



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20040127A A2

HR P20040127A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 07 K 7/08**

C 07 K 14/705

C 12 N 15/85

C 12 N 15/67

A 61 K 48/00

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 06.02.2004.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/NL02/00566

Datum podnošenja međunarodne prijave 28.08.2002.

(87) Broj međunarodne objave: WO 03/020753

Datum međunarodne objave 13.03.2003.

(31) Broj prve prijave: 01203314.8

(32) Datum podnošenja prve prijave: 03.09.2001.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: EP

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelji:

Yamanouchi Europe B.V., Elisabethhof 19, 2353 EW Leiderdorp, NL
Thomas, Jacobus, Maria Molenaar, Hooigracht 82a, 2312 KW Leiden, NL
Johan Kuiper, Krugerlaan 37, 2806 EB Gouda, NL
Theodorus, Josephus Cornelis Van Berkel, Van Nesstraat 44, 2024 DP
Haarlem, NL
Erik Anna Leonardus Biessen, Marga Klompéstraat 40, 2331 RX Leiden,
NL

(74) Punomoćnik:

PRODUCTA d.o.o., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma:

PEPTIDNI SPOJEVI SELEKTIVNO VEZANI NA P-SELEKTIN

(57) Sažetak: Prisutni izum odnosi se na spojeve koji se selektivno vežu na adhezijsku molekulu humanog P-selektina, te posebno na spojeve koji sadrže peptid s aminokiselinskim slijedom $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ ili funkcionalni ekvivalent navedenog peptida. Osim toga, izum se odnosi na metode priprave takvih spojeva, na upotrebu takvih spojeva u terapijskim ili dijagnostičkim metodama, te u farmaceutskim pripravcima, na nukleinske kiseline koje kodiraju proteinske tvari koje sadrže aminokiselinske slijedove navedenih spojeva, na prijenosnike u isporuci gena koji sadrže takve nukleinske kiseline, na vezne molekule koje se vežu na navedene spojeve i na metodu određivanja da li je spoj sposoban vezati se na P-selektin

HR P20040127A A2

OPIS IZUMA**Područje izuma**

5 Prisutan izum odnosi se na spojeve koji se selektivno vežu na adhezijsku molekulu humanog P-selektina, na metode pripreme takvih spojeva, na upotrebu takvih spojeva u terapijskim ili dijagnostičkim metodama, te farmaceutskim pripravcima, na nukleinske kiseline koje kodiraju proteinske tvari koje sadrže aminokiselinske slijedove navedenih spojeva, na prijenosnike u isporuci gena koji sadrže takve nukleinske kiseline, na vezne molekule koje se vežu na navedene spojeve i na metodu za određivanje da li je spoj sposoban vezati se na P-selektin.

10

Pozadina izuma

Zadnjih godina, adhezijske molekule staničnih površina postale su prepoznate kao ključni posrednici brojnih staničnih procesa uključujući stanični razvoj, diferencijaciju, migraciju i odgovor imunih stanica, te tumorske metastaze. Identificirane su četiri glavne vrste adhezijskih molekula: imunoglobulinska superobitelj staničnih adhezijskih molekula (CAMs), kadherini, integrini i selektini. Selektini predstavljaju obitelj koja se sastoji od tri transmembranskih glikoproteina koji vežu ugljikohidrate: "endotelijalnog" E-selektina, "leukocitnog" L-selektina i "trombocitnog" P-selektina. Sva tri selektina su ovisna o divalentnom kationu (npr. kalciju) i posjeduju izvanstaničnu domenu s motivom ugljikohidratnog prepoznavanja, epidermalni motiv sličan faktoru rasta i neke manje domene koje su povezane s dopunskim regulatornim proteinima.

Humani P-selektin (također naveden kao GMP-140, LECAM-3, PADGEM, CD62, CD62P) eksprimira se pomoću trombocita i endotelijalnih stanica. Kada je ekspimiran na površinama tih stanica, njegov najznačajniji učinak je usporavanje leukocita tako da oni napuštaju kapilare i ulaze u postkapilarne venule, što kasnije predstavlja glavno mjesto leukocitno-endotelijane adhezije. Proces usporavanja uočava se kao kotrljanje leukocita, naznačujući inicijalnu adheziju relativno niskog afiniteta. Čvrstom adhezijom kotrljajućih leukocita primarno posreduju integrini.

U endotelijalnim stanicama P-selektin se pohranjuje na Weibel-Palade tijelešćima; u trombocitima je naden u α -granulama. Nakon aktivacije, P-selektin se kao odgovor na različite upalne i trombogenične agense unutar nekoliko minuta mobilizira na površine stanica. Primarna funkcija endotelijalnog P-selektina je ojačavanje leukocita u postkapilarnim venulima, dok trombocitni P-selektin rezultira nastajanjem tromba. Jedan od poznatih prirodnih liganda P-selektina je PSGL-1 (glikoproteinski ligand P-selektina-1), 160 kDa sialoprotein ekspimiran na površini leukocita gdje je koncentriran oko uropoda. Detaljniji opisi strukture i funkcija P-selektina nalaze se u brojnim publikacijama, kao što su J. Panes, *Pathophysiology*, 5, 271 (1999); F. Chamoun i ostali, *Frontiers in Bioscience* 5, e103 (1. studeni 2000); S.-I. Hayachi, *Circulation* 102, 1710 (2000).

Smatra se da P-selektin izravno sudjeluje u nakupljanju trombocita, kao što su pokazala nedavna istraživanja na Ca-neovisnim interakcijama P-selektina sa 3-sulfoniranim galaktozil-ceramidom (također navedeni kao sulfatidi). Ova se interakcija vjerojatno odvija na različitim veznim mjestima P-selektina, vezanje se može inhibirati antitijelom WASP12.2, no ne antitijelom AK4, dok se vezanje prirodnog liganda P-selektina, PSGL-1, uključenog u leukocitnu adheziju, blokira s WASP12.2 i AK4. Smatra se da se vezna mjesta preklapaju. Pretpostavlja se da sulfatidne interakcije stabiliziraju nakupine trombocita.

Upale i upalni procesi igraju glavnu ulogu u patofiziologiji brojnih bolesti i stanja. Stanja mozga u kojima su nađene povećane razine selektina i koja zato mogu obuhvaćati patofiziološke slučajeve kojima posreduju selektini, uključuju tešku traumatsku ozljedu mozga, relapsirajuće-remitirajući oblik multiple skleroze, okluziju cerebralne arterije, ishemiju i moždani udar. Stanja srca u kojima selektini imaju ulogu uključuju akutni miokardijalni infarkt, ozljedu arterije koja je npr. izazvana angioplastikom i ishemiju. Slično, selektini utječu na stanja bubrega, kao što su ozljeda bubrega kod ishemije i reperfuzije, te zatajenje bubrega. Nadalje, selektini imaju ulogu u odbacivanju transplantiranog organa, hladnoj ishemiji, hemoragičnom šoku, septičkom šoku, tumorskim metastazama, kroničnim upalama, reumatoidnom artritisu, upalnoj bolesti crijeva, aterosklerozi, restenozi, angiogenezi, proširenoj intravaskularnoj koagulaciji, respiratornom stresnom sindromu kod odraslih i cirkulacijskom šoku.

Prema tome, moguće je poboljšati navedena i ostala stanja koja uključuju aktivaciju endotelijalnih stanica i leukocita, te posebno mobilizaciju i ekspresiju P-selektina specifičnim prekidanjem P-selektinskih kaskada. To se može postići npr. primjenom liganada koji se selektivno vežu na humani P-selektin, no ne ometaju njegovu bioaktivnost. Tom se metodom može inaktivirati mobilizirani P-selektin i spriječiti oštećenje tkiva koje je uzrokovano leukocitima. Isti se učinak potencijalno može postići genskom terapijom, čime se osigurava da je P-selektinski ligand ili njegov antagonist peptid ili modificirani peptid. Prema metodi, somatske stanice osobe kojoj je potrebno liječenje bile bi transfektirane ekspresijskim vektorom koji sadrži DNA slijed koji pak kodira antagonist P-selektina.

P-selektinski ligandi ili antagonisti mogu se također upotrijebiti za prevenciju ranije opisanih bolesti i stanja. Nadalje, takvi ligandi također se mogu korisno upotrijebiti u *in vivo* ili *in vitro* dijagnostici navedenih bolesti.

