

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/745

A61K 38/36

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94193587.6

[45]授权公告日 2000 年 9 月 20 日

[11]授权公告号 CN 1056619C

[22]申请日 1994.9.29 [24]颁证日 2000.6.24 [21]申请号 94193587.6 [30]优先权 [32]1993.9.30 [33]JP [31]245541/1993 [32]1994.3.22 [33]JP [31]50602/1994 [86]国际申请 PCT/JP94/01611 1994.9.29 [87]国际公布 WO95/09185 英 1995.4.6 [85]进入国家阶段日期 1996.3.29 [73]专利权人 新日本制铁株式会社 地址 日本东京都 [72]发明人 佐藤吉美 林良雄 片田淳 [56]参考文献 US4952562 1990.8.28 A61K37/00 FEBS LEFFERS VOL. 314, NO. 3 1992. 12. 1 N. NIO. "Iahibition of passive cutaneous ana phylaxis lh syunerhcric human im munoglobulin E fragment" 审查员 黄 赤	[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 代理人 孟八一 谭明胜 权利要求书 2 页 说明书 50 页 附图页数 4 页
--	--

[54]发明名称 具有作为血小板聚集抑制剂活性的肽、含有它们的药物组合物及其用途

[57]摘要

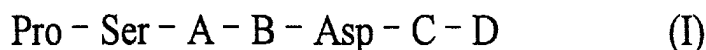
本发明提供了用下面通式(I)表示的肽或其盐、含有它们的药物组合物、药物制剂、以及其用途,其中 A 是任何氨基酸,B 是 Gly 或 Sar,C 是芳族 氨基酸,并且 D 是羟基或氨基。本发明化合物和其盐是有用的,因为他们具有 极好的血小板聚集抑制和血液凝固抑制活性并且是高度安全的。

Pro-Ser-A-B-Asp-C-D

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

权 利 要 求 书

1. 一种用下面通式(I)表示的肽或其盐:



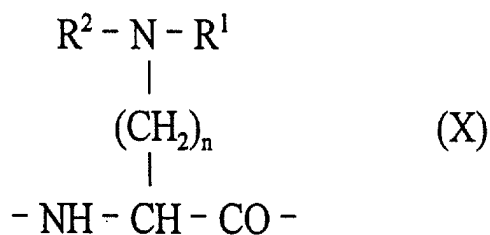
其中 A 是一种在侧链上没有胍基的氨基酸, B 是 Gly 或 Sar, C 是侧链上有疏水基的氨基酸, 和 D 是羟基或氨基。

2. 根据权利要求 1 的肽或其盐, 其中 A 是中性氨基酸。

3. 根据权利要求 2 的肽或其盐, 其中所述中性氨基酸是甘氨酸, 脯氨酸、羟基脯氨酸、硫代脯氨酸、甲基硫代脯氨酸、或脱氢脯氨酸。

4. 根据权利要求 1 的肽或其盐, 其中 A 是在侧链上有氨基的氨基酸, 该氨基可被含有 1-10 个碳原子的烷基取代。

5. 根据权利要求 1 的肽或其盐, 其中 A 是一种用下面通式(X)表示的氨基酸:



其中, R^1 和 R^2 可以相同或不同, 各自是氢原子或 1-10 个碳原子的烷基, 且 n 是 4-10 的整数。

6. 根据权利要求 1-5 任一权利要求的肽或其盐, 其中 B 是甘氨酸或 N-烷基甘氨酸。

7. 根据权利要求 1-6 任一权利要求的肽或其盐, 其中 C 是色氨酸或苯丙氨酸。

8. 根据权利要求 1 的肽或其盐, 其中 A 是一种中性氨基酸

或侧链上有氨基的氨基酸，该氨基可以被 1-10 碳原子烷基取代，B 是甘氨酸或 N-烷基甘氨酸，且 C 是色氨酸或苯丙氨酸。

9. 一种用于抑制血小板聚集的药物组合物，其包含权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐作为活性成分。

10. 一种用于抑制体外循环血液凝固的药物组合物，其包含权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐作为活性成分。

11. 一种细胞粘连抑制剂，其含有权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐作为活性成分。

12. 一种肿瘤转移抑制剂，其含有权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐作为活性成分。

13. 一种用于保护输血用血小板制剂中的血小板的组合物，其含有权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐作为活性成分。

14. 一种输血用血小板制剂，其中加入了权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐。

15. 一种输血用血小板制剂包，在包中输血用血小板制剂中含有权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐。

16. 权利要求 1 所述的通式(I)的肽或其盐在制备用于抑制血小板聚集、体外循环血液凝固、细胞粘连、或肿瘤转移的药物方面的用途。

17. 一种保护输血用血小板制剂中血小板的方法，包括向血小板制剂中加入有效量的权利要求 1-8 任一权利要求的肽或其盐的步骤。

说明书

具有作为血小板聚集抑制剂活性的肽、
含有它们的药物组合物及其用途

技术领域

本发明涉及具有血小板聚集抑制作用的新型肽，和含有新型肽为活性成分的血小板聚集抑制剂，体外循环血液凝固抑制剂，细胞粘连抑制剂，肿瘤转移抑制剂，和输血用血小板制剂的保护剂，以及加有新型肽的输血用血小板制剂，输血用血小板制剂包，该包中的输血用血小板制剂含有新型肽。

技术背景

血小板通过粘附于损伤血管表面在止血中起重要作用。

但是，已知血小板聚集主要引起血栓的形成，而形成的血栓阻塞血管。这种阻塞阻止了氧和养分对组织和器官的充分供应，从而在循环器官中引起局部缺血疾病，以心肌梗塞形成和脑梗塞形成为代表。目前，这些局部缺血疾病的死亡率仅次于癌症，已成为一个严重的社会问题。

当在医学治疗中涉及血液体外循环时，例如在外科手术中使用人工心脏和肺，对肾衰竭患者使用肾透析时，血小板激活作用和聚集作用可引起血液凝固，其对医学治疗的进行产生不利影响。

因此防止血栓生成和血液凝固在避免局部缺血性疾病的发生或在安全进行体外循环中是重要的事情。

血小板通过血浆中凝血酶，连接组织蛋白如由于血管损伤而暴露的内皮下组织中的胶原蛋白及其它物质与血小板膜上的受体结合而被激活。血小板也可通过类似自泌的方式使释放的二磷酸腺苷（ADP），肾上腺素，5-羟色胺，促凝血酶（TX）A₂等这类物质与膜受体结合而被激活。含有血纤维蛋白原受体的两种糖蛋白单元存在于细胞表面上，并与形成受体复合物（gp II b III a）有关，以此引发由血纤维蛋白原为桥的聚集作用。

先天性缺乏gp II b和gp III a的血小板机能不全患者没有血小板聚集能力。因此，很明显，gp II b III a复合物与血纤维蛋白原的结合对于血小板聚集是必不可少的（Ruoslahti et al., Science, 238, 491 (1987)）。

人们已作出努力，利用gp II b III a复合物的性质通过抑制血小板聚集作用来防止血栓形成。

例如，Coller等报导抗gp II b III a复合物的单克隆抗体的F(ab')₂片段对血小板聚集有强烈的抑制作用，并证实了利用这种作用可开发血小板聚集抑制剂（Blood, 68, 783 (1986)）。

尽管认识到这种单克隆抗体具有作为抑制血小板聚集的治疗剂的潜在效能，但由于它本身是一个大的蛋白质，重复给药可能会产生抗这种单克隆抗体的抗体，这是令人担忧的。

因此，希望开发含有非致免疫小化合物作为活性成分的血小板聚集抑制剂，这些小化合物具有拮抗gp II b III a复合物的性质。

已经积极地进行了血纤维蛋白原与gp II b III a复合物结合的研究。这些研究起始于Ruoslahti 等人进行的一系列研究所发现的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)为细胞粘连分子共有氨基酸序列(Ruoslahti et al., Nature 309, 30 - 33 (1984))。识别RGD序列受体的研

究证实gp II b III a复合物是一个分类于识别RGD序列整联蛋白类的受体 (Phillips et al., Blood, 71, 831 - 843 (1988)), 并且这种复合物特定识别存在于血纤维蛋白原分子中的两个精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-苯丙氨酸 (RGDF) 序列, 由此复合物与血纤维蛋白原结合 (Andrieux et al., J. Biol. Chem., 264, 9258 - 9265 (1989))。

进一步地, 已知gp II b III a复合物与具有RGD序列的遗传性假血友病因子, 纤维连结素, 玻璃体结合蛋白和凝血酶敏感蛋白以及血纤维蛋白原结合 (Pytela et al., Science., 231, 1559 (1986) 和 Cell, 42, 439 (1985))。

由这些发现人们期望含有RGD序列的合成肽抑制gp II b III a复合物与血纤维蛋白原结合, 从而抑制血小板聚集。事实上, 已有报导 400 μ M合成肽甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-脯氨酸 (GRGDSP) 完全抑制了被ADP激活的血小板聚集作用 (Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 8057 - 8061 (1985))。另外, 也已证明浓度为 46 - 50 μ M的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 (RGDS) 以浓度依赖方式抑制 80 - 90%的血小板聚集作用 (Plow et al., Blood, 70, 110 - 115 (1987))。并且已经报导肽RGDF具有的血小板聚集抑制活性是RGDS的 4 - 5 倍 (Harfinest et al., 71, 132 - 136 (1988))。

日本未审专利公开 (下文称作“KOKAI”) Nos. 平 1 - 190699和平 2 - 62892, EPO 422937A1和美国专利 (下文称作“USP”) No. 4952562公开了含有RGD序列的四肽衍生物。KOKAI No. 昭63 - 215696公开了其它含RGD序列的肽衍生物。KOKAI Nos. 平3 - 118331和平 2 - 62892和WO 91/01331公开了含有RGD肽环状结构的衍生物。

