



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1847261 B

(45) 授权公告日 2010.12.01

(21) 申请号 200610006795.2

(22) 申请日 2002.10.17

(30) 优先权数据

PR8334 2001.10.17 AU

(62) 分案原申请数据

02825257.8 2002.10.17

(73) 专利权人 昆士兰大学

地址 澳大利亚昆士兰

(72) 发明人 史蒂夫·泰勒 伊恩·A·希尔斯

戴维·费尔利

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元 赵仁临

(51) Int. Cl.

C07K 7/56 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 9900406 A, 1999.01.07, 全文.

审查员 唐慧

权利要求书 1 页 说明书 41 页 附图 14 页

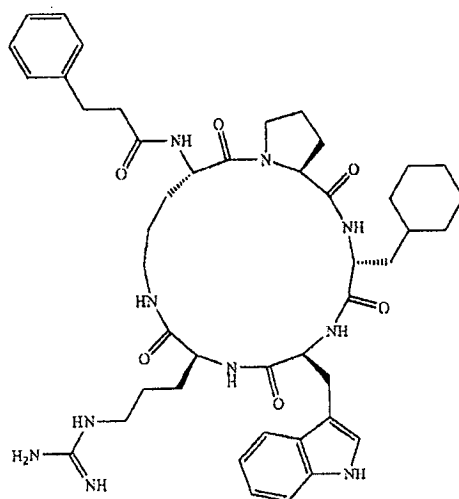
(54) 发明名称

作为 G 蛋白 - 偶联受体拮抗剂的环肽

(57) 摘要

本发明涉及具有调节 G 蛋白 - 偶联受体活性能力的新型环状化合物。所述化合物优选地作为拮抗剂。在优选的实施方案中,本发明提供了环状的肽和类肽 C5a 受体拮抗剂,其具有拮抗分叶核白细胞和巨噬细胞 C5a 受体上的活性。本发明的化合物有效且具有选择性,可用于治疗多种炎症疾病。

1. 下式化合物



2. 根据权利要求 1 的化合物, 其为 C5a G 蛋白 - 偶联受体拮抗剂, 且无 C5a 激动剂活性。

3. 根据权利要求 2 的化合物, 其中所述化合物具有 C5a 受体、抗利尿激素受体或神经激肽受体拮抗剂活性。

4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中所述化合物具有亚微摩尔浓度的拮抗剂活性。

5. 根据权利要求 4 的化合物, 其中所述化合物的受体亲和力 $IC_{50} < 25 \mu M$, 且拮抗剂活性 $IC_{50} < 1 \mu M$ 。

6. 一种组合物, 包括根据权利要求 1 的化合物以及可药用载体或赋性剂。

7. 权利要求 1 ~ 5 中任一项的化合物在制备用于治疗 G 蛋白 - 偶联受体介导的病理疾病的药物中的用途。

8. 根据权利要求 7 的用途, 其中所述的 G 蛋白 - 偶联受体介导的疾病为 C5a 受体介导的疾病。

9. 根据权利要求 8 的用途, 其中所述疾病涉及 C5a 的过表达或表达下调。

10. 根据权利要求 9 的用途, 其中所述疾病选自类风湿性关节炎、成人呼吸窘迫综合征、全身性红斑狼疮、组织移植排斥、缺血性心脏病、再灌注损伤、脓毒性休克、齿龈炎、纤维症、动脉粥样硬化、多发性硬化症、阿耳茨海默氏病、哮喘、痴呆、中枢神经系统疾病、肺损伤、体外透析后综合征以及皮肤炎性疾病。

11. 根据权利要求 10 的用途, 其中皮肤炎性疾病为牛皮癣、湿疹和接触性皮炎。

12. 根据权利要求 1 ~ 5 中任一项的化合物在制备用于治疗再灌注损伤的药物中的用途。

作为 G 蛋白 - 偶联受体拮抗剂的环肽

[0001] 本申请是中国发明申请（发明名称：作为 G 蛋白 - 偶联受体拮抗剂的环肽；申请日：2002 年 10 月 17 日；申请号：02825257.8）的分案申请。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及新型环状的化合物，其具有调节 G 蛋白 - 偶联受体活性的能力。这些化合物优选地作为拮抗剂。在优选的实施方案中，本发明提供了环状的肽类和肽类似物 C5a 受体拮抗剂，其对多形核白细胞和巨噬细胞上的 C5a 受体具有活性。本发明的化合物为强活性的且具有选择性，并可用于多种炎症性疾病的治疗。

[0004] 发明背景

[0005] 所有的参考文献，包括在本说明书中引用的任何专利或专利申请，这里都引入作为参考。但并不表示任何参考构成了现有技术。参考文献的讨论表述的是其作者声称的内容，但本申请者保留审查所引用文献的正确性以及相关性的权利。应该清楚地理解，尽管这里参考许多现有技术公开，但是这种参考并不表示这些文献中的任何一种在澳大利亚或在任何其它的国家形成了本技术领域的通用知识。

[0006] G 蛋白 - 偶联受体在人体中广泛分布，包括约 60% 的已知的细胞受体类型，并调节针对很宽范围内源性配体的细胞跨膜的信号转导。它们参与一系列生理和病理生理过程，包括但不限于与心血管、中枢及外周神经系统、生殖、代谢、消化、免疫炎症、以及生长失调以及其它细胞调节性和增殖性失调相关的过程。选择性调节 G 蛋白 - 偶联受体的药物具有重要的治疗应用。这些受体逐渐被认作重要的药物靶标，由于其在信号转导中的至关重要的作用（G protein-coupled Receptors, IBC Biomedical Library Series, 1996）。

[0007] 研究最为集中的 G 蛋白 - 偶联受体之一为 C5a 受体。C5a 为已知的最强活性的趋化剂之一，并将嗜中性粒细胞和巨噬细胞征集至损伤部位，改变其形态；诱导脱粒作用；增加钙转移、血管渗透性（水肿）以及嗜中性粒细胞粘附性；收缩平滑肌；刺激炎症介质的释放，包括组胺、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、全列腺素以及白三烯以及溶酶体酶系的释放；促进氧自由基的形成；并增加抗体的产生（Gerard 和 Gerard, 1994）。

[0008] C5a 的过表达或下调参与免疫系统介导的炎症疾病的发病机理，例如在类风湿性关节炎、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）、全身性红斑狼疮、组织移植排斥、缺血性心脏病、再灌注损伤、脓毒性休克、牛皮癣、齿龈炎、动脉粥样硬化、阿耳茨海默（氏）病、肺损伤和体外透析后综合征以及多种其他的疾病中（Whaley 1987；Sim 1993）。

[0009] 限制 C5a 的促炎症作用的试剂具有抑制慢性炎症以及其伴随的疼痛和组织损伤的潜能。由于这些原因，防止 C5a 与其受体结合的分子可用于治疗补体激活驱动的慢性炎症性疾病。这些化合物也为补体介导免疫性机理的研究提供来了有价值的新的信息。

[0010] 在我们的前述申请 No. PCT/AU98/00490 中，其所有公开这里引入作为参考，我们描述了一些人 C5a 碳 - 端类似物的三维结构，并利用这种信息设计了与人 C5a 受体（C5aR）结合的新化合物，作为 C5a 激动剂或拮抗剂。以前认为推定的拮抗剂可能同时需要 C 端精氨酸和 C- 端羧酸酯以满足受体结合和拮抗剂活性（Kontetis 等, 1994）。在 PCT/AU98/00490 中，我们证实事实上对与 C5aR 的高亲和力结合或对拮抗剂活性而言，末端羧酸酯一般并不

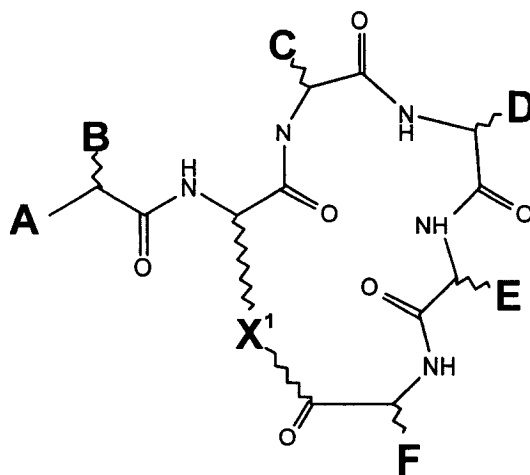
是必须的。但我们发现目前还没有意识到的结构特征,一种扭转(turn)构型,是嗜中性粒细胞上人 C5a 受体高亲和力结合的关键性识别特征。我们利用这种发现涉及了受限的结构模板,所述模板能使疏水基团聚集成疏水排列以与 C5a 受体相互作用。

[0011] 通过考察在我们前述申请中活性最强的化合物中的每一个氨基酸残基位置结构变化的效果,我们现在已经开发出人嗜中性粒细胞 C5a 受体拮抗剂的其他实例,并鉴定出具有许多强 C5aR 拮抗剂活性的化合物。这些化合物各包括环状骨架(scaffold),其满足在稍早 PCT/AU98/00490 申请中显示的一般性三维结构需求,但我们已经发现某些取代基与环相连可以导致令人惊奇的最出乎意料的结果,产生高和低的拮抗剂活性,而这种情形不能由前述申请 PCT/AU98/00490 准确预测。这些令人惊奇的新发现使得我们提炼并更好地定义 C5a 受体拮抗活性地必须药效团。这里描述的出乎意料的结构-活性关系有助于定义人多形核白细胞(嗜中性粒细胞)上的 C5a 受体拮抗活性的精细药效团结构。该药效团预期也适于人和哺乳动物其他细胞上的 C5a 受体。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明一方面提供了式 I 的环状肽或类肽,其为 G 蛋白-偶联受体拮抗剂的化合物,基本上没有激动剂活性:

[0014]



[0015] 其中 A 为 H、烷基、芳基、NH₂、NH-烷基、N(烷基)₂、NH-芳基、NH-酰基、NH-苯甲酰基、NHSO₃、NHSO₂-烷基、NHSO₂-芳基、OH、O-烷基或 O-芳基;

[0016] B 为烷基、芳基、苯基、苄基、萘基或吡啶基,或 D-或 L-氨基酸例如 L-苯基丙氨酸或 L-苯基甘氨酸的侧链,但不为甘氨酸、D-苯基丙氨酸、L-高苯基丙氨酸、L-色氨酸、L-高色氨酸、L-酪氨酸或 L-高酪氨酸的侧链;

[0017] C 为小的取代基,例如 D-, L-或高-氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、羟基脯氨酸、或硫代脯氨酸的侧链,但优选地不为体积大的取代基例如异亮氨酸、苯基丙氨酸,或环己基丙氨酸;

[0018] D 为中性 D-氨基酸例如 D-亮氨酸、D-高亮氨酸、D-环己基丙氨酸、D-高环己基丙氨酸、D-缬氨酸、D-正亮氨酸、D-高-正亮氨酸、D-苯基丙氨酸、D-四氢异喹啉、D-谷氨酰胺、D-谷氨酸、或 D-酪氨酸的侧链,但优选地不为小的取代基例如甘氨酸或 D-丙氨酸的侧链;

链、大体积的平面侧链例如 D- 色氨酸, 或体积大的带电侧链例如 D- 精氨酸或 D- 赖氨酸;

[0019] E 为体积大的取代基, 例如选自 L- 苯基丙氨酸、L- 色氨酸和 L- 高色氨酸的氨基酸的侧链, 或为 L-1- 萘基 (naphthyl) 或 L-3- 苯并噻吩基丙氨酸, 但不为 D- 色氨酸、L-N- 甲基色氨酸、L- 高苯基丙氨酸、L-2- 萘基 L- 四氢异喹啉、L- 环己基丙氨酸、D- 亮氨酸、L- 苄丙氨酸, 或 L- 组氨酸的侧链;

[0020] F 为 L- 精氨酸、L- 高精氨酸、L- 瓜氨酸, 或 L- 刀豆氨酸的侧链, 或生物电子等排体, 即, 侧链其中末端胍或脲基受限制, 但是碳骨架被不同结构的替换, 但是侧链以整体的形式与靶蛋白的反应与母体基团的方式一样;

[0021] X 为 $-(CH_2)_nNH-$ 或 $(CH_2)_nS-$, 其中 n 为 1 ~ 4 的整数, 优选地 2 或 3; $-(CH_2)_2O-$; $-(CH_2)_3O-$; $-(CH_2)_3-$; $-(CH_2)_4-$; $-CH_2COCHRNH-$; 或 $CH_2CHCOCHRNH-$, 且其中 R 为任何常用或不常用的氨基酸的侧链,

[0022] 条件是化合物不是下述的化合物 1。

[0023] 在 C 中, 顺式和反式形式的羟基脯氨酸和硫代脯氨酸都可以使用。

[0024] 优选地 A 为乙酰胺基、氨基甲基或取代的或未取代的磺酰胺基。

[0025] 优选地其中 A 为取代的磺酰胺, 取代基为 1 ~ 6, 优选地 1 ~ 4 碳原子烷基链, 或苯基或甲苯甲酰基基。

[0026] 优选地 G 蛋白 - 偶联受体为 C5a 受体。但是, 我们发现我们早期申请的先导化合物对抗利尿激素和神经激肽受体也具有明显的结合亲和力, 因此这些受体也包括在本发明的范围之内。

[0027] 在特别优选的技术方案中, 化合物具有 C5aR 拮抗剂活性, 并且没有 C5a 激动剂活性。

[0028] 本发明的环状化合物优选地为拮抗剂人、哺乳动物细胞包括但不限于, 人分叶核白细胞和人巨噬细胞上的 C5a 受体。本发明的化合物优选地强烈地且选择性地与 C5a 受体结合, 并更优选地在亚微摩尔浓度 (sub-micromolar 浓度) 具有强拮抗剂活性。更优选地化合物地受体亲和力 $IC_{50} < 25 \mu M$, 并且拮抗剂活性 $IC_{50} < 1 \mu M$ 。

[0029] 更优选地, 化合物选自这里描述的 2 ~ 6、10 ~ 15、17、19、20、22、25、26、28、30、31、33 ~ 37、39 ~ 45、47 ~ 50、52 ~ 58 和 60 ~ 70 化合物。更优选的化合物为化合物 33、化合物 60 或化合物 45。

[0030] 在本说明书中, 术语“烷基”为直链、支链、或环状、取代的或未取代的 1 ~ 6, 优选地 1 ~ 4 个碳原子的烷基链。更优选地, 烷基为甲基。术语“酰基”为取代的或未取代的 1 ~ 6, 优选地 1 ~ 4 个碳原子酰基。更优选地酰基为乙酰基。术语“芳基”应理解为取代的或未取代的碳环或杂环芳基, 其中所述环优选地为 5 或 6 员。

[0031] “常见”氨基酸为 L- 氨基酸, 选自甘氨酸、亮氨酸、异高氨酸、缬氨酸、丙氨酸、苯基丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、蛋氨酸、精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸。

[0032] “非常见”氨基酸包括但不限于, D- 氨基酸、高 - 氨基酸、N- 烷基氨基酸、脱氢氨基酸、除苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸以外的芳香氨基酸、邻 -, 间 - 或对 - 氨基苯甲酸、鸟氨酸、瓜氨酸、刀豆氨酸、正亮氨酸、 δ - 谷氨酸、氨基丁酸、L- 苄基丙氨酸、L-3- 苯并噻吩基丙氨酸以及 α , α - 二取代的氨基酸。

[0033] 根据第二方面,本发明提供了一种包括本发明化合物以及可药用载体或赋性剂的组合物。

[0034] 本发明的组合物可配制成为适于口服、肠胃外、吸入、鼻内、透皮或其他局部应用,但优选口服或局部应用。对于局部应用,可使用溶媒例如二甲基亚砷(sulphonate)或丙二醇。取决于处理的组织表面,可优选其他溶剂。

[0035] 可以预期绝大多数如果不是所有的本发明化合物在代谢酶的存在下稳定,例如消化刀、血液、肺的那些酶或细胞内酶。所述稳定性可用本技术领域普通技术人员公知的常规方法很方便地进行测定。

[0036] 通过任何期望的途径给药的合适制剂可用标准的方法制备得到,例如参考公知的教材例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Vol. II, 2000 (20th edition), A. R. Gennaro (ed), Williams & Wilkins, Pennsylvania。

[0037] 第三方面,本发明提供了一种治疗 G 蛋白-偶联受体介导病理疾病的方法,包括对需要这种治疗的哺乳动物或脊椎动物施用有效量的本发明的化合物。

[0038] 优选地 G 蛋白-偶联受体介导的疾病为 C5a 受体介导的疾病,并更优选地涉及 C5a 的过表达或表达下调。这些疾病包括但不限于类风湿性关节炎、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、全身性红斑狼疮、组织移植排斥、缺血性心脏病、再灌注损伤、脓毒性休克、齿龈炎、纤维症、动脉粥样硬化、多发性硬化症、阿耳茨海默(氏)病、哮喘、痴呆、中枢神经系统疾病、肺损伤、体外透析后综合征、以及皮肤炎性疾病例如牛皮癣、湿疹和接触性皮炎。

[0039] 在优选的实施方案中,疾病为类风湿性关节炎。

[0040] 在第二优选的实施方案中,所述疾病为再灌注损伤。在第二实施方案中,应该很清楚的理解,不适用式 I 的限制性条件。

[0041] 尽管本发明没有以任何方式限制到治疗任何具体的动物或种属,特别地预期本发明化合物可用于人的医学治疗,并也可用于兽医治疗,特别是相伴动物例如猫和狗,家畜例如牛、马和羊,以及动物园动物,包括非人灵长类、大的牛科动物、猫科动物、蹄类动物和犬科动物。可以治疗的其他物种包括爬行类、鱼类或两栖类动物。

[0042] 本发明化合物可以任何合适的剂量和任何适合的途径进行给药。口服、局部、透皮或鼻内给药为优选的给药方式,因为这些途径具有更强的便利性以及可接受性。局部应用也可包括制剂例如子宫托或阴道或直肠栓给药或水性滴剂用于对耳或眼睛局部给药。有效剂量将取决于治疗疾病的特性、以及治疗个体的年龄、体重以及潜在的健康状况。这可由医师或兽医进行判断。利用本领域公知的方法很容易通过反复试验进行确定合适的剂量水平。

[0043] 在本发明中,应该清楚地理解术语“包括”意思为“包括但不限于”,并且术语“包括”具有相应的含义。

[0044] 附图简述

[0045] 图 1 显示静脉内 (A)、口服 (B) 和局部 (C) AcF-[OPdChaWR] 以及适当对照 (D) 施用对皮肤阿蒂斯反应相关联的脉管渗漏的抑制。

[0046] 图 2 显示了静脉内 (A)、口服 (B) 和局部 (C) AcF-[OPdChaWR] 以及适当的局部对照 (D) 施用对皮肤阿蒂斯反应关联的循环 $TNF\alpha$ 升高的抑制情况。

[0047] 图 3 显示静脉内、口服和局部 AcF-[OPdChaWR] 应用后皮肤阿蒂斯反应相关联的病

理指数的下降。

[0048] 图 4 显示 C5a 拮抗剂对消化道缺血 - 再灌注诱导的肠水肿的效果。

[0049] 图 5 显示 C5a 拮抗剂对消化道缺血 - 再灌注诱导的嗜中性白血球减少的效果。

[0050] 图 6 显示 C5a 拮抗剂对消化道缺血 - 再灌注诱导的血清 TNF α 上升的效果。

[0051] 图 7 显示 C5a 拮抗剂对消化道缺血 - 再灌注诱导的血清触珠蛋白升高的效果。

[0052] 图 8 显示 C5a 拮抗剂对消化道缺血 - 再灌注诱导的天冬氨酸转氨酶的效果。

[0053] 图 9 显示 C5a 拮抗剂对消化道缺血 - 再灌注的组织病理的效果。

[0054] 图 10 显示在第 2 天到 +14 天经口施用 AcF-[OPdChaWR] 对关节炎性右膝关节肿胀的抑制。

[0055] 图 11 显示对右膝关节灌洗液中 TNF- α 和 IL-6 水平的抑制。“未处理”表示动物未用 AcF-[OPdChaWR] 处理,但是右膝在致敏后用抗原刺激。

[0056] 图 12 显示皮肤应用 3D53 的 DMSO/ 蒸馏 H₂O 或 PG/H₂O 溶液在 15 分钟之内在循环血浆中出现 C5a 拮抗剂,并且明显的水平持续至少 4 小时。点代表每组中 (n = 6-8) 的平均值 $\pm$ SEM。

[0057] 图 13 显示局部应用 C5a 拮抗剂对 C5a- 诱导的嗜中性白血球减少的抑制。结果以时间 0 点基线的百分变化进行表述。

[0058] 图 14 显示局部应用 C5a 拮抗剂抑制大鼠中静脉内注射 LPS 的全身作用。数据标明施用多种 C5a 拮抗剂,或者通过 i. v. (1mg/kg), 或皮肤局部应用 (50mg/kg 总应用剂量: 溶剂载体 50% DMSO/50% H₂O), 抑制 i. v. LPS (1mg/kg) 引起的嗜中性白血球减少。(a) 3D53 (化合物 1); (b) 化合物 45; (c) 化合物 17。

[0059] 图 15 显示 C5a 拮抗剂 AcF-[OPdChaWR] 在大鼠再灌注过程中对下列指标血清水平增加的影响 (A) 肌酸激酶 (CK) 和 (B) 乳酸脱氢酶 (LDH)。数据为平均值 $\pm$ SEM (n = 6-10)。*P<0.05 所有的药物处理组 vs. 缺血 / 再灌注 (I/R) - 只有; †P<0.05 所有的药物处理组 vs. 假手术。

[0060] 图 16 显示 C5a 拮抗剂, AcF-[OPdChaWR] 在再灌注后 2、3 和 4 小时对大鼠中下列指标血清水平增加的影响: (A) 丙氨酸转氨酶 (ALT) 和 (B) 天冬氨酸转氨酶 (AST)。数据为平均值 $\pm$ SEM (n = 6-10)。*P<0.05 所有的药物处理组 vs. 缺血 / 再灌注 (I/R) - 只有; †P<0.05 所有的药物处理组 vs. 假手术。

[0061] 图 17 显示大鼠中下列指标的水平: (A) 循环 PMNs、(B) 肌肉髓过氧化物酶 (MPO)、(C) 肺 MPO 和 (D) 肝脏 MPO。水平为试验完成后在大鼠上测得。数据为平均值 $\pm$ SEM (n = 4-10)。*P<0.05 vs. 缺血 / 再灌注 (I/R) - 只有; +P<0.05 vs. 假手术。

[0062] 图 18 显示在试验结束时取得的大鼠肝脏匀浆样品中的肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 水平。数据为平均值 $\pm$ SEM (n = 4-10)。*P<0.05 vs. 缺血 / 再灌注 (I/R) - 只有; +P<0.05 vs. 假手术。

[0063] 图 19 显示试验结束时大鼠后肢肌肉的水肿 (湿重 - 干重比) 量。数据为平均值 $\pm$ SEM (n = 4-10)。*P<0.05 vs. 缺血 / 再灌注 (I/R) - 只有; +P<0.05 vs. 假手术。

