



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 89104205.9

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C07K 7/00

[45]授权公告日 1996年1月17日

[24]颁证日 95.10.8

[21]申请号 89104205.9

[22]申请日 89.6.20

[30]优先权

[32]88.6.20 [33]US[31]208,926

[73]专利权人 默里尔多药物公司

地址 美国俄亥俄州

[72]发明人 斯蒂芬·H·布克

约翰·L·克拉坦尼斯基

A61K 38/04

舍斯特·F·哈斯曼

詹姆斯·R·麦克卡西

斯科特·L·哈比森

[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 辛敏忠

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图页数 5 页

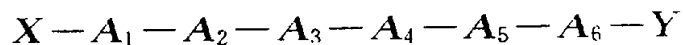
[54]发明名称 神经激肽A的拮抗剂的制备方法

[57]摘要

本申请叙述了神经激肽A的拮抗剂,它是天然存在的神经激肽A的衍生物,其中在羧基末端连接两个氨基酸的酰胺键被改变。应用一般的竞争结合和生物化学试验以及一般的生理学试验,确证了本发明化物的拮抗作用。本文还叙述了上述衍生物在与神经激肽A有关的许多方面的应用。

# 权 利 要 求 书

1. 制备下式肽衍生物或其药物上适用的盐的方法,



其中 X 为氢

$A_1$  为一个键;

$A_2$  为 *Asp*;

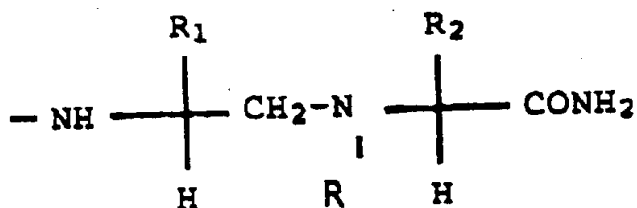
$A_3$  为 *Ser*;

$A_4$  为 *Phe*;

$A_5$  为 *Val*;

$A_6$  为 *Gly*; 和

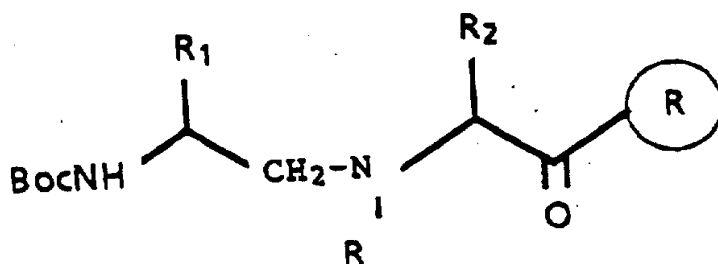
Y 为下式基团,



这里  $R$  为氢原子或甲基

$R_1$  和  $R_2$  均为异丁基；

该方法包括将  $\alpha$ -氨基受保护的氨基酸以  $A_6-A_1$  顺序固定到结合在树脂上的下式化合物上,并脱去氨基保护基,得到末端氨基增长的肽链,



其中  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R$  的定义同上,并且其中  $Boc$  为丁氧羰基保护基团  $R$  代表树脂。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中制备的产物为  $H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu\varphi[CH_2NH]Leu-NH_2$  或  $H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu\varphi[CH_2N(CH_3)]Leu-NH_2$ 。

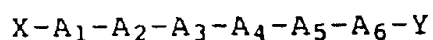
## 神经激肽 A 的拮抗剂的制备方法

本申请是美国申请号 3 1 5 2 0 2 ( 申请日期 1 9 8 9 年 2 月 2 4 日 ) 的部分继续申请, 而申请号 3 1 5 2 0 2 是现已放弃的申请号 2 0 8, 9 2 6 ( 申请日期 1 9 8 8 年 6 月 2 0 日 ) 的继续。

本发明是关于神经激肽 A 拮抗剂的新的肽衍生物。

P 物质和有关的速激肽、神经激肽 A 以及神经激肽 B 是一组天然存在的肽类, 它们广泛分布于身体组织内并具有各种生物作用。虽然 P 物质和神经激肽 B 的激动剂和拮抗剂是已知的, 神经激肽 A 的激动剂也是已知的, 但是神经激肽 A 的拮抗剂还没有报道。申请人现已发现一类神经激肽 A 的拮抗剂。该类化合物不仅从生物化学观点来看是有意义的, 而且该类化合物还具有有价值的药理学和医学用途。

下述结构 I 的肽衍生物或其药学上适用的盐是神经激肽 A 的拮抗剂。该类新的肽衍生物是神经激肽 A 的拮抗剂, 因此它们是有用的止喘剂、抗炎剂和抗关节炎剂。



1

其中 X 为氢、1—6 个碳原子的烷基、2—10 个碳原子的酰基，

A<sub>1</sub> 为一个键或为由 1~4 个氨基酸组成的基团，

A<sub>2</sub> 为一个键或为 Asp 或 Glu，

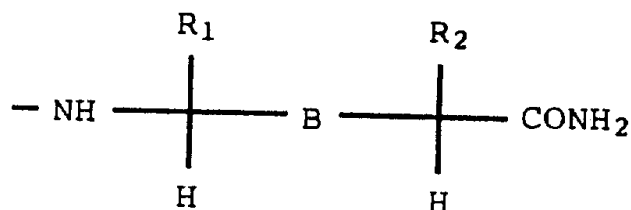
A<sub>3</sub> 为任何氨基酸，

A<sub>4</sub> 为 phe 或 N-Me-phe，

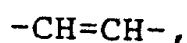
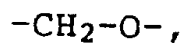
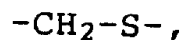
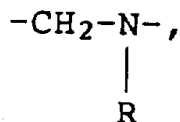
A<sub>5</sub> 为 Ile、Val、Leu、Phe、Ala、Tyr、  
Nle、Met 或 N-Me-Val，

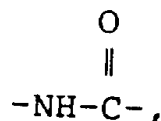
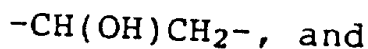
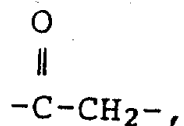
Ab 为 Gly 或 Sar，以及

Y 为下式基团，



其中 B 为下式中一个基团，





这里 R 为氢原子或 1—4 个碳原子的烷基，或者为苯基亚烷基，其中亚烷基部分可以是直链的或带支链的，并有 1—6 个碳原子，其中苯基部分可以是未被取代的或者是用 C<sub>1</sub>—烷基、C<sub>1</sub>—烷氧基、羟基或卤素单取代的；

R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 各自独立地选自异丙基、异丁基、仲丁基、正丁基和 2—(甲硫基)乙基。

本申请中常用的表示氨基酸和氨基以及羧基末端基团的缩写如下，

G l y ( 或 G ) — 甘氨酸

A l a ( 或 A ) — 丙氨酸

V a l ( 或 V ) — 缬氨酸

L e u ( 或 L ) — 亮氨酸

I l e ( 或 I ) — 异亮氨酸

F u m — 富马酰

O r n — 鸟氨酸

P r o ( 或 P ) — 脯氨酸

P h e ( 或 F ) — 苯丙氨酸

T r p ( W ) — 色氨酸

Met (或M) 甲硫氨酸  
Ser (或S) 丝氨酸  
Thr (或T) 苏氨酸  
Cys (或C) 半胱氨酸  
Tyr (或Y) 酪氨酸  
Asn (或N) 天冬酰胺  
Gln (或Q) 谷氨酰胺  
Asp (或D) 天冬氨酸  
Glu (或E) 谷氨酸  
Lys (或K) 赖氨酸  
Arg (或R) 精氨酸  
His (或H) 组氨酸  
Nle—正亮氨酸  
Hyp—羟基脯氨酸  
Glt—戊二酰基  
Mal—马来酰基  
Npa— $\beta$ —(2-萘基)丙氨酸  
3,4-dehydroPro—3,4-脱氢脯氨酸  
Pgl—苯基甘氨酸  
NMepgl—N-甲基-苯基甘氨酸  
Sar—肌氨酸(N-甲基甘氨酸)  
Psubphe—对位取代的苯丙氨酸  
Subphe—邻位、间位或对位、单或二取代的苯丙氨酸  
DAla (或a)—D-丙氨酸

A c — 乙酰基

S u c — 琥珀酰基

P c l p h e — 对—氯—苯丙氨酸

P N O<sub>2</sub> p h e — 对—硝基—苯丙氨酸

N M e V a l — N — 甲基—缬氨酸

烷基和烷氧基中的烷基部分包括直链、带支链或环状的烷基例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、仲戊基、环戊基、己基、异己基、环己基和环戊基。本发明中苯基亚烷基的亚烷基部分可以含有1—4个碳原子，并且可以是直链的或带支链的，例如可以是亚甲基、1,2—亚乙基、1,2—亚丙基、亚丁基、异亚丙基和仲—亚丁基。本发明中苯基亚烷基的苯基部分可以是未被取代的，或者也可以是在邻位、间位或最好是在对位单取代的。未被取代的苯基或对—羟基苯基是较好的。2—10个碳原子的酰基包括各基团有1~2个羰基部分的直链、带支链、环状、饱和与不饱和的酰基，例如乙酰基、苯甲酰基、琥珀酰基、马来酰基和戊二酰基、卤素包括氟、氯、溴或碘。本发明中的X基团，其中氢、烷基或酰基部分被连接到氨基末端氨基酸的 $\alpha$ 氨基上。其中氨基末端氨基酸的氨基用两个烷基或酰基取代的上述肽也被认为是在本发明的肽的范围内。

