



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 89109713.9

[51]Int.Cl⁶

[45]授权公告日 1996 年 3 月 20 日

C07K 5/04

[24]颁证日 96.1.21

[21]申请号 89109713.9

[22]申请日 89.12.30

[30]优先权

[32]89.1.13 [33]HU[31]116/89

[73]专利权人 理查德奇特昂凡昔的古阿脱

地址 匈牙利布达佩斯

[72]发明人 伊思脱凡勋 奥加奈克尼可帕力纳

拉乔斯开型法罗第 拉兹路丹尼斯

C07K 7/06

邱吉赫瞿斯 拉兹路司布尼

A61K 38/04

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 顾勇华

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 抑制T-淋巴细胞成熟和巨噬细胞活性的
新颖肽的制备方法

[57]摘要

本发明涉及能抑制 T-淋巴细胞成熟和巨噬细胞活性的新颖肽及其酸加成盐, 涉及含有这些肽的药用组合物以及制备这些肽和组合物的方法。该新颖肽对于治疗疾病是有用的, 在需要对免疫系统功能进行一般抑制作用的场合都可适用。

Lys-His-Leu-NH₂

通过连续地应用活性脂,混合酸

酞和/或迭氮化物的偶联步骤在溶液中使链分步加长,随后通过 α -和/或 ϵ -氨基的脱保护,其特征在于由含有羧基的氨基酸衍生物开

始，通过借氢化作用或酸解作用可去除的保护性基被酯化，和任意被保护的侧链羟基和/或氨基和/或 C-末端羧基，通过借氢化作用而可除去的保护性基被胺化或酯化；或者 1,2-二氨基乙烷、它的单-L-缬氨酸衍生物或 L-胱氨酸二酰胺、所述肽的衍生物的形成是在它们的 C-末端羧基上，通过借氢化或酸解作用可去除的保护基，再在它们的其他羧基上，通过借氢化或酸解作用可去除的保护基来进行酯化，同时含有它们的在肽键中不涉¹³到的、在它们的氨基保护基叔丁氧羰基或苄氧羰基，和/或在它们的羟基上进行保护；然后通过催化氢化和/或酸性处理去除存在的保护基；并且

假如需要，可通过合适的酸来处理，将所述肽转变为它们的酸加成盐；和/或

假如需要，可考虑将所述肽以它们的盐的形式得到，和/或转变为与其他酸所形成的盐。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于它包括使用含有可由叔丁基酯化的羧基的被保护氨基酸衍生物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于它包括使用可由在氨基上的叔丁氧羰基酰化的被保护氨基酸衍生物。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于它包括使用可由在氨基上的苄氧羰基酰化的保护氨基酸衍生物。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于它包括使用由在羟基上的叔丁基保护的氨基酸衍生物。

6. 如权利要求 1 所述的方法，用于制备如下肽，

Arg-Lys(Chc)-Asp-Val

Arg-Lys(Chc)-Asp

Arg-Sar-Asp-Val

Arg-Sar-Asp

Arg-Lys-Aad-Val

Arg-Lys-Aad

$$[\text{Arg-Lys-Asp-NH-CH}_2\text{-}]_2$$
$$\text{Arg-Lys-Asp-Val-NH-CH}_2$$

Arg-Lys-Asp-NH-CH₂

$$[\text{Arg-Lys-Asp-Val-NH-CH}_2\text{-}]_2$$

其特征在於它包括使用可由在其胍基上的氯化氫保护的精氨酸衍生物。

说明书

抑制 T-淋巴细胞成熟和巨噬细胞活性 的新颖肽的制备方法

本发明涉及及式(1)到(20)的新颖肽:

- | | |
|--|------|
| Arg-Lys(Chc)-Asp-Val | (1) |
| Arg-Lys(Chc)-Asp | (2) |
| Arg-Sar-Asp-Val | (3) |
| Arg-Sar-Asp | (4) |
| Orn-Lys-Asp-Val | (5) |
| Orn-Lys-Asp | (6) |
| Arg-Lys-Aad-Val | (7) |
| Arg-Lys-Aad | (8) |
| $[\text{Arg-Lys-Asp-NH-CH}_2\text{-}]_2$ | (9) |
| Arg-Lys-Asp-Val-NH-CH ₂ | (10) |
| | |
| Arg-Lys-Asp-NH-CH ₂ | |
| $[\text{Arg-Lys-Asp-Val-NH-CH}_2\text{-}]_2$ | (11) |
| $[\text{Arg-Lys-Asp-Cys-NH}_2\text{-}]_2$ | (12) |
| Lys-Ser-Lys-Leu | (13) |
| Ser-Lys-Leu | (14) |
| Ser-Ser-Ser-Thr | (15) |
| Lys-Glu-Thr | (16) |
| Lys-Thr-Glu-Thr | (17) |
| Pro-Lys-Leu-Thr | (18) |

