

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817193.4

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100413883C

[22] 申请日 2002.8.28 [21] 申请号 02817193.4
[30] 优先权

[32] 2001.9.3 [33] EP [31] 01203314.8

[86] 国际申请 PCT/NL2002/000566 2002.8.28

[87] 国际公布 WO2003/020753 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.2

[73] 专利权人 安斯泰来制药欧洲有限公司

地址 荷兰莱德多普

[72] 发明人 T·J·M·莫勒纳尔 J·柯伊伯

T·J·C·范贝克尔

E·A·L·比森

[56] 参考文献

WO0034303A1 2000.6.15

WO9531210A 1995.11.23

审查员 王亦然

[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 李华英

权利要求书 4 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

选择性地与 P-选择蛋白结合的肽化合物

[57] 摘要

本发明涉及选择性地与粘着分子人 P-选择蛋白结合的化合物，特别是包含具有氨基酸序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ 的肽，或者所述肽的功能等价物的这些化合物。此外，本发明还涉及这些化合物的制备方法，这些化合物在治疗或诊断方法以及在药物组合物中的用途，编码包含所述化合物的氨基酸序列的蛋白质材料的核酸，包含这些核酸的基因递载体，与所述化合物结合的结合分子，和测定化合物是否能够与 P-选择蛋白结合的方法。

1、氨基酸序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ 的化合物，其对人 P-选择蛋白具有亲和力，其中

A_1 是 D-或 L-半胱氨酸(C)或 D-或 L-缬氨酸(V)；

A_2 是 D-或 L-天冬氨酸(D)；

A_3 是 D-或 L-苯丙氨酸(F)或者 D-或 L-色氨酸(W)；

并且所述氨基酸序列的 $A_3A_1A_2A_1$ 部分选自 FVDV、WVDV 和 WCDV；

A_x 是 D-或 L-谷氨酸(E)，D-或 L-天冬氨酸(D)，D-或 L-半胱氨酸(C)或者 D-或 L-甘氨酸(G)；

并且其中 X 标志所述序列的 N-端侧且为氢或包含 1-6 个 D-或 L-氨基酸的残基，Y 标志所述序列的 C-端侧且为羟基或包含 1-11 个 D-或 L-氨基酸且以羟基终止的残基，或者其中 X 和 Y 在一起可以形成环状体系。

2、如权利要求 1 的化合物，其中所述序列在 N-端或 C-端还包含氨基酸 A_4 ，其中

A_4 是包含亲水侧链的 D-或 L-氨基酸。

3、如权利要求 1 的化合物，其中 A_x 代表 D-或 L-谷氨酸(E)或者包括 A_2 。

4、如权利要求 1 的化合物，其中 A_1 是缬氨酸(V)。

5、如权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 A_3 是色氨酸(W)。

6、如权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 X 包含至少 2 个氨基酸，其中之一为天冬氨酸(D)。

7、如权利要求 6 的化合物，其中天冬氨酸与 A_x 经由一个其它氨基酸组成的间隔相连，并且所述一个其它氨基酸是缬氨酸(V)。

8、如权利要求 1-4 中任一项的化合物，包含环状主链结构。

9、多聚体，其包含至少 2 个如权利要求 1-8 中任一项所述的化合物，所述多聚体与 P-选择蛋白结合的亲和常数低于一个所述化合物的亲和力的 1/20。

10、如权利要求 1-8 任一项的化合物的制备方法，其中通过化学或酶促连接装配氨基酸单体或氨基酸寡聚体，所述方法在液相中和/或在官能化固相的界面上进行。

11、如权利要求 1-8 任一项的化合物的制备方法，包括步骤：

- (a) 将编码该化合物的核酸序列与能够转染细胞的载体相结合；
- (b) 用该载体和与其结合的核酸序列转染宿主细胞；
- (c) 在允许表达该化合物的条件下培养所述宿主细胞；
- (d) 将该化合物分离。

12、如权利要求 1-8 任一项的化合物用于制备药物或诊断剂的用途。

13、如权利要求 1-8 任一项的化合物用于制备抑制白细胞与血小板和/或内皮细胞结合的药物、或者抑制 P-选择蛋白与钙蛋白酶家族的成员之间相互作用的药物的用途。

14、如权利要求 12 或 13 的用途，用于制备治疗、预防、或者诊断慢性炎症性疾病、类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化症、动脉

粥样硬化、再狭窄、局部缺血、再灌注损伤、肾衰竭、肿瘤转移、细菌性脓毒症、播散性血管内凝血、成人呼吸窘迫综合征、中风、血管生成、移植排斥、血栓形成或循环休克的药物。

15、药物组合物，包含如权利要求 1-8 任一项的化合物或权利要求 9 的多聚体和一种或多种药用可接受的载体或赋形剂。

16、如权利要求 15 的药物组合物，其被配制并加工用于肠胃外给药。

17、如权利要求 15 的药物组合物，配制并加工用于经口给药。

18、如权利要求 15 的药物组合物，配制并加工用于经粘膜给药。

19、如权利要求 15 的药物组合物，配制并加工用于经肺给药。

20、如权利要求 15-19 任一项的药物组合物，还包含药物靶向剂和/或生物利用率增强剂。

21、一种测定分子是否包括对 P-选择蛋白的结合亲和力的方法，包括将 P-选择蛋白与所述分子和与权利要求 1-8 任一项的化合物接触，并测定所述化合物与所述 P-选择蛋白的结合是否降低。

22、编码氨基酸序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ 的化合物的核酸，其中

A_1 是 D-或 L-半胱氨酸(C)或 D-或 L-缬氨酸(V)；

A_2 是 D-或 L-天冬氨酸(D)；

A_3 是 D-或 L-苯丙氨酸(F)或 D-或 L-色氨酸(W)；

并且所述氨基酸序列的 $A_3A_1A_2A_1$ 部分选自 FVDV、WVDV 和 WCDV；

A_x 是 D-或 L-谷氨酸(E), D-或 L-天冬氨酸(D), D-或 L-半胱氨酸(C)或者 D-或 L-甘氨酸(G);

并且其中 X 标志所述序列的 N-端侧且为氢或包含 1-6 个 D-或 L-氨基酸的残基, Y 标志所述序列的 C-端侧且为羟基或包含 1-11 个 D-或 L-氨基酸且以羟基终止的残基。

