[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07K 14/02
C07K 14/045 C07K 14/11
C07K 5/078 C07K 5/11
C07K 5/103 A61K 38/07
A61K 38/16 G01N 33/68
A61P 31/12

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99810388.8

[43]公开日 2001年10月3日

[11]公开号 CN 1315963A

[22]申请日 1999.8.25 [21]申请号 99810388.8

[30]优先权

[32]1998.9.1 [33]EP [31]98870186.8

[32]1999.3.29 [33]EP [31]99870062.9

[86]国际申请 PCT/EP99/06231 1999.8.25

[87]国际公布 WO00/12547 英 2000.3.9

[85]进入国家阶段日期 2001.2.28

[71]申请人 基因创新有限公司

地址 比利时根特

[72]发明人 E·德普拉 H·梅雷尔斯

G·梅尔滕斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 谭明胜

权利要求书4页 说明书32页 附图页数20页

[54]发明名称 结合膜联蛋白的苯并二氮杂䓬类和苯并硫杂䓬因衍生物和HBSAG肽,其组合物和用途

[57]摘要

本发明涉及可以抑制膜联蛋白和膜联蛋白结合蛋白之间的相互作用的衍生有肽的1,4-苯并二氮杂䓬类或1,4-苯并硫杂䓬因类。具体地说,本发明涉及能抑制膜联蛋白和结合膜联蛋白的病毒蛋白质之间的相互作用的1,4-苯并二氮杂䓬类或1,4-苯并硫杂䓬因类衍生物,所述病毒蛋白质是例如HBV的HbsAg蛋白、巨细胞病毒的糖蛋白B或者来自流感病毒的任何膜联蛋白结合蛋白。这些1,4-苯并二氮杂䓬类或1,4-苯并硫杂䓬因衍生物可以用来预防或治疗其中涉及膜联蛋白家族成员和膜联蛋白结合蛋白之间的相互作用的疾病,例如HBV和/或HDV感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1. 根据式I的衍生有一个或多个包含膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽或者其部分的化合物，前提是所述化合物不是BDA753，根据式II的化合物或根据式III的化合物。

2. 根据式IV的衍生有一个或两个肽R和/或R'的化合物，使得R，R'和/或 R+R'代表包含膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽或者其部分，前提是所述化合物不是BDA753或根据式III的化合物。

3. 根据式V的衍生有包含膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽或者其部分，R，的化合物。

4. 根据权利要求1-3任一项的化合物，其中所述膜联蛋白结合蛋白是病毒蛋白。

5. 根据权利要求4的化合物，其中所述病毒蛋白是HBV的表面抗原。

6. 根据权利要求4的化合物，其中所述病毒蛋白是巨细胞病毒的糖蛋白B。

7. 根据权利要求4的化合物，其中所述病毒蛋白是从任何流感病毒株衍生的蛋白，条件是该流感蛋白结合膜联蛋白V。

8. 根据权利要求4的衍生有一个或多个下面的肽或者其部分的化合物：

KTCTTPAQGN (SEQ ID NO 1)

$(FAKYLWEWASVR)_2$-KKGK(bio)GA (SEQ ID NO 4)

FAKYLW-K(bio) (SEQ ID NO 5)

FAKYLWEW-K(bio) (SEQ ID NO 6)

FAKYLWEWAS-K(bio) (SEQ ID NO 7)

FAKYLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 8)

FAKYLW (SEQ ID NO 9)

FAKYLWEW (SEQ ID NO 10)

FAKYLWEWAS (SEQ ID NO 11)

FAKYLWEWASVR (SEQ ID NO 2)

FARFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 12)

FGKFLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 13)

LGKYLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 14)

FAKFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 15)

KYGW-K(bio) (SEQ ID NO 16)

KFGW-K(bio) (SEQ ID NO 17)

RFGW-K(bio) (SEQ ID NO 18)

AYLW-K(bio) (SEQ ID NO 19)

AFLW-K(bio) (SEQ ID NO 20)

KYLW-K(bio) (SEQ ID NO 21)

RFLW-K(bio) (SEQ ID NO 22)

KFLW-K(bio) (SEQ ID NO 23)

FARFLWEWASVR (SEQ ID NO 24)

FGKFLWEWASAR (SEQ ID NO 25)

LGKYLWEWASAR (SEQ ID NO 26)

FAKFLWEWASVR (SEQ ID NO 27)

KYGW (SEQ ID NO 28)

KFGW (SEQ ID NO 29)

RFGW (SEQ ID NO 30)

AYLW (SEQ ID NO 31)

AFLW (SEQ ID NO 32)

KYLW (SEQ ID NO 33)

RFLW (SEQ ID NO 34)

KFLW (SEQ ID NO 35)

9. 具有下面氨基酸序列之一的多肽或者其部分：

FAKYLW-K(bio) (SEQ ID NO 5)

FAKYLWEW-K(bio) (SEQ ID NO 6)

FAKYLWEWAS-K(bio) (SEQ ID NO 7)

5

FAKYLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 8)

FARFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 12)

FGKFLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 13)

LGKYLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 14)

FAKFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 15)

KYGW-K(bio) (SEQ ID NO 16)

KFGW-K(bio) (SEQ ID NO 17)

RFGW-K(bio) (SEQ ID NO 18)

AYLW-K(bio) (SEQ ID NO 19)

AFLW-K(bio) (SEQ ID NO 20)

KYLW-K(bio) (SEQ ID NO 21)

RFLW-K(bio) (SEQ ID NO 22)

KFLW-K(bio) (SEQ ID NO 23)

FAKYLW (SEQ ID NO 9)

FAKYLWEW (SEQ ID NO 10)

FAKYLWEWAS (SEQ ID NO 11)

FARFLWEWASVR (SEQ ID NO 24)

FGKFLWEWASAR (SEQ ID NO 25)

LGKYLWEWASAR (SEQ ID NO 26)

FAKFLWEWASVR (SEQ ID NO 27)

KYGW (SEQ ID NO 28)

KFGW (SEQ ID NO 29)

RFGW (SEQ ID NO 30)

AYLW (SEQ ID NO 31)

AFLW (SEQ ID NO 32)

KYLW (SEQ ID NO 33)

RFLW (SEQ ID NO 34)

KFLW (SEQ ID NO 35)

10. 根据权利要求1-9任一项的化合物，它包含或者由其中所有氨基酸是L形式或者其中所有氨基酸是D形式的多肽组成。

11. 根据权利要求1-10任一项的化合物，它包括或者由反向-反

转多肽组成。

12. 制备根据权利要求1-11任一项的具体分子的方法。

13. 根据权利要求1-11任一项的分子制备预防或治疗其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何疾病，更具体地预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗HBV和/或HDV感染，巨细胞病毒感染或流感病毒感染的药物的用途。

14. 根据 BDA753、式 II 的化合物或者根据式 III 的化合物制备预防或治疗其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何疾病，更特别地预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染的药物的用途。

15. 包含下面氨基酸序列的肽或者其部分：AYGW(SEQ ID NO3)用于制备预防或治疗其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何疾病，更特别地预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染的药物的用途。

16. 一种药物组合物，它含有至少一种根据权利要求1-11或13-15的分子，用于预防或治疗其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何疾病，更特别地预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗HBV和/或HDV感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染。

17. 根据权利要求1-11或13-15的化合物在筛选阻断膜联蛋白和与膜联蛋白相互作用的蛋白质，更特别地，与膜联蛋白相互作用的病毒蛋白，更特别地，HBV的HBsAg蛋白、巨细胞病毒的糖蛋白B或任何流感病毒的膜联蛋白结合蛋白之间的结合的分子的方法中的用途。

01.02.28

说　明　书

结合膜联蛋白的苯并二氮杂䓬类和苯并硫杂叶庚因衍生物和 HBSAG 肽，其组合物和用途

发明领域

本发明涉及发现衍生有肽链的 1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-苯并硫杂叶庚因类抑制 HbsAg 对膜联蛋白 V 的结合。因此本发明涉及这样的分子及其治疗乙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒感染或者其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何其它疾病的用途。

发明背景

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝 DNA 病毒，其特征在于显著的趋肝性和物种特异性。丁型肝炎病毒(HDV)代表 HBV 的天然存在的亚病毒随伴体(Rizetto 等，1986)。HBV 引起主要的医学问题，例如慢性肝病和肝细胞癌症(Schroder 和 Zentgraf，1990)。与单独的 HBV 感染相比 HDV 超感染通常更加严重。估计全球有 300 百万人携带该病毒，同时在美国就有 7 万携带者共同感染 HDV。

在 HBV 基因组中，更具体地说在 S 基因中(也参见下面自然段)，存在天然序列变异。以该序列差异百分率为基础设计了 HBV 的 A 至 F 基因型(有关综述参见 Magnius 和 Norder，1995)。

被膜 HBV 由三种相关的糖蛋白组成，将它们称作乙型肝炎表面抗原(HBsAg)，其是 S 基因的产物：1)“小”跨膜蛋白，也称之为主要蛋白或小 S-蛋白，由 226 个氨基酸(aa)组成，2)“中”蛋白质，其包括小 S-蛋白和在 N-末端的相应于 S 基因的前-S2 区的 55 个另外的氨基酸，和 3)“大”蛋白质由相应于下面区的 389 或 400 个氨基酸组成：S+前-S2+前-S1(108-119N-末端 aa)(Heerman 等，1984；Robinson 等，1987)。HDV 的被膜也完全由 HBV 衍生并且主要由小 HBsAg，5-10%中 HBsAg 组成，没有大 HBsAg 或者大 HBsAg 少于 1%(Bonino 等，1986)。

流感病毒引起复发性流行病，甚至是全球性传染病。这些传染病爆发期间的缺勤导致巨大经济损失并且伴随住院率增加，甚至导致源于呼吸病的死亡(有关综述参见 Cox 和 Fukuda，1998)。

巨细胞病毒（cytomegalovirus）是疱疹病毒家族的一个成员并

且是无免疫应答个体例如艾滋病患者的重要的病原体。在疱疹病毒的包膜内存在称之为糖蛋白 B 的蛋白质。证明该蛋白质对于感染是必需的，所述感染包括进入宿主细胞和细胞至细胞的传播(Cai 等,1988)。

膜联蛋白 V(也称之为内联蛋白 II,胎盘抗凝蛋白,PP4 或脂皮质蛋白 V)是结构上相关的 Ca^{2+}-依赖性磷脂-结合蛋白家族的一个成员，已知为分子量在 32-67kDa 之间的膜联蛋白(Klee,1988;Zaks 和 Creutz,1990)。在各种组织中发现膜联蛋白 V,例如肝,脾,肺,肠和胎盘(Walker 等,1990)。曾经描述过该蛋白质以 Ca^{2+}-依赖性方式结合胎盘膜(Haigler 等,1987)并且体外抑制血液凝固(Grundmann 等,1988)和磷脂酶 A2 活性(Pepinsky 等,1988)。其它研究人员证明膜联蛋白 V 行为象整合膜蛋白并且形成钙-选择性阳离子通道(Rojas 等,1990;Bianchi 等,1992)。

最近证明 1,4-苯并二氮杂䓬类(Hofmann 等,1998)和 1,4-苯并硫杂䓬因类(Kaneko 等,1997a,b)能结合膜联蛋白 V。膜联蛋白 II 与膜联蛋白 V 相关并且也结合 1,4-苯并二氮杂䓬类(Hofmann 等,1998)。膜联蛋白也起着大量的与非病毒蛋白质结合的作用,所述非病毒蛋白质例如胶原蛋白,腱生蛋白,肌动蛋白,突触蛋白,钙影蛋白,胰岛素受体,纤溶酶原等等(有关综述参见 Sheldon 和 Chen,1996)。

我们最近证明人肝质膜上存在的膜联蛋白 V,以 Ca^{2+}-依赖性方式特异性结合“小”HBsAg(Hertogs 等, 1993; WO94/01554)。用天然人肝膜联蛋白 V 或重组膜联蛋白 V 免疫的兔，或者用兔抗膜联蛋白 VIgG 的 $F(ab')_2$-片段免疫的鸡自发性产生特异性识别 HBsAg 的抗-特应抗体(Ab2)的发现进一步支持 HBsAg 和膜联蛋白 V 之间的受体-配体关系(Hertogs 等, 1994)。我们还证明 HDV 颗粒通过包含 HBV 包膜的 HBsAg 结合膜联蛋白 V(de Bruin 等,1994)。WO97/07268 中描述了膜联蛋白 V 结合中涉及的 HBsAg 上的位点位置。该区域中这些位点由“小”HBsAg 的 100-160 个氨基酸组成,估计其位于该病毒的外表面(有关综述参见 Berting 等,1995)。

也证明了流感病毒与膜联蛋白 V 的结合(Huang 等,1996)和巨细胞病毒与膜联蛋白 II 的结合(Pietropaolo 和 Compton,1997)。

从上述文献清楚得知 HBV 和/或 HDV 感染以及其它病毒感染例如流感和巨细胞病毒感染依然是一个主要的健康问题。因此开发出干扰 HBV 和/或 HDV 或这些其它病毒的生活周期的新的药物依然是一个主要的需求。以 HBV 和/或 HDV 或这些其它病毒与膜联蛋白的结合被抑制这样一种方式结合膜联蛋白的化合物可能是干扰这些病毒的生活周期的好的候选者，因此可能是用作治疗病毒感染的药物的好的候选者。因此，迫切需要提供与膜联蛋白特异性作用，同时抑制 HBV 和/或 HDV 或这些其它病毒与膜联蛋白的相互作用的分子。

本发明的目的

本发明的目的是抑制膜联蛋白与膜联蛋白结合蛋白的相互作用。

本发明更具体的目的是抑制膜联蛋白与能结合膜联蛋白的病毒蛋白的相互作用。

本发明另一个更具体的目的是抑制膜联蛋白 V 与 HBV 的表面抗原的相互作用。

本发明另一个更具体的目的是抑制膜联蛋白 II 与巨细胞病毒的糖蛋白 B 的相互作用。

本发明另一个更具体的目的是抑制膜联蛋白 V 与衍生自结合膜联蛋白 V 的任何流感病毒株的蛋白质的相互作用。

本发明另一个目的是预防或治疗其中涉及膜联蛋白家族成员与膜联蛋白结合蛋白之间的相互作用的任何疾病。

本发明更具体的目的是预防或治疗其中涉及膜联蛋白家族成员与病毒蛋白之间的相互作用的任何病毒疾病。

本发明另一个更具体的目的是预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染。

本发明另一个更具体的目的是预防或治疗巨细胞病毒感染。

本发明另一个更具体的目的是预防或治疗流感病毒感染。

认为通过下面的实施方案实现本发明的所有这些目的。

本发明的详细描述

本文描述的本发明引用先前公开的工作和未结案专利申请。举例来说，这样的工作由科技文献，专利或未结案专利申请组成。上文或下文中引用的所有这些公开物和申请在这里引作参考。

本发明涉及衍生有一个或多个肽的 1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-

苯并硫杂叶庚因类。

具体地说，本发明涉及衍生有一个或多个肽使得该衍生物抑制膜联蛋白和一些膜联蛋白结合蛋白之间的相互作用的 1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-苯并硫杂叶庚因类。

结合 HBV 病毒进入中涉及的分子——膜联蛋白 V 的 1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-苯并硫杂叶庚因类不抑制 HBV 对膜联蛋白 V 的结合。本申请以这些化合物衍生肽配体时膜联蛋白 V 和 HBV 的 HBsAg 之间的相互作用可以被抑制的惊人发现为基础。这些新的 1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-苯并硫杂叶庚因类的衍生物因此是干扰 HBV 和/或 HDV 和结合一般来说膜联蛋白或者更具体地说膜联蛋白 V 的其它病毒的生活周期的药物发现中的新的前导。这些分子一般可以干扰膜联蛋白与另一种蛋白质的任何相互作用。通过将 1,4-苯并二氮杂䓬类或 1,4-苯并硫杂叶庚因类选择性衍生化，可以以特定途径导向这些相互作用的任一种。

术语“膜联蛋白”(也称之为内联蛋白 II、胎盘抗凝蛋白、PP4 或脂皮质蛋白 V)指结构上相关的 Ca^{2+}-依赖性磷脂-结合蛋白家族的任何成员，已知为分子量在 32-67kDa 之间的膜联蛋白(Klee,1988;Zaks 和 Creutz,1990)。更具体地说，所述膜联蛋白可以是表现出结合 HBV 的 HBsAg 和结合流感病毒的膜联蛋白 V，或者已知结合巨细胞病毒的糖蛋白 B 的膜联蛋白 II。但是本发明中指定的膜联蛋白不局限于这些膜联蛋白，而且也可以是与膜联蛋白结合蛋白结合的所有其它膜联蛋白。

所述 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因可以带有本领域公知的任何修饰，例如 WO94/11360 和 WO92/12148 中提到的那些。优选地，1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因具有式 I(图 1)所示结构，其中：

*在 1 位：- 苯并硫杂叶庚因类具有一个硫原子(X 代表 S)；X 也可以是 SO_n，其中 n=0,1,2；

- 苯并二氮杂䓬类具有一个氮原子(X 代表 N)，其在 1 位另外修饰有羧甲基($-CH_2COOH$)之后，允许通过肽的 C-末端连接的或者通过肽的 N-末端连接的另外修饰有一个权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合

蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分。在N不修饰有一个肽的情况下，修饰可以是H，烷基，苯基，-COZ，其中Z代表H，烷基，苯基或取代的苯基；