Lys- Lys- Thr- Glu (19)

Lys- His- Leu- NH₂ (20)

它们的含有这些肽的酸性加成盐和药用组合物。

根据本发明的另一方面，可以提供制备式(1)到(20)新颖肽的制备方法及含有它们的药用组合物

上述式(1)到(20)的肽能抑制 T- 淋巴细胞的成熟和巨噬细胞的活性。

本发明进一步涉及通过服用上述式(1)到(20)本身的有效剂量的一个或多个化合物或以药用组合物形式的药物来影响被治疗的人或动物的免疫系统功能以治疗 (活的) 动物 (包括人类) 的方法。

对健康的有机体来说，免疫系统的平衡功能可维持强有力的保护机制，它能杀灭微生物，达到破坏异物和肿瘤细胞，以及从有机体中除去它们，而有机体本身的健康细胞却不受伤害。

当免疫系统功能减弱 (最适度以下) 时，感染性的外源的或肿瘤的细胞就能繁殖，最终导致宿主有机体功能的全面破坏；而且，当免疫反应过份增大时，健康组织也可能会受伤害 (自身免疫和变态反应性疾病)，例如在器官移植过程中，植入的器官或组织可以被机体的天然防御反应 (应答) 所拒绝。

胸腺产生的淋巴细胞，即所谓 T- 细胞，它在起动、维持和中止免疫反应中起到主要作用。众所周知，由于信息传递，活的有机体中的免疫系统的功能受到许多肽和蛋白质的影响。由免疫细胞所产生的胸腺激素和信息传递因素 (细胞分裂素) 在治疗肿瘤和免疫疾病方面曾被作过广泛研究 (《未来的医药》“Drugs of the Future” 11, 784(1984); 《医药实验临床研究》“Drugs Exp. Clin. Res.” 13, 327(1987))。这种因素为如所谓的胸腺素级分 5, 一种从含有已知

胸腺激素的牛犊胸腺中获得的部分纯化提取物 (“Cancer Immunol. Immunother.” 18, 185(1984))。通过利用由遗传工程技术制得的细胞分裂素 (Cytokine) 来治疗癌症疾病已获得了良好的效果 (“N. Engl. J. Med.” 313, 1485(1985))。

对于医药用的组合物，需要建立更加严格的质量要求。当器官提取物和生物合成高分子不够纯而不能使其均质化时，则污染物（杂质）将会引起不希望有的副作用。由于这个理由，人们都应尽力在治疗中采用具有精确确定结构和高纯度的组合物。上述的与高分子有关的免疫刺激作用也可以通过使用较小的肽来达到（美国专利说明书专利号4,190,646、4,215,112、4,232,008、4,261,886、4,395,404和4,442,031；德国专利说明书专利号2,938,420、3,001,775和3,100,974；匈牙利专利说明书专利号4827/86）。

在上面引用的参考资料中所描述的短肽表明了T-和B-细胞的增生现象，并具有一种总的免疫刺激效应。为了再现天然免疫调整剂的整个反应谱，就需要一些物质，它们在总的免疫反应的各个不同时期可发挥它们的作用，并且其作用方式不同于已知的免疫刺激剂。

本发明的肽对免疫系统功能能发挥一个总的抑制效果，并且特别是它们能抑制T-细胞的成熟和巨噬细胞的活性。这种作用使得利用这些肽来治疗与免疫系统功能亢进有关的症状成为可能。目前在治疗中所用的免疫抑制药物如环磷酰胺，即2-[双(2-氯乙基)氨基]-四氢-2H-1,3,2-噁嗪磷-2-氧化物；硫唑嘌呤，即6-(1-甲基-4-硝基-5-咪唑基硫代)嘌呤；皮质甾类或环孢菌素 (cyclosporin)，它们具有治疗指数低于10，即就是其治疗剂量与毒性的药物剂量没有很大的差别，因此，它们只能在严格的医学控制下使用。