23、如权利要求 22 的核酸, 其中所述氨基酸序列在 N-端或 C-端还包含氨基酸 A_4 , 其中

A_4 是包含亲水侧链的 D-或 L-氨基酸。

24、如权利要求 22 或权利要求 23 的核酸用于制备药物的用途。

25、一种基因送递载体, 包含如权利要求 22 或权利要求 23 的核酸。

26、一种测定化合物是否能够结合人 P-选择蛋白的方法, 包括在如权利要求 1-8 任一项的化合物中, 用氨基酸置换保守氨基酸并测定所得化合物是否能够与所述 P-选择蛋白结合。

选择性地与 P-选择蛋白结合的肽化合物

发明领域

本发明涉及选择性地与粘着分子人 P-选择蛋白结合的化合物，这些化合物的制备方法，这些化合物在治疗或诊断方法以及在药物组合物中的用途，编码含有所述化合物的氨基酸序列的蛋白质材料的核酸，包含这些核酸的基因送递载体，与所述化合物结合的结合分子，和一种测定化合物是否能够与 P-选择蛋白结合的方法。

发明背景

近年来，细胞表面的粘着分子已被公认为是许多细胞过程(包括细胞生长、分化、免疫细胞转移迁移和应答，以及癌转移)中的关键介质。已鉴定了 4 大类的粘着分子：免疫球蛋白超家族细胞粘着分子(CAMs)、钙粘着蛋白、整联蛋白和选择蛋白。选择蛋白代表了一类目前 3 个跨膜、结合碳水化合物的糖蛋白：“内皮”E-选择蛋白、“白细胞”L-选择蛋白和“血小板”P-选择蛋白。所有这 3 个选择蛋白都是二价阳离子(例如钙)依赖性的并且具有带碳水化合物识别基序(一种表皮生长因子样基序)的细胞外结构域，以及一些较小且与补体调节蛋白有关的结构域。

人 P-选择蛋白(也称之为 GMP-140、LECAM-3、PADGEM、CD62、CD62P)是由血小板和内皮细胞表达的。当在这些细胞的表面上表达时，其最显著的作用是在白细胞离开毛细管并进入毛细血管后小静脉时减慢这些白细胞，后者代表了白细胞-内皮粘着的主要部位。这种减慢过程被观察为白细胞滚动，表示最初粘着的亲和力相对低。滚动白细胞的牢固粘着主要是通过整联蛋白介导的。

在内皮细胞内，P-选择蛋白贮存在怀布尔-帕拉德体上；在血小板

中，以 α -颗粒找到。激活之后，P-选择蛋白响应多种炎性或血栓形成剂而在几分钟内动员到细胞表面。内皮P-选择蛋白的主要功能是将白细胞募集到毛细血管后小静脉内，而血小板P-选择蛋白还导致形成血栓。目前已知的P-选择蛋白的一个天然配体是PSGL-1(P-选择蛋白糖蛋白配体-1)，它是一个160 kDa唾液蛋白，在白细胞表面上表达，在那里在尾部浓缩。对p-选择蛋白的结构和功能的更详细描述在许多文献中可以找到，例如 J. Panes, *Pathophysiology* 5, 271 (1999); F. Chamoun 等人, *Frontiers in Bioscience* 5, e103 (2000 年 11 月 1 日); S.-I. Hayachi, *Circulation* 102, 1710 (2000)。

P-选择蛋白还表现出更直接地参与血小板聚集，如最近对P-选择蛋白与3-硫酸化的半乳糖苷神经酰胺(也称之为硫苷脂)的Ca-非依赖性相互作用的研究中所示的。这种相互作用可能在P-选择蛋白的不同结合部位发生，因为这种结合可以受到抗体WASP 12.2的抑制，但是不受AK4的抑制，而天然P-选择蛋白配体PSGL-1(其参与白细胞粘着)的结合既受到WASP 12.2的阻断也受到AK4的阻断。然而，似乎结合部位是重叠的。假设硫苷脂相互作用稳定血小板聚集物。

炎症和炎症性过程在许多疾病和病症的病理生理学中起着重要作用。发现其中选择蛋白水平增加并且因此可能涉及选择蛋白-介导的病理生理学事件的脑病症包括：严重外伤性脑损伤、复发-缓解的多发性硬化症、脑动脉闭塞、局部缺血和中风。提示选择蛋白在其中起作用的心脏病症包括：急性心肌梗塞、动脉损伤，例如因血管成形术产生的，以及局部缺血。类似地，选择蛋白在肾病症中涉及，例如因局部缺血和再灌注引起的肾损伤，和肾衰竭。而且，选择蛋白表现出在器官移植排斥、冷缺血、出血性休克、败血症性休克、肿瘤转移、慢性炎症、类风湿性关节炎、炎性肠病、动脉粥样硬化、再狭窄、血管生成、播散性血管内凝血、成人呼吸窘迫综合征和循环休克中起作用。

因此，通过特异性地打断P-选择蛋白级联来改善涉及激活内皮细胞和白细胞特别是P-选择蛋白动员和表达的这些和其他病症似乎是可行的。可以这样实现，例如通过给予与人P-选择蛋白选择性地结合

但是不具有其生物活性的配体。通过这种方法,可以使动员的 P-选择蛋白失活并防止白细胞-诱导的组织损伤。潜在地,通过基因治疗可以获得相同的效果,条件是 P-选择蛋白配体或拮抗剂是一种肽或者经修饰的肽,根据该方法,需要这种治疗的人的体细胞将用载有编码 P-选择蛋白拮抗剂的 DNA 序列的表达载体进行转染。

P-选择蛋白配体或拮抗剂也可用于预防上述疾病和病症。而且,这些配体也可用于在体内或体外诊断这些疾病。

近年进行了许多尝试来鉴定或创建这些 P-选择蛋白的选择性配体。迄今为止,测定了许多物质,但是还没有临床研究得出结论性证据证实任何这些化合物产生所需的临床效果而在副作用方面可以耐受。

