

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03816795.6

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1313145C

[22] 申请日 2003.6.6 [21] 申请号 03816795.6
[30] 优先权

[32] 2002. 6. 6 [33] US [31] 60/386,928

[86] 国际申请 PCT/US2003/017881 2003. 6. 6

[87] 国际公布 WO2003/103592 英 2003. 12. 18

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 14

[73] 专利权人 华盛顿大学

地址 美国华盛顿

[72] 发明人 H·C·莱 T·佐佐木

N·P·辛格

[56] 参考文献

US5578637A 1996. 11. 26

US6214864B1 2001. 4. 10

CN1105235A 1995. 7. 19

审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 3 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质
之间的共价缀合物及其使用方法

[57] 摘要

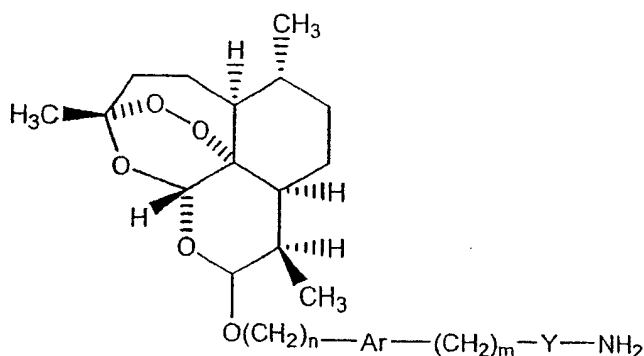
本发明在一个方面中提供了青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物。在某些实施方案中,该共价缀合物包括阿替林酯和全运铁蛋白。本发明在另一个方面中提供了给予本发明的共价缀合物以治疗癌症和由可结合携带铁的蛋白质的病原体所导致的感染的方法。

1. 包含与携带铁的蛋白质共价连接的青蒿素相关性内过氧化物的共价缀合物。

2. 权利要求 1 所述的共价缀合物，其中所述青蒿素相关性内过氧化物包括阿替林酯。

3. 权利要求 1 所述的共价缀合物，其中所述青蒿素相关性内过氧化物是酰肼衍生物。

4. 权利要求 2 所述的共价缀合物，其中所述青蒿素相关性内过氧化物具有如下结构：



其中 $n = 1-3$, $m = 0-3$, $\text{Ar} = \text{芳基}$, 且 $\text{Y} = \text{---}(\text{C}=\text{O})\text{NH---}$ 、 ---NH--- 或 ---O--- 。

5. 权利要求 1 所述的共价缀合物，其中所述携带铁的蛋白质选自全运铁蛋白、全乳铁蛋白、血红蛋白、血红素结合蛋白和与中性明胶酶相关的脂质运载蛋白组成的组。

6. 权利要求 5 所述的共价缀合物，其中所述携带铁的蛋白质为全运铁蛋白。

7. 权利要求 5 所述的共价缀合物, 其中所述携带铁的蛋白质为全乳铁蛋白。

8. 权利要求 5 所述的共价缀合物, 其中所述携带铁的蛋白质为哺乳动物蛋白。

9. 权利要求 5 所述的共价缀合物, 其中所述携带铁的蛋白质为人蛋白。

10. 权利要求 1 所述的共价缀合物, 其中包括阿替林酯和全运铁蛋白。

11. 权利要求 1 所述的共价缀合物, 其中包括阿替林酯和全乳铁蛋白。

12. 权利要求 1 所述的共价缀合物, 其中包括阿替林酯和血红蛋白。

13. 一种组合物, 其中包括与携带铁的蛋白质共价连接的青蒿素相关性内过氧化物的共价缀合物, 以及药物上可接受的载体。

14. 包含与携带铁的蛋白质共价连接的青蒿素相关性内过氧化物的共价缀合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

15. 权利要求 14 所述的用途, 其中所述青蒿素相关性内过氧化物选自阿替林酯和二氢青蒿素组成的组。

16. 权利要求 14 所述的用途, 其中所述携带铁的化合物为全运铁

蛋白。

17. 权利要求 14 所述的用途，其中所述药物被制成经非胃肠道给药。

18. 含有青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质的共价缀合物在制备用于治疗被病原体感染的受试者的药物中的用途，其中所述的病原体表达该携带铁的蛋白质的受体。

19. 权利要求 18 所述的用途，其中所述的青蒿素相关性内过氧化物选自阿替林酯和二氢青蒿素组成的组。

20. 权利要求 18 所述的用途，其中所述的携带铁的蛋白质选自全运铁蛋白、全乳铁蛋白、血红蛋白、血红素结合蛋白和与中性明胶酶相关的脂质运载蛋白组成的组。

21. 权利要求 18 所述的用途，其中所述的病原体包括幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)，其中所述的携带铁的蛋白质包括人乳铁蛋白，且其中所述的青蒿素相关性内过氧化物选自阿替林酯和二氢青蒿素组成的组。

22. 权利要求 18 所述的用途，其中所述的病原体包括脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)，其中所述的携带铁的蛋白质包括人运铁蛋白，且其中所述的青蒿素相关性内过氧化物选自阿替林酯和二氢青蒿素组成的组。

青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的 蛋白质之间的共价缀合物及其使用方法

相关申请的交叉引用

本申请要求按照 35 U. S. C. 119 于 2002 年 6 月 6 日提交的美国临时申请号 60/386,928 的利益。

发明领域

本发明涉及青蒿素 (artemisinin) 相关性内过氧化物 (endoperoxide) 与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物和这些缀合物在治疗癌症和由可结合携带铁的蛋白质的病原体导致的感染中的应用。

发明背景

青蒿素是从植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L) 中分离的倍半萜内酯类, 该植物的提取物已经用于治疗疟疾至少 1600 年。青蒿素分子含有内过氧化桥, 它与铁原子反应形成自由基。青蒿素的抗疟作用是因其与寄生虫内的血红素发生反应形成自由基而使细胞死亡所导致的。癌细胞具有显著高于正常细胞的铁流入。因此, 已经证实青蒿素和青蒿素类似物对建立的肿瘤和肿瘤细胞系具有细胞毒性 (例如, 参见 Woerdenbag 等 (1993) 《天然产物杂志》 (J. Nat. Prod.) 56 (6): 849-56; Lai & Singh (1995) 《癌症通讯》 (Cancer Lett.) 91 : 41-6 ; Efferth 等 (2001) 《国际肿瘤学杂志》 (Int. J. Oncol.) 18: 767-73; Li 等 (2001) 《生物有机药物化学通讯》 (Bioorg. Med. Chem. Lett.) 11: 5-8; Singh & Lai (2001) 《生命科学》 (Life Sci.) 70: 49-56; Efferth 等 (2002) 《生物化学与药理学》 (Biochem. Pharmacol.) 64: 617-23; Efferth 等 (2002) 《血细胞、分子和疾病》 (Blood Cells, Molecules & Diseases) 28 (2): 160-8; Sadava 等 (2002) 《癌症通讯》 (Cancer Lett.) 179:

151-6)。

已经描述了青蒿素的许多类似物和其它具有生物活性的含有内过氧化物桥(endoperoxide bridge)的化合物(例如,参见美国专利 US5,180,840; 美国专利 US5,216,175; 美国专利 US5,225,427; Cumming 等(1998)《药物化学杂志》(J Med.Chem.) 41 (6):952-64; Posner 等(1999)《药物化学杂志》(J Med.Chem.) 42: 300-4; Li 等(2001)《生物有机药物化学通讯》(Bioorg. Med. Chem. Lett.) 11: 5-8; Wu 等(2001)《欧洲药物化学杂志》(Eur. J. Med.Chem.) 36: 469-79; Posner 等(2003)《药物化学杂志》(J Med.Chem.) 46: 1060-5)。已经用于治疗疟疾的青蒿素类似物包括二氢青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯、蒿乙醚、二氢青蒿素丙基碳酸酯和 artelinic acid。

青蒿素是相对安全的药物,甚至在高剂量下也只有极少且低微的副作用。已经将6天70 mg/kg/天的口服剂量用于治疗人疟疾。在用青蒿琥酯治疗癌症患者后,没有观察到明显的不良副作用(口服剂量50 mg/天;肌肉剂量60 mg/天;为期9个月)(Singh & Verma (2002)《肿瘤学学报》(Arch. Oncol.) 10 (4): 279-80)。还已将青蒿素和青蒿素类似物用于治疗皮肤病,诸如银屑病、起泡性皮肤病、病毒疣、上皮软疣(molluscum contagiosum)和痔(例如,参见美国专利 US4,978,676; 美国专利 US5,219,880)。还将青蒿素和青蒿素类似物用于预防疟疾。

已经证实给予铁盐或携带铁的蛋白质全运铁蛋白(holotransferrin)增加了癌细胞和植入的肿瘤对青蒿素及其类似物的敏感性(Lai & Singh (1995)《癌症通讯》(Cancer Lett.) 91: 41-46; Moore 等(1995)《癌症通讯》(Cancer Lett.) 98: 83-7; Singh & Lai (2001)《生命科学》(Life Sci.) 70: 49-56; Sadava 等(2002)《癌症通讯》(Cancer Lett.) 1179: 151-6)。

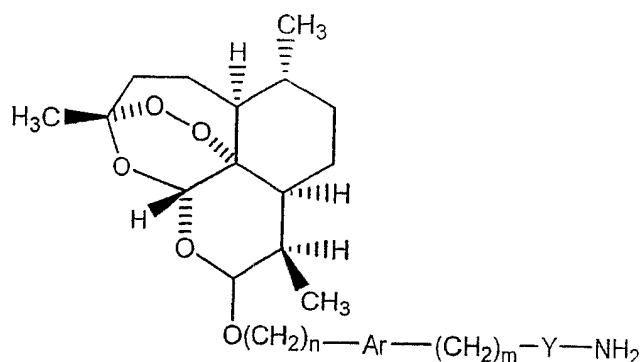
还证实某些病原体通过结合携带铁的宿主蛋白质而获得铁。例如,细菌性脑膜炎的病原体脑膜炎奈瑟氏球菌表达携带铁的化合物的细胞表面受体,诸如运铁蛋白(transferrin)和乳铁蛋白(lactoferrin)(Evans & Oakhill (2002)《生物化学协会学报》(Biochem. Soc. Trans.)

30 (4): 705-7)。目前, 尚无疫苗可用于脑膜炎奈瑟氏球菌 B 型菌株即西方世界中最流行的菌株。此外, 已经证实人胃炎、胃和十二指肠溃疡和腺癌的病原体幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 可通过结合人乳铁蛋白而获得铁 (Husson 等 (1993) 《感染性免疫》 (Infect. Immun.) 61 (6): 2694-7)。

本领域中仍需要有效力增加的青蒿素组合物, 以用于治疗癌症和由可结合携带铁的宿主蛋白的病原体导致的疾病。还需要用于治疗癌症和由可通过摄入携带铁的宿主蛋白而获得铁的病原体所导致的感染的方法。本发明满足了这些需求。

发明概述

本发明在一个方面中提供了新化合物和包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物的组合物。青蒿素相关性内过氧化物可以通过酰肼部分、肼部分或氨基基部分与携带铁的化合物连接。在某些实施方案中, 所述的青蒿素相关性内过氧化物具有如下结构:



其中 $n = 1-3$, $m = 0-3$, Ar = 芳基, 且 $\text{Y} = \text{---}(\text{C}=\text{O})\text{NH---}$, ---NH--- 或 ---O--- 。有代表性的存在于本发明共价缀合物中的青蒿素相关性内过氧化物包括阿替林酯 (artelinate) 和二氢青蒿素。

有代表性的存在于本发明共价缀合物中的携带铁的蛋白质包括蛋白质中的运铁蛋白家族、与中性明胶酶相关的脂质运载蛋白 (neutral gelatinase associated lipocalin, NGAL)、血红素蛋白和其它携带铁

的蛋白质。因此，所述的共价缀合物可以包括：例如阿替林酯与全运铁蛋白、阿替林酯与全乳铁蛋白（hololactoferrin）或阿替林酯与血红蛋白的缀合物。本发明还提供了包含本发明共价缀合物和药物上可接受的载体的组合物。本发明的共价缀合物可用于治疗癌症和由可结合携带铁的蛋白质的病原体所导致的感染。

本发明在另一个方面中提供了对需要的受试者给予本发明的共价缀合物的方法。在本发明该方面中适合于给药的典型共价缀合物包括：例如阿替林酯与全运铁蛋白之间、阿替林酯与全乳铁蛋白之间和阿替林酯与血红蛋白之间的共价缀合物。