很显然，本发明的肽衍生物包括其中天然存在的神经激肽A的两个碳末端氨基酸的正常肽酰胺键变化了的肽类，并且这两个变化了的氨基酸在这里化学上以基团Y表示。应用肽化学家规范命名法则，基团Y包括两个L e u残基（即其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>各自为仲丁基），它们的酰胺键通过还原羰基而转变为亚甲基，基团

Y 可以表示为  $Leu\varphi[CH_2, NH]Leu$ 。该符号表明，倒数第二个  $Leu$  的酰胺羰基还原为亚甲基。用于叙述本发明的肽衍生物的其他术语符号有  $\varphi[CH_2, S]$ 、 $\varphi[CH_2, O]$ 、 $\varphi[CH=CH]$ 、 $\varphi[C(O)CH_2]$ 、 $\varphi[CH(OH)CH_2]$  和  $\varphi[NHC(O)]$ 。

关于  $A_1$  定义中所用的术语“一个键”，是指基团 X 直接结合到基团  $A_1$  上，或者如果  $A_1$  也是一个键的话，那么 X 直接结合到基团  $A_1$  上。同样，关于  $A_2$  定义中所用的术语“一个键”，是指  $A_2$  直接结合到基团  $A_1$  上，或者如果  $A_2$  也是一个键的话，那么 X 直接结合到基团  $A_1$  上。

这里所用的术语“任一氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成制备天然存在的肽的类似物时在肽化学领域中常用的其他“非蛋白” $\alpha$ -氨基酸。天然存在的氨基酸有甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、组氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、鸟氨酸和赖氨酸。“非蛋白” $\alpha$ -氨基酸的实例有正亮氨酸；正缬氨酸；别异亮氨酸；高精氨酸；硫代脯氨酸；脱氢脯氨酸；羟脯氨酸(HYP)、高丝氨酸、环己基甘氨酸(Chy)； $\alpha$ -氨基-正-丁酸(Aba)；环己基丙氨酸(Cha)；氨基苯基丁酸(Pba)；在苯基部分的邻、间或对位有 1 个或 2 个选自以下取代基取代的苯丙氨酸，这些取代基是  $(C_1 - C_4)$  烷基、 $(C_1 - C_4)$  烷氧基、卤素或硝基，或者在苯基部分的邻、间或对位用亚甲二氧基取代的苯丙氨酸； $\beta$ -2-和 3-噻吩基丙氨酸； $\beta$ -2-或 3-咪喃基丙氨酸； $\beta$ -2-、3-和 4-吡啶基丙氨酸； $\beta$ -(苯并噻吩-2-和

3-基)丙氨酸;  $\beta$ -(1-和2-氨基)丙氨酸; 丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的O-烷基化衍生物; S-烷基化的半胱氨酸; 酪氨酸、3,5-二碘酪氨酸的O-硫酸酯以及天然存在氨基酸的D-异构体。

除甘氨酸之外,天然的氨基酸含有一手性碳原子。除非另有说明本申请中所述的具有旋光的氨基酸均为L-构型。按常规,所画肽的结构,氨基末端是在链的左边,羧基末端是在链的右边。与上述和通常习惯相一致,所画基团B左边的化合价键连接到带有“H”、基团“R<sub>1</sub>”和基团“NH”的基团Y的碳原子上,而基团B右边的化合价键连接到带有“H”、基团“R<sub>2</sub>”和基团“CONH<sub>2</sub>”的基团Y的碳原子上。

式1的多肽可以与无毒的有机酸或无机酸作用形成药理学上适用的盐。可形成合适盐的无机酸的实例有盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸,以及酸式金属盐,例如磷酸一氢钠和硫酸氢钾。可形成合适盐的有机酸的实例有一元羧酸、二元羧酸或三元羧酸。上述有机酸的实例有乙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、马来酸、羟基马来酸、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯乙酸、肉桂酸、水相酸、2-苯氧基苯甲酸和磺酸(如甲磺酸和2-羟基乙磺酸)。羧基末端氨基酸部分的盐包括与任何合适的无机碱或有机碱作用生成的无毒的羧酸盐。举例来说,这些盐包括与碱金属,如钠或钾;碱土金属,如钙和镁;包括铝在内的ⅢA族轻金属;有机伯、仲和叔胺,如包括三乙胺在内的三烷基胺、普鲁卡因、二苄基胺、1-乙烯胺(1-ethenamine)、N,N'-二苄基亚乙基二胺、二氢砒酸基胺、N-(低级)烷基哌

啉以及与任何其他合适的胺生成的盐。

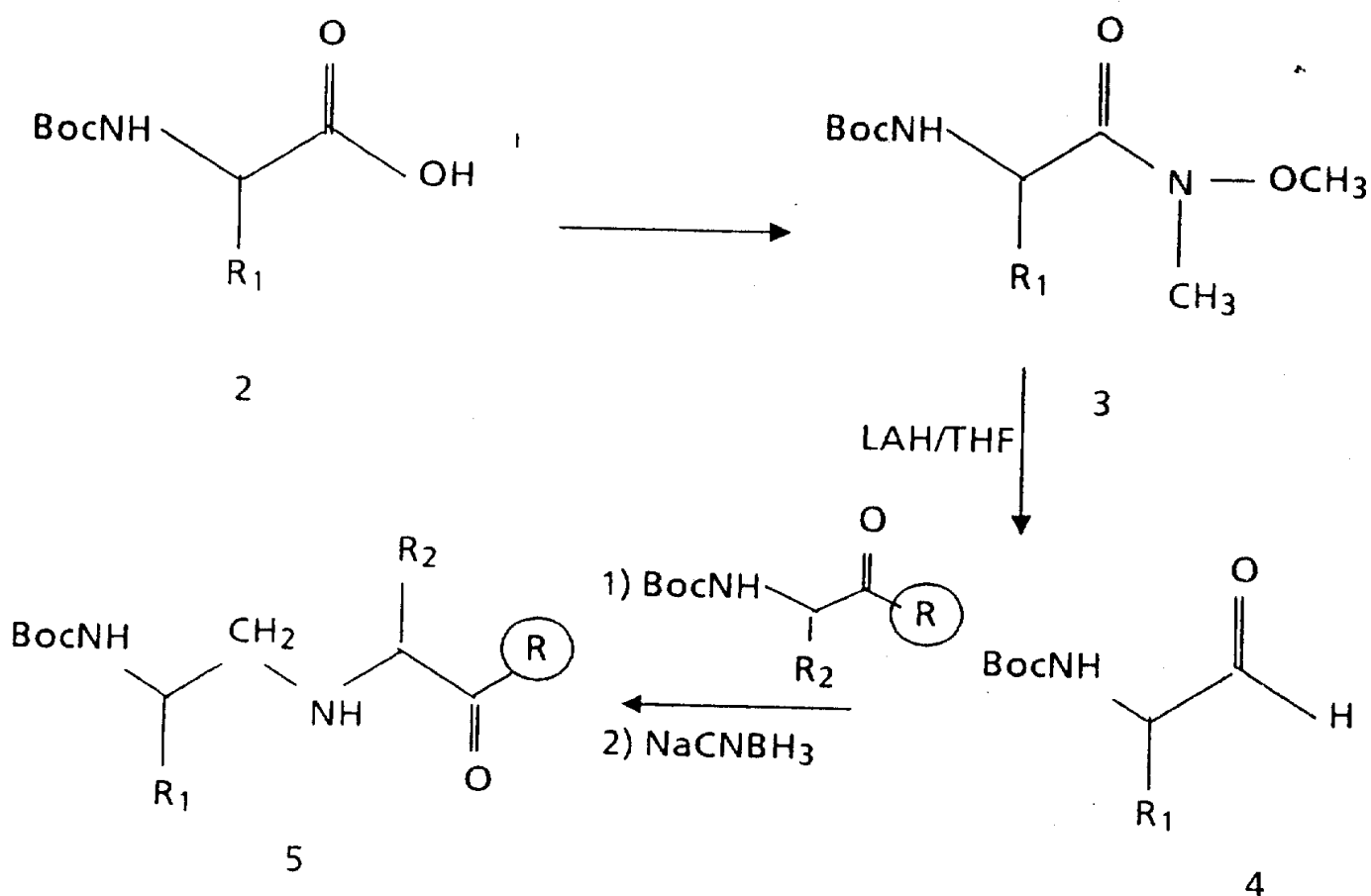
对于任何类属基团的化合物，其中某些基团是较好的。申请人优先选用的式1肽衍生物是，其中X为氢和A<sub>1</sub>为一个键。申请人优先选用的式1肽衍生物是，其中X为Glt、Mal、Fum，特别是Suc。申请人还优先选用的式1肽衍生物是，其中A<sub>1</sub>为His—Lys—Thr，Lys—Thr，Thr，Asp—Val—Pro—Lys—Ser，Val—Pro—Lys—Ser，Pro—Lys—Ser，Lys—Ser，Ser，Pglu—Pro—Ser—Lys，Pro—Ser—Lys，Ser—Lys或Lys。申请人特别优先选用的式1肽衍生物是，其中A<sub>1</sub>为His—Lys—Thr，Lys—Thr或Thr。申请人优先选用其中A<sub>2</sub>为Asp的式1肽衍生物。申请人也优先选用下述式1肽衍生物，其中A<sub>2</sub>为Gly、Gln、Asn、Ser，尤其是Ala或Ser。申请人还优先选用下述式1肽衍生物，其中A<sub>4</sub>为Phe，以及其中A<sub>5</sub>为Val和其中A<sub>6</sub>为Gly。申请人优先选用下述式1肽衍生物，其中B为—CH<sub>2</sub>，NH—和其中R<sub>1</sub>为异丁基即2—甲基丙基，以及其中R<sub>2</sub>为2—甲硫基乙基、异丁基或正丁基。申请人特别优先选用其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>各自为异丁基的上述化合物。最优先选用的式1肽衍生物是H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu φ [CH<sub>2</sub>，NH]—Leu—NH<sub>2</sub>，其中R为氢或甲基。