例如,在动物模型中产生并测定的 P-选择蛋白的抗体,发现它可保护肾免受缺血-再灌注损伤(H. C. Rabb 等人, JASN 5, 907, 1997; US-A-6,033,667)。在另一研究中,使用重组可溶形式的 P-选择蛋白糖蛋白配体-1 (rPSGL-Ig)抑制猫中的血栓形成(M. J. Eppihimer 等人, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 20, 2483, 2000)。WO-A-96/09309 公开了为 E-和 P-选择蛋白的配体的寡糖结构。WO-A-99/41363 公开了与选择蛋白结合的足糖萼蛋白样蛋白质。WO-A-00/41711 描述了多种较小的肽或肽序列,它们与人选择蛋白家族的成员结合;这些序列中的大多数包括一个或多个亮氨酸或异亮氨酸单元。

作为抑制 P-选择蛋白级联的另一种方法,发现得自选择蛋白家族的凝集素结构域的多种肽抑制嗜中性粒细胞与 P-选择蛋白粘着(例如 US-A-6,111,065 和 US-A- 5,916,876);这些肽可能与白细胞上的 P-选择蛋白受体结合。

在 WO-A-94/05269 中,描述了抑制选择蛋白如 P-选择蛋白、E-选择蛋白和 L-选择蛋白结合的肽。这些肽具有 P-选择蛋白、E-选择蛋白或 L-选择蛋白的 11-18 个氨基酸序列的部分作为其核心区域。而且,WO-A-95/31210 涉及结合选择蛋白(包括内皮白细胞粘着分子 1

(ELAM-1))的肽和化合物。为了抑制炎症的目的,将这些肽用于阻断白细胞与选择蛋白即特别是 E-选择蛋白但是也包括与 P-选择蛋白或 L-选择蛋白粘着。

尽管进行了这些尝试,但是仍然需要对 P-选择蛋白具有选择性亲和力的物质,所述物质可用于制备诊断、预防和治疗涉及白细胞与血管内皮细胞或者与血小板粘着的多种疾病和病症用的药物组合物。还需要 P-选择蛋白配体,它可用作药物组合物中的靶向分子或部分,用于将药物或遗传物质靶向引导到表达 P-选择蛋白的组织。

发明目的

因此本发明的目的是提供对人 P-选择蛋白有亲和力的化合物。

具体地说,本发明的目的是提供起 P-选择蛋白的拮抗剂或部分拮抗剂作用的化合物。

本发明的另一目的是提供起靶向配体作用的化合物,它具有将药物和遗传物质靶向引导到表达 P-选择蛋白的细胞和组织的能力。

本发明的再一目的是提供这些化合物的制备方法。

再一目的是提供这些化合物以及含有这些化合物的组合物的用途。

本发明的其它目的在以下描述的基础上将显而易见。

发明概述

在第一个方面,本发明提供了对人 P-选择蛋白具有选择性亲和力的化合物。本发明的化合物是肽或功能等价物,例如经修饰的肽、肽类似物或者肽模拟物。它们包含序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$, 其中 A_1 是选自如下的 D-或 L-氨基酸: 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)或其类似物或模拟物; A_2 是选自天冬氨酸(D)或其类似物或模拟物的 D-或 L-氨基酸; 并且 A_3 是选自如下的 D-或 L-氨基酸: 苯丙氨酸(F)、酪氨

酸(Y)和色氨酸(W)或其类似物或模拟物; A_x 是任意的 D-或 L-氨基酸或其类似物或模拟物; X 是任意的 N-端基团或序列; 并且 Y 是任意的 C-端基团或序列。这些化合物与人 P-选择蛋白的亲合常数通常在微摩尔范围内, 但是当它们作为具有 2 或更高价的多聚体构型时其亲和力大大增加。

在 WO-A-00/34303 中, 描述了一种含有 610 个氨基酸的序列, 它包含序列 Asn-Val-Val-Glu-Cys (NVVEC) 和 Gly-Phe-Val-Glu-Cys (GFVEC)。在该 WO-A-00/34303 中没有提及 P-选择蛋白。给出的这两个序列不是本发明化合物的类似物或模拟物。

在第二个方面, 本发明提供了这些化合物的制备方法。这些方法包括化学和酶促连接氨基酸单体或寡聚体以装配这些化合物。它们还包括使用载体将核酸序列转染宿主细胞, 在宿主细胞内表达编码这些化合物的核酸序列。

另一方面, 本发明涉及本发明的这些化合物用于制备药物或诊断组合物的用途, 这些组合物适于在体外和体内抑制白细胞与血小板和内皮细胞结合, 以及适于直接抑制血小板聚集。作为药物, 这些组合物可用于治疗并预防涉及激活 P-选择蛋白-介导的白细胞与血小板和内皮细胞结合的病症和障碍, 例如血栓疾病、局部缺血、再狭窄、动脉粥样硬化、肾衰竭、寄生虫病、肿瘤和肿瘤转移; 而且, 这些化合物和组合物可用于诊断、预防和治疗涉及血小板聚集的疾病和病症, 例如血栓形成、中风和心脏病发作。含有本发明化合物的药物组合物可以适合各种给药路径, 例如肠胃外、经口、经粘膜、经鼻或肺。它们还可以含有靶向剂、生物利用率提高剂、或除本发明化合物之外的活性成分, 并提供立即或改进的释放。

再一方面, 本发明涉及测定一种分子是否包括对 P-选择蛋白的结合亲和力的方法, 包括将 P-选择蛋白或其功能等价物与所述分子和与本发明的化合物接触, 接着测定所述化合物与所述 P-选择蛋白或其功能类似物的结合是否降低。

此外, 本发明还涉及一种编码蛋白质分子的核酸, 所述蛋白质分

子包含氨基酸序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$, 其中 A_x 、 A_3 、 A_1 和 A_2 如本文上面所定义, 并且其中 X 是所述序列的 N-端侧, Y 是所述序列的 C-端侧, 或其功能等价物。正如本文所用的, 蛋白质分子是基于氨基酸序列的化合物, 例如蛋白质和寡肽或多肽, 及其衍生物或类似物。所述核酸可用于制备一种药物, 而另外包括所述核酸的基因送递载体也在本发明的范围内。

再一方面, 本发明还包括能够特异性地结合本发明化合物的结合分子。

而且, 本发明涉及一种测定化合物是否能够与人 P-选择蛋白结合的方法, 包括在本发明的化合物中, 用一个氨基酸置换一个保守氨基酸并测定所得化合物是否能够与所述 P-选择蛋白结合。