[0064] 发明详述

[0065] 通常, 术语“治疗”等这里用来指影响研究对象、组织或细胞得到需要的药理和 / 或生理效果。效果可为预防性的, 全部或部分地预防疾病或征兆或症状, 以及和 / 或为治疗

性地,部分或全部治愈疾病。这里所用的“治疗”包含脊椎动物、哺乳动物,特别是人中的任何的疾病的治疗或预防,并包括:预防倾向于患病并且诊断还没有患病的研究对象中疾病的发生;抑制疾病,即,终止其发展;或疾病的减轻或改善作用,即引起疾病作用的转归。

[0066] 本发明包括用于改善疾病的多种药物组合物。根据本发明的一种实施方案的药物组合物通过将式 I 化合物、类似物、衍生物或其盐以及一种或多种药物活性物质式 I 化合物与一种或多种药物活性物质的组合用载体、赋性剂和添加剂或佐剂一起制备成适合对研究对象给药的形式而进行制备。

[0067] 经常施用的载体或佐剂包括碳酸镁、二氧化钛、乳糖、甘露醇以及其他糖类、滑石粉、乳蛋白、明胶、淀粉、维生素、纤维素及其衍生物、动植物油、聚乙二醇以及溶剂,例如无菌水、乙醇、甘油以及多羟基醇类。静脉内溶媒包括液体和营养补充剂。防腐剂包括抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂以及惰性气体。其他的可药用载体包括水性溶剂、无毒性赋性剂,包括盐类、防腐剂、缓冲剂等,如例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. Williams & Wilkins (2000) 和 The British National Formulary 43rd ed. (British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2002; <http://bnf.rhn.net>) 中所描述的,其内容这里引入作为参考。可药用组合物的 pH 以及各种成分的确切浓度根据本领域普通技术常规进行调节。参见 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7th ed., 1985)。

[0068] 可药用组合物优选地以单位剂量进行制备和给药。固体单位剂量包括片剂、胶囊以及栓剂。对研究对象进行治疗的时候,依据化合物的活性、给药方式、疾病的性质以及严重程度、对象的年龄以及体重,可以使用不同的剂量。在某些情况下,更高或更低的日剂量是合适的。日剂量的给药可下述方式实现:通过单个单位剂量的单次给药或数个更小剂量单位给药,以及也可以通过在特定的时间间隔多次施用细分剂量。

[0069] 本发明的药物组合物可以治疗有效量进行局部或全身给药。用于这种用途的有效量当然地取决于疾病的严重程度以及研究对象的体重以及一般状况。典型地,体外使用的剂量将为原位施用组合物的量有用的指导,并且动物模型可用来判断治疗细胞毒性副作用的有效剂量。在 Langer, Science, 249:1527, (1990) 中描述了多种需要考虑的因素。口服应用的制剂可为硬明胶胶囊的形式,其中所述活性成分与惰性固体稀释剂,例如,碳酸钙、磷酸钙或高岭土进行混合。其也可可为软明胶胶囊的形式,其中所述活性成分与水或油介质例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0070] 水性悬浮剂通常包含活性物质以及适于制备水性悬浮剂的赋性剂。这些赋性剂可为助悬剂例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶以及阿拉伯树胶;分散或润湿剂,其可为天然存在的磷脂例如卵磷脂;(b) 亚烷基氧化物与脂肪酸的缩合物,例如,硬脂酸聚氧乙烯酯;(c) 环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物,例如 heptadecaethylenoxy 十六烷醇;(d) 环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯,或(e) 环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的部分酯的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯。

[0071] 药物组合物可为无菌注射水性或油性悬浮液的形式。所述悬浮剂可依照已知的方法进行配制,利用合适的分散或润湿剂以及助悬剂例如上面述及的那些。无菌注射制剂也可在在无毒性肠胃外可接受的稀释剂或溶剂无菌注射溶液或悬浮液,例如,1,3-丁二醇溶

液。在可用的可接受的溶媒和溶剂中,有水、Ringer 氏溶液以及等张氯化钠溶液。此外,无菌、固化油通常用作溶剂或悬浮介质。为了这种目的,可使用任何温和的固化油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸可用于注射制剂。

[0072] 式 I 化合物可以脂质体给药系统进行给药,例如小单层脂质体、大单层脂质体以及多层脂质体。脂质体可由多种磷脂例如胆固醇、十八烷酰胺或磷脂酰胆碱形成。

[0073] 本发明式 I 化合物的剂量水平一般为约 0.5mg ~ 20mg 千克体重的水平,优选的剂量水平为约 0.5mg ~ 约 10mg 千克体重每天(为约 0.5g ~ 约 3g 每人每天)。可与载体物质混合制备单一剂量的活性成分的量将根据要处理的宿主以及具体的给药途径而变化。例如,人口服制剂可包含约 5mg ~ 1g 的活性化合物以及适当量方便量的载体物质,后者可在约 5 ~ 95% 总组合物的范围内变化。单位剂量形式通常包含约 5mg ~ 500mg 活性成分。

[0074] 但是,应该理解为具体的剂量水平将取决于多种因素包括具体使用化合物的活性、年龄、体重、健康状况、性别、饮食、给药时间、给药途径、排除速率、药物组合以及进行治疗的具体疾病严重程度。

[0075] 此外,一些本发明化合物将与水或常见的有机溶剂形成溶剂合物。这些溶剂合物包括在本发明范围之内。

[0076] 本发明的化合物还可与其他化合物组合以提供有效的组合。因此包括药物活性成分与本发明式 I 化合物的任何化学兼容的组合。

[0077] 应该清楚地理解为前述有关药物制剂、给药途径、剂量水平等论述同等地适用于化合物 1。

[0078] 这里使用的缩写如下:

[0079]

BOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-三-(二甲胺基)-磷盐
C5cR	C5a 受体
dH ₂ O	蒸馏水
D-Cha	D- 环己基胺
DIPEA	二异丙基乙基胺
DMF	N, N- 二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
HBTUO	苯并三唑 N' , N' , N' , N' - 四甲基脒六氟磷酸盐;
HEPES	N-[2- 羟基乙基] 哌嗪 -N' -[2- 乙磺酸]
HPLC	高效液相色谱
RP-HPLC	反相高效液相色谱
	静脉内
i. v.	
LPS	脂多糖
PMN	分叶核粒细胞
Po	口服
RMSD	平均平方根偏差 (root mean square deviation)
rp-HPLC	反相 - 高效液相
TFA	三氟乙酸;

[0080] 在说明书中,常规的单字母和三字母代码用来表示氨基酸。

[0081] 术语“3D53”和“PMX53”是同义词,并表示化合物

Ac-Phe-[Orn-Pro-dCha-Trp-Arg] ;

[0082] 术语“LP-10”和“PMX-201”是 synonym，并表示化合物 Ac-Phe-[Orn-Pro-dCha-Trp-Cit] ;以及

[0083] 术语“LP-16”和“PMX-205”是 synonym，并表示化合物 HC-[Orn-Pro-dCha-Trp-Arg]，其中“HC”表示氢化肉桂酰基 (hydrocinnamate)。

[0084] 本发明现在只参考下述一般性方法以及实验例进行描述。

[0085] 我们发现目前已经测试的所有式 I 化合物具有广泛的类似的药理活性，与化合物 1 (这里也指为 3D53 或 PMX53) 的活性类似，尽管单个具体化合物的物理化学性质、活性以及生物利用度随具体的取代基有一定程度的变化。因此，我们预期化合物 1 得到的体外或体内结果可以适当地预测在相应分析中式 I 化合物的活性。

[0086] 一般方法

[0087] 保护的氨基酸和树脂得自 Novabiochem。TFA、DIPEA 和 DMF (肽合成级) 购自 Auspep。所有其他的物质为试剂级，除非另有说明。制备级别的反相 HPLC 制备在 Vydac C18 反相柱 (2.2x25cm) 上进行，并且分析性反相 HPLC 分离在 Waters Delta $\square$ Pak PrepPak C18 反相柱 (0.8x10cm) 上进行，利用溶剂 A = 水 / 0.1% TFA 和溶剂 B = 水 10% / 乙腈 90%，0.09% TFA 的梯度混合物。肽的分子量用电喷雾质谱测定，在三重四极质谱仪 (PE SCIEX APIIII) 上记录，如 (Haviland 等, 1995) 中所述。¹H-NMR 谱在 Bruker ARX500MHz 或 Varian Unity400 谱仪上记录。质子归属利用 2D NMR 实验 (DFCOSY, TOCSY, NOESY) 进行判断。

[0088] 化合物通过质谱和反相分析性 HPLC 进行分析。

[0089] 化合物合成

[0090] 线性肽序列通过本技术领域人员公知的手工逐步标准的固相肽合成 (SPPS) 技术进行制备。氨基酸或肽端 HBTU 用 DIEA 进行原位中和。偶联用标准的定量茚三酮测定进行监控。利用 Boc 化学进行氨基酸的临时的 N α -保护，用 TFA 处理 2 次 1 分钟去除 Boc 基团。肽在 Novabiochem Boc-D-Arg(Tos)-PAM 或 Boc-L-Arg(Tos)-PAM 树脂上进行合成，取代值为约 0.2-0.5mmol/g。用液体 HF (10mL)、对甲酚 (1mL) 在 -5°C 处理 1-2 小时将肽完全脱保护并裂解。肽用反相 HPLC (例如梯度: 0% B ~ 75% B, 60 分钟) 纯化并经电喷雾质谱经分析。

[0091] 或者，线性肽可用 Fmoc 化学进行合成，利用 HBTU/DIEA 活化 Fmoc-D-Arg(Mtr)-Wang 树脂。Fmoc 基团的去除利用 50% 哌啶 / DMF 处理 2 个 1 分钟。裂解和脱保护使用 95% TFA / 2.5% TIPS / 2.5% H₂O 得到 Mtr-保护的肽，可用 RP-HPLC 纯化。

[0092] 环化线性肽的一般步骤涉及: 将肽 (1 当量) 和 BOP (5 当量) 溶解在 DMF (10mM 肽浓度) 中，并剧烈搅拌，然后加入 DIEA (15 当量)。尽管在绝大多数情况下反应在 2 小时内完成，一般将溶液室温搅拌过夜。在高真空 30°C 下在旋转蒸发仪上除去 DMF，然后经 RP-HPLC 纯化。对于包含游离 N 端的环状肽，将 Fmoc 基团用作环化步骤中临时的 N-端保护基。在高真空 30°C 下在旋转蒸发仪上除去 DMF，并且然后将肽用 30% 哌啶 / DMF 室温处理 1 小时以除去 Fmoc 基团。然后高真空除去溶剂，并经 RP-HPLC 纯化。下面描述了代表性的环肽的合成。

[0093] NMR 结构测定

[0094] 在 Varian Unity400 谱仪在 24°C 参照溶剂测定测试化合物 (3mg 的 750 μ l

d_6 -DMSO 溶液, δ 2.50) 的 ^1H -NMR 谱。二维 ^1H □ NMR NOESY (弛豫接力 2.0s, 混合时间 50–300ms), DFQ □ COSY 和 TOCSY (混合时间 75ms) 实验以相灵敏的模式获得并记录。对所有实验, 获得时间 = 0.186s, 谱宽 = 5500Hz, 复合点数 (t_1 维) = 1024。数据及进行零填充并且在二维方向傅立叶转换成 1024 实点。

[0095] 化合物 1 的 NMR 数据利用 TRIAD 软件 (Tripos Assoc.) 在 SiliconGraphics Indy 工作站上进行处理。将 2DNOE 交叉峰进行积分并表征为强 (1.8–2.5 Å)、中 (2.3–3.5 Å) 以及弱 (3.3–5.0 Å)。从上和下距离限制编目利用 Diana2.8 (69 距离限制, 包括对相邻残基 27 以及更远 6) 利用剩余二面角限制 (REDAC) 策略计算初步的三维结构。利用 MARDIGRAS 精确地计算上和下距离限制。在本阶段, 检查肽可能存在的氢键, 并将其添加为距离限制。将 50 个最低能量 Diana 结构进行有限分子动力学 (RMD) 以及能量最小化 (REM)。最初, REM 由 50 步最速下降组成, 然后 100 步成对梯度最小化。RMD 通过将结构加热至 300K 刺激 1ps, 然后 500K 刺激 1ps 进行。用 2ps 将温度逐渐降至 300K 最后在 200K 保持 2ps。用 50 步最速下降, 200 步成对梯度然后 300 步 Powell 最小化执行 REM。检查最后的结构以得到相对于骨架重原子 (N, C α 和 C) 具有平均成对 rms 差异。50 个结构的 20 个对所有骨架原子 (O, N, C) 具有平均 rmsd < 0.5 Å。

[0096] 受体 – 结合分析

[0097] 分析按照下述方法进行, 用新鲜的人 PMNs, 如以前所述 (Sanderson 等, 1995) 的方法分离得到, 利用缓冲液 50mM HEPES、1mM CaCl_2 、5mM MgCl_2 、0.5% 牛血清白蛋白、0.1% 杆菌肽以及 100 μM 苯基甲基磺酰氯 (PMSF) 进行。在 4°C 分析中, 将缓冲液、未标记的重组人 C5a (Sigma) 或肽、Hunter/Bolton 标记的 ^{125}I -C5a ($\sim 20\text{pM}$) (New England Nuclear, MA) 以及 PMNs (0.2×10^6) 依次加入到 Millipore Multiscreen 分析板 (HV0.45) 中, 终体积为 200 μL /孔。4°C 孵育 60 分钟后, 过滤样品并将板用缓冲液洗涤 1 次。将滤器干燥, 冲压并在 LKB γ 计数器终计数。非特异性结合通过包含 1mM 肽或 100nM C5a 进行评价, 一般为总结合的 10–15%。

[0098] 利用非线性回归和用 Dunnett post-test 统计进行数据分析。

[0099] 利用髓过氧化物酶释放分析评价拮抗剂活性

[0100] 细胞的分离如以前所述 (Sanderson 等, 1995) 并与细胞松弛素 B 孵育 (5 $\mu\text{g/mL}$, 15 分钟, 37°C)。将包含 0.15% 明胶和肽的 Hank's 平衡盐溶液加到 96 孔板 (总体积 100 μL /孔) 中, 然后加入 25 μL 细胞 ($4 \times 10^6/\text{mL}$)。为了评价各肽拮抗 C5a 的能力, 将细胞与各肽在 37°C 孵育 5 分钟, 然后加入 C5a (100nM) 并继续孵育 5 分钟。然后将 50 μL 磷酸钠 (0.1M, pH6.8) 加到各孔中, 将板冷却到室温, 并将 25 μL 等体积的二甲氧基对二氨基联苯 (5.7mg/mL) 和 H_2O_2 (0.51%) 的新鲜混合物加入到各孔中。在 10 分钟的时候加入 2% 叠氮钠终止反应。在 Bioscan450 板读取器上测定 450nm 处的吸光度, 相对于对照值 (无肽) 进行校正, 并通过非线性回归进行分析。

[0101] 消炎活性的体内分析

[0102] 下述公知的体内分析体系用来评价本发明化合物的消炎活性。用非线性回归分析和 Student's t -检验、变量分析方法分析所有的分析数据, $p < 0.05$ 作为具有显著意义的临界水平。

[0103] (a) 角叉(菜)胶爪水肿

[0104] 对麻醉的(腹腔注射氯胺酮和甲苯噻嗪)Wistar 大鼠(150-200g)或小鼠注射无菌空气(第1天20ml,第4天10ml)进入背部的皮下组织。6天后可以使用形成的腔,将角叉(菜)胶(2ml,1% w/w 的0.9%盐水溶液)注射到空气袋中,10小时后收集流出液。第6天后每天施用测试化合物,并通过空气袋流出液中的细胞差分计数分析它们的消炎效果。注射后的合适的时间处死动物,并用2ml的0.9%盐水灌洗空腔;灌洗液转移到肝素化的管中并用血细胞计数器和Diff-Quik染色细胞离心制剂对细胞进行计数。

[0105] 或者,通过足部注射注射角叉(菜)胶在Wistar大鼠中发展的常规的角叉(菜)胶爪水肿可用来引起水肿,后者在2小时内可见,在4小时发展到极限。测试化合物在炎症原(inflammagen)前40分钟施用,并通过2和4小时后的爪的微弯脚器测定评价其效果。参见Fairlie, D. P. 等(1987)。还参见Walker和Whitehouse(1978)。

[0106] (b) 佐剂诱发的关节炎。

[0107] 在大鼠(3系)中诱导佐剂诱发的关节炎,通过免疫(注射热灭活的结核分支杆菌Mycobacterium tuberculosis)或化学(用avridine)方法,通过与油性溶媒一起在尾部接种佐剂,例如Freund氏佐剂(参见Whitehouse, M. W., Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases, Eds. Greenwald, R. A.; Diamond, H. S.; Vol. 1, pp. 3-16, CRC Press)。

[0108] 在13天内,佐剂诱发的关节炎显示为尾部的局部炎症以及溃疡、所有四爪的总体肿胀、爪和耳朵的炎症损伤、体重下降以及发热。这些症状,与人体中的那些炎症疾病类似(Winter和Nuss, 1966),可用药物例如消炎痛或环孢霉素减轻,在人中也显示处有益的效果(例如Ward和Cloud, 1966)。在第14天不用药物处理,关节炎大鼠将出现爪肥大、白蛋白减少以及血清中上升的急性阶段反应蛋白,以及外源性物质的肝代谢下降,显示为延长的巴比妥-诱导的睡眠时间。

[0109] 为了评价化合物的活性,在用关节炎原接种(第0天)后的第10~13天,将化合物经口($\leq 10\text{mg/kg/天}$)或腹膜内(腹腔注射)给药4天。如果化合物具有活性,或者炎症不可见,或尾部或前爪的炎症显著减轻,用微卡钳测量爪厚度以及尾部体积进行评估,以及炎症损伤的总检查。在第18天,将动物通过颈部错位处死,除非没有关节炎症状,在这期间在得到伦理委员会允许的基础上继续观察。实验交错排列以使通量最大化,在进行化合物之间的早期比较。这种常规分析被认同为确证用于人体的抗炎剂的方法。

[0110] 药代动力学

[0111] 雌性和雄性Wistar大鼠(200-250g)用1mL的zoletil(50mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg; Lyppard, Australia)进行麻醉,经腹膜内注射。在大鼠的下腹部区域剃出5x10cm的区域并作记号,在该区域应用药物剂量。包含10mg/ml的C5a拮抗剂储存液以各种浓度的水溶解在溶剂丙二醇或二甲基亚砜中,并用抹刀均匀地涂抹在大鼠的剃毛的腹部区域。用加热垫来保持大鼠的体温,并在第1小时每隔15分钟采集血液样品,之后每1小时采集1次共3小时。

[0112] 立即将血样品加入到包含肝素(500单位/ μL)管中并离心(11000xg)。取出各样品的血浆层并在 -20°C 储存。加入氘代的内标 $^2\text{H}_3\text{CO-F-[OPdChaWR]}$ 50 μL , 5 $\mu\text{g/mL}$ 的50%乙腈/水溶液)并涡旋。将样品进一步用高效液相色谱(HPLC)级的乙腈进行1:3稀释并快速涡旋(20sec),然后离心(11000xg)。该方法导致样品中大血浆蛋白沉淀,并将药物

从血浆中完全萃取出来。样品的液体部分放置在 1mL Eppendorf 管中并储存待分析。

[0113] 这些样品转移至 96 孔板中并用 GeneVac 离心蒸发器蒸发至干,然后用流动相重建于孔 (20 μ L) 中。样品的分析用液相色谱 (LCMS) 进行,利用装配有多孔板自动进样器和 PE Sciex Qstar Pulsar ESI-TOF 质谱仪的 Agilent1100series HPLC。从药物:内标标准峰面积比的标准曲线确定浓度。标准的制备通过将适当量的药物以及内标加入到未处理的大鼠血浆中,并用与实验样品同样的方法进行提取和制备。

[0114] 实施例 1 :

[0115] 环状化合物的合成

[0116] 环肽 AcF-[OPdChaWR] (1) 的合成。线性肽 Ac-Phe-Orn-Pro-dCha-Trp-Arg 以 0.20mmole 规模用 Boc 化学方法进行合成,利用 HBTU/DIEA 活化并在 Boc-L-Arg(Tos)-PAM 树脂 (338mg, SV = 0.591mmol/g) 进行原位中和。树脂 (457mg) 的裂解和脱保护通过将树脂用 HF (10ml) 和对甲酚 (1ml) 在 $-5 \sim 0^{\circ}\text{C}$ 处理 1-2 小时而实现,得到粗肽 (160mg, 90%)。环化涉及将粗肽 (41mg, 45 μ mol)、BOP (126mg, 0.28mmol) 和 DIEA (158 μ L, 0.9mmol) 在 DMF (57mL) 中搅拌 15 小时。真空去除溶剂并将环状肽经 rpHPLC 纯化 (18.8mg, 47%) Rt = 10.8 分钟 (梯度:70% A/30% B $\sim$ 0% A/100% B, 30 分钟)。MS: [M+H]⁺ (计算值) = 896.5, [M+H]⁺ (实验值) = 896.5。

[0117] 环状 AcF-[OPdPheWR] (33) 的合成。线性肽 Ac-Phe-Orn-Pro-dPhe-Trp-Arg 用 Boc 化学方法利用 HBTU/DIEA 活化以及原位中和在 Boc-L-Arg(Tos)-PAM 树脂上进行合成。树脂的裂解和脱保护通过将树脂用 HF (10ml) 和对甲酚 (1ml) 在 $-5 \sim 0^{\circ}\text{C}$ 处理 1-2 小时而实现,得到粗肽。环化涉及将粗肽 (85mg)、BOP (200mg) 和 DIEA (222 μ L) 在 DMF (10mL) 中搅拌 15 小时。真空去除溶剂并将环状肽经 rpHPLC 纯化 (31mg) Rt = 16.7 分钟 (梯度:70% A/30% B $\sim$ 0% A/100% B, 30 分钟)。MS: [M+H]⁺ (计算值) = 890.5, [M+H]⁺ (实验值) = 890.5。

[0118] 环状 AcF-[OPdChaFR] (60) 的合成。线性肽 Ac-Phe-Orn-Pro-dCha-Phe-Arg 用 Boc 化学方法利用 HBTU/DIEA 活化以及原位中和在 Boc-L-Arg(Tos)-PAM 树脂上进行合成。树脂的裂解和脱保护通过将树脂用 HF (10ml) 和对甲酚 (1ml) 在 $-5 \sim 0^{\circ}\text{C}$ 处理 1-2 小时而实现,得到粗肽。环化涉及将粗肽 (104mg)、BOP (57mg) 和 DIEA (103 μ L) 在 DMF (1mL) 中搅拌 15 小时。真空去除溶剂并将环状肽经 rpHPLC 纯化 (52mg)。Rt = 11.37 分钟 (梯度:70% A/30% B $\sim$ 0% A/100% B, 15 分钟)。MS: [M+H]⁺ (计算值) = 857.5, [M+H]⁺ (实验值) = 857.4。

