

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 7/56

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 7/64 A61K 38/04

A61P 7/02

[21] 申请号 00810415.8

[43] 公开日 2002 年 7 月 31 日

[11] 公开号 CN 1361792A

[22] 申请日 2000.7.3 [21] 申请号 00810415.8

[30] 优先权

[32] 1999.7.15 [33] DE [31] 19933173.1

[86] 国际申请 PCT/EP00/06188 2000.7.3

[87] 国际公布 WO01/05810 德 2001.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.15

[71] 申请人 默克专利股份公司

地址 德国达姆施塔特

[72] 发明人 A·约恩茨克 B·蒂芬巴赫

S·古德曼 U·格罗斯

G·茨辛斯基

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 钟守期

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 作为整合蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 抑制剂的环肽衍生物

[57] 摘要

本发明涉及式 I 的新的肽衍生物: 环(Arg - X¹ - Asp - X² - X³ - X⁴ - X⁵ - X⁶ - R¹) I, 它是整合蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 的配体。其中, X¹ 是 Ser, Gly 或 Thr, X² 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe, X³ 是 Asp, Glu, Lys 或 Phe, X⁴ 是 Gly, Ala 或 Ser, X⁵ 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe, X⁶ 是 Arg, Har 或 Lys, R¹ 表示空缺或一个或多个 ω -氨基酸残基, 这个 ω -氨基酸残基长度为: 500 ~ 2500pm, 上述这些氨基酸还可以衍生化, 包括具有旋光活性的 D 型和 L 型氨基酸残基, 及其生理上可接受的盐和溶剂化物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 式 I 的多肽衍生物和它们在生理上能被接受的盐和溶剂化物
环 (Arg-X¹-Asp-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-R¹) I

其中:

- 5 X¹ 是 Ser, Gly 或 Thr
X² 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe
X³ 是 Asp, Glu, Lys 或 Phe
X⁴ 是 Gly, Ala 或 Ser
X⁵ 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe
10 X⁶ 是 Arg, Har 或 Lys
R¹ 表示空缺或一个或多个 ω -氨基酸残基, 这个 ω -氨基酸残基
长度为: 500 ~ 2500pm,

上述这些氨基酸还可以衍生化,

包括具有旋光活性的 D 型和 L 型氨基酸残基。

- 15 2. 据权利要求 1 的式 I 的多肽衍生物和它们在生理上能被接受的
盐类

环 (Arg-X¹-Asp-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-R¹) I

其中:

- X¹ 是 Ser, Gly 或 Thr
20 X² 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe
X³ 是 Asp, Glu, Lys 或 Phe
X⁴ 是 Gly, Ala 或 Ser
X⁵ 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe
X⁶ 是 Arg, Har 或 Lys
25 R¹ 表示空缺或选自下述群体中的 1-10 个氨基酸, 这个群体含有

Ala, Asn, Asp,
Arg, Cys, Gln, Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu,
Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr,
Val 和

H₂N-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_m-COOH,

其中 m, n 在任一种情况下是彼此相互独立的, 可取 0, 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11 或 12, 前提是 $m+n>0$;

上述提到的氨基酸仍能衍生化,

包括 D 型和 L 型的光学活性的氨基酸残基。

3. 据权利要求 1 和权利要求 2 的选自下面群体中的多肽化合物
5 和它们在生理上能被接受的盐和溶剂化物
这个群体含有:

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Gly-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha-Aha),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aee),

环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),

环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg- β -Ala),

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg- β -Ala),

4. 能用作药剂的权利要求 1 和权利要求 2 的式 I 的多肽化合物
10 和权利要求 3 的化合物, 和它们在生理上能被接受的盐类和溶剂化物。

5. 据权利要求 4 的药剂, 其用作一种抑制剂用来控制基于 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白受体的表达和病理学功能的病症。

6. 据权利要求 5 的药剂用来控制血栓形成, 心肌梗塞, 冠状心
15 脏疾病, 动脉硬化, 肿瘤, 骨质疏松症, 纤维化, 炎症, 感染, 牛皮癣和影响伤口愈合过程。

7. 药物制剂, 至少含有据权利要求 5 和 6 之一的一种药剂; 如果恰当的话, 和载体和/或赋形剂; 如果恰当的话, 和其它活性化合物。

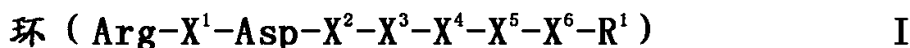
8. 权利要求 1 到 3 的多肽化合物和/或它们在生理上可被接受的盐类在生产用来控制基于 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白受体的表达和病理学功能的病症的一种药剂中的用途。

5 9. 权利要求 8 的用途，其中生产一种药剂用于控制血栓形成，心肌梗塞，冠状心脏疾病，动脉硬化，肿瘤，骨质疏松症，纤维化，炎症，感染，牛皮癣和影响伤口愈合过程。

说明书

作为整合蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 抑制剂的环肽衍生物

5 本发明涉及如式 I 所示的新的多肽衍生物, 及其在生理上能被接受的盐类和溶剂化物,



其中:

X^1 是 Ser, Gly 或 Thr

X^2 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe

10 X^3 是 Asp, Glu, Lys 或 Phe

X^4 是 Gly, Ala 或 Ser

X^5 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe

X^6 是 Arg, Har 或 Lys

15 R^1 表示空缺或一个或多个 ω -氨基酸残基, 这个 ω -氨基酸残基长度为: 500 ~ 2500pm.

上述这些氨基酸还可以衍生化, 包括具有旋光活性的 D 型和 L 型氨基酸残基。

本发明是基于发现新的具有好的价值属性化合物为目的, 特别是它们可以用作医药的生产。

20 已经发现根据本发明的化合物和它们的盐类有很高价值的药理属性和好的耐受性。

根据本发明的多肽能够用作整合蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 受体的有效抑制剂, 因而能作为多种疾病和病理状态的治疗手段。

25 整合蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 的其它抑制剂在 DE 19858857 中被 S. Kraft et al. 在 J. Biol. Chem. 274, 1979-85 (1999). 所描述。根据本发明的化合物被认为是所提到申请中的一种。

30 整合蛋白属于类型 I——跨膜受体中的异源二倍体家族, 这些跨膜受体在许多细胞—基质或细胞—细胞的连接过程中起着重要作用 (Tuckwell et al., 1996, Symp. Soc. Exp. Biol. 47)。整合蛋白大致可以分为三类: β_1 整合蛋白, 胞外基质的受体; β_2 整合蛋白, 在白细胞中可被激活并在炎症反应中被引发; β_v 整合蛋白, 影响在伤口愈合与其它病理过程中细胞的反应 (Marshall and Hart, 1996,

Semin. Cancer Biol. 7, 191) .