本发明的蛋白质可以用熟悉本领域的技术人员容易了解的多种方法制得。该方法包括固相顺序合成法，该方法是应用已建立的自动控制方法，例如可以应用自动控制的肽合成仪进行。为了制备本发明

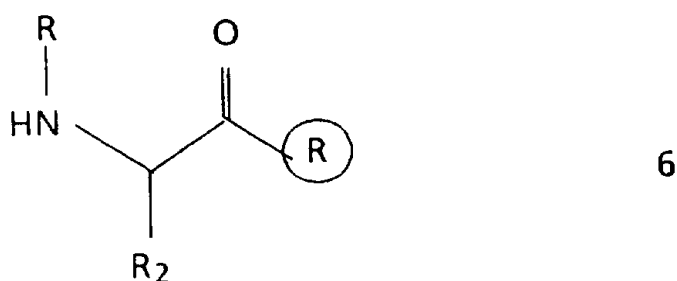
的肽衍生物，将相对于碳末端改变了肽连接的变化了的二肽或其前体结合到树脂载体上。用于制备各个改变肽连接的方法在本技术领域是已知的，并且可以容易地由精通肽的化学家掌握。从Chorev和Goodman, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 21 (3), 258~68 (1983)中，可以了解其中B为一NHCO—基团的上述式1肽衍生物，即 $\varphi$  [NHCO]化合物的制备方法。从Holladay和Rich, *Tetrahedron Letters*, 24(41), 4401~04 (1983)中，可以了解其中B为一COCH<sub>2</sub>—或—CH(OH)CH<sub>2</sub>—基团的上述式1肽衍生物，即 $\varphi$  [COCH<sub>2</sub>]和 $\varphi$  [CH(OH)CH<sub>2</sub>]化合物的各自制备方法。从Sasaki和Coy, *Peptides*, Vol. 8, pp. 119—121, 1987中，可以了解其中B为一CH<sub>2</sub>NH—基团的上述式1肽衍生物，即 $\varphi$  [CH<sub>2</sub>NH]化合物的制备方法，并且下面将更详细地叙述。从Spatola和Darlak, *Tetrahedron Letters*, 44(3), 821~833 (1988)中，可以了解其中B为一CH<sub>2</sub>S基团的上述式1肽衍生物，即 $\varphi$  [CH<sub>2</sub>S]化合物的制备方法。从TenBrink, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 418~22中可以了解，其中B为一CH<sub>2</sub>O—基团的上述式1肽衍生物 即 $\varphi$  [CH<sub>2</sub>O]化合物的制备方法。

具体地说，其中B为CH<sub>2</sub>N(R)—基团的本发明化合物可以通过还原式3的N—甲氧基—N—甲基酰胺为式4的醛而制得。还原反应可以用一般已知的方法进行，并且熟悉本技术领域的人员可以容易地完成，例如可以用氢化铝锂(LAH)来进行。向冷却的(一般

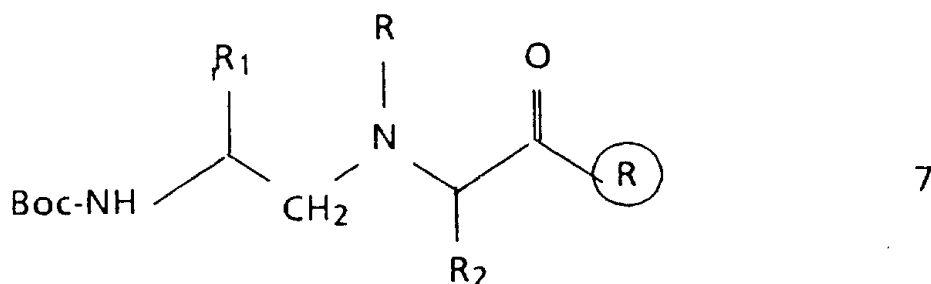
约为 0℃) 式 3 化合物在惰性溶剂 (例如醚溶剂, 如四氢呋喃 (THF) 或乙醚) 的溶液中加入约 1 摩尔当量的 LAH, 通常可以容易地完成上述还原反应。在反应实质上完成以后 (通常在约 30 分钟之后) 加入例如 10% 硫酸氢钾或硫酸氢钠, 然后加入水, 使反应混合物冷却。接着用溶剂, 如乙醚提取水混合物, 用冷的稀盐酸洗涤乙醚相, 干燥并除去溶剂, 可以使产物分离出来。粗产物可以用例如硅胶柱层析进行纯化, 用 55% 乙酸乙酯/己烷进行洗脱。



然后使式 4 的醛与结合到树脂上的式 6 氨基酸进行反应，



其中 R 和 R<sub>2</sub> 同式 1 中的定义，并且其中 ⊕ 代表树脂。例如用氰基硼氢钠还原最初生成的席夫碱，得到结合在树脂上变化了的二肽（式 7）



其中 R、R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 同式 1 中的定义，并且其中 ⊕ 代表树脂。

然后，按通常方式将 A<sub>0</sub> 到 A<sub>1</sub> 氨基酸依次加到结合了变化二肽的树脂中。

按通常方式，从相应 N—Boc 受保护的酸制备 N—甲氧基—N—甲基酰胺（式 3），将羰基二咪唑加到 N—Boc 保护的氨基酸在醚溶剂（例如乙醚）的干燥溶液中，使反应混合物搅拌 10 分钟～1

小时，一般约为15~20分钟。将N，O-二甲基羟胺盐酸盐的DMF溶液和立体受阻的胺（如二异丙基乙胺）加入，于室温下搅拌混合物约6小时到约24小时。然后蒸发溶剂，分离出所需化合物，通过在硅胶柱上进行快速层析纯化粗制品，用二氯甲烷进行洗脱。

所用的载体树脂可以是固相制备多肽技术领域中常用的合适树脂最好是与0.5~3%二乙烯苯交联的聚苯乙烯，该聚苯乙烯-二乙烯苯树脂或者被氯甲基化或者被羟甲基化，以便提供与开始引入的 $\alpha$ -氨基受保护的氨基酸反应形成酯的位点。

Bodanszky等（Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966)）叙述了羟甲基树脂。氯甲基树脂可以从Bio Rad Laboratories, Richmond, California购买，并且Stewart等编著的“Solid phase peptide synthesis”（Freeman and Co., San Francisco 1969）中第一章1-6页叙述了该树脂的制备方法。应用Gisin的方法（Helv. Chem. Acta, 56, 1476 (1973)），可以将受保护的氨基酸结合到树脂上。许多结合了受保护氨基酸的树脂是市场上可以买得到的。为了制备其中羧基末端是Thr残基的本发明多肽，作为一个实例，可以应用叔丁氧基羰基（BOC）保护的Thr结合的苄基化、羟甲基化的苯基乙酰氨基甲基（PAM）树脂，并且它们是市场上可以买到的。

在将 $\alpha$ -氨基受保护的氨基酸结合到载体树脂上之后，应用任何合适的方法（例如应用三氟乙酸的二氯甲烷溶液、单独应用三氟乙酸或应用HCl的二氧六环溶液）脱去保护基。脱保护基

反应在 0℃~室温下进行。为了脱去特定的  $\alpha$ -氨基保护基团，可以应用其他一般的裂解试剂和条件。在脱去  $\alpha$ -氨基保护基之后，其他氨基受保护的氨基酸可以按所需的顺序逐步结合。另外，多级氨基酸基团可以在与载有氨基酸序列的树脂结合之前用溶液法进行偶合。

引入多肽序列的各个氨基酸的  $\alpha$ -氨基保护基团可以是本技术领域已知的保护基团。 $\alpha$ -氨基保护基团有 (1) 酰基型保护基团，例如甲酰基、三氟乙酰基、邻苯二甲酰、甲苯磺酰 (tosyl)、苯磺酰基、硝基-苯基磺基、三苯甲基磺基、O-硝基苯氧基乙酰基和  $\alpha$ -氯代丁酰；(2) 芳族氨基甲酸酯型保护基，例如苄氧基羰基和取代的苄氧基羰基，如 P-氯代苄氧基羰基、P-硝基苄氧基羰基、P-溴代苄氧基羰基、P-甲氧基苄氧基羰基、1-(P-联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二甲基-3, 5-二甲氧基苄氧基羰基和二苯甲氧基羰基；(3) 脂肪族氨基甲酸酯保护基，例如叔丁氧基羰基 (Boc)、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基和烯丙氧基羰基；(4) 环烷基氨基甲酸酯型保护基，例如环戊氧基羰基、金刚烷氧基羰基和环己氧基羰基；(5) 硫代氨基甲酸酯型防护基，例如苯基硫代羰基；(6) 烷基型保护基，例如三苯甲基 (trityl) 和苄基；和 (7) 三烷基硅烷基，例如三甲基硅烷最好的  $\alpha$ -氨基保护基是叔丁氧基羰基。