Za identifikaciju ili osmišljavanje selektivnih liganada P-selektina zadnjih godina učinjeni su različiti eksperimenti. Do sada su ispitane mnoge tvari, no niti jedna klinička studija nije dala uvjerljiv dokaz da bilo koji od tih spojeva dovodi do željenog kliničkog učinka uz činjenicu da istovremeno ne uzrokuje nuspojave.

Na primjer, otkriveno je da antitijela na P-selektinu koja su dobivena i ispitana na animalnim modelima, štite bubrege od ishemijsko-reperfuzijske ozljede (H.C. Rabb i ostali, JASN 5, 907, 1997; US-A-6,033,667). U drugom istraživanju je za inhibiranje tromboze u mačaka upotrijebljen rekombinant, topljivi oblik glikoproteinskog liganda P-selektina-1 (rPSGL-Ig) (M.J. Eppihimer i ostali, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 20, 2483, 2000). WO-A-96/09309 iznosi oligosaharidne strukture koje predstavljaju ligande E- i P-selektina. WO-A-99/41363 iznosi proteine slične podokaliksenu koji se vežu na selektine. WO-A-00/41711 opisuje različite manje peptide ili peptidne slijedove koji se vežu na članove obitelji humanih selektina; većina slijedova sadrži jednu ili više leucinskih ili izoleucinskih jedinica.

U drugom pristupu inhibiciji P-selektinske kaskade otkriveno je da različiti peptidi dobiveni iz lecitinske domene selektinske obitelji inhibiraju neutrofilnu adheziju na P-selektin (npr. US-A-6,111,065 i US-A-5,916,876); ti peptidi se vjerojatno vežu na P-selektinske receptore leukocita.

U WO-A-94/05269 opisani su peptidi koji inhibiraju vezanje selektina, kao što su P-selektin, E-selektin i L-selektin. Središnja regija tih peptida sadrži slijed od 11-18 aminokiselina P-selektina, E-selektina ili L-selektina. Nadalje, WO-A-95/31210 odnosi se na peptide i spojeve koji vežu selektine uključujući endotelijsku leukocitnu adhezijsku molekulu 1 (ELAM-1). Ti se peptidi u svrhu inhibiranja upala upotrebljavaju za blokiranje adhezije leukocita na selektine, tj. pogotovo na E-selektine, no također i na P-selektine ili L-selektine.

Unatoč navedenim naporima i dalje postoji potreba za tvarima sa selektivnim afinitetom prema P-selektinu koje se mogu upotrijebiti kod pripreme farmaceutskih pripravaka za dijagnozu, prevenciju i liječenje raznih bolesti i stanja koja uključuju adheziju leukocita na vaskularne endotelijalne stanice ili trombocite. Također postoji potreba za P-selektinskim ligandima koji se mogu upotrijebiti kao ciljajuće molekule ili dijelovi u farmaceutskim pripravcima za ciljanje lijekova ili genetskog materijala na tkivima gdje dolazi do ekspresije P-selektina.

Svrhe izuma

Svrha izuma je osigurati spojeve s afinitetom prema humanom P-selektinu.

Napose, svrha izuma je osigurati spojeve koji djeluju kao antagonisti ili parcijalni antagonisti P-selektina.

Slijedeća svrha izuma je osigurati spojeve koji djeluju kao ciljajući ligandi sa sposobnošću ciljanja lijekova ili genetskog materijala na stanicama ili tkivima gdje dolazi do ekspresije P-selektina.

Slijedeća svrha izuma je predstavljanje metoda za pripremu takvih spojeva.

Još jedna svrha izuma je predstavljanje upotreba takvih spojeva i pripravaka.

Ostale svrhe prisutnog izuma postat će jasne na osnovu slijedećeg opisa.

Kratak pregled izuma

U prvom aspektu prisutni izum osigurava spojeve sa selektivnim afinitetom prema humanom P-selektinu. Spojevi izuma su peptidi ili funkcionalni ekvivalenti, kao što su modificirani peptidi, peptidni analozi ili peptidomimetici. Oni sadrže slijed $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$, pri čemu je A_1 D- ili L-aminokiselina odabrana iz skupine koja se sastoji od cisteina (C), metionina (M) i valina (V) ili njen analog ili mimetik; A_2 je D- ili L-aminokiselina odabrana iz skupine koja se sastoji od asparaginske kiseline (D) ili njen analog ili mimetik; A_3 je D- ili L-aminokiselina odabrana iz skupine koja se sastoji od fenilalanina (F), tirozina (Y) i triptofana (W) ili njen analog ili mimetik; A_x je bilo koja D- ili L-aminokiselina ili njen analog ili mimetik; X je bilo koja N-terminalna skupina ili slijed, a Y je bilo koja C-terminalna skupina ili slijed. Spojevi imaju konstantu afiniteta prema humanom P-selektinu u mikromolarnom rasponu, no njihov se afinitet znatno povećava kada se konfiguriraju kao multimeri s valencijom 2 ili većom.

U WO-A-00/34303 opisan je slijed 610 aminokiselina koji obuhvaća slijedove Asn-Val-Val-Glu-Cys (NVVEC) i Gly-Phe-Val-Glu-Cys (GFVEC). P-selektin nije spomenut. Dva dana slijeda nisu analozi ili mimetici spojeva prisutnog izuma.

U drugom aspektu izum osigurava metode pripreme takvih spojeva. Metode uključuju kemijsku ili enzimsku ligaciju aminokiselinskih monomera ili oligomera za dobivanje spojeva. One također uključuju ekspresiju slijedova nukleinskih kiselina koji kodiraju spojeve u stanicama domaćina upotrebom vektora za transfekciju stanica domaćina slijedovima nukleinskih kiselina.

U slijedećem aspektu izum se odnosi na upotrebu spojeva izuma za pripremu farmaceutskih ili dijagnostičkih pripravaka koji su prikladni za inhibiciju vezanja leukocita na trombocite i endotelijalne stanice *in vitro* i *in vivo*, kao i za izravnu inhibiciju nakupljanja trombocita. Pripravci kao medikamenti mogu biti korisni u liječenju i prevenciji stanja i poremećaja koji obuhvaćaju aktivaciju vezanja leukocita na trombocite i endotelijalne stanice kojim posreduje P-selektin, kao što su trombotični poremećaji, ishemija, restenoza, ateroskleroza, zatajenje bubrega, parazitske bolesti, tumori i tumorske metastaze; nadalje, spojevi i pripravci mogu biti korisni u dijagnostici, prevenciji i terapiji bolesti i stanja koja uključuju nakupljanje trombocita, kao što su tromboza, moždani udar i srčani infarkt.

Farmaceutski pripravci koji sadrže spojeve izuma mogu se prilagoditi različitim načinima primjene, kao što su parenteralna, oralna, transmukozna, nazalna i pulmoloska primjena. Oni mogu sadržavati i agense koji ciljaju lijekove, agense za povećavanje biodostupnosti ili aktivne sastojke van spojeva izuma, te osigurati neposredno ili modificirano otpuštanje.

U još jednom aspektu prisutni se izum odnosi na metodu određivanja da li molekula sadrži afinitet vezanja za P-selektin, što obuhvaća doticaj P-selektina ili njegovog funkcionalnog ekvivalenta s navedenom molekulom i spojem prema izumu, te određivanje da li se smanjuje vezanje navedenog spoja na navedeni P-selektin ili njegov funkcionalni analog.

Nadalje, izum se odnosi na nukleinsku kiselinu koja kodira proteinsku molekulu koja sadrži aminokiselinski slijed $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$, pri čemu su A_x , A_3 , A_1 i A_2 ranije definirani i pri čemu je X N-terminus navedenog slijeda, a Y je C-terminus navedenog slijeda ili njegov funkcionalni ekvivalent. Proteinske molekule su spojevi koji se baziraju na aminokiselinskim slijedovima, kao što su proteini, oligo- ili polipeptidi, te njihovi derivati ili analozi. Navedena nukleinska kiselina može se upotrijebiti za pripremu medikamenta, a u područje prisutnog izuma također ulaze i prenosnici u isporuci gena koji sadrže navedenu nukleinsku kiselinu.

U slijedećem aspektu prisutan izum također obuhvaća i vezne molekule koje su sposobne specifično vezati spoj izuma.

Nadalje, prisutni izum odnosi se na metodu određivanja da li je spoj sposoban vezati se na humani P-selektin, što obuhvaća zamjenu aminokiseline konzervativnom aminokiselinom u spoju prema izumu i određivanje da li je dobiveni spoj sposoban vezati se na humani P-selektin.