整合蛋白 $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_v\beta_6$ 都是与天然配体如纤连蛋白或玻连蛋白中的“精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸”(RGD)多肽序列结合, 含有 RGD 序列的可溶性多肽能够阻止这些整合蛋白与其相应的天然配体的相互作用。 $\alpha_v\beta_6$ 是相对较少见的整合蛋白 (Busk et al., 1992 J. Biol. Chem. 267(9), 5790), 它在上皮组织的修复反应中含量增高, 并优先结合天然基质分子纤连蛋白和肌腱蛋白 (Wang et al., 1996, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15(5), 664). $\alpha_v\beta_6$ 的生理和病理学功能还没有被精确阐明, 然而据猜测, 这个整合蛋白在涉及上皮细胞生理反应与病症 (如: 炎症反应、伤口愈合、肿瘤) 中起着重要作用。因此 $\alpha_v\beta_6$ 在伤口的角质形成细胞中表达 (Haapasalmi et al., 1996, J. Invest. Dermatol. 106(1), 42), 以此可以断定除了伤口愈合反应和炎症, 皮肤的其它生理性事件例如牛皮癣也能被所述的整合蛋白的激动剂或拮抗剂所影响。而且, $\alpha_v\beta_6$ 在呼吸道上皮细胞中也起作用 (Weinacker et al., 1995, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12(5), 547), 因此这个整合蛋白合适的激动剂/拮抗剂能够用于呼吸道失调症中, 例如: 支气管炎、哮喘、肺纤维化和呼吸道肿瘤。最后, 已知 $\alpha_v\beta_6$ 在肠道上皮组织中也起作用, 因此整合蛋白合适的激动剂/拮抗剂能用于胃/肠道的炎症、肿瘤和胃/肠道伤口的治疗上。

P.C. Brooks, R.A. Clark and D.A. Cheresh 在 Science 264, 569-71 (1994) 中描述了血管生成对血管整合蛋白与胞外基质蛋白之间相互作用的依赖性。

针对先前所提到的天然高分子量配体和抗体在治疗和诊断上的困难性, 因而本发明目的是找到 $\alpha_v\beta_6$ 潜在的、特异的和具有选择性的低分子量配体, 优选多肽, 它不仅能够用于上述提及的治疗领域, 还可以作为诊断剂和试剂。

已经发现根据本发明的多肽化合物及其盐类作为可溶性分子对携带有所述受体的细胞发挥作用, 或者, 如果它们结合于表面, 就是 $\alpha_v\beta_6$ 调节细胞粘着中的人工配体。首要的是, 它们作为 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白的抑制剂, 尤其抑制这个受体与其它配体的结合, 例如纤连蛋白的粘附, 这个反应可以被检测出来, 其方法可参见: J.W. Smith et al.,

1990, J. Biol. Chem. 265, 12267-12271.

更进一步发现了这种新物质有很好的药理活性和好的耐受性，可以用作药剂。在下面将详细的说明。

5 根据本发明的多肽化合物，如果运用现有技术，加上合适的标记物（如：生物素基团），就能用作体内和体外的诊断试剂。这些诊断试剂是用作上皮系统的生理状况的检测和定位。

10 本发明还包括了与至少一种其它活性化合物的组合；和/或其它活性化合物如细胞毒性化合物的缀合物；还有与用于 X-射线治疗和 PET 诊断的放射性标记的缀合物；而且还包括融合蛋白，这些融合蛋白或者带有标记蛋白如 GFP 或抗体，或者带有治疗蛋白如 IL-2。

15 尤其有活性的化合物是式 I 中的那些化合物，它们的八肽序列，环 (Arg-X¹-Asp-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶) 被 R¹ 所扩展，其中这些基团 X¹, X², X³, X⁴, X⁵ 和 X⁶ 有指定的意思。以环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg) [EMD 271588] 作为一个例子，其环扩展所带来的影响如图 I 所示。而 Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH₂ [EMD 271293] 则起着对照化合物的作用。一些如环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-R¹) 所示的多肽，从 R¹ 处算起的距离（估算）、Q 值 (IC₅₀[substance] / IC₅₀[EMD 271293]) 和 -log Q 在下表中给出。

表 I

R ¹	距离 [pm]	Q	-log Q
0	0	47	-1.672
Gly	370	2.1	-0.322
Abu	617	0.028	1.553
Gly-Gly	740	0.05	1.301
Aha	870	0.036	1.444
Aee	1078	0.038	1.420
Gly-Gly-Gly	1110	0.03	1.523
Abu-Abu	1235	0.03	1.523
Gly-Gly-Gly-Gly	1480	0.033	1.481
Aha-Aha	1740	0.036	1.444
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	1850	0.046	1.337
Gly-(Gly) ₄ -Gly	2220	0.05	1.301

从表 I 上可以看出图表所表示的意思。

- 5 即使间隔区 (spacer) R¹ 长度约有 500pm 处也能得到尤其有活性的化合物。

式 I 中特别优选的化合物是那些 R¹ 是一个或多个 ω -氨基酸残基, 这个 ω -氨基酸残基长度为: 600~2500pm, 非常优选的间隔区长度是: 600~2000pm。

- 10 ω -氨基酸残基可被理解为任何一种 ω -氨基酸, 其中优选下面群体中的氨基酸, 这个群体包括:

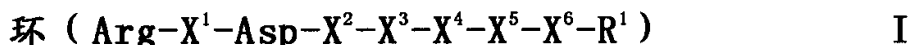
Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu, Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val
和 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$,

- 其中 m, n 在任一种情况下是彼此相互独立的, 可取 0, 1, 2, 3, 4, 5,
15 6, 7, 8, 9, 10, 11 或 12, 只要保证 $m+n>0$;

因此本发明优先涉及据权利要求 I 的式 I 中多肽衍生物及其生理

可接受的盐。

在式 I



其中:

- 5 X^1 是 Ser, Gly 或 Thr
 X^2 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe
 X^3 是 Asp, Glu, Lys 或 Phe
 X^4 是 Gly, Ala 或 Ser
 X^5 是 Leu, Ile, Nle, Val 或 Phe
 10 X^6 是 Arg, Har 或 Lys
 R^1 表示空缺或选自下述群体中的 1-10 个氨基酸, 这个群体含有

Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln,
 Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu, Lys, Met, Pen, Phe,
 Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val 和
 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH},$