免疫抑制性肽的一个特殊优点是它们在有机体中分解非常快，不会积累在组织和细胞中，然而，虽然它们存在时间短暂，但它们能产

生导致重大作用的复合过程。它们的特点在于低毒性[LD₅₀>1000毫克/公斤静脉内(i.v)]。

人们已发现，式(1)到(20)的新颖肽能够抑制 T-细胞依赖性产生抗体的细胞的成熟，减少了新生小鼠的抗体产生细胞的活性，并且可抑制吞噬作用和减少迟发过敏性反应。这些肽的抑制效应据推测是建立在下列现象的基础上的。即它们在免疫过程中能抑制巨噬细胞的抗原表现和/或 T-细胞的抗原识别。实际上，免疫反应的复合机制是通过这些过程和相互作用开始的；因此，可以设想这些肽的免疫抑制作用在免疫反应的开始阶段是非常有效的。

本发明式(1)至(20)的新颖肽的制备方法是如在肽化学中所知道的连续地应用活性酯、混合酸酐和/或叠氮化合物法的偶联步骤在溶液中使链分步加长，接着使 α -和/或 ϵ -氨基脱保护作用。由此，可由含有羧基的氨基酸衍生物开始，通过可借氢化作用或酸解作用去除的保护基来酯化，并且一个任意经保护的侧链羟基和/或氨基和/或 C-末端接羧基可通过借氢化作用而可除去的保护基来胺化或酯化；或者由 1,2-二氨基乙烷、它的单-L-缬氨酸衍生物或 L-胱氨酸二酰胺开始，式(1)至(20)的肽的衍生物的形成是，通过借氢化或酸解作用可去除的保护基，在它们的 C-末端羧基上进行胺化或酯化，通过借氢化或酸解作用可除去的保护性基在它们的其他羧基上进行酯化，它们含有肽链上不涉及的它们氨基上的保护基叔丁氧羰基或苄氧羰基，和/或在它们的羟基上进行保护；然后通过催化氢化和/或酸性处理除去存在的保护基；并且：

假如需要，可通过适用的酸处理，将式(1)至(20)的游离肽转变为它们的酸加成盐；和或，

假如需要，式(1)至(20)的游离肽，可以以它们的盐的形式得到，和/或与其他酸转变为所形成的盐。

在某些情况下，在合成中结合使用保护基，如使其可能选择性地去除氨基保护基，然后在合成快结束时以一步或二步的方式除掉所有的保护基。为了要形成肽键，可采用利用N-羟基-琥珀酰亚胺酯的方法 (Wunsch: Synthese Von Peptiden Vol.2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, page 14), 采用五氟代苯基酯的方法 (匈牙利专利说明书专利号168,431), 或采用混合酸酐的方法 (匈牙利专利说明书专利号183,579)。

为了合成式(9)至(12)的二聚物型化合物，可采用1,2-二氨基乙烷或其单-L-缬氨酸衍生物或L-胱氨酸二酰胺作为起始物质。在分步方式使链加长方法中，可使用约2摩尔的酰化氨基酸衍生物，以1摩尔的上述起始物质来计算 (实际摩尔比取决于反应物中的哪一个反应物应该适当过量使用)。

很明显，在式(9)、(11)和(12)的化合物的合成中，每一个中间物具有一对称结构，而式(10)的中间物为不对称的。

氨基可由Boc或Z基保护，而羧基具有叔丁基，苄基或4-硝基苄基酯保护基。

在合成完成后，任意地将存在的保护基从用上述方式获得的被保护的肽中除去。然后，假如需要，游离肽可用酸处理使其转变为它的酸加成盐。催化氢化作用或酸解作用可用于去除保护基。这样获得的肽通常是非常纯的，可作治疗用，并且不需要进一步提纯处理。然而，若需要，它们可通过在硅胶上进行柱色谱法 (色层分离法) 来提纯。以溶液形式所获得的肽可通过溶液的蒸发或冷冻干燥的方法来分离。游离肽可被转变为任意的盐。