[0119] 环肽 AcF-[OPdCha(N-Me-Phe)R] (64) 的合成。线性肽 Ac-Phe-Orn-Pro-dCha-(N-Me-Phe)-Arg-OH 用 Fmoc 化学进行合成,利用 HBTU/DIEA 活化以及原位中和在 Novabiochem 的 Fmoc-L-Arg(pbf)-Wang 树脂 (0.35mmol/g) 上进行,利用甲基-L-Phe (281mg, 2 当量)、Fmoc-dCha (275mg, 2 当量)、Fmoc-Pro (472mg, 4 当量)、Fmoc-Orn (Boc) (477mg, 3 当量)、Fmoc-Phe (542mg, 4 当量) 和 Ac₂O (4 当量)。树脂的裂解和脱保护通过用 95% TFA (15mL) 处理树脂 1 小时而实现,乙醚沉淀后得到粗肽 (150mg)。环化涉及将 rpHPLC 纯化的肽 (100mg)、BOP (200mg) 和 DIEA (222 μ L) 在 DMF (2mL) 中搅拌 4 小时。真空去除溶剂并将环状肽经 rpHPLC 纯化 (50mg) Rt = 33 分钟 (梯度:70% A/30% B $\sim$ 0% A/100% B, 30 分钟)。MS: [M+H]⁺ (计算值) = 871.5, [M+H]⁺ (实验值) = 871.5。

[0120] 环肽 AcF-[{Orn-(δ N-Me)}PdChaWR] (66) 的合成。Boc-(δ N-Me-Orn)-OH 按照报道的方法 (Pol. J. Chem. 1988, 62, 257-261) 进行合成。线性肽 Ac-Phe-[Orn-(δ N-MeC bz)]-Pro-dCha-Trp-Arg-OH 利用 Boc 化学进行合成, 用 HBTU/DIEA 活化以及原位中和在 Novabiochem Boc-L-Arg(tosyl)Pam 树脂 (0.41mmol/g) 上进行。将树脂用 HF/ 对甲苯酚处理 2 小时实现树脂的裂解和脱保护, 用乙醚沉淀后得到粗肽。环化涉及将 RP-HPLC 纯化的肽 (100mg)、BOP (200mg) 和 DIEA (222 μ L) 在 DMF (2mL) 中搅拌 4 小时。真空去除溶剂, 并将环状肽经 rpHPLC 纯化。Rt = 11.5 分钟 (35% B)。MS : [M+H]⁺ (计算值) = 910.5, [M+H]⁺ (实验值) = 910.5。

[0121] 纯化及表征

[0122] 粗肽用制备性 rp-HPLC 利用 Vydac C18 反相柱 (2.2x25cm) 纯化。使用 1mL/ 分钟的溶剂 A ~ 溶剂 B 梯度并在 214nm 检测。收集级分并用离子喷雾质谱 (ISMS) 测定正确的分子量, 用分析性 rp-HPLC 检测纯度, 在 WatersDelta-Pak PrepPak C18 反相柱 (0.8x10cm) (变化梯度例如 : 0 ~ 75% B, 60 分钟) 上进行。乙腈为 HPLC 级 (BDH Laboratories) 且 TFA 为合成级 (Auspep)。

[0123] 表 1 显示了用来制备环状化合物 1-70 的反应实例, 以及它们用电喷雾质谱 (Mass Spec Found) 以及在指定洗脱条件下反相 HPLC (rp-HPLC) 保留时间 (Rt 分钟) 的表征。

[0124] 表 2 描述了各个化合物的结构, 并列出了它们用髓过氧化物酶分析测量各自的对人分叶核白细胞 (嗜中性粒细胞) 上 C5a 受体的受体结合亲和力以及拮抗剂活性。

[0125]

表 1：表 2 中所列环状化合物的合成和表征总结

化合物	线性肽 用量	BOP 用量	DIPEA 用量	DMF 用量	环化肽 产量	质谱 计算值	质谱 实测值	rpHPLC 条件	rpHPLC Rt(分钟)
1	41mg	126mg	158 μ L	57mL	19mg	895.5	896.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	10.8
2						957.5	958.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	14.8
3	78mg	36mg	71 μ L	1mL	29mg	937.6	938.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	13.1
4	65mg	29mg	57 μ L	1mL		966.6	967.5	15 $\rightarrow$ 100%B 60m	18.5-20.5
5	81mg	36mg	71 μ L	1mL		967.5	968.5	30 $\rightarrow$ 100%B 90m	23.2
6	25mg	-	0.25mL 2M 氢氧化钠	0.5mL 甲醇	定量			同上	19.3
7	92mg	200mg	222 μ L	10mL	29mg	910.5	910.3	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	23.0-23.8
8	87mg	200mg	222 μ L	10mL	18mg	896.5	898.4	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	13.1-14.2
9	55mg	200mg	222 μ L	10mL	5mg	912.5	912.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	3.2-4.2
10	105mg	200mg	222 μ L	10mL	51mg	932.5	932.7	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	6.0-8.2
11	88mg	200mg	222 μ L	10mL	27mg	1008.5	1008.7	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	10.4-11.7
12	72mg	200mg	222 μ L	10mL	15mg	882.5	882.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	7.0-8.0
13	53mg	28mg	56 μ L	1mL	21mg	805.5	806.5	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	7.6
14	51mg	200mg	222 μ L	10mL	12mg	914.5	914.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	8.6-9.4

[0126]

15	90mg	200mg	222 μ L	10mL	33mg	914.5	914.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	7.3-8.5
16	81mg	200mg	222 μ L	10mL	22mg	935.5	935.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	21.8-22.2
17	90mg	46mg	91 μ L	1mL	46mg	838.5	839.4	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	13.4-17
18	60mg	31mg	61 μ L	1mL	25mg	836.5	837.4	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	15.1-18
19	53mg	33mg	65 μ L	1mL		691.4	692.4	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	9-10.5
20	66mg	200mg	222 μ L	10mL	15mg	898.5	898.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	14.2-14.7
21	81mg	200mg	222 μ L	10mL	22mg	912.5	912.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	17.2-18.0
22	59mg	200mg	222 μ L	10mL	20mg	945.5	946.7	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	
24	110mg	200mg	222 μ L	10mL	37mg	952.6	952.4	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	16.7-17.2
25	82mg	200mg	222 μ L	10mL	20mg	912.5	912.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	7.2-8.3

[0127]

化合物	线性肽 用量	BOP 用量	DIPEA 用量	DMF 用量	环化肽 产量	质谱计 算值	质谱实 测值	ipHPLC 条件	ipHPLC Rt(分钟)
26	71mg	200mg	222 μ L	10mL	16mg	928.5	928.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	6.7-7.6
27	75mg	200mg	222 μ L	10mL	21mg	896.5	896.7	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	25.9-26.3
28	130mg	62mg	122 μ L	2mL	90mg	909.5	910.4	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	14.6-17.6
29	143mg	73mg	144 μ L	2mL	60mg	841.4	842.5	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	7.4-8.9
30	135mg	72mg	142 μ L	2mL		813.4	814.4	10 $\rightarrow$ 100%B 60m	16.8-18.6
31	102mg	52mg	101 μ L	1mL		855.5	856.6	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	8.2-9.7
32	49mg	200mg	222 μ L	10mL	8mg	928.5	929.6	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	12.7-13.7
33	85mg	200mg	222 μ L	10mL	31mg	889.5	890.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	16.5-16.9
34	122mg	57mg	113 μ L	2mL		901.5	902.2	30 $\rightarrow$ 100%B 15m	6.0
35	106mg	49mg	95 μ L	2mL		901.5	902.2	30 $\rightarrow$ 100%B 15m	10.7
36	120mg	61mg	122 μ L	2mL		855.5	856.4	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	9.2-10.7
39	70mg	200mg	222 μ L	10mL	28mg	906.5	906.7	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	
40	62mg	34mg	66 μ L	1mL		799.4	800.6	20 $\rightarrow$ 100%B 60m	9-9.7
44	100mg	48mg	93 μ L	1mL		909.5	910.6	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	13.4-16.3
45	94mg	45mg	89 μ L	1mL		896.5	897.8	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	14.0-15.2

[0128]

49	55mg	29mg	58 μ L	1mL		796.4	797.4	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	17.2-18.6
50	75mg	30mg	0.06mL	1mL	35mg	862.5	863.7	30 $\rightarrow$ 100%B 90m	21-23
51	64mg	27mg	0.05mL	1mL	25mg	822.5	823.7	30 $\rightarrow$ 100%B 90m	14.5-17
52	196mg	94mg	184 μ L	2mL	67mg	906.5	907.5	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	17-18.4
53	177mg	84mg	166 μ L	2mL		906.5	907.6	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	16.1-20.4
54	79mg	200mg	222 μ L	10mL	22mg	944.5	945.5	30 $\rightarrow$ 100%B 30m	
56	161mg	79mg	156 μ L	2mL		868.5	869.2	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	
57	70mg	39mg	70 μ L	1mL		846.5	847.4	10 $\rightarrow$ 100%B 60m	15.3-17.6
58	160mg	76mg	150 μ L	2mL		912.5	913.3	30 $\rightarrow$ 100%B 60m	15.4-19.6
59	150mg	73mg	143 μ L	2mL		895.5	896.6	30 $\rightarrow$ 100%B 15m	10.4

[0129]

化合物	线性肽 用量	BOP 用量	DIPEA 用量	DMF 用量	环化肽 产量	质谱计 算值	质谱实 测值	rpHPLC 条件	rpHPLC Rt(分钟)
60						856.5	857.4	30→100%B 15m	11.4
61	160mg	80mg	156μL	2mL		870.5	871.4	30→100%B 60m	13.9-17.4
62	180mg	91mg	180μL	2mL	84mg	850.4	851.4	30→100%B 60m	8.9-11.3
63	174mg	83mg	164μL	2mL	75mg	900.5	901.4	30→100%B 60m	13.4-15.3
64	100mg	200mg	222μL	2mL	50mg	870.5	871.5	30→100%B 60m	33.0
65	100mg	200mg	222μL	2mL		903.5	904.5	35%B	8.2
66	100mg	200mg	222μL	2mL		909.5	910.5	35%B	11.5
67	50mg	50mg	100μL	5mL	22mg	861.6	862.6	30→100%B 30m	20.5
68	50mg	50mg	100μL	5mL	18mg	881.5	882.4	30→100%B 30m	29.5
69	50mg	50mg	100μL	5mL	19mg	863.0	864.0	30→100%B 30m	23.2
70	50mg	50mg	100μL	5mL	4mg*	884.0	885.0	30→100%B 30m	29.5

*Tyr-O-苄基为使用的氨基酸，但是产物涉及重排成苄基取代基取代的间-C-取代酪氨酸(见化合物 70 的结构)。

- [0130] 实施例 2
- [0131] 环状化合物的拮抗剂活性

[0132] 表 2 显示了实施例 1 中合成的化合物的结构,以及它们各自用髓过氧化物酶分析测定的对人分叶核白细胞(嗜中性粒细胞)C5a 受体的受体结合亲和力和拮抗剂活性。

[0133] 化合物 1-9、16-18、20、21、23、24、27-32、36、38、44、51 和 59 包括在我们较早专利申请 PCT/AU98/00490 公开的结构通式的宽范围内。但是,表 2 证实事实上,在这些化合物中,只有 1-6、17、20、28、30、31、36 和 44 对人嗜中性粒细胞 C5a 受体具有可观的拮抗剂活性($IC_{50} < 1 \mu M$)。其他化合物,7-9、16、18、21、23、24、27、29、32、38、51 以及 59 没有显示可观的拮抗剂活性和/或受体亲和力,在所有的情况下 $IC_{50} > 1 \mu M$ 。

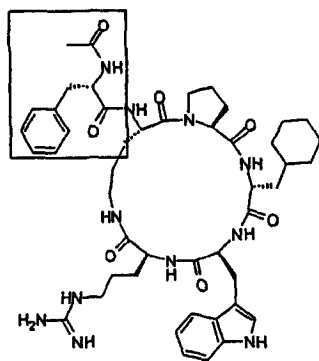
[0134] 另一方面,化合物 10-15、19、22、25、26、33-35、37、39-43、45、47-50、52-58 以及 60-70 没有包括在 PCT/AU98/00490 范围内,尽管它们的确涉及与所述申请中公开的相同或类似的环状骨架。表 2 显示了这些新化合物中,10-12、14、15、25、33、35、40、45、48、52、58、60、66 和 68-70 具有可观的拮抗剂活性($IC_{50} < 1 \mu M$)。然而,其他的化合物(13、19、22、26、34、37、39、41-43、47、49、50、53-57、61-65 和 67)没有显示可观的拮抗剂活性和/或受体亲和力,在这些情况下, $IC_{50} > 1 \mu M$ 。

[0135] 表 2 中的这些结果使我们能够进一步定义并提炼 C5a 受体拮抗剂活性所需要的活性药效团的限制条件,以得到或预测亚微摩尔活性的拮抗剂。

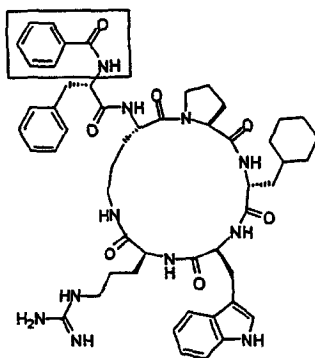
[0136] 表 2 :70 个 C5a 受体环状拮抗剂的实例的结构以及对人分叶核白细胞的活性

[0137]

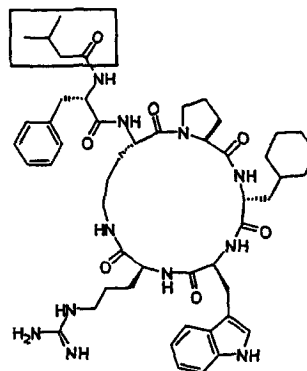
C5aR 拮抗剂实例



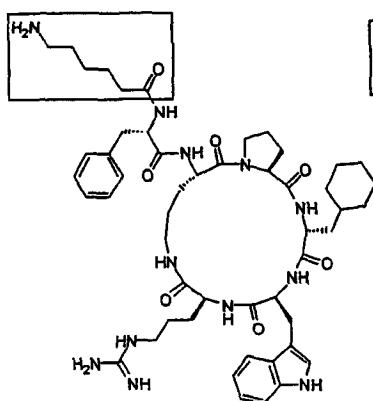
1
C5aR 结合 IC₅₀: 0.45 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 28nM



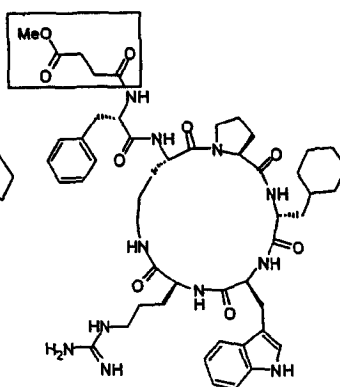
2
C5aR 结合 IC₅₀: 1.4 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 110nM



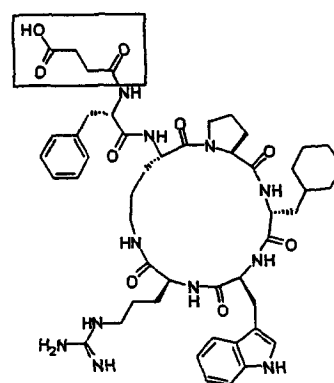
3
C5aR 结合 IC₅₀: 0.84 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 30nM



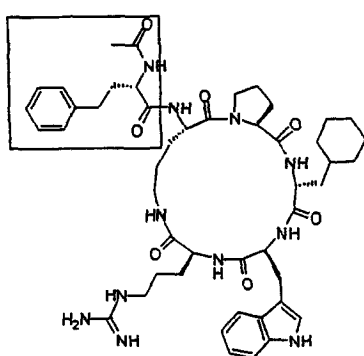
4
C5aR 结合 IC₅₀: 0.25 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 62nM



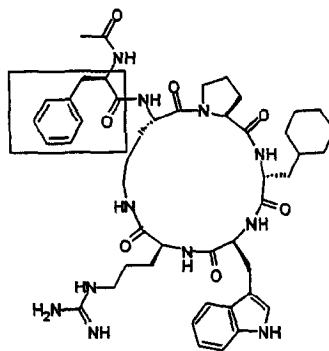
5
C5aR 结合 IC₅₀: 0.84 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 38nM



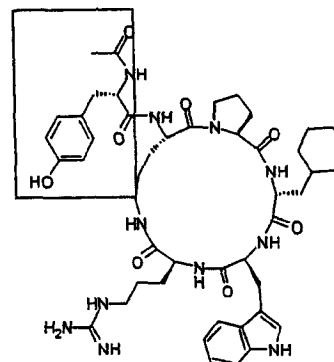
6
C5aR 结合 IC₅₀: 0.45 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 23nM



7
C5aR 结合 IC₅₀: >1000 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

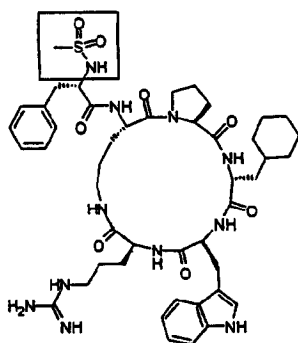


8
C5aR 结合 IC₅₀: 28.9 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

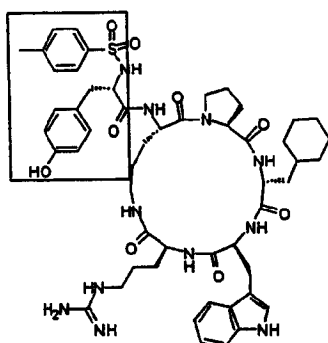


9
C5aR 结合 IC₅₀: >9 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

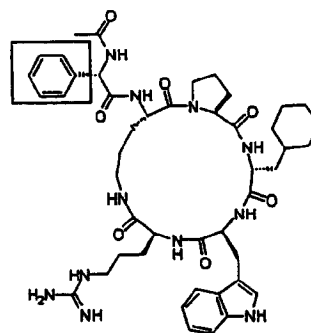
[0138]



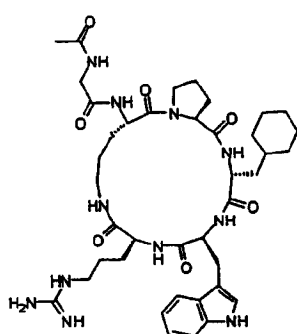
10
C5aR 结合 IC₅₀: 0.47 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 34nM



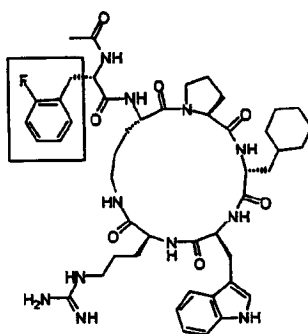
11
C5aR 结合 IC₅₀: 0.96 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 291nM



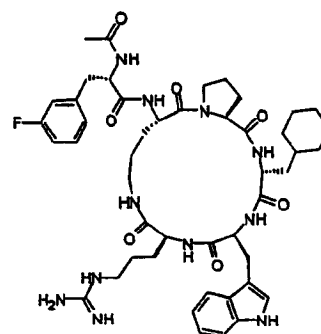
12
C5aR 结合 IC₅₀: 0.76 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 151nM



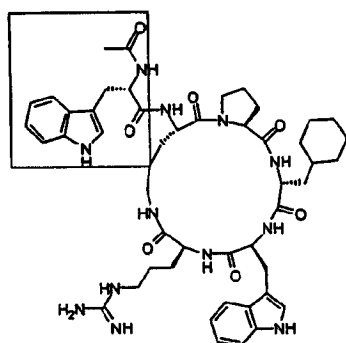
13
C5aR 结合 IC₅₀: 37 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



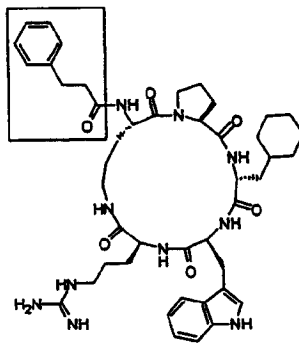
14
C5aR 结合 IC₅₀: 0.52 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 38nM



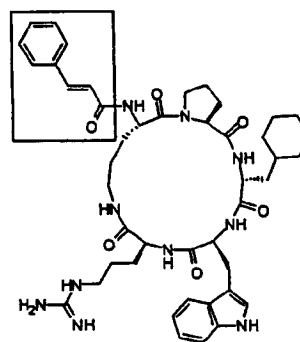
15
C5aR 结合 IC₅₀: 0.39 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



16
C5aR 结合 IC₅₀: 19.2 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

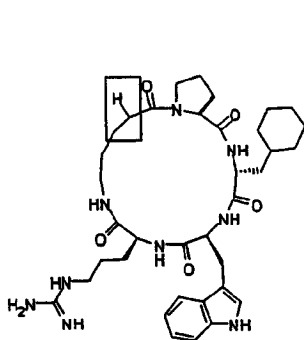


17
C5aR 结合 IC₅₀: 0.22 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 31nM

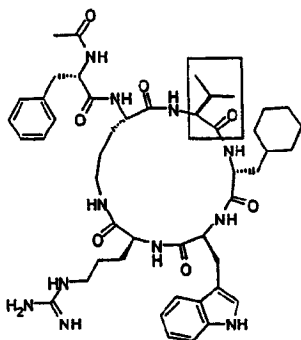


18
C5aR 结合 IC₅₀: 9.9 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

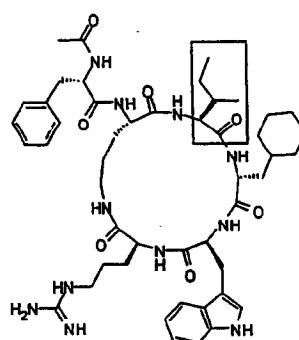
[0139]



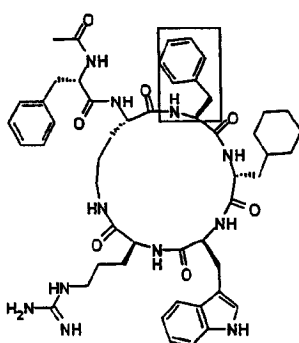
19
C5aR 结合 IC₅₀: 16.1 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



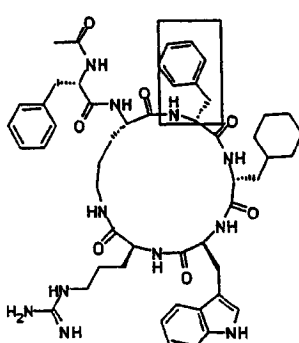
20
C5aR 结合 IC₅₀: 0.68 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



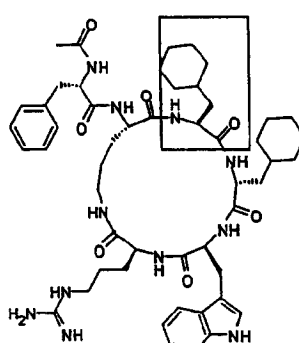
21
C5aR 结合 IC₅₀: 2.9 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