- 其中 m, n 在任一种情况下是彼此相互独立的, 可取 0, 1, 2, 3, 4, 5,
 15 6, 7, 8, 9, 10, 11 或 12, 只要保证 $m+n>0$;

上述提到的氨基酸仍能衍变, 包括 D 型和 L 型的光学活性的氨基酸残基。

- 化合物及其盐的一些优选基团能够被下述子式 I_A 到 I_h 所表述, 而
 这些子式与式 I 相适应, 而那些在子式中没有更详细表明的基团具有
 20 在式 I 中指示的意思,

- a) X^1 是 Gly 或 Thr;
 b) X^1 是 Gly 或 Thr
 X^2 是 Leu;
 c) X^1 是 Gly 或 Thr
 25 X^2 是 Leu
 X^3 是 Asp 或 D-Asp;
 d) X^1 是 Gly 或 Thr
 X^2 是 Leu
 X^3 是 Asp 或 D-Asp

- 5 X⁴ 是 Gly 或 Ala;
 e) X¹ 是 Gly 或 Thr
 X² 是 Leu
 X³ 是 Asp 或 D-Asp
 X⁴ 是 Gly 或 Ala
 X⁵ 是 Leu;
 f) X¹ 是 Gly 或 Thr
 X² 是 Leu
 X³ 是 Asp 或 D-Asp
 10 X⁴ 是 Gly 或 Ala 或 Ser
 X⁵ 是 Leu
 X⁶ 是 Arg;
 g) X¹ 是 Gly 或 Thr
 X² 是 Leu
 15 X³ 是 Asp 或 D-Asp
 X⁴ 是 Gly 或 Ala 或 Ser
 X⁵ 是 Leu
 X⁶ 是 Arg
 R¹ 是选自下述群体中的 1-10 个氨基酸, 这个群体含有

20

Ala, Asn, Asp, Arg,
 Cys, Gln, Glu, Hcy, His, Hse, Ile, Leu,
 Lys, Met, Pen, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp,
 Tyr, Val 和 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$,

其中 m, n 在任一种情况下是彼此相互独立的, 可取 0, 1, 2, 3, 4, 5,
 6, 7, 8, 9, 10, 11 或 12, 只要保证 $m+n>0$;

- 25 h) X¹ 是 Gly 或 Thr
 X² 是 Leu
 X³ 是 Asp 或 D-Asp
 X⁴ 是 Gly Ala 或 Ser
 X⁵ 是 Leu
 X⁶ 是 Arg

R¹ 选自 Gly, β -Ala, Abu 或 Aha 中的 1-6 个氨基酸。

本发明特别涉及选自下面群体中的多肽化合物, 这个群体由下面环状多肽及其它们的在生理上能被接受的盐类组成。

环 (Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Gly-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Gly-Gly),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha-Aha),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aha),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Aee),
 环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu),
 环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg- β -Ala),
 环 (Arg-Gly-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg- β -Ala),

5

上文和下面涉及的氨基酸残基的缩写词代表了下述的氨基酸。

	Abu	4-氨基丁酸
	Aee	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{COOH}$
	Aha	6-氨基己酸
10	Aib	α -氨基异丁酸
	Ala	丙氨酸
	Asn	天门冬酰胺
	Asp	天门冬氨酸
	Arg	精氨酸
15	Bgl	C $_{\alpha}$ -叔丁基氨酸
	Cys	半胱氨酸
	Dab	2,4-二氨基丁酸
	Dap	2,3-二氨基丙酸
	Gln	谷氨酰胺
20	Glp	焦谷氨酸
	Glu	谷氨酸
	Gly	甘氨酸
	Har	高精氨酸

	Hcy	高半胱氨酸
	His	组氨酸
	Homo-Phe	高苯丙氨酸
	Hse	高丝氨酸
5	Ile	异亮氨酸
	Leu	亮氨酸
	Lys	赖氨酸
	Met	甲硫氨酸
	Nal	萘-2-基丙氨酸
10	Nle	正亮氨酸
	Orn	鸟氨酸
	Pen	青霉胺
	Phe	苯丙氨酸
	Phg	苯基甘氨酸
15	4-Hal-Phe	4-卤代苯丙氨酸
	Pro	脯氨酸
	Ser	丝氨酸
	Thr	苏氨酸
	TIS	三异丙基硅烷
20	Trp	色氨酸
	Tyr	酪氨酸
	Val	缬氨酸

另外, 随后的缩写词代表了下面的意思。

	Ac	乙酰基
25	BOC	叔丁氧羰基
	BSA	牛血清白蛋白
	CBZ 或 Z	苄氧羰基
	DCCl	二环乙基碳二亚胺
	DCM	二氯甲烷
30	DIEA	二异丙基乙胺
	DMF	甲基甲酰胺
	EDC1	N-乙基-N,N'-(二甲胺基丙基)-碳二亚胺

	Et	乙基
	FCA	羧酸荧光素
	FITC	异硫氰酸荧光素
	Fmoc	9-芴甲氧羧酸
5	FTH	硫脲荧光素
	HOBt	1-羟基苯并三唑
	Me	甲基
	MBHA	4-甲基二苄甲基胺 4-methylbenzhydrylamine
	Mtr	4-甲氧基-2, 3, 6-三甲苯磺酰基
10	HONSu	N-氢氧基丁二酰亚胺
	OBu ^t	叔丁酯
	Oct	辛酰基
	Ome	甲酯
	Oet	乙酯
15	Pbf	2, 2, 4, 6, 7-五甲基苯并二氢呋喃-5-磺酰基
	Pmc	2, 2, 5, 7, 8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基
	POA	苯氧乙酰基
	Sal	水杨酰
	TBS ⁺⁺	二价 Tris 缓冲盐溶液
20	TBSA	TBS+BSA
	TBTU	四氟硼酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3-四甲基脲鎓
	TFA	三氟乙酸
	Trt	三苯甲基

如果上文所提到的氨基酸能够出现一种或多种对映异构体，那么
 25 它们所有这些构型和它们的混合物（如 DL 构型）都被包括在上文和
 下面中。另外，能够给这些氨基酸提供本质上已知的合适的保护基
 团。

本发明还涉及水合物和溶剂化物，例如这些化合物中的醇化物。

所谓的前体药物衍生物包括在据本发明的化合物中，这些衍生物
 30 是通过修饰而成的，而用于修饰的基团有烷基、酰基、糖基或寡肽，
 它们在体内会迅速断裂释放出根据本发明的活性化合物。这些还包括
 了据本发明的化合物中生物可降解的多聚高分子衍生物，这在 Int. J.