发明详述

本发明的化合物具有对人 P-选择蛋白(一种膜糖蛋白, 由血管内皮细胞和血小板表达, 涉及白细胞与内皮和血小板粘着)的亲合力。化合物与 P-选择蛋白的亲合力或结合特性可以定量, 例如以亲和常数 (IC_{50})。通常, 亲和常数为约 50-100 μM 或更小将被认为是亲和力和结合的证据。对于配体而言更理想的是亲和常数为约 10 μM 或更小的物质。根据本发明, 在相互作用或结合中起作用的非共价型键可以获得的最高亲和常数是约 10^{-15} M。然而, 通常亲和常数高于约 10^{-12} M, 大多数情况下高于约 10^{-9} M。

而且, 本发明的化合物包括一种肽或者与肽相关的分子结构, 本文称之为功能等价物。

肽定义为由两个或更多的氨基酸通过一个酸的氨基与另一个的羧基结合获得的酰胺(Merriam Webster Medical Dictionary ©2001)。正如本文所用的, 肽也可指在分子内的肽结构。通常, 肽是由天然存在的 L- α -氨基酸组成的, 这些氨基酸为丙氨酸(Ala 或 A)、精氨酸(Arg 或 R)、天冬酰胺(Asn 或 N)、天冬氨酸(Asp 或 D)、半胱氨酸(Cys 或 C)、谷氨酰胺(Gln 或 Q)、谷氨酸(Glu 或 E)、甘氨酸(Gly 或 G)、组氨酸(His

或 H)、异亮氨酸(Ile 或 I)、亮氨酸(Leu 或 L)、赖氨酸(Lys 或 K)、甲硫氨酸(Met 或 M)、苯丙氨酸(Phe 或 F)、脯氨酸(Pro 或 P)、丝氨酸(Ser 或 S)、苏氨酸(Thr 或 T)、色氨酸 (Trp 或 W)、酪氨酸(Tyr 或 Y)和缬氨酸(Val 或 V)。

本发明的肽的功能等价物是蛋白质分子，包含种类性质相同的人 P-选择蛋白结合活性，但是量不一定相同，并且可以是例如经修饰的肽、类肽、肽类似物或肽模拟物。

经修饰的肽是由肽通过引入天然存在的氨基酸中没有的取代基或官能团而获得的分子。该术语还包括通过肽与其它化学类别的分子反应获得的化合物，无论这些分子是否天然存在。例如，生物素化的肽、糖蛋白和脂蛋白经常在自然界中找到，而用聚乙二醇修饰的肽，例如聚乙二醇化(pegylated)干扰素 α -2b (Peg-Intron[®])，是已经过设计以改变一部分但不是所有的肽性能的化学修饰肽的实例。

类肽，如同肽一样，通常是两个或多个氨基酸的酰胺。然而，它们经常不是直接由天然存在的氨基酸获得的，而是由各种类型的化学合成的 L-或 D-氨基酸获得的。

肽模拟物，在其最广义范围内，是其功能结构或多或少与肽相似的化合物，但是在主链中可能还含有非肽键，或者 D-氨基酸。一般说来，肽模拟物作为在与受体和酶相互作用中天然肽的替代物 (Pharmaceutical Biotechnology, D. J. A. Crommelin 和 R. D. Sindelar 编辑, Harwood Academic Publishers, 1997, 第 138 页)。假肽是一类肽模拟物，它们是含有酰胺键电子等排物而不是酰胺键的化合物(出处同上, 第 137-140 页)。

本发明的化合物还包括肽或功能等价物的盐，例如药用可接受的酸-或碱加成盐。它们还包括肽或功能等价物的多聚体。

本发明的化合物的特征在于它们包含序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ ，其中 A_1 是 D-或 L-半胱氨酸(C)、D-或 L-甲硫氨酸(M)、D-或 L-缬氨酸(V)或其类似物； A_2 是 D-或 L-天冬氨酸(D)或其类似物； A_3 是 D-或 L-苯丙氨酸(F)、D-或 L-酪氨酸(Y)或者 D-或 L-色氨酸(W)或其类似物； A_x

是 D-或 L-氨基酸，并且其中 X 标记所述序列的 N-端侧，Y 标记所述序列的 C-端侧，或者其中 X 和 Y 在一起可以形成一环状体系。更具体地说，X 是氢或者包含 1-6 个 D-或 L-氨基酸的残基；Y 是羟基或者包含 1-11 个 D-或 L-氨基酸且以羟基终止的残基。

根据本发明，在该序列中的 2 个 A₁ 单元独立地选择；它们彼此可以相同或不同。优选，至少一个 A₁ 单元代表缬氨酸(V)。更优选两个 A₁ 单元都是缬氨酸(V)。在另一个实施方案中，A₁ 是半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)或缬氨酸(V)的类似物或模拟物。选择天然存在的氨基酸的适宜类似物或模拟物的技术对本领域技术人员来说是公知的。例如，假肽方案旨在获得较高化学或酶稳定性的肽，同时保持其生物活性。在体内经受快速降解的肽键被其它官能团替换以产生生物电子等排物或酰胺键代用品。生物电子等排基团的实例是 N-甲基酰胺、硫酯、硫代酰胺、酮亚甲基、亚甲基氨基、逆-反酰胺、亚甲基硫代和亚甲基氧基团(出处同上，第 138-139 页)。一种改进肽的选择性的方法是向主链中引入构象限制，这样使潜在的受体或酶相互作用的数量降低。这些限制最经常是通过引入碳-碳双键(烯烃类似物)和环结构实现的(出处同上)。鉴定类似物(其模拟氨基酸如半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)或缬氨酸(V)的功能结构)的另一方法是计算机辅助建模。优选的模拟物结构具有电荷或电负性、疏水性以及空间定向与所述氨基酸相似的侧链。在另一实施方案中，一个或两个 A₁ 单元是半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)或缬氨酸(V)的 D-氨基酸类似物。

正如所述的，本发明还包括所述肽的功能等价物。等价物尤其可以使用保守氨基酸变化通过氨基酸置换找到。具体地说，本发明还包括一种测定化合物是否能够结合人 P-选择蛋白的方法，包括在本发明的化合物中用一氨基酸置换一保守氨基酸并测定所得化合物是否能够与所述 P-选择蛋白结合。据此，已发现，并且也是本发明的一部分，该肽的精确氨基酸组成-至少对氨基酸 A₂ 和 A₃ 而言-随着肽中氨基酸数目增加，变得多少不太重要。例如，已发现，包含 10 个以上，优选 12 个以上氨基酸，包含苯丙氨酸(F)而不是色氨酸(W)作为 A₃ 的肽，能