Detaljni opis izuma

Spojevi izuma posjeduju afinitet prema humanom P-selektinu, membranskom glikoproteinu koji se eksprimira pomoću vaskularnih endotelijalnih stanica i trombocita i koji je uključen u leukocitnu adheziju na endotelij i trombocite. Afinitet ili vezne karakteristike spojeva na P-selektin mogu se kvantitativno odrediti npr. pomoću konstante afiniteta (IC_{50}). Konstanta afiniteta od oko 50-100 μM ili manja smatra se dokazom afiniteta i samog vezanja. Za ligande je poželjno da imaju konstantu vezanja od oko 10 μM ili manju. Najveće konstante afiniteta koje se mogu postići za nekovalentne veze koje imaju ulogu u interakcijama ili vezanjima u skladu s prisutnim izumom su oko 10^{-15} M. Općenito, konstante afiniteta veće su od oko 10^{-12} M, a u većini slučajeva su veće od oko 10^{-9} M.

Nadalje, spoj izuma sadrži peptid ili molekulsku strukturu srodnu peptidu, koja je ovdje navedena kao funkcionalni ekvivalent.

Peptidi se definiraju kao amidi dobiveni iz dvije ili više aminokiselina spajanjem amino-skupine jedne aminokiseline s karboksilnom skupinom druge (Merriam Webster Medical Dictionary[©] 2001). Peptid se također može odnositi i na peptidne strukture unutar molekule. Uobičajeno se peptidi sastoje L- α -aminokiselina koje se javljaju u prirodi, a to su alandin (Ala ili A), arginin (Arg ili R), asparagin (Asn ili N), asparaginska kiselina (Asp ili D), cistein (Cys ili C), glutamin (Gln ili Q), glutaminska kiselina (Glu ili E), glicin (Gly ili G), histidin (His ili H), izoleucin (Ile ili I), leucin (Leu ili L), lizin (Lys ili K), metionin (Met ili M), fenilalanin (Phe ili F), prolin (Pro ili P), serin (Ser ili S), treonin (Thr ili T), triptofan (Trp ili W), tirozin (Tyr ili Y) i valin (Val ili V).

Funkcionalni ekvivalenti peptida izuma su proteinske molekule koje se na isti način, no ne nužno u istoj količini vežu na humani P-selektin, a to mogu biti npr. modificirani peptidi, peptoidi, peptidni analozi ili peptidomimetici.

Modificirani peptidi su molekule dobivene iz peptida uvođenjem supstituenata ili funkcionalnih skupina koje nisu prisutne u aminokiselinama koje se javljaju u prirodi. Termin također uključuje spojeve dobivene reakcijom peptida s molekulama ostalih kemijskih kategorija, bez obzira da li se te molekule javljaju u prirodi ili ne. Na primjer, biotinizirani

peptidi, glikoproteini i lipoproteini često se javljaju u prirodi, dok su peptidi modificirani polietilen-glikolom, kao što je pegilirani interferon α -2b (Peg-Intron®) primjeri kemijski modificiranih peptida koji su osmišljeni da mijenjaju neka, no ne sva svojstva peptida.

- 5 Peptidoidi su kao i peptidi amidi dvije ili više aminokiselina. Oni se često ne dobivaju direktno iz aminokiselina koje se javljaju u prirodi, već iz različitih vrsta kemijski sintetiziranih L- ili D-aminokiselina.

Peptidomimetici su spojevi koji su u svojim funkcionalnim strukturama više ili manje slični peptidima, no u okosnici također mogu sadržavati nepeptidne veze ili D-aminokiseline. Općenito, peptidomimetici služe kao supstituenti nativnih peptida u interakciji s receptorima ili enzimima ("Pharmaceutical Biotechnology", Ed. D.J.A. Crommelin i R.D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, str. 138). Pseudopeptidi pripadaju u skupinu peptidomimetika i predstavljaju spojeve koji umjesto amidnih veza sadrže izostere amidnih veza (*ibid.*, str 137-140).

15 Spojevi izuma također uključuju soli peptida ili funkcionalnih ekvivalenata, kao što su farmaceutski prihvatljive kiselinske ili bazne adicijske soli. Također mogu obuhvaćati multimere peptida ili funkcionalnih ekvivalenata.

20 Spojevi izuma su okarakterizirani time što sadrže slijed $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$, pri čemu je A_1 D- ili L- cistein (C), D- ili L- metionin (M) ili D- ili L- valin (V) ili njihov analog; A_2 je D- ili L-asparaginska kiselina (D) ili njen analog; A_3 je D- ili L-fenilalanin (F), D- ili L-tirozin (Y) ili D- ili L-triptofan (W) ili njihov analog; A_x je D- ili L-aminokiselina, i pri čemu X označava N-terminus navedenog slijeda, a Y C-terminus navedenog slijeda ili pri čemu X i Y zajedno mogu formirati ciklički sustav. Točnije, X je vodik ili ostatak koji sadrži 1-6 D- ili L-aminokiselina; Y je hidroksil ili ostatak koji sadrži 1-11 D- ili L-aminokiselina koje završavaju hidroksilom.

25 Prema izumu, unutar slijeda su neovisno odabrane dvije jedinice A_1 ; one mogu biti identične ili različite jedna od druge. Preferirano, najmanje jedna A_1 jedinica predstavlja valin (V). Više preferirano, obje A_1 jedinice predstavljaju valin (V). U drugom ostvarenju, A_1 je analog ili mimetik cisteina (C), metionina (M) ili valina (V). Stručnjacima su poznati postupci odabira prikladnih analoga ili mimetika aminokiselina koje se javljaju u prirodi. Na primjer, u pseudopeptidnom pristupu nastoji se postići veća kemijska ili enzimska stabilnost peptida uz zadržavanje njegove bioktivnosti. Peptidne veze koje su podložne brzom degradaciji *in vivo*, zamjenjuju se ostalim funkcionalnim skupinama za stvaranje bioizostera ili surogata amidnih veza. Primjeri bioizosteričkih skupina su N-metil-amida skupina, tioesterska skupina, tioamidna skupina, ketometilenska skupina, metilenamino-skupina, retroinverzna amidna skupina, metilendio-skupina i metilenoksi-skupina (*ibid.*, str. 138-139). U pristupu za poboljšanje selektivnosti peptida u okosnicu se uvode konformacijska iskrivljenja kojima se smanjuje broj potencijalnih receptorskih ili enzimskih interakcija. Iskrivljena se najčešće postižu uvođenjem dvostrukih veza ugljik-ugljik (olefinski analozi) i prstenastih struktura (*ibid.*). Slijedeća metoda za identifikaciju analoga koji oponašaju funkcionalne strukture aminokiselina, kao što su cistein (C), metionin (M) ili valin (V) je kompjutersko modeliranje. Preferirane mimetičke strukture posjeduju ograničen naboj ili elektronegativnosti, hidrofobnosti i prostorne orijentacije kao i navedene aminokiseline. U drugom ostvarenju, jedna ili obje A_1 jedinice su D-aminokiselinski analozi cisteina (C), metionina (M) ili valina (V).

40 Kao što je navedeno, prisutni izum također obuhvaća i funkcionalne ekvivalente navedenih peptida. Ekvivalenti se mogu, između ostalog, naći aminokiselinskom supstitucijom uz upotrebu konzervativnih aminokiselinskih zamjena. Prisutni izum također obuhvaća metodu za određivanje da li je spoj sposoban vezati se na humani P-selektin, što obuhvaća supstituciju aminokiselina konzervativnom aminokiselinom u spoju prema izumu i određivanje da li je dobiveni spoj sposoban vezati se na humani P-selektin. U tom smislu, otkriveno je, što je također dio prisutnog izuma, da određeni aminokiselinski sastav peptida postaje - barem za aminokiseline A_2 i A_3 - nešto manje presudan uz povećanje broja aminokiselina u peptidu. Na primjer, otkriveno je da je peptid koji sadrži više od 10, a preferirano više od 12 aminokiselina i koji kao A_3 sadrži fenilalanin (F) umjesto triptofana (W), sposoban specifično se vezati na humani P-selektin. Štoviše, kada peptid sadrži 6 aminokiselina, navedena supstitucija triptofana fenilalaninom ne dovodi do specifičnog vezanja peptida. Slijedeći primjer ekvivalenta u skladu s prisutnim izumom je peptid koji sadrži aminokiselinski slijed $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ i 15 aminokiselina, a na položaju A_2 je asparaginska kiselina (D) supstituirana glutaminskom kiselinom (E) i koji se također specifično veže na humani P-selektin. Kada se peptidni lanac sastoji od samo 6 aminokiselina, ista supstitucija ne dovodi do specifičnog vezanja peptida. Na primjer, slijed EWVEVA ima afinitet vezanja od 1,600 μ M, dok 15-mer koji sadrži navedeni slijed ima afinitet vezanja manji od 10 μ M. Pretpostavlja se da utjecaj duljine peptida povezan s konformacijom peptida, što pak ima utjecaj na sposobnost vezanja. Kada su peptidi prisutnog izuma najmanje dekameri ili preferirano, najmanje dodekameri, A_3 i A_2 mogu predstavljati F, odnosno E.