最近几年, 为了开发具有高血小板聚集抑制活性并在体内有极好

稳定性的试剂，已经积极进行了研究，其中具有天然不存在结构的化合物由作为关键化合物的RGD肽衍生（Hartman et al., J. Med. Chem. 35, 4640 - 4642 (1992) and Callahan et al., ibid, 35, 3970 - 3972 (1992)）。这些化合物作为口服血小板聚集抑制剂是有用的，其对蛋白酶作用敏感。

但是预期这些化合物会呈现毒性（这个问题经常发生在衍生为非天然结构的情况中）和副作用，这是由于这些药物在人体内不产生代谢变化而累积造成的。因此要非常关注安全性。

化合物在体内的稳定性的提高会导致血小板聚集抑制作用和血凝固抑制作用的持久性，由此便潜在性地长期抑制血小板所固有的重要生理作用，如诱发出血倾向等。

已经报导，在体外循环期，即使实际上给药用以抑制血液凝固的来自生物体的肝素也具有明显副作用，即肝素作用长于合适的时期从而引起易出血倾向（Tadao Akizawa, et al., NIHON RINSHO, Vol. 43, 377 - 391 (1985)）。

如“技术背景”中描述的，RGD肽本身不具有这样高的血小板聚集作用以保证床实践中的应用。但RGD肽具有极好特性，因为它们能被生物体内固有的蛋白酶酶解为氨基酸，这些氨基酸对生物体是安全有用的。

本发明人就是想应用这种特性制备具有极好血小板聚集抑制能力和血液凝固抑制能力，血小板保护作用和细胞粘连抑制活性的肽衍生物，并将这些化合物用作药物制剂。

本发明的一个目的是提供具有极好血小板聚集抑制能力和血液凝固抑制能力，血小板保护作用和细胞粘连抑制活性并高度安全的肽及其盐。

本发明的另一目的是提供含有所述肽或其盐为活性成分的血小板聚集抑制剂，体外循环血液凝固抑制剂，细胞粘连抑制剂，肿瘤转移抑制剂和输血用血小板制剂的保护剂，以及加有所述肽或其盐的输血用血小板制剂和输血用血小板制剂包，其中该包中输血用血小板制剂含有该肽或其盐。

本发明进一步目的是提供含有肽或其盐为活性成分的药物组合物，特别用于抑制血小板聚集，体外循环时血液凝固，细胞粘连和肿瘤转移及用于保护输血用血小板制剂中的血小板。

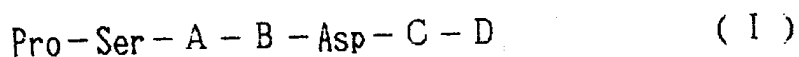
本发明还有进一步目的是提供应用该肽或其盐抑制血小板聚集的方法，抑制体外循环时血液凝固的方法，抑制细胞粘连的方法，抑制肿瘤转移的方法，保护输血用血小板制剂中血小板的方法。

本发明的公开内容

作为所进行的解决上述问题各种研究的结果，本发明人制得了具有高度活性和安全的肽化合物，它具有极好的血小板聚集抑制活性和血液凝固抑制活性而且可实际应用。出人意料地，尽管它们不含有被认为是血小板聚集抑制作用所必须的RGD序列，但本发明肽仍具有非常高水平的这些活性。

本发明的主题如下：

(1) 用下面通式(I)表示的化合物或其盐：



其中A是一种在侧链上没有胍基的氨基酸，B是一种氨基酸，C是侧链上有疏水基团的氨基酸，和D是羟基或氨基；

(2) 含有(1)的化合物或其盐为活性成分的血小板聚集抑制剂；

(3) 含有(1)的化合物或其盐为活性成分的体外循环血液凝固抑制剂；

- (4) 含有(1)的化合物或其盐为活性成分的细胞粘连抑制剂；
- (5) 含有(1)的化合物或其盐为活性成分的肿瘤转移抑制剂；
- (6) 含有(1)的化合物或其盐为活性成分的输血用血小板制剂的保护剂；
- (7) 其中加有(1)的化合物或其盐的输血用血小板制剂；
- (8) 输血用血小板制剂包，包中输血用血小板制剂中含有(1)的化合物或其盐；
- (9) 含有(1)的化合物或其盐和可药用载体的药物组合物；
- (10) 抑制血小板聚集的方法，包括给患者施用可药用载体中的有效量的(1)的化合物或其盐这一步骤；
- (11) 抑制体外循环中血液凝固的方法，包括给患者施用可药用载体中的有效量的(1)的化合物或其盐这一步骤；
- (12) 抑制细胞粘连的方法，包括给患者施用可药用载体中的有效量的(1)的化合物或其盐这一步骤；
- (13) 抑制肿瘤转移的方法，包括给患者施用可药用载体中的有效量的(1)的化合物或其盐这一步骤；和
- (14) 保护输血用血小板制剂中的血小板的方法，包括向血小板制剂中加入有效量的(1)的化合物或其盐这一步骤。

实现本发明的最好方式

在本发明中，术语“氨基酸”指分子中含有氨基和羧基的分子。

在上述式(I)中，N末端Pro-Ser结构由在N末端有一碱性部分的脯氨酸和在侧链上有一羟基的丝氨酸结合构成。C末端Asp-C结构由侧链上有一羧基的酸性氨基酸天冬氨酸与侧链上含有疏水基团的氨基酸(下文称作“疏水氨基酸”)结合组成。

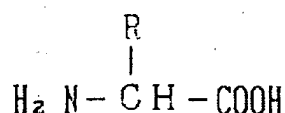
在本发明肽中，有碱性部分的脯氨酸和有酸性部分的天冬氨酸的

存在是血小板聚集抑制活性和血液凝固抑制活性所需要的。而且为了增强这两种活性，一种连接碱性和酸性部分从而固定其空间位置的结构和一种通过一疏水键，一氢键等与 IIbIIIa 复合物相互作用的键，这两者的存在是重要的。

脯氨酸 N-末端存在的亚氨基相当于碱性部分，天冬氨酸侧链上的羧基相当于酸性部分。通式 (I) 所示的肽中丝氨酸或 A 和 B 氨基酸，和 C 疏水氨基酸有利于氢键和疏水键的生成，该氢键和疏水键参与生成上述重要结构，以增强血小板聚集抑制活性和血液凝固抑制活性。

式 (I) 中，A 是一种侧链上不含胍基的氨基酸，包括中性氨基酸，侧链上含有氨基的氨基酸和其衍生物，该氨基可被 1-10 碳原子烷基取代如对-氨基环己基甘氨酸，对-氨基环己基丙氨酸，对-氨基苯基甘氨酸，对-氨基苯基丙氨酸等等。

在本发明中，术语“侧链”指下面氨基酸通式中 R 部分。



本发明中，术语“中性氨基酸”指侧链上有不带电荷基团的氨基酸，以及甘氨酸、脯氨酸或其衍生物。甘氨酸衍生物的例子包括具有 1-10 碳原子烷基的 N-烷基甘氨酸、脯氨酸衍生物的例子包括环中有一个取代基，一个不饱和键和一个杂原子的脯氨酸，和具有不同大小的环的脯氨酸。侧链上不带电荷基团的例子包括具有 1-30 个碳原子的取代或未取代烷基，取代或未取代的芳基，取代或未取代的杂芳基，具有 3-10 个碳原子的取代或未取代的环烷基，和其结合基团。这些基团可进一步含有不带电荷的基团，该基团含一个杂原子如氧、硫等等。这种基团的例子包括羟基、巯基，和具有 1-10 个

碳原子的烷基。

具体地讲当侧链是甲基时，该中性氨基酸是丙氨酸。

当侧链是一烷基时，优选为直链或支链形式，这样使含有该烷基的中性氨基酸在水中具有相对高的溶解性，并且从其空间位阻方面来说更优选的例子是具有 1 - 20 个碳原子的烷基如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基、庚基和辛基。

侧链上有烷基的中性氨基酸的优选实例包括丙氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、叔亮氨酸、异亮氨酸、别异亮氨酸等这类物质。其中侧链上有正丙基或正丁基线型烷基的中性氨基酸是特别优选的。例如将包含带有庞大的异丙基或异丁基的缬氨酸或亮氨酸的肽（实施例 3 和 6 制备的化合物）与包含有相同碳原子数的线性基团正丙基或正丁基的正缬氨酸或正亮氨酸的肽（实施例 5 和 9 制备的化合物）相比，含有带线性烷基的正缬氨酸或正亮氨酸这样的中性氨基酸的肽趋于具有较高血小板聚集抑制和血液凝固抑制活性。

侧链上具有线性烷基的中性氨基酸的优选例子包括：

Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Nva-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Nva-Ala-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Nle-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Nle-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Nle-Ala-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Ala-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Ala-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Ala-Ala-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Ala-Sar-Asp-Phe-OH,
Pro-Ser-Gly-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Gly-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Gly-Ala-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Met-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Met-Ala-Sar-Trp-OH, Pro-Ser-Met-Ala-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Cys-Gly-Asp-Trp-OH, 和 Pro-Ser-Pen-Gly-Asp-Trp-OH.

更优选的例子包括：Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Trp-OH和Pro-Ser-Nle-Gly-Asp-Trp-OH。

最优选的例子包括：Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Trp-OH。

侧链上具有支链型烷基的中性氨基酸的优选实例包括：

Pro-Ser-Tle-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Tle-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Tle-Ala-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Tle-Gly-Asp-Phe-OH,
Pro-Ser-Tle-Sar-Asp-Phe-OH, Pro-Ser-Val-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Val-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Val-Ala-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Leu-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Leu-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Leu-Ala-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Leu-Gly-Asp-Phe-OH,
Pro-Ser-Ile-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Ile-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Ile-Ala-Asp-Trp-OH 和 Pro-Ser-(allo)Ile-Gly-Asp-Trp-OH.