*1，2，3，4，5位可以以邻接位置形成双键；如果是这种情况，则侧链R_2，R_4，R_5或R_7不存在；

*2和/或2’位上的R_1和/或R_2可以代表H，胺，烷基或者2位可以被氧化(=O)。在R_1和/或R_2是胺的情况下，其可以进一步地或者直接通过肽的C-末端连接或者通过象戊二醛或琥珀酐这样的连接基团连接于肽的N-末端而被一个权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分取代；

*3和/或3’位上的R_3和/或R_4可以代表H，胺或烷基。在R_3和/或R_4是胺的情况下，其可以进一步地或者直接通过肽的C-末端连接或者通过象戊二醛或琥珀酐这样的连接基团连接于肽的N-末端而被一个权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分取代；

*4位上的R_5可以代表4位另外修饰有羧甲基(-CH_2COOH)后或者直接通过肽的C-末端连接的或者通过肽的N-末端连接的权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分的支链。在R_5不是权利要求书中定义的肽的情况下，R_5可以代表H，烷基，-CO-R_{12}或者3-(1-(4-苄基)哌啶基)丙酰基)；

*R_6和/或R_7代表H或烷基或苯基，可能进一步取代有烷基，氰基，卤素，硝基，烷基烷氧基，烷酰基，羧基，烷酰基烷氧基，氨基甲酰基；

*R_8，R_9，R_{10}和/或R_{11}代表H，烷基，氰基，卤素，硝基，烷基烷氧基，烷酰基，羧基，烷酰基烷氧基，氨基甲酰基；

*R_{12}代表H或烷基或可能进一步取代有烷基，氰基，卤素，硝基，烷基烷氧基，烷酰基，羧基，烷酰基烷氧基，氨基甲酰基的苯基。

用于制备本发明的分子的1，4-苯并二氮杂䓬或1，4-苯并硫杂䓬因还可以是该结构式的任何药学可接受盐。用于制备本发明的分子的1，4-苯并二氮杂䓬可以是所有本领域公知的衍生物，例如但不限于阿普唑仑，溴西泮，chloordiazepoxide，氯巴占，氯硝西泮，氯氮卓，地西泮，氟地西泮，氯硝西泮，氟西泮，劳拉西泮，硝西泮，奥沙西泮，替马西泮，三唑仑，BDA250，BDA452，BDA753(也参见图6和Hoffman

等,1998)。但是,本发明的化合物不是BDA753,一种根据式II的化合物(FR2479818;图2)或者一种根据式III的化合物(Nachman等,1998;图3)。1,4-苯并硫杂吖庚因也可以是本领域任何公知的衍生物,例如但不限于K-201(Kaneko等,1997a)。

根据本发明,这些 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂吖庚因在2,2',3 和/或 3'位(在式 I 中)修饰有胺后衍生有一种多肽,其可以在2,2',3 和/或 3'位(在式 I 中)连接(两个肽可以在相同的位置连接)。该肽可以或者直接通过该肽的C-末端连接胺,或者该肽可以通过使用一个连接基团通过该肽的N-末端连接。

所述连接基团可以是使两个胺残基连接的任何连接基团。优选所述连接基团是二醛,例如戊二醛或者酸酐,例如琥珀酐。其它可能的连接基团也可以由Pierce(Rockford,IL,USA)提供。图9和图10给出了通过利用一个连接基团使肽与 1,4-苯并二氮杂䓬连接的基础反应的实施例。

所述多肽也可以连接到1和/或4位(在式I中)。在这种情况下,所述肽或者通过肽的C-末端连接或者在1和/或4位分别另外修饰有羧甲基(-CH_2COOH)之后该肽通过N-末端连接。

在一个优选的实施方案中,肽与在5位处被苯基取代的1,4-苯并二氮杂䓬的1和/或3位连接。一个肽,R,可以通过其C-末端与所述的3位修饰有胺之后的1,4-苯并二氮杂䓬的3位连接,或者,一个肽,R',可以通过其N-末端与所述1位修饰有羧甲基之后的1,4-苯并二氮杂䓬的1位连接,或者,两个肽,R和R',分别与所述的1,4-苯并二氮杂䓬的3和1位连接。因此,本发明涉及所述衍生有一个或两个肽,R和/或R',的1,4-苯并二氮杂䓬,R,R'和/或R+R'代表包含膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽或者其部分。所述1,4-苯并二氮杂䓬然后具有式IV所示的结构(图4),其中:

*R,R'和/或 R+R'构成包含膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽或者其部分。在只有R是一个肽的情况下,1位是甲基化的或羧甲基化的。在只有R'是一个肽的情况下,3位含有胺;

*X代表可以被-$COCH_3$修饰的肽的N-末端;

*Y代表可以被-NH_2或-赖氨酸-生物素修饰的肽的C-末端。

用于通过Fmoc为基础的肽合成的所述1,4-苯并二氮杂䓬衍生物

的合成的结构单元可以从 Neosystem(Strasbourg,法国)获得。

在本发明另一个实施方案中,通过使用如上所述的连接基团,肽,R,通过其 N-末端与所述 1,4-苯并二氮杂䓬(在 5 位被苯基取代)的 3 位连接。在这种情况下,1 位的氮原子(式 I)被甲基化或羧甲基化。因此本发明涉及衍生有包含膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽, R, 或者其部分的根据式 V 的化合物。

与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂䓬庚因连接的多肽可以是所有的包括从已知结合膜联蛋白的蛋白质衍生的膜联蛋白结合表位的多肽。

术语“膜联蛋白结合蛋白”指能与膜联蛋白形成复合物的所有蛋白质。

术语“膜联蛋白结合表位”指与膜联蛋白特异性相互作用形成膜联蛋白结合蛋白 - 膜联蛋白复合物的膜联蛋白结合蛋白的区。“膜联蛋白结合表位”包括至少 2, 优选 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35 或更多个氨基酸的膜联蛋白结合蛋白。通过本领域公知的任何技术可以确定表位或者通过本领域公知的各种计算机属性模型预示。

术语“多肽”或“肽”可以互换使用,指与其从中衍生的蛋白质的部分相同或相近的氨基酸的聚合物。所述多肽可以由多种氨基酸组成,优选地,多肽由少于 13 个氨基酸,优选 12,11,10,9,8,7,6,5,4,3 或 2 个氨基酸组成,这样一个膜联蛋白结合表位包含在该多肽中。在本发明化合物具有根据式 IV 的结构的情况下,肽 R 或 R'只由 1 个氨基酸组成和/或膜联蛋白结合表位包含在代表 R+R'的多肽中也是可能的。应该注意从膜联蛋白结合蛋白衍生的并且形成与膜联蛋白的结合区的多肽可能是构象结合区的一部分,因此不能由膜联蛋白结合蛋白的接近的氨基酸序列组成。

通过任何本领域公知的方法,例如,如 Houbenweyl(1974)和 Atherton 和 Shepard(1989)描述的经典化学合成,或者利用如 Maniatis 等(1982)描述的重组 DNA 技术,可以制备多肽。术语“多肽”不指也不排除多肽的翻译后修饰, 例如糖基化, 酰基化, 磷酸化, 用脂肪酸修饰等等。该定义中包括例如含有一个或多个氨基酸类似物(包括非天然氨基酸或 D- 异构形式)的多肽,具有被取代的键的多

肽，该多肽的突变版本或天然序列变体(例如，如上所述相应于 HBV 的 A 至 F 基因型的 HBV 的 HBsAg 蛋白质的肽变体)，半胱氨酸残基中间有二硫键的多肽，反向-反转（reverso-inverso）多肽(例如 Guichard 等所述的，1994)，以及本领域公知的其他修饰。

在一个具体实施方案中，从已知结合膜联蛋白的病毒蛋白衍生与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因连接的多肽。术语“从病毒蛋白衍生的多肽”指氨基酸的聚合物，其与从中衍生的病毒蛋白的部分相同或相近并且包含该病毒蛋白的膜联蛋白结合表位。

在另一个具体的实施方案中，从已知抗原(Heerman 等，1984；Robinson 等，1987)HBV 的 HBsAg 蛋白质衍生与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因连接的多肽。这里所使用的术语“从 HBV 的 HBsAg 蛋白质衍生的多肽”指一种具有氨基酸序列的多肽，其与“小” HBsAg 的氨基酸序列的部分相同或相近并且包含 HBsAg 的膜联蛋白结合表位。应该清楚“从 HBV 的 HBsAg 蛋白质衍生的多肽”可以从 HBV 的任何基因型衍生（基因型 A 至 F，Magnius 和 Norder1995)。

在本发明另一个具体的实施方案中，从巨细胞病毒的糖蛋白 B 衍生与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因连接的多肽。术语“从糖蛋白 B 衍生的多肽”指一种氨基酸的聚合物，其与巨细胞病毒的糖蛋白 B 的部分相同或相近并且包含糖蛋白 B 的膜联蛋白结合表位。

在本发明另一个具体的实施方案中，从来自任何流感病毒株的蛋白质衍生与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因连接的多肽，条件是该流感蛋白质结合膜联蛋白 V。术语“从来自流感病毒株的蛋白质衍生的多肽”指一种氨基酸的聚合物，其与来自流感病毒株的蛋白质的部分相同或相近并且包含流感蛋白的膜联蛋白结合表位。

此外，本发明目的在于提供具有肽衍生化作用的 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因，所述肽衍生化包括如上定义的或从 HBV 和/或 HDV、巨细胞病毒或流感病毒的所有突变株产生的肽的任何组合。

在一个具体的实施方案中，本发明提供了衍生有一个肽的 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叶庚因分子，其中所述肽包括包含下面 HBV 表面抗原的区域之一的膜联蛋白结合表位的少于 13 个氨基酸：

KTCTTPAQGN (SEQ ID NO 1)

FAKYLWEWASVR (SEQ ID NO 2)

曾经描述过这在 HBsAg 与膜联蛋白 V 的相互作用中涉及过(WO97/07268 和本发明)。

更具体地说,本发明的与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叮庚因衍生物连接的多肽涉及包括从 HBV 的 HBsAg 的 122-131 位氨基酸序列衍生的 2-10 个氨基酸的多肽,如 SEQ ID NO1 所示。更具体地说,涉及包括或者由下面氨基酸(aa)序列组成的肽:

aa 122-123, aa 123-124, aa 124-125, aa 125-126, aa 126-127, aa 127-128, aa 128-129, aa 129-130, aa 130-131, aa 122-124, aa 123-125, aa 124-126, aa 125-127, aa 126-128, aa 127-129, aa 128-130, aa 129-131, aa 122-125, aa 123-126, aa 124-127, aa 125-128, aa 126-129, aa 127-130, aa 128-131, aa 122-126, aa 123-127, aa 124-128, aa 125-129, aa 126-130, aa 127-131, aa 122-127, aa 123-128, aa 124-129, aa 125-130, aa 126-131, aa 122-128, aa 123-129, aa 124-130, aa 125-131, aa 122-129, aa 123-130, aa 124-131, aa 122- 130, aa 123-131, aa 122-131.

类似地,本发明的与 1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂叮庚因衍生物连接的多肽特别涉及包括从 HBV 的 HBsAg 的 158-169 位氨基酸序列衍生的 2-12 个氨基酸的多肽,如上 SEQ ID NO2 所示。更具体地说,涉及包括或者由下面氨基酸(aa)序列组成的肽:

aa 158-159, aa 159-160, aa 160-161, aa 161-162, aa 162-163, aa 163-164, aa 164-165, aa 165-166, aa 166-167, aa 167-168, aa 168-169, aa 158-160, aa 159-161, aa 160-162, aa 161-163, aa 162-164, aa 163-165, aa 164-166, aa 165-167, aa 166-168, aa 167-169, aa 158-161, aa 159-162, aa 160-163, aa 161-164, aa 162-165, aa 163-166, aa 164-167, aa 165-168, aa 166-169, aa 158-162, aa 159-163, aa 160-164, aa 161-165, aa 162-166, aa 163-167, aa 164-168, aa 165-169, aa 158-163, aa 159-164, aa 160-165, aa 161-166, aa 162-167, aa 163-168, aa 164-169, aa 158-164, aa 159-165, aa 160-166, aa 161-167, aa 162-168, aa

163-169, aa 158-165, aa 159-166, aa 160-167, aa 161-168, aa 162-169, aa 158-166, aa 159-167, aa 160-168, aa 161-169, aa 158-167, aa 159-168, aa 160-169, aa 158-168, aa 159-169, aa 158-169.

更具体地说，本发明涉及衍生有下面肽或者其部分之一的 1,4-苯并二氮杂䓬：

(FAKYLWEWASVR)$_2$-KKGK(bio)GA (SEQ ID NO 4)

FAKYLW-K(bio) (SEQ ID NO 5)

FAKYLWEW-K(bio) (SEQ ID NO 6)

FAKYLWEWAS-K(bio) (SEQ ID NO 7)

FAKYLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 8)

FAKYLW (SEQ ID NO 9)

FAKYLWEW (SEQ ID NO 10)

FAKYLWEWAS (SEQ ID NO 11)

FAKYLWEWASVR (SEQ ID NO 2)

IGP1362 或者其部分与 BDA250 或 BDA452 或者其任何衍生物连接得到具有在阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 的相互作用中的提高的特异性的化合物。应该注意并不是所有的序列得到相同的结果。例如，也从 HBsAg(aa115-125)衍生的 IGP1363 肽代表的序列就不抑制膜联蛋白 V 与 HBsAg 的结合。

在本发明另一个具体的实施方案中，1,4-苯并二氮杂䓬或 1,4-苯并硫杂吖庚因衍生有由下面氨基酸序列组成的多肽或者其部分：

FARFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 12)

FGKFLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 13)

LGKYLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 14)

FAKFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 15)

KYGW-K(bio) (SEQ ID NO 16)

KFGW-K(bio) (SEQ ID NO 17)

RFGW-K(bio) (SEQ ID NO 18)

AYLW-K(bio) (SEQ ID NO 19)

AFLW-K(bio) (SEQ ID NO 20)

KYLW-K(bio) (SEQ ID NO 21)

RFLW-K(bio) (SEQ ID NO 22)

KFLW-K(bio) (SEQ ID NO 23)

FARFLWEWASVR (SEQ ID NO 24)

FGKFLWEWASAR (SEQ ID NO 25)

LGKYLWEWASAR (SEQ ID NO 26)

FAKFLWEWASVR (SEQ ID NO 27)

KYGW (SEQ ID NO 28)

KFGW (SEQ ID NO 29)

RFGW (SEQ ID NO 30)

AYLW (SEQ ID NO 31)

AFLW (SEQ ID NO 32)

KYLW (SEQ ID NO 33)

RFLW (SEQ ID NO 34)

KFLW (SEQ ID NO 35)

上述肽或者其部分可以例如如上所述在1,2,2',3,3'和/或4位与1,4-苯并二氮杂䓬或1,4-苯并硫杂䓬因连接。

在一个优选的实施方案中,在根据式 IV 的 1,4-苯并二氮杂䓬的1(R')和/或3(R)位连接所述的肽。然后两个肽的加和(R+R')代表如上所述的肽或者其部分。因此,1,4-苯并二氮杂䓬可以在上述肽的任何位置。例如,当 R+R'=FAKYLWEWASVR(SEQ ID NO2)时, R 和/或 R'可以以各种方式连接 1,4-苯并二氮杂䓬(Bdz):

Bdz-FAKYLWEWASVR: R' = FAKYLWEWASVR (SEQ ID NO 2); 或

F-Bdz-AKYLWEWASVR: R = F, R' = AKYLWEWASVR (SEQ ID NO 36); 或

FA-Bdz-KYLWEWASVR: R = FA (SEQ ID NO 37), R' = KYLWEWASVR (SEQ ID NO 38); 或

FAK-Bdz-YLWEWASVR: R = FAK (SEQ ID NO 39), R' = YLWEWASVR (SEQ ID NO 40); 或

FAKY-Bdz-LWEWASVR: R = FAKY (SEQ ID NO 41), R' = LWEWASVR (SEQ ID NO 42); 或

FAKYL-Bdz-WEWASVR: R = FAKYL (SEQ ID NO 43); R' = WEWASVR (SEQ ID NO 44); 或

FAKYLW-Bdz-EWASVR: R = FAKYLW (SEQ ID NO 9), R' = EWASVR (SEQ ID NO 45); 或

FAKYLWE-Bdz-WASVR: R = FAKYLWE (SEQ ID NO 46), R' = WASVR (SEQ ID NO 47); 或

FAKYLWEW-Bdz-ASVR: R = FAKYLWEW (SEQ ID NO 10), R' = ASVR(SEQ ID NO 48); 或

FAKYLWEWA-Bdz-SVR: R = FAKYLWEWA (SEQ ID NO 49), R' = SVR (SEQ ID NO 50); 或

FAKYLWEWAS-Bdz-VR: R = FAKYLWEWAS (SEQ ID NO 11), R' = VR (SEQ ID NO 51); 或

FAKYLWEWASV-Bdz-R: R = FAKYLWEWASV (SEQ ID NO 52), R' = R; 或

FAKYLWEWASVR-Bdz: R = FAKYLWEWASVR (SEQ ID NO 2);

其中通过 3 位修饰有胺之后的肽的 C-末端在 3 位连接 R 和/或通过 1 位修饰有羧甲基之后的肽的 N-末端在 1 位连接 R'。在只有 R 是一个肽的情况下，1 位被甲基化或羧甲基化。在只有 R'是一个肽的情况下，3 位包含胺。图 8 给出了这些化合物的实施例。