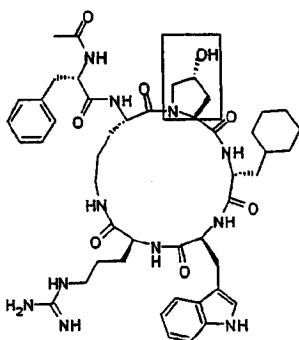
22
C5aR 结合 IC₅₀: 2.4 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



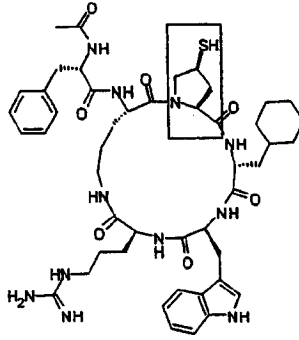
23
C5aR 结合 IC₅₀: 2.4 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



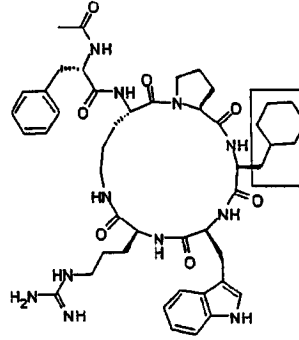
24
C5aR 结合 IC₅₀: >1000 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



25
C5aR 结合 IC₅₀: 0.27 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

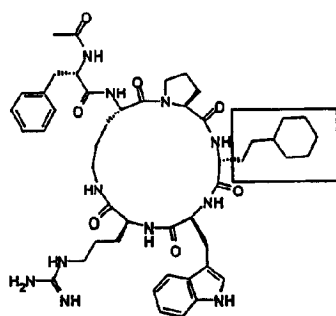


26
C5aR 结合 IC₅₀: 75.5 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

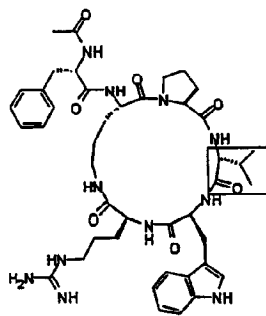


27
C5aR 结合 IC₅₀: 144 μM
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

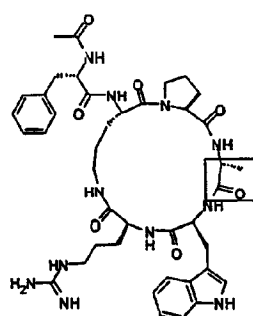
[0140]



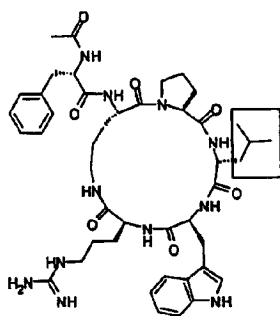
28
C5aR 结合 IC₅₀: 0.39 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 40nM



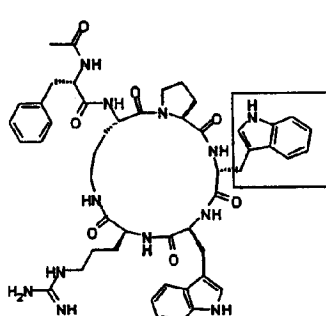
29
C5aR 结合 IC₅₀: 13 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



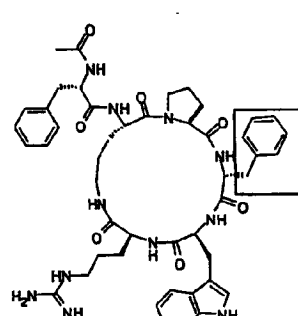
30
C5aR 结合 IC₅₀: 145 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 37.1 μ M



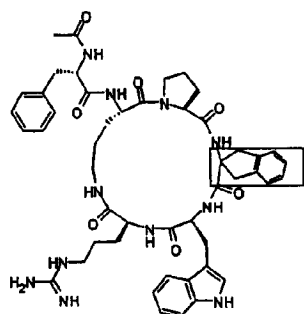
31
C5aR 结合 IC₅₀: 1.1 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 35nM



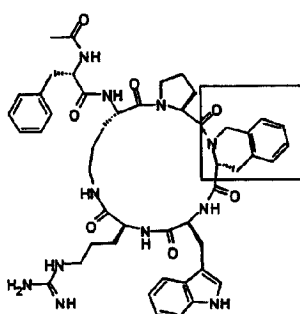
32
C5aR 结合 IC₅₀: 30.1 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND



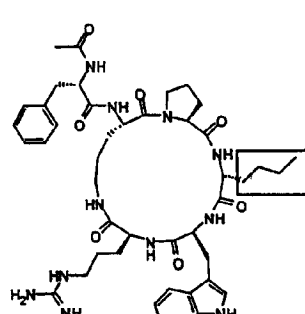
33
C5aR 结合 IC₅₀: 0.26 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 22nM



34
C5aR 结合 IC₅₀: 22.7 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: ND

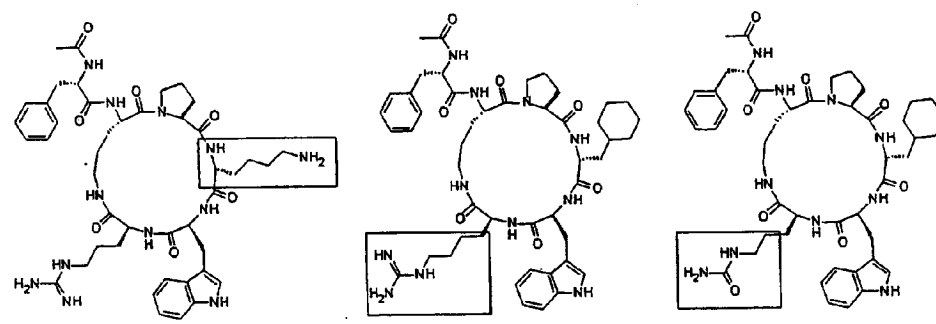
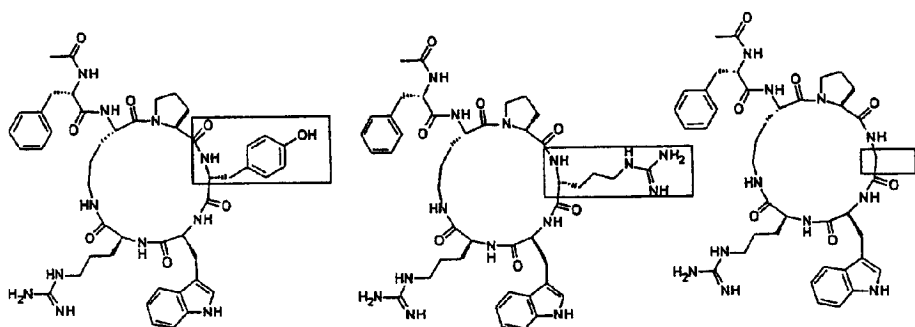
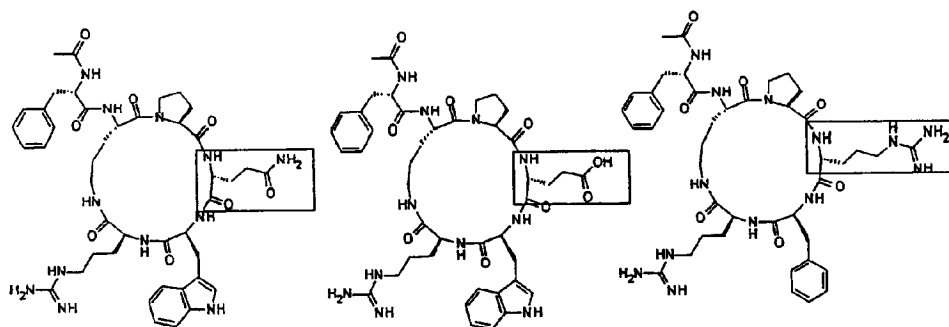


35
C5aR 结合 IC₅₀: 9.2 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 15 μ M

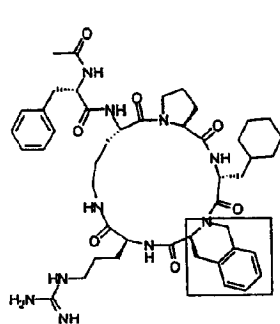


36
C5aR 结合 IC₅₀: 0.53 μ M
C5aR 拮抗剂 IC₅₀: 30nM

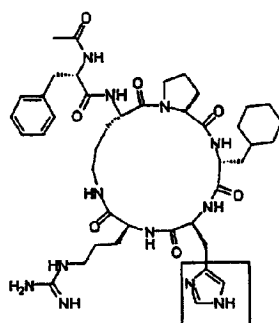
[0141]



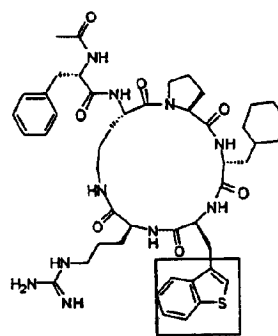
[0142]



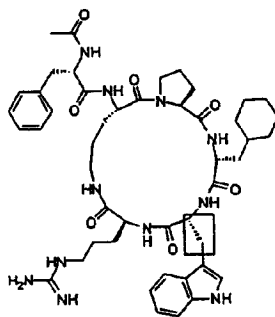
56
C5aR结合IC₅₀: 3.7μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: 10.9μM



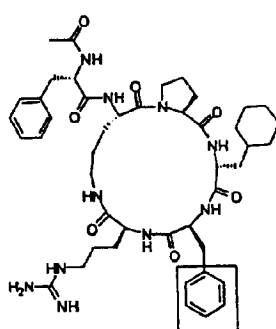
57
C5aR结合IC₅₀: 23.5μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: ND



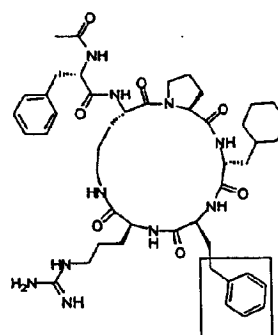
58
C5aR结合IC₅₀: 0.28μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: 172nM



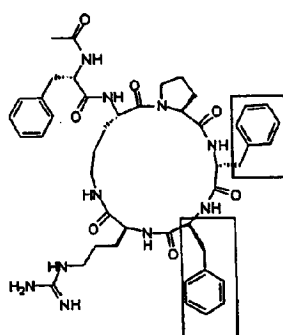
59
C5aR结合IC₅₀: 30.4μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: ND



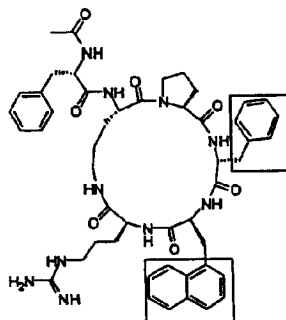
60
C5aR结合IC₅₀: 0.25μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: 32nM



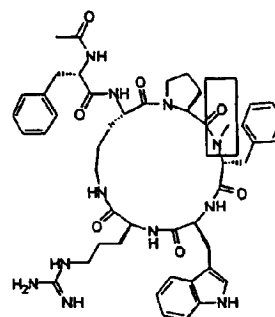
61
C5aR结合IC₅₀: 11.5μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: ND



62
C5aR结合IC₅₀: 5.2μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: 4.6μM



63
C5aR结合IC₅₀: 3.1μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: ND



64
C5aR结合IC₅₀: .27μM
C5aR拮抗剂IC₅₀: 2μM

[0143] “C5a 结合 IC₅₀”指与人 PMNs 实现 50%最大结合所需要的化合物浓度。“C5a 拮抗剂 IC₅₀”指实现 50%拮抗从 C5a- 刺激的人 PMNs 髓过氧化物酶释放所需要的化合物浓度。框中的区域表示结构之间相对变化的位置。化合物 1 为从我们前述申请 PCT/AU98/00490 中得到的先导化合物,这里也包括用于比较。

[0144] 实施例 3:

[0145] 环状 C5a 拮抗剂

[0146] 这些环状拮抗剂以及它们明显的受体-结合亲和力和拮抗剂活性的一些实例显

示在 3 中,其中使用了单字母来表示氨基酸。“d”表示氨基酸的右旋 (D) 形式。“ND”表示没有测定。

[0147] 表 3

[0148] 作为 C5a 拮抗剂的新化合物

[0149]

AcPhe 置换	化合物 编号	n	结合 IC ₅₀ (μ M)	拮抗剂 IC ₅₀ (nM)
MsF[OP-dCha-WR]	10	3	0.47	34
TsF[OP-dCha-WR]	11	3	0.96	291
AcPhg[OP-dCha-WR]	12	3	0.76	151
AcG[OP-dCha-WR]	13	3	37.2	ND
Ac(o-fluoro)F[OP-dCha-WR]	14	3	0.52	38
Ac(m-fluoro)F[OP-dCha-WR]	15	1	0.39	ND
HC[OP-dCha-WR]	17	3	0.22	31
Hydrogen[OP-dCha-WR]	19	3	>1000	ND

[0150] Ms = 甲磺酰基, Ts = 甲苯磺酰基, MeSuc = 甲基琥珀酸酯, Suc = 琥珀酸酯, Ahx = 6-氨基己酸酯, HPhe = 高苯基丙氨酸, Phg = 苯基甘氨酸, HC = 氢化肉桂酰胺基 (Hydrocinnamate)

[0151] ND = 未测定

[0152]

Pro 置换	化合物 编号	n	结合 (μ M)	拮抗剂 (nM)
AcF[O-Hyp-dCha-WR]	25	3	0.27	ND
AcF[O-Thp-dCha-WR]	26	1	75.5	ND
AcF[O-Phe-dCha-WR]	22	3	2.43	ND

[0153] Hyp = 反式 - 羟基脯氨酸, Thp = 顺式 - 硫代脯氨酸

[0154]

D-Cha 置换	实验室 编号	n	结合 (μ M)	拮抗剂 (nM)
AcF[OP-dCha-WR]	3D53, 1	13	0.45	28
AcF[OP-dLeu-WR]	31	3	1.13	35
AcF[OPGWR]	42	3	1082	ND
AcF[OP-dVal-WR]	29	3	13.0	ND
AcF[OP-dNle-WR]	36	3	0.53	30
AcF[OP-dTic-WR]	35	3	9.18	15,000
AcF[OP-aic-WR]	34	3	22.71	ND
AcF[OP-dTyr-WR]	40	3	2.16	300
AcF[OP-dArg-WR]	41	3	>100	ND
AcF[OP-dPhe-WR]	33	3	0.26	22
AcF[OP-dhCha-WR]	28	3	0.39	40.5

[0155] Aic- 氨基茛满羧酸

[0156] Tic- 四氢异喹啉

[0157] dhCha-D- 高环己基丙氨酸

[0158]

Trp 置换	实验室 编号	n	结合 (μ M)	拮抗剂 (nM)
AcF[OP-dCha-HR]	57	3	23.5	ND
AcF[OP-dCha-FR]	60	3	0.25	32
AcF[OP-dCha-LR]	51	3	18.9	3,000
AcF[OP-dCha-Cha-R]	50	3	11.9	4,500
AcF[OP-dCha-hPhe-R]	61	3	11.5	ND
AcF[OP-dCha-2NaI-R]	53	3	15.8	ND
AcF[OP-dCha-Bta-R]	58	3	0.28	172
AcF[OP-dCha-Flu-R]	54	3	28.9	ND
AcF[OP-dCha-1NaI-R]	52	3	0.71	46.6
AcF[OPdCha-Tic-R]	56	3	3.73	10,900
AcF[OP-dCha-G-R]	55	3	>1000	ND
AcF[OPdCha-dTrp-R]	59	3	30.4	ND

[0159] hPhe = 高苯基丙氨酸, 2NaI = 2- 萘基丙氨酸, 1NaI = 1- 萘基丙氨酸, Bta = 苯并噻吩基丙氨酸, Flu = 苄基丙氨酸, Tyr-O- 烷基 = 酪氨酸的 O- 烷基化类似物。Tic = 四氢异喹啉

[0160]

Arg 置换	实验室 编号	n	结合 (μ M)	拮抗剂 (nM)
AcF[OPdChaW-Cit]	45	3	6.00	690
AcF[OPdChaW-K]	47	3	24.15	ND
AcF[OPdChaW-hArg]	44	3	1.36	ND

[0161] Can = L- 刀豆氨酸, Cit = 瓜氨酸, hArg = 高精氨酸

[0162]

多重置换	实验室 编号	n	结合 (μ M)	拮抗剂 (nM)
AcF[OP-dPhe-dIeu-NaI-R]	105	3	3.1	ND
AcF[OP-dPhe-FR]	62	3	5.2	5,210
AcF[DapOPdChaWRC]	151	3	1.84	100
AcF[OP-dPhe-1NaI-R]	63	3	3.1	ND
AcF[OP-dPhe-Y-R]	150	3	69.2	ND

[0163] 1NaI = 1- 萘基丙氨酸, Dap = 2,3- 二氨基丙酸, dPhe = D- 苯基丙氨酸

[0164] 实施例 4:

[0165] 药效团提炼

[0166] 在表 2 结果的基础上, 我们发展了人分叶核白细胞上 C5a 受体拮抗活性需要的提炼的药效团, 如下所述:

[0167] 位置“A”能容忍大量基团, 包括 H(例如化合物 17、18)、烷基、芳基、 NH_2 、NH 烷基、N(烷基)₂、NH 芳基、NH 酰基(例如化合物 1、3、4、5、6)、NH 苯甲酰基(例如化合物 2)、OH、O 烷基、O 芳基、 NHSO_2 烷基(例如化合物 10)、 NHSO_2 芳基(例如化合物 11), 对活性没有不利的作用。

[0168] 位置“A”取代基的宽容忍性表示在环状肽骨架的附加基团方面受体中有相当的空

间。该位置因此可用来添加取代基以改变拮抗剂的水和脂质溶解性,从而提高拮抗剂的口服或透皮吸收。该位置也可连接标记例如荧光标记,对靶细胞有高度亲和力的拮抗剂或多肽序列,例如与 C5a 氨基酸 1-69 类似的序列。

[0169] 位置“B”可为烷基、芳基、苯基、苄基、萘基或吡啶、或 D- 或 L- 氨基酸的侧链,例如 L- 苯基丙氨酸(化合物 1)、或 L- 苯基甘氨酸(化合物 12)。不应为 D- 苯基丙氨酸(化合物 8)、L- 高苯基丙氨酸(化合物 7)、L- 酪氨酸(化合物 9)、L- 高酪氨酸、甘氨酸(化合物 13)、L- 色氨酸(化合物 16)、或 L- 高色氨酸的侧链。

[0170] 位置“B”不能容忍宽范围的取代基。似乎 L- 苯基丙氨酸的苄基不能容忍许多取代,并且不能变得更大。该位置看起来是受体结合所需要的,而不是对拮抗活性本身重要,因为修饰的最大效果是在受体亲和力方面,如 IC₅₀ 测定所示。

[0171] 位置“C”应该为小取代基,例如 D- 或 L- 氨基酸的侧链例如脯氨酸(化合物 1)、L- 缬氨酸(化合物 20)、丙氨酸、反式-羟基脯氨酸(化合物 25),或顺式-硫代脯氨酸(化合物 26)。不应该为大的取代基例如 L- 异高氨酸(化合物 21)、D- 或 L- 苯基丙氨酸(化合物 22、23)、L- 环己基丙氨酸(化合物 24)的侧链。

[0172] “D”位置应该为大体积的取代基,例如 D- 氨基酸如 D- 亮氨酸(化合物 31)、D- 高亮氨酸、D- 环己基丙氨酸(化合物 1)、D- 高环己基丙氨酸(化合物 28)、D- 缬氨酸(化合物 29)、D- 正亮氨酸(化合物 36)、D- 高-正亮氨酸、D- 苯基丙氨酸(化合物 33)、D- 四氢异喹啉(化合物 35)、D- 谷氨酰胺(化合物 37)、D- 谷氨酸(化合物 38)、或 D- 酪氨酸(化合物 40)的侧链。不应该为更小的取代基,例如甘氨酸、D- 丙氨酸(化合物 30)的侧链,体积大的平面侧链如 D- 色氨酸(化合物 32)、大的带电侧链如 D- 精氨酸(化合物 39)或 D- 赖氨酸(化合物 43),或 L- 氨基酸如 L- 环己基丙氨酸(化合物 27)。骨架上位置“D”处小的 D- 氨基酸以及小的或大的 L- 氨基酸将导致 C5a 受体亲和力的极大下降。

[0173] 位置“E”选自 L- 色氨酸(化合物 1)和 L- 高色氨酸,而不是 D- 色氨酸(化合物 59)或 L-N- 甲基色氨酸(化合物 47)的大侧链;L- 苯基丙氨酸(化合物 60)而不是 L- 高苯基丙氨酸(化合物 61);L- 萘基(化合物 52)而不是 L-2- 萘基(化合物 53);L-3- 苯并噻吩基丙氨酸(化合物 58)。不应该是 L- 环己基丙氨酸(化合物 50)、D- 亮氨酸(化合物 51)、L- 苄基丙氨酸(化合物 54)、甘氨酸(化合物 55)、L- 四氢异喹啉(化合物 56),或 L- 组氨酸(化合物 57)的侧链。

[0174] 环状肽骨架位置“E”的取代基对 C5a 受体的拮抗活性至关重要。该位置的取代基可限制构象变化,后者通常与拮抗剂反应相关联。这可能是“阻滞”残基,其将拮抗剂固定在受体中并防止受体的构象重组,而构象重组这一点是激动活性必须的。

[0175] 位置“F”可为下列基团的侧链:L- 精氨酸(化合物 1)、L- 高精氨酸(化合物 44)、L- 瓜氨酸(化合物 45);或 L- 刀豆氨酸(化合物 48)。而不应该是 D- 或 L- 赖氨酸(化合物 47)、D- 或 L- 高赖氨酸、或甘氨酸(化合物 49)。该位置的取代基大小对得到高受体亲和力很重要。瓜氨酸化合物具有未带电的侧链,但是与该位置的精氨酸相比,仍然具有可观的拮抗剂活性。

[0176] 位置“X”可为 $-(CH_2)_nNH-$ 或 $-(CH_2)_nS-$, 其中 n 为 1 ~ 4 的整数,优选地 2 或 3, $-(CH_2)_2O-$ 、 $-(CH_2)_3O-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-CH_2COCHRNH-$ 、或 $-CH_2-NHCOCHRNH-$ 其中 R 为任何常见的或不常见的 L- 或 D- 氨基酸的侧链。该基团提供了环化连接,例如在化合物 1 的 Arg

和 Phe 残基之间,从而影响环状骨架的结构。此外,该连接基上的取代基例如 R 能潜在地与受体残基相互作用以增加拮抗剂亲和力。

[0177] 环上氨基酸成分的 N- 甲基化倾向于降低化合物的受体结合亲和力和拮抗剂活性(例如 64,65),尽管鸟氨酸的 δ 氮的 N- 甲基化事实上对拮抗剂活性无影响。