更优选的例子包括：

Pro-Ser-Tle-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Leu-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Ile-Gly-Asp-Trp-OH 和 Pro-Ser-(allo)Ile-Gly-Asp-Trp-OH.

最优选的例子包括：Pro-Ser-Tle-Gly-Asp-Trp-OH。

氨基酸A中侧链为芳基的情况下，包括苯基和萘基等等。该芳基可以被上述不带电荷的基团取代如含有1-10个碳原子的烷基，含有3-10个碳原子的环烷基或芳基，卤原子如溴、碘、氯原子等等，氰基、硝基，含有1-10个碳原子的烷氧基，含有2-10个碳原子的酰基或酮基。

侧链上含有芳基的中性氨基酸的例子包括苯基甘氨酸、萘基甘氨酸等，优选例子包括Pro-Ser-Phg-Gly-Asp-Trp-OH及类似物。

氨基酸A的侧链为杂芳基的情况下，杂芳基包括呋喃基、四氢呋喃基、吡喃基、噻吩基等这类基团。该杂芳基可被不带电荷的上述基

团取代如含有 1 - 10 个碳原子的烷基, 含有 3 - 10 个碳原子的环烷基或芳基, 卤原子如溴、碘或氯原子等, 氰基、硝基, 含有 1 - 10 个碳原子的烷氧基, 含有 2 - 10 个碳原子的酰基或酮基。

氨基酸 A 的侧链是一含有 3 - 10 个碳原子的环烷基的情况下, 其优选为含有 3 - 7 个碳原子烷基的环烷基如环戊基、环己基、环庚基等。该环烷基可以被上述不带电荷的基团取代如含有 1 - 10 个碳原子的烷基, 含有 3 - 10 个碳原子的环烷基或芳基, 卤原子如溴、碘或氯原子等等, 氰基、硝基, 含有 1 - 10 个碳原子的烷氧基, 含有 2 - 10 个碳原子的酰基或酮基或羟基。

侧链上含有一个环烷基的中性氨基酸的例子包括环己基甘氨酸等等。优选的例子包括 Pro-Ser-Chg-Gly-Asp-Trp-OH。

含 1 - 10 个碳原子烷基, 芳基和杂芳基, 具有 3 - 10 个碳原子环烷基基团结合的具体例子包括芳烷基如苯基烷基; 环烷基-烷基如环己基烷基; 烷基-环烷基等等。更具体的例子包括苄基、苯基乙基、环己基甲基等等。结合基团中的环部分可以被上述不带电荷的基团取代如含有 1 - 10 个碳原子的烷基, 含有 3 - 10 个碳原子的环烷基或芳基, 卤原子如溴、碘或氯原子等等, 氰基、硝基, 含有 1 - 10 个碳原子的烷氧基, 含有 2 - 10 个碳原子的酰基, 酮基或羟基。

具有上述结合基团的中性氨基酸的例子包括苯基丙氨酸、环己基丙氨酸、4-甲基苯基丙氨酸、4-溴苯基丙氨酸、萘基丙氨酸、高苯基丙氨酸, 和 O-甲基酪氨酸。肽的优选例子包括:

Pro-Ser-Cha-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Phe-Gly-Asp-Trp-OH, 和 Pro-Ser-Hph-Gly-Asp-Trp-OH。

更优选的例子包括 Pro-Ser-Cha-Gly-Asp-Trp-OH。

氨基酸 A 侧链是烷基、芳基, 含有一个杂原子如氧、硫等的不带

电荷基团的杂芳基或环烷基，或这些基团结合成的基团时，该基团特别的例子包括具有羟基或巯基的烷基和环烷基，或含有 1 - 10 个碳原子的烷硫基。含有这种基团的中性氨基酸的优选例子包括丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、高半胱氨酸等这类物质。

氨基酸 A 是含有 1 - 10 个碳原子烷基的 N - 烷基甘氨酸的情况下，具有 3 或更少碳原子烷基的所述氨基酸如肌氨酸是优选的。

氨基酸 A 是其环中有取代基的脯氨酸的情况下，取代基的例子包括上面提到的不带电荷的基团如具有 1 - 10 碳原子烷基，具有 3 - 10 碳原子环烷基或芳基，卤原子如溴、碘或氯原子等，氰基、硝基，具有 1 - 10 碳原子的烷氧基，具有 2 - 10 碳原子的酰基、酮基或羟基。具有不饱和键衍生物的例子包括脱氢脯氨酸。其中构成环的碳原子被杂原子取代的衍生物的例子包括硫代脯氨酸等这类物质。具有不同大小环的衍生物的优选例子包括具有 3 元至 8 元环的衍生物如氮杂环丁烷羧酸，高脯氨酸等等。脯氨酸衍生物可以是它们的化合物如 β ， β - 二甲基硫代脯氨酸等这类物质。

使肽具有高溶解性和活性的中性氨基酸的例子包括丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、羟基脯氨酸、脱氢脯氨酸、4 - 甲基脯氨酸和 4 - 甲氧基脯氨酸。

这种肽优选的例子包括；

Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Pro-Sar-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Pro-Ala-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Ser-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Ser-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Thr-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Thr-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Hyp-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser-Hyp-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser- Δ Pro-Gly-Asp-Trp-OH,
Pro-Ser- Δ Pro-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-(4-CH₃ Pro)-Gly-Asp-Trp-OH,

Pro-Ser-(4-CH₃ Pro)-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-(4-OCH₃ Pro)-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-(4-OCH₃ Pro)-Sar-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Thz-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Dmt-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Dmp-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Azt-Gly-Asp-Trp-OH 和 Pro-Ser-Hyp(Bzl)-Gly-Asp-Trp-OH.

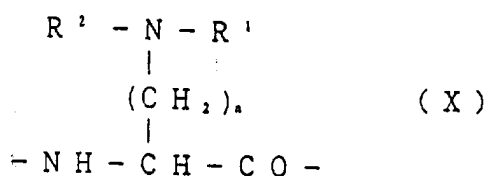
更优选的例子包括：

Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Hyp-Gly-Asp-Trp-OH, Pro-Ser-Δ Pro-Gly-Asp-Trp-OH 和 Pro-Ser-Hyp(Bzl)-Gly-Asp-Trp-OH.

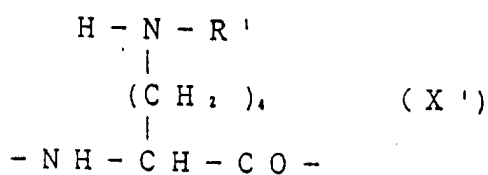
最优选的例子包括Pro-Ser-ΔPro-Gly-Asp-Trp-OH。

为防止酶裂解并保持肽的高活性，可使用D-氨基酸。D-氨基酸优选的例子包括上述中性氨基酸的D-异构体，并且肽的优选例子包括Pro-Ser-DPro-Gly-Asp-Trp-OH。

侧链上含有氨基且该氨基可被1-10碳原子烷基取代的氨基酸的例子包括用下面通式(X)表示的氨基酸残基：



其中R¹和R²可以相同或不同，各自为氢原子或1-10碳原子的烷基，n是4-10的整数。优选例子包括用下面通式(X')代表的氨基酸残基：



其中 R^1 是氢原子、甲基或叔丁基。这些氨基酸残基是赖氨酸， ϵ -N-甲基赖氨酸和 ϵ -N-叔丁基赖氨酸残基。就其空间位阻来说，赖氨酸优于 ϵ -N-甲基赖氨酸，而 ϵ -N-甲基赖氨酸优于 ϵ -N-叔丁基赖氨酸残基。具有未取代氨基的赖氨酸是优选的。如下文实验实施例 1 所示，含有氨基酸 A 为赖氨酸的肽（实施例 1 3 制备的化合物，其中上式 (X) 中的 n 为 4）比含有氨基酸 A 为鸟氨酸的肽（对比实施例 1 中制备的 $n = 3$ 的化合物）显示更高的血小板聚集抑制和血液凝固抑制活性。式 (X) 中的整数 n 代表 α -碳到侧链中氨基的距离。因此 n 优选至少为 4，更优选 4 ~ 6。

并且除上文所述事实外，如下文所描述的实验实施例 1 所示，与含有氨基酸 A 为鸟氨酸的肽（对比实施例 1 制备的化合物）相比，氨基酸 A 为侧链上有相同长度烷基链但没有碱性功能氨基的正缬氨酸的肽（实施例 4 制备的化合物）显示明显增强的血小板聚集抑制活性和血液凝固抑制活性。

通式 (I) 中，B 是 - 氨基酸。具有大空间位阻的氨基酸和酸性氨基酸趋于降低含有它们的肽的血小板聚集抑制活性和血液凝固抑制活性。因此优选氨基酸 E 的例子包括含 10 个或更少碳原子的较小侧链的中性氨基酸和其 N-烷基取代产物。N-烷基取代产物中烷基的碳原子数优选为 1 ~ 5。具体可提及甘氨酸、丙氨酸、 β -丙氨酸、肌氨酸、N-乙基甘氨酸、N-异丙基甘氨酸、N-丙基甘氨酸等为优选实例。如下文描述的实验实施例 1 所示，B 为肌氨酸的本发明肽（实施例 1 制备的化合物）具有大约 2 倍于 B 为甘氨酸的肽（实施例 2 制备的化合物）的血小板聚集抑制和血液凝固抑制活性。据信这是因为肽的主链通常具有反式构型，但当引入肌氨酸时它们转换成顺式，而这些结构有助于形成较高血小板聚集抑制和血液凝固抑制活性所需