1,4-苯并二氮杂䓬也可以连接上述肽的仅仅一部分。例如，可以在缺失一个或多个氨基酸的上述肽中的任何位置连接 1,4-苯并二氮杂䓬。

当 R+R'=FAKYLWEWASVR(SEQ ID NO2)时，其部分可以以任何方式与 1,4-苯并二氮杂䓬(Bdz)连接，例如：

Bdz-AKYLWEWASVR; 或　　Bdz-KYLWEWASVR; 或

F-Bdz-KYLWEWASVR; 或　　F-Bdz-YLWEWASVR; 或

FA-Bdz-YLWEWASVR; 或　　FA-Bdz-LWEWASVR; 或

FAK-Bdz-LWEWASVR; 或　　FAK-Bdz-WEWASVR; 或

FAKY-Bdz-WEWASVR; 或　　FAKY-Bdz-EWASVR; 或

FAKYL-Bdz-EWASVR; 或　　FAKYL-Bdz-WASVR; 或

FAKYLW-Bdz-WASVR 或 ；　　FAKYLW-Bdz-ASVR; 或
FAKYLWE-Bdz-ASVR; 或　　FAKYLWE-Bdz-SVR; 或
FAKYLWEW-Bdz-SVR; 或　　FAKYLWEW-Bdz-VR; 或
FAKYLWEWA-Bdz-VR; 或　　FAKYLWEWA-Bdz-R; 或
FAKYLWEWAS-Bdz-R; 或　　FAKYLWEWAS-Bdz; 或
FAKYLWEWASV-Bdz;

其中如上所述，肽通过其 C-末端和/或 N-末端连接。

如上所述的肽或者其部分也可以利用如上所述的连接基团通过它们的 N-末端与 3 位连接。图 11 给出了这样的化合物的实施例。

本发明进一步涉及由下面氨基酸序列或者其部分之一组成的多肽：

FAKYLW-K(bio) (SEQ ID NO 5)
FAKYLWEW-K(bio) (SEQ ID NO 6)
FAKYLWEWAS-K(bio) (SEQ ID NO 7)
FAKYLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 8)
FARFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 12)
FGKFLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 13)
LGKYLWEWASAR-K(bio) (SEQ ID NO 14)
FAKFLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 15)
KYGW-K(bio) (SEQ ID NO 16)
KFGW-K(bio) (SEQ ID NO 17)
RFGW-K(bio) (SEQ ID NO 18)
AYLW-K(bio) (SEQ ID NO 19)
AFLW-K(bio) (SEQ ID NO 20)
KYLW-K(bio) (SEQ ID NO 21)
RFLW-K(bio) (SEQ ID NO 22)
KFLW-K(bio) (SEQ ID NO 23)
FAKYLW (SEQ ID NO 9)

FAKYLWEW (SEQ ID NO 10)

FAKYLWEWAS (SEQ ID NO 11)

FARFLWEWASVR (SEQ ID NO 24)

FGKFLWEWASAR (SEQ ID NO 25)

LGKYLWEWASAR (SEQ ID NO 26)

FAKFLWEWASVR (SEQ ID NO 27)

KYGW (SEQ ID NO 28)

KFGW (SEQ ID NO 29)

RFGW (SEQ ID NO 30)

AYLW (SEQ ID NO 31)

AFLW (SEQ ID NO 32)

KYLW (SEQ ID NO 33)

RFLW (SEQ ID NO 34)

KFLW (SEQ ID NO 35)

这些肽是天然的或者是HBV基因型A/B的HBsAg的膜联蛋白结合表位的同源变体。还出人意料地发现它们抑制膜联蛋白 V 和 HBV 的 HBsAg之间的相互作用。

在根据本发明的化合物中使用的多肽可以由L形式或D形式或者其混合形式的氨基酸组成。在优选的实施方案中，本发明的化合物特征在于所有的氨基酸都是L形式。在另一个优选的实施方案中，本发明的化合物特征在于所有的氨基酸都是D形式。

本发明还包括包含或者由如上所述多肽的反向-反转多肽(例如Guichard等，1994描述的)组成的化合物。

应该注意提到的所有的化合物可能是前导化合物，其上可以进一步改善 1,4-苯并二氮杂䓬/1,4-苯并硫杂叮庚因核心或肽配体的另外的衍生化作用。

本发明还涉及如上定义的多肽与带负电荷的磷脂例如磷脂酰丝氨酸的组合物。WO97/07268 中已经证实了磷脂酰丝氨酸和膜联蛋白之间的相互作用。所述多肽与带负电荷的磷脂成分的组合物可以是本领域公知的任何可能的方式，例如共价或非共价偶联分子的形式或脂

质体形式等。

本发明进一步涉及制备上述 1,4-苯并二氮杂䓬类或 1,4-苯并硫杂䓬因类衍生物的方法。用于制备 1,4-苯并二氮杂䓬类或 1,4-苯并硫杂䓬因的方法是本领域公知的。这些方法包括但不限于 Sternbach 等(1963),US3109843,US3116203,US3121114,US3123529 和 US3203990 描述的方法。1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-苯并硫杂䓬因类也可以以商业途径从 Sigma(Dreisenhofen,德国)或 Neosystem(Strasbourg,法国)购得。从膜联蛋白结合蛋白衍生的多肽,更具体地说,从结合膜联蛋白的病毒蛋白衍生的多肽,更具体地说从 HBV 和/或 HDV 的 HBsAg 衍生的多肽,从巨细胞病毒的糖蛋白 B 或者从任何流感病毒的膜联蛋白结合蛋白衍生的多肽通过本领域公知的任何方法与 1,4-苯并二氮杂䓬类或 1,4-苯并硫杂䓬因类连接。例如,通过使用(R,S)-Fmoc-3-氨基-N-1-羧甲基-2-氧代-5-环己基-1,4-苯并二氮杂䓬(FB03601;N eosystem,Strasbourg,法国,图 7)作为结构单元通过以 Fmoc 为基础的肽合成可以连接肽。图 8 给出了得到的分子的例子。通过利用 Pierce 产品目录(Pierce,Rockford,IL,USA)中描述的同型双功能连接基团通过肽的 N-末端使肽与 1,4-苯并二氮杂䓬的 3 位连接可以合成其它的 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物。图 9 或 10 给出了这样的反应。图 11 给出了得到的分子的例子。

本发明还涉及本发明的化合物制备预防或治疗其中涉及膜联蛋白家族成员和膜联蛋白结合蛋白之间的相互作用的任何疾病的药物的用途。

更特别地,本发明涉及本发明的化合物制备预防或治疗其中涉及病毒蛋白和膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病的药物的用途。

更特别地,本发明涉及本发明的化合物制备通过抑制 HBV 和/或 HDV 与膜联蛋白 V 的相互作用来干扰 HBV 和/或 HDV 的生活周期从而预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染的药物的用途。关于这一点,术语“HBV 和/或 HDV”的应用指 HBV 感染可以单独发生或者伴随 HDV 超感染这一点是清楚的。另一方面,HDV 感染不单独发生。换句话说,本发明的分子可以用于制备预防或治疗单独的 HBV 感染或混合的 HBV/HDV 感染

的药物。

本发明进一步涉及本发明的化合物制备通过抑制巨细胞病毒与膜联蛋白 II 的相互作用来干扰巨细胞病毒的生活周期从而预防或治疗巨细胞病毒感染的药物的用途。

本发明进一步涉及本发明的化合物制备通过抑制流感病毒与膜联蛋白 V 的相互作用来干扰流感病毒的生活周期从而预防或治疗流感病毒感染的药物的用途。

因此，本发明涉及本发明的化合物制备预防或治疗其中涉及膜联蛋白家族成员与蛋白质相互作用的任何疾病，更特别地涉及预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地涉及预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染的药物的用途。

本发明进一步涉及 DBA753、根据式 II 的化合物或者根据式 III 的化合物制备预防或治疗其中涉及膜联蛋白家族成员与蛋白质相互作用的任何疾病，更特别地预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染的药物的用途。

在本发明中，BDA753 特别用来抑制 HBV 与膜联蛋白 V 的相互作用。尽管证实了膜联蛋白 V 与衍生有 AYGW 的 1,4-苯并二氮杂䓬类和 1,4-苯并硫杂䓬因的结合(Hoffman 等，1998)，但是没有肽衍生化作用或者在 3 位只衍生有一个氨基酸的 1,4-苯并二氮杂䓬类不能抑制 HBV 的 HBsAg 与膜联蛋白 V 的相互作用。出我们意料的是用肽 AYGW 将 1,4-苯并二氮杂䓬衍生化得到能抑制 HBV 的 HBsAg 与膜联蛋白 V 的相互作用的化合物。

因此，本发明还涉及包含下面氨基酸序列或者其部分的肽的用途：AYGW(SEQ ID NO3)用于制备预防或治疗其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何疾病，更特别地预防或治疗其中涉及病毒蛋白和宿主膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染的药物的用途。

本发明进一步涉及一种预防或治疗其中涉及蛋白质与膜联蛋白家族成员相互作用的任何疾病，更特别地预防或治疗其中涉及病毒蛋

白和膜联蛋白家族成员之间的相互作用的任何病毒疾病，更特别地预防或治疗 HBV 和/或 HDV 感染、巨细胞病毒感染或流感病毒感染或者它们的任何突变病毒株感染的药物组合物或药物(两个术语可以互换使用)，它们包括至少一种本发明的化合物、至少 BDA753，至少一种根据式 II 的化合物、至少一种根据式 III 的化合物或者至少肽 AYGW(SEQ ID NO3)和可能地，一种药学可接受载体或赋形剂(两个术语可以互换使用)。任选地，所述组合物可以含有用于抗上述感染的其它治疗剂。这些治疗剂包括但不限于用于 HBV 的 adefovir，BMS200475，famciclovir，膦甲酸，fiacitabine，fialuridine，(-)-FTC，更昔洛韦，GEM132，干扰素，lamivuding，L-FMAU，lobucavir，正-二十二烷醇，利巴韦林，索利夫定，阿糖腺苷或者 WO98/18818 中提到的化合物；用于巨细胞病毒的阿昔洛韦，adefovir，cidofovir，环 HPMPC，fiacitabine，fomivirsen，更昔洛韦，I263W94，lobucavir，利巴韦林，valaciclovir 或阿糖腺苷；用于流感的金刚烷胺，GG167，GS4104，利巴韦林或金刚乙胺。“药物”可以通过技术人员知识内任何合适的方法施用。优选地，施用方式可以是经肠或非经肠给药。本发明的组合物可以是适合这样的给药方法的任何已知的药物组合物形式。所述组合物可以以本领域技术人员公知的方法配制，使得活性化合物控制释放的，例如快速释放或缓释。这些药物组合物的活性物质也可以单独给药，没有载体赋形剂。但是，它们也可以与药学可接受无毒载体或稀释剂一起施用，其中比例由具体载体的适配性和化学性质确定。技术人员公知的合适的载体或赋形剂是盐水，Ringer's 溶液，葡萄糖溶液，Hank's 溶液，固定油，油酸乙酯，5%葡萄糖盐水溶液，提高等渗性和化学稳定性的物质，缓冲液和防腐剂。

在非经肠给药中，本发明的药物以与如上定义的药学可接受的赋形剂结合的溶液，悬浮液或乳状液的单位剂量可注射形式配制。但是给药的剂量和方法将取决于个体。一般情况下，施用药物，使得以 1 微克/千克至 100 毫克/千克，更优选地以 10 微克/千克至 20 毫克/千克，最优选地以 0.1 至 2 毫克/千克给与本发明的化合物。优选地，以大丸剂剂量给药。也可以使用连续灌注。如果使用连续灌注，可以以 1 至 100 微克/千克/分钟，更优选地 5 至 20 微克/千克/分钟的剂量灌注药

物。

适合口服的剂量形式包括但不限于片剂，丸剂，胶囊剂，caplets，颗粒剂，粉末剂，酏剂，糖浆，溶液和含水或油悬浮液。用于对人给药的合适的活性化合物的日剂量一般是大约1毫克至大约5000毫克，更通常大约5毫克至大约1000毫克，单独一次剂量给药或者每天一次或多次分剂量给药。

本发明最后涉及如上所述的化合物在筛选阻断膜联蛋白和与膜联蛋白相互作用的任何蛋白质，更特别地，与膜联蛋白相互作用的任何病毒蛋白，更特别地，HBV的HBsAg蛋白质、巨细胞病毒的糖蛋白B或任何流感病毒的膜联蛋白结合蛋白之间的结合的分子的方法中的用途。如这里所使用的，术语“筛选分子的方法”指适合分子筛选的本领域公知的任何方法。特别地，该术语指本发明的实施例1描述的方法。

本发明现在通过参考给出的特别有利的实施方案的实施例详细说明。但是应该注意这些实施例是说明性的不以任何方式限制本发明。说明书和权利要求书中除非另有说明，术语“包含”，及其变化表示例如“包含”和“含有”理解为指包括所述的整体部分或所述的整体部分或步骤的步骤或组，但是不排除任何其它整体部分或整体部分或步骤的步骤或组。

表和附图的简要说明

表1提供了涉及确定HBsAg的6个基因型(A,B,C,D,E,F)的“小”HBsAg的99-169位氨基酸的区和认定检查的多肽结合膜联蛋白V的序列信息。

图1给出了1,4-苯并二氮杂䓬类和1,4-苯并硫杂䓬庚因类的基础结构式(式I)，其中：

*在1位：- 苯并硫杂䓬庚因类具有一个硫原子(X代表S)；X也可以是SO_n，其中n=0,1,2；

- 苯并二氮杂䓬类具有一个氮原子(X代表N)，其在1位另外修饰有羧甲基($-CH_2COOH$)之后，允许通过肽的C-末端连接的或者通过肽的N-末端连接的另外修饰有一个权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其

部分。在 N 不修饰有一个肽的情况下，修饰可以是 H，烷基，苯基，-COZ，其中 Z 代表 H，烷基，苯基或取代的苯基；

*1，2，3，4，5 位可以以邻接位置形成双键；如果是这种情况，则支链 R_2，R_4，R_5 或 R_7 不存在；

*2 和/或 2' 位上的 R_1 和/或 R_2 可以代表 H，胺，烷基或者位置 2 可以被氧化(=O)。在 R_1 和/或 R_2 是胺的情况下，其可以进一步地或者直接通过肽的 C-末端连接或者通过象戊二醛或琥珀酐这样的连接基团连接于肽的 N-末端而被一个权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分取代；

*3 和/或 3' 位上的 R_3 和/或 R_4 可以代表 H，胺或烷基。在 R_3 和/或 R_4 是胺的情况下，其可以进一步地或者直接通过肽的 C-末端连接或者通过象戊二醛或琥珀酐这样的连接基团连接于肽的 N-末端而被一个权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分取代；

*4 位上的 R_5 可以代表 4 位另外修饰有羧甲基($-CH_2COOH$)后或者直接通过肽的 C-末端连接的或者通过肽的 N-末端连接的权利要求书中定义为“含有一个膜联蛋白结合蛋白的膜联蛋白结合表位的肽”的肽或者其部分的支链。在 R_5 不是权利要求书中定义的肽的情况下，R_5 可以代表 H，烷基，$-CO-R_{12}$ 或者 3-(1-(4-苄基)哌啶基)丙酰基)；

*R_6 和/或 R_7 代表 H 或烷基或苯基，可能进一步取代有烷基，氰基，卤素，硝基，烷基烷氧基，烷酰基，羧基，烷酰基烷氧基，氨基甲酰基；

*R_8，R_9，R_{10} 和/或 R_{11} 代表 H，烷基，氰基，卤素，硝基，烷基烷氧基，烷酰基，羧基，烷酰基烷氧基，氨基甲酰基；

*R_{12} 代表 H 或烷基或可能进一步取代有烷基，氰基，卤素，硝基，烷基烷氧基，烷酰基，羧基，烷酰基烷氧基，氨基甲酰基的苯基。

图 2 给出了式 II 的结构(FR2479818)，其中：

*在 2 位，R 代表一个氨基酸或者由两个或三个氨基酸组成的肽；

*X 代表氯或氟。

图 3 给出了式 III 的结构，其中 1，4-苯并二氮杂䓬的 3 位被肽 ARPYN 取代并且 1 位被 L 残基取代(Nachman 等，1998)。

图 4 给出了式 IV 的结构，其中：

*R,R'和/或 R+R'构成包含膜联蛋白结合蛋白膜联蛋白结合表位的肽或者其部分。在只有 R 是一个肽的情况下,位置 1 是甲基化的。在只有 R'是一个肽的情况下,位置 3 含有胺;

*X 代表可以被-$COCH_3$修饰的肽的 N-末端;

*Y 代表可以被-NH_2或-赖氨酸-生物素修饰的肽的 C-末端。

图 5 给出了式 V 的结构,其中肽 R 通过其 N-末端通过连接基团(SPC)连接。

图 6 给出了实施例 1 中描述的 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物的结构: BDA250:1,3-二氢-1-甲基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮杂䓬-2-酮;BDA452:3-(R,S)-(L-色氨酰基)-1,3-二氢-1-甲基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮杂䓬-2-酮; BDA753:3-(R,S)-全-L-(NH-Trp-Gly-Tyr-Ala-H)-1,3-二氢-1-甲基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮杂䓬-2-酮。

图 7 给出了用于 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物合成的 Fmoc 保护的(R,S)- Fmoc-3-氨基-N-1-羧甲基-2-氧代-5-环己基-1,4-苯并二氮杂䓬(FB03601;Neosystem,Strasbourg,法国)。