最终产物的纯度可用高性能液体色谱法 (HPLC) 分析来核验。

靶子化合物对免疫系统的作用将在下述试验中加以研究。

1. 对新生大鼠产生抗体的细胞的作用

本研究是按照Cunningham的方法用得自新生大鼠的脾细胞来进行的, (Handbook of Experimental Immunology, Ed, D. M. Weir, Vol.2. Black-well Oxford-London, page 285, 1978)。对来自枯叶层的十二只Wister(L A T 1)大鼠, 在它们出生12小时内, 采用7.5 微克(μg)的试验物质, 剂量为1 毫克/ 公斤(mg/kg)进行腹腔内(i.p)注射处理。在出生后的第14天, 将这些动物用0.5 毫升的1%绵羊红细胞悬浮液进行腹腔内免疫接种, 然后7 天后用断头术放血。从得自该小动物的脾细胞, 用绵羊红细胞悬浮液和补体制备均匀的悬浮液, 然后将其放置于适宜获得单细胞层的小室内。该小室用石蜡密封, 在 37°C 下培育45分钟。在产生抗体的脾细胞的周围, 形成溶解区(lytic areas), 即所谓空斑。在用抑制物质处理的影响下, 空斑形成细胞(P F C)的数目被减少了。表1 中归纳的数据表明这种百分数的减少量是根据得自未处理的对照动物的细胞基础来计算的。在同样情况下, 空斑形成细胞的数目可通过使用免疫刺激肽而

表 1
抗体产生的抑制

肽	变化 %
(1) Arg- Lys-(Chc)-Asp- Val	-14.4
(2) Arg- Lys-(Chc)-Asp	-27.1
(3) Arg- Sar- Asp- Val	-25.5
(4) Arg- Ssr- Asp	-21.5
(5) Orn- Lys- Asp	-19.5
(8) Arg- Lys- Aad	-10.6
(10) Arg- Lys- Asp- Val- NH- CH ₂	-22.4

	Arg- Lys- Asp- NH- CH ₂	
(11)	(Arg- Lys- Asp- Val- NH- CH ₂) ₂	-21.2
(16)	Lys- Glu- Thr	-36.8
(17)	Lys- Thr- Glu- Thr	-23.2
(18)	Ppo- Lys- Leu- Thr	-19.4
(19)	Lys- Lys- Thr- Glu	-22.9
(20)	Lys- His- Leu- NH ₂	-25.3
A	Arg- Lys- Asp	+68.6
B	Arg- Lys- Asp- Val	+58.0
C	Arg- Lys- Asp- Val- Tyr	+46.9

2.对新生大鼠初次抗体产生的影响

该研究是建立在凝集现象的基础上的。一种特定的抗血清粘附于抗原形成的大颗粒的表面并快速沉降（凝集）。

将新生Wistar(L A T I)大鼠在出生后12小时内，用1毫克/公斤剂量的试验物质进行腹腔内(i.p)处理。在第14天，用0.5毫升的1%绵羊红细胞悬浮液对小动物进行腹腔内免疫接种。随着免疫作用的第7天，后眼眶取血，30分钟后，用离心法分离血清，并按Takatsy法测定血细胞凝集素滴定度[Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 3, 191(1955)]。从二只大鼠的混合血清(50微升(μl)，以12个步骤制备对半稀释液。每个试样给以25微升(μl)的2%绵羊红细胞悬浮液。将该混合物在37℃下培育1小时以评价凝集作用。表2中归纳的这些数据表明该化合物对初次抗体产生的抑制作用以相对于未处理动物的百分比来表示。免疫刺激物质在此试验中正好表现出其相反作用。

表 2
对初次抗体产生的作用

肽	相对于未处理 对照物的变化 %
(3) Arg- Sar- Asp- Val	-17.9
(4) Arg- Sar- Asp	-10.7
(11) (Arg- Lys- Asp- Val- NH- CH ₂) ₂	-14.9
(12) (Arg- Lys- Asp- Cys- NH ₂) ₂	-10.7
(19) Lys- Lys- Thr- Glu	-10.8
A Arg- Lys- Asp	+13.7
B Arg- Lys- Asp- Val	+28.1
C Arg- Lys- Asp- Val- Tur	+41.3

3. 静止巨噬细胞吞噬能力的抑制作用

静止巨噬细胞的吞噬能力在小鼠身上已作过研究 [J. Immunophamacol, 4, 265 (1982-1983)]。重22-28 克的雄性 C F L P (L A T)

小鼠，每日用1 毫克/ 公斤剂量的试验物质进行皮下 (S. C.)