在某些实施方案中，本发明提供了治疗癌症的方法，通过对有此需要的人或动物受试者给予有效量的组合物来进行，该组合物包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物。可以通过局部或全身性给予所述的共价缀合物，或可以将它们直接注入肿瘤。可以单独或与一种或多种其它治疗剂一起给予所述的共价缀合物。例如，可以与例如可通过增加缀合物中携带铁的蛋白质的细胞表面受体数来增加向细胞内的铁转运的活性剂一起给予所述的共价缀合物。

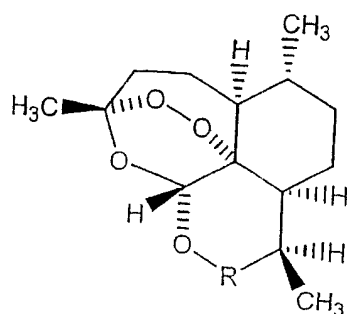
本发明还提供了治疗由可结合携带铁的蛋白质的病原体所导致的感染的方法，通过对有此需要的人或动物受试者给予有效量的组合物来进行，该组合物包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物。在一个实施方案中，所述的病原体包括幽门螺杆菌，其中携带铁的蛋白质包括人乳铁蛋白，且其中所述青蒿素相关性内过氧化物选自阿替林酯和二氢青蒿素组成的组。在其它典型的实施方案中，所述的病原体包括脑膜炎奈瑟氏球菌，其中所述携带铁的蛋白质包括人运铁蛋白，且其中所述青蒿素相关性内过氧化物选自阿替林酯和二氢青蒿素组成的组。

在另外的实施方案中提供了治疗幽门螺杆菌感染的方法，通过对有此需要的人或动物受试者给予有效量的组合物来进行，该组合物包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物。

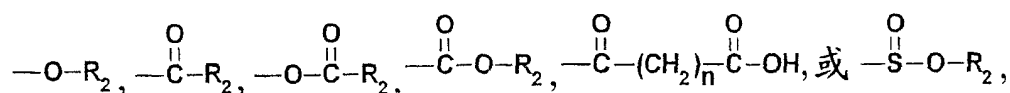
优选实施方案的详细描述

本发明在一个方面中提供了包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物的组合物。本文所用的术语"共价缀合物"指的是其中青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质共价连接在一起的化合物。术语"青蒿素相关性内过氧化物"指的是含有内过氧桥(endoperoxide bridge)的化合物,它可与铁原子反应而形成自由基,导致细胞死亡。青蒿素相关性内过氧化物化合物还可以在有铜和锰存在的情况下形成自由基。有代表性的青蒿素相关性内过氧化物如本文所述,不过,显然其它内过氧化物也可用于该目的。

一般来说,青蒿素相关性内过氧化物选自由倍半萜内酯类及其醇类、碳酸酯类、酯类、醚类和磺酸酯类、阿替夫林、1,2,4-三噁烷类和1,2,4,5-四噁烷类组成的组。青蒿素相关性内过氧化物可具有如下结构:



其中 R 为 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—}$ 或 $\text{—}\overset{\text{R}_1}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—}$, R_1 为氢、羟基、烷基或具有下列通式:



其中 R_2 为烷基或芳基且 n 为 1-6; 或者其药学上可接受的盐。本文所用的术语"烷基"指的是含有 1-6 个碳原子、优选 1-4 个碳原子的低级烷基。本发明的烷基可以是直链或支链基团。术语"芳基"指的是含

有 4-14 个主链碳或杂原子的单环和多环芳族基团, 包括碳环芳基和杂环芳基。碳环芳基是其中所有的环原子均为碳的芳基。杂环芳基含有 1-4 个杂原子作为环原子, 剩余的环原子为碳。有代表性的芳基包括例如苯基和苄基。药物上可接受的盐包括碱金属或碱土金属盐, 优选钠或钾盐。

例如, 本发明的青蒿素相关性内过氧化物包括: 青蒿素, 其中 R 为



; 二氢青蒿素 ($R_1 = -OH$); artesunic

acid ($R_1 = -OCO(CH_2)_2CO_2H$); 以及青蒿琥酯; 蒿甲醚 ($R_1 = -OCH_3$); 和蒿乙醚 ($R_1 = -OC_2H_5$)。本发明其它有代表性的内过氧化物化合物包括 artelinic acid、二氢青蒿素丙基碳酸酯、阿替夫林 (Ro. 42-1611) 及其类似物 (Biirgen 等 (1994) Sixth Int. Cong. Infect. Dis. Abst. 427, p. 152, Prague)、1, 2, 4-三噁烷类 (Peters 等 (1993) Ann. Trop. Med. Parasit. 87(1) : 9-16) 和 1, 2, 4, 5-四噁烷类 (Vennerstrom 等 (1992) 《药物化学杂志》 (J Med Chem.) 35 (16): 3023-3027)。青蒿素的其它合适的结构类似物描述在例如美国专利 US5, 216, 175 和 US5, 180, 840、Cumming 等 (1998) 《药物化学杂志》 (J Med Chem.) 41 (6): 952-64 和 PCT 专利申请 WO 97/01548、WO 99/33461 和 WO 00/42046 中。

青蒿素相关性内过氧化物的来源可以为天然 (例如分离自植物)、合成或半合成的。例如, 可以通过在微生物宿主中表达相关合成途径中的酶来产生自由基发生剂 (例如, 参见 Martin 等 (2003) 《天然生物技术》 (Nature Biotechnol.), 在线公开: 2003 年 6 月 1 日, doi: 10.1038/nbt833)。

本文所用的术语 "携带铁的蛋白质" 指的是适合于将铁转运至细胞的蛋白质。本发明共价缀合物中携带铁的蛋白质可以为哺乳动物蛋白, 例如人蛋白质。典型的携带铁的蛋白质包括蛋白质中的运铁蛋白家族、与中性明胶酶相关的脂质运载蛋白 (neutral gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、血红素蛋白和其它结合铁的蛋白质。铁在细胞生长中起着关键的作用。蛋白质中的运铁蛋白家族包括运铁蛋白、乳铁蛋白、

卵运铁蛋白 (ovotransferrin) 和黑运铁蛋白 (melanotransferrin) (Aisen & Harris (1989) 在《铁载体和铁蛋白》(Iron Carriers and Iron Proteins) 中所述 (ed. Loehr, VCH, New York) 273-320 页; Baker (1994) 《高级无机化学》(Adv. Inorg. Chem.) 41: 389-463)。所有这些蛋白质均为结构相关性的单链糖蛋白, 含有 670-690 个氨基酸。运铁蛋白将铁和血红素从循环中转运入细胞。运铁蛋白的载铁形式(全运铁蛋白)结合细胞表面上的运铁蛋白受体, 并通过受体介导的胞吞作用被摄入细胞内, 在此释放铁。乳铁蛋白在从人乳中吸收铁的过程中具有关键作用。乳铁蛋白的另一种功能是阻止铁接触传染原。不同于运铁蛋白, 乳铁蛋白可以在低 pH 下稳定地结合铁并吸收入肠中。