的构型。

任何侧链上含有疏水基团的氨基酸通过疏水键与受体相互作用，其可用作通式（I）中的C。C氨基酸优选的例子包括侧链上有疏水基团如烷基、苯基、苯基烷基、烷氧苯基、环烷基、吡啶基、吡咯基等基团的氨基酸。特别的例子包括苯基丙氨酸、色氨酸、O-烷基酪氨酸、萘基丙氨酸、吡啶基丙氨酸等等。其中色氨酸是优选的。作为烷基，不多于10个碳原子的低级烷基是优选的。

通式（I）中，D是羟基或氨基，D是羟基的情况下肽的活性趋于比D为氨基时高。但是，D是氨基情况下作用时间较长。选择羟基还是氨基决定于所要达到的目的。

当本文用缩写定义氨基酸、肽、保护基团、活性基团等时，其应与IUPAC和IBU定义或本领域所用任何常规符号相符。在直接与基因控制相关的 α -氨基酸有旋光异构现象情况下，应明白意指L-异构体，除非另有说明。

缩写的例子如下所示：

Asp或D	: 天冬氨酸
Ala	: 丙氨酸
Arg或R	: 精氨酸
Gly或G	: 甘氨酸
Phg	: 苯基甘氨酸
Sar	: 肌氨酸
Ser或S	: 丝氨酸
Thr	: 苏氨酸
Val	: 缬氨酸
Nva	: 正缬氨酸

Ile	: 异亮氨酸
(allo) Ile	: 别异亮氨酸
Leu	: 亮氨酸
Nle	: 正亮氨酸
Tle	: 叔亮氨酸
Lys	: 赖氨酸
Chg	: 环己基甘氨酸
Cha	: 环己基丙氨酸
Met	: 蛋氨酸
Trp	: 色氨酸
Tyr	: 酪氨酸
Tyr (CH ₃)	: O - 甲基酪氨酸
Phe或F	: 苯丙氨酸
Hph	: 高苯丙氨酸
Pro或P	: 脯氨酸
DPro	: D - 脯氨酸
Hyp	: 羟基脯氨酸
△Pro	: 脱氢脯氨酸
4 - CH ₃ Pro	: 4 - 甲基脯氨酸
4 - OCH ₃ Pro	: 4 - 甲氧基脯氨酸
Boc	: 叔丁氧羰基
Bu ^t	: 叔丁基
OBu ^t	: 叔丁基酯
Mtr	: 4 - 甲氧基 - 2, 3, 6 - 三甲基苯磺酰基
Pmc	: 2, 2, 5, 7, 8 - 五甲基苯并二氢吡喃 - 6 - 磺酰基

Fmoc	: 9 - 芴基甲氧羰基
Orn	: 鸟氨酸
Cys	: 半胱氨酸
Pen	: 青霉胺
Azt	: 氮杂环丁烷羧酸
Thz	: 硫代脯氨酸
Dmt	: 二甲基硫代脯氨酸
Dmp	: 二甲基脯氨酸

通过简单方法用可商购的氨基酸可容易地合成本发明肽。例如可以用肽化学领域中常规方法或者液相或者固相合成肽，如Schroder和Luhke "The Peptides" Vol. 1, Academic Press, New York, U. S. A (1966), Nobuo Izumiya et al., "The Fundamentals and Experiments of Peptide Synthesis", Maruzen (1985)等所描述的方法。这些制备方法可以是柱法或分批方法 (batch method)。

生成肽键的缩合方法包括叠氮化物法、酰氯法、酸酐法、碳化二亚胺法、碳化二亚胺加成法、活化酯法、羰基咪唑法、氧化还原法、酶法，使用Woodward's试剂K的方法等等。用固相法进行缩合反应情况下，可以优先使用酸酐法、碳化二亚胺法和活化酯法。

当用固相法增长肽链时，C末端氨基酸与载体偶联，载体为例如不溶于所用有机溶剂的树脂。在这种情况下，为将氨基酸与树脂键连，可通过引入官能团，在树脂和官能团间插入间隔基或者根据条件引入能在各种位置解离的称为“手臂”的链根据目的将树脂改性。树脂的例子包括卤甲基树脂（如氯甲基树脂）、氧甲基树脂、4 - (氧甲基) 苯基乙酰胺甲基树脂、4 - (氧甲基) 苯氧甲基树脂、用于C - 末端酰胺化的树脂等等。

缩合反应之前，不参加缩合反应的精氨酸残基中的羧基，氨基和胍基可以用常规已知技术保护。与此相反，直接参加缩合反应的羧基和氨基可以被活化。

作为保护作用的保护基，可以使用有机化学领域中经常使用的那些基团，如Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" John Willey & Sons, Inc (1981)中所描述的。

羧基保护基例子包括通常使用和已知的保护基如各种甲酯、乙酯、苄酯、对-硝基苄酯、叔丁基酯、环己基酯等等。

氨基保护基的例子包括苄氧羰基、叔丁氧羰基、异冰片基氧基羰基和9-苄基甲氧羰基等等。

氨基酸残基如丝氨酸中羟基保护基的例子包括叔丁基、苄基、三甲基甲硅烷基和四氢吡喃基等等。

赖氨酸中 ϵ -氨基保护基的例子包括叔丁氧羰基、9-苄基甲氧基羰基等等。

带有活化羧基的氨基酸的例子包括相应于羧基的酸酐；叠氮化物；与五氟苯酚，2,4-二硝基苯酚，氰甲基醇，对-硝基苯酚形成的活化酯，N-羧基琥珀酰亚胺，N-羧基-5-降冰片烯-2,3-二羧酰亚胺，N-羧基邻苯二甲酰亚胺，和1-羧基苯并三唑等等。

带有活化氨基的氨基酸的例子包括相应于氨基的酰胺磷酸酯 (amide phosphate)。

肽合成缩合反应通常在溶剂中进行。溶剂的例子包括氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、吡啶、二噁烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮、水、甲醇等等及其混合物。通常缩合反应一般在-30至50℃温度下进行。

可根据保护基的类型选择肽制备方法中保护基的脱保护反应类型，

条件是保护基团的去除不影响肽键。脱保护反应例子包括用酸处理，所述酸为例如盐酸、氢溴酸、无水氟化氢、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟乙酸或其混合物；用碱处理，所述碱为如氢氧化钠、氢氧化钾、胍、二乙胺、哌啶等，用液氨中的钠处理，用铂/炭还原，用三氟甲磺酸三甲基甲硅烷基酯，三甲基甲硅烷基溴化物等进行的甲硅烷基化反应处理。在上述用酸或甲硅烷基化试剂的脱保护反应中，优选加入阳离子捕获剂，如苯甲醚、苯酚、甲苯酚、硫代苯甲醚和乙二硫醇以有效进行脱保护反应。

用固相方法进行的肽合成可用常规方法从固相中解离。解离肽的方法的例子包括用上述酸或甲硅烷基化试剂处理。

上述一系列反应后，如此制得的肽可用常规的和已知方法分离和纯化。例如萃取、分配、再沉淀、重结晶、柱层析等可以用来得到更纯形式的肽。

根据制备方法中的反应条件的不同，本发明肽可以盐的形式制得。盐的例子包括无机酸盐如盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等；有机酸盐如甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、甘醇酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、三氟乙酸盐等等；碱金属盐如钠和钾盐等等，碱土金属盐如钙盐等，有机胺盐如铵、乙醇胺、三乙胺和二环己基胺盐等等。

当如此制得的本发明肽被用作血小板聚集抑制剂，细胞粘连抑制剂，肿瘤转移抑制剂，和输血用血小板制剂的保护剂（下文称作“血小板聚集抑制剂等”）的活性成分时，优选这些肽或其可药用的盐与固体或液体可药用载体或稀释剂即赋形剂，稳定剂等一起配制成药物组合物。在该药物组合物中，活性成分与载体的比例可在1至90%（重量）间变化。药物组合物可以以粒剂、细粒剂、粉剂、片剂、胶

囊、丸剂、液体和溶液等形式口服给药。另一种可选择的方式，该药物组合物可以以球粒 (bulk powders) 的形式口服给药，或者可以静脉内、肌内或者皮下注射给药。注射剂可以在使用前由本发明肽或其可药用盐粉末制备。

适用于口服，经肠或肠胃外给药的有机的或无机的，固体的或液体形式的可药用载体或稀释剂可被用来制备本发明血小板聚集抑制剂等。水、明胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、滑石、动物脂肪和油、植物脂肪和油、苺基醇、树胶、聚亚烷基二醇、石油树脂、椰子油、羊毛脂和所有其它医用载体可用作本发明血小板聚集抑制剂等的载体或稀释剂。稳定剂、湿润剂、乳化剂和改变渗透性或保持制剂合适 pH 值的盐可以合适地用作辅助剂。

如果需要，本发明血小板聚集抑制剂等可以含有其它药学活性成分如其用在治疗各种疾病的情况中时的其它类型血小板聚集抑制成分。

粒剂、细粒剂、粉剂、片剂或胶囊剂情况下，活性成分含量优选在 5 - 80 % (重量) 范围内。液体和溶液情况下，活性成分含量优选在 1 - 30 % (重量) 范围内。进一步地，在注射剂情况下，活性成分含量优选在 1 - 10 % (重量) 范围内。