处理7 天。给动物放血后，它们的腹膜用8 毫升 P B S 缓冲溶液 (磷酸盐缓冲盐水, pH= 洗涤，每次含有10个国际单位 (I U) 的肝素。从腹腔内洗出的细胞悬浮液用蒸馏水摇荡的方法使其成为无红细胞，然后用 P B S 缓冲溶液洗涤3 次。二次洗涤间的沉淀是通过在1000转 / 分下离心作用5 分钟来达到的。每次细胞悬浮液的浓度调整至10细胞 / 毫升，并且将该悬浮液在含有5%二氧化碳的气氛下、温度为37℃的 Boyden-室内沉降30分钟。粘附于玻璃壁的巨噬细胞的上面产

生一层调理酵母。在除去非吞噬的颗粒后，在每个细胞中对由巨噬细胞并入的那些粒子进行计数。表3 给出了相对于从作为对照的未处理动物分离出的巨噬细胞的吞噬的酵母细胞的数目减少的百分比。

表 3

肽	变化 %
(1) Arg- Lys-(Chc)-Asp- Val	-11.2
(2) Arg- Lys-(Chc)-Asp	-47.3
(3) Arg- Sar- Asp- Val	-10.5
(4) Arg- Ssr- Asp	-22.7
(7) Arg- Lys- Aad- Val	-28.7
(8) Arg- Lys- Aad	-29.1
(9) (Arg- Lys- Asp- NH- CH)	-11.6
(11) (Arg- Lys- Asp- Val- NH- CH)	-16.5
(12) (Arg- Lys- Asp- Cys- NH)	-40.1
(14) Ser- Lys- Leu	-14.0
(17) Lys- Thr- Glu- Thr	-17.5
(18) Pro- Lys- Leu- Thr	-11.8
(19) Lys- Lys- Thr- Glu	-18.6
(20) Lys- His- Leu- NH	-39.6
环磷酸胺其腹腔内剂量为150 毫克/ 公斤	-75.0

4.对迟发过敏性 (DTH) 反应影响

该试验是在重25—30克的雄性CFLP (LATI) 小鼠身上进行的。在实验开始时，将小鼠用3%的噁唑酮在无水乙醇中的溶液进行

处理，在每只小鼠的双耳和前爪上涂敷20微升的该种溶液。在处理的第7天，这些动物再用溶解于生理盐水的化合物在其腹腔内进行处理，剂量为1毫克/公斤。对照小鼠仅用盐水处理之。在实验的第10天，用20微升（ μ l）的2.5%噁唑酮的橄榄油溶液涂抹该小动物的每只耳朵。耳朵的厚度测量二次，即在引入抗原前如引入抗原后24小时。双耳厚度的测量是在耳垂的中部位置，测量精确度至0.01毫米。其变化与对照组进行比较而得。有关DTH反应发展的抑制作用的数据以百分比值给出于表4中。

表 4

肽	抑制作用 %
(1) Arg- Lys-(Chc)-Asp- Val	39.1
(5) Orn- Lys- Asp- Val	28.3
(6) Orn- Lys- Asp	39.6
(8) Arg- Lys- Aad	36.8
(11) (Arg- Lys- Asp- Val- NH- CH ₂) ₂	27.0
(12) (Arg- Lys- Asp- Cys- NH ₂) ₂	35.3
(13) Lys- Ser- Lys- Leu	28.2
(14) Ser- Lys- Leu	22.7
(15) Ser- Ser- Ser- Thr	18.0
(16) Lys- Glu- Thr	27.5
(17) Lys- Thr- Glu- Thr	35.5
环磷酰胺其腹腔内剂量为150 毫克/ 公斤	72

上表作为比较用的肽“A”、“B”和“C”是已知的，“A”和“B”在匈牙利专利号185,263的说明书中有所描述，“C”可从美国专利号4,190,646的说明书中得知。

本发明的化合物及它们的酸加成盐可以普通药用组合物形式，被应用在任何需要减少免疫系统活性的治疗领域。式(1)至(20)的肽可以其本身或它们的盐的形式被应用，很适宜的是通常在治疗中以医药配方来应用。这些配方（药方）可以为固体或液体状态，并且可通过使用填料、稀释剂、稳定剂、pH影响剂和渗透压影响剂，以及通常用于这些配方的能促进配方的添加剂。