够特异性地与人 P-选择蛋白结合。然而，当该肽包括 6 个氨基酸时，所述色氨酸被苯丙氨酸置换不会获得特异性结合的肽。本发明的等价物的另一实例是这样一种肽，它包含氨基酸序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ 并包括 15 个氨基酸，在位置 A_2 包括谷氨酸(E)而不是天冬氨酸(D)，得到特异性的 P-选择蛋白结合。然而，当该肽链仅有 6 个氨基酸时，相同的置换不能得到特异性结合肽。例如，序列 EWVEVA 具有 $1600\ \mu\text{M}$ 结合亲和力，而具有所述序列的 15-聚体的结合亲和力小于 $10\ \mu\text{M}$ 。尽管不希望受任何理论的约束，但是假定肽长度的影响与肽的构象有关，它对结合能力有影响。当本发明的肽是至少十聚体时，或者优选至少十二聚体时， A_3 和 A_2 可以分别代表 F 和 E。

根据本发明， A_2 是一种 D-或 L-氨基酸，其溶剂接触的侧链在生理 pH 下带负电，该氨基酸选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)、或其类似物或模拟物。在优选实施方案中， A_2 或者是 L-谷氨酸(E)或者是 L-天冬氨酸(D)。在其它实施方案中， A_2 是与天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)有关的类似结构。为了鉴定合适的类似物，适用与就 A_1 所述相同的原理。

A_3 是一种带有芳香侧链的 D-或 L-氨基酸，它选自苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)、或其类似物或模拟物。更优选 A_3 是一种选自该组的 L-氨基酸。最优选是色氨酸(W)。在其它实施方案中， A_3 是一种如上所定义的与苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)有关的类似结构。

A_x 可以是任意的 D-或 L-氨基酸、或其类似物或模拟物。然而要求有 A_x 存在，因为已发现没有 A_x 的化合物通常显示与 P-选择蛋白结合差(与含有 A_x 的类似化合物相比)。在一个优选实施方案中， A_x 是一种选自如下的 D-或 L-氨基酸：天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)、或其类似物或模拟物。在该实施方案中， A_x 的特性与 A_2 的相似；该化合物可以定义为包含序列 $XA_2A_3A_1A_2A_1Y$ 。应注意的是，2 个 A_2 单元(如同 2 个 A_1 单元一样)独立选择，即它们彼此可以相同或不同。

X 定义为任意的 N-端基团或序列。例如，X 可以简单地是氢。更优选 X 是一个或多个氨基酸、或其类似物或模拟物的序列。在一个优

选实施方案中，X 包括至少两个氨基酸。更优选 X 包括一个天冬氨酸(D)，它优选与 A_x 经由由一个其它氨基酸组成的间隔相连。

Y 定义为任意的 C-端基团或序列。如果在 Y 内没有包含氨基酸或类似物，那么 C-端基团可以是羟基。在一个优选实施方案中，Y 是多至约 5 个氨基酸单元的序列。也优选至少一个具有带负电侧链的氨基酸存在于 Y 中，优选它与其余 $XA_xA_3A_1A_2A_1$ 序列通过 1-3 个氨基酸分隔开。被 P-选择蛋白识别对在 C-端的取代比在 N-端的取代更能耐受。本领域技术人员有能力发现这方面的合适氨基酸。

本发明的化合物可以具有一个环状或者以其它方式限制的主链。在这种情况下，X+Y 在一起可以适宜地经 cys-cys 结合相连。当然，尽管也可以有其它类型的(化学)键，例如酰胺结合，硫醚结合、氨基甲酸酯结合或酯结合。

基团 X+Y 的长度并不特别关键，只要核心序列被 P-选择蛋白识别。通常，X+Y 的最小长度相当于 5-6 个氨基酸的长度。

在其中一个实施方案中，本发明提供了这样的化合物，它除了如上所述的结构特性之外，在 C-或 N-末端还具有一个 A_4 单元，其中 A_4 是具有亲水侧链的 D-或 L-氨基酸、或其类似物或模拟物。优选 A_4 是丝氨酸(S)、甘氨酸(G)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)、或谷氨酸(E)。最优选是丝氨酸(S)。 A_4 的优选位置在 Y 和序列的剩余部分之间，如序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1A_4Y$ 和 $XA_2A_3A_1A_2A_1A_4Y$ 所示。

本发明的化合物具有直链、支链、环状或受限制的主链。例如，具有至少两个半胱氨酸(C)单元的肽或功能等价物可以经氧化环化。如果化合物经这种二硫键环化，那么优选参与的半胱氨酸单元分别是 X 和 Y 的成员。环状结构事实上是构象受限制的主链的一个实例。其它类型的受限制的结构也可以引入以降低该化合物的构象柔性。特别是在主链中存在烯键或小环结构用于该目的。在 *Pharmaceutical Biotechnology*, D. J. A. Crommelin 和 R. D. Sindelar 编辑, Harwood Academic Publishers, 1997, 第 139f 页中给出了这种限制的实例。

在一个优选实施方案中，本发明的化合物以肽或功能等价物的多

聚体提供。正如本文所用的，多聚体，在肽化学中也称作寡聚体，指肽、蛋白质、类肽、肽模拟物、或其类似物，其由一个以上的肽链组成。例如，发现包含序列 $XA_xA_3A_1A_2A_1Y$ 的生物素化肽的四聚体与 P-选择蛋白的亲合力比组成它们的肽的亲合力高得多。本发明优选的多聚体对 P-选择蛋白的亲合常数低于相应肽的亲合常数的 1/20，特别是 1/100。

在可以创建以形成本发明化合物的另一类多聚体中，单一的肽或类肽链与可生物相容的蛋白质例如人血清白蛋白、人源化抗体、脂质体、微胶粒、合成聚合物、纳米粒子和噬菌体相偶联。多聚体也可以代表经由间隔物彼此连续偶联的肽序列，即多联体、或树状体、或簇。