standard works such as Houbenweyl, Methoden der orfanischen Chemie (Methods of Organic Chemistry), Georg-Thieme Verlag, Stuttgart) 中有所描述。即是在已知并适合所述反应的条件下进行。这些方法还可以用于本身已知的各种变体上。

5 据本发明的化合物优选用固相合成法制备和接下来的分离和纯化。Jinczyk und Meienhofer (Peptides, Proc. 8th Am. Pept. Symp. Eds. V. Hruby and D. H. Rich, Pierce Comp. III, pp. 73-77, 1983, 或 Angew. Chem. 104, 1992, 375) 中有所描述或参见 Merrified (J. Am. Chem. Soc. 94, 1972, 3102)。

10 据本发明的多肽能在固相(手工或自动合成仪)上制备,通过 Fmoc 策略运用酸不稳定的侧链保护基团和 RP-HPLC 的纯化方法。峰均质性能通过 RP-HPLC 检测,而物质的鉴定则可用 FAB-MS。

另外,这些多肽能通过通常的氨基酸和多肽合成方法制备,例如从 Novabiochem-1999 Catalog & Peptide Synthesis Handbook of
15 Calbichem- Novabiochem GmbH, D-65796 Bad Soden; 从许多标准的工作和已公布的专利申请上,这些方法早已被熟知。

接下来可利用逐步耦联和片断缩合,使用不同的 N-端、C-端和侧链保护基团,而它们是优选用于正交清除的,可以使用不同缩合剂保证耦联步骤得以实施,这些缩合剂有碳二亚胺、碳二亚胺咪唑、脲脲
20 类如: TBTU, 混合酸酐法, 酰基卤或活性酯法。活性酯可以在原位方便地形成,例如通过添加 HOBt 或 N-羟基丁二酰亚胺。

含有侧链保护基团的线性前体分子的环化同样可以用这样的缩合反应来实施。例如在 DE 43 10 643 或在 Houben-Weyl, 1.c., Volume 15/II, 1 到 806 页(1974)有描述。

25 不同的树脂和锚功能团能应用于固相多肽的合成中,树脂可以聚苯乙烯或聚丙烯酰胺为基础;而锚功能团如王氏树脂(Wang), O-三氯苯甲基能用于肽酸的制备,而 aminoxanthenoxy 用于肽酰胺的制备。

生物素或荧光标记多肽/蛋白也同样可以用标准的方法进行制
30 备。(如: E. A. Bayer and M. Wilchek, Methods of Biochemical Aanlysis Vol. 26, The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology;和 Handbook of Fluorescent Probes

and Research Chemicals, 6 Edition, 1996, by R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc.;或者见: WO 97/14716)。

当然据本发明的多肽也能通过溶剂解而从它们的功能性衍生物上解离下来, 特别是通过水解作用或氢解作用。优选的用于溶剂解或氢解的起始物质是那些取代了一个或多个游离氨基和/或羟基而含有相应被保护的氨基和/或羟基, 尤其是那些取代了与 N 原子相连的 H 原子而带上一个氨基保护基团或者取代了羟基上的 H 原子而带上了一个羟基保护基团。同样, 可以通过一个保护基团如酯来取代羧酸“CO-OH”的羟基功能团, 从而保护了羧酸。

通常都知道, 氨基保护基团是指那些能通过化学反应恰当的保护(或封闭)某一氨基, 而且这些基团可以在分子内的其它位置经过特定的化学反应而被轻易的除去。羟基保护基团是同样的意思, 即是指那些能通过化学反应恰当的保护某一羧基, 而且这些基团可以在分子内的其它位置经过特定的化学反应而被轻易的除去。这些化合物从它们功能性衍生物上解离下来依靠于保护基团, 例如利用各种强酸, 很方便的应用 TFA 或高氯酸, 也可利用其它的无机强酸, 如: 盐酸或硫酸; 有机强羧酸如: 三氯乙酸(TCA)或磺酸如苯或对甲苯磺酸。氢解可以除去的保护基团(如 CBZ 或苄基)例如能在一种催化剂(如在惰性金属催化剂如钯, 方便的支持剂如碳)存在下, 用氢进行处理而除掉。

N 端和侧位氨基典型的保护基团是苄氧羰基(Z)、叔丁基羰基(BOC)、Fmoc、而那些 C 端或 Asp/Glu 侧链的保护基团是 O-prim-烷基(如: OMe 或 OEt)、O-叔烷基(如: OBut)或 O 苄基。例如 Z, BOC, NO₂, Mtr, Pmc 或 Pdf 对 Arg 的胍基是适合的。醇基能用苄基、三烷基或三苯甲基来保护。

用在二氯甲烷中的三氯乙酸(TFA)或在 15~30°的 dioxane 中用约 3~5NHCl, BOC, OBut 和 Mtr 能优先除去, 而在 15~30°的二甲基甲酰胺(DMF)中用约 5~50%的二甲基胺、二乙基胺或吡啶能优选的除去 FMOC 基团。

三苯甲基能用来保护组氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺和半胱氨酸。去除反应依据最终产物的不同而进行实施。用三氯乙酸(TFA)/10% 苯硫酚, 三苯甲基能从上述所有氨基酸上除去, 而当用三氯乙

酸 (TFA) / 茴香醚或三氟乙酸 (TFA) / 硫代茴香醚, 只有 His, Asn 和 Gln 上的三苯甲基被除去, 而 Cys 侧链上的保留下来。

氢解可去除的保护基团 (如: CBZ 或苯基) 例如能在一种催化剂 (如在惰性金属催化剂如钯, 方便的支持剂如碳) 存在下, 用氢进行处理而除掉。其中合适的溶剂是上面所提到的, 特别是醇类如: 甲醇、乙醇或者酰胺类如 DMF。作为一种常规, 氢解在约 0~100°、约 1~200bar 下进行, 优选 20~30°、1~10bar。例如 CBZ 基团的氢解能在甲醇溶液中的 5~10% Pd/C 上很容易的进行, 或者应用甲酸铵 (代替氢) 在 20~30° 的甲醇/DMF 中的 Pd/C 上进行。