[0178] 骨架上的多重变化对得到相对于 1 的活性增加的拮抗剂是不利的。因此尽管 L-Phe 对 1 中的 L-Trp 是一种合适的置换(例如 60),拮抗剂活性改变很小,1 的组合改变,例如 L-Phe 代替 Trp 以及或者 L- 高 Phe 代替 Arg(例如 67) 或对氯 - 苯基丙氨酸代替 Arg(例如 68),导致下降的受体亲和力以及下降的拮抗剂活性。类似地,当 1 中的 L-Trp 用 L-Phe 代替且 D-Cha 用 D-Phe 代替,化合物失去了根本的活性(例如 62)。尽管 1 中的 D-Cha 改变为 D-Phe 仍然导致拮抗剂活性的保持(例如 33),当与 L-Phe 代替 L-Trp 的置换一起时候(62),这种变化就是有害的。

[0179] 明显地,这些残基在与受体结合中存在协调性,由于单一变化的一种(例如 33, 60)产生的活性高于两种变化一起进行(例如 62)的情形。当 Arg 被仍然含带电氨基的芳香基团替代的时候(69),活性显著下降,如当 60 中的 Phe 被取代的酪氨酸所替换(70)得到的结果那样。

[0180] 所有这些变化指出了环状骨架上什么能或什么不能用来得到人 PMNC5a 受体亲和力和拮抗剂活性。已经公认在其他细胞类型上的 C5a 受体对侧链具有不同的容忍性,但是环状骨架仍然构成活性化合物的基础。

[0181] 实施例 5

[0182] 大鼠中逆向被动阿蒂斯反应

[0183] 逆向被动腹膜阿蒂斯反应按照以前公开的方法进行诱导(Strachan 等,2000),一组大鼠在腹膜抗体沉积之前用 AcF-[OPdChaWR] (1) 经口强饲(10mgkg^{-1} 的 10%乙醇/90%盐水溶液至终体积 $200\mu\text{L}$) 或抗体沉淀 30 分钟之前适当地口服溶媒对照进行处理。雌性 Wistar 大鼠(150-250g)用氯胺酮(80mg kg^{-1} 腹腔注射)和甲苯噻嗪(12mg kg^{-1} 腹腔注射)进行麻醉。

[0184] 将大鼠的侧面小心地剃毛并在每侧清楚地描绘 5 个不同的位置。注射抗体 10 分钟之前,将埃文斯蓝($15\text{mg kg}^{-1}\text{i.v.}$)、鸡卵清蛋白($20\text{mgkg}^{-1}\text{i.v.}$) 注射到股静脉诱导在各个皮肤位置逆向被动阿蒂斯反应。在大鼠每侧 2 个分开的皮肤位置以双份注射兔抗鸡卵清蛋白(只有盐水、100、200、300 或 $400\mu\text{g}$ 抗体,终注射体积 $30\mu\text{L}$),每只大鼠有 10 个注射位置。将大鼠放置在加热垫上,并在 4 小时的处理期间保持麻醉状态,定期采集血液样品。血液在冰上自发地凝结,并且收集血清样品并保存在 -20°C 。皮肤阿蒂斯反应诱导 4 小时后,将麻醉的大鼠安乐死,并从各阿蒂斯反应位点采集 10mm^2 面积的皮肤。将皮肤样品在 10%缓冲的福尔马林中至少保存 10 天,然后利用苏木精和曙红染色进行组织学分析。此外,另一组皮肤样品放置在 1mL 甲酰胺中过夜,在 650nm 处测定埃文斯蓝萃取液的吸光度,作为血清渗漏到皮肤中的指标。图 1 显示了用 AcF-[OPdChaWR] 静脉内、口服或局部前处理后皮内注射 $0-400\mu\text{g}$ 位置⁻¹ 的兔抗鸡卵清蛋白后皮肤冲压提取液的光密度。数据显示为 650nm 处吸光度与血浆吸光度的百分比的平均值 $\pm\text{SEM}$ ($n = 3-6$)。* 表示当与阿蒂斯对照值相比 P 值 <0.05 的情况。

[0185] 将大鼠用 C5aR 拮抗剂, AcF-[OPdChaWR] (1) 的 TFA 盐进行处理,或者静脉

内 ($0.3-1\text{mgkg}^{-1}$ 的包含 10% 乙醇的 $200\ \mu\text{L}$ 盐水, 皮肤阿蒂斯开始之前 10min)、经口 ($0.3-10\text{mgkg}^{-1}$ 的 $200\ \mu\text{L}$ 盐水, 包含 10% 乙醇, 经口强饲, 在处理之前 18 小时断食的大鼠的皮肤阿蒂斯之前 30 分钟) 或局部 ($200-400\ \mu\text{g}$ 位置⁻¹, 皮肤阿蒂斯反应开始之前 10 分钟), 或用适当的溶媒对照。拮抗剂局部应用涉及应用 $20\ \mu\text{L}$ 的 $10-20\text{mgmL}^{-1}$ 溶液, 溶解在 10% 二甲基亚砷 (DMSO) 中, 在阿蒂斯反应开始之前 10 分钟将其直接涂抹在各侧皮肤上,。

[0186] 从用埃文斯蓝处理的大鼠盐水 - 只有注射位置只作为抗原对照, 从用埃文斯蓝加上局部只有 DMSO 处理大鼠的盐水 - 单用注射位置用作溶媒对照, 用埃文斯蓝加上或者静脉内、口服或局部拮抗剂处理大鼠的盐水 - 单用注射位置作为拮抗剂对照, 并且埃文斯蓝加上皮肤兔抗鸡卵清蛋白作为抗体对照。局部应用肽 AcF-[OPGWR] 作为无活性肽对照, 其具有与 AcF-[OPdChaWR] (1) 类似的化学组成以及溶解性, 但是在分离的人 PMNs 中 IC_{50} 结合亲和力 $>1\text{mM}$ 。AcF-[OPGWR] 也溶解在 10% DMSO 中, 并阿蒂斯反应开始之前 10 分钟以 $400\ \mu\text{g}$ 位置⁻¹ 的剂量进行局部应用。

[0187] TNF α 测定

[0188] 血清 TNF α 浓度用酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒进行测量。所用的抗体对为兔抗大鼠 TNF α 抗体偶联生物素化的鼠抗 - 大鼠 TNF α 抗体。图 2 显示用 AcF-[OPdChaWR] 静脉内、口服或局部预处理大鼠组的皮肤阿蒂斯反应开始后定期的时间间隔的血清 TNF α 浓度。数据显示为平均值 $\pm\text{SEM}$ ($n = 3-6$)。* 表示与阿蒂斯对照值相比, P 值 <0.05 。

[0189] 白介素 -6 测定

[0190] 如前所述地 ELISA 方法用来测量血清和腹膜洗液白介素 -6 (IL-6) 浓度 (Strachan 等, 2000)。

[0191] 病理学评价

[0192] 将大鼠皮肤样品在 10% 缓冲的福尔马林中固定至少 10 天, 并用苏木精和曙红利用标准的组织学技术进行染色。皮肤样品以盲检的方式分析病例证据, 大鼠 PMN 浸润程度以 0-4 级进行评分。皮肤阿蒂斯反应开始产生间质嗜中性粒细胞的增加, 按照下述方式进行定量。切片评分为 0, 如果没有检测到异常。评分为 1 表示血管中出现增加的 PMNs, 但是炎性细胞没有迁移出内腔。评分 2 和 3 表示在组织间隙中出现增加数目的 PMNs, 并且在血管的周围出现更明显的炎性细胞聚集。表示严重病理异常的最大评分 4 存在于下述特征的皮肤切片中, 伴随 PMNs 过量浸润到组织中并且这些细胞迁移出血管。图 3 显示皮内注射增加量的抗体导致皮肤样品病理指数评分的剂量响应增加 (A)。显示了用 AcF-[OPdChaWR] 静脉内 (B) ($n = 3$)、经口 (C) ($n = 3$) 和局部 (D) ($n = 3$) 预处理的大鼠中皮肤样品进行皮内注射盐水或 $400\ \mu\text{g}$ 位置⁻¹ 抗体 ($n = 5$) 的试验数据。数据显示为平均值 $\pm\text{SEM}$ 。* 当与阿蒂斯值相比, 用无参数的 t - 检验 $P \leq 0.05$ 。

[0193] 实施例 6

[0194] C5a 拮抗剂对大鼠中肠缺血 - 再灌注损伤模型的影响

[0195] 所有实验之前 12 小时, 将雌性 Wistar 大鼠 ($250-300\text{g}$, $n = 132$) 禁食并且只给予水。将动物经腹膜内注射 80mgkg^{-1} 氯胺酮和 10mgkg^{-1} 甲苯噻嗪进行麻醉, 并在整个过程中, 将大鼠放置在加热垫上以保持正常的体温。通过中线切开打开腹部以暴露肠系膜上动脉 (SMA)。从通过一定长度的聚乙烯管打环的缝合丝形成一种非 - 创伤性闭合动脉装置。通过牵引至环的末端闭合 SMA。将聚乙烯导管插入股静脉以输入 1mgkg^{-1} AcF-[OPdChaWR] (1) 的

5%乙醇溶液或无菌无热源盐水,体积0.2ml。用2分钟完成输液。经口施用AcF-[OPdChaWR] (1) (0.3、1、10mgkg⁻¹) 在闭合之前60分钟通过强饲(0.2ml盐水的25%乙醇溶液)而实现。肠缺血通过将SMA夹住30分钟进行诱导,之后移去闭合缝合,然后监控再灌注120分钟。假手术大鼠按照同样的方式进行处理,除了省略脉管闭合,并且输注0.2ml无菌、无热源盐水或强饲0.2ml盐水的25%乙醇溶液。在估计PMN数目的时间期间180分钟内以定期的时间间隔将血样品(50 μL)收集到肝素化的Eppendorf管中。在不同系列的同样实验中,在180分钟的定期时间间隔点采集全血并在冰上凝结,并且收集血清或血浆样品并在-20℃保存以进行后续的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、触珠蛋白(Hp)和天冬氨酸转氨酶(AST)浓度的测定。在120分钟再灌注期间结束的时候,将动物用过量的戊巴比妥进行安乐死。取出闭合的回肠部分,将内腔用盐水洗涤,并将肠吸干然后称重。将样本在烤箱中在80℃干燥24小时得到组织的干重。通过评价湿和干组织重量比判断肠水肿。此外,富集缺血和正常肠样本,并用盐水洗涤并立即在10%缓冲的甲醛-盐水固定以进行组织学研究。

[0196] 图4显示与假手术动物相比,缺血-再灌注后小肠的湿干重之比显著地升高。与未处理的缺血-再灌注(I/R)动物相比,用C5a受体拮抗剂AcF-[OPdChaWR] 1mg/kg i.v. 和10mg/kg p.o. 处理显著地减少组织水肿。数据显示为平均值±SEM(每组中,n=4-6)。*, P<0.05vs. 假手术动物。+, P<0.05vs. I/R动物。

[0197] 嗜中性白血球减少分析

[0198] 将用于PMN计数的血(50 μL)放置在肝素化的管中并在等体积的Histopaque1083(Sigma, U.S.A.)上分层,分离PMNs并在血细胞计数器上进行细胞计数。PMN的浓度值表示为SMA闭合之前即刻得到的值的平均百分数±SEM。

[0199] 图5显示与假手术动物(A,B)相比,消化道缺血-再灌注引起显著的循环PMN浓度下降。用C5a受体拮抗剂AcF-[OPdChaWR] 1mg/kg i.v. (A)和10mg/kg p.o. (B)进行前处理的大鼠显著地抑制缺血-再灌注诱导的嗜中性白血球减少。1mg/kg p.o. (B)处理的动物显示没有抑制嗜中性白血球减少。数据显示为平均值±SEM(每组n=6)。*等于P<0.05vs. 对照动物。线显示30分钟缺血期。

[0200] 肿瘤坏死因子-α测定

[0201] 血清TNF-α浓度用酶联免疫吸附分析(OptEIA, Pharmingen, USA),按照生产者的说明。血清样品中TNF-α的浓度从标准曲线通过线性回归分析进行测定。

[0202] 图6显示与假手术动物相比,消化道缺血-再灌注产生显著的血清TNF-α升高。用C5a受体拮抗剂AcF-[OPdChaWR] 1mg/kg i.v. 和1-10mg/kg p.o. 前处理的大鼠完全抑制血清TNF-α水平的变化。数据显示为平均值±SEM(每组n=6)。*, P<0.05vs. 假手术动物。线显示30分钟缺血期。

[0203] 触珠蛋白分析

[0204] 血清Hp利用Hp分析试剂盒(Tridelata Development Ltd. U.K)进行测量,根据生产者的说明。血清样品中的Hp浓度利用线性回归从标准曲线中测定。

[0205] 图7显示与假手术动物相比,消化道缺血-再灌注产生显著增加的血清触珠蛋白。用C5a受体拮抗剂AcF-[OPdChaWR] 1mg/kg i.v. 和1, 10mg/kg p.o. 进行大鼠前处理显著地抑制血清触珠蛋白水平的增加。数据显示为平均值±SEM(每组n=4-6)。*, P<0.05vs. 假手术动物。+, P<0.05vs. I/R动物。

[0206] 天冬氨酸转氨酶分析

[0207] 血浆 AST (AST/GOT ;Sigma,USA) 浓度在收集血浆 48 小时内根据生产者的说明进行测量。血浆 AST 浓度从校准曲线得到。结果以 Sigma-Franke (SF) 单位 /ml 进行表述。

[0208] 图 8 显示与假手术动物相比,消化道缺血 - 再灌注导致显著增加的血浆天冬氨酸转氨酶。与未处理的 I/R 动物相比,用 C5a 受体拮抗剂 AcF-[OPdChaWR] 1mg/kg i. v. 和 1, 10mg/kg 处理显著地降低消化道缺血 - 再灌注诱导的天冬氨酸转氨酶。数据显示为平均值 $\pm$ SEM (每组 n = 6) 。*, P<0. 05vs. 假手术动物。+, P<0. 05vs. I/R 动物。

[0209] 组织病理学

[0210] 将样本在 10% 甲醛 - 盐水中固定,包埋在石蜡中,连续切片,并用苏木精和曙红染色。以盲检的方式,让一位训练的观察者读片并评分。肠组织损伤的程度利用前述 0 ~ 8 级分级评分进行判断 (Chiu 等,1970)。

[0211] 图 9 显示与假手术动物相比,消化道缺血 - 再灌注导致显著的肠损伤。与未处理的 I/R 动物相比,用 C5a 受体拮抗剂 AcF-[OPdChaWR] 1mg/kg i. v. 和 1,10mg/kg 处理显著地降低消化道缺血 - 再灌注诱导的组织损伤。数据显示为平均值 $\pm$ SEM (每组 n = 6) 。*, P<0. 05vs. I/R 动物。

[0212] 实施例 7

[0213] 大鼠单关节抗原 - 诱导的关节炎

[0214] 雌性 Wistar 大鼠 (150-250g) 从 Central Animal Breeding House, University of Queensland 获得。将甲基化的牛血清白蛋白 (mBSA) (0. 5mg) 溶解在 Freund 全佐剂 (0. 5mg) 中并超声以产生均匀的悬浮液。在第 1 天和第 7 天每只大鼠接受皮下注射这种悬浮液 (0. 5mL)。在第 12-28 天,将大鼠隔离到分离的笼子中,每天监测体重以及进食和进水情况。大鼠接受包含 AcF-[OPdChaWR] (1) 或者普通自来水龙头水或饮用水。每天监测体重和进水情况,并且大鼠在试验的 12-28 天接受日剂量为 1mg/kg/ 天的 C5aR 拮抗剂 AcF-[OPdChaWR] (1)。在第 14 天,将大鼠麻醉并将其后肢剃光。每只大鼠接受通过关节内 (100 μ l) 注射在左膝注射 mBSA (0. 5mg),右膝接受盐水。膝盖只接受盐水处理的大鼠接受正常的饮水并作为盐水对照,大鼠接受 AcF-[OPdChaWR] (1) 饮用水溶液的大鼠的盐水处理膝盖作为拮抗剂对照。

[0215] 在第 28 天将大鼠安乐死,并将全血收集到 Eppendorf 管中并在冰上凝结。将血样品离心 (11,000rpm x3 分钟) 并收集血清并在 -20°C 储存直至用 ELISA 进行血清细胞因子分析。将各膝盖荚膜用 100 μ L 盐水灌洗,并用血细胞计数器进行总细胞计数。此外,将部分膝关节洗液滴到玻璃载波片上,并使之空气干燥。一旦干燥,将细胞用不同的染料 (Diff Quick) 进行染色,并用 40x 镜头显微镜进行差示细胞计数。将各关节的其余洗液在 -20°C 储存直至后续用 ELISA 进行关节内细胞因子水平分析。去除各膝关节,并用解剖刀将皮肤分离并进行固定。将膝关节样品在 10% 缓冲的福尔马林储存 $\geq$ 10 天。然后将膝关节用蒸馏水洗涤并在饱和的 EDTA 溶液中放置 21 天进行脱钙并包埋在石蜡中。

[0216] 膝组织样品利用上述实施例 6 中描述的标准组织学技术进行制备并用苏木精和曙红染色。以盲检的方式分析组织载波片。组织切片用 0-4 级评分,0 分表示无异常,随着滑液细胞增殖、炎性细胞浸润、软骨破坏以及出血的出现,评分升高。没有样品中出现明显的骨侵蚀。在进行 TNF α 和 IL-6 水平 ELISA 分析时候将血清和滑液样品解冻。从标准曲

线测定浓度,利用前述实施例 6 中描述的 ELISA 方法。

[0217] 图 10 显示在第 -2 ~ +14 天经口施用 AcF-[OPdChaWR] 对关节炎右膝关节肿胀的抑制,而图 11 显示在右膝关节洗液中 TNF- α 和 IL-6 水平的抑制。未处理指动物未用 AcF-[OPdChaWR] 处理但是在敏化后右膝用抗原刺激。

[0218] 实施例 8

[0219] C5a 拮抗剂局部皮肤应用

[0220] 本发明教导了局部应用 C5a 拮抗剂可用来治疗涉及补体系统激活的局部炎症性疾病。在该实施例中,我们证实局部应用 C5a 拮抗剂也可产生全身药理作用,并在循环系统出现相应浓度的 C5a 拮抗剂。

[0221] 在局部皮肤应用后,考察了环状拮抗剂的体内药理性质。使用了内血症模型,其中 1mg/kg Escherichia coli 脂多糖 (LPS;血清型 55:B5, Sigma, USA, 以 100mg ml⁻¹ 的水溶液 4℃ 储存),经 i. v 注射到大鼠中,产生循环 PMN 水平和血压的急性变化。这些参数在有和无 C5aR 拮抗剂 (1mg/kg i. v 或 50mg/kg/ 大鼠局部) 条件下测定。该研究显示局部应用 C5a 受体拮抗剂是一种有效的转运化合物的方法,观察到全身性药理活性。

[0222] 将重 200-250g 的雌性 Wistar 大鼠用来进行体内测试所有的 C5a 受体拮抗剂。将大鼠按照前述方法进行麻醉,并转移到加热垫上以保证在整个试验过程中保持体温。将导管插入到股静脉中,用缝合线进行保护,并充满 100 μ L 肝素化盐水。对大鼠施用拮抗剂或溶媒,静脉内 (1mg kg⁻¹ 的 200 μ L 盐水,包含 10% 乙醇, LPS 刺激之前 10 分钟) 或局部 (10mg 位置⁻¹ 的 50% 二甲基亚砜 /H₂O, 补体刺激之前 60 分钟)。在拮抗剂或溶媒对照的 iv 用药 10 分钟之后或局部用药 60 分钟之后,对大鼠经股导管 i. v 输注 LPS (1mg kg⁻¹ i. v 的 100 μ L 盐水溶液)、重组人 C5a (2 μ gkg⁻¹ 的 100 μ L 溶液),或溶媒对照。所有 i. v 输注试剂在 2 分钟时间注射完毕,然后注射 100 μ L 盐水以保证药物的完全输送。

[0223] 在药物和 LPS 或 C5a 给药的时间点,从尾静脉采集全血样品 (0.1mL)。并在相对于注射 LPS (时间 0 点) 的 -15、0、5、10、15、30、60、90、120 和 150 分钟采集样品,并放置在含肝素 (500 单位 /mL) 的管中。为了分离 PMNs,将 100 μ L 血在 200 μ L 的 Histopaque1077 (Sigma U. S. A.) 溶液上分层并在 400xg 室温 (25℃) 离心 30 分钟。分出富含血小板的血浆上清液层、单核细胞和淋巴细胞界面以及 Histopaque 的分离层并弃去,留下富含 PMN 和红细胞层。将 9mL 冷蒸馏水 (4℃) 加入到残留的沉淀中并振荡 40 秒以溶解红血细胞。将 Dulbecco's 磷酸盐缓冲的盐水 (10x 浓度) 加入以恢复等张性。然后将细胞在 400xg 在 10℃ 离心 15 分钟。将得到的上清液弃去,剩下 PMNs 沉淀。将 PMNs 进一步用 9mL 盐水洗涤,并再在 400xg 在 10℃ 离心 10 分钟。再将得到的上清液弃去,将得到的沉淀再悬浮于 100 μ L 盐水中并充分混合。在血细胞计数器上对 PMNs 计数。将各时间点的细胞数计算为补体刺激或 LPS 之前时间 0 点的细胞总数的百分比。

[0224] 将用于本研究的雌性 Wistar 大鼠分成下述处理组:

[0225] (a) 单用 LPS,其中输注 100 μ L 5% 乙醇 (-15 分钟)+1mg/kg LPS (0 分钟);

[0226] (b) 乙醇对照,其中在 -15 分钟输注 100 μ L 5% 乙醇以考察乙醇对大鼠中测定参数的影响;

[0227] (c) 拮抗剂对照,其中在 -15 分钟经 i. v. 输注 1mg/kg 环状拮抗剂;

[0228] (d) i. v 拮抗剂 +LPS,其中输注 1mg/kg 环状拮抗剂 (-15 分钟) 以及 1mg/kg LPS (0

分钟);以及

[0229] (e) 局部 - 应用拮抗剂 + LPS, 其中 10mg/ 大鼠的拮抗剂涂抹在大鼠的腹部, 然后在 0 分钟的时候 iv 输注 LPS。

[0230] 将 C5a 拮抗剂例如 3D53 (PMX53) 以应用剂量 50mg/kg 对大鼠皮肤给药在循环血浆中产生药理显著水平的药物。药物在多种溶剂, 例如二甲基亚砜 (DMSO)、丙二醇 (PG) 以及水以及多种组合中的应用导致循环中出现药物的药理相关浓度, 如图 12 中所示。这表明皮肤应用 3D53 的 DMSO/ 蒸馏水或丙二醇 (PG)/ 水溶液导致在 15 分钟内在循环血浆中出现 C5a 拮抗剂, 并且显著的水平持续至少 4 小时。

[0231] 实施例 9

[0232] 皮肤应用后 C5a 拮抗剂的全身性作用

[0233] 如实施例 8 中所示, 对动物皮肤局部应用 C5a 拮抗剂在循环中产生药理相关的药物水平。为了显示这些水平具有全身性活性, 测定了这些循环水平的 C5a 拮抗剂抑制中性白细胞减少症的效果, 后者为 i. v. 给药 C5a 时的作用。