本发明通过下述的而并非限制的实施例作详细说明。

在叙述中所用的缩写相当于通常在文献中已知的缩写[Biochem. J. 219,345(1984)]。“Chc”意指环己基氨基甲酰基和“Aad”为 α -L-氨基己二酰基。熔点是在Dr. Tottoli装置（由瑞士Büchi制造）内测定。薄层色谱法检查是通过使用备用的吸收剂(DC-Fertigplatten, 由FRG, Merck制造)及以下的溶剂混合物（此处原液为20:6:11的吡啶/乙酸/水的混合物）:

- | | |
|---------------------|----------|
| 1. 乙酸乙酯/ 原液 | 19:1; |
| 2. 乙酸乙酯/ 原液 | 9:1; |
| 3. 乙酸乙酯/ 原液 | 4:1; |
| 4. 乙酸乙酯/ 原液 | 7:3; |
| 5. 正丁醇/ 原液 | 3:7; |
| 6. 正丁醇/ 原液 | 1:4; 和 |
| 7. 正丁醇/ 乙酸/ 乙酸乙酯/ 水 | 1:1:1:1. |

(比率为体积比)

色谱用水合茚三酮来测定，或者在氯化作用后，用碘化钾/ 联甲苯胺试剂来测定。

HPLC分析是可通过采用装有Labor-MINDE 975型具有可变波长的紫外探测器、Alltex泵和KUTESZ 175型记录器的装置来进行。为了便于分离，使用具有由C₁₈烷基烷基化了的硅凝胶静止相的长250毫米、内径4.6毫米填料。

下面的混合物作为洗脱之用：

A. 含有25毫升的甲醇和75毫升的含0.5%（体积）三氟代乙酸的0.01摩尔硫酸钠水溶液的混合物；

B. 1.5:1.0:97.5 的乙腈/三氟代乙酸/蒸馏水的混合物。

测量是在流量为1毫升/分钟下完成的，并且溶液的吸附在212毫微米(nm)处测得。该色谱通过面积标准化法来评定。

靶化合物的纯度根据HPLC和薄层色谱法(TLC)分析两者测得，高于95%。

特有的旋光度可由Perkin-Elmer 241型旋光计来测定。所有的溶剂可由在40℃水浴中的Buchi旋转蒸发器来除去或蒸发掉。

靶化合物的氨基酸分析是在Biotronik LC 5001型装备中进行。将试样在110℃ 6摩尔浓度的盐酸溶液中水解24小时。分析结果在所有情况下为在±5%的误差极限之内。

合成的起始物质在一般在文献中是共知的。

实施例1

Arg- Sar- Asp- Val的制备（方法“A”）

将1.68毫升(12.0毫摩尔)的三乙胺加入到含2.58克(12.0毫摩尔)的H-Val-O^tBu.HCl和4.62克(11.0毫摩尔)的在25毫升二甲基甲酰胺(DMF)中的Z-Asp(O^tBu)的悬浮液中。将反应混合物留置过夜，然后在减压下蒸发。将残留物与50毫升乙酸乙酯混合，所得的悬浮液接连地用25毫升的水洗涤，用25毫升的1摩尔/升盐酸（每次）洗涤3次，再用25毫升的5%碳酸氢钠水溶液（每次）洗

涤3次，最后用25毫升水洗涤，用无水硫酸钠干燥之，并在减压下蒸发，获得4.3克(81.7%)的油状Z-Asp(O^tBu)-Val-O^tBu保护的二肽， $R_f^1 = 0.85$ 。

把4.07克(8.5毫摩尔)上述被保护的二肽溶解于40毫升甲醇中，并通过有1.0克钨(在碳上)存在下的溶液，在搅拌的同时使氢起泡方法来氢化。氢化作用在2小时内完成，然后滤掉催化剂，将滤液在减压下蒸发，将残留物溶解于50毫升乙醚中，并通过加入6摩尔/升浓度的二噁烷的盐酸溶液以调节pH值至4。滤出沉淀物以获得3.2克(91.5%)的H-Asp(O^tBu)-Val-O^tBu.HCl游离二肽氢氯化物，熔点为187-189℃， $R_f^2 = 0.40$ 。

将3.0克(10.0毫摩尔)的Z-Sar-OSu和3.05克(8.0毫摩尔)的在30毫升DMF中的H-Asp(O^tBu)-Val-O^tBu.HCl在有1.40毫升(10.0毫摩尔)的三乙胺参与下发生反应。次日将该反应混合物在减压下蒸发，其残留物被溶解于50毫升乙酸乙酯中，所得的悬浮液接连地用20毫升水洗涤、每次再用20毫升的1摩尔/升盐酸(每次)洗涤，共2次，每次再用20毫升的5%碳酸氢钠溶液(每次)洗涤共2次，并最后用20毫升水洗涤，通过无水硫酸钠干燥之，并在减压下蒸发。