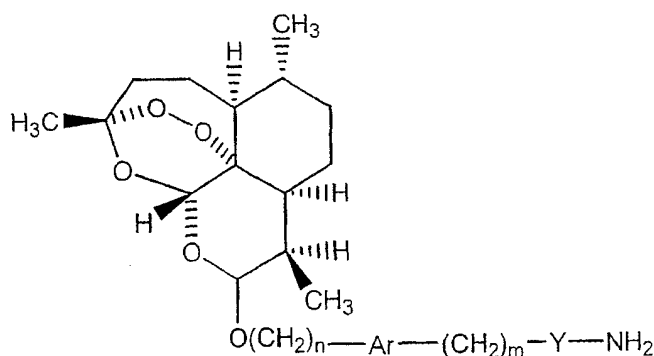
NGAL 是与运铁蛋白家族无关的携带铁的蛋白质, 推测它可以将铁递送至分化着的上皮细胞处 (Kaplan (2002)《细胞》(Cell)111: 603-6)。血红素蛋白为诸如血红蛋白、肌红蛋白、血红素结合蛋白、细胞色素、过氧化氢酶和过氧化物酶这类携带血红素作为辅基的蛋白质。例如, 血红素结合蛋白是 60kDa 的血清糖蛋白, 它以极高的亲合力从血流中螯合血红素, 并将其转运至肝 (Baker 等 (2003)《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. US. A.) 100 (7): 3579-83)。

在本发明的共价缀合物中, 青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质连接, 连接的方式可以是能保留携带铁的蛋白质的活性和青蒿素相关性内过氧化物的活性二者的任何方式。例如, 如实施例 1 中所述, 可以通过下列步骤将青蒿素相关性内过氧化物与糖基化的携带铁的蛋白质连接: 首先制备青蒿素相关性内过氧化物的酰肼衍生物, 然后使其与携带铁的蛋白质上的一个或多个氧化多糖基团连接。为了制备青蒿素相关性内过氧化物的酰肼衍生物, 可以首先通过下列步骤形成青蒿素相关性内过氧化物的酯: 将 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 加入到青蒿素相关性内过氧化物中, 随后添加乙基二甲基乙基碳二亚胺。然后使 HOBt 酯与肼反应生成酰肼衍生物。随后使该酰肼衍生物与携带铁的蛋白质共价连接, 其中已用氧化剂 (诸如高碘酸钠) 氧化了多糖基团。任何含有 $-(C=O)NH-$ 基团的青蒿素相关性内过氧化物均可以用于制备可与运铁蛋白或其它

携带铁的糖蛋白连接的酰肼衍生物(例如, 参见 Gumming 等(1998)《药物化学杂志》(J Med. Chem.) 41 (6): 952-64)。

还可以通过首先制备青蒿素相关性内过氧化物的肼或氮氧基衍生物而将青蒿素相关性内过氧化物与糖基化的携带铁的蛋白质连接起来。为了制备青蒿素相关性内过氧化物的肼或氮氧基衍生物, 首先通过下列步骤形成青蒿素相关性内过氧化物的卤化物: 将卤代醇加入到青蒿素相关性内过氧化物中, 随后添加三氟化硼合乙醚。然后可以使所述的卤化物或青蒿素相关性内过氧化物与肼或羟基胺反应而分别生成肼或氮氧基衍生物。卤代基团可以被对甲苯磺酰基或甲磺酰基取代而用于反应。然后可以使肼或氮氧基衍生物与携带铁的蛋白质共价连接, 其中已用氧化剂(诸如高碘酸钠)氧化了多糖基团。任何含有 $-(C=O)NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-O-$ 基团的青蒿素相关性内过氧化物均可以用于制备可与运铁蛋白或其它携带铁的糖蛋白连接的肼衍生物或氮氧基衍生物。

适合于按照这种方式连接的青蒿素相关性内过氧化物包括可以从其中制备酰肼、肼或氮氧基衍生物而不破坏内过氧桥活性的化合物。一般来说, 通过间隔基(诸如烃链)将内过氧桥与酰肼、肼或氮氧基隔开。还可以将醚类、酯类、酰胺类、硫化物和二硫化物用作间隔基。例如, 可以用苯环将内过氧桥与如阿替林酯上的酰肼、肼或氮氧基隔离开。因此, 适用于本发明的青蒿素相关性内过氧化物包括、但不限于如下结构的内过氧化物:



其中 $n = 1-3$, $m = 0-3$, Ar = 芳基, 例如苯基、萘基、苊基、吡啶基或嘧啶基, 且 $Y = -(C=O)NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-O-$ 。有代表性的存在于本发明共价缀合物中的青蒿素相关性内过氧化物包括阿替林酯和二氢青蒿素。

用于将青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的糖蛋白相连接的方法包括硼酸酯介导的与携带铁的糖蛋白上的糖残基的连键(例如, 参见美国专利 US5, 919, 708)。因此, 含有硼酸酯基的青蒿素相关性内过氧化物将与蛋白质表面上的糖残基的 1, 2-二醇部分反应。

就非糖基化的携带铁的蛋白质而言, 可以如实施例 2 中所述通过使用氨基酸侧链使青蒿素相关性内过氧化物与该蛋白质连接。例如, 青蒿琥酯和阿替林酯带有可以用 N -羟基琥珀酰亚胺(例如, 参见 Lewis 等 (1994) 《生物缀合物化学》(Bioconj. Chem.) 5(6): 655-76) 和水溶性碳化二亚胺试剂、诸如 N -乙基(ethyl)- N' -二甲氨基乙基碳化二亚胺活化成活性酯的游离羧酸基。可以将这种酯与非糖基化的携带铁的蛋白质的水溶液混合而将青蒿素相关性内过氧化物与该蛋白质表面上的 Lys 残基连接。