如早已所述, 根据本发明的多肽包括它们生理上可被接受的盐类, 这些盐类也同样可以用标准的方法进行制备。因此, 根据本发明的化合物的一个碱基能转变成为结合酸的加成盐, 例如在惰性溶剂中混合等量的碱和酸进行反应, 这些溶剂如: 甲醇及其接下来的汽化。适合这个反应的酸类尤其是那些能产生在生理上可被接受的盐类的无机酸可以被应用, 例如: 硫酸、硝酸、氢卤酸如盐酸或氢溴酸、磷酸如 [正] 磷酸、氨基磺酸; 还可以是有机酸, 特别是: 脂肪酸、脂环酸、araliphatic、芳香酸或杂环单或多元羧酸、磺酸或硫酸, 如甲酸、乙酸、丙酸、新戊酸、二乙基乙酸、丙二酸、丁二酸、庚二酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、葡萄糖酸、抗坏血酸、烟酸、异烟酸、甲基或乙基磺酸、乙基二磺酸、2-羟基乙基磺酸、苯磺酸、对甲苯亚磺酸、萘单和萘双磺酸、十二烷基硫酸。生理上不可被接受酸的盐类, 如: 苦味酸盐能用于根据本发明的化合物的分离和/或纯化, 另一方面, 根据本发明的化合物的酸类能通过和一种碱反应而转变成生理上可被接受的金属盐或铵盐。既然如此, 可能的盐类特别是钠、钾、镁、钙和铵盐, 此外还有取代铵盐, 如: 二甲基、二乙基或二异丙基铵盐, 单乙醇、二乙醇或二乙醇异丙基铵盐, 环己基或二环己基铵盐、二苄基 1, 2-乙二铵盐, 另外还有与精氨酸或赖氨酸形成的盐类。

如上所述, 据本发明的多肽化合物能够用作人药和兽药中的药物活性物质, 特别是在涉及上皮细胞功能失调的预防和/或治疗上。在此文尤其要强调的是皮肤、呼吸道组织、胃和肠部位功能失调、炎症或伤口愈合过程。例如: 中风、心绞痛、肿瘤、溶骨性疾病如骨质

疏松症、病理性血管生成症如炎症纤维化、特别是肺的纤维化，
5 opthalmological，糖尿病性视网膜病，视网膜黄斑变性，近视，眼
网状内皮细胞真菌病，风湿病样的关节炎，骨关节炎，风疹性青光眼，
溃疡性结膜炎，节段性回肠炎，动脉粥样硬化，牛皮癣，在急性肾功
能失调、肾炎、微生物感染和脑脊髓多发性硬化中血管成形术后的再
狭窄。

本发明相应的涉及上文和下面定义式中的多肽化合物和权利要求
所包括它们生理上可被接受作为药剂、诊断剂和试剂的盐类。

10 本发明尤其涉及了作为抑制剂的合适药剂，这些抑制剂能控制那
些直接或间接地基于表达 $\alpha_v\beta$ 。整合蛋白受体的功能失调症。因此特
别是在生理性血管生成失调症，血栓形成，心肌梗塞，冠状心脏疾病，
动脉硬化，肿瘤，骨质疏松症，炎症、感染和影响伤口愈合过程。

还涉及合适的药学制剂，它们至少包含式 I 中的一种药剂，如果
可能的话，和载体和/或赋形剂。

15 另外，本发明还涉及权利要求书和说明书的多肽化合物的应用和
/或其生理上可被接受的盐类在生产用于控制那些直接或间接地基于
表达 $\alpha_v\beta$ 。整合蛋白受体的功能失调症药物中的应用，尤其是在生理
性血管生成失调症，血栓形成，心肌梗塞，冠状心脏疾病，动脉硬化，
肿瘤，骨质疏松症，炎症、感染和影响伤口愈合过程。据本发明的药
20 物或包含它们的药物组合物能用作人药和兽药。可用的载体是那些无
机或有机物质，这些物质适于在肠道或非肠道中给药，或局部应用或
通过吸入喷雾的形式给药而不与其它新物质发生反应。这些物质例
如：水、植物油、苯甲醇、烷撑二醇、聚乙二醇、乙二醇三醋酸酯、
明胶、碳水化合物如乳糖或淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、凡士林。尤其是
25 片剂、丸剂、外包片剂、胶囊、粉剂、粒剂、糖浆剂、用于口服的汁
或滴剂、肠道给药的栓剂、溶液、特别是油性或水溶性溶液，另外，
混悬液、乳剂或植入片被用作肠胃外给药，软膏、乳膏和粉剂被用于
局部。此新颖的化合物还可以被冷冻而且得到的冻粉还可以被利用，
例如用于注射试剂的生产。这些指定的制剂能够被固定化和/或包含
30 有赋形剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂和/或湿润剂、乳化剂、影响渗
透压的盐类、缓冲剂、着色剂、调味料和/或更具活性的物质如：一
种或多种维他命。

作为一种喷雾吸入给药，这些喷雾剂可以以溶解或使其悬浮在推进剂或推进剂混合物（如： CO_2 或氟氯碳氢化合物）的方式包含活性物质。既然这样，这些活性物质很方便的以微粒体的形式使用，其中可以添加一种或多种生理上能被接受的溶剂化物如：乙醇。可吸入溶液能在通常的吸入器的助推下给药。

通常，据本发明的物质可以其它已知、商业上可得的多肽的类似方式（参见：US-A-4 472 305）进行施药，特别是剂量在 $0.05 \sim 500\text{mg}$ 。更优选 $0.5 \sim 100\text{mg}$ 每剂量单位。优选的每天剂量约为： $0.01 \sim 20\text{mg}$ 每公斤体重。然而，每个病人的特定剂量受各种因素影响，如：特定药物的药效、年龄、体重、整体健康状况、性别、节食、服药时间和给药途径，排泄速率、诊断所涉及对特定病症的药物间复合反应和病症的严重性。优选非肠道给药。

此外，据式 I 的新化合物能用于分析生物学和分子生物学。

据式 I 的新化合物，其中 X 是一种荧光染色基团，通过 $-\text{CONH}-$ ， $-\text{COO}-$ ， $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$ ， $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ， $-\text{SO}_2\text{NH}-$ 或 $-\text{NHCO}-$ 相连，它们能用作荧光活化细胞分选技术（FACS）和荧光显微镜中的诊断标记。

标记化合物应用在荧光显微镜中的例子可参见：Y.-L. Wang and D.L. Taylor, Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, parts A+B, Academic Press, Inc. 1989.