当血小板聚集抑制剂等用来口服给药时，成人患者活性成分临床剂量优选在每天 500 至 1000mg 范围内，其可根据患者年龄，所要治疗疾病的严重程度等变化。本发明血小板聚集抑制剂等可以以上述日剂量一天一次，两次或三次以合适间隔时间给药。注射情况下，活性成分的剂量对成人患者来说优选在每次注射一至几百 mg。可选择地，本发明血小板聚集抑制剂等可以通过输注法等以一次或几次注射给药。

当本发明肽或其盐用于体外循环时，其可用注射或点滴输入形式使用。给药的位置和剂量可根据体外循环系统的种类，持续时间等而

不同。例如本发明肽可以每小时 1 至 100mg/kg 的剂量由入口注射或连续输入到体外循环系统中。不管它们是单独使用还是与其它药剂一起使用，与降解酶大量存在的体内相比，本发明肽在体外循环系统中在较小剂量时便有效。

据信如果本发明肽与现有技术中用作血液凝固抑制剂的肝素结合使用，则血液凝固的两个重要途径即血小板聚集和血液凝固系统会被抑制，从而完全抑制血液凝固。另外，由于预想两种药物有协同作用，可减少肝素的使用，已描述过其具有不希望的副作用。并且本发明肽与柠檬酸，蛋白酶抑制剂如 futhan，溶解纤维蛋白酶原剂如组织纤维蛋白溶酶原激活剂及类似物质结合使用被认为是有效的。

本发明中，用于输血的血小板制剂包的形式其特征在于，输血用血小板的保护试剂包含在输血用血小板制剂中，并且没有特别限定。通常用于临床实践的所有输血用血小板制剂包形式都可使用。合适的例子包括成包的袋或瓶等等。其材料也无特别限定。例如，能尽可能抑制活性成分吸收的聚乙烯材料，如聚氯乙烯、聚烯烃等可用作袋的材料；塑料和玻璃材料可用作瓶的材料。以血小板成分的量为准计，本发明输血用血小板制剂的保护试剂可以以终浓度相当于 $0.1\mu\text{M}$ 至 1mM ，优选 $1\mu\text{M}$ 至 $50\mu\text{M}$ 的本发明的肽或其盐的量加入。当然，通常加至输血用血小板制剂包中的其它成分能与本发明保护输血用血小板的试剂一同加入。

另外，应用本发明肽的特性如潜在的血小板聚集抑制作用和低毒性，可将其用于预防血栓溶解治疗后的血栓再形成和外科治疗后的血栓生成。特别是，本发明肽可用于通过外科治疗心肌梗塞和各种其它动脉血栓进行的经皮经腔冠状血管成形术（PTCA）后防止血管再狭窄，保持血管成形术如动脉或静脉偏侧移植后的移植物开放，防止动脉血

管移植后的血栓生成等等。

附图的简明描述

图 1 是狗血液透析模型的透析循环示意图。

图 2 是显示狗血液透析模型中血液凝固抑制效果的曲线。

图 3 是防止储存过程中血小板数减少的本发明肽的保护效果曲线。

图 4 是说明本发明肽对于防止血小板聚集作用降低的保护效果。

实施例

此后参照下面工作实施例将更详细地解释本发明。

[化合物的合成]

[实施例 1]

合成 $\text{Pro-Ser-Ala-Sar-Asp-Trp-OH}$

在反应容器中放入用下式表示的对-烷氧基苄基醇型树脂 (引入的 Trp 量: 0.87meq/g ; BACHEM Co.) (0.275g ; 0.25mmol)
 $\text{HOCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4(1,4)-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4(1,4)-\text{聚合物}$ 。在二甲氨基嘧啶存在下以活化酯的形式加入 Fmoc-Trp, 然后重复表 1 所示的振荡和过滤步骤得到下面通式代表的被保护肽树脂。

$\text{Pro-Ser}(\text{Bu}^t)-\text{Ala-Sar-Asp}(\text{OBu}^t)-\text{Trp-树脂}$

所得到的被保护肽树脂在三氟乙酸 (TFA) 中在 *m*-甲酚和乙二醇的存在下用硫代苯甲醚在 0°C 下处理 1 小时。用蒸发器蒸发 TFA, 然后过滤去除树脂, 冰浴下向滤液中加入乙醚, 得粉末状由树脂上解离下来的肽。用乙醚洗涤该粉末。洗涤过的肽用 Sephadex G-10 (Pharmacia Co.) 为载体通过凝胶渗透色谱去盐并冻干得粗产品肽。该粗产品肽用高压液相色谱 (HPLC) 纯化 (柱: ODS 5C_{18} (μ 粘合体球径: $\phi 2.0 \times 150\text{mm}$), 流动相: (A) 0.1% TFA, (B) 100% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA, 梯度: (A) : (B) = $90:10$ 至 (A) :

(B) = 70 : 30, 20 分钟, 流速: 1.7 ml/min)。通过使用 Sephadex G-25 (Pharmacia Co.) 为载体的凝胶过滤作用而得到肽的乙酸盐并冻干得 3.4 mg 标题肽。

氨基酸分析 (6 N 盐酸 + 苯酚, 24 小时, 110°C)

在该分析中不能测得色氨酸, 因为它在酸解中降解, 不存在标准氨基酸的氨基酸不能测到, 因为用作为用于测定的外部标准的氨基酸是标准氨基酸。

Asp 1.06 (1)

Ser 1.00 (1)

Sar - (1)

Trp - (1)

Ala 1.09 (1)

Pro 1.10 (1)

HPLC 分析

使用 Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 × 200 mm) 柱 (Nacalai tesque Co.) 以 1.0 ml/min 的流速, 用 0.1% TFA 中 10 - 40% (60 分钟) 乙腈的梯度洗脱的分析 HPLC 谱表明在 18.0 分钟的保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值 646.3, 实测值 646

表 1

步骤	试剂或溶剂	使用量 (ml/步)	时间 (分钟)	次数
1.	DMF	30	1	6
2. 20%	哌啶 /DMF	6	2	1
3. 20%	哌啶 /DMF	6	20	1
4.	DMF	50	1	10
5. F _{max} .	一氨基酸 & HOBT** /DMF (3 eq each)	6	2*	1
6.	DIPCD** (3 eq)***	6	120	1

* : 振荡后不去除试剂或溶剂而继续下一步

** : 1-羟基苯并三唑

*** : 二异丙基碳化二亚胺

[实施例 2]

合成Pro-Ser-Ala-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 2.4 小时, 110°C)

Asp 0.82 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.08 (1)

Trp - (1)

Ala 1.08 (1)

Pro 1.19 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60分钟)乙腈梯度洗脱的HPLC分析谱表明在19.2分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值632.3, 实测值632

[实施例 3]

合成Pro-Ser-Val-Sar-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6N HCl+苯酚, 24小时, 110℃)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Sar - (1)

Trp - (1)

Val 1.13 (1)

Pro 1.01 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60min)乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在20.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 4]

合成Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6N HCl+苯酚, 24小时, 110℃)

Asp	1.03	(1)
Ser	1.00	(1)
Gly	1.12	(1)
Trp	-	(1)
Nva	1.08	(1)
Pro	1.21	(1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 的乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在26.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值660.3, 实测值660

[实施例 5]

合成Pro-Ser-Nva-Sar-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题化合物。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp	0.97	(1)
Ser	1.00	(1)
Sar	-	(1)
Trp	-	(1)
Nva	1.12	(1)
Pro	1.24	(1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速

用0.1%TFA中10-40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在28.5分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 6]

合成Pro-Ser-Leu-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题化合物。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 24 小时, 110°C)

Asp 0.97 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.12 (1)

Trp - (1)

Leu 1.16 (1)

Pro 1.08 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10-40% (60 分钟) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在32.0分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 7]

合成Pro-Ser-Leu-Sar-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 24 小时, 110°C)

Asp 1.01 (1)

Ser 1.00 (1)

Sar - (1)

Trp - (1)

Leu 1.07 (1)

Pro 1.13 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在36.0分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值688.3, 实测值688

[实施例 8]

合成Pro-Ser-Nle-Sar-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp 0.97 (1)

Ser 1.00 (1)

Sar - (1)

Trp - (1)

Nle 1.22 (1)

Pro 1.10 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在34.5分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值688.3, 实测值688

[实施例 9]

合成Pro-Ser-Nle-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 2 4 小时, 110°C)

Asp 0.94 (1)

Ser 0.94 (1)

Gly 1.04 (1)

Trp - (1)

Nle 1.06 (1)

Pro 1.00 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速
用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱
表明在34.6分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 10]

合成Pro-Ser-Ala-Sar-Asp-Phe-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 2 4 小时, 110°C)

Asp 1.09 (1)

Ser 0.93 (1)

Sar - (1)

Phe 1.08 (1)

Ala 1.00 (1)

Pro 1.03 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在17.0分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值607.3, 实测值607

[实施例 1]

合成Pro-Ser-Gly-Sar-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp 1.07 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.14 (1)

Trp - (1)

Sar - (1)

Pro 1.10 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明18.0分钟保留时间时有一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值632.3, 实测值632

[实施例 1 2]

合成Pro-Ser-Ile-Sar-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 2 4 小时, 110℃)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Sar - (1)

Trp - (1)

Ile 1.20 (1)

Pro 1.18 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速
用0.1%TFA中10-40% (60min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱
表明在34.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M+H 计算值688.3, 实测值688

[实施例 1 3]

合成Pro-Ser-Lys-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 2 4 小时, 110℃)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.19 (1)

Trp - (1)

Lys 1.15 (1)

Pro 1.24 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在17.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值689.3, 实测值689

[实施例 14]

合成Pro-Ser-Ile-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp 0.98 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.08 (1)

Trp - (1)

Ile 1.05 (1)

Pro 1.12 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明34.2分钟保留时间时有一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 15]