可以通过本领域中的标准方法, 例如通过使用凝胶过滤色谱法、离子交换和反相或疏水相互作用高压液相色谱法(HPLC)纯化所述的共价缀合物。可以通过使用本领域中的标准方法, 例如离子喷雾质谱法, 测定与一个分子的携带铁的蛋白质相结合的青蒿素相关性内过氧化物分子的数量。共价缀合物中青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质的比例取决于所用的携带铁的蛋白质和形成缀合物的方法。例如, 使用实施例 1 中所述的方法获得每分子的全运铁蛋白含有 1-10 个分子的青蒿素相关性内过氧化物的共价缀合物。

本发明还提供了包括本发明共价缀合物的组合物。在某些实施方案中, 如实施例 1 中所述, 本发明的组合物包括阿替林酯与人全运铁蛋白之间的共价缀合物。在其它实施方案中, 所述的组合物包括阿替林酯与人全乳铁蛋白之间的共价缀合物。

本发明的共价缀合物可用于治疗癌症。由于大部分癌细胞快速分

裂,所以它们具有比正常细胞更高的铁摄取速率,且表达的细胞表面运铁蛋白受体的浓度也高于正常细胞。已经证实给予铁盐或全运铁蛋白增加了癌细胞对青蒿素及其类似物的敏感性(Moore 等(1995)《癌症通讯》(Cancer Lett.) 98: 83-7; Singh & Lai (2001)《生命科学》(Life Sci.) 70: 49-56; Sadava 等(2002)《癌症通讯》(Cancer Lett.) 1179: 151-6)。因此,通过将青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质、诸如全运铁蛋白共价连接,可增加青蒿素相关性内过氧化物对癌症的功效和选择性,因为内过氧化物和铁同时被转运至或转运入同一细胞。

本发明的共价缀合物还可用于治疗具有共价缀合物中所述携带铁的蛋白质的受体的致病生物体所导致的感染。为了建立成功的感染,病原体必须克服宿主施加的严格铁限制。为了克服这种限制,许多病原体从携带铁的宿主蛋白中获得铁(例如,参见 Cornelissen, (2003) Front. Biosci. 8: D836-47)。例如,细菌性脑膜炎的病原体脑膜炎奈瑟氏球菌表达携带铁的蛋白质—运铁蛋白和乳铁蛋白的细胞表面受体(Evans & Oakhill (2002)《生物化学协会学报》(Biochem. Soc. Trans.) 30 (4): 705-7),人胃炎和消化性溃疡的病原体幽门螺杆菌表达人乳铁蛋白的受体(Husson 等(1993)《感染性免疫》(Infect. Immun.) 61 (6): 2694-7),而金黄色葡萄球菌表达血红蛋白受体(Mazmanian 等(2003)《科学》(Science) 299: 906-9)。因此,本发明的共价缀合物可用于杀死其中具有共价缀合物中所述携带铁的蛋白质的受体的致病生物体。例如,青蒿素相关性内过氧化物与人运铁蛋白或人全乳铁蛋白之间的共价缀合物可以用于治疗脑膜炎奈瑟氏球菌导致的细菌性脑膜炎或幽门螺杆菌导致的胃炎和消化性溃疡病。

按照本发明的方法,当对癌细胞给药时,青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物具有优于分别给予青蒿素相关性内过氧化物和携带铁的蛋白质所达到的细胞毒性活性。此外,本发明的共价缀合物可有效杀伤带有携带铁的蛋白质的受体的病原体。

本发明在第二个方面中提供了对此需要的受试者给予组合物的

方法,该组合物包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物。青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质的共价缀合物如上所述。例如,如实施例1中所述,某些实施方案提供了阿替林酯与全运铁蛋白的共价缀合物。

这些方法适合于任意动物受试者,诸如人体受试者。例如,需要有包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物的组合物的受试者可以是癌症患者。如上所述,快速增殖的细胞、诸如癌细胞一般具有较高的细胞表面运铁蛋白受体浓度。该方法提供了选择性递送内过氧化物部分和铁的机制,它可以对快速增殖的细胞、诸如癌细胞产生反应。因此,本发明提供了治疗癌症的方法,通过对有此需要的人或动物受试者给予有效量的化合物来进行,该化合物包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物。其它存在细胞过度增殖且可以用本发明的共价缀合物治疗的疾病包括、但不限于再狭窄、自身免疫病、关节炎、移植物排斥、炎症性肠病或医疗操作后诱发的增殖。在某些实施方案中,所述的方法包括给予化合物的步骤,该化合物包括阿替林酯与人全运铁蛋白之间的共价缀合物。

还可以给予包括青蒿素相关性内过氧化物与携带铁的蛋白质之间的共价缀合物的化合物和组合物,以便治疗由表达共价缀合物中所述携带铁的蛋白质的细胞表面受体的病原体所导致的感染。本文所用的术语"治疗病原体导致的感染"指的是抑制病原体生长和/或预防或改善与该感染相关的疾病症状。

具有携带铁的宿主蛋白的受体的典型病原体如上所述,包括表达人运铁蛋白的受体的脑膜炎奈瑟氏球菌和表达人乳铁蛋白的受体的幽门螺旋菌。目前已经证实金黄色葡萄球菌表达血红蛋白受体(Mazmanian等(2003)《科学》(Science) 299: 906-9),单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)和炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)也表达类似的蛋白质(Cabanes等(2002)《微生物学趋势》(Trends. Microbiol.) 10 (5): 238-45)。表达携带铁的宿主蛋白的受体的典型病原体实例如表1中所示。一旦该携带铁的蛋白质与病原体表达的受体

相结合, 则铁或血红素一般从携带铁的蛋白质中释放出来, 并被转运入细胞(例如, 参见 Gray-Owens &Schryvers (1996) 《微生物学趋势》(Trends. Microbiol.) 4 (5): 185-91; Wandersman &Stojiljkovic (2000) 《最新微生物学观点》(Curer. Op. Microbiol.) 3: 215-20)。