据本发明的新化合物也能够作为整合蛋白的配体用来制备纯化的整合蛋白的亲合层析柱。亲和素衍化的支持物复合体如：琼脂糖和此新化合物能够用已知的方法进行制备（例如：E.A. Bayer and M. Wilchek, Methods of Biochemical Analysis Vol 26, The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology）。这儿合适的多聚支持物是那些多聚固相物质，它们具有优先亲水性和目前已知多肽化学性质，例如交连多糖如：纤维素、琼脂糖凝胶或 Sephadex[®]，丙烯酰胺，基于聚乙二醇或 Tentakel Polymers[®] 的多聚物。

最后本发明还包括了编码多肽区的重组 DNA 序列，这个多肽区含有据本发明的多肽的结构基元。

这种类型的 DNA 能够以微粒体的形式转进细胞内，参见：Ch.

Andree et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 12188-12192(1994),
或这个转移能够被其它的赋形剂如脂质体所提高 (A. I. Aronsohn and
J.A. Hughes J. Drug Targeting, 5, 163-169 (1997)).

5 这种类型的 DNA 的转移通过杆状病毒能够相应的用在酵母中，或
者在哺乳动物细胞中生产据本发明的多肽物质。

如果动物或人体感染了这种类型的重组 DNA，本发明的多肽能在
这些被感染的细胞中最终形成并能够迅速地结合于如肿瘤细胞的 $\alpha_v\beta_3$
整合蛋白受体上，并阻断它。相应的重组 DNA 能通过已知和常规
10 的技术进行制备，然而也能够以包含有病毒外壳蛋白编码序列片断的
病毒 DNA 形式存在。通过以重组优选非致病的这种类型病毒感染寄主
组织，那些表达整合蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 的寄主细胞能被优先受到攻击（寻
靶）。

合适的病毒如腺病毒已经许多次被用作向哺乳动物细胞转移外
源基因的载体。一系列特性确保它们成为基因治疗的良好候选者。
15 可参见：S.J. Watkins et al. Gene Therapy 4, 1004-1012(1997);
(或另见：J. Engelhardt et al. Hum. Gene Ther. 4, 759-
769(1993))。

从 (A. Fasbender et al. J. Clin. Invest. 102, 184-
193(1998)) 中可以看出，通过病毒和非病毒载体进行基因治疗中的
20 的一个共同问题是基因转移效率的限制性。通过在腺病毒的外壳蛋白上
外加上述 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白的配体序列，提高了转移效率，如已成功地
提高了胆囊纤维化跨膜蛋白质电导调节剂 (CFTR) cDNA 的转移效率。

同 T. Tanaka et al. (Cancer Research 58, 3362-3369(1998))
的工作相似，只是代替了血管抑制素的 DNA，据本发明的序列的 DNA
25 也能通过逆转录病毒或腺病毒载体应用于细胞转染中。

据本发明的多肽还能够用于用以细胞培养物的传染的含有脂/多
肽/DNA 的脂质体复合物和用在人体基因治疗含有脂/DNA (无多肽) 的
脂质体复合物中。含有脂/多肽/DNA 的脂质复合体的制备参见：Hart
S.L. et al. 1998: Lipid-mediated Enhancement of Transfection
30 by a Non-Viral Integrin-Targeting Vector. Human Gene Therapy
9, 575-585.

脂/多肽/DNA 的脂质复合体的制备可利用下述的贮存液：1 μ g/ μ l

脂转染试剂 (DOTMA (N-[1-(2,3-二油氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵) 和 DOPE (二油基磷酸酯酰乙醇胺) 的等量混合物), 10 μ g/ml 质粒 DNA 和 100 μ g/ml 多肽。为此, DNA 和多肽都是溶解在细胞培养基中。

5 这个脂质复合体是通过混合特定重量比 (例如: 脂:多肽:DNA = 0.75:1:4) 的这三种而制备的。用于人类基因治疗的脂质体 DNA 复合物已经有所描述, 见 (Caplen N. J. et al. 1995: Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis, Nature Medicine 1, 39-46)。

10 因此, 本发明还涉及利用基因释放系统中相应修饰过的重组 DNA, 优选是病毒 DNA, 用于控制那些基于直接或间接地表达 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白受体的各种疾病。因此尤其是病理性血管生成失调症、血栓形成、心肌梗塞、冠状心脏失调症、动脉硬化、肿瘤、骨质疏松症、炎症、感染和影响伤口愈合的过程。

上文和下面的所有温度都是指摄氏度。

15 HPLC 分析 (保留时间 R_t) 通过下述系统实施:

5 μ m LichroSpher 60 RP-Select B(250-4) 柱, 在水/0.3% 三氟乙酸中 50 分钟 0~80% 的 2-丙醇的浓度梯度, 以 1ml/min 的流速和在 215nm 进行检测。

质谱 (MS): EI (电子碰撞电离) M^+

20 FAB (快原子轰击) $(M+H)^+$

实施例 1

制备和纯化据本发明的多肽

通常, 制备和纯化可用 Fmoc 策略通过在酸不稳定树脂上对酸不稳定侧链的保护, 应用商购“连续流动”多肽合成仪, 可参见: Haubner
25 et al. (J. Am. Chem. Soc. 118, 1996, 17703)。

环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) [EMD 272914]

2.7g Fmoc-Abu-OH (Bachem B-1910) 悬浮在 150ml 二氯甲烷中, 加 10ml DMF 直到它们完全溶解至清亮。加入 5.6ml 二异丙基乙胺, 此
30 溶液浇注 12.0g O- 氯三苯甲基聚苯乙烯树脂 (1.14mmol/g, Bachem D-196512), 并在室温进行摇动。

5 小时后, 树脂通过抽吸滤干, 并分别用 300ml 的

DCM/MeOH/DIEA=17/2/1, DCM, DMF, DCM 和 MeOH 清洗。除去各种溶剂后, 得到了 14.55g 的 Fmoc 氨基树脂。平均, 三份 Fmoc 测定表明能负载 (loading) 541 μ mol/g 的 Fmoc-Avu-O-oClTrt-树脂。

0.7g Fmoc-Abu-O-oClTrt-聚苯乙烯树脂连续两次经受了在商业合成仪中 4.1ml 的 DMF 中溶有 0.30gTBTU, 0.315ml 乙基二异丙胺和 Fmoc 氨基酸的双偶联技术中的偶联步骤, 其典型的程序可参见 (Milligen 9050 Pep Synthesizer™ 合成仪和手册, 1987), 每种条件下都是 30min. 洗脱在 DMF 中持续 10 分钟, 裂解在哌啶/DMF (1:4 体积比) 中, 5 分钟, N-端乙酰化(盖帽)用乙酰酐/哌啶/DMF (2:3:15 体积比), 15 分钟。