图 8 给出了一些根据式 IV 的 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物的例子。

图 9 给出了通过使用戊二醛作为连接基团合成根据式 V 的 1,4-苯并二氮杂䓬衍生物的基础反应。

图 10 给出了通过使用琥珀酸酐作为连接基团合成根据式 V 的 1,4-苯并二氮杂䓬衍生物的基础反应。

图 11 给出了一些根据式 V 的 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物的例子。

图 12 证明不同的化合物对膜联蛋白 V 和 HBsAg 之间的相互作用的不同抑制:在图 6 中描述了 BDA250,BDA452 和 BDA753;IGP1362 和 IGP1363 是分别从 HBV 的 HBsAg 的 158-169 位氨基酸和 115-125 位氨基酸衍生的肽并且在表 1 中给出。BDA753 能抑制膜联蛋白 V 和 HBsAg 之间的相互作用,而只包含该分子(BDA250)的苯并二氮杂䓬部分的化合物则不能。

图 13 证明代表 HBsAg 的 158-169 位氨基酸的天然变体或代表 C-末端没有另外修饰生物素化赖氨酸的肽(IGP1632)的不同肽对膜联蛋

白 V 和 HBsAg 之间的相互作用的不同抑制(表 1)。这些结果归一化为 IGP1481 的抑制效力。

图 14 证明代表 IGP1481 的 C-末端截短的变体的不同肽对膜联蛋白 V 和 HBsAg 之间的相互作用的不同抑制(表 1)。这些结果归一化为 IGP1481 的抑制效力。

图 15 证明代表 IGP1481 的非天然突变体的不同肽对膜联蛋白 V 和 HBsAg 之间的相互作用的不同抑制(表 1)。这些结果归一化为 IGP1481 的抑制效力。带星号的肽在试验的最高浓度表现出没有抑制作用,在这些情况下条匡代表试验的最高相对浓度。

实施例

实施例 1:1,4-苯并二氮杂䓬和衍生物对膜联蛋白 V 对 HBsAg 的结合的影响

为了证明膜联蛋白 V 结合分子对 HBsAg 与膜联蛋白 V 的相互作用的影响进行了竞争试验。使膜联蛋白 V 结合化合物(图 6 和表 1)在结合膜联蛋白 V 中与 HBsAg 竞争。最后测定与 HBsAg 结合的标记的膜联蛋白 V。简要地说,将重组 HBsAg 包被在微量滴定板(2 微克/毫升,4℃下在补充有 1mM 氯化钙和 1mM 氯化镁的 TBS 中过夜)上。用 3%冷的鱼明胶封闭平板后(室温下在补充有 1mM 氯化钙和 1mM 氯化镁的 TBS 中培养 2 小时),在过量肽或化合物存在下加入 ^{125}I-标记的膜联蛋白 V(50ng),并且使相互作用(37℃下在补充有 1mM 氯化钙和 1mM 氯化镁和 0. 3%冷的鱼明胶的 TBS 中培养 2 小时)。温育之后用补充有 1mM 氯化钙和 1mM 氯化镁和 0. 05%Tween-20 的 TBS 冲洗平板三次。该项试验重复进行 6 次,表达的结果是平均值(平均值顶点上的线代表标准偏差)。使用的各种化合物或肽对 HBsAg 的摩尔过量如下:

BDA 250	25000
BDA 452	13750
BDA 753	1600
IGP 1362	400
IGP 1363	560

从图 12 可以判断,BDA753 和 IGP1362 分子破坏膜联蛋白 V 与

HBsAg 的结合。BDA753 由衍生有 4 个氨基酸的肽链的 1,4-苯并二氮杂䓬组成。其苯并二氮杂䓬部分与 BDA250 相同，其结合膜联蛋白但是不能抑制 HBsAg 对膜联蛋白 V 的结合。相反，BDA250 却增强了结合。具有和 BDA250 类似核心结构但是带有胺化的色氨酸的分子 BDA452 根本不影响 HBsAg 对膜联蛋白 V 的结合，而分子 BDA753 确实抑制 HBsAg 对膜联蛋白 V 的结合。从这些结果可以得出结论，BDA753 上存在的而 BDA452 上不存在的三个另外的氨基酸是观察到的竞争作用的原因。最可能的是这些氨基酸和 HBsAg 一样对膜联蛋白 V 在相同位点结合。已经存在于 BDA452 中的胺化的色氨酸残基也可能部分干扰 HBsAg 结合，因为该附加的色氨酸残基确实破坏 BDA250 引起的结合增强。这表明也可以进一步修饰 BDA452 获得更好的抑制膜联蛋白 V 对 HBsAg 结合的特异性。包含 HBsAg 的 aa158-169 的肽 IGP1362 也能抑制 HBsAg 对膜联蛋白 V 的结合(图 12)并且最可能结合和 BDA753 结合时的相同位点。应该注意并不是所有的肽序列都得到和肽 IGP1363 代表的序列相同的结果，所述 IGP1363 也由 HBsAg(氨基酸 115-125)衍生，但是不抑制膜联蛋白 V 对 HBsAg 的结合。可以得出结论该肽中存在的序列不结合膜联蛋白 V 的 HBsAg 结合区。

因此，IGP1362 或者其部分连接 1,4-苯并二氮杂䓬类，BDA250 或 BDA452 或者其任何衍生物。这样的分子可以使用(R,S)-Fmoc-3-氨基-N-1-羧甲基-2-氧代-5-环己基-1,4-苯并二氮杂䓬(FB03601;Neosystem,Strasbourg,法国，图 7)作为结构单元通过以 Fmoc 为基础的肽合成来制备。图 8 给出了得到的分子的实施例。通过在如图 9 和 10 所示的反应中利用连接基团分子通过肽的 N-末端使肽与 3 胺-1,4-苯并二氮杂䓬连接来合成其它 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物。图 11 给出了得到的分子的实施例。在竞争实验中测试得到的 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物来证明在阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 的相互作用中的提高的特异性。

实施例 2:与膜联蛋白 V 结合的 HBsAg 序列的进一步鉴定

为了更详细地研究肽序列对 HBsAg-膜联蛋白 V 结合的抑制作用，进一步优化了结合测定。这导致下面的测定设置：

. 将微量滴定板包被 HBsAg:500ng/100 微升，1 小时，37℃；

. 封闭:TBS3%(v/v)冷鱼明胶，1 小时，室温；

. 结合:50ng 放射标记膜联蛋白 V/100 微升(在 TBS,10mM 氯化钙,0.3%(v/v)冷鱼明胶中在 37℃下与竞争化合物预培养 1 小时),1 小时, 37℃;

. 冲洗:用 200 微升 TBS,10mM 氯化钙,0.05%(v/v)Tween-20,室温下冲洗三次;

. 用 SDS(60 微升,1 小时, 37℃)洗脱结合的标记物,接着在 γ 计数器中计数。

肽 IGP1362 是有支链的肽,在生物素化的赖氨酸核心上存在小 HBsAg 的氨基酸 158-169 两个支链(表 1)。该序列也从带有在 ε 胺官能团上带有生物素的 C-末端赖氨酸或者带有酰胺化的 C-末端的单体形式(IGP1481 和 1623,见表 1)来合成。另外,制备代表 HBsAg 的相同区(氨基酸 158-169)但是从 HBV 的其它基因型衍生的肽:代表 C 基因型中发现的主要序列的 IGP1624 和 1625,代表 D/E 基因型中发现的主要序列的 IGP1618 和代表基因型 F 中发现的主要序列的 IGP1619,而 IGP1481 代表 A/B 基因型中发现的主要序列(表 1)。肽 IGP1481,1624,1625,1618 和 1619 的总序列代表 1998 年 10 月公共序列数据库中可获得的 460 条 HBsAg 序列的 90%。所有的肽都经反相色谱纯化并且为了证实期望的肽的存在对含有肽的级分用质谱进行分析。在膜联蛋白 V/ HBsAg 结合测定中测定纯化的肽并且以对包被的重组 HBsAg 的摩尔过量计算导致 50%竞争作用的浓度。对达到 50%竞争水平的摩尔过量对于 IGP1481 是 17.5, IGP1481 是与包被的 HBsAg 同源的序列。其它肽的结果在图 13 中给出并且归一化为用 IGP1481 获得的值(将达到 50%竞争水平的 IGP1481 的摩尔过量设定为 1)。从该图可以判断从其它基因型衍生的所有的肽表现出相同等级大小的竞争水平(最大差异是对于 IGP1625 低 5 倍)。从该结果可以预言存在的 HBsAg 的所有天然变体表现出相同的效力。出人意料的是除了生物素化赖氨酸外与 1481 相同的肽 1623 活性小 7 倍。因此对肽加上一个生物素化赖氨酸以这样一种方式改变其性质使得效力被提高。IGP1481, 1618,1619,1624 或 1625 或者其部分连接 1,4-苯并二氮杂䓬,BDA250,BDA452 或者其任何衍生物。在竞争实验中测定得到的 1,4-苯并二氮杂䓬类衍生物来证明它们在阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 的相互作用中提高的特异性。

实施例 3：与膜联蛋白 V 结合的 HBsAg 序列的进一步描述

为了测定序列 158-169 的哪一部分对于观察到的竞争作用重要，合成了 C-末端截短的肽，通过反相色谱纯化并且通过质谱证实其结构。制备与 IGP1481 相比分别缺失 2，4 和 6 个氨基酸的三个这样的肽，IGP1556，1557 和 1558（见表 1）并且测定竞争作用。只缺失 2 个 C-末端氨基酸的肽 IGP1556 效力只小 10 倍，缺失 4 个氨基酸的 IGP1557 也是如此，而缺失 6 个氨基酸的 IGP1558 活性小 100 倍（图 14）。

IGP1556，1557 或 1558 或者其部分连接 1，4-苯并二氮杂䓬类，BDA250，BDA452 或者其任何衍生物。在竞争实验中测定得到的 1，4-苯并二氮杂䓬类衍生物来证明它们在阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 的相互作用中提高的特异性。

实施例 4：在阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 的相互作用具有提高的特异性的化合物的鉴定

两种肽 IGP1623 和 BDA753 确实抑制膜联蛋白 V 与 HBsAg 的相互作用。而且这些化合物表现出一定程度的序列同源性：

FAKYLWEWASVR

: :

AYGW-Bdz

通过提高 BDA753 和 IGP1623 或者其天然变体例如 IGP1618，1619，1624 和 1625 之间的同源性，产生具有提高的阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 之间的相互作用中的特异性的新的化合物。这样的化合物是：

KYGW-Bdz

KFGW-Bdz

RFGW-Bdz

AYLW-Bdz

AFLW-Bdz

KYLW-Bdz

RFLW-Bdz

KFLW-Bdz

Bdz 代表其中 3 位修饰有肽通过其 C-末端与其连接的胺并且 1 位可以修饰为羧甲基的化合物 BDA250(图 6)。

实施例 5:对于在阻断膜联蛋白 V 与 HBsAg 之间的相互作用中的高特异性重要的 HBV 的 HBsAg 的 158-169 区中的氨基酸的鉴定

为了鉴定对于肽 IGP1481 抑制 HBsAg 和膜联蛋白 V 之间的相互作用的效力重要的 HBV 的 HBsAg 的氨基酸序列 158-169 中的残基,几个氨基酸突变为丙氨酸或谷氨酰胺(IGP1482,1483,1484,1485,1486,1487,1488,1489,1493 和 1622,见表 1)。所有的肽再次通过反相色谱纯化并且通过质谱证实存在期望的结构。图 15 说明这些肽对于 IGP1481 的相对竞争。这些结果证明,160 位的氨基酸是重要的并且该赖氨酸突变为丙氨酸(IGP1484)诱导至少 20 倍的活性(最高试验浓度仍然不导致竞争)。如实施例 4 具体说明的,该些实验支持化合物 BDA753 中氨基酸丙氨酸至赖氨酸(或精氨酸)的突变的影响。对于通常是亮氨酸的 162 位氨基酸发现了相同的结果。该亮氨酸突变为谷氨酰胺(IGP1486)几乎破坏了活性,而该亮氨酸突变为丙氨酸(IGP1622)导致活性降低至少 25 倍(最高试验浓度仍然不导致竞争)。如实施例 4 具体说明的,该些实验支持化合物 BDA753 中氨基酸甘氨酸至亮氨酸的突变的影响。

表1:HBV基因型和检测了与膜联蛋白V结合的多肽的最常见的序列

	100	110	120	130	140	150	160	170	
geno	*	*	*	*	*	*	*	*	
HBsAg A	DYQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVR								(SEQ ID NO 53)
HBsAg B	DYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVR								(SEQ ID NO 54)
HBsAg C	DYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVR								(SEQ ID NO 55)
HBsAg C							K		(SEQ ID NO 56)
HBsAg D	DYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASAR								(SEQ ID NO 57)
HBsAg E	DYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMYPSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASAR								(SEQ ID NO 58)
HBsAg F	DYQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMYPSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWALGKYLWEWASAR								(SEQ ID NO 59)

IGP 1363			(TTSTGPCKTCT)$_2$-KKGK(bio)GA						(SEQ ID NO 60)
IGP 1362							(FAKYLWEWASVR)$_2$-KKGK(bio)GA		(SEQ ID NO 4)
IGP 1481							FAKYLWEWASVR-K(bio)		(SEQ ID NO 8)
IGP 1623							FAKYLWEWASVR		(SEQ ID NO 2)
IGP 1624							FARFLWEWASVR-K(bio)		(SEQ ID NO 12)
IGP 1618							FGKFLWEWASAR-K(bio)		(SEQ ID NO 13)
IGP 1619							LGKYLWEWASAR-K(bio)		(SEQ ID NO 14)
IGP 1625							FAKFLWEWASVR-K(bio)		(SEQ ID NO 15)
IGP 1556							FAKYLWEWAS-K(bio)		(SEQ ID NO 7)
IGP 1557							FAKYLWEW-K(bio)		(SEQ ID NO 6)
IGP 1558							FAKYLW-K(bio)		(SEQ ID NO 5)
IGP 1482							AAKYLWEWASVR-K(bio)		(SEQ ID NO 61)

IGP 1483	FNKYLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 62)
IGP 1484	FAAYLWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 63)
IGP 1485	FAKALWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 64)
IGP 1486	FAKYNWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 65)
IGP 1487	FAKYLAEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 66)
IGP 1488	FAKYLWAWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 67)
IGP 1489	FAKYLWEAASVR-K(bio) (SEQ ID NO 68)
IGP 1493	FAKYLWEWASVA-K(bio) (SEQ ID NO 69)
IGP 1622	FAKYAWEWASVR-K(bio) (SEQ ID NO 70)



文献目录

Atherton, Shepard (1989)，固相肽合成(Solid phase peptide synthesis)，IRL 出版社，牛津。

Berting A, Hahnen J, Kroger M, Gerlich WH (1995)，对小乙型肝炎表面蛋白的立体结构的计算机辅助研究（Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein），Intervirology 38:8-15.

Bianchi R, Giambanco I, Ceccarelli P, Pula G, Donato R (1992)，牛组织中膜键合的膜联蛋白V异构体(CaBP33 和 CaBP37)和膜联蛋白VI性能象膜内在蛋白质相似(Membrane-bound annexin V isoforms (CaBP33 and CaBP37) and annexin VI in bovine tissues behave like integral membrane proteins)，FEBS 快讯（FEBS Letters）296:158-162.

Bonino F, Heermann K, Rizetto M, Gerlich W (1986)，丁型肝炎病毒:丁型抗原和其乙型肝炎病毒-产生的被膜病毒的蛋白质组合物(Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope), J. Virol. 58:945-950.

Cai W, Wu B, Person S. (1988), I型单纯疱疹病毒的糖蛋白B在病毒进入和细胞融合中的作用（Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type I in viral entry and cell fusion), 病毒学杂志(J.Virol)62: 2596-2604.

Cox NJ, Fukuda K. (1998)，流感(Influenza)，Infect Dis Clin North Am 12:27-38.

de Bruin W, Leenders W, Kos T, Hertogs K, Depla E, Yap S.H. (1994)，丁型肝炎病毒通过人肝内联蛋白II接触人肝细胞，一种特异性HBsAg 结合蛋白质(Hepatitis delta virus attaches to human hepatocytes via human liver endonexin II, a specific HBsAg binding protein)，肝炎病毒杂志(J. Viral Hepatitis) 1: 33-38.

Guichard G, Benkirane N, Zeder-Lutz G, van Regenmortel MH, Briand JP, Muller S (1994)，带有反向-反转模拟肽的天然L-肽的抗原模拟(Antigenic mimicry of natural L-peptides with

retro-inverso-peptidomimetics), 美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A) 91:9765-9769.

Grundmann U, Abel K, Bohn H, Lobermann H, Lottspeich F, Kupper H (1988) ,编码与脂皮质蛋白家族同源的人胎盘抗凝蛋白(PP4)的cDNA的表征(Characterization of cDNA encoding human placental anticoagulant protein (PP4) homology with the lipocortin family), 美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)85:3708-3712.

Haigler H, Schlaepher D, Burgess W, Haigler H (1987) , 作为表皮生长因子受体(人基质和磷脂酶A2抑制剂)的脂皮质蛋白I和免疫学相关的33-kD蛋白的表征(Characterization of lipocortin I and an immunologically related 33-kD protein as epidermal growth factor receptor (human substrate and phopholipase A2 inhibitors)), 生物化学杂志(J Biol Chem)262:6921-6930.

Heermann K, Goldmann W, Schwartz T, Seyffrath H, Baumgarten W, Gerlich W (1984) 乙型肝炎病毒的包含前-S序列的大表面蛋白(Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence), 病毒学杂志(J. Virol.) 52:396-402.

Hertogs K, Leenders WPJ, Depla E, De Bruin WCC, Meheus L, Raymackers J, Moshage H, Yap SH (1993),存在于人肝质膜上的内联蛋白II是小乙型肝炎病毒(HBV)被膜蛋白的特异性结合蛋白(Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein),病毒学(Virology) 197:549-557.