所得的油状Z-Sar-Asp(O^tBu)-Val-O^tBu被保护的三肽，其产量为4.2克(7.6毫摩尔)($R_f^1 = 0.75$)，溶解于40毫升的甲醇中，并在加入0.8克的钨(在碳上)催化剂后，用一般方法使混合物氢化。滤去催化剂后，将1.0克(8.0毫摩尔)的草酸二水化物加入到滤液中，蒸发溶液，加入乙醚使残留物固化，得到2.24克的H-Sar-Asp(O^tBu)-Val-O^tBu草酸盐(游离三肽草酸盐)，熔点为190-192℃， $R_f^1 = 0.30$ 。

将1.14克(3.5毫摩尔)的在10毫升DMF中的Boc-Arg(HC

1)-OH. H₂O 溶液冷却至-10 °C, 加入0.55毫升(4毫摩尔)的氯甲酸异丁酯, 在同一温度下再加入0.44毫升(4毫摩尔)的溶解于5 毫升DMF中的N-甲基吗啉溶液。将所得的混合酸酐在-10 °C下搅拌10分钟, 然后在相同温度下加入上面所得的1.5 克(3毫摩尔)的游离三肽草酸盐溶液, 和0.84毫升(6毫摩尔)的在5 毫升DMF中的三乙胺。将反应混合物温热至室温, 并留置过夜。在减压下使溶剂蒸发, 将残留物溶解于50毫升氯仿中, 并将该溶液用20毫升的1 摩尔/升盐酸(每次)洗涤3 次, 再用20毫升水洗涤, 并用无水硫酸钠干燥。油状残留物用加入乙醚的方法使其固化, 过滤悬浮液, 获得1.30克(66%)的无定形 Boc-Arg(HCl)-Sar-Asp(O^tBu)-Val-O^tBu, $R_f^1 = 0.18$, $R_f^2 = 0.24$, $[\alpha]_D^{20} = -37.0^\circ$ (C=1, 甲醇)。

将上面得到的1.20克(1.8毫摩尔)的被保护的四肽在40°C下用三氟代乙酸处理2 小时, 然后加入60毫升乙醚将该混合物稀释, 过滤悬浮液, 并用醚洗涤沉淀物。将三氟代乙酸盐溶解在10毫升水中后, 利用5 毫升乙酸酯系(DOWE × 2 × 8)的阴离子交换树脂, 使三氟化乙酸酯离子被乙酸酯离子所取代。在减压下蒸发溶液后, 加入5 毫升的90% 乙醇水溶液使残留物固化, 获得0.6 克的无定形 Arg-Sar-Asp-Val; $[\alpha]_D^{20} = -32.3^\circ$ (C=1, 10%乙酸)。氨基酸分析: Asp 1.03(1), Val 0.97(1), Arg 1.00(1)。

实施例2

Lys-Glu-Thr的制备 (方法“B”)

将3.3 克(11.0 毫摩尔)的H-Thr(^tBu.草酸盐)悬浮于60毫升的乙醚中后, 将此悬浮液随同30毫升的5%碳酸氢钾水溶液共摇动直至溶解。分离有机相, 用附加的20毫升的5%碳酸氢钾水溶液洗涤, 然后再用20毫升水洗涤, 通过无水硫酸钠干燥, 并在减压下蒸发。将4.12克(9.5毫摩尔)的 Z-Glu(O^tBu)-OSu 加入到在20毫升DMF