合成Pro-Ser-Ser-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp	1.01 (1)
Ser	2.00 (2)
Gly	1.15 (1)
Trp	- (1)
Pro	1.10 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明19.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值648.3, 实测值648

[实施例 16]

合成Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Phe-OH

用与实施例 1 相同方法制备标题化合物。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp	1.01 (1)
Ser	1.00 (1)
Gly	1.10 (1)
Nva	1.12 (1)
Phe	0.98 (1)
Pro	1.05 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR (ϕ 4.6 $\times$ 200mm) 柱 (Nakalai tesque Co.) 以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈

梯度洗脱的分析HPLC谱表明30.2分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值621.3, 实测值621

[实施例 1 7]

合成Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Hph-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题化合物。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 2 4 小时, 110℃)

Asp 0.97 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.12 (1)

Nva 1.09 (1)

Hph 1.11 (1)

Pro 1.06 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在31.5分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值635.3, 实测值635

[实施例 1 8]

合成Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Tyr (CH₃) - OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 2 4 小时, 110℃)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.08 (1)

Nva 1.17 (1)

Tyr(CH₃) 1.05 (1)

Pro 1.12 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明27.6分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值651.3, 实测值651

[实施例 19]

合成Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110°C)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.08 (1)

Trp - (1)

Pro 2.13 (2)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 中乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在21.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值658.3, 实测值658

[实施例 2 0]

合成Pro-Ser-(allo) Ile-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 2 4 小时, 110°C)

Asp	0.97 (1)
Ser	1.00 (1)
Gly	1.07 (1)
(allo)Ile	1.08 (1)
Trp	- (1)
Pro	1.12 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明32.1分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 2 1]

合成Pro-Ser-Tle-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 2 4 小时, 110°C)

Asp	0.99 (1)
Ser	1.00 (1)
Gly	1.05 (1)
Tle	1.02 (1)
Trp	- (1)
Pro	1.10 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明34.0分钟保留时间有一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 2 2]

合成Pro-Ser-Chg-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp 1.01 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 0.99 (1)

Chg 1.08 (1)

Trp - (1)

Pro 1.05 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明39.5分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值700.3, 实测值700

[实施例 2 3]

合成Pro-Ser-Met-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp	1.00 (1)
Ser	1.00 (1)
Gly	1.06 (1)
Met	1.09 (1)
Trp	- (1)
Pro	1.02 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明29.0分钟保留时间时有一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值692.4, 实测值692

[实施例 2 4]

合成Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Cha-OH

与实施例 1 相同的方法制备标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110°C)

Asp	1.03 (1)
Ser	1.00 (1)
Gly	1.05 (1)
Nva	1.10 (1)
Cha	1.09 (1)
Pro	1.04 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用

0.1%TFA中10-40%(60min)乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在38.1分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值627.3, 实测值627

[实施例 2 5]

合成Pro-Ser-Phe-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6N HCl+苯酚, 24小时, 110℃)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.02 (1)

Phe 1.01 (1)

Trp - (1)

Pro 1.06 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min速率用0.1%TFA中10-40%(60min)乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在38.3分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值709.3, 实测值709

[实施例 2 6]

合成Pro-Ser-Phg-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6N HCl+苯酚, 24小时, 110℃)

Asp 1.03 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.09 (1)

Phg 1.10 (1)

Trp - (1)

Pro 1.08 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明在36.1分钟保留时间出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值695.3, 实测值695

[实施例 27]

合成Pro-Ser-Hyp-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例1相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110°C)

Asp 0.96 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.10 (1)

Hyp 1.04 (1)

Trp - (1)

Pro 1.11 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明19.7分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值674.3, 实测值674

[实施例 2 8]

合成Pro-Ser-DPro-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 2 4 小时, 110℃)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.13 (1)

Trp - (1)

Pro 2.05 (2)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6×200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明21.0分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值658.3, 实测值658

[实施例 2 9]

合成Pro-Ser-Azt-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl+苯酚, 2 4 小时, 110℃)

Asp 1.10 (1)

Ser 1.03 (1)

Gly 1.15 (1)

Trp - (1)

Pro 1.08 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明20.5分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值644.3, 实测值644

[实施例 3 0]

合成Pro-Ser-Thz-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp 0.98 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.06 (1)

Trp - (1)

Pro 1.08 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明23.5分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值676.3, 实测值676

[实施例 3 1]

合成Pro-Ser-Dmt-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110 $^{\circ}$ C)

Asp 1.05 (1)

Ser 1.02 (1)

Gly 1.10 (1)

Trp - (1)

Pro 1.07 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR($\phi 4.6 \times 200\text{mm}$)柱以 $1.0\text{ml}/\text{min}$ 流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明30.1分钟保留时间时有一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值704.3, 实测值704

[实施例 3 2]

合成Pro-Ser- Δ Pro-Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同的方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 24 小时, 110°C)

Asp 0.99 (1)

Ser 1.00 (1)

Gly 1.00 (1)

Trp - (1)

Δ Pro 1.10 (1)

Pro 1.08 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR($\phi 4.6 \times 200\text{mm}$)柱以 $1.0\text{ml}/\text{min}$ 流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表

明22.1分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值657.3, 实测值657

[实施例 3 3]

合成Pro-Ser-Hyp (Bzl) - Gly-Asp-Trp-OH

用与实施例 1 相同方法合成标题肽。

氨基酸分析 (6 N HCl + 苯酚, 2 4 小时, 110°C)

Asp 1.05 (1)

Ser 1.02 (1)

Gly 1.10 (1)

Trp - (1)

Pro 1.10 (1)

HPLC分析

用Cosmosil 5C18 - AR(ϕ 4.6 $\times$ 200mm)柱以1.0ml/min流速用0.1%TFA中10 - 40% (60 min) 乙腈梯度洗脱的分析HPLC谱表明38.2分钟保留时间时出现一单峰。

FAB-MS: M + H 计算值764.3, 实测值764

[实验实施例 1] 本发明化合物的血小板聚集抑制能力

合成肽活性的测定

[用PRP测定体外人血小板聚集作用]

健康雄性志愿者作为受实验者对待, 他们至少两周没有使用过任何药物。用一个预先装入1 / 10 体积3.8%柠檬酸钠溶液并带有#19针头的塑料注射器由每个空腹受实验者的前臂静脉抽取血样。采集血样后立即将注射器轻轻摇荡使血液与柠檬酸钠溶液混合。混合血液在室温下离心 (1100rpm, 250g) 1 5 分钟。不使用制动器使旋转停下。

然后，用Komagome型吸管收集上清液得富血小板血浆（PRP）。室温下保存PRP。离心剩余的血液在室温下再次离心（3500rpm，1500g）15分钟，不用制动器使旋转停下。收集上清液得缺乏血小板的血浆（PPP）。制备PRP后，计数血小板数，含有多于 $2 \times 10^9 / \text{ml}$ 血小板的样品被用于下面的实验。

用8通道血小板聚集测定仪（Hematracer，Nikoh Bioscience，Tokyo，Japan）通过PRP的光透射比的变化为基础测定血小板聚集。首先，PPP和PRP（每样200 μl ）放于玻璃比色杯中并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温。然后测定透射比。PPP的透射比定为100%，PRP为0%。然后向PRP中加入10 μl 盐水或含样品盐水，并在37 $^{\circ}\text{C}$ 保温1分钟。加入浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胶原蛋白溶液（10 μl ）（终浓度：5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）产生聚集作用，然后测定透射比超过7分钟。用样品进行这项实验，其中在第一步骤确证与胶原蛋白和ADP的聚集作用并且其中与胶原蛋白聚集作用的最大比率至少为70%。

样品溶解在盐水中，浓度为 $2.2 \times 10^{-2} \text{M}$ ，并制备2倍稀释系列用于实验。不溶于盐水的样品溶解在含10%二甲亚砆的盐水中。

如下计算所得结果：

$$\text{聚集抑制百分比} = \left[1 - \frac{\text{加入样品时聚集的最大百分比}}{\text{加入盐水时聚集的最大百分比}} \right] \times 100$$

计算式（1）

由聚集抑制的百分比对样品浓度的点作图，由该图计算聚集作用被抑制50%时的浓度（ IC_{50} ）。每个样品的 IC_{50} 见表2。表2表明，本发明在N-末端具有Pro-Ser结构基本骨架并引入不含胍基氨基酸的肽与血纤维蛋白原分子中存在的氨基酸序列RGDS（表2，对比实施

例 2) 相比, 具有大大增强的血小板聚集抑制活性。

表 2. 本发明肽的血小板聚集抑制活性

肽		IC ₅₀
Pro-Ser-Ala-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 1)	2.2 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Ala-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 2)	4.6 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Val-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 3)	7.3 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 4)	5.4 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Nva-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 5)	1.4 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Leu-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 6)	1.3 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Leu-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 7)	2.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Nle-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 8)	5.2 x 10 ⁻⁵ M
Pro-Ser-Nle-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 9)	8.4 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Ala-Sar-Asp-Phe-OH	(实施例 10)	4.1 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Gly-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 11)	3.7 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Ile-Sar-Asp-Trp-OH	(实施例 12)	5.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Lys-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 13)	1.4 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Ile-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 14)	1.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Ser-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 15)	5.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Phe-OH	(实施例 16)	1.0 x 10 ⁻⁵ M
Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Hph-OH	(实施例 17)	1.1, x 10 ⁻⁵ M
Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Tyr(CH ₃)-OH	(实施例 18)	3.4 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 19)	6.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-(allo)Ile-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 20)	1.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Tle-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 21)	7.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Chg-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 22)	6.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Met-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 23)	2.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Nva-Gly-Asp-Cha-OH	(实施例 24)	4.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Phe-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 25)	1.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Phg-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 26)	1.0 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Hyp-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 27)	6.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-DPro-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 28)	6.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Azt-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 29)	5.1 x 10 ⁻⁶ M
Pro-Ser-Thz-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 30)	5.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Dmt-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 31)	5.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Δ Pro-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 32)	3.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Hyp(Bzl)-Gly-Asp-Trp-OH	(实施例 33)	5.0 x 10 ⁻⁷ M
Pro-Ser-Orn-Gly-Asp-Trp-OH	(对比实施例 1)	6.3 x 10 ⁻⁴ M
Arg-Gly-Asp-Ser-OH	(对比实施例 2)	4.6 x 10 ⁻⁴ M