Hertogs K, Depla E, Crabbe T, De Bruin W, Leenders W, Moshage H, Yap SH (1994), 用人肝内联蛋白II或者用抗人肝内联蛋白II 免疫球蛋白G的F(ab')$_2$片段免疫的动物体内自发产生抗乙型肝炎病毒被膜(抗独特型)抗体: 小乙型肝炎表面抗原和内联蛋白II中间类受体-配体关系的证明(Spontaneous development of anti-hepatitis B virus envelope (anti - idiotypic) antibodies in animals immunized with human liver endonexin II or with

the $F(ab')_2$ fragment of anti-human liver endonexin II immunoglobulin G: evidence for a receptor-ligand-like relationship between small hepatitis B surface antigen and endonexin II),病毒杂志(J. Virol) 68:1516-1521。

Hofmann A, Escherich A, Lewit-Bentley A, Benz J, Raguenes-Nicol C, Russo-Marie F, Gerke V, Moroder L, Huber R (1998),苯并二氮杂䓬衍生物和膜联蛋白的相互作用(Interactions of benzodiazepine derivatives with annexins),生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 273:2885-2894。

Houbenweyl (1974),有机化学方法(Methode der organischen chemie), vol.15, I & II (Wunch E编著). Thieme, Stuttgart。

Huang RTC, Lichtenberg B, Rick O(1996)流感病毒进入中涉及膜联蛋白V和磷脂在感染中起的作用(Involvement of annexin V in the entry of influenza viruses and the role of phospholipids in infection),Febs Letters 392:59-62。

Kaneko N, Matsuda R, Toda M, Shimamoto K (1997a),一种新的1,4-苯并硫杂䓬庚因衍生物,对大单层脂质体泡中膜联蛋白V-依赖性Ca^{2+}运动的抑制(Inhibition of annexin V-dependent Ca^{2+} movement in large unilamellar vesicles by K201, a new 1,4-benzothiazepine derivative),生物化学.生物物理年鉴(Biochem. Biophys. Acta)1330:1-7。

Kaneko N, Ago H, Matsuda R, Inagaki E, Miyano M (1997b),带有作为钙通道活性抑制剂的其配体K-201 的膜联蛋白V的晶体结构(Crystal structure of annexin V with its ligand K-201 as a calcium channel activity inhibitor),分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)274:16-20。

Klee B (1988), Ca^{2+}-依赖性磷脂-和膜-结合蛋白(Ca^{2+}-dependent phospholipid -and membrane-binding proteins),生物化学(Biochemistry) 27:6645-6653。

Magnius LO, Norder H (1995), S-基因的序列变异性反映的乙型肝炎病毒的亚型,基因型和分子流行病记录(Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as

reflected by sequence variability of the S-gene), Intervirology 38:24-34。

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J(1982) ,分子克隆:实验手册(Molecular cloning: a laboratory manual),冷泉港实验出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港(Cold Spring Harbor), NY。

Nachman RJ, Moyna G, Williams HJ, Tobe SS, Scott AI (1998),昆虫咽侧体抑制素神经肽类似物回转促进部分的合成,生物活性和构象研究(Synthesis, biological activity, and conformational studies of insect allatostatin neuropeptide analogues incorporating turn-promoting moieties),生物-有机药物化学(Bio-org. Med. Chem.)6:1379-1388。

Pepinsky R, Tizard R, Mattaliano J 等(1988) ,具有脂皮质蛋白I同源性的5种不同的钙和磷脂结合蛋白(Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I.),生物化学杂志(J. Biol Chem)263:10799-10811。

Pietropaolo RL, Compton R (1997),人巨细胞病毒糖蛋白B和细胞膜联蛋白II之间的直接相互作用(Direct interaction between human cytomegalovirus glycoproteinB and cellular annexin II),病毒学杂志(J. Virol.) 71: 9803-9807。

Rizetto M, Verme G, Gerin J, Purcell R (1986),丁型肝炎病毒疾病(Hepatitis delta virus disease), In: Popper H 和 Schaffner F编著,肝病研究(Progress in Liver Disease), Vol VIII. Orlando: Grune 和 Straton: 417-431。

Robinson W, Miller R, Marion P (1987) , 嗜肝DNA病毒和反转录病毒共有基因组同源性和复制性质(Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication),肝脏学(Hepatology) 7:64S-73S。

Rojas E, Pollard H, Haigler H, Parra C, Burns L (1990) ,钙激活的人内联蛋白II形成跨越酸性双层膜的钙通道(Calcium-activated human endonexin II forms calcium channels across acidic bilayer membranes), 生物化学杂志(J Biol

Chem)265:21207-21215.

Schroder CH, Zentgraf H (1990),感染乙型肝炎病毒相关的肝细胞癌症chronocity,打开恶性肿瘤转移的不同的途径(Hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma chronocity of infection the opening to different pathways of malignant transformation),生物化学.生物物理年鉴(Biochem Biophys Acta)1032:137-156.

Sheldon A, Chen JM ,膜联蛋白/蛋白质相互作用:为功能提供线索(Annexin/protein interactions: clues for function)(1996) In: 膜联蛋白:细胞功能的分子结构(Annexins:Molecular structure to cellular function), Seaton B编著, Springer-Verlag, Heidelberg, 德国.

Sternbach LH, Fryer RI, Keller O, Metlesics W, Sach G, Steiger N (1963)喹唑啉类和1,4-苯并二氮杂䓬类.X.硝基-取代的5-苯基-1,4-苯并二氮杂䓬衍生物 (Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. X. Nitro-substituted 5-phenyl-1,4-benzodiazepine derivatives),药物化学杂志(J. Med. Chem.) 6: 261.

Walker JH, Boustead C, Brown R, Koster J, Middleton C (1990) ,内联蛋白,一种钙依赖性磷脂-结合蛋白质的组织和亚细胞分布(Tissue and subcellular distribution of endonexin, a calcium-dependent phospholipid-binding protein),Biochem Soc Trans 18:1235-1236.

Zaks W, Creutz C (1990),对作为胞吐作用中膜融合的有效介体的膜联蛋白的评价 (Evaluation of the annexins as potential mediators of membrane fusion in exocytosis),J. Bioener Biomembr 22:97-119.