选择合适的偶合试剂在本技术领域是熟知的。如果加入的氨基酸为 Gln、Asn 或 Arg，那么特别合适的偶合试剂为 N, N'-二异丙基碳二亚胺和 1-羟基苯并三唑。应用上述试剂可阻止形成脍和内酰胺。其他的偶合剂有 (1) 碳二亚胺类，例如 N, N'-二环己基碳二亚胺和 N-乙基-N'-( $\gamma$ -二甲氨基丙基)碳二亚胺；

(2) 氮脒类, 例如  $N, N$ -二苄基氮脒; (3) 烯酮亚胺类;  
(4) 异噁唑盐类, 例如  $N$ -乙基-5-苄基-异噁唑-3'-磺酸盐; (5) 在环中含 1 到 4 个氮原子的芳香族含氮单杂环酰胺, 例如咪唑酰胺类、吡唑酰胺类和 1, 2, 4-三唑酰胺类。常用的特定杂环酰胺有  $N, N'$ -羰基二咪唑和  $N, N$ -羰基-二-1, 2, 4-三唑; (6) 烷氧基化的乙炔, 例如乙氧基乙炔; (7) 能与氨基酸的羧基部分形成混合酸酐的试剂, 例如氯甲酸乙酯和氯甲酸异丁酯, 或者是需偶合的氨基酸的对称酸酐, 例如  $Boc-Ala-O-Ala-Boc$  (8) 在 1 个环氮原子上有羟基的含氮杂环化合物, 例如  $N$ -羟基邻苯二甲酰亚胺,  $N$ -羟基琥珀酰亚胺和 1-羟基苯并三唑。其他活性试剂和它们在肽偶合中的应用见 Kapoor, J. pharm. Sci., 59, p. 1-27 (1970)。申请人优先应用对称酸酐作为除 Arg、Asn 和 Gln 以外所有氨基酸的偶合试剂。

各个受保护的氨基酸或氨基酸序列以约 4 倍过量引入固相反应器中, 并在介质 (二甲基甲酰胺; 二氯甲烷 = 1:1, 或者单独用二甲基甲酰胺, 最好单独用二氯甲烷) 中进行偶合。如果发生不完全的偶合, 那么在固相反应器中偶合下一个氨基酸之前, 先重复偶合操作然后再脱去  $\alpha$ -氨基保护基团。在合成的各个阶段, 用 H. Kaiser 等 (Analyt. Biochem. 34, 595 (1970)) 所述的水合茚三酮反应监测偶合反应完成与否。

在得到所需要的氨基酸序列之后, 从树脂上切下肽。这可以通过水解来完成, 例如可以用甲硫醚、对甲苯酚和甲苯硫酚的无水氢氟酸处理结合多肽的树脂。

已知在固相肽合成的技术领域，当接长肽链时，许多氨基酸带有需要保护的官能团。应用和选择合适的保护基团，对于熟悉本技术领域的工作人员来说是熟知的，并且将根据肽上需要保护的氨基酸和存在的其他受保护的氨基酸残基进行选择应用。支链保护基的选择是严格的，因为在脱去 $\alpha$ -氨基部分的保护基时，支链保护基必须是不脱去的基团。例如，赖氨酸合适的支链保护基为苄氧基羰基和取代的苄氧基羰基，该取代基可以选自卤素（如氯、溴、氟）和硝基，例如2-氯苄氧基羰基，对-硝基苄氧基羰基，3,4-二氯苄氧基羰基，甲苯磺酰基，叔戊氧基羰基，叔丁氧基羰基和二异丙基甲氧基羰基。苏氨酸和丝氨酸的醇羟基可以用乙酰基、苯甲酰基、叔丁基、三苯甲基、苄基、2,6-二氯苄基或苄氧基羰基进行保护。天冬氨酸和谷氨酸的羧羟基可以用苄基或环己基进行保护。较好的保护基为苄基。

上述基团可以用本技术领域已知的方法脱去。脱去保护基一般在肽链合成完成之后进行，但是保护基也可以在任何其他合适的时间脱去。

式1肽衍生物作为神经激肽A拮抗剂的作用可以用Buck等所述的方法（*Science* 226, 987-989, 1984），以上述肽与碘化了的神经激肽A竞争哺乳动物神经激肽A（NK<sub>2</sub>）受体的能力来表示，或用Bristow等所述的方法（*British J. Pharmacol.* 90, 211~21, 1987），以上述化合物刺激或抑制神经激肽A诱导的磷脂酰肌醇的转换来表示，或用Dion等所述的方法（*Life Sciences* 41, 2269-2278, 1987），以上述化合物拮抗神经激肽A导致的平滑肌收缩作用来

表示。

根据本发明的肽衍生物作为神经激肽 A 拮抗剂的能力，本发明化合物可以用作为免疫抑制剂，并可用于治疗关节炎、气喘、疼痛、炎症、肿瘤、胃肠道运动过强、杭廷顿氏 (Huntington's) 疾病、精神病、神经炎、神经痛、头痛 (包括偏头痛)、高血压、尿失禁、荨麻疹、类癌瘤综合症、流感或感冒。口服或非经胃肠道给药的有效剂量可以由熟悉本技术领域的工作人员容易地确定。有效剂量是引起拮抗神经激肽 A (NK<sub>2</sub>) 受体作用的剂量。例如，本发明肽的有效剂量可以从约每天 0.5 μg / Kg 体重 ~ 500 mg / Kg 体重。一般以含约 1 mg ~ 500 mg 有效化合物的单位剂量形式服用，并且每天可以服 1—4 次或 4 次以上的单位剂量形式。这里应用的术语“病体”是指哺乳动物，例如灵长目动物，包括人、羊、马、牛、猪狗、猫、大白鼠和小白鼠。

虽然本发明的某些肽衍生物口服可以通过肠部，但申请人优先选用非口服给药途径，例如皮下注射、静脉注射、肌肉注射或腹膜内注射，或长效注射给药，植入片制剂；或者将含有本发明的肽衍生物以气雾剂形式或以干粉形式应用到粘膜 (如鼻、喉和支气管) 上。对于非经胃肠道给药，本发明化合物可以按溶液剂或悬浮剂形式注射给药，溶液剂或悬浮剂是将化合物溶于或悬浮于生理上可接受的稀释剂和药学上适用的载体中，它们可以是灭菌液体 (如水和油)，可以用或不用表面活性剂和其他药学上适用的辅助剂。在上述制剂中可以应用的油的实例有石油产品、动物油、植物油或合成油，例如花生油、豆油和矿物油。一般来说，水、盐水、葡萄糖水溶液和有关的糖溶液、乙醇和二元醇 (如丙二醇或聚乙二醇) 是较好的液体载体，它们尤其适用于注

射溶液剂。

本发明化合物可以按长效注射剂或植入片制剂的形式给药，长效注射剂和植入片制剂是使有效成份以缓释的方式进行配制。可以将有效成分压成小丸剂或小的园柱体，并以长效注射剂或植入片经皮下或肌肉注入式植入，植入片可以应用惰性材料，例如生物降解聚合物或合成的硅氧烷，如由Dow-Corning公司生产的硅橡胶、硅氧橡胶。

### 实例

本发明以下述非限制性实例详细地叙述。

#### 例 1

H—A s p—S e r—P h e—V a l—G l y—L e u—  
 $\varphi$  [ C H<sub>2</sub> N H ]—L e u—N H<sub>2</sub> 和 H—A s p—S e r—P h e  
—V a l—G l y—L e u— $\varphi$  [ C H<sub>2</sub> N ( C H<sub>3</sub> ) ]—L e u—  
N H<sub>2</sub> 二种肽对神经激肽 A 受体的拮抗作用，通过其对受体结合  
的影响加以证实。

收集若干只地鼠膀胱，切碎并浸入含 1 2 0 m M N a C l 和  
5 m M K C l 的 5 0 m M T r i s—H C l 缓冲液 ( p H 7. 4  
中，在 4 °C 条件下制成匀浆，然后以 4 8, 0 0 0 X g 的速度离心  
1 5 分钟。沉淀物重新混悬于含 1 0 m M E D T A 和 3 0 0 m M  
K C l 的 5 0 m M T r i s—H C l 缓冲液 ( p H 7. 4 ) 中，于 4  
°C 放置 3 0 分钟。混悬液以 4 8 0 0 0 X g 离心 1 5 分钟。沉淀物  
用 5 0 m M T r i s—H C l ( p H 7. 4 ) 缓冲液洗涤二次后，  
以 4 8, 0 0 0 X g 离心 1 5 分钟。沉淀物重新混悬于保温缓冲液中  
在每只试管中加入此混悬液一份 ( 约含 3—5 m g 组织 )，作为该试  
验的第一步。试管内含保温缓冲液，其组成如下，5 0 m M T r i s

—HCl缓冲液 (pH 7.4), 0.02%牛血清蛋白 (BSA), 40 μg/ml 杆菌肽, 4 μg/ml 抑糜蛋白酶素, 4 μg/ml 甲(乙)酰—亮—亮—精三肽, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 nM <sup>125</sup>I 碘化组氨酰神经激肽 A (Amersham 公司) 以及浓度范围为 0.03 nM—100 μM 的标题指出的二种肽或标准品。将含组织和保温缓冲液的试管置室温 120 分钟, 使达平衡。然后立即将各管内容物用事先浸泡过 0.5% BSA 的 Whatman GF/B 滤纸过滤, 并迅速用冰冷却的 50 mM Tris—HCl 缓冲液 (pH 7.4) 冲洗滤纸两遍。用加码计数仪定量测定与滤纸结合的放射性。比结合 (最大) 定义为 1 μM 未标记的神经激肽 A 存在和缺乏条件下的结合之差。受试肽或标准品对碘化后的神经激肽 A 结合的竞争作用以其最大竞争作用的百分比表示。标题中二种肽的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 即抑制 50% 受体结合所需要的浓度为 100—200 nM (图 1)。