60 Prema izumu, A_2 je D- ili L-aminokiselina čiji je ogranak pod utjecajem otapala pri fiziološkom pH negativno nabijen, odabrana iz skupine koja se sastoji od asparaginske kiseline (D) i glutaminske kiseline (E) ili njen analog ili mimetik. U preferiranim ostvarenjima, A_2 je ili L-glutaminska kiselina (E) ili L-asparaginska kiselina (D). U ostalim ostvarenjima, A_2 je analogna struktura slična asparaginskoj kiselini (D) ili glutaminskoj kiselini (E). Za identifikaciju odgovarajućih analoga, primjenjuju se principi isti onima koji su objašnjeni s obzirom na A_1 .

A_3 je D- ili L-aminokiselina sa aromatskim ogrankom odabrana iz skupine koja se sastoji od fenilalanina (F), tirozina (Y) i triptofana (W) ili njen analog ili mimetik. Više preferirano, A_3 je L-aminokiselina odabrana iz te skupine. Najviše preferirano, triptofan. U ostalim ostvarenjima, A_3 je analogna struktura slična fenilalaninu (F), tirozinu (Y) ili triptofanu (W), kao što je ranije definirano.

A_x može biti bilo koja D- ili L-aminokiselina ili njen analog ili mimetik. Potrebna je prisutnost A_x , jer je otkriveno da se spojevi bez A_x općenito slabo vežu na P-selektin u usporedbi sa sličnim spojevima koji A_x sadrže. U jednom od preferiranih ostvarenja, A_x je D- ili L-aminokiselina odabrana iz skupine koja se sastoji od asparaginske kiseline (D) i glutaminske kiseline (E) ili njen analog ili mimetik. U tom ostvarenju, karakteristike A_x nalikuju karakteristikama A_2 ; taj se spoj može definirati time što sadrži slijed $XA_2A_3A_1A_2A_1Y$. Treba se naznačiti da su 2 jedinice A_2 (kao i 2 jedinice A_1) neovisno odabrane, tj. mogu biti identične ili različite jedna od druge.

X se definira kao bilo koja N-terminalna skupina ili slijed. Na primjer, X jednostavno može biti vodik. Više preferirano, X je slijed jedne ili više aminokiselina ili njihovog analoga ili mimetika. U jednom od preferiranih ostvarenja, X sadrži najmanje dvije aminokiseline. Više preferirano, X sadrži valin (V), preferirano vezan na A_x preko razmaknice koja se sastoji od jedne druge aminokiseline.

Y se definira kao bilo koja C-terminalna skupina ili slijed. Ako Y ne sadrži aminokiseline ili analoge C-terminalna skupina može biti hidroksilna skupina. U preferiranom ostvarenju, Y je slijed do oko pet aminokiselinskih jedinica. Također se preferira da je u Y prisutna barem jedna aminokiselina s negativno nabijenim ogrankom, preferirano odvojena od preostalog slijeda $XA_xA_3A_1A_2A_1$ jednom do tri aminokiseline. Prepoznavanje P-selektinom tolerantnije je na supstituente na C-terminusu nego na supstituente na N-terminusu. Stručnjak na tom području je kompetentan naći prikladne aminokiseline.

Spojevi izuma imaju cikličku ili drugačije iskrivljenu okosnicu. U tom slučaju $X+Y$ zajedno mogu biti prikladno povezani preko cys-cys veze, iako mogu biti prisutni i ostali tipovi (kemijskih) veza, kao što su amidna veza, tioeterska veza, karbamatna veza ili esterska veza.

Duljina skupine $X+Y$ nije toliko presudna dok god P-selektin prepoznaje središnji slijed. Općenito, minimalna duljina $X+Y$ podudara se s duljinom 5-6 aminokiselina.

U jednom od svojih ostvarenja, izum osigurava spojeve koji uz ranije prikazane strukturne karakteristike na C-terminusu ili N-terminusu posjeduju jedinicu A_4 , pri čemu je A_4 D- ili L-aminokiselina sa hidrofilnim ogrankom ili njen analog ili mimetik. Preferirano, A_4 je serin (S), glicin (G), lizin (K), arginin (R) ili glutaminska kiselina (E). Najviše preferirani je serin (S). Preferirani položaj za A_4 je između Y i preostalog dijela slijeda, kao što predstavljaju slijedovi $XA_xA_3A_1A_2A_1A_4Y$ i $XA_2A_3A_1A_2A_1A_4Y$.

Spojevi izuma imaju linearne, razgranate, cikličke ili iskrivljene okosnice. Na primjer, peptidi ili funkcionalni ekvivalenti s najmanje dvije cisteinske (C) jedinice mogu se ciklizirati oksidacijom. Ako spoj ciklizira putem disulfidne veze, preferirano je da su cisteinske jedinice koje sudjeluju u vezanju članovi X, odnosno Y. Cikličke strukture su zapravo primjer konformacijski iskrivljenih okosnica. Da se smanji konformacijska fleksibilnost spojeva također mogu biti uvedene i druge vrste iskrivljenih struktura. Pogotovo prisutnost olefinskih veza ili malih prstenastih struktura služi toj svrsi. Primjeri takvih iskrivljenja dani su u "Pharmaceutical Biotechnology", Ed. D.J.A. Crommelin i R.D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, str. 139f.

U jednom od preferiranih ostvarenja, spojevi izuma su multimeri peptida ili funkcionalnih ekvivalenata. Multimeri koji se u kemiji peptida također nazivaju i oligomeri, odnose se na peptide, proteine, peptoidne, peptidomimetike ili njihove analoge, te su uključeni u peptidne lance. Na primjer, tetrameri biotiniliranih peptida koji sadrže slijed $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ posjeduju znatno veći afinitet prema P-selektinu nego peptidi od kojih se sastoje. Preferirani multimeri izuma imaju konstantu afiniteta za P-selektin ispod 1/20, te pogotovo ispod 1/100 konstante afiniteta odgovarajućih peptida.

U drugom tipu multimera koji se može osmisliti za formiranje spojeva izuma, pojedini peptid ili peptidni lanci spojeni su s biokompatibilnim proteinom, kao što su humani serumski albumin, humanizirana antitijela, liposomi, micele, sintetički polimeri, nanočestice i fagi. Multimeri također mogu predstavljati peptidne slijedove koji su međusobno serijski spojeni putem razmaknica tj. konkatamera, dendrimera ili klastera.

Spojevi se općenito mogu pripremiti prema poznatim metodama pripreme peptida i sličnih tvari. Manji spojevi koji sadrže svega nekoliko aminokiselina ili sličnih jedinica, te preferirano ne više od 30-50 jedinica, mogu se pripremiti postupcima kemijske ili enzimске ligacije, upotrebom klasičnog pristupa u kojem se reakcije odvijaju u otopini ili suspenziji ili pak primjenom modernijeg pristupa krute faze u kojem se peptid sastavlja dok je pričvršćen na krutoj površini, kao što je polimerno zrnice. Veći spojevi uobičajeno se sintetiziraju pomoću automatskih sintetizatora peptida na krutoj fazi.

Alternativno, spojevi se mogu pripremiti poznatim tehnikama genetskog inženjeringa. Taj pristup je posebno opravdan ako je spoj peptid ili neznatno modificirani peptid. Na primjer, DNA slijed koji kodira spoj može se povezati ili spojiti s ekspresijskim vektorom koji je sposoban transfekirati stanice. U drugom koraku metode, stanice domaćina ili ciljane stanice transfekiraju se navedenom DNA doticajem stanica s vektorom i DNA koja je povezana s vektorom pod uvjetima koji dopuštaju transfekciju. U slijedećem koraku se stanice domaćina i ciljane stanice uzgajaju pod uvjetima koji dopuštaju ekspresiju spoja. Zatim se spoj može izolirati. Ako se spoj ne može kodirati ili eksprimirati, no vrlo je sličan peptidu koji to može, metoda se može primijeniti za pripremu takvog peptida, uz jedan ili više koraka u kojima se peptid modificira kemijskim ili enzimskim postupcima.