表 1. 人和动物病原体中携带铁的蛋白质的受体

病原体	宿主	疾病	受体
牛莫拉氏菌	牛	角膜结膜炎	运铁蛋白, 乳铁蛋白 ¹
粘膜炎莫拉氏菌	人	中耳炎	运铁蛋白, 乳铁蛋白 ¹
腔隙莫拉氏菌	人	角膜结膜炎	运铁蛋白, 乳铁蛋白 ¹
脑膜炎奈瑟氏球菌	人	脑膜炎	运铁蛋白, 乳铁蛋白 ¹ 血红蛋白 ^{1,19}
淋病奈瑟氏球菌	人	淋病	运铁蛋白, 乳铁蛋白, 血红蛋白 ^{1,18}
放线共生放线杆菌 (Actinobacillus actinomycetecomitans)	人	青少年牙周 炎	运铁蛋白 ¹
马驹放线杆菌	马	败血症	运铁蛋白 ¹
胸膜肺炎放线杆菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae)	猪	肺炎	运铁蛋白 ¹
羔羊嗜血菌	绵羊	败血症	运铁蛋白 ¹
鸟巴斯德氏菌	家禽	肺炎	运铁蛋白 ¹
流感嗜血杆菌	人	脑膜炎, 中耳 炎	运铁蛋白, 血红蛋白 ^{1,20}
副鸡嗜血杆菌 (Haemophilus paragallinarum)	家禽	传染性鼻炎	运铁蛋白 ¹
睡眠嗜血杆菌 (Haemophilus somnus)	牛	血栓栓塞性 脑膜脑炎	运铁蛋白 ¹
副猪嗜血杆菌	猪	格拉瑟病	运铁蛋白 ¹
杜克氏嗜血杆菌	人	生殖器溃疡 病	血红蛋白 ¹⁵

病原体	宿主	疾病	受体
溶血巴斯德氏菌	牛, 绵羊, 山羊	航运热, 巴斯德菌病	运铁蛋白 ¹
多杀巴斯德氏菌	牛	肺炎, 败血症	运铁蛋白 ¹
金黄色葡萄球菌	人	菌血症, 肺炎, 心内膜炎, 脓毒性关节炎, 骨髓炎, 深脓肿, 食物中毒	运铁蛋白 血红蛋白 ^{2,13}
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	人	心内膜炎, 眼内炎, 败血 症, 膀胱炎	运铁蛋白 ²
肺炎链球菌	人	肺炎, 脑膜炎, 菌血症, 中耳炎	乳铁蛋白 ³
<i>Leishmania chagasi</i>	人	利什曼病	运铁蛋白, 乳铁蛋白 ⁴
大肠埃希氏杆菌 K88	猪	肠病发生	运铁蛋白 ⁵
<i>Tritrichomonas foetus</i>	牛	毛滴虫病	乳铁蛋白 血红蛋白 ⁶
苍白密螺旋体	人	梅毒	乳铁蛋白 ⁷
肺炎枝原体	人	肺炎	乳铁蛋白 ⁸
百日咳博德特氏菌	人	百日咳	乳铁蛋白 ⁹
<i>Trichomonas vaginalis</i>	人	阴道病	乳铁蛋白 ¹⁰
杀鲑气单胞菌	鱼	疳病	运铁蛋白, 乳铁蛋白 ¹¹
幽门螺杆菌	人	胃炎, 胃和十二指肠溃 瘍, 胃腺癌, 淋巴瘤	乳铁蛋白 ¹²
小肠结肠炎耶尔森 氏菌	人	肠炎	血红蛋白, 肌红 蛋白, 血红素结 合蛋白, 过氧化 氢酶, 清蛋白- 血红素 ¹⁴
创伤弧菌	鳗鱼 (eel)	食物中毒, 败血症, 创伤 感染	血红蛋白 ¹⁶
牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	人	牙周病	血红蛋白 ¹⁷

- 1 Gray-Owen & Schryvers (1996) *Trends Microbiol.* 4(5):185-91
- 2 Modun et al. (1998) *Infect. Immun.* 66(8):3591-6
- 3 Hammerschmidt et al. (1999) *Infect. Immun.* 67(4):1683-7
- 4 Britigan et al. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.* 443:135-40
- 5 Grange et al. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* 412:357-61
- 6 Tachezy et al. (1996) *Exp. Parasitol.* 83(2):216-28
- 7 Alderete et al. (1988) *Genitourin. Med.* 64(6):359-63
- 8 Tryon & Baseman (1987) *Microb. Pathog.* 3(6):437-43
- 9 Redhead et al. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133(4):891-8
- 10 Peterson & Alderete (1984) *J. Exp. Med.* 160(2):398-410
- 11 Chart & Trust (1983) *J. Bacteriol.* 156(2):758-64
- 12 Dhaenens et al. (1997) *Infect. Immun.* 65(2):514-8
- 13 Mazmanian et al. (2003) *Science* 299:906-9
- 14 Bracken et al. (1999) *J. Bacteriol.* 181(19):6063-72
- 15 Al-Twafiq et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(3):1049-54
- 16 Fouz et al. (1997) *Microbiol. Lett.* 156(2):187-91
- 17 Simpson et al. (2000) *J. Bacteriol.* 182(10): 5737-48
- 18 Chen et al. (1996) *Infect. Immun.* 64:5008-14
- 19 Stojiljkovic et al. (1996) *J. Bacteriol.* 179(15):4670-78
- 20 Frangipane et al. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 118:243-8

本发明该方面的方法提供了选择性递送内过氧化物部分和铁的机制，它可以通过使共价缀合物与携带铁的蛋白质的受体结合而对致病生物体的细胞膜产生直接的反应。按照本发明的方法，结合的共价缀合物中的内过氧化物部分与从携带铁的蛋白质中释放的铁或血红素反应，从而在病原体附近产生有害自由基。因此，本发明提供了治疗幽门螺杆菌导致的疾病的方法，通过对有此需要的人体受试者给予有效量的包括青蒿素相关性内过氧化物与人全乳铁蛋白之间的共价缀合物的组合物来进行。本发明还提供了治疗脑膜炎奈瑟氏球菌导致的疾病的方法，通过对有此需要的人体受试者给予有效量的包含青蒿素相关性内过氧化物

与人全运铁蛋白之间的共价缀合物的组合物来进行。

可以通过给予有效量的包括本发明共价缀合物的组合物治疗的其它典型的感染包括局部细菌感染，诸如龋炎、皮肤和眼部感染。

所述共价缀合物的有效量一般可达最大耐受剂量，但浓度并非关键且可以广泛改变。当然，临床医师使用的精确量随化合物、给药途径、患者的身体情况和其它因素而改变。可以将每日剂量作为单剂量给药或可以将其分成多次剂量给药。

实际给予的本发明缀合物的用量应是治疗有效量，本文所用的该术语表示产生实质性的有益作用所需的用量。可以根据由体外或动物模型试验系统得到的剂量-反应曲线外推出有效剂量。一般还将动物模型用于确定理想的剂量范围和给药途径。然后将这类信息用于确定用于人或其它哺乳动物的有用剂量和给药途径。有效剂量的测定也属于本领域技术人员的能力范围。因此，实际给予的用量取决于治疗所施用的个体，并优选是优化用量，以便获得所需作用而没有显著副作用。