首先是氨基酸 Fmoc-Arg(Pmc), 接着 Fmoc-Leu, 接着 Fmoc-Ala, 接着 Fmoc-D-Asp(Obut), 接着 Fmoc-Leu, 接着 Fmoc-Asp(OBut), 接着 Fmoc-Arg(Pmc), 最后是 Fmoc-Abu. 从 Fmoc-Abu-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-O-oClTrt-聚苯乙烯树脂上去掉 Fmoc 保护基团后, 用 DMF 和异丙醇洗, 室温真空干燥后就得到了 0.9g 的 Abu-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(Obut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-O-oClTrt-聚苯乙烯树脂。

在室温下用 20ml 三氯乙醇/二氯甲烷/醋酸 (2: 6: 2 体积比) 处理这个肽基树脂 2 小时, 过滤, 真空浓缩, 研磨得到了 0.19g 的侧链被保护的多肽 Abu-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-OH。

在 30 分钟内滴加此产物的 DMF 溶液 (100mg 多肽/15mlDMF) 到已经搅拌好的 50mlDMF/100mg 多肽的 TBTU/HOBt/DIPEA (10:10:11 当量) 的调和溶液中, 进一步搅拌 1 小时, 就得到了环化物。经过用水浓缩和析出, 得到了 0.15g 的粗制的环状多肽, 环[Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-D-Asp(OBut)-Ala-Leu-Arg(Pmc)-Abu-Abu]。室温用三氯乙酸/水/TIS (94: 3: 3 体积比) 处理 2 小时, 真空浓缩和在二乙酯醚研磨得到了 85mg 的环[Arg-Thr -Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu]沉淀物。

在 0.3% 的三氯乙酸用 4% 到 24% 的 2-丙醇梯度溶液通过 RP-HPLC (Lichrosorb RP 18 (250-25, 7 μ m, Merck KGaA)) 以 10ml/min

的流速持续一个小时来纯化此产物，流出物的评估应用紫外流通式光度计在 215 和 254nm 处进行，得到 51mg 的产物，FAB 1067; Rt19.0.

下面的物质式通过相似的方法制备的：

编码 (EMD)	序列	MW (g/mol)	FAB	Rt
271312	环 (RTDLDSLRL)	957.1	958	15.10
271578	环 (RTDLdSLRL)	957.1	957	17.51

编码 (EMD)	序列	MW (g/mol)	FAB	Rt
271579	环 (RTDLdALR)	941.1	941	16.64
271586	环 (RGDLDSLRL)	913.0	913	17.95
271587	环 (RGDLdSLR)	913.0	913	17.24
271588	环 (RGDLdALR)	897.0	897	19.60
271589	环 (RGDLdGLR)	882.9	883	16.68
271590	环 (RGDLd- β -Ala-LR)	897.0	897	15.47
271591	环 (RGDLdALRG)	954.1	954	16.79
271592	环 (RGDLdALRGG)	1011.1	1011	17.83
271593	环 (RGDLdALRGGG)	1068.2	1068	17.79
271594	环 (RGDLdALRGGGGG)	1239.3	1239	17.30
272914	环 (RGDLdALR-Abu-Abu)	1067.2	1067	19.00
272966	环 (RTDLdALRGGG)	1112.2	1113	17.14
272967	环 (RTDLdGLRGGG)	1098.2	1099	19.00
272968	环 (RTDLdALRGGG)	1112.2	1113	17.39
272969	环 (RTDLdGLRGGG)	1098.2	1099	16.88
272970	环 (RGDLdALRG)	954.1	955	17.32
272971	环 (RaDLdALRGGG)	1082.2	1083	18.26
272972	环 (RGDLdALRGGG)	1082.2	1083	18.23
272958	环 (RGDLdALR-Aha-Aha)	1123.3	1123	19.38
272959	环 (RGDLdALR-Aha)	1010.2	1010	20.63
272960	环 (RGDLdALR-Aee)	1042.2	1042	18.92
272961	环 (RGDLdALRGGGG)	1125.2	1125	17.56
272962	环 (RGDLdALRGGGGG)	1182.3	1182	17.52
272963	环 (RGDLdGLRGGG)	1054.1	1054	15.59
272964	环 (RGDLdALRGGG)	1068.2	1069	16.84
272965	环 (RGDLdGLRGGG)	1054.1	1055	16.03
273028	环 (RTDLdALR-Aha)	1072.2	n.d.	19.30
273033	环 (RTDLdALR-Abu)	1044.2	n.d.	16.72
273035	环 (RGDLdALR-Abu)	1000.1	n.d.	16.96
273038	环 (RTDLdALR-Aha-Aha)	1185.4	n.d.	20.46
273040	环 (RTDLdALR-Abu-Abu) × 2 TFA	1111.3	n.d.	18.75
304219	环 (RTDLdALR- β Ala)	1012.1	1012	19.4
304218	环 (RGDLdALR- β Ala)	968.1	968	18.7
329400	环 (RGDLdALR)	811.9	812	21.15

编码 (EMD)	序列	MW (g/mol)	FAB	Rt
329412	环 (RTDLdALR-Abu-Abu)	1111.3	1112	20.31
329402	环 (RGDLdALAGGG)	983.1	984	20.48
329399	环 (NMeArg- GDLaALRGGG)	1038.2	1039	19.66
329398	环 (R-NMeGly- DLaALRGGG)	1038.2	1039	19.76
326397	环 (RGD-NMeLeu- aALRGGG)	1038.2	1039	20.22
329396	环 (RGDL-[D-NMeAla]- ALRGGG)	1038.2	1039	20.55
329395	环 (RGDLa-NMeAla- LRGGG)	1038.2	1039	21.35
329394	环 (RGDLaA-NMeLeu- RGGG)	1038.2	1039	18.87
329393	环 (RGDLaAL-NMeArg- GGG)	1038.2	1039	20.64
	环 (RGDLdAAR)			
	环 (RGDLdAARGGG)			

氨基酸的命名原则是参考了 Eur. J. Biochem. 138, 9-37 (1984)

小写字母表示 D 型氨基酸

5 n. d. 表示不确定

实施例 2

$\alpha_v\beta_6$ /纤连蛋白受体结合实验:

已制备好的本发明的多肽和在溶液中竞争性起作用的纤连蛋白一起结合到固定化的 $\alpha_v\beta_6$ 受体上, Q 值被作为这种多肽对 $\alpha_v\beta_6$ 结合选择性的一种检测手段。这儿的 Q 值是用被测多肽的 IC_{50} 值与标准多肽 IC_{50} 值的商来计算的。标准多肽是线性分子: Ac-RTDLDSLRLR-NH₂ (代码 EMD 271293) (参见专利, Pytela et al. Science 231, 1559, (1986))。结合实验的细节如下所述:

可溶性 $\alpha_v\beta_6$ 受体在微滴定皿上的固定通过下列步骤完成, 可

- 将此蛋白质溶液稀释在 TBS++ 中，并在 4℃ 温育过夜（100μl/孔）。非特异的结合位点被用 TBS++ 中 3% 的牛血清白蛋白（200ul/孔）通过温育（37℃，2 小时）所阻断。过量的牛血清白蛋白用 TBSA++ 洗三次而去除。多肽在 TBSA++ 中被连续稀释（1: 10）并和生物素化的纤连蛋白一起与固定化的整合蛋白温育（每孔 50ul 的多肽 + 50ul 的配体；37℃；2 小时）。未结合上的纤连蛋白和多肽用 TBSA++ 洗三次而除去。结合上的纤连蛋白用碱性磷酸酶耦联的抗生物素抗体（Biorad）37℃ 温育 1 小时来检测（TBSA++ 中，1: 20,000；100ul/孔）。用 TBSA++ 洗三次后，通过与底物溶液（5mg 磷酸硝基苯，1ml 乙醇胺，4ml 水；100μl/孔）的温育（25℃，黑暗中，10-15min）用比色法进行检测。此酶反应可以通过添加 0.4M NaOH（100ul/孔）而终止。色彩强度可由 ELISA 检测装置在 405nm 处决定，并与零值比较。那些没有被受体包被的孔定为零值。Ac-RTDLSLR-NH₂ 被用作一个标准。被测多肽的 IC₅₀ 值可从图上读出，用这个值加之标准多肽的 IC₅₀ 值就可以决定据本发明的多肽的 Q 值。

Q 值 = 被测多肽的 IC₅₀ 值 / 标准多肽的 IC₅₀ 值

通过重复实验来计算 Q 值。

所述实验的结果总结在下面的表 1 中：

表 1

 $\alpha_v\beta_6$ /纤连蛋白受体结合实验的结果

编码 (EMD)	序列	Q值 = 被测多肽的 IC ₅₀ /EMD 271293 的 IC ₅₀
271293	Ac-RTDLDSLRL-NH ₂	1.00 (=75 nM)
271586	环 (RGDLDSLRL)	26
271587	环 (RGDLdSLRL)	88
271588	环 (RGDLdALRL)	47
271589	环 (RGDLdGLRL)	19
272970	环 (RGDLDALRG)	6.7
272964	环 (RGDLDALRGGG)	0.037
272965	环 (RGDLdGLRGGG)	0.16
272972	环 (RGDLdALRGGG)	0.05
271593	环 (RGDLdALRGGG)	0.03
272963	环 (RGDLdGLRGGG)	0.084
271590	环 (RGDLd- β Ala-LR)	233
271591	环 (RGDLdALRG)	2.1
271592	环 (RGDLdALRGG)	0.05
271594	环 (RGDLdALRGGGGGG)	0.05
272914	环 (RGDLdALR-Abu-Abu)	0.03
272958	环 (RGDLdALR-Aha-Aha)	0.036
272959	环 (RGDLdALR-Aha)	0.036
272960	环 (RGDLdALR-Aee)	0.038
272961	环 (RGDLdALRGGGG)	0.033
272962	环 (RGDLdALRGGGGG)	0.046
273035	环 (RGDLdALR-Abu)	0.028
271312	环 (RTDLDSLRL)	8
271578	环 (RTDLdSLRL)	104
271579	环 (RTDLdALRL)	12
272966	环 (RTDLdALR-GGG)	0.05
272967	环 (RTDLdGLR-GGG)	0.15
272968	环 (RTDLDALR-GGG)	0.14
272969	环 (RTDLdGLR-GGG)	0.18

编码 (EMD)	序列	Q值 = 被测多肽的 IC ₅₀ /EMD 271293 的 IC ₅₀
273028	环 (RTDLdALR-Aha)	0.015
273033	环 (RTDLdALR-Abu)	0.043
273038	环 (RTDLdALR-Aha-Aha)	0.015
273040	环 (RTDLdALR-Abu-Abu)	0.014
272971	环 (RaDLdALR-GGG)	8.2

下面的例子涉及药剂制备:

实施例 A: 注射剂小瓶

- 5 100g 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 和 5g 的磷酸氢二钠溶解在 3 升的双蒸水中, 用 2N 的盐酸调节 pH 值至 6.5, 无菌过滤, 分装到注射用的小瓶中, 无菌条件下冻干和封口。每个小瓶含有 5mg 的活性化合物。

实施例 B: 栓剂

- 10 20g 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 混合物与 100g 的大豆卵磷脂和 1400g 的椰子油融合, 浇注模子至其冷却。每个栓包含 20mg 的活性化合物

实施例 C: 溶液

- 15 一种溶液由 1g 环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 和 9.38g NaH₂PO₄ · 2H₂O, 28.48g NaH₂PO₄ · 12H₂O 和 0.1g 洁而灭溶解在 940ml 的双蒸水中, 调节 pH 值至 6.8, 补足至 1 升, 并辐射灭菌。这种溶液能用作眼药水。

实施例 D: 软膏

- 20 500mg 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 和 99.5g 凡士林在无菌条件下混和。

实施例 E: 片剂

1kg 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu), 4kg 乳糖, 1.2kg 马铃薯淀粉, 0.2kg 滑石粉和 0.1kg 硬脂酸镁的混合物通过常规的方法压缩成片剂, 利用这种方法, 每片含有 10mg 活

性化合物。

实施例 F: 包被片剂

与实施例 E 相似, 片剂被压制随后用常规的方法包上一层蔗糖、马铃薯淀粉、滑石粉、黄芪胶和色剂。

5 实施例 G: 胶囊

用常规的方法将 2kg 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 分配到硬明胶胶囊中使每个胶囊中含有 20mg 的活性化合物。

实施例 H: 安瓿

10 1kg 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 溶解在 60 升双蒸水中, 无菌过滤, 分装到安瓿中, 无菌冻干和封口。每安瓿含有 10mg 的活性化合物。

实施例 I: 吸入式喷雾剂

15 14g 的环 (Arg-Thr-Asp-Leu-D-Asp-Ala-Leu-Arg-Abu-Abu) 溶解在 10 升 NaCl 等渗溶液中, 并把它分装到商业上可得的雾剂容器中, 这个雾剂容器要有一个泵的装置。一次的喷雾量 (约为 0.1ml) 大约相当于 0.14mg 的剂量。