由此证明，与表2中对比实施例2所列的且含在血纤维蛋白原分子中的氨基酸序列RGDS-OH（由Peptide Laboratory, Minoo-shi, Japan购得）相比，本发明肽的血小板聚集抑制能力显著增强。

[实验实施例2] 急性毒性实验

以100mg/kg的量给小鼠静脉注射实施例1中得到的肽，没有发现毒性。

[实验实施例3] 用本发明肽作体外循环血液凝固抑制剂

为了证明本发明肽具有在体外循环系统中抑制血液凝固的作用，如人工肺的血液透析，以小猎兔犬人工血液透析模型根据别处描述的方法（参见Hamano et al., Thromb, Res, 55 (1989) pp. 438 - 449）作一些改进后，进行实验。狗血液透析模型中透析循环示意图见图1。

在这项实验中使用重10 - 12 kg的小猎兔犬（雄性或雌性）。小猎兔犬用戊巴比妥麻醉（约30 mg/kg）。切开右后腿露出股动脉和股静脉。带有硅试管的插管插入股动脉和股静脉，并且这些硅试管与中空纤维透析器连接（RENAK-A, RA-04, 0.4m², Kawasumi Lab. Tokyo）。在该操作中没有使用抗凝固剂如肝素。将一个输血泵放在股动脉和透析器之间保持实验中体外循环体系血液流速为25 ml/min。透析液不循环，当透析器中空纤维外部空间流体静力学压力为大约100cm H₂O时，密封透析液循环的入口和出口。

在这项实验中测定下面三个参数：

（1）透析器近端部分的压力（灌注压），（2）血小板粘连程度（血小板功能和血小板激活程度的参数）和（3）全血凝固时间（血凝固系统激活程度的参数）。用如图1所示透析器近端部分连接的压力表测定灌注压。由于在透析器这里血液经常与外部材料接触，并且

血液在狭窄空间流动，因此透析循环中血凝固最可能发生在这里。如果血凝固在这里发生，透析器阻塞，近端部分的血压将升高。这个位置灌注压的变化表明透析循环中血凝固程度。以一定间隔时间在透析部分入口和出口采集等份血样，用常规方法测定参数（2）和（3）。

循环一开始，血液立即通过周线循环，由动脉端开始注入本发明肽的盐水溶液。总的注射量为10mg/狗，在1小时之间逐渐给药（注入速度：1ml/min）。在对比实验中，只是以相同方式连续注射盐水。60分钟后停止注射药物，然后血液循环至180分钟，继续测定上述参数。当灌注压超过500mmHg时，在该时间停止实验。

图2表明了实验结果，其中测定了实施例19化合物对灌注压增强的抑制效果。横坐标上的数表示药物输注开始后的时间，纵坐标上的数表示灌注液压力。血液流动开始后灌注液压力是0—30mmHg，且由于血凝固的发生而增大。在没有注射抗凝剂的对照组，10分钟后灌注液压力很快增大，25分钟内超过500mmHg，不可能再进一步测量。这种情况表明，在透析循环中没有抗凝剂时血凝固很快发生，特别是在透析器位置。相反，当注射实施例19制备的本发明肽时，血凝固作用显著被抑制。

考虑到血小板粘连能力和全血凝固时间，发现与灌注液压力的增长方式基本平行的变化。简而言之，在对照组，随时间进程发现血小板粘连能力增加和全血凝固时间减少。这表明血小板被激活从而血液凝固系统被激活，结果是狗处于血液凝固高可能性发生的条件下。相反，在注射了本发明肽的组中，在药物持续注入时间内，发现血液凝固能力降至大约0%，因此，狗处在血小板激活作用完全被抑制这样的条件下。另外，在这期间，全血凝固时间显著增长。

如上所述，本发明肽完全抑制体外循环系统中血液凝固作用，这

表明本发明肽能满意地用作日常使用的抗凝剂肝素的替代物。如上所述，尽管肝素完全抑制体外循环系统中的血液凝固作用，但其缺点在于它只能从体内少量排除从而抑制血液凝固作用而同时即使在血液透析后几小时仍促进出血倾向。相反，本发明肽在体内可高度降解（在大约30分钟内从体内消除）。因此认为本发明肽比肝素或其相关药物优越，因为给药停止后血凝固活性将立即恢复到正常水平。而且由于本发明肽具有极低的毒性，因此作为新的血凝固抑制剂来弥补肝素的缺点，其前景乐观。

如上所示，如果本发明肽溶解在盐水或柠檬酸钠溶液中，并用点滴输入等方式由体外循环系统入口以大约1—3 mg/小时/kg的速度连续注射，则预期有令人满意的血液凝固抑制作用。若实际应用到人体时，则剂量会更少。

如果本发明肽与其它完全不同作用模式的抗凝剂结合，如柠檬酸钠溶液，肝素，futhan，溶解纤维蛋白原试剂等，预期含有协同作用。因此，两种药物剂量会降低并且保证更加安全。

[实验实施例4]应用本发明肽作输血用血小板制剂的保护剂

本实验使用Hartley豚鼠（雄性：体重350—400 g）。豚鼠用乙醚麻醉后，剖开腹膜腔并从腹膜动脉采集血样。用装有1/10体积预先消毒过的3.8%柠檬酸钠溶液并带有一#24针头的注射器采血，采取后立即轻轻振荡注射器使血液与柠檬酸钠溶液混合。将混合的血在室温下离心（900rpm）15分钟并停止旋转。然后无菌条件下用一Komagome型吸管收集上清液得到血小板部分保存。

将血小板部分转移至血小板储存包（TERUMO CORP., Separation Bag S for Apheresis）后，该包置于振荡器上，以振幅20 cm，振频20 Hz室温下振荡保存。

储存一定时间后，取等份血小板部分样品并测定血小板数目。用柠檬酸溶液将储存部分调至pH6.5并在室温下离心（2000rpm，15分钟）。移去上清液后，加入含有腺苷三磷酸双磷酸酶的Ca - Tyrode溶液（pH6.5）（Sigma Co，终浓度0.2U/ml）重新悬浮血小板。室温下保持20分钟后，将悬浮液离心（2000rpm，15分钟）并去除上清液。用相同方法再次洗涤悬浮液并将血小板再次悬浮在预先保留的豚鼠血浆（血小板数：大约 3×10^8 /ml）中。根据实验实施例1相同的方法用这种血小板悬浮液测定血小板聚集能力。

图3表明储存过程中血小板数的变化。在只加入生理盐水的对照组中，储存过程中血小板数大大减少。相反，加入实施例28制备的化合物的组中，发现其与对比组相比有明显抑制血小板数降低的效果。这种保护效果随所加入的肽的浓度而定，表明本发明肽本身对血小板具有保护作用。

图4表示储存过程中血小板聚集能力随时间的变化。在没有加入药物的对比组，储存后48小时血小板聚集活性降低到少于40%。在加入了实施例28制备的化合物的组中，储存48小时后血小板聚集活性保持了至少60%。这表明通过加入本发明化合物明显抑制了血小板聚集活性的下降。

如上所示，本发明肽的加入产生了储存期间的血小板被保护的效果如抑制血小板数的减少，对血小板聚集能力降低的抑制作用等等。已经证明即使至今应用的肽化合物如RGDS、RGDF等加入到血小板部分中，它们也会被血浆中存在的酶的作用酶解，因此明显不适合用于血小板的长期保存中。另一方面，非常稳定且在体内不易分解的化合物将在输血后抑制体内血小板的所有功能，从而降低了输血效率。相反，本发明肽具有理想特性，如在血小板部分中的高稳定性，在体内可高

度降解性和低毒性，因此其可用作极好的血小板保护剂。

另外，如果本发明肽以乙酸盐或磷酸盐形式给药，预期他们将表现出缓冲作用，从而在血小板部分储存期间产生抑制 pH 值变化的效果。而且，如果本发明肽不是单独使用而与阿斯匹林或其它具有不同作用模式的血小板聚集抑制剂结合使用时，预期会有协同效果。

[制剂实施例 1]

将实施例 1 - 3 1 得到的每一种肽 (100mg) 溶解在 100ml 盐水中。在无菌条件下，所得溶液以 2.5ml 体积安瓿分装，将安瓿密封得注射制剂。

[制剂实施例 2]

向由一种实施例 1 - 3 1 得到的肽 (500mg)、结晶纤维素 (50mg) 和乳糖 (450mg) 组成的混合物中加入乙醇和水的混合物 (1ml)，并且细密研磨，所得混合物用常规方法造粒制备颗粒剂。

工业可应用性

如上文所解释的，本发明肽用作血小板聚集制剂。换句话说，本发明肽用来防止血栓溶解治疗后和治疗期间的血栓，血栓栓塞和再梗塞，防止冠状动脉和其它动脉血管成形术后和冠状动脉分流术后的血栓，血栓栓塞和再梗塞，并防止心肌梗塞形成。