## 例 2

H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu—  
 φ [CH<sub>2</sub> NH]—Leu—NH<sub>2</sub> 和 H—Asp—Ser—Phe—  
 Val—Gly—φ [CH<sub>2</sub> N(CH<sub>3</sub>) ]—Leu—NH<sub>2</sub> 二  
 种肽对神经激肽 A 受体的拮抗作用。通过其对磷脂酰肌醇转换的影响加以证实。

集中若干只地鼠膀胱, 并用组织唐粹器研磨成 350 μm 大小。将研磨过的组织移入 Krebs—Hepes 缓冲液, 于 37℃ 保温。每 15 分钟换一次新鲜缓冲液, 共二次 (30 分钟)。然后将膀胱组织移入含 100~200 μCi <sup>3</sup>H—肌醇的 Krebs—Hepes 缓冲

液中，于37℃保温。接着用含10mM Li<sup>+</sup>的Krebs — Hepe s 缓冲液洗涤组织并在37℃再保温30分钟，每15分钟更换一次新鲜缓冲液。在含Li<sup>+</sup>缓冲液的试管中顺序加入：膀胱组织碎块一份（约10~20mg/每只试管），受试肽25μl，不同浓度的神经激肽A 25μl，最终体积为250μl。在受试肽浓度范围为1nM-100μM和神经激肽A浓度范围为1nM-10μM的条件下评价受试肽对神经激肽A受体的阻断作用。此外还在给出的受试肽诸浓度下单独评价受试肽的激动活性。室温放置30分钟后依次加入940μl 氯仿—甲醇（1：2），310μl 氯仿和310μl 水，以终止磷脂酰肌醇的转换。每只试管旋转15秒钟后，以3000rpm离心10分钟，使有机相与水相分离，将900μl 上层水相加到0.5ml Biorad AG-1×8（甲酸盐）离子交换柱上。自各试管抽取底层氯仿50μl，移入计数瓶，干燥后加入闪烁液计数。加在离子交换柱上的样品则依次用以下各液洗脱：

（1）10ml 水

（2）5ml 5mM 四硼酸二钠/60mM 甲酸钠溶液

（3）10ml 1M 甲酸铵的0.1M 甲酸溶液

收集最后一次（第三次）洗脱液，吸取1ml与6ml ACS 闪烁液混合，计数。然后计算每一样品中这一部分的计数值（总的肌醇磷酸）和相应的有机相计数值的比值。再将在受试肽和（或）标准品存在条件下的此比值与对照管（即没有兴奋性激动剂）的比值作比较。绘制剂量—反应曲线，用图解分析法或借助于计算机程序的帮助测定受试肽促进或抑制神经激肽A诱导的磷脂酰肌醇转换的能力，并以图2和图3表示。

### 例 3

#### 地鼠膀胱收缩标本

将取自 Syrian 种雄性金黄地鼠 (75~100g) 的半条膀胱, 按 Dion 等 (Life Sciences 41, 2269~2278, 1987) 报告的方法, 在 31°C 和 1g 静止张力条件下, 悬浮于 Tyrode's 缓冲液中, 加入 10 μM 脑啡肽酶抑制剂 thiorphan 后 15 分钟, 再加入每种受试肽。首先绘制无受试肽存在下累计的剂量—反应曲线, 然后再~~制~~制有受试肽存在下累计的剂量—反应曲线。受试肽以累加方式加入, 以确定它们本身是否具有肌肉收缩作用。在下一个累计浓度加入以前, 都要使观察到的受试肽作用处于平稳状态。在这些条件下, NKA 收缩效应的半数效应量 (EC<sub>50</sub>) 一般为 10 nM, 与文献报告的值一致。收缩效应的数据以产生大于静止张力克数表示。在三只离体地鼠膀胱组织中, 每只给予 H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu φ [CH<sub>2</sub> NH] Leu—NH<sub>2</sub>, 或 H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu φ [CH<sub>2</sub> N(CH<sub>3</sub>) ] Leu—NH<sub>2</sub>, 直到浓度达 10 μM, 均未产生任何收缩效应。图 4 和图 5 说明在受试肽存在和缺乏的条件下, 作为~~精~~神经肽 A 功能之一的膀胱收缩力的改变。

#### 实例 4

I. Boc—Leu—醛合成 (Fehrentg, J. A. 和 Castro, B. Synthesis, 1983, 676~678);

A. N—叔—Boc—亮氨酸 N—甲氧基—N—甲酰胺;

15. 0 mmoles Boc—亮氨酸水合物溶于 30 ml 无

水乙醚。该溶液用无水  $MgSO_4$  干燥，过滤除去固体。将 16.5 mmol 羰基咪唑加到滤液中，于室温下搅拌 20 分钟。向生成的溶液中加入由 22.5 mmol  $O,N$ -二甲基羟胺盐酸盐、15 ml 二甲基甲酰胺和 3.9 ml 二异丙基乙胺组成的悬浮液。反应混合物于室温下搅拌过夜。用 75 ml 乙酸乙酯稀释反应液，并用 1 N 冷的盐酸 ( $3 \times 40$  ml)、饱和  $NaHCO_3$  ( $3 \times 40$  ml) 和饱和  $NaCl$  ( $1 \times 40$  ml) 洗涤。有机相经  $MgSO_4$  干燥、过滤、真空除去乙酸乙酯。分析数据， $R_f$  (硅胶 F 254) 0.51 (乙酸乙酯/己烷, 3/2),  $^1H-NMR$  ( $CDCl_3$ ) TMS (内标),  $\delta = 0.95$  ppm (2d, 6H,  $J = 6.6$  Hz), 1.42 (s, 1H), 1.64~1.80 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.72 (m, 1H), 5.10 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz)。质谱,  $M + H^+ =$  理论值 275, 测得值 275。

#### B. Boc-亮氨酸醛:

2.5 mmol Boc-亮氨酸  $N$ -甲氧基- $N$ -甲酰胺溶于 30 ml 无水乙醚。向该溶液中加入 3.2 mmol 氢化铝锂 (1 M 四氢呋喃溶液)。反应物于室温下搅拌 20 分钟，然后小心地加入 0.6 g  $NaHSO_4$  的 10 ml 水溶液。将反应混合物加到 75 ml 乙醚中，用 1 N 冷的盐酸 ( $3 \times 30$  ml)、饱和  $NaHCO_3$  ( $3 \times 30$  ml) 和饱和  $NaCl$  ( $1 \times 30$  ml) 洗涤。有机相经  $MgSO_4$  干燥，过滤，真空除去溶剂。分析数据， $R_f$  (硅胶 60 F 254), 0.68 (乙酸乙酯/己烷 3/2)。质谱,  $M = H^+$ , 理论值 216, 实测值 216。

## II. Leu-树脂的合成,

在自动控制的肽合成仪上应用一般的固相肽合成技术进行合成。在形成 0.5 mmol Boc-Leu-树脂之后, 脱去 Boc 保护基, 并用二甲基甲酰胺、二氯甲烷洗涤树脂, 并干燥。

## III. 形成还原酰胺键 (Leu<sup>0</sup> [CH<sub>2</sub>NH]),

2 mmol Boc-Leu 醛溶于 10 ml 1% 乙酸的二甲基甲酰胺溶液, 将该溶液加到含有 0.5 mmol Leu-树脂 (见上述 II) 的反应容器中。向该混合物中加入 150 mg NaCNBH<sub>3</sub> 的 2 ml 二甲基甲酰胺溶液。将混合物振摇 4 小时, 取出反应容器, 先用二甲基甲酰胺然后用二氯甲烷洗涤树脂。

## IV. [φ [CH<sub>2</sub>NH]<sup>0</sup>, Leu<sup>10</sup>]NK A<sub>4</sub>-10 的合成,

在自动控制的肽合成仪上, 通过顺序加入其余的氨基酸 (Gly Val, Phe, Ser (Bzl) 和 Asp (Chxl)), 完成肽的合成。从树脂上切下肽, 用无水 HF, 苯甲醚 = 10:1 使保护基全部脱去。用反相 HPLC 技术纯化肽。分析数据, 氨基酸分析 (HCl 消化法) Asp (1.03), Ser (0.93), Gly (1.01), Val (0.96), Phe (0.74)。肽含量 53.4%。快速原子轰击质谱, M+H<sup>+</sup> 理论值 735, 实测值 735。

## V. [φ [CH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>]<sup>0</sup>, Leu<sup>10</sup>]NK A<sub>4</sub>-10 的合成,

0.5 mmol N-甲基-Leu-树脂 (按照上述 II 的方法从 Boc-N-甲基亮氨酸制备) 与上述 I 制备的 2.0 mmol

Boc-Leu醛反应。然后按上述IV进行肽合成。分析数据，氨基酸分析(HCl消化法) Asp(1.01), Ser(0.89) Gly(1.02), Val(1.00), Phe(0.98)。肽含量53.5%，快速原子轰击质谱，M+H<sup>+</sup>理论值749，实测值749。