说 明 书 附 图

结构式 I

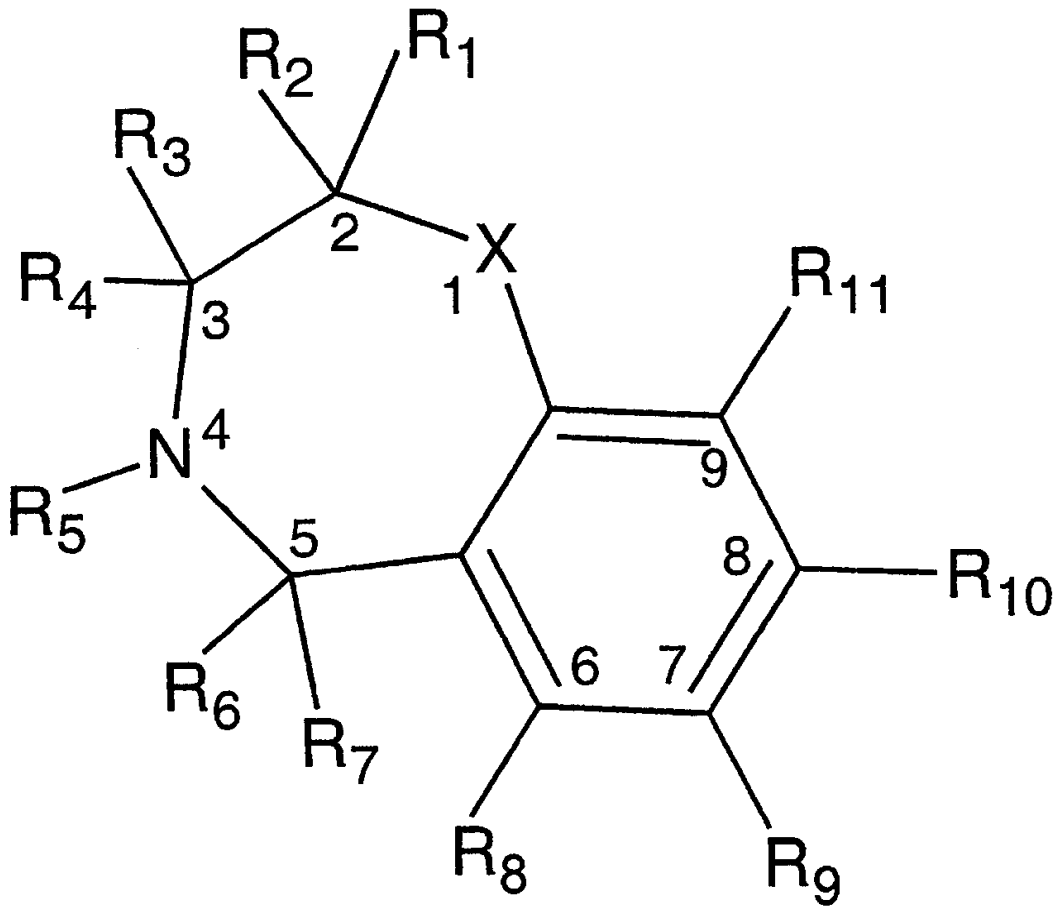

图 1

01.02.28

结构式 II

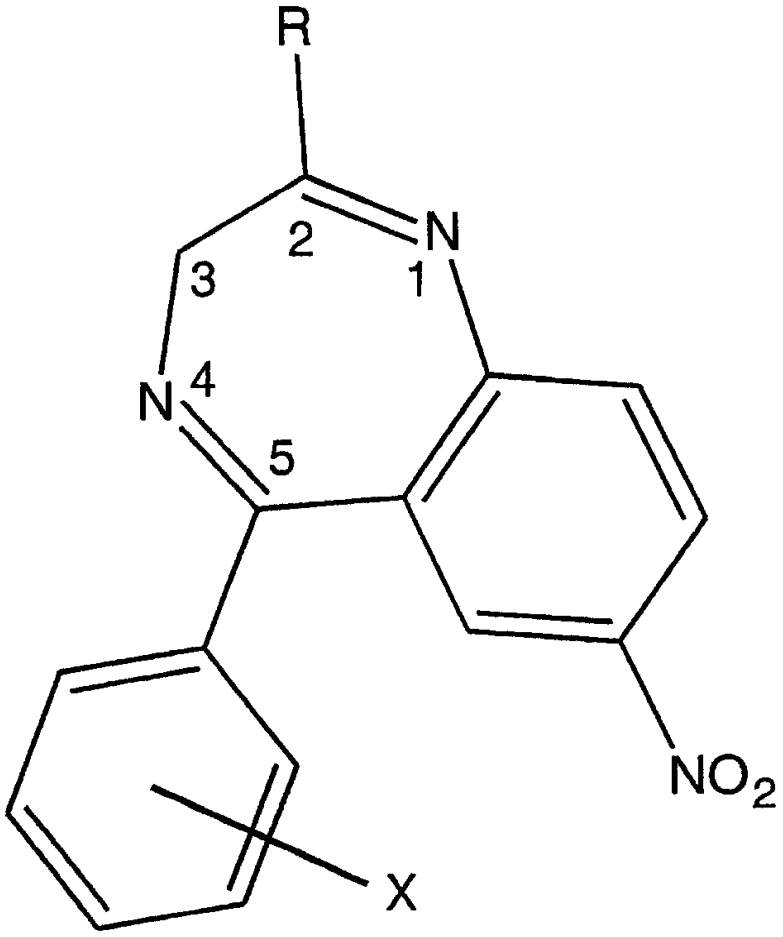

图 2

01.02.28

结构式 III

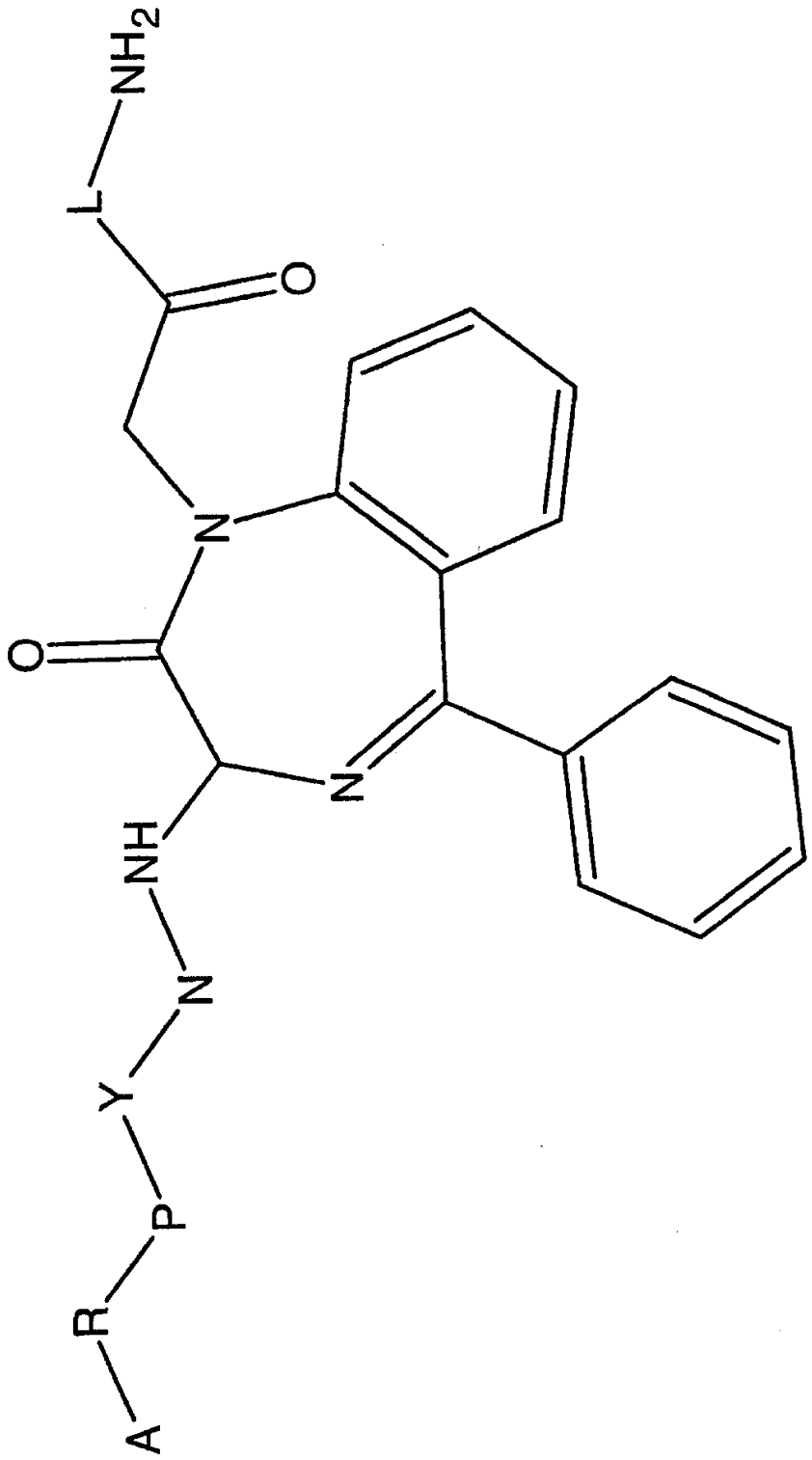

图 3

01.02.28

结构式 IV

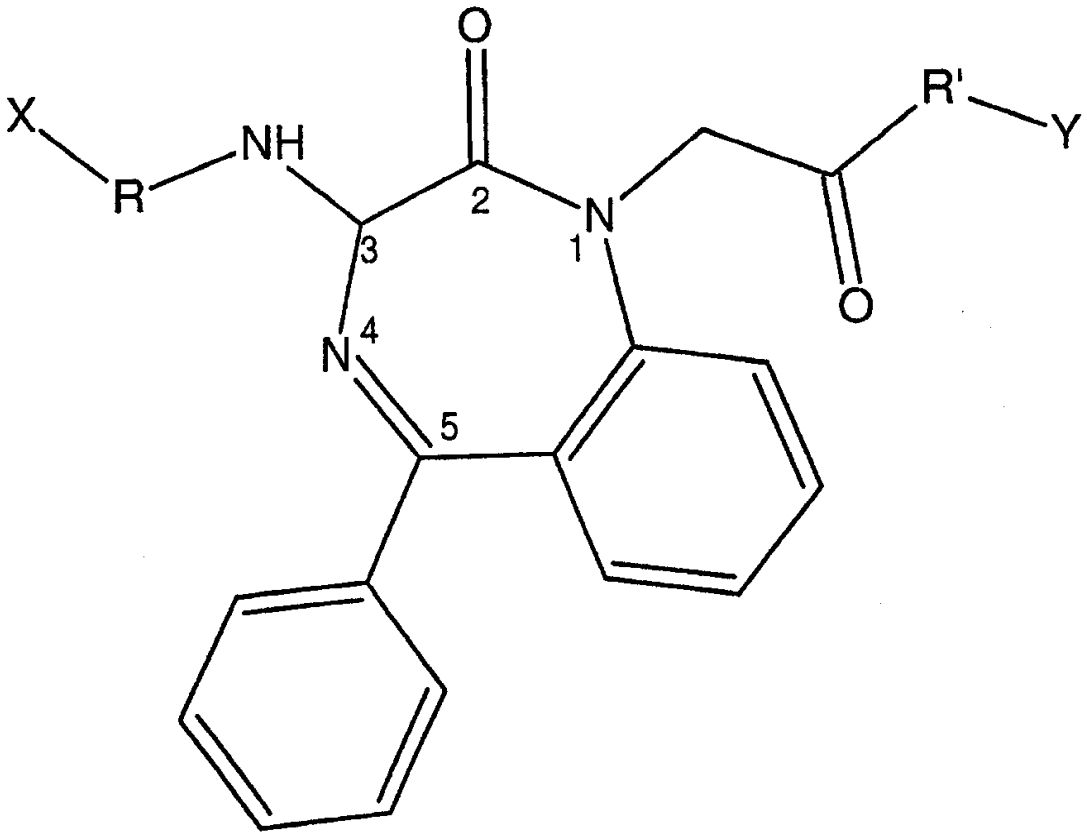

图 4

01-02-28

结构式 V

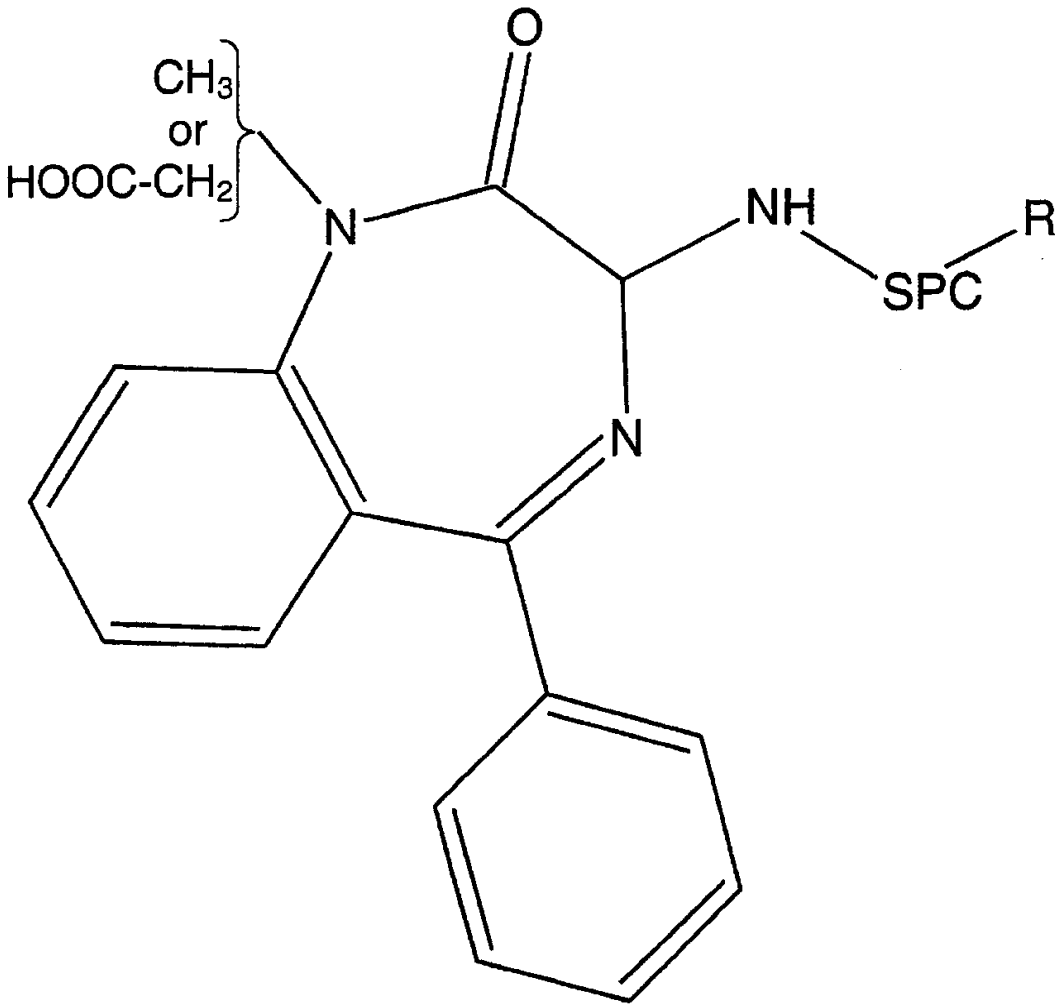

图 5

01.02.28

BDA250

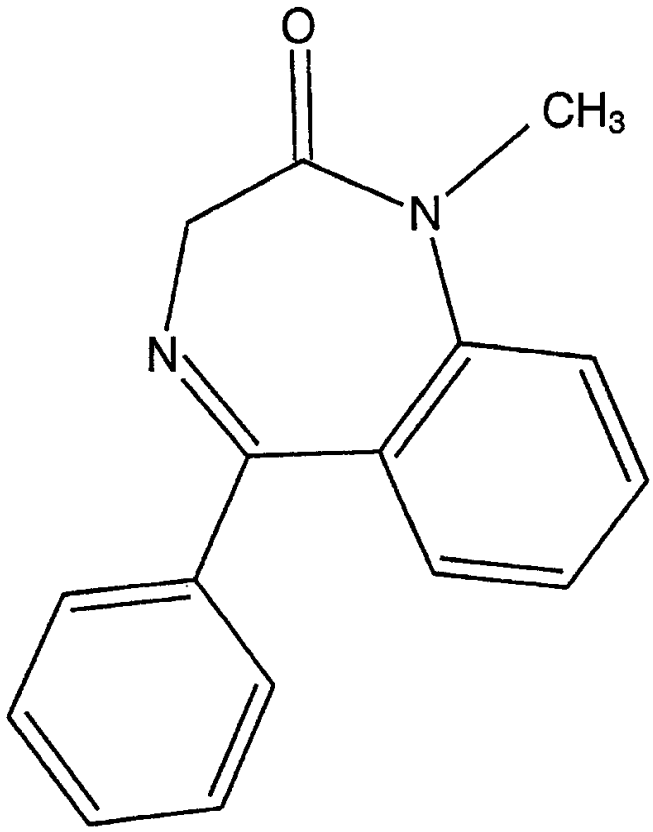

图 6

01.02.28

BDA452

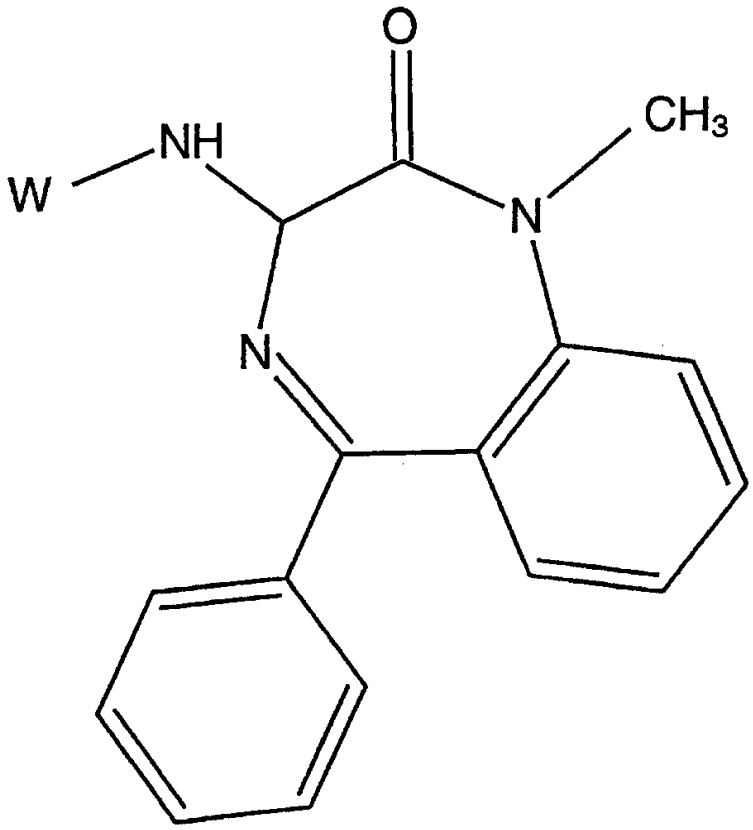

图 6续

01.02.28

BDA753

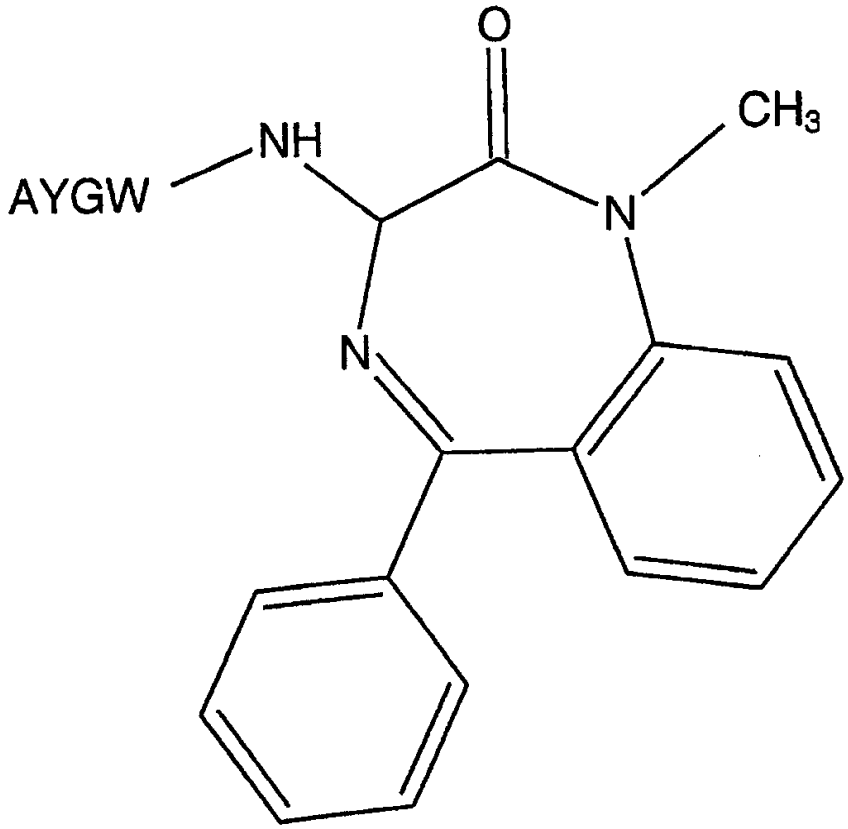

图 6续'