[0234] 将 C5a 受体拮抗剂 3D53 以 (10mg/ 大鼠) 的 50% 丙二醇和 50% 蒸馏水进行给药。将组合物均匀地涂抹在腹部皮肤 (4x8cm²) 上 30 分钟, 然后将 C5a 经 i. v. 注射 2 μg/kg 的 200 μl 盐水溶液。在下列时间点采集血样: -30 (药物给药前)、0 (C5a 注射前) 以及 5、15、30、60 和 120 分钟以测定循环 PMNs。如图 13 中所示, 局部应用化合物 3D53 的确预防 C5a 的中性白细胞减少症作用。

[0235] 实施例 10

[0236] 局部应用 C5a 拮抗剂抑制 LPS 的全身性效果

[0237] 将 C5a 拮抗剂, 3D53 (化合物 1) 以及化合物 17 和化合物 45 以剂量 10mg/ 大鼠在 50% DMSO/50% H₂O 中进行局部应用, 如上所述。皮肤应用拮抗剂 60 分钟后, 将 LPS 以 1mg/kg 剂量经 i. v. 进行注射。在 LPS 注射后, 监测循环 PMN 水平 150 分钟, 并计算 PMN 水平相对于注射 LPS 时间 0 点的百分变化。得到的结果, 如图 14 中所示, 表明局部应用的每种 C5a 拮抗剂抑制响应 i. v. LPS 的嗜中性白血球减少, 并且这种抑制可与 i. v. 注射药物后观察到的抑制相比。

[0238] 实施例 11

[0239] C5a 拮抗剂对缺血 - 再灌注损伤的作用

[0240] 在腹主动脉瘤手术后以及外伤性压伤后, 下肢缺血 - 再灌注 (I/R) 损伤是一个严重的问题 (Kerrigan 和 Stotland, 1993)。骨骼肌肉组织的缺血和随后的再灌注刺激受影响肌肉的炎性反应, 以及其他组织中诱导损伤 (Gute 等, 1998)。在严重的肢体缺血情况下, 发生的再灌注与多全身性组织衰竭导致的高死亡率相关联 (Defraigne 和 Pincemail, 1997)。为了考察 C5a 受体拮抗剂对大鼠中下肢缺血 - 再灌注 (I/R) 后多种局部和远端损伤参数的抑制能力, 将大鼠后肢进行缺血 2 小时和再灌注 4 小时。这种止血带刺激模型已经被惯犯地用作下肢 I/R 损伤的模型。

[0241] 将大鼠进行双后肢缺血 2 小时和再灌注 4 小时。药物处理大鼠或在缺血前 10 分钟或再灌注之前 10 分钟接受 AcF-[OPdChaWR] (1mg/kg) i. v., 或缺血之前 30 分钟口服 (10mg/kg)。测定循环中肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙氨酸和天冬氨酸转氨酶 (ALT/AST)、肌酸酐、血尿酸 (BUN)、分叶核白细胞 (PMNs) 和钙 (Ca⁺⁺) 和钾 (K⁺) 的水平。这些生化指标

公知可以反映 I/R 事件后的组织或器官损伤。其他测量的参数包括肺、肝脏和肌肉中的尿蛋白水平、肌肉水肿和髓过氧化物酶 (MPO) 浓度以及肝脏匀浆中的 TNF- α 浓度。与假手术动物相比,这些参数中没有观察到明显的变化,表明单用药物没有这些标志物变化所定义的副作用。肢体 I/R 损伤特征为 CK、LDH、ALT、AST、肌酸酐、BUN、蛋白尿、PMNs、血清 K⁺、肌肉水肿、器官 MPO 以及肝脏匀浆 TNF- α 浓度的显著升高,但是血清 Ca⁺⁺ 浓度的显著下降。当大鼠接受 AcF-[OPdChaWR] 处理的时候,这些参数均有显著改善。

[0242] 本研究按照 National Health&Medical Research Council of Australia 的指导规则进行,并且实验方案得到 University of Queensland Animal Ethics Committee 的批准。重 250-300g 的雌性 Wistar 大鼠禁食过夜,然后通过腹腔注射注射 6mg/kg 甲苯噻嗪和 120mg/kg 氯胺酮进行麻醉。通过另外注射氯胺酮维持实验过程中的麻醉。将大鼠放置在加热垫上以保持正常的体温,并将聚乙烯导管插入到右颈静脉以输入 C5a 拮抗剂或 7%乙醇/盐水。双后肢缺血按照下述方式诱导:通过在每只后肢较大转节上应用乳胶 o-环(市售环形物;Hayes Veterinary Supplies, Brisbane, Australia)。缺血 2 小时后,切开乳胶环并去除并将肢体再灌注 4 小时。使用了 6 个实验组:

[0243] (a) 假手术,

[0244] (b) 只有缺血,

[0245] (c) 只有 I/R-,

[0246] (d) I/R+C5a 拮抗剂 (1mg/kg, i. v.), 缺血前 10 分钟给药,

[0247] (e) I/R+C5a 拮抗剂 (10mg/kg, p. o.), 缺血前 30 分钟给药,以及

[0248] (f) I/R+C5a 拮抗剂 (1mg/kg, i. v.), 再灌注前 10 分钟给药。

[0249] 假手术动物不进行任何缺血或再灌注,并且只有缺血的动物用止血带 2 小时没有后续的再灌注。其他所有实验组进行 2 小时缺血以及 4 小时的再灌注。假手术、只有缺血以及 I/R 组在缺血前 10 分钟输注 7%乙醇/盐水之,而不是药物。在整个实验过程中,从尾静脉采血,并且血清或血浆在 4℃或 -20℃保存以进行后续的生化分析。在研究的最后阶段收集尿液以测定尿蛋白水平。在实验结束的时候,将大鼠实行安乐死,并取出肺、肝脏以及腓肠肌肌肉部分并评估水肿、嗜中性粒细胞集聚以及进行肝脏 TNF- α 研究。

[0250] 所有的实验结果表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差 (SEM)。数据分析利用 GraphPad Prism3.0 软件 (GraphPad Software, Inc. USA) 进行。假手术和只有 I/R- 组之间的统计学比较利用单变量 (one-way) 分析然后进行 Dunnett 比较后检验 (post-test) 分析。统计学显著判断标准为 $P < 0.05$ 。

[0251] (a) 肌酸激酶和乳酸脱氢酶的抑制

[0252] 利用 CK 试剂盒 (Sigma, St. Louis, USA) 根据生产厂家说明,测量缺血后即刻、以及再灌注 1、2 和 3 小时后以及在实验结束时采得的血清样品中的肌酸激酶 (CK) 的循环水平。在只接受 I/R 动物中,止血带放松后 10 分钟采集血清以进行 CK 测定。再灌注 2 小时后采集的样品进行 1 : 5 稀释。

[0253] 测量缺血即刻,再灌注 1、2 和 3 小时后以及实验结束时血清样品中的乳酸脱氢酶 (LDH) 循环水平。在只接受 I/R 动物中,止血带放松后 10 分钟采集血清以进行 LDH 测定。根据厂家说明利用 LDH 试剂盒 (Sigma) LDH 测定浓度,再灌注 2 小时后取得的样品进行 1 : 4 稀释。对于这两种酶,将所有的样品在 4℃保存并在收集后 24 小时内分析。结果用

Sigma-Franke(SF) 单位 /mL 表示。

[0254] 如图 15 中所示,在再灌注 1、2、3 和 4 小时后,双后肢 I/R 产生 CK 和 LDH 循环水平升高,两种酶水平都在 4 小时后达到峰值。与假手术大鼠相比,只有缺血的大鼠没有显示出明显的 CK 或 LDH 水平升高 (CK, 58.3 ± 23.5 单位 /mL ;LDH, 269.5 ± 72.8 单位 /mL ; $P > 0.05$; $n = 4$)。与假手术大鼠相比,在只有 I/R 的大鼠中,止血带释放 10 分钟后,这些酶的水平没有显著的增加 (CK, 73.9 ± 28.1 单位 /mL ;LDH, 395.3 ± 123.2 单位 /mL ; $P > 0.05$; $n = 4$) ,表明在 4 小时期间再灌注 - 依赖的升高。再灌注显著地升高 CK 和 LDH 的血浆水平 ($P < 0.05$)。缺血之前用 C5a 拮抗剂处理的大鼠,或者 i. v. (1mg/kg) 或口服 (10mg/kg),具有类似的显著地下降的 CK 和 LDH 水平,与只接受 I/R 大鼠相比 ($P < 0.05$)。此外,再灌注之前用 C5a 拮抗剂 (1mg/kg) i. v. 处理的大鼠也显示出显著的 CK 和 LDH 水平的抑制,具有与缺血前处理大鼠类似的幅度 ($P < 0.05$)。所有药物处理大鼠在再灌注期间的这些酶的水平显著地高于假手术大鼠组的水平,显示 C5a 拮抗剂的部分抑制作用 ($P < 0.05$)。

[0255] (b) 丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶的抑制

[0256] 测量实验结束以及再灌注后 2 和 3 小时取得的血浆样品中丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 的循环水平。只接受 I/R 的动物在止血带释放后 10 分钟采集血清以测定 ALT 和 AST。用 ALT/AST 试剂盒 (GPT/GOT ;Sigma),根据厂家说明测定 ALT 和 AST 的浓度,测定在收集血浆 24 小时之内进行,血浆分析前储存在 4°C 。结果以 SF 单位 /mL 表示。

[0257] 如图 16 中所示,再灌注 2、3 或 4 小时后,肢体 I/R 导致血浆中 ALT 和 AST 的升高,两种酶 4 小时后达到浓度峰值。与假手术大鼠相比,只接受 2 小时缺血的大鼠的 ALT 或 AST 水平没有显著升高 (ALT, 12.9 ± 4.6 单位 /mL ;AST, 91.4 ± 10.4 单位 /mL ; $P > 0.05$; $n = 4$)。在只接受 I/R 大鼠中,止血带松开 10 分钟后,与假手术大鼠相比,两种酶的水平没有显著增加 (ALT, 18.1 ± 4.4 单位 /mL ;AST, 105.9 ± 21.3 单位 /mL ; $P > 0.05$; $n = 4$) ,再次表明再灌注 - 依赖的升高。在所有 3 组用 C5a 拮抗剂处理的大鼠中发现具有类似的 ALT 和 AST 水平的显著下降,与只接受 I/R 大鼠相比 ($P < 0.05$)。再灌注 4 小时后,而不是在 2 或 3 小时,与假手术大鼠相比,药物处理大鼠具有显著地上升的 ALT 水平 ($P < 0.05$;图 16A)。与此形成对比的是,与假手术大鼠相比,这些药物处理大鼠在所有测量时间点具有升高的 AST 水平,表明 C5a 拮抗剂对 ALT 和 AST 的不同抑制作用 ($P < 0.05$;图 16B)。

[0258] (c) 钾和钙离子血清水平变化的抑制

[0259] 在各实验结束后以及对只接受 I/R 动物止血带释放 10 分钟后,用火焰光度计 (Corning435 ;Corning, U. S. A.) 测量钾离子 (K^{+}) 的血清水平。在实验结束后以及对只接受 I/R 的动物在止血带释放 10 分钟后,利用钙试剂盒 (Sigma) 测量血清钙离子 (Ca^{++}) 浓度。将样品储存在 -20°C 并在收集后 2 周内测量 K^{+} 和 Ca^{++} 水平。结果以 mmol/L 表示,并总结在表 1 中。

[0260] 表 1

[0261] 缺血以及再灌注 4 小时后大鼠血清阳离子水平的改变

[0262]

实验组	n ^a	血清 K ⁺ (mmol/L)	血清 Ca ⁺⁺ (mmol/L)
假手术	8	4.84±0.29*	2.66±0.06*
缺血-只有	4	4.70±0.17*	2.52±0.10*
I/R ^b -只有	10	7.53±0.34 [†]	2.23±0.09 [†]
I/R+1mg/kg i.v. 缺血前	8	6.13±0.18*	2.46±0.04*
I/R+10mg/kg p.o. 缺血前	6	5.57±0.58*	2.49±0.04*
I/R+1mg/kg i.v. 再灌注前	6	5.02±0.32*	2.45±0.10*

[0263] 数据为平均值 ±SEM.

[0264] ^a 大鼠数

[0265] ^b 缺血 / 再灌注

[0266] *P<0.05vs I/R- 只有

[0267] [†]P<0.05vs 假手术

[0268] 血尿氮、肌酸酐以及尿蛋白的抑制

[0269] 实验结束时采集的血清样品中血尿氮 (BUN) 循环水平的测量利用尿氮试剂盒 (Sigma) 根据厂家说明进行。将样品储存在 -20℃并在收集后 2 周内分析。实验结束时采集的血清样品中肌酸酐的循环水平利用肌酸酐试剂盒 (Sigma) 根据厂家说明进行。在实验结束之前 1 小时收集的尿样品中的蛋白浓度利用蛋白试剂盒 (Sigma) 根据厂家说明进行。将样品储存在 4℃并在收集后 24 小时内分析。所有这三种参数以 mg/dL 表示,如表 2 中所示。

[0270] 表 2

[0271] 缺血以及再灌注 4 小时后大鼠肾脏损伤标志物的改变

[0272]

实验组	n ^a	血清 BUN ^b (mg/dL)	血浆肌酸酐 (mg/dL)	蛋白尿(mg/dL)
假手术	8	21.9±1.2*	0.79±0.12*	10.7±2.2*
缺血-只有	4	22.8±2.5*	0.62±0.26*	13.3±7.0*
I/R ^c -只有	10	41.9±3.1 [†]	1.66±0.09 [†]	120.3±18.9 [†]
I/R+1mg/kg i.v. 缺血前	8	23.6±1.6*	1.07±0.07*	36.4±11.4*
I/R+10mg/kg p.o. 缺血前	6	21.8±2.1*	1.14±0.14*	45.8±9.8*
I/R+1mg/kg i.v. 再灌注前	6	22.0±2.2*	1.22±0.05*	41.2±11.4*

[0273] 数据为平均值 ± SEM.

[0274] ^a 大鼠数

[0275] ^b 血尿氮

[0276] ^c 缺血 / 再灌注

[0277] ^d 没有检测到

[0278] *P<0.05 vs I/R- 只有

[0279] [†]P<0.05 vs 假手术

[0280] 与假手术大鼠相比,再灌注4小时后在只接受I/R-大鼠中观察到高钾血症(P<0.05)。与只接受I/R的大鼠相比,在所有3组药物处理组中的大鼠具有显著地下降的K⁺水平,再灌注之前处理的大鼠显示出接近正常的水平(P<0.05)。缺血以及再灌注4小时后,与假手术动物相比,只接受I/R的大鼠具有显著地下降的血清Ca⁺⁺浓度(P<0.05)。在所有3组药物处理组中的大鼠显示出类似的I/R-诱导的Ca⁺⁺水平下降的抑制作用(P<0.05)。药物处理I/R大鼠中以及只有缺血大鼠中K⁺和Ca⁺⁺二者的水平与假手术大鼠中的二者水平没有显著的差别(P>0.05)。在只接受I/R-大鼠中止血带释放10分钟后这些离子的水平(K⁺, 5.27±0.49mmol/L; Ca⁺⁺, 2.50±0.17mmol/L; P>0.05; n=4)与假手术大鼠中的水平也没有显著的差别。

[0281] 与假手术大鼠相比,缺血以及再灌注4小时后,只接受I/R大鼠具有显著升高的血清BUN和肌酸酐水平以及增加的尿蛋白浓度(P<0.05)。与假手术大鼠相比,单独缺血2小时没有引起这些参数中的任何一种上升(P>0.05)。与只接受I/R大鼠相比,在所有3组用C5a拮抗剂处理的大鼠具有显著地降低的这些参数水平(P<0.05),并且与假手术大鼠相比,这些水平没有显著的不同(P>0.05)。

[0282] 分叶核白细胞数目以嗜中性粒细胞聚集的抑制

[0283] 测量缺血之前即刻采集以及在实验结束时采集的血样品中的循环PMNs,按照Strachan等,(2000)描述的方法。最终样品中的PMNs数表述被缺血前数目的平均百分比

±SEM。

[0284] 如图 17A 中所示,与假手术大鼠相比,再灌注 4 小时后只接受 I/R 大鼠中的循环 PMNs 显著地升高 ($P<0.05$)。与假手术大鼠相比,只有缺血处理的大鼠没有显著的 PMNs 升高 ($P>0.05$)。在所有的 3 组药物处理组中大鼠的 PMN 数与假手术大鼠中的数值没有显著的不同 ($P>0.05$),并且与只接受 I/R 大鼠相比,显著地下降 ($P<0.05$),缺血前用 i. v. (1mg/kg) 处理的大鼠显示出最大的抑制作用。

[0285] 嗜中性粒细胞向大鼠中肝脏、肺和肌肉的浸润通过测量髓过氧化物酶 (MPO) 的活性水平来判断。在实验结束时,得到肺 (~0.5g)、肝脏 (~1g) 以及左下肢肌肉 (~1g) 并称量然后用 1mL 磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 进行匀浆。然后将样品进行超声处理,肝脏和肺样品 20 秒,或肌肉样品 60 秒。离心后 (14,000 $\times$ g, 10 分钟, 22℃),将得到的上清液立即用来测量 MPO 水平。分析混合物由 o-dianisidine (2.85mg/mL;Sigma)、过氧化氢酶 (0.85%) 以及 1 : 40 稀释的样品的 PBS 溶液组成。底物加入 5 分钟后,读取 450nm 处的吸光度,并将结果以吸光度单位 / 克组织表示。

[0286] 将在大鼠后肢肌肉、肺以及肝脏 MPO 的活性水平作为进入组织组织的嗜中性粒细胞的测定 (Kyriakides 等,2000)。如图 17B、C 和 D 中所示,与假手术大鼠相比,只接受 I/R 大鼠的后肢肌肉、肺以及肝脏中的 MPO 活性有显著的升高 ($P<0.05$),而假手术大鼠、只有缺血大鼠在这些组织的任何一种中 MPO 的活性没有显著的增加 ($P>0.05$)。与只接受 I/R 大鼠相比,所有 3 组药物处理大鼠在所有的组织中有显著下降的 MPO 活性 ($P<0.05$),与假手术大鼠相比,其水平没有显著的不同 ($P>0.05$)。

[0287] 对肝脏匀浆 TNF- α 的抑制

[0288] 肝脏匀浆上清样品中 TNF- α 水平的测量,利用酶联免疫吸附分析试剂盒 (OptEIA, Pharmingen, USA),如以前所述 (Strachan 等,2000) 方法进行。将来自肝脏匀浆样品上清液进行 1 : 10 稀释然后用于分析。将上清液储存在 -20℃,并在收集后 2 周内分析样品。结果以 ng/g 组织表示。如图 18 中所示,与假手术大鼠的样品相比,来自只接受 I/R 大鼠的肝脏匀浆样品显著增加的 TNF- α 浓度 ($P<0.05$)。只有缺血大鼠中的 TNF- α 水平与假手术大鼠没有显著的不同 ($P>0.05$)。与只接受 I/R 的大鼠相比,在药物处理大鼠中,所有 3 组具有类似的下降的 TNF- α 浓度 ($P<0.05$),与假手术动物相比,没有显著的不同 ($P>0.05$)。

[0289] 肌肉水肿的抑制

[0290] 将在实验结束时得到的右后肢肌肉 (~1g) 称重并在 80℃烤箱放置 24 小时,然后再称重。测定湿干重比,并作为肌肉水肿的测定指标。如图 19 中所示,与假手术动物相比,只接受 I/R 大鼠后肢肌肉的湿干重比显著地增加 ($P<0.05$)。只有缺血动物中的比例与假手术动物没有显著的不同 ($P>0.05$)。与只接受 I/R 大鼠相比,在所有 3 组药物处理大鼠中,存在类似的下降的湿重 - 干重比 ($P<0.05$),并且这些值与假手术动物中的值没有显著的不同 ($P>0.05$)。

[0291] 结果表明接受 2 小时的止血带 - 诱导的双后肢缺血以及再灌注 4 小时的大鼠遭受局部损伤以及肺、肝脏以及肾脏损伤,如用多种组织压力指标测定。与假手术动物相比,只接受缺血的大鼠在疾病标志物方面没有显著的改变。与假手术动物相比,再灌注 10 分钟后从接受只有 I/R 处理的动物采集的血也没有显著的 CK、LDH、AST、ALT、K⁺ 或 Ca⁺⁺ 血浆或血

清水平改变。局部骨骼肌肉损伤的严重性通过再灌注后 4 小时肌肉水肿以及嗜中性粒细胞聚集以及再灌注期间血清 CK 和 LDH 的增加来评估。胞质 CK 发现主要在肌肉中,并且时可靠的肌肉组织损伤标志物 (Tay 等,2000)。乳酸脱氢酶也是一种见于肌肉的胞质酶,但是也存在于许多其他组织中 (Carter 等,1998)。因此,LDH 是一种特异性稍差的肌肉损伤测量,但是仍然可作为一般组织损伤的测量。

[0292] 在接受缺血以及再灌注处理的动物的肺、肝脏以及肾脏中检测远端器官损伤指标。通过测量肺软组织中嗜中性粒细胞聚集的增加来评价肺损伤。通过测量肝 TNF- α 以及嗜中性粒细胞聚集的增加,以及通过测量 ALT 和 AST 血浆水平来定量肝损伤。尽管 ALT 和 AST 血浆水平的增加典型地可用作肝脏病理学地标志物,但是这两种酶也见于肌肉中,因此部分增加任何地源于肌肉,而不是肝脏损伤 (Tay 等,2000)。骨骼肌肉 I/R 后肾功能障碍较为常见 (Tanaka 等,1995)。我们发现 I/R 大鼠中血清 BUN 和血浆肌酸酐增加。但是,肌酸酐,并且特别是 BUN,也源自肌肉,并且观察到的增加也可源于肌肉损伤 (Carter 等,1998)。我们发现 I/R 大鼠中蛋白尿右相当大的增加,表明一定程度的肾损伤。

[0293] 已经发现,在该模型中,C5a 拮抗剂 AcF-[OPdChaWR] 抑制许多局部组织以及远端器官损伤的疾病标志物。这些结果表明 C5a 在骨骼肌肉 I/R 损伤病理生理中的关键作用。由于人中下肢缺血和再灌注较高的并发症发病率,本发明的 C5a 受体拮抗剂代表了的一种将来可能的这些并发症的治疗,特别是当 I/R 损伤可以预计的情况,例如在手术操作中。C5a 拮抗剂阻滞促炎性细胞因子产生以及嗜中性粒细胞转运的能力可能是其疾病调节特性中的关键因素。这里的口服活性证实这种药物性质可广泛用于临床情况。

[0294] 讨论

[0295] 本发明描述了一系列包含构象限制的扭转环状分子,其具有结合细胞的预先构成,也可于人 C5a 结合。本发明化合物的主要特征在于环状骨架表现处的预先构成的扭转构型,其至少 3 各疏水基团聚集到相邻的空间,创造了疏水表面‘结构部分(patch)’。

[0296] 拮抗剂的这种扭转构象将使环状肽与跨膜区域中在或邻近于人 C5a 的 C-端也结合的 C5a 受体位置结合。

[0297] 这里描述的结果能够设计和开发甚至更强活性的构象限制的小分子 C5a 拮抗剂。理论上这些环状拮抗剂的特征也可用来设计不相关的非-肽模板,其类似地取代基投射成与当这些 C5a 受体拮抗剂受体结合时候占据的类似的三维空间,取代基相应于或类似于这里描述的环状肽骨架相连的那些基团。

[0298] 与非环状肽相比,环状肽作为候选药物具有数种重要的优点 (Fairlie 等 1995, Fairlie 等,1998, Tyndall 和 Fairlie,2001)。本说明书描述的环状化合物对蛋白水解降解稳定,在人血或血浆、在人或大鼠胃液,或在消化酶例如胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶存在下在 37°C 至少稳定 7 小时。与之相反,由 L-氨基酸组成的短的线性肽在这些条件下数分钟内快速降解成其组成氨基酸。第二个优点在于环状和非肽分子采用的受限的单一构象,与非环状或线性肽相比,后者具有足够的灵活性在溶液中采取多种结构而不是受体-结合需要的一种结构。第三,环状化合物例如本发明描述的那些通常具有更大的脂溶性,作为药物与非环肽相比,具有更高的药物生物利用度,非环肽几乎不能经口给药。第四,环状分子的血浆半衰期通常比肽类长。

[0299] 对本领域普通技术人员很明显的是,尽管本发明为了清楚和理解进行进行了一定

程度的详细描述,在不偏离本发明说明书的发明概念的基础上,可以对这里描述的实施方案和方法进行多种修饰和改变。

[0300] 这里引用的参考文献列在后页中,这里引入作为参考。

[0301] 参考文献

[0302] Carter W0, BullC, Bortolon E, et al. A murine skeletal muscle ischemia-reperfusion injury model: differential pathology in BALB/c and DBA/2N mice. J Appl Physiol 1998; 85: 1676-1683.