这些化合物通常可以通过制备肽和类似物质已知的方法制得。仅含有几个氨基酸或类似单元，优选不超过 30-50 个单元的较小化合物能够经化学或酶促连接技术制得，或者使用在溶液和悬液中进行反应的经典方法，或者通过使用更流行的固相方法，其中将该肽进行装配同时固定在固体表面如聚合物珠上。较大的化合物通常是通过自动固相肽合成器合成的。

或者，这些化合物可以通过已知的基因工程技术制得。如果该化合物的确是肽或者是略微修饰的肽的话，该方法特别有效。例如，编码该化合物的 DNA 序列可以与能够转染细胞的表达载体相联合或组合。在该方法的另一步骤中，通过在能够发生转染的条件下将细胞与载体和载体结合的 DNA 接触，用所述 DNA 转染宿主细胞或靶细胞。在另一步骤中，将该宿主或靶细胞在允许表达该化合物的条件下培养。接着，可以将该化合物分离。如果该化合物本身不能被编码或者表达，但是与可以编码或表达的肽非常相似，那么可以使用该方法制备与该化合物相似的肽，接着通过一个或多个将该肽经化学或酶技术进行修饰的步骤制备该化合物。

为此目的使用多种载体，例如病毒载体、lipoplexes、polyplexes、微球体、毫微球、树状体、裸露 DNA、肽递送体系、脂质，特别是阳离子脂质、或由其制得的脂质体、聚合物载体，特别是由聚阳离子聚

合物制得的。优选的病毒载体有逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、单纯性疱疹病毒、和病毒体。优选的非病毒载体包括脱乙酰壳多糖、SPLP、基于 PLGA 的聚合物体系、聚乙烯亚胺类、聚赖氨酸类、聚磷酸胺化物、聚(甲基)丙烯酸酯类、聚磷腈类；DOPE、DOTAP、和 DOTMA。

对可用于制备这些化合物的方法的一些更为全面的概括描述在：W. F. Anderson, *Nature* 392 Supp., 1998 年 4 月 30 日，第 25-30 页；*Pharmaceutical Biotechnology*, D. J. A. Crommelin 和 R. D. Sindelar 编辑，Harwood Academic Publishers, 1997，第 53-70、167-180、123-152、8-20 页；*Protein Synthesis: Methods and Protocols*, R. Martin 编辑，Humana Press, 1998，第 1-442 页；*Solid-Phase Peptide Synthesis*, G. B. Fields 编辑，Academic Press, 1997，第 1-780 页；*Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press, 1997，第 1-89 页。

肽或功能等价物的盐是通过已知方法制得的，它通常包括将该肽或类肽与药用可接受的酸混合形成酸加成盐，或者与药用可接受的碱混合形成碱加成盐。酸或碱是否是药用可接受的可以通过本领域技术人员考虑该化合物的特定用途之后容易地判断。例如，不是所有对于体外诊断组合物可以接受的酸和碱都可用于治疗组合物。根据所需用途，药用可接受的酸包括有机和无机酸如甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、羟乙酸、草酸、丙酮酸、琥珀酸、马来酸、丙二酸、肉桂酸、硫酸、盐酸、氢溴酸、硝酸、高氯酸、磷酸和硫氰酸，它们与肽和功能等价物的游离氨基形成铵盐。药用可接受的碱，与肽和功能等价物的游离羧基形成羧酸盐，它们包括乙胺、甲胺、二甲胺、三乙胺、异丙胺、二异丙胺、和其它一-、二-和三烷基胺以及芳基胺。而且，还包括药用可接受的溶剂化物、络合物或加合物，例如水合物或 ethurates。

多聚体例如可以通过将肽或类肽链的 N-端生物素化接着与链霉抗生物素复合。由于链霉抗生物素能够高亲和力地结合 4 个生物素分子或者缀合物，通过该方法可以形成非常稳定的四聚体肽复合物。多聚体可以由相同或不同的肽或功能等价物组成。然而，优选本发明的

多聚体由两个或多个相同的肽或功能等价物组成。

本发明的另一方面涉及所公开的化合物的用途。由于这些化合物选择性地与 P-选择蛋白结合，因此根据结合之后其与 p-选择蛋白相互作用的类型，它们可以起拮抗剂、部分拮抗剂的作用，或者仅仅起靶向工具的作用将缀合物物质靶向引导到表达 P-选择蛋白的细胞和组织上。因此，这些化合物可以有利地用于药物组合物。根据本发明，还提供这种药物组合物。

正如本文所用的，术语“药物组合物”是指治疗和诊断组合物，以及含有这种组合物的药物和诊断剂。治疗组合物和药物用于预防或治疗需要改善的哺乳动物的疾病和其它病症。诊断剂和诊断组合物用于在体内和体外诊断这些疾病。

这些化合物的优选用途是用于制备预防或改善涉及白细胞如单核细胞和嗜中性粒细胞与血管内皮和与血小板粘着以及进一步涉及血小板聚集的疾病和病症的治疗组合物或药物。这些化合物也可用于治疗希望抑制 P-选择蛋白-介导的胞内发信号的疾病的组合物。

例如，含有一种或多种本发明化合物的组合物可以有助于控制白细胞-介导的炎症过程。已知激活的白细胞释放毒性分子，该毒性分子可以破坏正常组织。这些炎症反应，其中一些还涉及 P-选择蛋白-介导的血小板激活，是几种病理情况的一部分，例如移植排斥、冷缺血、出血性休克、败血症性休克、肿瘤转移、慢性炎症、类风湿性关节炎、炎性肠病、动脉粥样硬化、再狭窄、血管生成、播散性血管内凝血、成人呼吸窘迫综合征、循环休克、严重外伤性脑损伤、复发-缓解的多发性硬化症、脑动脉闭塞、局部缺血、中风、急性心肌梗塞、动脉损伤，例如因血管形成术产生的，心肌局部缺血、因局部缺血和再灌注导致的肾损伤、和肾衰竭。

在另一实施方案中，这些化合物可用于制备诊断组合物或产品。这些组合物可用于体外测定以定量体液中的 P-选择蛋白浓度作为上述疾病和病症的标记。它们也可用于体内诊断成像过程以监控 P-选择蛋白介导的动脉粥样硬化、动脉瘤、经皮腔内冠状动脉成形术之后的再