01.02.28

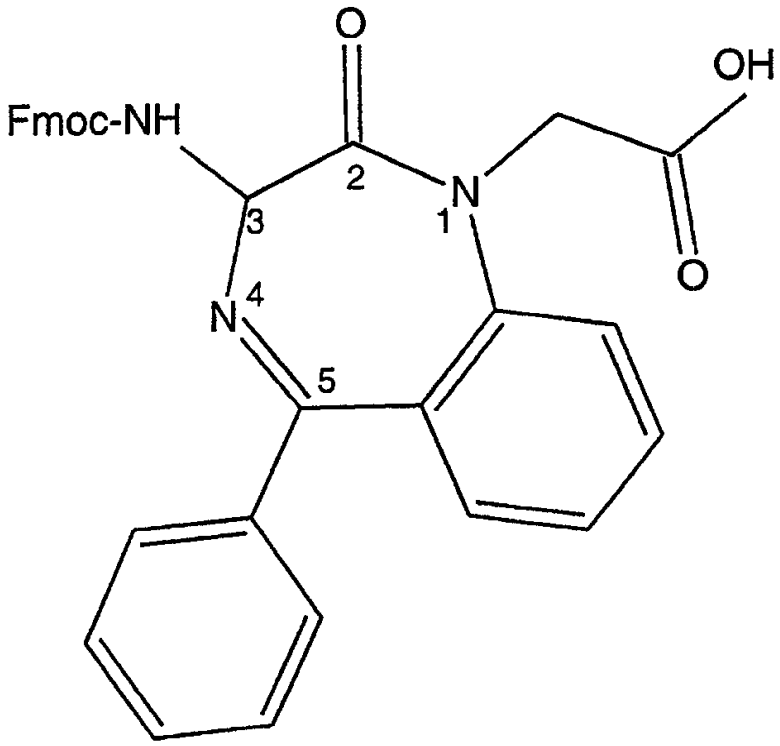

图 7

01.02.28

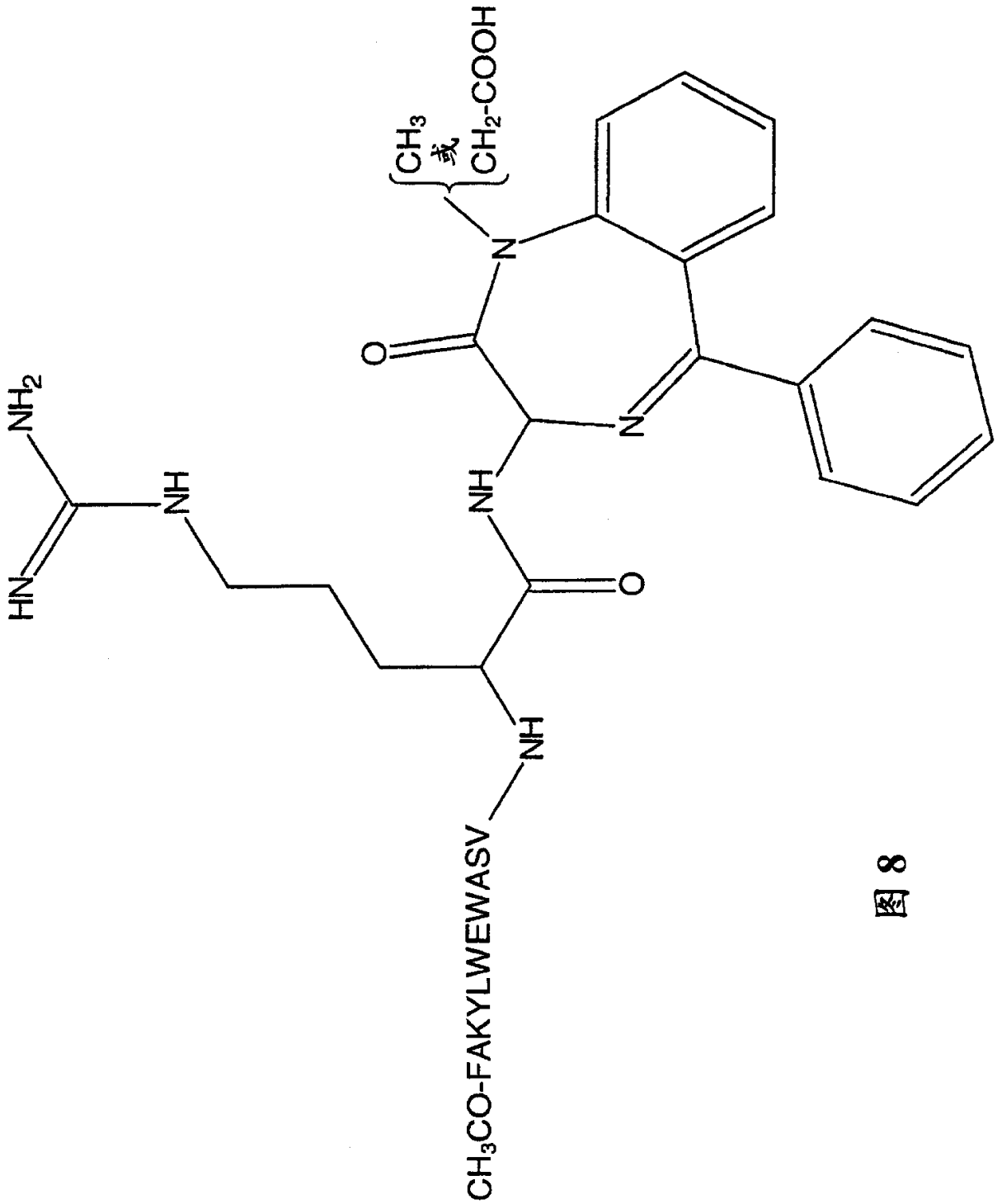

图 8

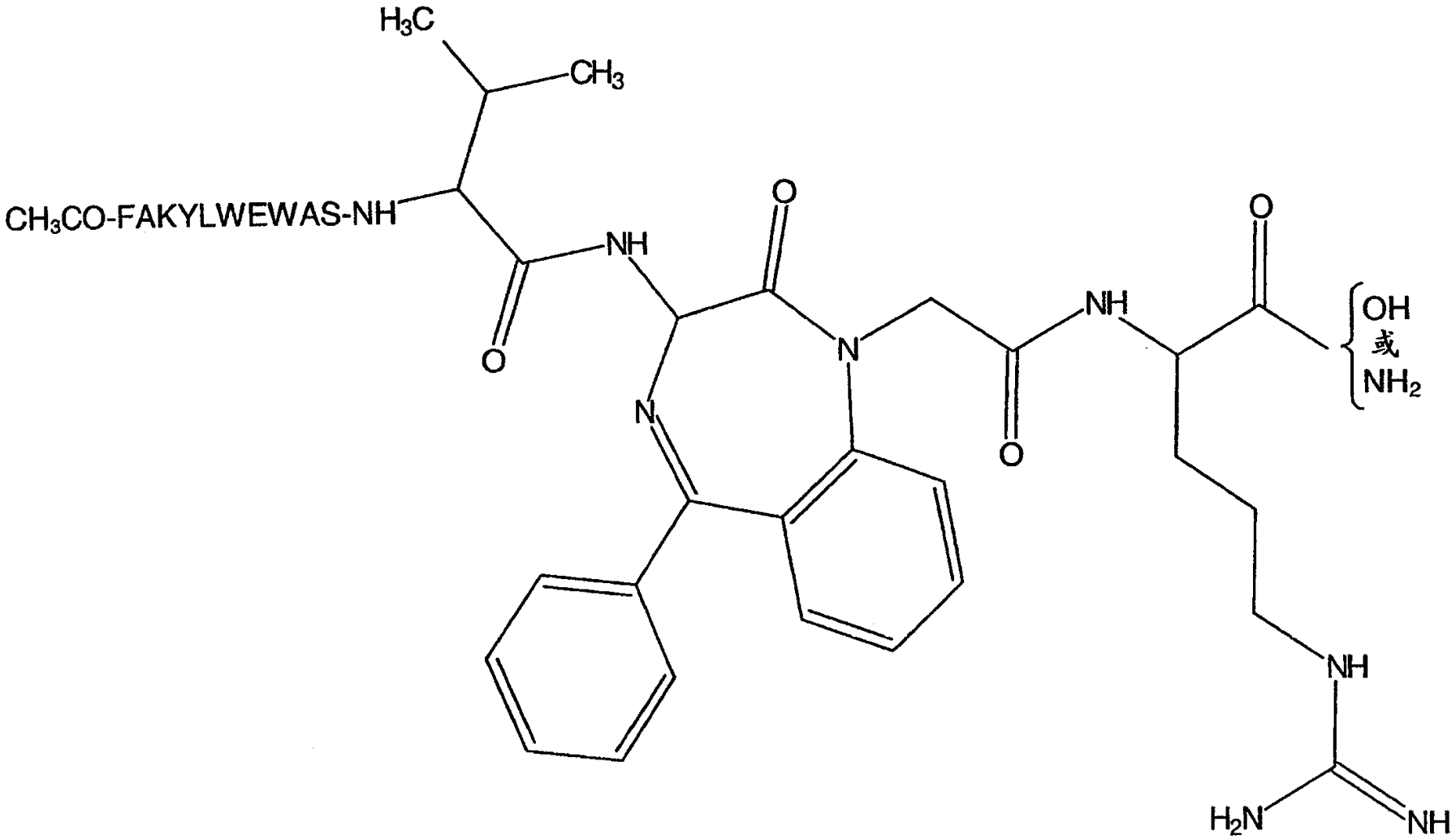

图 8续

01.02.28

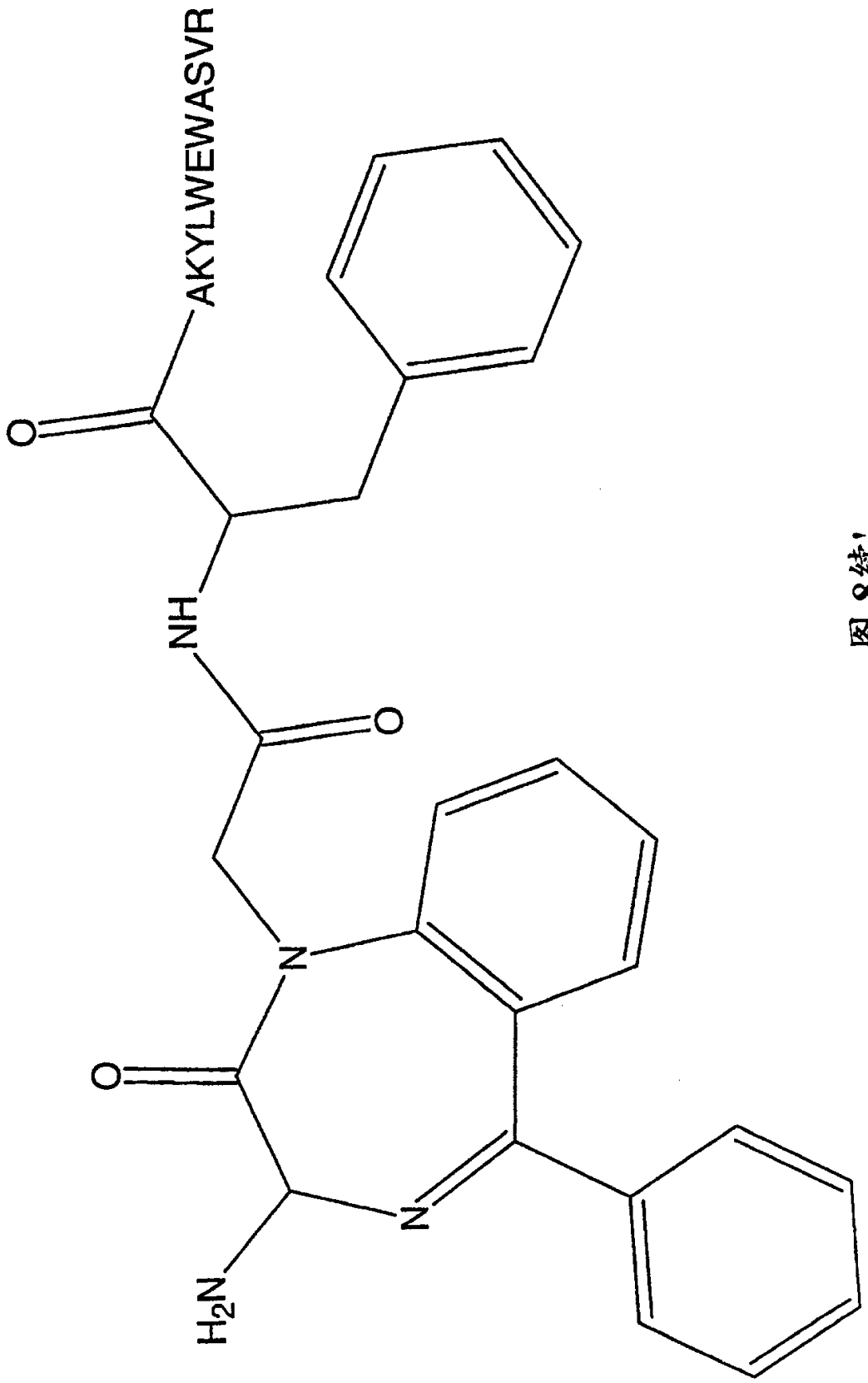

图 8续'