U tu se svrhu mogu upotrijebiti različite vrste vektora, kao što su virusni vektori, lipopleksi, polipleksi, mikrosfere, nanosfere, dendrimeri, ogoljela DNA, sustavi isporuke peptida, lipidi, pogotovo kationski lipidi ili iz njih dobiveni liposomi, polimerni vektori, pogotovo oni koji su dobiveni iz polikationskih polimera. Među preferiranim virusnim vektorima nalaze se retrovirusi, adenovirusi, herpes simplex virusi i virosomi. Preferirani nevirusni vektori obuhvaćaju kitosan, SPLP, polimerne sustave koji se baziraju na PLGA, polietilenimine, polilizine, polifosfoamidate, poli(met)akrilate, polifosfazene, DOPE, DOTA i DOTMA.

Neki opsežniji sažeci metoda koje se mogu primijeniti u pripremi spojeva opisani su u:

W.F. Anderson, Nature 392 Supp., 30. travanj 1998, str. 25-30; "Pharmaceutical Biotechnology", Ed. D.J.A. Crommelin i R.D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, str. 53-70, 167-180, 123-152, 8-20; "Protein Synthesis: Methods and Protocols", Ed. R. Martin, Humana Press, 1988, str. 1-442; "Solid-Phase Peptide Synthesis", Ed. G. B. Fields, Academic Press, 1997, str. 1-780; "Amino Acid and Peptide Synthesis", Oxford University Press, 1997, str. 1-89.

Soli peptida ili funkcionalnih ekvivalenata pripremaju se poznatim metodama koje uobičajeno uključuju mješanje peptida ili peptoida sa farmaceutski prihvatljivom kiselinom za dobivanje kiselinske adicijske soli ili pak sa farmaceutski prihvatljivom bazom za dobivanje bazne adicijske soli. Stručnjak može lako odrediti da li je određena kiselina ili baza farmaceutski prihvatljiva uzimajući u obzir specifičnu upotrebu spoja. Na primjer, ne mogu se sve kiseline ili baze koje su prihvatljive za *in vitro* dijagnostičke pripreme upotrijebiti za terapijske pripreme. Ovisno o namjenjenoj upotrebi, farmaceutski prihvatljive kiseline obuhvaćaju organske i anorganske kiseline, kao što su mravlja kiselina, octena kiselina, propionska kiselina, mliječna kiselina, glikolna kiselina, oksalna kiselina, piruvatna kiselina, sukcinatna kiselina, maleinska kiselina, malonska kiselina, cimetna kiselina, sulfatna kiselina, kloridna kiselina, bromidna kiselina, nitrarna kiselina, perkloratna kiselina, fosfatna kiselina i tiocijanatna kiselina koje sa slobodnim amino-skupinama peptida i funkcionalnih ekvivalenata tvore amonijeve soli. Farmaceutski prihvatljive baze koje sa slobodnim karboksilnim skupinama peptida i funkcionalnih ekvivalenata tvore karbokatne soli, obuhvaćaju etilamin, metilamin, dimetilamin, trietilamin, izopropilamin, diizopropilamin i ostale mono-, di- ili trialkilamine, te arilamine. Nadalje, također su obuhvaćeni i farmaceutski prihvatljivi solvati, kompleksi ili adukti, kao što su hidrati ili eturati.

Multimeri se na primjer, mogu pripremiti biotiniziranjem N-terminusa peptida ili peptoidnog lanca, a zatim kompleksiranjem sa streptavidinom. Budući da je streptavidin u mogućnosti vezati 4 biotinske molekule ili konjugata s visokim afinitetom, tom se metodom mogu formirati vrlo stabilni terterni peptidni kompleksi. Multimeri se mogu sastojati od identičnih ili različitih peptida ili funkcionalnih ekvivalenata. Preferirano, multimeri izuma sastoje se od više identičnih peptida ili funkcionalnih ekvivalenata.

Slijedeći aspekt izuma odnosi se na upotrebe otkrivenih spojeva. Budući da se spojevi selektivno vežu na P-selektin, ovisno o tipu interakcije s P-selektinom nakon vezanja, mogu djelovati kao antagonisti, parcijalni antagonisti ili kao ciljajuća sredstva za ciljanje konjugiranih tvari na stanicama ili tkivima gdje dolazi do ekspresije P-selektina. Stoga se spojevi pogodno mogu upotrijebiti u farmaceutskim pripravcima. Prema izumu, osigurani su i farmaceutski pripravci.

Termin "farmaceutski pripravak" odnosi se na terapijske ili dijagnostičke pripreme, kao i na lijekove i dijagnostike koji takav pripravak sadrže. Terapijski pripravci i lijekovi koriste se za prevenciju ili liječenje bolesti i ostalih stanja sisavaca. Dijagnostici ili dijagnostički pripravci koriste se u dijagnozi takvih bolesti *in vivo* i *in vitro*.

Preferirana upotreba spojeva je za pripremu terapijskih pripravaka ili lijekova za sprečavanje ili poboljšanje bolesti i stanja koja uključuju adheziju leukocita, kao što su monociti ili neutrofili, na vaskularni endotelij i trombocite, uz nakupljanje trombocita. Spojevi se također mogu upotrijebiti u pripravcima za liječenje bolesti u kojima je poželjna inhibicija intracelularnog signala kojim posreduje P-selektin.

Na primjer, pripravci koji sadrže jedan ili više spojeva izuma pridonose kontroliranju upalnih procesa kojima posreduju leukociti. Poznato je da aktivirani leukociti otpuštaju toksične molekule koje mogu oštetiti zdravo tkivo. Takve upalne reakcije od kojih neke obuhvaćaju trombocitnu aktivaciju kojom također posreduje P-selektin, dio su teških patoloških stanja kao što su odbacivanje transplantata, hladna ishemija, hemoragični šok, septički šok, tumorske metastaze, kronična upala, reumatoidni artritis, upalna bolest crijeva, ateroskleroza, restenoza, angiogeneza, proširena intravaskularna koagulacija, respiratorni stresni sindrom kod odraslih, cirkulacijski šok, teška traumatska ozljeda mozga,

relapsirajuće-remitirajući oblik multiple skleroze, okluzija cerebralne arterije, ishemija, moždani udar, akutni miokardijalni infarkt, ozljeda arterije npr. izazvana angioplastikom i miokardijalna ishemija, bubrežna ozljeda kod ishemije i reperfuzije, te zatajenje bubrega.

- 5 U drugom ostvarenju, spojevi se koriste u pripravi dijagnostičkih pripravaka ili produkata. Takvi se pripravci kao markeri navedenih bolesti i stanja mogu upotrijebiti kod *in vitro* ispitivanja za kvantitativno određivanje koncentracija P-selektina u tjelesnim tekućinama. Oni se također mogu upotrijebiti u postupcima dobivanja dijagnostičkih slika kod praćenja ateroskleroze kojom posreduje P-selektin, aneurizmi, restenoze koja proizlazi iz perkutane transluminalne koronarne angioplastike (post-PTCA restenoza) i ostalih stanja odabranih između onih u kojima se mobilizira P-selektin. Prema izboru, spoj prema izumu može se konjugirati s kelatorom koji se zatim kompleksira s izotropnim markerom koji se može detektirati odabranim sistemom praćenja.

- 15 Slijedeća upotreba spojeva je u istraživanjima. Na primjer, mogu se upotrebljavati za ispitivanje afiniteta vezanja molekula na P-selektin ili funkcionalne ekvivalente P-selektina. Kod provođenja ove metode P-selektin ili funkcionalni ekvivalent P-selektina dolazi u kontakt, uz inkubaciju, s molekulom čiji se afinitet vezanja ispituje, te sa spojem izuma. Slabije vezanje spoja izuma indicirat će afinitet molekule na P-selektin.

- 20 Izumitelji su također pronašli da P-selektin mogu pocijepati članovi obitelji kalpaina koji se javljaju u prirodi. Zanimljivo, čini se da su neke proteaze iz obitelji kalpaina samo prirodne polipeptidne strukture koje sadrže jedan od preferiranih slijedova spojeva izuma, EWVDV. Prejaka aktivacija kalpaina 1 i kalpaina 2 je najvjerojatnije povezana s neurološkim poremećajima, kao što su Alzheimerova bolest, traumatska ozljeda mozga, moždani udar i očne mrene. Aktivnost kalpaina 3 može se vezati uz neke tipove mišićne distrofije, kalpaina 9 uz karcinom želuca, dok se smatra da kalpain 8 i kalpain 10 imaju ulogu u tipu 2 diabetes mellitus. Drugi aspekti utjecaja kalpaina na različite bolesti ljudi opisuju Y. Huang i K. Wang u revijskom članku "The calpain family and human disease", Trends Mol. Med. 7, 355-362, 2001, koji je ovdje inkorporiran referencom.