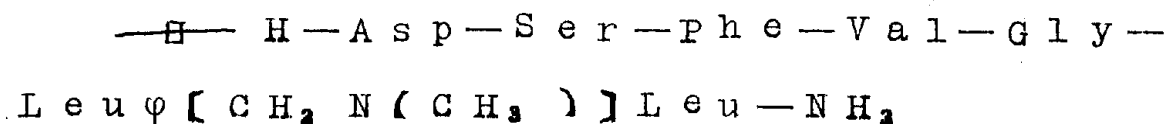
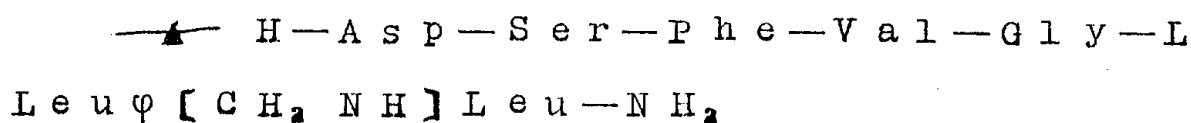
VI.  $[\varphi[\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{R}]^0, \text{Leu}^{10}] \text{NK A}_{4-10}$  的合成；

按照上述步骤II和III的方法制备Boc-Leu $[\varphi(\text{CH}_2\text{NH})$ -Leu树脂。然后在NaCNBH<sub>3</sub>存在下，按上述III的方法使该树脂与2.5mmoles R-CHO在10ml 1%HOAc的二甲基甲酰胺溶液中反应。按上述IV的方法完成肽的合成。

### 图 解

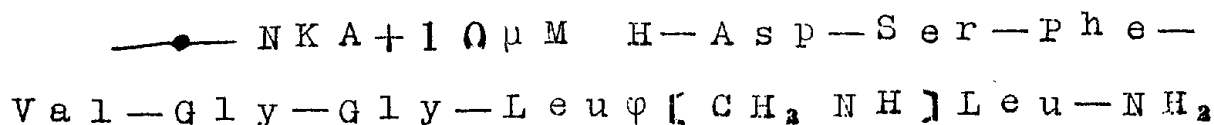
图1表示H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu $\varphi[\text{CH}_2\text{NH}]$ Leu-NH<sub>2</sub>和H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu $\varphi[\text{CH}_2\text{NCH}_2]$ Leu-NH<sub>2</sub>二种肽拮抗结合神经激肽A (NK A) 受体的能力。通过检验其替代来源于地鼠膀胱的I<sup>125</sup>标记的NK A的能力加以证实(例11)。横座标(X轴)为对数座标，表示NK A受体激动剂或拮抗剂的浓度，以nm表示，纵座标(Y轴)表示观察到的每种受试激动剂或拮抗剂的比结合，以最大比结合的百分比表示。

- 神经激肽 A
- 神经激肽 A (3-10)
- ▲— 神经激肽 A (4-10)



受试的激动剂为神经肽 A 和神经肽 A 的二个片段，一为由第 3 至第 10 个氨基酸组成的 NKA 片段 (NKA(3-10))，一为由第 4 至第 10 个氨基酸组成的 NKA 片段 (NKA(4-10))。图中数值为 6-12 次实验的平均值 ± 标准误。半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 在图上由 50% 抑制点估计而得。

图 2 说明 H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu $\varphi$ (CH<sub>2</sub>NH)Leu—NH<sub>2</sub> 拮抗 NKA 受体结合的能力通过其对地鼠膀胱中磷脂酰肌醇 (PI) 转换的影响加以证实 (例 2)。横座标 (X 轴) 为对数座标，表示 NKA 受体激动剂或拮抗剂的浓度，以 nM 表示。纵座标 (Y 轴) 表示观察到的 PI 转换，以对照的百分比表示。



从图中可看出，H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu $\varphi$ (CH<sub>2</sub>NH)Leu—NH<sub>2</sub> 可导致 NKA 剂量—反应曲线以竞争方式明显右移。图中数值为一个实验重复三次的平均值 ± 标准误

图 3 说明 H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leu $\varphi$ (CH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>)Leu—NH<sub>2</sub> (样品 29916)

拮抗 NKA 受体结合的能力，通过其对地鼠膀胱中磷脂酰肌醇 (PI) 转换的影响加以证实 (例 2)。横座标 (X 轴) 为对数座标，表示 NKA 受体的激动剂或拮抗剂的浓度，以 nM 表示。纵座标 (Y 轴) 表示观察到的 PI 转换，以对照的百分比表示。

—○— NKA

—●— H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—  
Leuφ [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)]Leu—NH<sub>2</sub>

—▲— H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—  
Leuφ [CH<sub>2</sub>NH]Leu—NH<sub>2</sub>

—▲— NKA + 1 μM H—Asp—Ser—Phe—  
Val—Gly—Leuφ [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)]Leu—NH<sub>2</sub>

—■— NKA + 10 μM H—Asp—Ser—Phe—  
Val—Gly—Leuφ [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)]Leu—NH<sub>2</sub>

—■— NKA + 100 μM H—Asp—Ser—Phe—  
Val—Gly—Leuφ [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)]Leu—NH<sub>2</sub>

1, 10 和 100 μM H—Asp—Ser—Phe—Val  
Gly—Leuφ [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)]Leu—NH<sub>2</sub> 可导致  
NKA 剂量—反应曲线以竞争方式明显右移。这些数据的 Schild  
图的斜率为 -0.99，表示属于竞争性拮抗作用；PA<sub>2</sub> 为 7.66

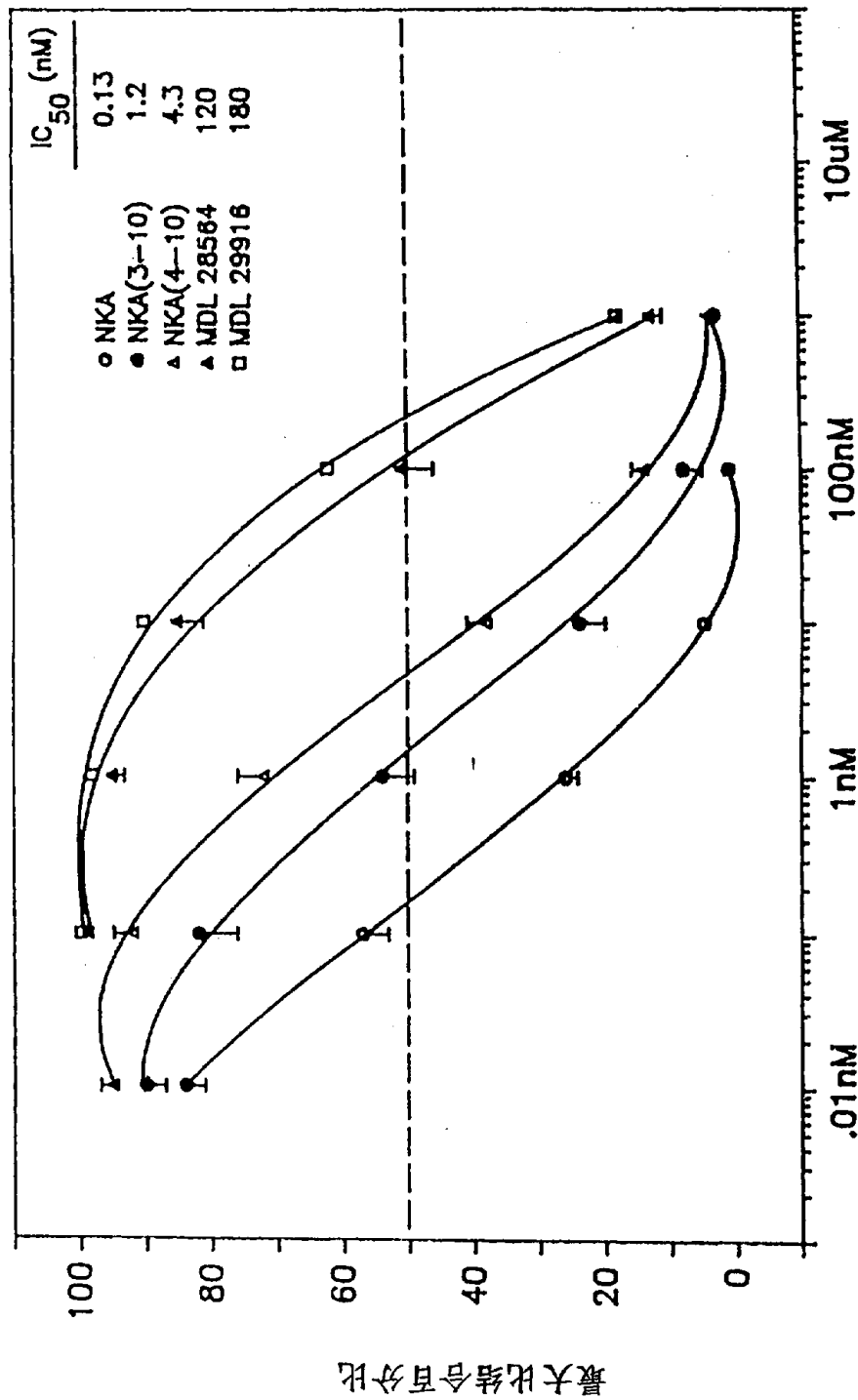
H—Asp—Ser—Phe—Val—Gly—Leuφ  
[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)]Leu—NH<sub>2</sub> 的浓度高达 100 μM 也仅  
显示 5% 的激动活性，而 H—Asp—Ser—Phe—Val—  
Gly—Leuφ [CH<sub>2</sub>NH]Leu—NH<sub>2</sub> 只有 12% 的激动  
活性。图中靠值为一个实验重复三次的平均值 ± 标准误。