[0303] Defraigne JO, Pincemail J. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. Physiopathology and prevention. Acta Chir Belg 1997; 97: 176-186.

[0304] DeMartino, J. A., Konteatis, Z. D., Siciliano, S. J., Van Riper, G., Underwood, D. J., Fischer, P. A., Springer, M. S. J. Biol. Chem., 1995 270 15966-15969 DeMartino, J. A., Van Riper, G., Siciliano, S. J., Molineaux, C. J., Konteatis, Z. D., Rosen, H. Springer, M. S. J. Biol. Chem., 1994 269 14446-14450.

[0305] Ember, J. A., Sanderson, S. D., Taylor, S. M., Kawahara, M. and Hugli, T. E. J. Immunol., 1992 148 3165-3173.

[0306] Fairlie, D. P., Wong, A. K.; West, M. W. Curr. Med. Chem., 1998, 5, 29-62.

[0307] Fairlie, D. P., Abbenante, G. and March, D. Curr. Med. Chem., 1995 2 672-705.

[0308] Finch, A. M., Vogen, S. M., Sherman, S. A., Kirnarsky, L., Taylor, S. M., and Sanderson, S. D. J. Med. Chem., 1997 40 877.

[0309] Gerard, C and Gerard, N. P. Ann. Rev. Immunol., 1994 12 775-808.

[0310] Gerard, N and Gerard, C. Nature, 1991 349 614-617.

[0311] Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. Mol Cell Biochem 1998; 179: 169-187.

[0312] Haviland, D. L., McCoy, R. L., Whitehead, W. T., Akama, H., Molmenti, E. P., Brown, A., Haviland, J. C., Parks, W. C., Perlmutter, D. H. and Wetsel, R. A. J. Immunol., 1995 154 1861-1869.

[0313] Kawai, M., Quincy, D. A., Lane, B., Mollison, K. W., Luly, J. R., Carter, G. W. J. Med. Chem., 1991 34 2068-71.

[0314] Kawai, M., Quincy, D. A., Lane, B., Mollison, K. W., Or, Y. -S., Luly, J. R., and Carter, G. W. J. Med. Chem., 1992 35 220-223.

[0315] Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. Microsurgery 1993; 14: 165-175.

[0316] Kohl, J., Lubbers, B., Klos, A., et al. Eur. J. Immunol., 1993 23 646-652.

[0317] Konteatis, Z. D., Siciliano, S. J., Van Riper, G., Molineaux, C. J., Pandya, S., Fischer, P., Rosen, H., Mumford, R. A., and Springer, M. S. J. Immunol., 1994 153 4200-4204.

[0318] Kyriakides C, Austen WG, Jr., Wang Y, et al. Neutrophil mediated remote organ

injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000 ;48 :32-38.

[0319] Morgan, E. L. , Sanderson, S. D. , Scholz, W. , Noonan, D. J. , Weigle, W. O. and Hugli, T. E. *J. Immunol.* , 1992 48 3937-3942.

[0320] Sanderson, S. D. , Ember, J. A. , Kirnarsky, L. , Sherman, S. A. , Finch, A. M. , Taylor, S. M. *J. Med. Chem.* , 1994 37 3171-3180.

[0321] Sanderson, S. D. , Kirnarsky, L. , Sherman, S. A. , Vogen, S. M. , Prakesh, O. , Ember, J. A. , Finch, A. M. and Taylor, S. M. *J. Med. Chem.* , 1995 38 3669-3675.

[0322] Siciliano, S. J. , Rollins, T. E. , DeMartino, J. , Konteatis, Z. , Malkowitz, L. , VanRiper, G. , Bondy, S. , Rosen, H. and Springer, M. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994 91 1214-1218.

[0323] Sim, E. *The Natural Immune System. Humoral Factors*, 1993, IRL Press, Oxford University Press, Oxford.

[0324] Strachan, A. J. , Haaime, G. , Fairlie, D. P. and S. M. Taylor. Inhibition of the reverse passive Arthus reaction and endotoxic shock in rats by a small molecule C5a receptor antagonist. *J Immunol.* 164 :6560-6565, 2000.

[0325] Strachan A. J. , Woodruff T. M. , Haaime G. , et al. A new small molecule C5a receptor antagonist inhibits the reverse-passive Arthus reaction and endotoxic shock in rats. *J Immunol* 2000 ;164 :6560-6565.

[0326] Tanaka T. , Kita T. , Liu R. , Tanaka N. Protective effect of peptide leukotriene antagonist on renal failure induced by a tourniquet in rabbits. *Forensic Sci Int* 1995 ;71 :57-64.

[0327] Tay S. K. , Ong H. T. , Low P. S. Transaminitis in Duchenne' s muscular dystrophy. *Ann Acad Med Singapore* 2000 ;29 :19-722.

[0328] Tempero, R. M. , Hollingsworth, M. A. , Burdick, M. D. , Finch, A. M. , Taylor S. M. , Vogen, S. M. , Morgan, E. L. , and Sanderson, S. D. *J. Immunol.* , 1997 158 1377-1382.

[0329] Tyndall, J. D. A. ; Fairlie, D. P. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 893-907.

[0330] Whaley, K. *Complement in Health and Disease. Immunology and Medicine Series*, Ed. Reeves, W. G. , 1987, MTP Press Ltd, Lancaster.