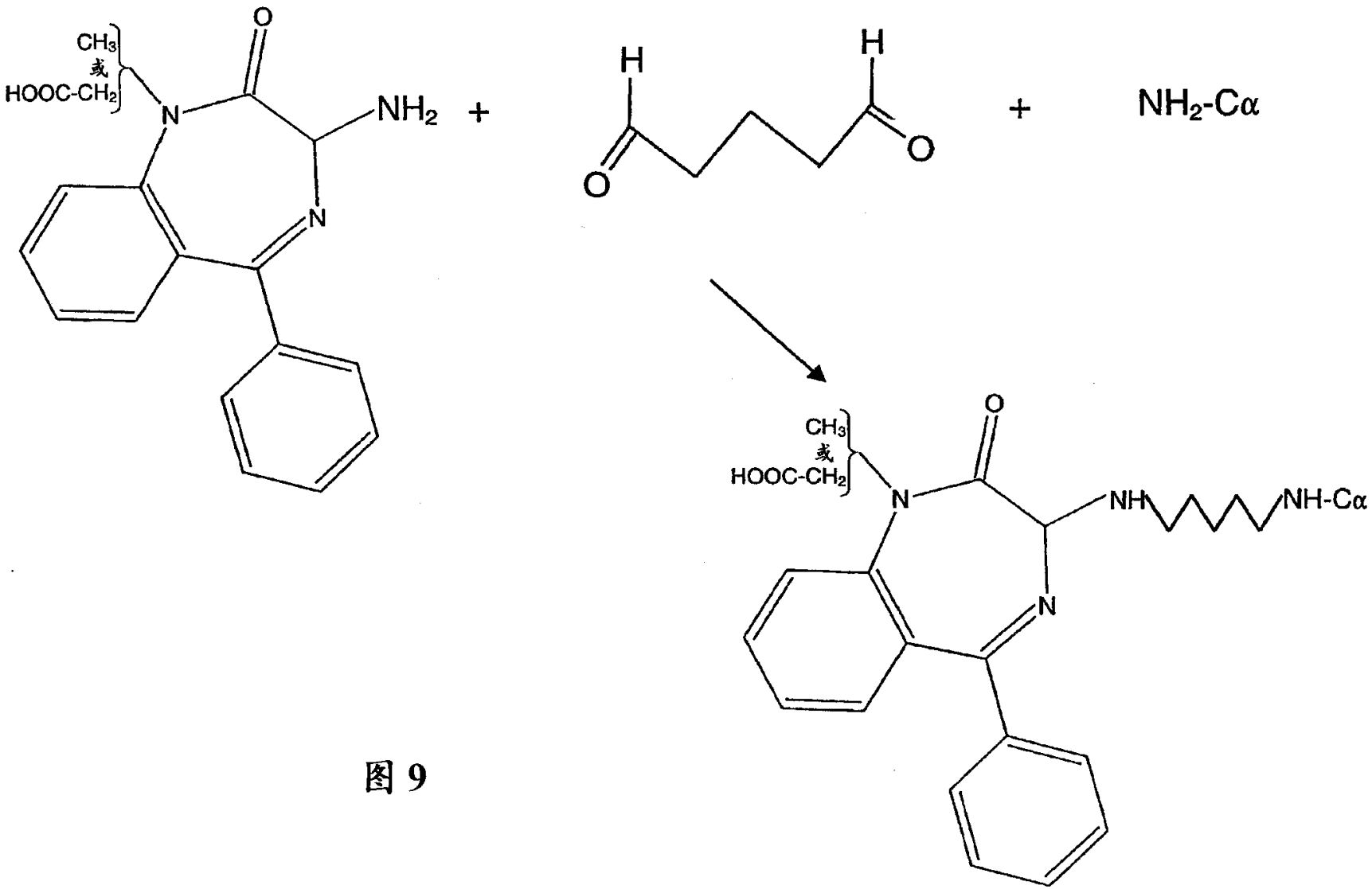

图 9

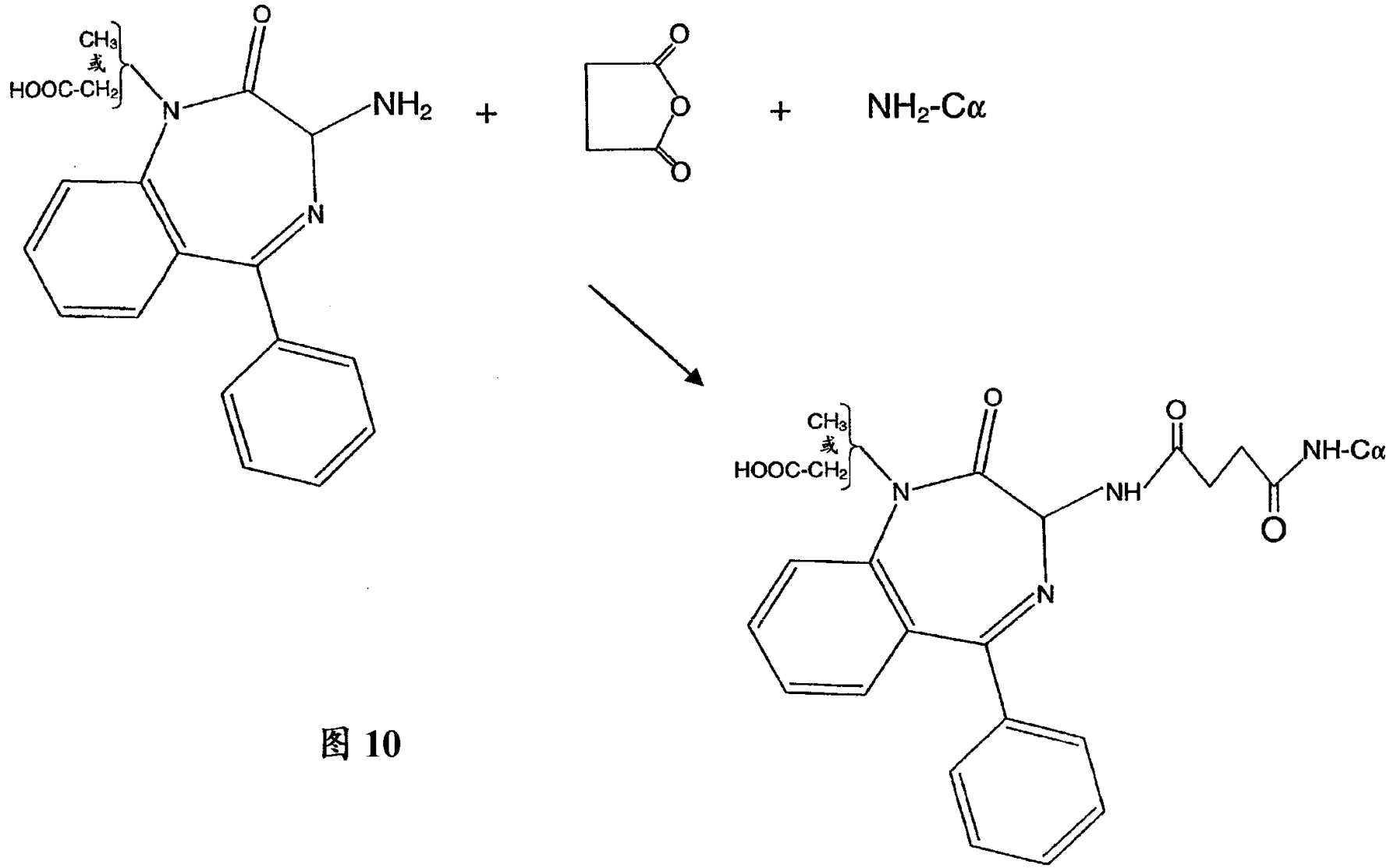

图 10

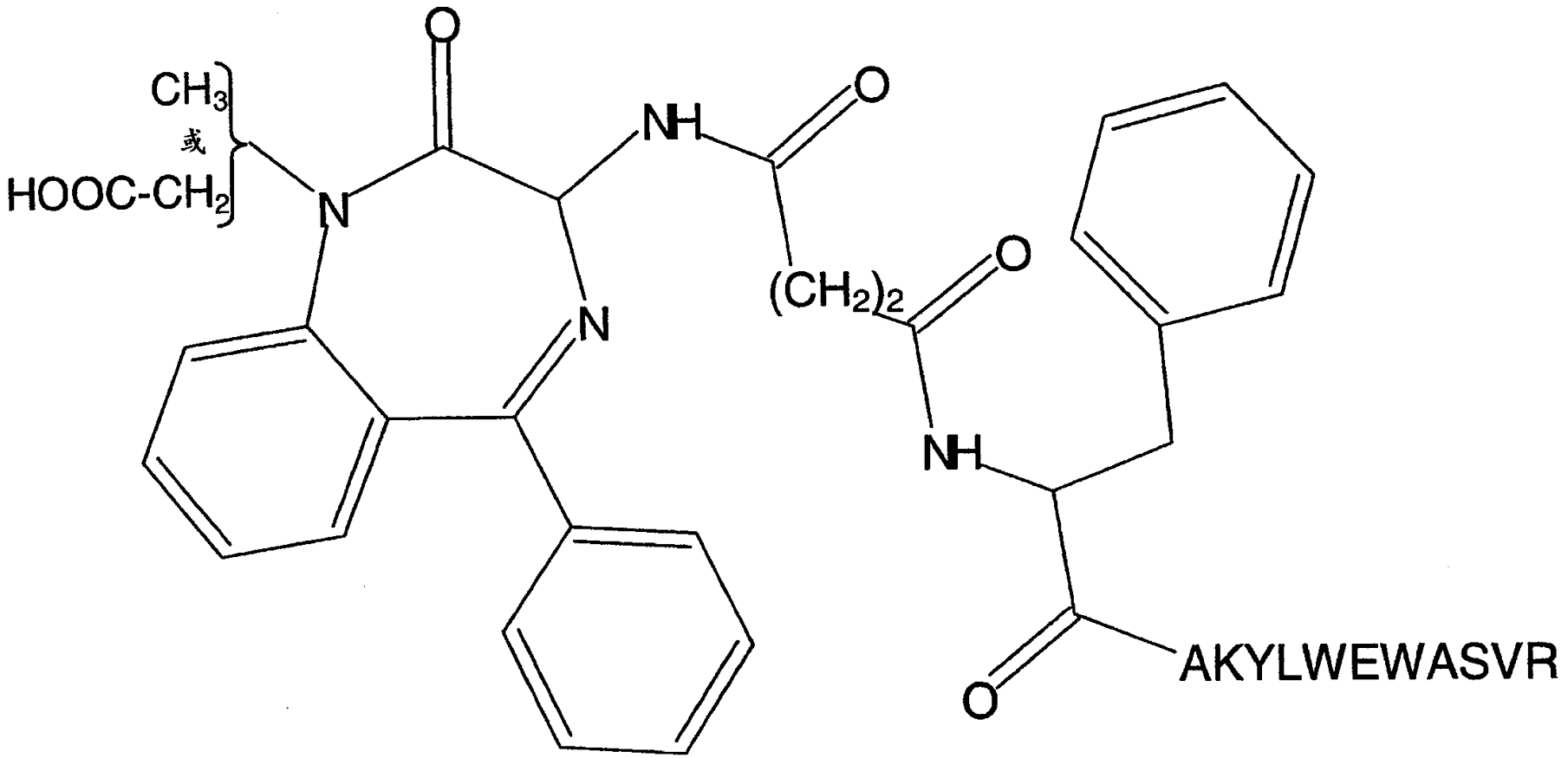

图 11

01.02.28

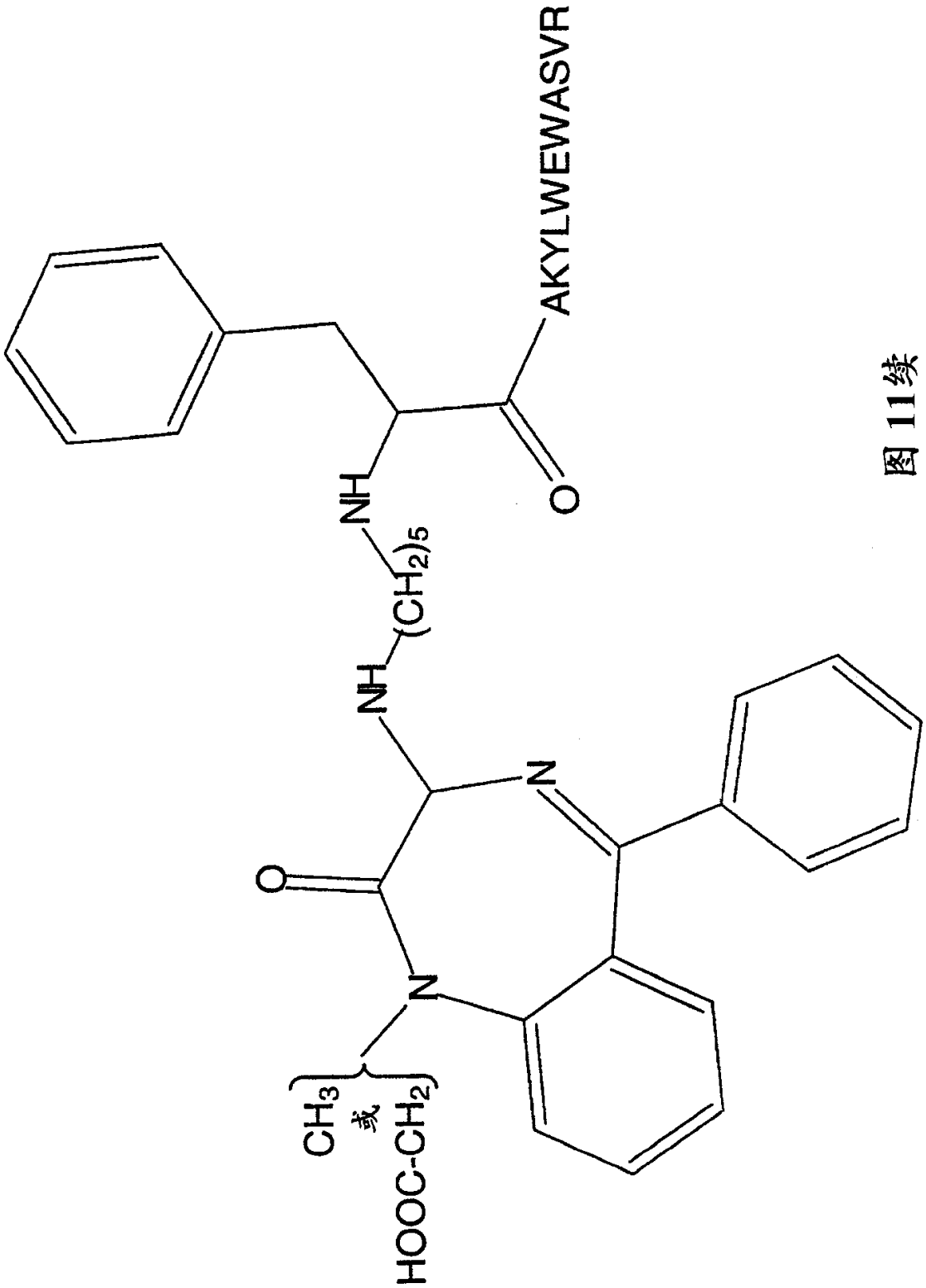

图 11续

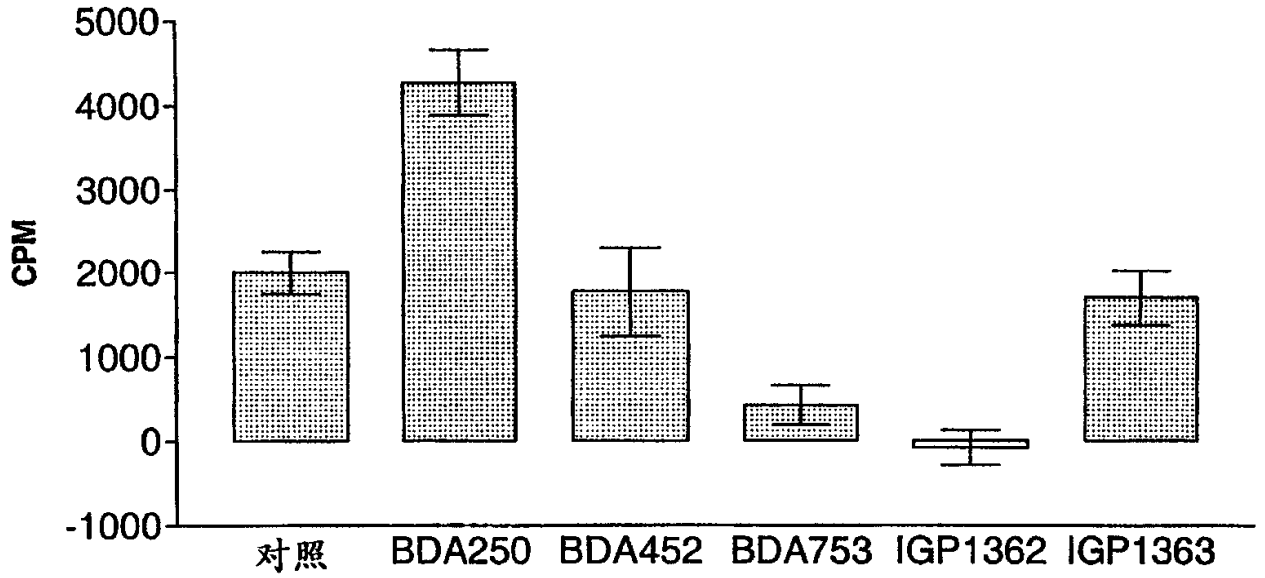
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
CPM
对照
BDA250
BDA452
BDA753
IGP1362
IGP1363

图 12

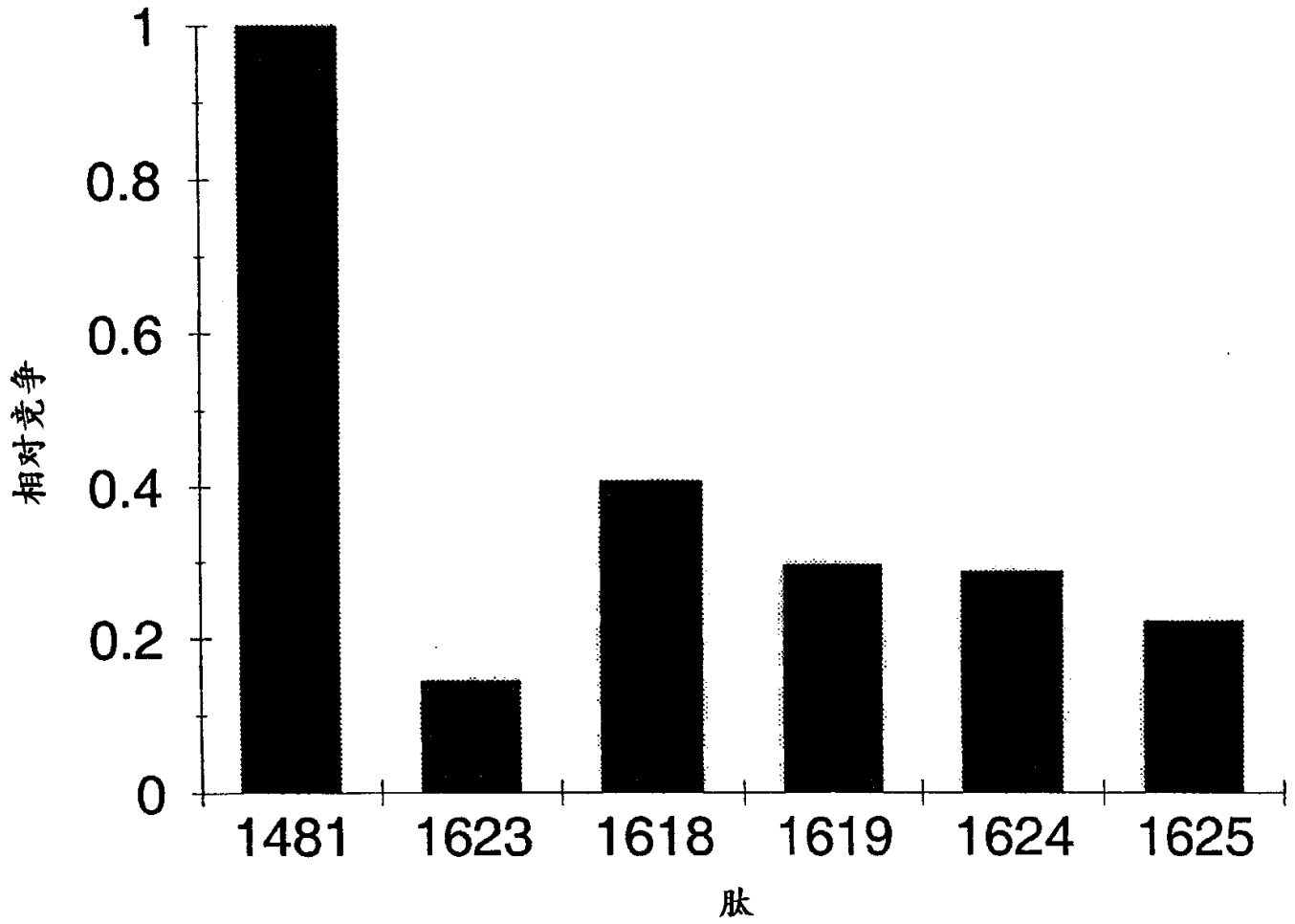

图 13

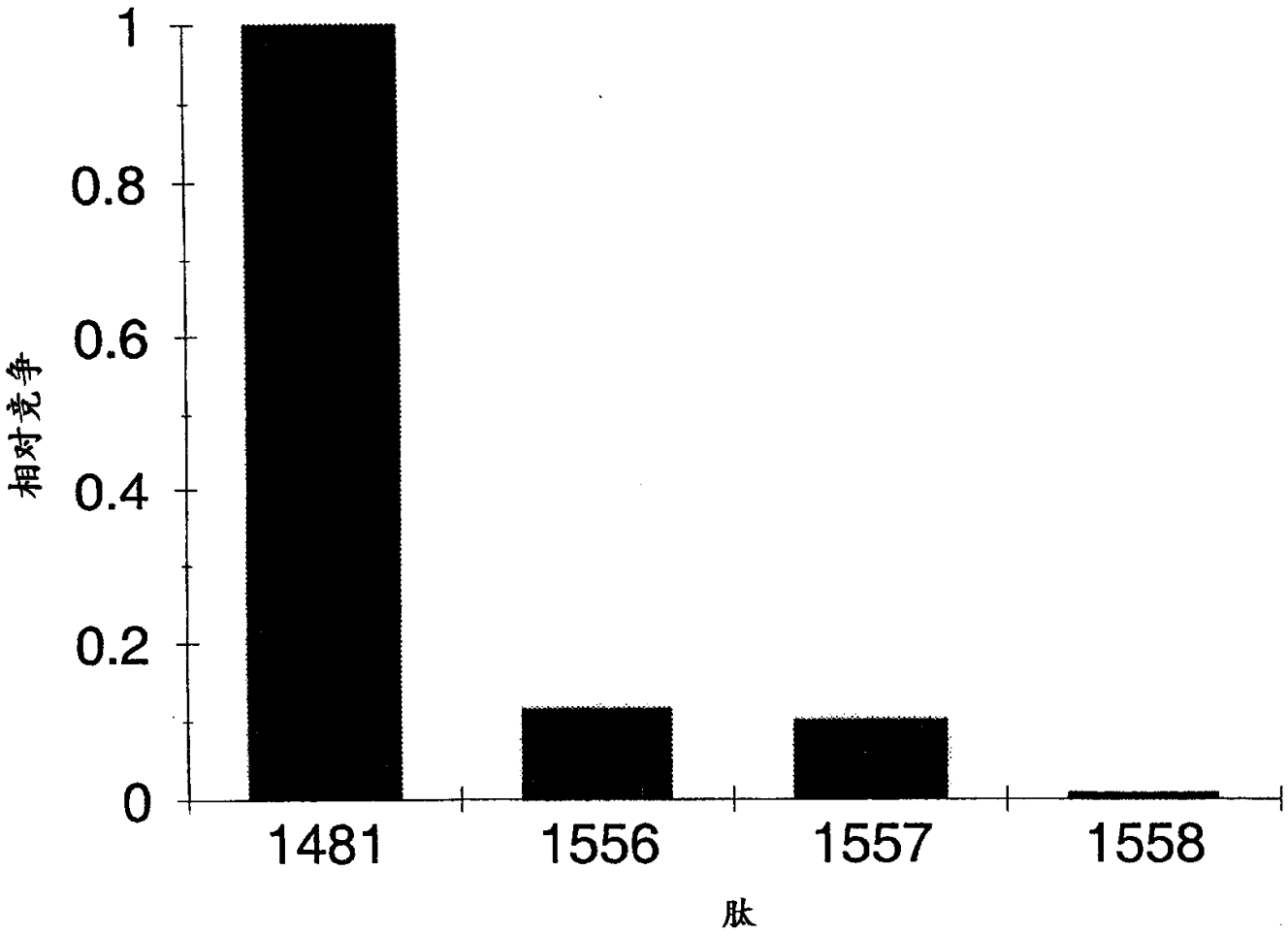

图 14

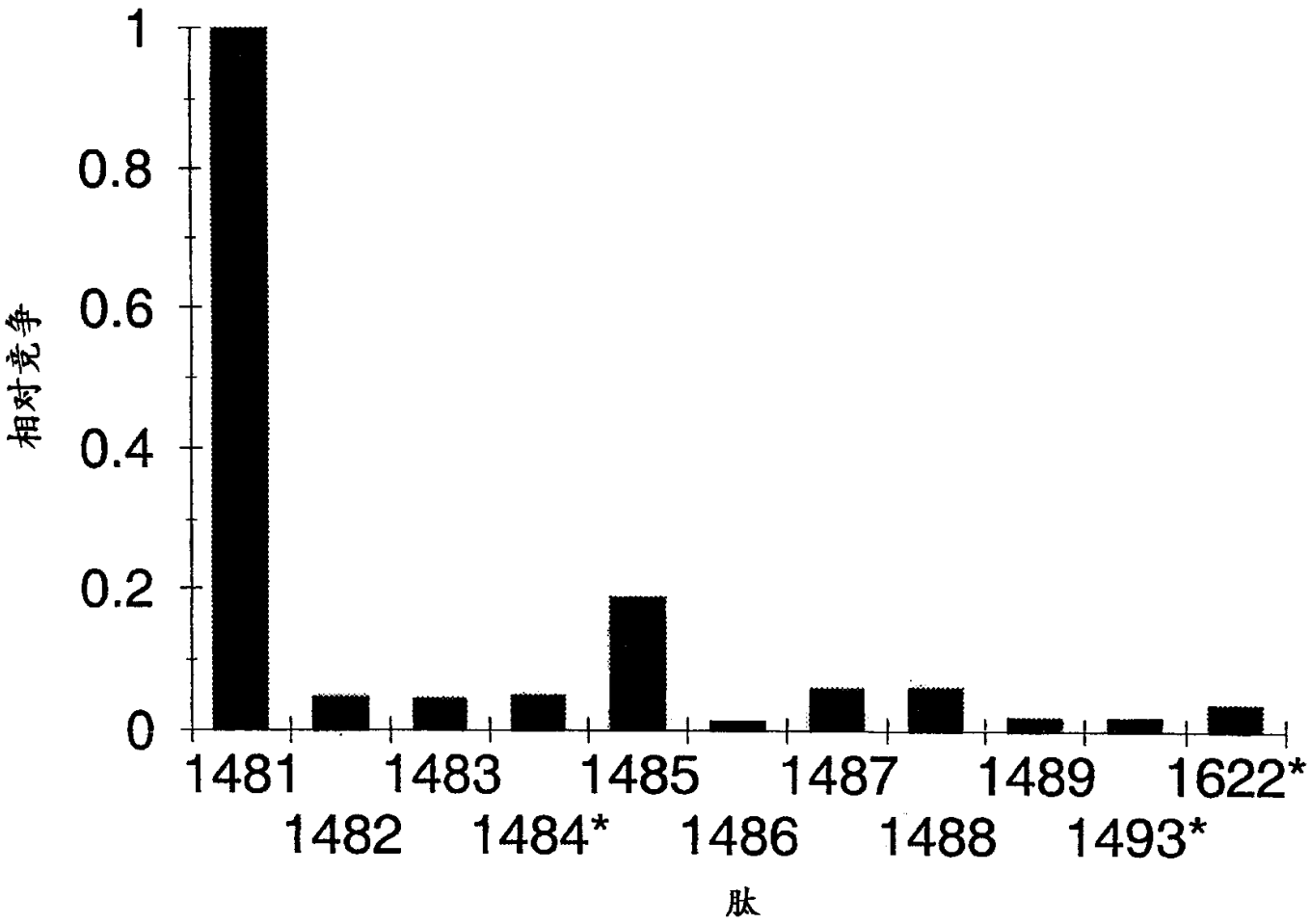
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相对竞争
1481
1482
1483
1484*
1485
1486
1487
1488
1489
1493*
1622*
肽

图 15