另外，本发明肽可用作体外循环时抑制血栓生成的体外循环血液凝固抑制剂。

而且，本发明肽对抑制血小板功能的降低是有效的，即它们有效保护血小板。而且本发明肽作为抑制肿瘤转移的细胞粘连抑制剂是有效的。

说明书附图

图1

狗血液透析模型中透析循环示意图

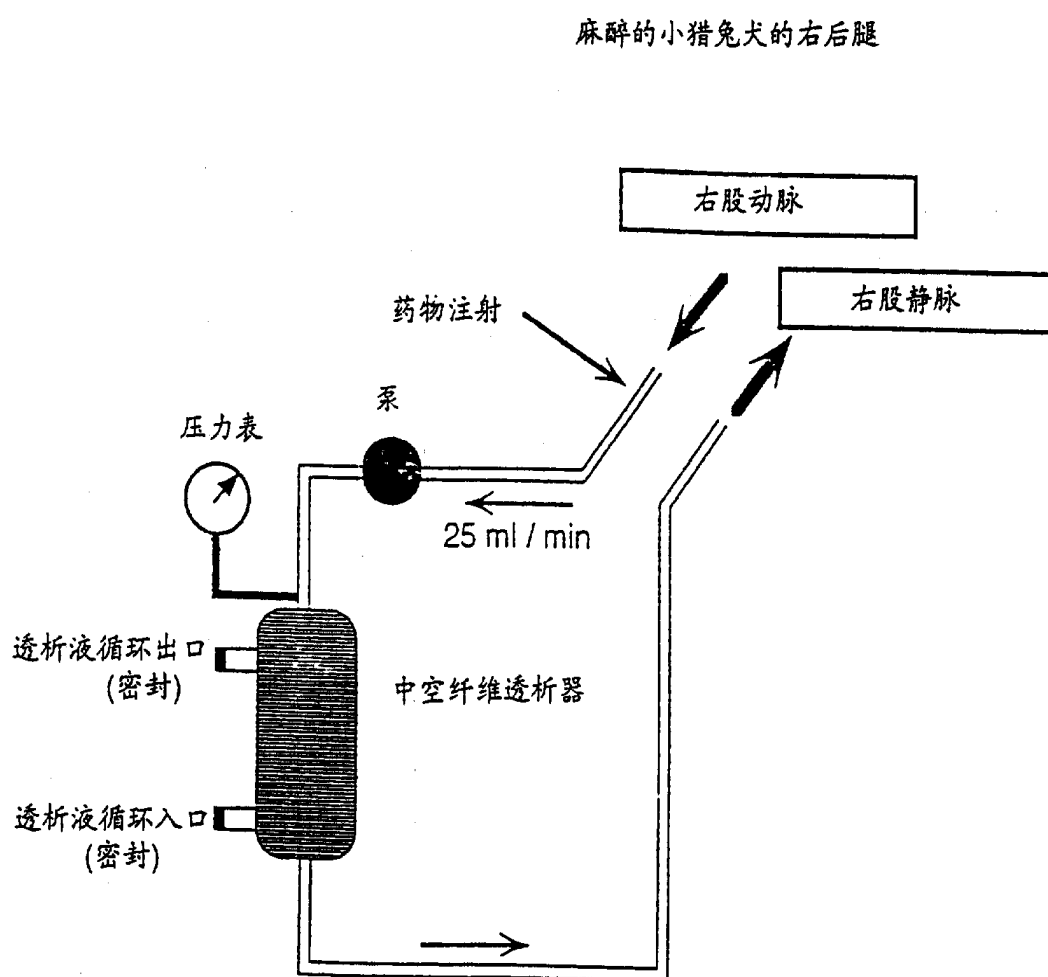


图2

狗血液透析模型中血液凝固抑制效果

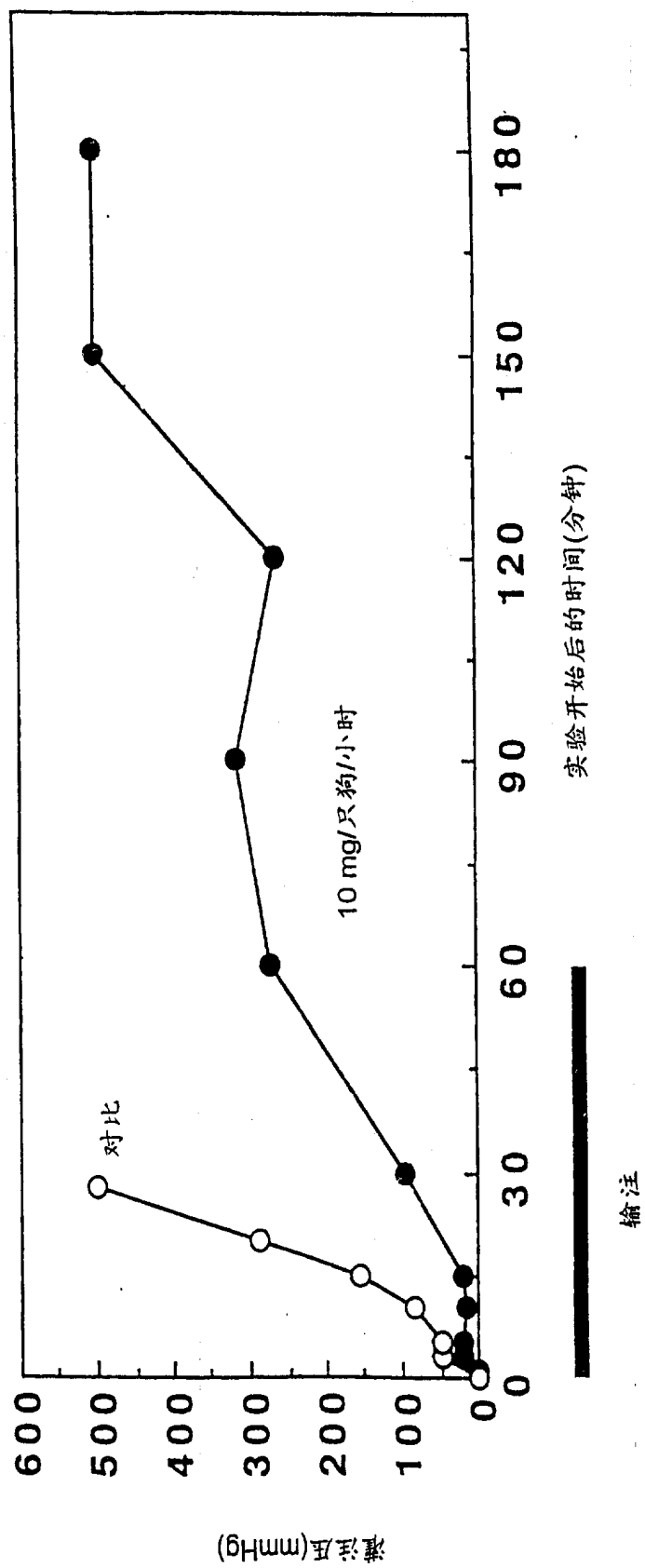


图3

储存过程中防止血小板数减少的保护效果

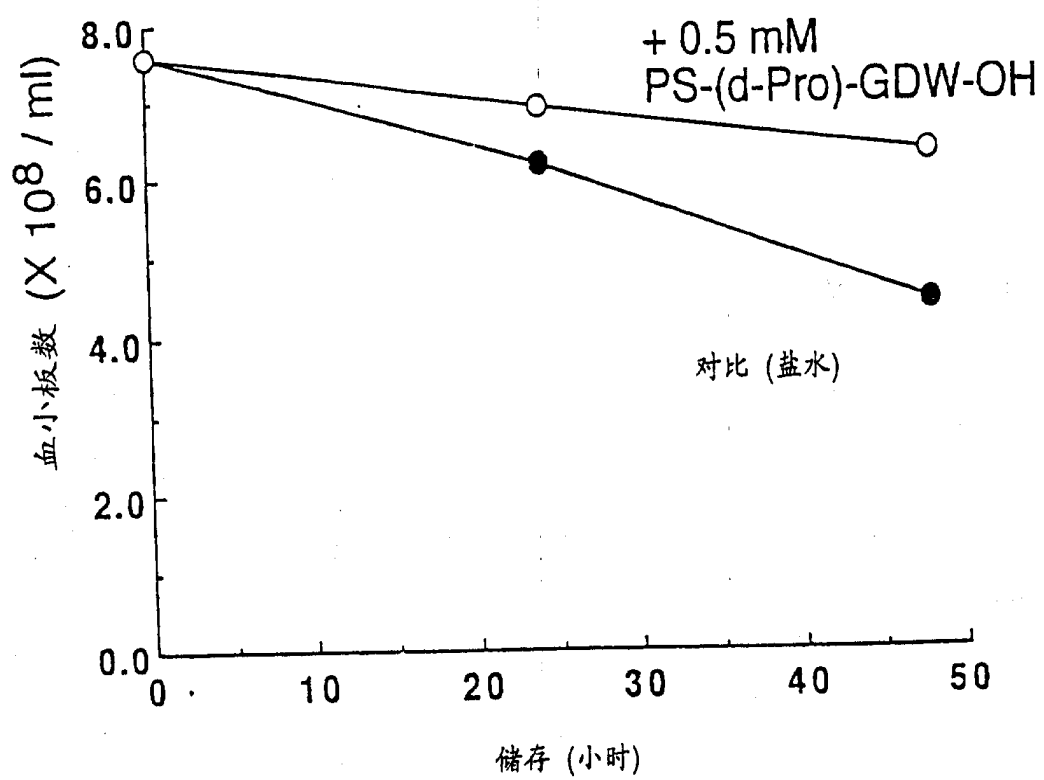


图4

防止血小板聚集能力下降的保护效果