- 25 Nadalje, otkriveno je spojevi izuma mogu inhibirati cijepanje L-selektina i P-selektina koje inducira kalpain, uz mnogo veći afinitet - ubičajeno otprilike 100 puta većim - za P-selektin. S gledišta mehanizma, time se sugerira da je kalpain uključen u aktivaciju selektina. Točnije, odbacivanje selektina s površina stanica gdje dolazi do njegove ekspresije može uzrokovati kalpain. Posljedično, spojevi izuma korisni su za bilo koju primjenu u kojoj je poželjno inhibirati interakciju između P-selektina i kalpaina.

- 30 Spojevi se u farmaceutskim pripravcima također mogu upotrijebiti i kao ciljajuće molekule ili konjugati za ciljanje lijekova ili genetskog materijala na tkivima gdje dolazi do ekspresije P-selektina. Kao konjugati, spojevi se mogu direktno spojiti s aktivnim molekulama ili nukleinskim kiselinama koje se usmjeravaju na takva tkiva. Alternativno, mogu se inkorporirati ili pričvrstiti na površinu liposoma ili ostalih lipidnih mjehurića, emulzijskih kapljica, polimera, nano- ili mikročestica da bi se dobio ciljani prenosnik za lijekove ili genetski materijal koji se usmjerava na tkivo gdje dolazi do ekspresije P-selektina.

- 40 Farmaceutski pripravci preferirano sadrže jedan ili više spojeva s afinitetom prema P-selektinu i najmanje jedan nosač ili ekscipijent. Nosač ili ekscipijent je bilo koja farmaceutski prihvatljiva tvar ili smjesa tvari bez značajne farmaceutske aktivnosti, koja se može upotrijebiti kao prenosnik ili kao pomoćna tvar za formuliranje spoja u stabilnom i lako primjenjivom obliku doziranja. Primjeri farmaceutski prihvatljivih ekscipijenata nalaze se u monografijama svih važnih farmakopeja.

- 45 U jednom ostvarenju, pripravak se formulira i proizvodi za parenteralnu injekciju, preferirano intravaskularnu injekciju, kao što su intramuskularni, potkožni, intralezionalni, intraarterijski i drugi putovi parenteralne primjene. Da bi pripravili pripravke za navedene putove primjene stručnjacima će poslužiti isti principi koji određuju formulaciju drugih lijekova. Na primjer, jedan od uvjeta parenteralnih oblika doziranja je njihova sterilnost. Ostali uvjeti opisani su u svim važnim farmakopejama, npr. u USP 24, u monografiji "General Requirements for Tests and Assay. 1. Injections", str. 1775-1777. Za povećavanje stabilnosti parenteralne formulacije, može biti neophodno osigurati suhi oblik doziranja koji se mora rekonstituirati prije primjene. Primjer takvog oblika doziranja je sušenje smrzanjem ili liofilizirana formulacija.

- 55 Poželjno je spoj izuma primijeniti kao parenteralni oblik doziranja s kontroliranim otpuštanjem da se izbjegnju česte injekcije i da se poboljša efikasnost i prikladnost terapije. Poznate su različite metode za pripravu takvih formulacija. Produženo otpuštanje može se osigurati krutim implantantima, nanočesticama, nanokapsulama, mikročesticama, mikrokapsulama, emulzijama, suspenzijama, uljnim otopinama, liposomima i sličnim strukturama.

- 60 Ekscipijenti koji su posebno korisni za pripravu parenteralnih formulacija su otapala, kootapala, te tekući ili polukruti nosači, kao što su sterilna voda, etanol, glicerol, propilen-glikol, polietilen-glikol, butandiol, masna ulja, kratko- i dugolančani trigliceridi, lecitin, polioksietilenski derivati ricinusovog ulja; tvari za podešavanje koncentracije i pH, kao

što su šećeri, pogotovo glukoza, šećerni alkoholni, pogotovo manitol, natrijev klorid, natrijev karbonat, limunska kiselina, acetat, fosfat, fosfatna kiselina, kloridna kiselina, natrijev hidroksid itd.; stabilizatori, antioksidansi i konzervansi, kao što su askorbinska kiselina, natrijev sulfat ili natrijev hidrosulfat, EDTA, benzilni alkohol, itd.; ostali ekscipijenti i tvari koji podupiru liofilizaciju, kao što su albumin, dekstran, itd.

Alternativno, farmaceutski pripravci mogu biti osmišljeni za oralnu primjenu i proizvoditi se na taj način. Prikladni oralni oblici doziranja uključuju tablete, tvrde kapsule, meke kapsule, praške, granule, oblike doziranja koji se razgrađuju u ustima, sirupe, kapi, suspenzije, pjenušave tablete, tablete za žvakanje, oralne filmove, liofilizirane oblike doziranja, oblike doziranja s kontinuiranim otpuštanjem, oblike doziranja s kontroliranim otpuštanjem. U jednom od preferiranih ostvarenja, oralni oblik doziranja je ovijeni kruti oblik doziranja da se osigura zaštita spoja od kiselih i proteolitičkih uvjeta u želucu.

Spoj izuma može se također pogodno primijeniti i u transmukoznom obliku doziranja. Taj način primjene nije invazivan i ne šteti pacijentu; istovremeno može dovesti do poboljšane biodostupnosti spoja u usporedbi s oralnom primjenom, posebno ako spoj nije stabilan u tekućinama probavnog sustava ili ako je prevelik da bi se djelotvorno apsorbirao iz crijeva. Transmukozna primjena moguća je, na primjer, putem nazalnih, bukalnih, sublingvalnih, gingivalnih ili vaginalnih oblika doziranja. Takvi oblici doziranja mogu se pripremiti poznatim postupcima; mogu biti formulirani kao nazalne kapi ili sprejevi, umeci, filmovi, flasteri, gelovi, pomasti ili tablete. Preferirano, ekscipijenti koji se koriste za transmukozni oblik doziranja uključuju jednu ili više tvari koje osiguravaju prijanjanje na sluznicu čime se produžuje vrijeme doticaja oblika doziranja s mjestom apsorpcije i potencijalno povećava apsorpcija.

U drugom ostvarenju, spojevi se primjenjuju pulmološkim putem, upotrebom inhalatora s odmjerenom inhalacijskom dozom, raspršivača, aerosolnog spreja ili inhalatora sa suhim prahom. Prikladne formulacije mogu se pripremiti poznatim metodama i postupcima. U nekim slučajevima također je moguća i transdermalna, rektalna ili okularna primjena.

Za djelotvorniju isporuku spoja izuma mogu se povoljno upotrijebiti napredne metode isporuke lijekova ili metode ciljanja. Na primjer, ako je odabran neparenteralni put primjene, odgovarajući oblik doziranja može sadržavati agens za povećavanje biodostupnosti koji može biti bilo koja tvar ili smjesa tvari koja povećava dostupnost spoja. To se može postići zaštićivanjem spoja od degradacije, npr. enzimskim inhibitorima ili antioksidansima. Više preferirano, agens povećava biodostupnost spoja povećavajući permeabilnost apsorpcijske barijere tj. sluznice. Agensi za povećanje propusnosti mogu djelovati putem različitih mehanizama: neki povećavaju fluidnost mukoznih membrana, dok drugi otvaraju ili proširuju pukotine između dodirnih točaka mukoznih stanica. Neki pak smanjuju viskoznost sluznice prekrivajući sloj mukoznih stanica. Među preferiranim agensima koji povećavaju biodostupnost nalaze se amfifilne tvari, kao što su derivati kolne kiseline, fosfolipidi, etanol, masne kiseline, oleinska kiselina, derivati masne kiseline, EDTA, karbomeri, polikarbofil i kitosan.

U sljedećem aspektu, molekule sposobne vezati se na ranije navedene spojeve nalaze se unutar područja izuma. Na primjer, za pripremu specifičnih monoklonalnih antitijela na spoju može se primijeniti standardna hibridizacijska tehnologija. Za osmišljavanje i pripremu manjih molekula koje su sposobne vezati se na spoj izuma dostupne su druge tehnike.