图4说明H—A s p—S e r—P h e—V a l—G l y—  
L e u  $\phi$  [ C H<sub>2</sub> N H ] L e u—N H<sub>2</sub> 对地鼠膀胱标本中NKA介  
导的收缩活性的拮抗作用(例3)。横座标(Y轴)为对数座标,表  
示NKA浓度或NKA中含10 $\mu$ m H—A s p—S e r—P h e  
—V a l—G l y—L e u  $\phi$  [ C H<sub>2</sub> N H ] L e u—N H<sub>2</sub> 的浓度  
以n M表示。图中数值为一个实验重复三次所得结果的平均值 $\pm$ 轻准  
误。

图5说明H—A s p—S e r—P h e—V a l—G l y—  
L e u  $\phi$  [ C H<sub>2</sub> N ( C H<sub>3</sub> ) ] L e u—N H<sub>2</sub> 对地鼠膀胱标本中  
NKA介导的收缩活性的拮抗作用(例3)。横座标(X轴)为对数  
座标,表示NKA浓度或NKA中含10 $\mu$ M H—A s p—S e r  
P h e—V a l—G l y—L e u  $\phi$  [ C H<sub>2</sub> N ( C H<sub>3</sub> ) ] L e u  
—N H<sub>2</sub> 的浓度,以n M表示。图中数值为一个实验重复三次所得结  
果的平均值 $\pm$ 标准误。

图1

(地鼠膀胱中 (125I)NKA 竞争作用

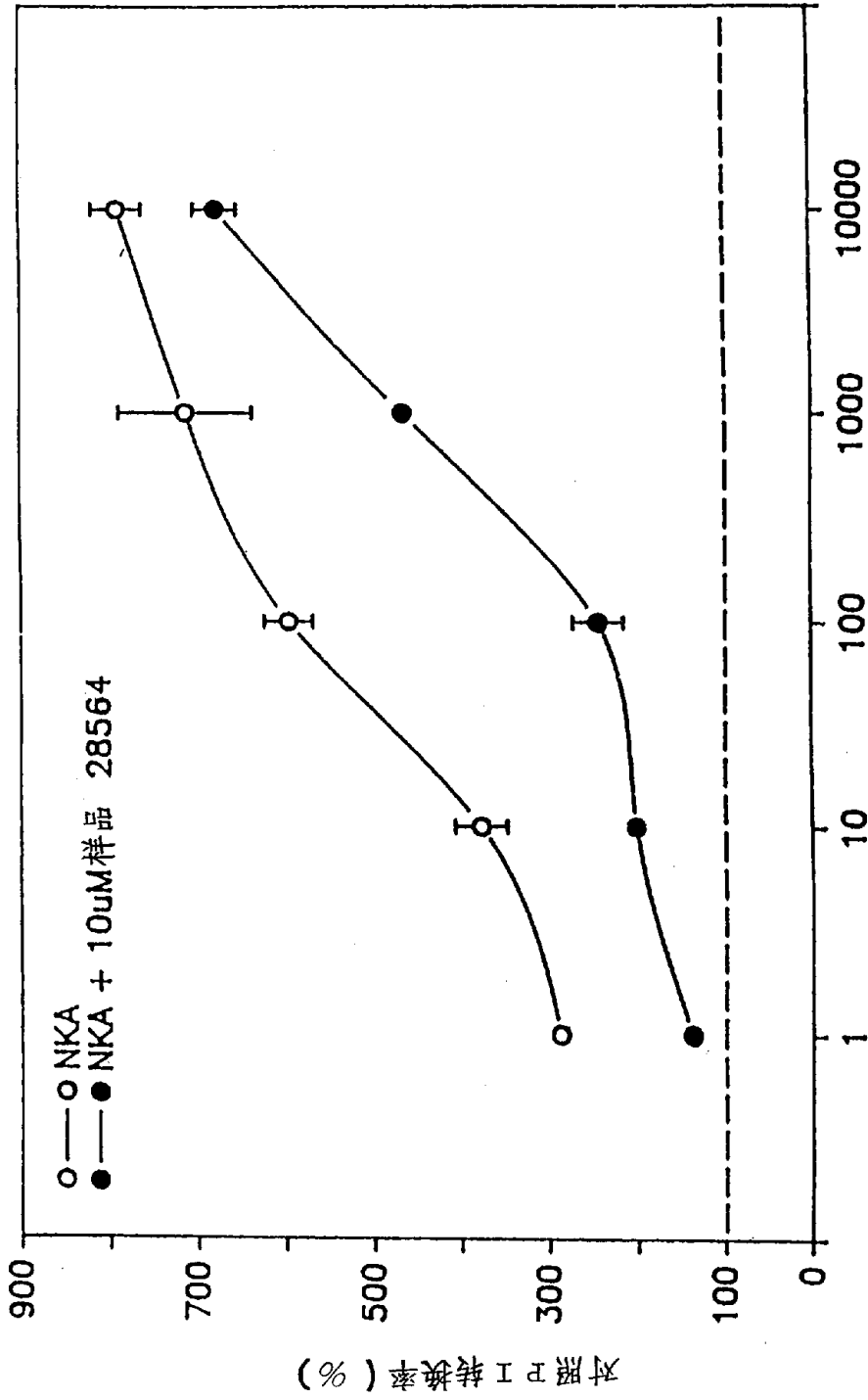


肽浓度

样品 28564 对地鼠膀胱酸化 NKA 结合受体的抑制作用样品 28564 = Leu<sup>9</sup>-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>10</sup>-NKA (4-10) 样品 29916 = Leu<sup>9</sup>CH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>-Leu<sup>10</sup>-NKA (4-10) 图中数值为 6-12 次实验的平均值 ± 标准误差。IC<sub>50</sub> 在图上由 50% 抑制点估计而得

图2

地鼠膀胱中磷脂酰肌醇的转换

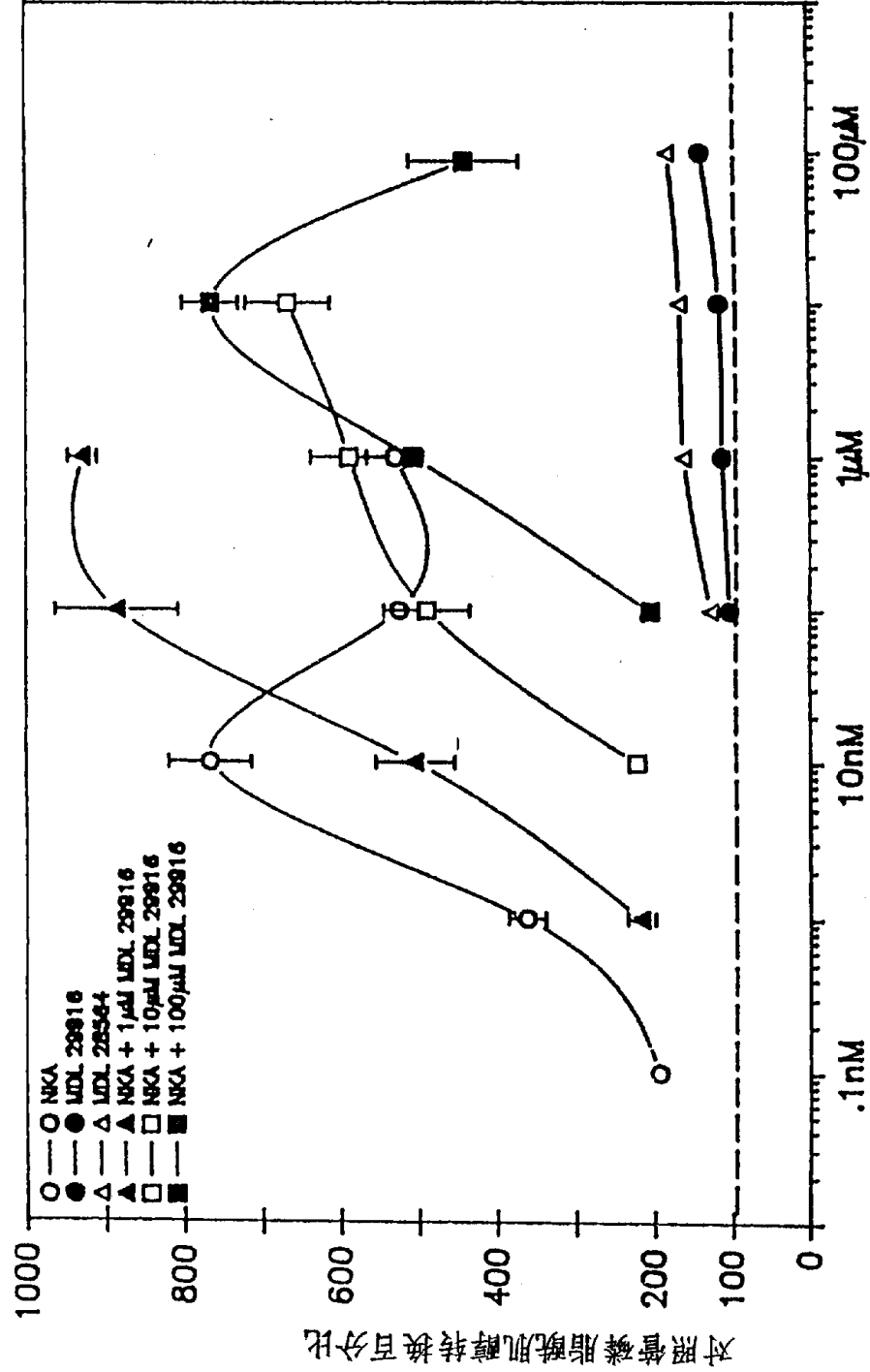


[nM]