狭窄(PTCA 后的再狭窄), 以及选自其中 P-选择蛋白被动员的其它病症。作为这些用途的一个选择, 本发明的化合物可以与螯合剂缀合, 接着与各向同性的标记(可以通过所选的监测系统检测)络合。

这些化合物的另一用途是作为研究工具。例如, 它们可用于测定分子与 P-选择蛋白或 P-选择蛋白的功能等价物的结合亲和力。为了进行该测定方法, P-选择蛋白或 P-选择蛋白的功能等价物将与待测定结合亲和力的分子和与本发明的化合物接触并温育。本发明化合物的降低的结合将指示该分子与 P-选择蛋白的亲和力。

本发明人还已发现, P-选择蛋白可以被天然存在的钙蛋白酶家族的成员切割。感兴趣的是, 钙蛋白酶家族中的一些蛋白酶似乎是包含本发明化合物的优选肽序列之一的仅有天然多肽结构, 所述序列是核心基序 EWVDV。钙蛋白酶 1 和钙蛋白酶 2 过度激活很有可能与神经疾病如阿尔茨海默氏病、外伤性脑损伤、中风和内障有关。钙蛋白酶 3 活性可能涉及一些类型的肌萎缩症, 钙蛋白酶 9 活性可能涉及胃癌, 而钙蛋白酶 8 和 10 似乎在 2 型糖尿病中起作用。在多种人类疾病中涉及钙蛋白酶的其它方面由 Y. Huang 和 K. Wang 描述在综述文章中:

The calpain family and human disease, Trends Mol. Med. 7, 355-362, 2001, 将其引入本文作为参考。

而且, 已发现, 本发明的化合物可抑制钙蛋白酶引起的对 L-选择蛋白和 P-选择蛋白的切割, 对 P-选择蛋白具有高得多的亲和力-通常为约 100 倍。从机械论的角度, 这暗示钙蛋白酶参与选择蛋白的激活。更具体地说, 这些选择蛋白从它们被表达的细胞表面上的脱落可通过钙蛋白酶诱导。因此, 本发明的化合物可用于希望抑制 P-选择蛋白和钙蛋白酶之间相互作用的任何应用。

这些化合物还可用作靶向分子或者缀合物在药物组合物中用于将药物或基因物质靶向引导到表达 P-选择蛋白的组织上。作为缀合物, 这些化合物可以直接与待送递到这些组织的活性分子或核酸偶联。另外, 可以将它们引入到脂质体或其它脂质载体、乳液小滴、聚合物、毫微颗粒和微粒子中或者将它们固定到其表面上, 从而获得待送递到

表达 P-选择蛋白的组织的药物或遗传物质的靶向载体。

这些药物组合物优选含有一种或多种本文中公开的具有 P-选择蛋白亲和力的化合物以及至少一种载体或赋形剂。正如本文所用的，载体或赋形剂是任意药用可接受的物质或者物质的混合物，其没有实质性药理活性，可以用作载体或者作为辅助物质，从而将化合物配制成稳定且易于给药的剂型。药用可接受的赋形剂的实例可在所有主要药典的专论中找到。

在一个实施方案中，该组合物经配制并加工用于肠胃外注射，优选用于血管内注射，例如静脉内或动脉内，但是也用于肌内、皮下、病损内、腹膜内或其它肠胃外给药路径。规定其它药物用于这些给药途径的制剂的相同原理也将教导本领域技术人员如何制备这些组合物。例如，肠胃外剂型的一个要求是其无菌。其它要求描述在所有主要药典中，例如在 USP 24 中，在专论 "General Requirements for Tests and Assays. 1. Injections"，第 1775-1777 页中。为了增加肠胃外制剂的稳定性，可能需要提供干的剂型，在可以将其给药之前必须重新配制。这种剂型的一个实例是冻干制剂。

可能希望以肠胃外控释剂型给予本发明的化合物，从而避免频繁注射并提高这种治疗的效力和便利性。已知有各种制备这种长效制剂的方法。通过固体植入物、毫微颗粒、毫微胶囊、微粒、微胶囊、乳液、悬液、油性溶液、脂质体或类似结构，可以提供延长的释放。

特别适用于制备肠胃外制剂的赋形剂是溶剂、助溶剂和液体或半固体载体，例如无菌水、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、丁二醇、脂肪油、短链和中链甘油三酯、卵磷脂、聚氧乙烯蓖麻油衍生物；调节重量摩尔渗透压浓度和 pH 的物质，例如糖，特别是葡萄糖，糖醇，特别是甘露醇，氯化钠、碳酸钠、柠檬酸、乙酸盐、磷酸盐、磷酸、盐酸、氢氧化钠等；稳定剂、抗氧化剂和防腐剂，例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠、EDTA、苄醇等；其它赋形剂和冻干助剂，例如白蛋白、葡聚糖等。

或者，这些药物组合物可以设计成用于口服并相应加工。适宜的

口服剂型包括片剂、硬胶囊、软胶囊、粉剂、颗粒、口服崩解剂型、糖浆、滴剂、悬液、泡腾片、可咀嚼的片剂、口服薄膜、冻干剂型、持续释放的剂型、控制释放的剂型。在一个优选实施方案中，口服剂型是一种包肠溶衣固体剂型以在胃的酸性和蛋白质水解环境中保护该化合物。

以经粘膜剂型给予本发明的化合物可能也是有益的。这种给药路径为非侵入性且对患者友善；同时它可以提高该化合物的生物利用率(与口服相比)，特别是如果该化合物在消化系统的液体中不稳定时，或者如果它太大不能从肠道有效吸收时。经粘膜给药例如可以经鼻、口腔、舌下、牙龈或阴道剂型实现。这些剂型可以通过已知技术制得；它们可以经过配制呈现鼻滴剂或喷剂、插入物、薄膜、贴剂、凝胶、软膏或片剂。优选，用于经粘膜剂型的赋形剂包括一种或多种提供粘膜附着性的物质，由此延长该剂型与吸收部位的接触时间，并因此潜在地增加吸收程度。

在另一实施方案中，这些化合物经肺途径给药，使用计量的吸入器、喷雾器、气溶胶喷剂或干粉吸入器。适宜的制剂可以通过已知方法和工艺制得。透皮、直肠、或眼给药在某些情况下也是可行的。