Namjera je sljedećih primjera dodatno objasniti izum, no ne ograničiti područje izuma na prisutna ostvarenja.

Primjer 1:

Sljedeći peptidi su sintetizirani pomoću automatskih sintetizatora peptida na krutoj fazi standardnom Fmoc kemijom, upotrebom smjese HBTU/HOBt kao agensa za aktivaciju:

	...A _x A ₃ A ₁ A ₂ A ₁ ...																			
TM1:				C	P	E	F	V	D	V	E	G	D	P	G	A	L	L	A	C
TM2:					C	G	W	V	D	V	I	A	S	G	D	T	A	T	L	A
TM11:			C	D	V	E	W	V	D	V	S	S	L	E	W	D	L	P	C	
TM16:				C	P	D	W	V	D	V	F	K	L	V	E	G	V	M	L	C
TM17:			C	L	M	G	C	W	C	D	V	G	V	G	G	E	S	L	C	
SH31:	V	G	L	D	P	R	D	W	V	D	V	S	D	Y	A					
SH32:							D	W	V	D	V	R	E	V	L	T	G	E	Q	R
A17:				C	D	V	E	W	V	D	V	S	C							
A18:				C	D	V	E	W	V	D	V	S								
A19:					D	V	E	W	V	D	V	S								
A27:					D	V	E	W	V	D	V	A								

Peptidi su biotinilirani konjugacijom Ahx karike na N-terminus svakog peptidnog slijeda i kasnijim spajanjem konjugata na biotin. TM11 je također pripremljen u cikličkoj konfiguraciji oksidacijom, uz stvaranje disulfidne veze između N- i C-terminalnih cisteina. TM11 i SH31 tetrameri dobiveni su inkubacijom 10 μ M streptavidina s biotiniliranim peptidom u molarnom omjeru 1:4, dva sata pri sobnoj temperaturi (RT). Količina peptida provjerena je masenom spektroskopijom i HPLC-om.

Afinitet spojeva prema P-selektinu ispitan je upotrebom prilagođene ELISA metode. Streptavidin-peroksidaza (peroksidaza iz hrena) (strepPO) inkubirana je sa TM11-biotinom u molarnom omjeru 1:4, dva sata pri sobnoj temperaturi, nakon čega je došlo do stvaranja tetramernog peptidnog strepPO-kompleksa. Mikrotitarske jažice premazane su kimernim humanim P-selektinom, kao što je opisano kod izolacije faga koji veže P-selektin. Jažice su zatim inkubirane jedan sat sa 2,5 nM TM11-strepPO kompleksa u puferu za određivanje pri 4°C, u prisutnosti istitriranih količina peptida za dovršetak vezanja na humani P-selektin. Linearni spojevi su testirani u prisutnosti DDT da se spriječi nastajanje nakupina. Nakon što su jažice isprane puferom za određivanje 6 puta, inkubirane su s 100 μ L smjese TBM/H₂O₂ 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom 1M H₂SO₄, te je očitana apsorbanacija pri 450 nm. Iz rezultata su izračunate konstante afiniteta:

	Afinitet
Biotin-TM1:	82 μ M
Biotin-TM2:	49 μ M
Biotin-TM11:	2 μ M
Biotin-TM11 (ciklički):	2 μ M
Biotin-TM16:	12 μ M
Biotin-TM17:	7 μ M
Biotin-SH31:	19 μ M
Biotin-A17:	0,1 μ M
Biotin -A19:	12 μ M
Tetramerni TM11:	10,7 nM
Tetramerni SH31:	61,3 nM

Afinitet spojeva potvrđen je određivanjem stanične adhezije u kojem su jajne stanice kineskih hrčaka koje ekspiriraju humani P-selektin inkubirane sa HL60 stanicama koje ekspiriraju PSLG-1 u prisutnosti istitrirane količine spojeva.

Primjer 2 (usporedni primjer):

Slijedeći spojevi pripremljeni su kao i u primjeru 1, te je ispitan njihov afinitet prema humanom P-selektinu. Treba napomenuti da iako se smatra da su spojevi vrlo slični spojevima primjera 1, ne zadovoljavaju potpuno strukturne uvjete zahtjeva 1 i zato nisu spojevi prema izumu.

								Afinitet [μ M]
D	V	E	A	V	D	V	S	400,000
D	V	E	W	A	D	V	S	1,400
D	V	E	W	V	A	V	S	21,000
D	V	E	W	V	D	A	S	13,000
		E	W	V	K	V	A	13,000

Primjer 3: Inhibicija nakupljanja trombocita

Slijedeći spojevi pripremljeni su prema primjeru 1, te je ispitan njihov učinak na inhibiciju nakupljanja trombocita.

Humani trombociti aktivirani su s ADV, a zatim je izmjeren stupanj nakupljanja trombocita u prisutnosti ili odsutnosti peptida koji sadrže EWVDV. Pokazalo se da DVEWVDVS (A19) i CDVEWVDVSC (A17) značajno oslabljuju drugu fazu nakupljanja trombocita, uz agregaciju smanjenu s oko 45%, odnosno 25%.

Primjer 4: Interakcija spojeva sa sulfatidnim liposomima

Slijedeći spojevi pripremljeni su kao što je opisano u primjeru 1, te je ispitana njihova interakcija s liposomima koji sadrže 22% sulfatida. Treba napomenuti da je interakcija spojeva sa sulfatidima dodatni i alternativan aspekt aktivnosti spojeva izuma. Spojevi koji ne stupaju u interakciju sa sulfatidima i dalje mogu predstavljati spojeve izuma, dok god se vežu na P-selektin i sadrže konzensusni motiv kao što je definirano u zahtjevu 1.

Liposomi su pripremljeni iz fosfatidilkolina iz žumanjka jajeta, kolesterola i sulfatida otopljenih u smjesi kloroform/etanol (1:1, v/v), pri masenim omjerima 4:8:1,33, podvrgavanjem visokofrekventim zvučnim valovima.

Dodan je obilježeni [^3H]-kolesterol ($1,3 \times 10^8$ dpm) i smjesa je osušena pod protokom dušika. Dobiveni lipidni sloj promućkan je u PBS, a zatim je soniciran, čime su dobiveni liposomi srednjeg promjera čestica od 59-62 nm.

5 Fe-specifični kozji antihumani IgG inkubiran je u puferu za premazivanje (50 mM NaHCO_3 , pH 9,6) na pločici s 96 jažica. Slijedeći dan jažice su isprane puferom za određivanje (20 mM HEPES , 150 mM NaCl , 1 mM CaCl_2 , pH 7,4), te su inkubirane s puferom za blokiranje (3% BSA u puferu). Nakon ispiranja jažice su inkubirane sa humanim P-selektin-IgG, isprane, a zatim su ponovno inkubirane 2 sata s obilješnim [^3H]-kolesterolskim liposomima u prisutnosti ili odsutnosti niže navedenih spojeva i antitijela pri 4°C . Nakon uklanjanja nevezanih liposoma, vezani liposomi su sakupljeni i izbrojani pomoću scintilacijskog brojača.