可以通过标准制药步骤在细胞培养物或实验动物中测定本发明共价缀合物的治疗功效和可能的毒性(例如 ED_{50} ，即有效治疗 50%群体的剂量；和 LD_{50} ，即使 50%群体致死的剂量)。治疗与毒性作用之间的剂量比为治疗指数，可以将其表示为 LD_{50} 与 ED_{50} 之比。表现出高治疗指数的共价缀合物特别适合于实施本发明的方法。可以将从细胞培养试验和动物研究中获得的数据用于配制人或其它哺乳动物所使用的剂量范围。这类缀合物的剂量优选属于包括几乎没有或无毒性的 ED_{50} 的循环浓度范围内。剂量一般在该范围内改变，这取决于所用的剂型、受试者的敏感性和给药途径。因此，最佳用量可以根据给药方法的不同而改变，并且一般为以相同或相似形式给药的常用药剂的用量。

可以将本发明的共价缀合物单独或与一种或多种其它治疗活性剂一起给药。例如，在治疗癌症的过程中，可以将该缀合物与治疗剂联用，所述的治疗剂包括、但不限于：雄激素抑制剂，诸如氟他胺和 *luprolide*；抗雌激素药，诸如他莫昔芬；抗代谢药和细胞毒性剂，诸如柔红霉素、氟尿嘧啶、氟尿苷、干扰素 α 、氨甲蝶呤、普卡霉素、巯基嘌呤、硫鸟

嘌呤、多柔比星、卡莫司汀、洛莫司汀、阿糖胞苷、环磷酰胺、多柔比星、雌莫司汀、六甲蜜胺、羟基脲、异环磷酰胺、丙卡巴肼、丝裂菌素制剂、白消安、米托蒽醌、卡铂、顺铂、链佐星、博来霉素、放线菌素和伊达比星；激素，诸如甲羟孕酮、雌莫司汀、炔雌醇、雌二醇、亮丙立德、甲地孕酮、奥曲肽、己烯雌酚、氯烯雌醚、依托泊苷、鬼臼毒素和戈舍瑞林；氮芥衍生物，诸如美法仑、苯丁酸氮芥、methlorethamine 和塞替派；类固醇，诸如倍他米松；和其它抗肿瘤药，诸如活牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*）、dicarbazine、天冬酰胺酶、亚叶酸、米托坦、长春新碱、长春碱和泰索帝。在每种情况中的适宜用量随特定活性剂的不同而改变，本领域技术人员易于得知或易于通过常规实验测定。

还可以将本发明的共价缀合物与例如可增加缀合物中携带铁的蛋白质的细胞表面受体数量而增加铁向细胞内的转运的活性剂联合给药。例如，已经证实胰岛素、胰岛素样生长因子 I 和表皮生长因子会引起细胞表面上的运铁蛋白受体数量增加（例如，参见 Davis 等（1987）《生物化学杂志》（*J Biol. Chem.*）261（19）：8708-11；Davis 等（1986）《生物化学杂志》（*J Biol. Chem.*）262（17）：13126-34）。因此，在某些实施方案中，将本发明含有运铁蛋白的共价缀合物与胰岛素、胰岛素样生长因子 I 或表皮生长因子联合给药。

可以通过任意有效途经、例如通过非肠道或口服来给予本发明的共价缀合物。给药方法包括局部（例如皮肤贴剂）、吸入、口含、动脉内、皮下、髓内、静脉内、鼻内、直肠内、眼内给药和其它常用方式。例如，可以将所述的共价缀合物直接注入肿瘤、注入肿瘤附近或注入对肿瘤供血的血管。

可以将本发明的共价缀合物配制成组合物，该组合物中另外含有合适的药物上可接受的载体，包括赋形剂和其它有利于对哺乳动物受试者给予该共价缀合物的其它化合物。有关配制和给药的更具体的技术可以在最新版《Remington 氏药物科学》（"Remington's Pharmaceutical Sciences"）（Maack Publishing Co, Easton PA）中找到。

可以使用本领域中众所周知的药物上可接受的载体配制用于口服给药的组合物，其剂量适合于口服给药。这类载体能够将含有本发明的共价缀合物的组合物配制成适合于受试者摄取的片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆剂、浆液、混悬液等。可以将口服应用的组合物与固体赋形剂一起配制，任选研磨所得混合物，并且如果需要，在加入合适的其它化合物后将该颗粒混合物进行加工，以制成片剂或锭剂药芯。合适的赋形剂包括碳水化合物或蛋白质填料。它们包括、但不限于：糖类，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇；来自玉米、小麦、稻、马铃薯或其它植物的淀粉；纤维素，诸如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠；和树胶，诸如阿拉伯胶和黄耆胶；以及蛋白质，诸如明胶和胶原蛋白。如果需要，可以加入崩解剂或加溶剂，诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐，诸如藻酸钠。

给锭芯包合适的包衣层，诸如浓糖溶液，其还可以含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆用溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或锭剂包衣层中加入染料或色素以用于产品识别或表征活性化合物用量(即剂量)。

例如，可以将用于口服给药的共价缀合物配制成由明胶制成的推入配合式胶囊以及由明胶和诸如甘油或山梨醇这类包衣材料组成的密封软胶囊。推入配合式胶囊可以含有共价缀合物，其中混有：填充剂或粘合剂，诸如乳糖或淀粉；润滑剂，诸如滑石或硬脂酸镁；和任选的稳定剂。在软胶囊中，可以将共价缀合物溶于或悬浮于合适的含有或不含稳定剂的液体中，诸如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。

非肠道给药用组合物包括一种或本发明共价缀合物的水溶液。为了进行注射，可以用生理上相容的缓冲液、诸如 Hank's 溶液、林格液或生理缓冲盐水将本发明的共价缀合物配制成水溶液。含水的注射混悬液可以含有增加该混悬液粘度的物质，诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。另外，可以将共价缀合物的混悬液制备成适宜的油性注射混悬液。合适的亲脂性溶剂或载体包括：脂肪油，诸如芝麻油；或合成的脂肪酸酯类，诸如油酸乙酯或甘油三酯类；或脂质体。该混悬液还可以任选含