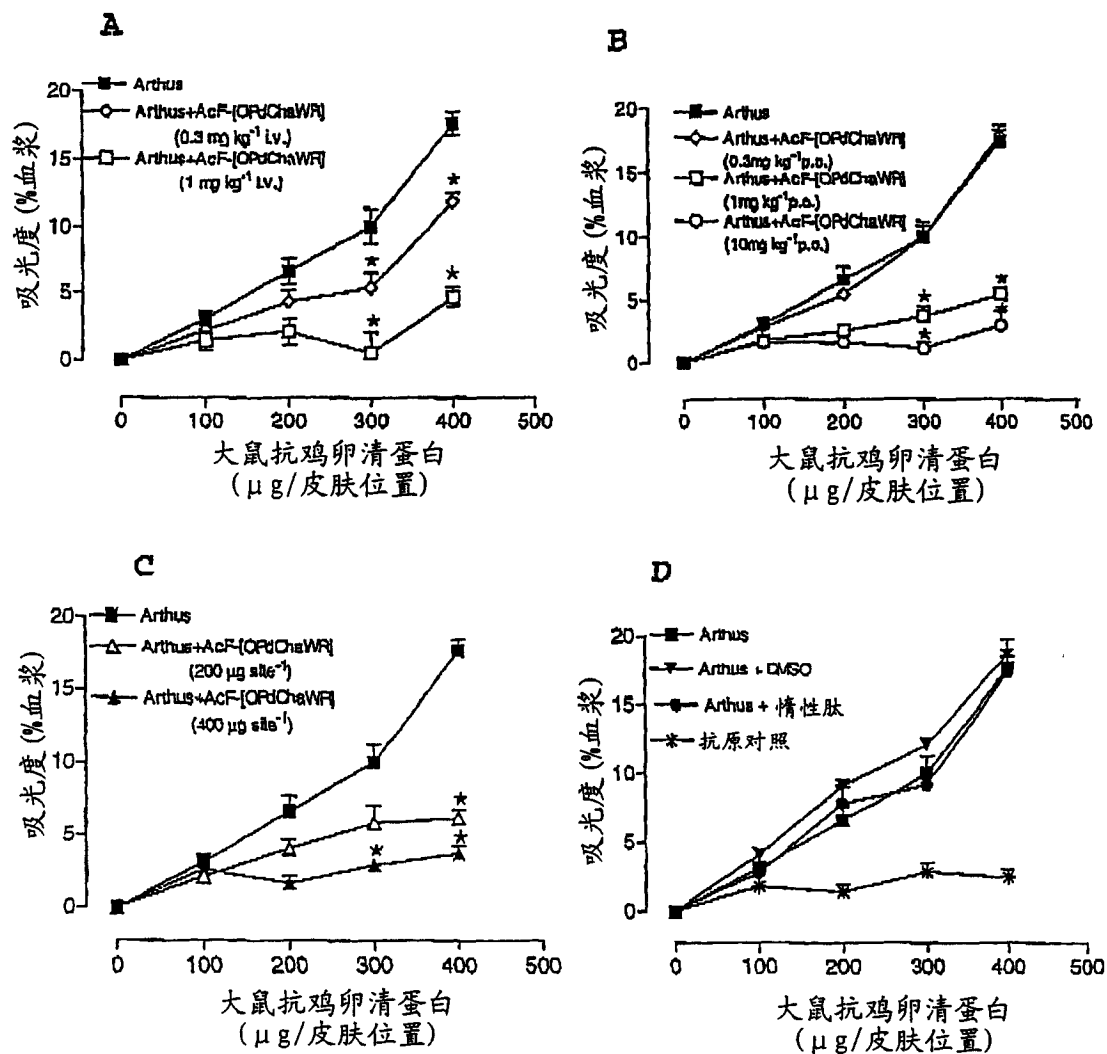


图 1

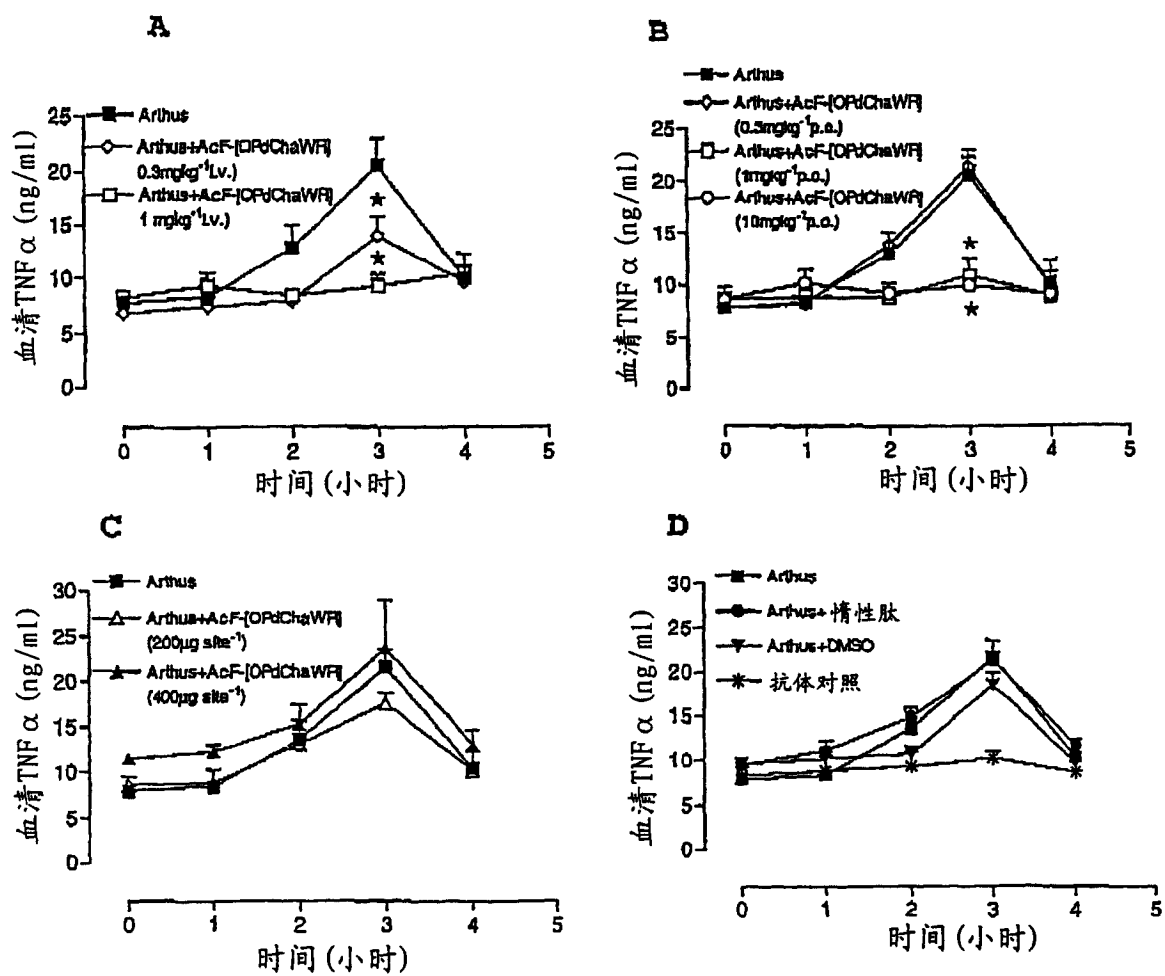


图 2

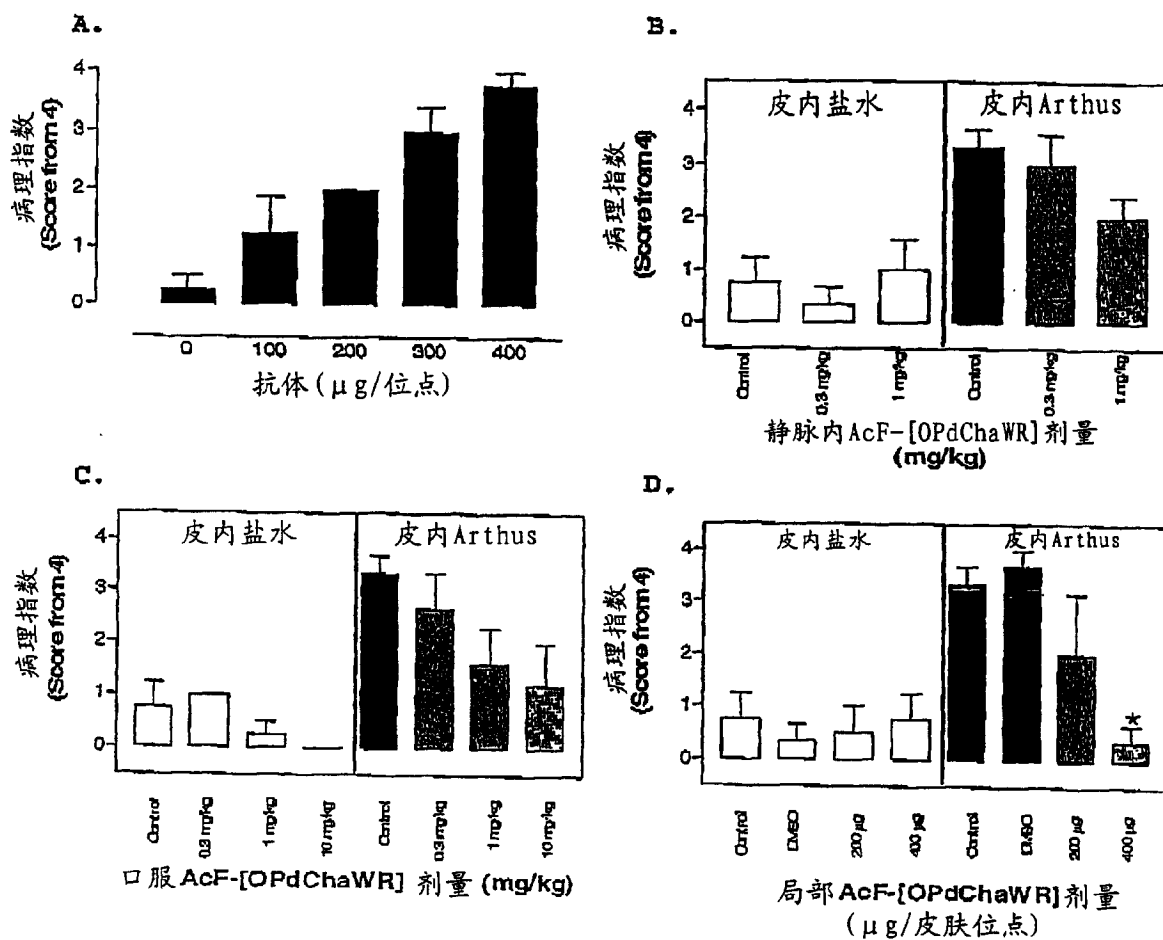


图 3

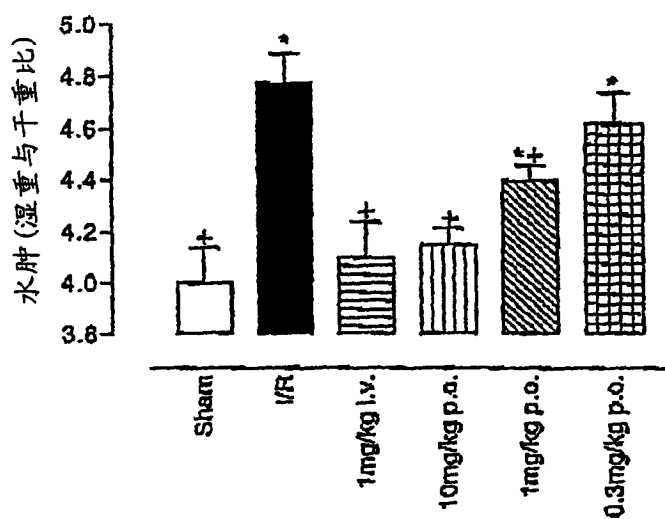


图 4

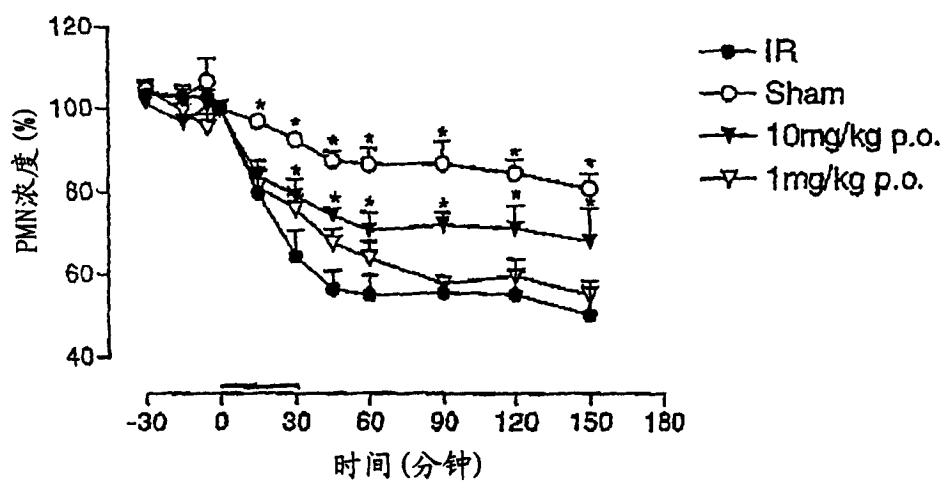


图 5

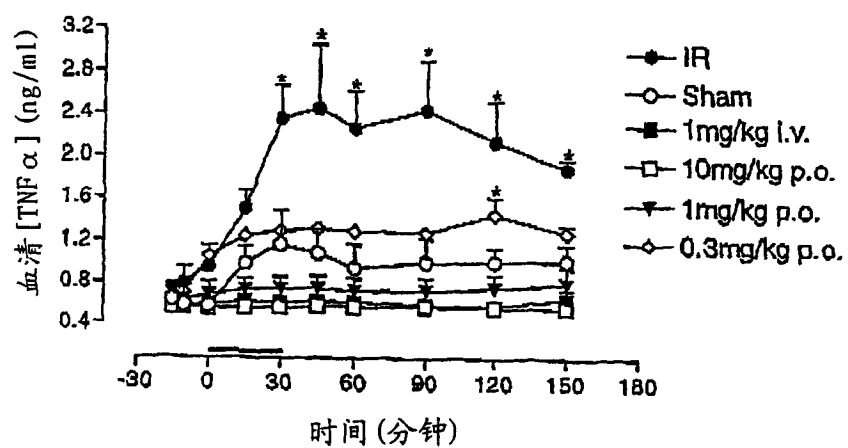


图 6

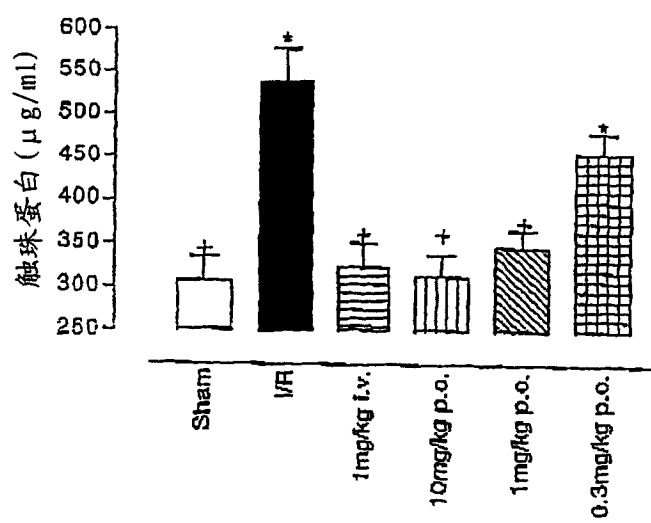


图 7

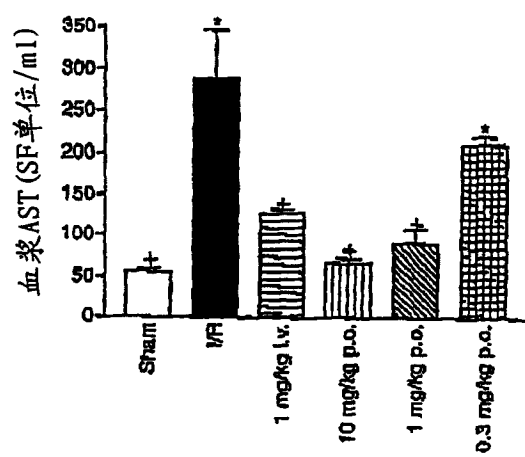


图 8

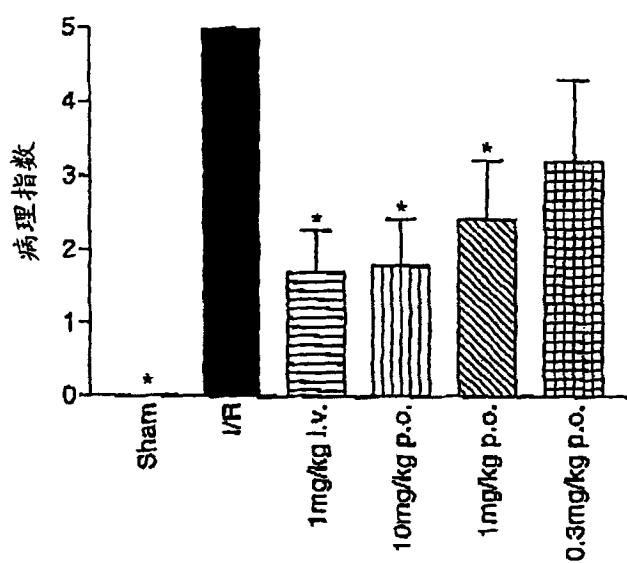


图 9

14-天研究

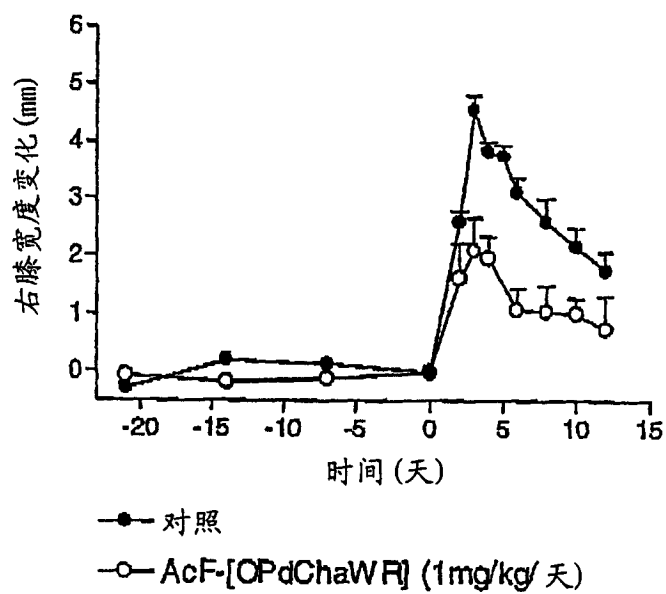


图 10

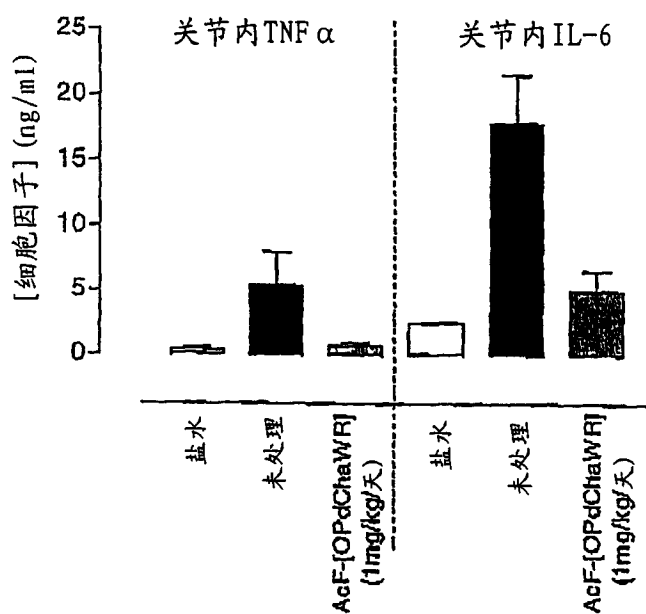


图 11

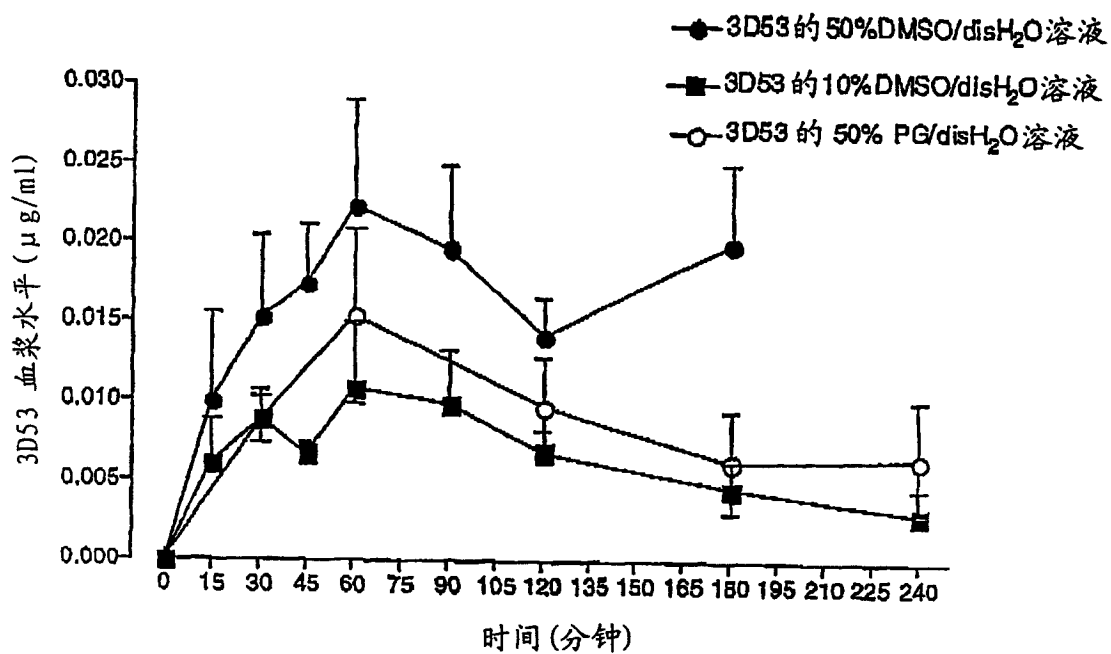


图 12

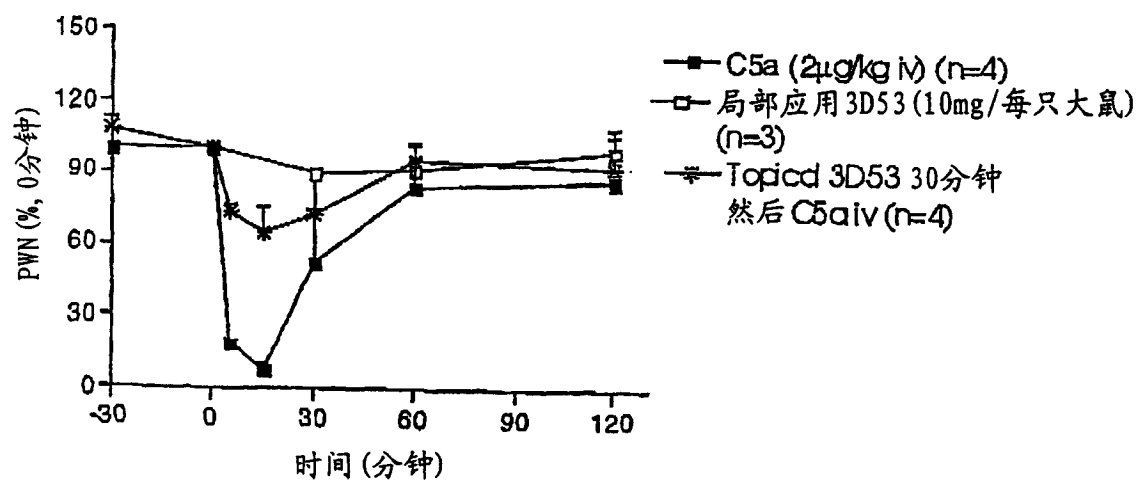


图 13

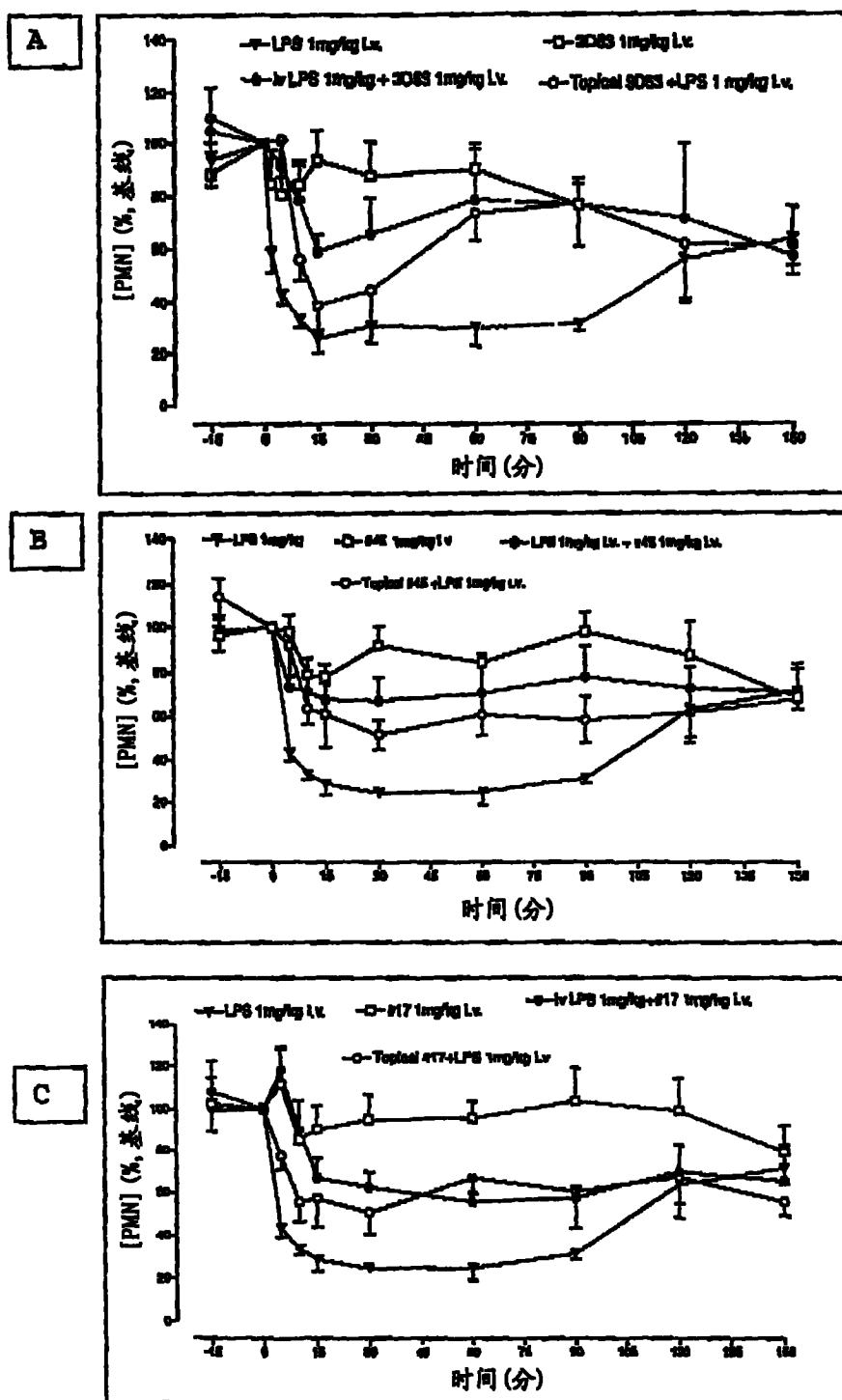


图 14

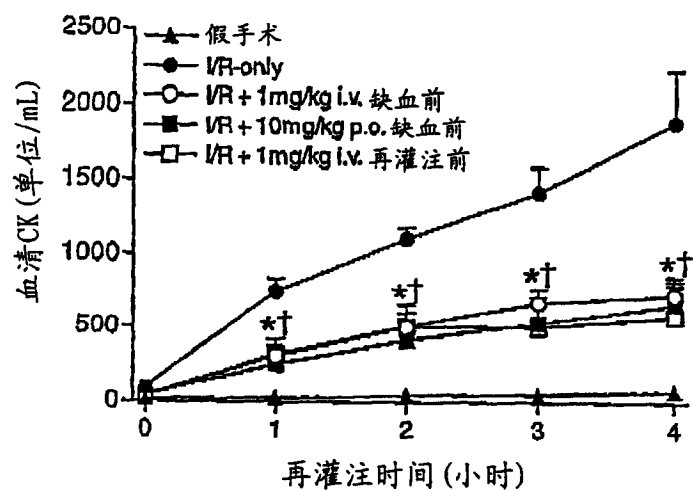


图 15A

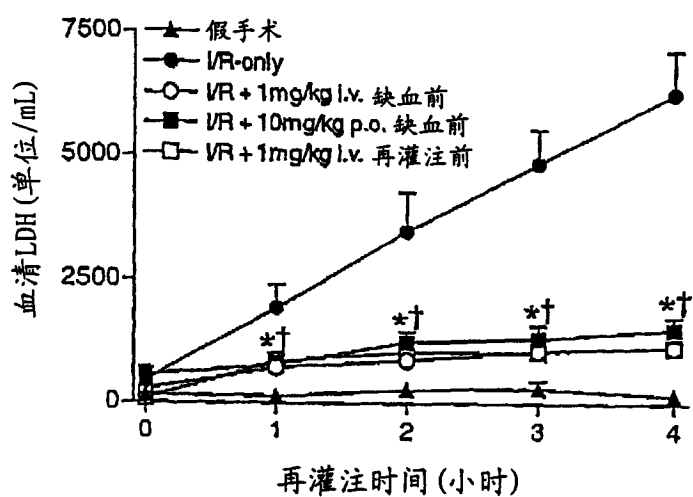


图 15B

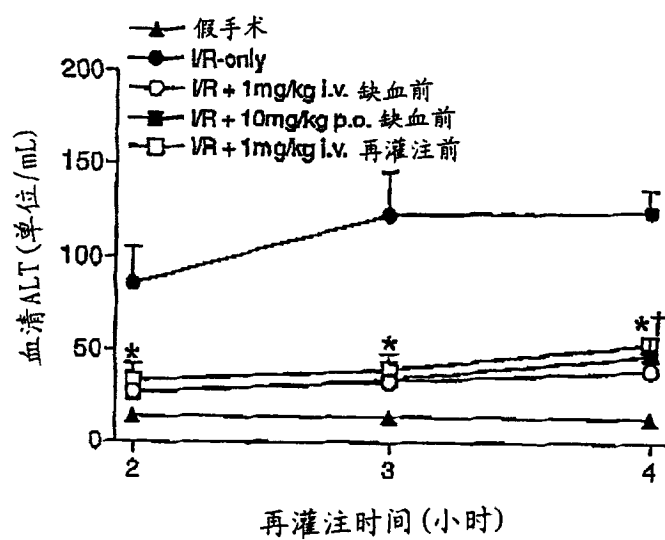


图 16A

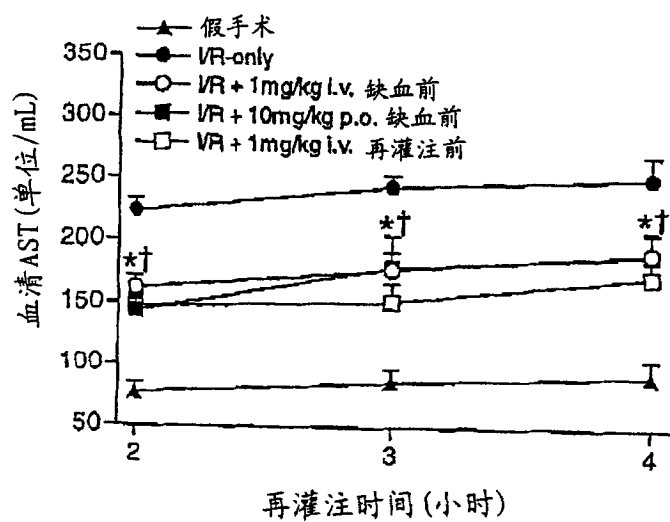


图 16B

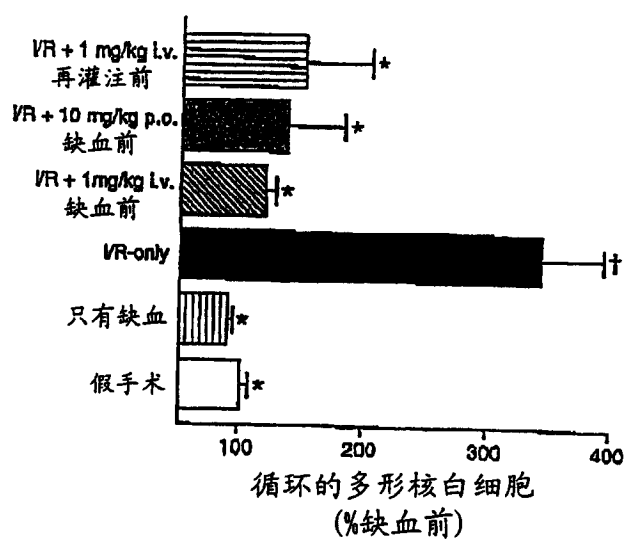


图 17A

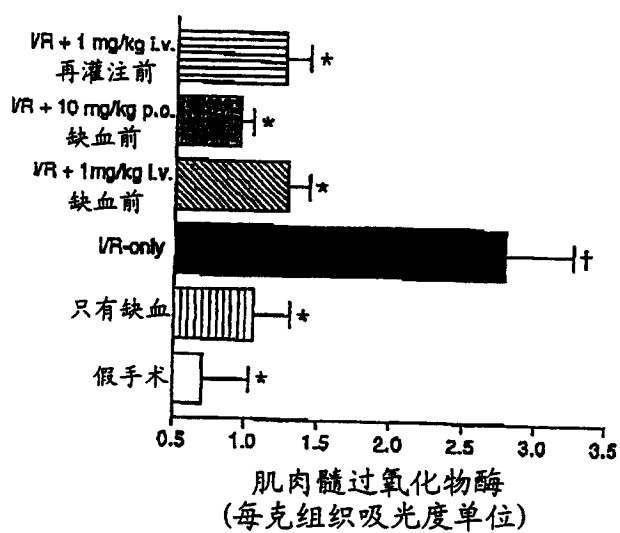


图 17B

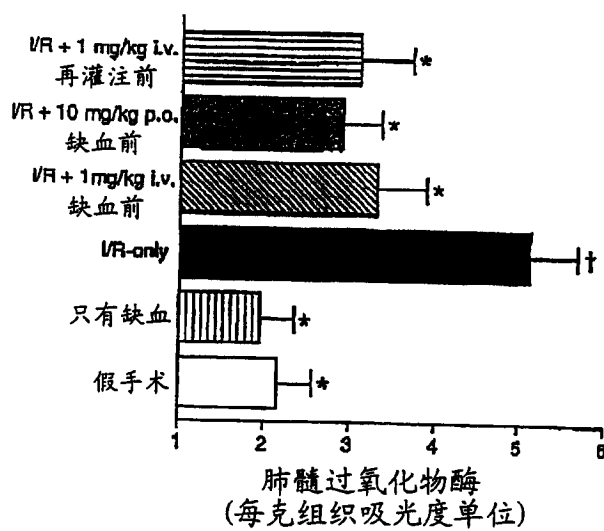


图 17C

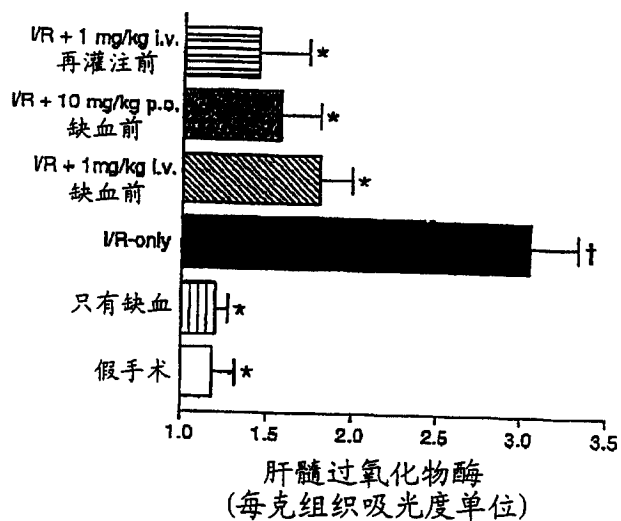


图 17D

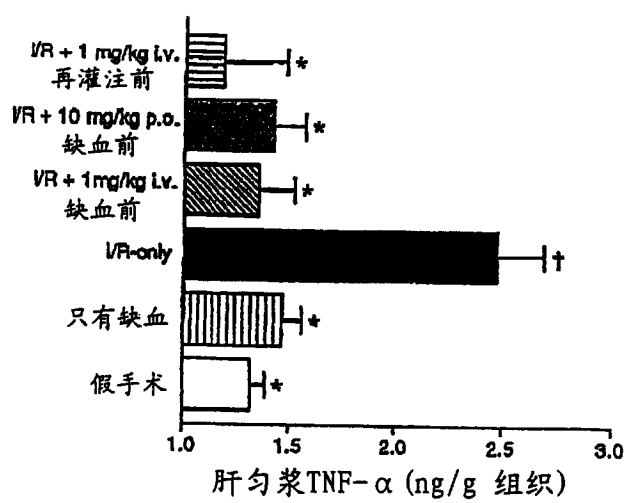


图 18

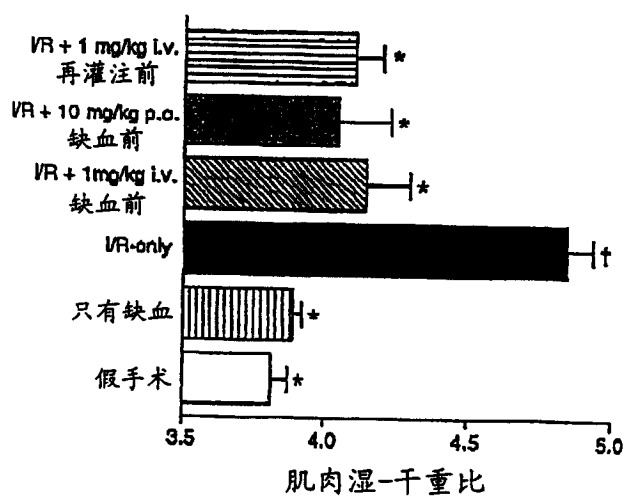


图 19