10 Pronađeno je da su spojevi DVEWVDVS, DVEWVDVA, i CDVEWVDVSC, za razliku od spojeva DVEAVDVS i EWVDV, značajno inhibirani vezanjem sulfatida na P-selektin. Time se pokazuje da su bez obzira na ranije definirani središnji slijed, dva položaja asparaginske kiseline izvan središnjeg slijeda (D, podcrtano) značajna pojava učinkovite inhibicije sulfatida.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Spoj s afinitetom prema humanom P-selektinu, **naznačen time**, da sadrži peptid s aminokiselinskim slijedom $\text{XA}_x\text{A}_3\text{A}_1\text{A}_2\text{A}_1\text{Y}$ ili funkcionalni ekvivalent navedenog peptida, pri čemu:
 A_1 je D- ili L-cistein (C), D- ili L-metionin (M), D- ili L-valin (V) ili njihov analog ili mimetik;
 A_2 je D- ili L-asparaginska kiselina (D) ili njen analog ili mimetik;
 A_3 je D- ili L-fenilalanin (F), D- ili L-tirozin (Y), D- ili L-triptofan (W) ili njihov analog ili mimetik;
 A_x je D- ili L-aminokiselinski analog ili njegov mimetik;
 X označava N-terminus navedenog slijeda, Y označava C-terminus navedenog slijeda ili X i Y mogu zajedno formirati ciklički sustav.
2. Spoj prema zahtjevu 1, **naznačen time**, da navedeni slijed sadržava i aminokiselinu A_4 na N-terminalnom ili C-terminalnom kraju, pri čemu:
 A_4 je D- ili L-aminokiselina koji sadrži hidrofilni ogranak ili analog takve aminokiseline.
3. Spoj prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačen time**, da A_x predstavlja D- ili L-glutaminsku kiselinu (E) ili sadrži A_2 .
4. Spoj prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačen time**, da je A_1 valin (V).
5. Spoj prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, da je A_3 triptofan (W).
6. Spoj prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, da X sadrži najmanje dvije aminokiseline od kojih je jedna asparaginska kiselina (D).
7. Spoj prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, da sadrži cikličku ili iskrivljenu okosnicu.
8. Spoj prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, da sadrži najmanje dva navedena peptida ili njegove funkcionalne ekvivalente, navedeni spoj sadrži konstantu afiniteta za vezanje na P-selektin koja je manja od $1/20$, a preferirano manja od $1/100$ afiniteta jednog od navedenih peptida.
9. Metoda za pripremu spoja prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, da su aminokiselinski monomeri, aminokiselinski oligomeri ili mono- ili oligomeri aminokiselinskih analoga ili mimetika spojeni kemijskom ili enzimskom ligacijom koja se izvodi u tekućoj fazi i/ili na granici funkcionalizirane krute faze.
10. Metoda za pripremu spoja prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, da sadrži slijedeće korake:
 (a) spajanje slijeda nukleinskih kiselina koji kodira spoj ili peptid sličan spoju s vektorom koji je sposoban transfektirati stanice, kao što je virusni vektor, lipidni vektor ili polimerni vektor;
 (b) transfektiranje stanica domaćina vektorom i slijedom nukleinskih kiselina koji je s njim povezan;
 (c) uzgajanje navedenih stanica u uvjetima koji dopuštaju ekspresiju spoja ili peptida sličnog spoju;
 (d) izolacija spoja ili peptida sličnog spoju; i izborno,
 (e) modifikiranje peptida sličnog spoju za dobivanje spoja.
11. Metoda za pripremu spoja prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, da sadrži slijedeće korake:
 (a) spajanje slijeda nukleinskih kiselina koji kodira spoj ili peptid sličan spoju s vektorom koji je sposoban transfektirati stanice, kao što je virusni vektor, lipidni vektor ili polimerni vektor;
 (b) transfektiranje stanica domaćina vektorom i slijedom nukleinskih kiselina koji je s njim povezan, navedene stanice domaćina dio su živog ljudskog organizma.
12. Metoda za pripremu spoja prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, da sadrži slijedeće korake:
 (a) spajanje slijeda nukleinskih kiselina koji kodira spoj ili peptid sličan spoju s vektorom koji je sposoban transfektirati stanice, kao što je virusni vektor, lipidni vektor ili polimerni vektor;
 (b) transfektiranje stanica unutar živog ljudskog organizma vektorom i slijedom nukleinskih kiselina koji je s njim povezan.
13. Upotreba spoja prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, da se on koristi u liječenju ili dijagnostici.
14. Upotreba spoja prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, **naznačena time**, da se on koristi za proizvodnju lijekova za inhibiranje leukocitnog vezanja na trombocite i/ili endotelijalne stanice ili za inhibiciju interakcije između P-selektina i člana obitelji kalpaina.

15. Upotreba prema zahtjevu 13 ili 14, **naznačena time**, da se on koristi za proizvodnju lijekova za liječenje, prevenciju ili dijagnostiku kroničnih upalnih poremećaja, reumatoidnog artritisa, upalne bolesti crijeva, multiple skleroze, ateroskleroze, restenoze, ishemije, reperfuzijske ozljede uključujući zatajenje bubrega, tumorskih metastaza, bakterijske sepse, proširene intravaskularne koagulacije, respiratornog stresnog sindroma kod odraslih, moždanog udara, angiogeneze, odbacivanja transplantiranog organa, tromboze ili cirkulacijskog šoka.
16. Farmaceutski pripravak, **naznačen time**, da sadrži spoj prema bilo kojem od zahtjeva 1-8 i jedan ili više farmaceutski prihvatljivih nosača ili ekscipijenta.
17. Farmaceutski pripravak prema zahtjevu 16, **naznačen time**, da se formulira i proizvodi za parenteralnu primjenu, preferirano za intravaskularnu, intramuskularnu, potkožnu ili interlezijsku injekciju.
18. Farmaceutski pripravak prema zahtjevu 16, **naznačen time**, da se formulira i proizvodi za oralnu primjenu, preferirano u obliku tablete, kapsule, granule, crijevnog krutog oblika doziranja, krutog oblika doziranja koji osigurava kontinuirano ili kontrolirano otpuštanje ili oblika doziranja koji se razgrađuje u ustima.
19. Farmaceutski pripravak prema zahtjevu 16, **naznačen time**, da se formulira i proizvodi za transmukoznu primjenu, kao što je nazalna, bukalna, sublingvalna ili vaginalna primjena.
20. Farmaceutski pripravak prema zahtjevu 15, **naznačen time**, da se formulira i proizvodi za pulmoloznu primjenu preko inhalatora s odmjerenom inhalacijskom dozom, raspršivača, aerosolnog spreja ili inhalatora sa suhim prahom.
21. Farmaceutski pripravak prema bilo kojem od zahtjeva 16-20, **naznačen time**, da sadrži i agens za ciljanje lijeka i/ili agens za povećavanje biodostupnosti.
22. Metoda određivanja da li molekula sadrži afinitet vezanja prema P-selektinu, **naznačena time**, da obuhvaća doticaj P-selektina ili njegovog funkcionalnog ekvivalenta s navedenom molekulom i sa spojem prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, te da određuje da li se smanjuje vezanje navedenog spoja na navedeni P-selektin ili njegov funkcionalni analog.
23. Nukleinska kiselina koja kodira proteinske molekule, **naznačena time**, da sadrži aminokiselinski slijed $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ ili njegov funkcionalni ekvivalent, pri čemu:
 A_1 je D- ili L-cistein (C), metionin (M), valin (V) ili njihov analog ili mimetik;
 A_2 je D- ili L-asparaginska kiselina (D) ili njen analog ili mimetik;
 A_3 je D- ili L-fenilalanin (F), tirozin (Y), triptofan (W) ili njihov analog ili mimetik;
 A_x je D- ili L-aminokiselina;
X označava N-terminus navedenog slijeda, a Y označava C-terminus navedenog slijeda.
24. Nukleinska kiselina prema zahtjevu 23, **naznačena time**, da navedeni aminokiselinski slijed sadrži i aminokiselinu A_4 na N-terminalnom ili C-terminalnom kraju, pri čemu:
 A_4 je D- ili L-aminokiselina koja sadrži hidrofilni ogranak ili analog takve aminokiseline.
25. Upotreba aminokiseline prema zahtjevu 23 ili zahtjevu 24, **naznačena time**, da se ona upotrebljava za pripremu lijeka.
26. Prijenosnik u isporuci gena, **naznačen time**, da sadrži nukleinsku kiselinu prema zahtjevu 24 ili zahtjevu 25.
27. Vezna molekula, **naznačena time**, da je sposobna specifično vezati spoj prema bilo kojem od zahtjeva 1-8.
28. Vezna molekula prema zahtjevu 27, **naznačena time**, da sadrži antitijelo ili funkcionalni dio, derivat i/ili njegov analog.
29. Metoda određivanja da li je spoj sposoban vezati se na humani P-selektin, **naznačena time**, da obuhvaća zamjenu aminokiseline konzervativnom aminokiselinom u spoju prema bilo kojem od zahtjeva 1-8, te da određuje da li je dobiveni spoj sposoban vezati se na navedeni P-selektin.

SAŽETAK

- Prisutni izum odnosi se na spojeve koji se selektivno vežu na adhezijsku molekulu humanog P-selektina, te posebno na spojeve koji sadrže peptid s aminokiselinskim slijedom $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ ili funkcionalni ekvivalent navedenog peptida. Osim toga, izum se odnosi na metode pripreme takvih spojeva, na upotrebu takvih spojeva u terapijskim ili dijagnostičkim metodama, te u farmaceutskim pripravcima, na nukleinske kiseline koje kodiraju proteinske tvari koje sadrže aminokiselinske slijedove navedenih spojeva, na prijenosnike u isporuci gena koji sadrže takve nukleinske kiseline, na vezne molekule koje se vežu na navedene spojeve i na metodu određivanja da li je spoj sposoban vezati se na P-selektin.