样品 28564 (组成见图 1) 对 NKA 刺激的磷脂酰肌醇 (PI) 转换的拮抗作用。10 uM 样品 28564 可导致 NKA 剂量-反应曲线以竞争方式明显右移。图中数值为一个实验重复三次的平均值 ± 标准误差

图 3

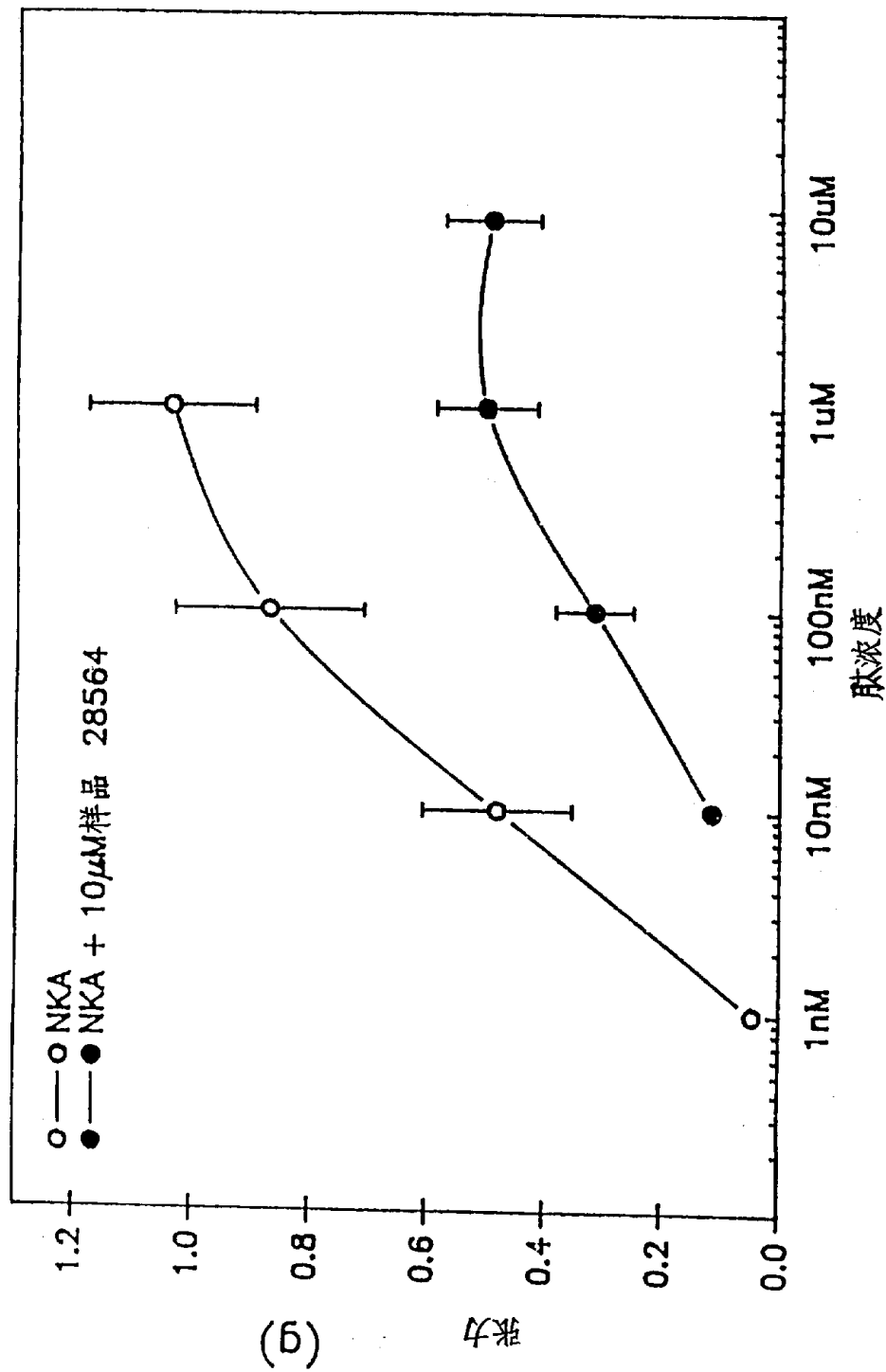
地鼠膀胱中磷脂酰肌醇的转换



肽浓度

样品 29916 对神经激肽 A 刺激的磷脂酰肌醇 (PI) 转换的拮抗作用。1. 10 和 100  $\mu\text{M}$  样品 29916 导致 NKA 剂量一反应曲线依赖剂量的右移。这些数据 Schilld 图的斜率为 -0.99, 表示属于竞争性拮抗作用; PA 2 为 7.66, 样品 29916 的浓度高达 100  $\mu\text{M}$  时也仅显示 5% 的激动活性。而样品 28564 也只有 12% 的激动活性。图中数值为一个实验重复三次所得结果的平均值  $\pm$  标准误差

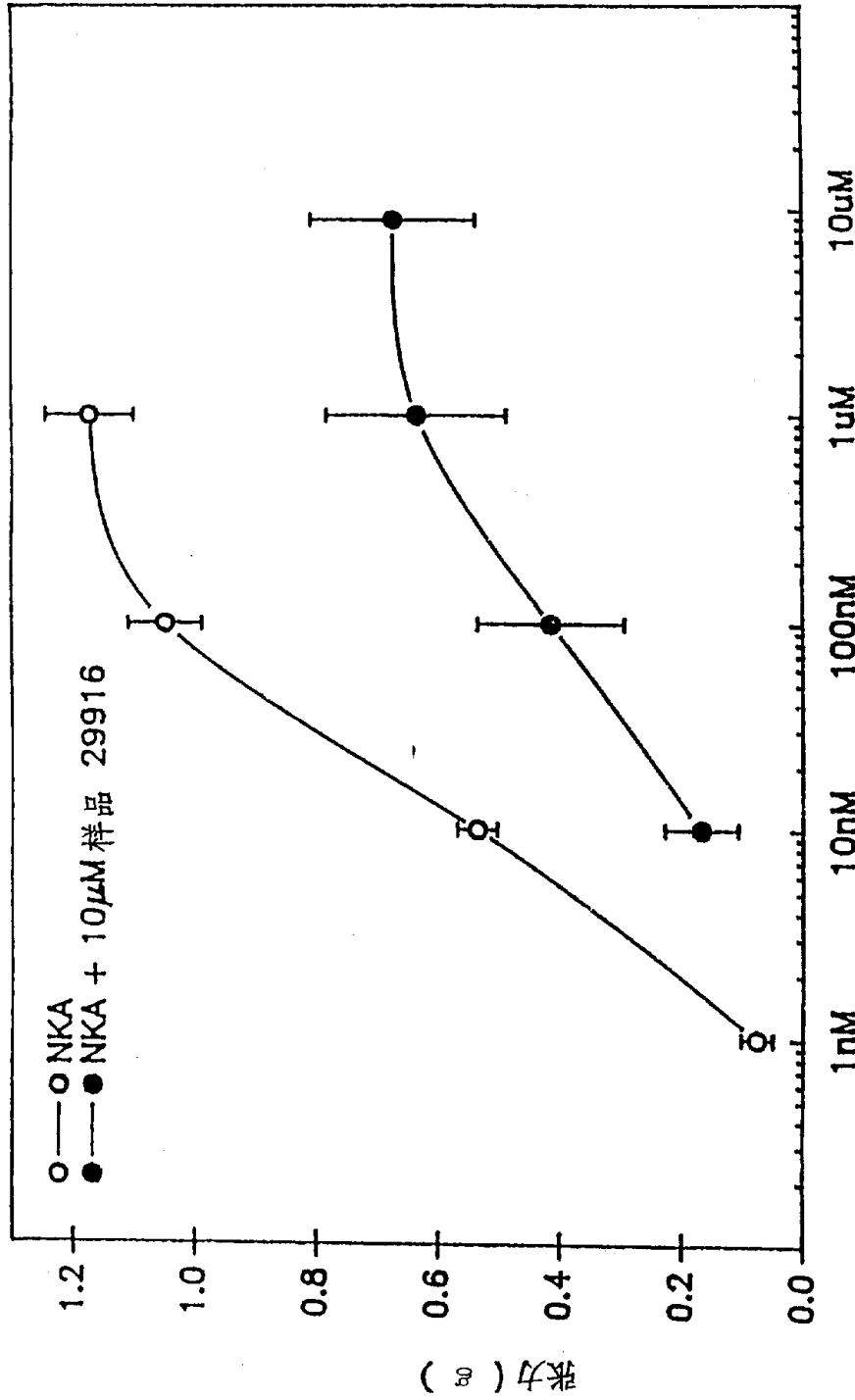
图 4  
样品 28564 对 NKA 介质的地鼠膀胱标本收缩效应的影响  
(n=3)



样品 28564 对地鼠膀胱标本中神经激肽 A 的拮抗作用, 10 $\mu$ m 样品 28564 导致 NKA 剂量-收缩效应曲线的明显右移, NKA 最大收缩效应也受到抑制。图中数值为一个实验重复三次所得结果的平均值士标准误差

图 5

样品 29916 NKA 介导的地鼠膀胱标本收缩效应的影响  
(n=3)



样品 29916 对地鼠膀胱中 NKA 的拮抗作用。10 $\mu$ M 样品 28564 导致 NKA 剂量—收缩效应曲线的明显右移。NKA 最大收缩效应也收到抑制。图中数值为一个实验重复三次所得结果的平均值 ± 标准误差