有合适的稳定剂或增加共价缀合物溶解度的试剂以便制备高浓度溶液。

为了进行局部或鼻部给药，一般将适合于透入特定屏障的渗透剂用于制剂中。它们的实例为 2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、丙二醇、甲醇或异丙醇、二甲亚砜和月桂氮革酮。还可以包括其它试剂以使制剂在美容上可接受。它们的实例为脂肪、蜡、油、染料、香料、防腐剂、稳定剂和表面活性剂。还可以包括诸如本领域中公知的那些角质分解剂。实例为水杨酸和硫。为了进行局部给药，组合物可以为用于全身递送所述化合物的经皮软膏或贴剂的形式，可以按照常规方式制备（例如，参见 Barry, 《皮肤病用制剂》（Dermatological Formulations）（Drugs and the Pharmaceutical Sciences--Dekker）；Harrys Cosmeticology（Leonard Hill Books）。

为了进行直肠给药，可以以栓剂或滞留型灌肠剂的形式给予组合物。可以通过将共价缀合物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备这类组合物，所述的无刺激性赋形剂在常温下为固体，而在直肠温度下为液体，由此在直肠中融化而释放药物。合适的赋形剂包括、但不限于可可脂和聚乙二醇类。

这些不同类型的添加剂各自的用量对本领域技术人员而言是显而易见的，最佳用量与设计用于相同类型给药的其它已知制剂相同。例如，角质层渗透促进剂一般是约 0.1% - 约 15% 浓度。

可以按照与本领域中已知类似的方式制备含有本发明共价缀合物的组合物（例如，通过常规的混合、溶解、成粒、制锭、研磨、乳化、包囊、包埋或冻干法）。还可以通过常规方式（例如包衣）改变组合物成可以提供适当释放特性，例如缓释或靶向释放。

可以盐的形式提供包含共价缀合物的组合物，并且可以与许多酸成盐，包括、但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐倾向于比相应的游离碱形式更易溶于水性或其它质子溶剂。

在制备了制成含有共价缀合物和可接受的载体的这类组合物后，可以将它们放入合适的容器并标记使用。

下列实施例仅解释了目前已知用于实施本发明的最佳方式，但不应

用于限制本发明。

实施例 1

本实施例描述了本发明有代表性的组合物的制备方法，该组合物含有一种或多种与全运铁蛋白分子共价连接的青蒿素相关性内过氧化物分子。

Artelinic acid hydrazide 的合成 (ART-NH-NH₂): 制备青蒿琥酯的酰肼衍生物的尝试并不成功，因环化反应而导致形成二氢青蒿素。如上所述由二氢青蒿素合成阿替林酯 (Shrimali 等 (1998) 《印度化学杂志》 (Indian J Chem.) 37B: 1161-1163)。将 artelinic acid (0.1 g, 0.24 mmol) 溶于无水乙腈 (0.48 mL)。向该溶液中加入 1-羟基苯并三唑 (HOBt) (0.038 g, 0.29 mmol)，随后添加乙基二甲基乙基碳化二亚胺 (0.055 g, 0.29 mmol)。在室温下搅拌该反应混合物并通过薄层色谱法 (TLC) 监测，直到所有的酸均转化成 HOBt 酯。

将肼 (0.46 mL, 0.48 mmol) 在乙腈 (0.48 mL) 中的溶液冷却至 0° C，并将上述反应混合物加入到该体系中，同时将温度维持在 0-10°C。正如通过 TLC 测定的，在 10 分钟后反应完全。将该反应混合物倾入水 (5 mL) 中、用乙酸乙酯 (3 x 10 mL) 萃取并用盐水洗涤。分离有机相、用无水硫酸钠干燥并蒸发至干。通过使用甲醇/氯仿梯度的硅胶色谱法纯化粗产物而得到纯的产物 (0.078 g)，产率为 76%。

阿替林酯-全运铁蛋白缀合物的合成：在室温下使用 10 mmol/L 高碘酸钠将溶于 1 mL 0.1 mol/L pH 5.5 的乙酸钠的全运铁蛋白 (2 mg) 在其聚糖水平氧化 30 分钟。将该溶液上样到安装了 UV 监测器的短 Sephadex G-25 柱。用 0.1 mol/L pH 5.5 的乙酸钠洗脱该柱并收集蛋白质级分。向氧化的全运铁蛋白中加入过量的 ART-NH-NH₂ 溶液并将该反应体系在室温下保持过夜，同时轻轻振摇。然后将阿替林酯-全运铁蛋白缀合物溶液上样到 Sephadex G-25 柱上，以除去过量的 ART-NH-NH₂。用 pH 7.5 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱该柱，并收集蛋白质级分。将缀合物储存在 4°C 下。

通过疏水相互作用 HPLC 纯化阿替林酯-全运铁蛋白缀合物,得到均一的蛋白质缀合物。通过离子喷雾质谱法测定每个全运铁蛋白分子的青蒿琥酯分子数。

尽管已经解释和描述了本发明的优选实施方案,但是可以理解可以对其中进行各种改变而不会脱离本发明的实质和范围。

实施例 2

本实施例描述了本发明有代表性的组合物的制备方法,该组合物含有与血红蛋白分子共价连接的一个或多个青蒿素相关性内过氧化物分子。

为了用青蒿素衍生物共价修饰非糖基化的蛋白质,诸如血红蛋白,首先将青蒿素的羧酸衍生物、诸如 artelinic acid 活化为 N-羟基琥珀酰亚胺 (HOSu) 酯,以便与蛋白质表面上的赖氨酸残基反应。将 artelinic acid (4.2 mg, 0.01 mmol) 溶于二甲基甲酰胺 (DMF) (0.5 mL) 中,并将该溶液在冰浴中冷却。向该溶液中加入 N-乙基-N'-二甲氨基乙基碳二亚胺 (EDC) (1.5 mg, 0.01 mmol) 和 HOSu (1.1 mg, 0.01 mmol)。将该反应混合物在 0°C 下保持搅拌 2 小时以完全形成 artelinic acid 的 HOSu 酯。

将血红蛋白 (10 mg) 溶于 7.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (5 mL)。在 0°C 下将 artelinic acid HOSu 酯的 DMF 溶液缓慢加入到血红蛋白溶液中。将该反应混合物在 0°C 下保持搅拌 2 小时并在室温下再保持搅拌 2 小时。然后使该反应混合物上样到用 pH 7 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液平衡的 Sephadex G-25 柱上,并用相同的缓冲液洗脱该柱。经修饰的血红蛋白以外水体积洗脱下来。合并含有血红蛋白的级分,然后通过疏水相互作用 HPLC 纯化。通过离子喷雾质谱法测定与蛋白质连接的青蒿素衍生物数目。