使用先进的药物递送或靶向方法更有效地递送本发明的化合物可能是有益的。例如，如果选择的是非肠胃外给药路径，适宜的剂型可以含有生物利用率提高剂，它可以是增加该化合物的利用率的任何物质或其混合物。这可以通过例如防止该化合物降解来实现，例如通过酶抑制剂或抗氧化剂。更优选该增强剂通过增加吸收屏障(通常为粘膜)的渗透性来增加该化合物的生物利用率。渗透增强剂可以经各种机理起作用；一些增加粘膜的流动性，而另一些将粘膜细胞之间的间隙连接打开或扩宽。另外一些降低了覆盖粘膜细胞层的粘液的粘性。优选的生物利用率增强剂有两亲物质如胆酸衍生物、磷脂类、乙醇、脂肪酸、油酸、脂肪酸衍生物、EDTA、卡波姆、聚卡波非和脱乙酰壳多糖。

另一方面，能够与上面公开的化合物结合的分子都在本发明的范围内。例如，可以使用标准杂交技术制备对化合物特异性的单克隆抗

体。可以利用其它技术设计和制备能够与本发明的化合物结合的更小分子。

以下实施例打算进一步描述本发明，但是并不将其范围限于本文提供的实施方案。

实施例 1:

使用 HBTU/HOBt 作活化剂经标准 Fmoc 化学法在自动合成器上通过固相合成制备以下肽:

.....A_xA₃A₁A₂A₁.....

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 C
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 V
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

通过向每一肽序列的 N-端缀合 Ahx 接头接着将该缀合物偶联到生物素上来将这些肽生物素化。还通过氧化将 TM11 制成环状构型，由此在 N-和 C-端半胱氨酸之间形成二硫键。通过将 10 μM 链霉抗生物素与生物素化的肽以 1:4 摩尔比在室温(RT)下温育 2 小时而得到 TM11 和 SH31 的四聚体。通过质谱分析和 HPLC 检测这些肽的质量。

使用适合的 ELISA 法研究这些化合物与 P-选择蛋白的亲合力。将链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(strepPO)与 TM11-生物素以 1:4 摩尔比在 RT 下温育 2 小时，由此形成四聚体肽 strepPO-复合物。为了竞

争研究, 将微量滴定孔用嵌合人 p-选择蛋白包被, 如分离 p-选择蛋白结合噬菌体所述。然后将孔与 2.5 nM TM11-strepPO 复合物于测定缓冲液中 4℃ 下温育 1 小时, 在有滴定量的肽的存在下, 以竞争与人 p-选择蛋白结合。在有防止聚集体形成的 DTT 存在的情况下测定线性化合物。用测定缓冲液洗涤 6 次之后, 在室温下将这些孔与 100 μ l TMB/H₂O₂ 温育 15 分钟。用 1 M H₂SO₄ 使反应终止, 并读出 450 nm 下的吸光度。由这些结果计算亲和常数:

	亲和力
生物素-TM1:	82 μ M
生物素-TM2:	49 μ M
生物素-TM11:	2 μ M
生物素-TM11(环状):	2 μ M
生物素-TM16:	12 μ M
生物素-TM17:	7 μ M
生物素-SH31:	19 μ M
生物素-A17:	0.1 μ M
生物素-A19:	12 μ M
四聚体 TM11:	10.7 nM
四聚体 SH31:	61.3 nM

通过细胞粘着试验证实这些化合物的亲和力, 其中在有滴定量的这些化合物存在的情况下将表达人 P-选择蛋白的中国仓鼠卵巢细胞与表达 PSGL-1 的 HL60 细胞一起培养。

实施例 2 (对比实施例):

如实施例 1 制备以下化合物并测定其与人 P-选择蛋白的亲和力。应注意到尽管这些化合物与实施例 1 的化合物非常相似, 但是它们不完全满足权利要求 1 的结构要求, 因此不是本发明的化合物:

								亲和力 [μM]
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

实施例 3: 对血小板聚集的抑制

如实施例 1 所述制备以下化合物并测定其抑制血小板聚集的效果。

人血小板通过 ADV 激活，并在有或者没有含 EWVDV 的肽的情况下测定血小板聚集程度。显示 DVEWVDVS (A19) 和 CDVEWVDVSC (A17) 显著削弱第二相的血小板聚集，聚集分别降低约 45% 和 25%。

实施例 4: 化合物与硫苷脂脂质体的相互作用

如实施例 1 所述制备下面的化合物并测定它们与带有 22% 硫苷脂的脂质体的相互作用。应注意的是，这些化合物与硫苷脂的相互作用是本发明化合物活性的附加且任选的方面。不与硫苷脂相互作用的化合物可能仍然代表本发明的化合物，只要它们与 P-选择蛋白结合并包含权利要求 1 定义的共有基序。

通过超声处理由蛋黄磷脂酰胆碱、胆固醇和硫苷脂制备脂质体，这些原料都溶解在氯仿/甲醇(1:1, v/v)中，其重量比为 4:0.8:1.33。加入痕量的 [^3H]-胆固醇(1.3×10^8 dpm)，并在氮气流下将该混合物干燥。所得脂质层在 PBS 中涡旋，接着经过超声处理，获得平均粒径为 59-62 nm 的脂质体。

将在包被缓冲液(50 mM NaHCO₃, pH 9.6)中的 Fc-特异性山羊抗-人 IgG 于高度结合 96 孔平板中温育。第二天, 用测定缓冲液(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4)洗涤这些孔并用封闭缓冲液(3% BSA 在测定缓冲液中)温育。洗涤之后, 用人 P-选择蛋白-IgG 温育这些孔, 洗涤, 接着用 [³H]-胆固醇标记的脂质体在有或者没有下面的化合物和抗体的情况下于 4℃ 下温育 2 小时。将未结合的脂质体除去之后, 收集结合的脂质体并使用闪烁计数器计数。

发现化合物 DVEWVDVS、DVEWVDVA 和 CDDVEWVDVSC 显著地抑制硫苷脂与 P-选择蛋白的结合, 而化合物 DVEAVDVS 和 EWVDV 对该结合没有抑制。看起来除了上面定义的核心序列之外, 在核心序列之外两个位置的天冬氨酸(下划线的 D)是有效抑制硫苷脂的必要特征。