中的油状残留物的溶液中。将该混合物在室温下搅拌2小时，然后在减压下蒸发。将该残留物溶解在50毫升乙酸乙酯中，并接连地每次用15毫升的10%柠檬酸水溶液洗涤共洗涤3次，每次用15毫升的5%碳酸氢钠水溶液洗涤共2次，最后用15毫升水洗涤，再通过无水硫酸钠干燥之，并在减压下蒸发，获得4.4克(8.0毫摩尔)的油状 Z- Glu (O^tBu)- Thr (^tBu)- O^tBu 保护的二肽 ($R_F^1=0.85$)，将该物溶解于50毫升甲醇中，并如实施例1中描述的方法进行氢化，在滤去催化剂后，蒸发滤液，产得游离 H- Glu (O^tBu)- Thr (^tBu) 二肽 ($R_F^2=0.22$)，将它溶解于20毫升DMF中，在加入4.77克(10毫摩尔)的 Z- Lys (Boc)-O Su 后，将该反应混合物在室温下搅拌2小时，并在减压下蒸发。在油状残留物溶解于50毫升的乙酸乙酯中后，按通常方法经多次洗涤来净化溶液，然后用无水硫酸钠干燥、并在减压下蒸发。油状蒸发残留物在乙醚中重结晶，产得4.75克(74%)的 Z- Lys (Boc)-Glu (O^tBu)- Thr (^tBu)保护的三肽，熔点为114-115°C， $R_F^2=0.80$ ， $[\alpha]_D^{20}=22.8$ (C=1，甲醇)。

4.4克(5.6毫摩尔)上述的被保护的三肽被溶解于40毫升甲醇中，如实施例1描述的方法进行催化氢化。在滤去催化剂后，将滤液在减压下蒸发，并且将油状残留物溶解于40毫升具有6摩尔/升浓度的二噁烷盐酸溶液中。15分钟后出现沉淀物。一小时后，该悬浮液用100毫升的乙醚稀释，过滤，将沉淀物用乙醚洗涤以获得2.3克(91%)的无定形 Lys- Glu- Thr .2HCl 三肽二氢氯化物，熔点为213-215°C (随有分解)， $[\alpha]_D^{20}=+2.7$ (C=1, 1.1% 乙酸)。

将上述 Lys- Glu- Thr .2HCl 三肽二氢氯化物溶解于20毫升水中后，氯化物离子在乙酸酯系 (D O N E × 2 × 8) 的树脂上被乙酸酯离子所取代，然后将该溶液在减压下蒸发，并且加入乙醇使残留物固化。这样可获得2.27克的无定形 Lys- Glu- Thr- 乙酸酯， α

-+3.5 · (C-1, 10%乙酸)。氨基酸分析: Glu 1.01(1), Thr 1.00(1), Lys 1.00(1)。

实施例3

Lys-His-Leu-NH₂乙酸酯的制备 (方法C)

先将2.8 毫升(20 毫摩尔)的三乙胺和然后再将5.6 克(11 摩尔)的Z-Lys(Z)-O Su 加入到2.42克(10 毫摩尔)的在30毫升DMF中的His·OMe·2 HCl 的溶液中。次日, 蒸发该反应混合物, 油状残留物被溶解于45毫升氯仿中, 将溶液多次用20毫升水洗涤共2 次, 通过无水硫酸钠干燥之, 并在减压下蒸发。加入乙酸乙酯使油状残留物固化后, 获得4.54克(80%)的Z-Lys(Z)-His-OMe, 熔点为135-136 °C, $R_f^3 = 0.45$ 。

将4.0 克(7毫摩尔)上面得到的保护的二肽酯溶解于40毫升的温甲醇中, 并加入4 毫升的水合肼。将该混合物保持在室温下3 天, 然后在减压下蒸发至其一半体积, 再用50毫升的乙醚稀释。滤出无定形沉淀物, 并用乙醚洗涤, 获得3.70克的Z-Lys(H)-His-N₂H₃保护的二肽肼, 熔点为150-153 °C, $R_f^3 = 0.20$ 。

将含有3.65克(6.0毫摩尔)的在15毫升DMF中的上述Z-Lys(Z)-His-N₂H₃的溶液冷却至-10 °C, 在相同温度下, 以滴入方式加入2.5 毫升的具有7 摩尔/升浓度的二噁烷氢氯化物和随后加入0.75毫升(6.6毫摩尔)的在4 毫升DMF中的叔丁基亚硝酸酯。将该反应混合物在-10 °C下搅拌20分钟后, 加入2.0 毫升的三乙胺, 并且然后滴入1.33克(7毫摩尔)的Leu-NH₂乙酸酯溶液和1 毫升的在10毫升DMF中的三乙胺。然后将该混合物在0 °C下搅拌30分钟, 然后留置于室温下过夜。反应混合物在减压下蒸发, 并且该残留悬浮在水中。可获得3.7 克粗产物, 使该产物从30毫升的异丙醇中重结晶, 获得2 克(65%)的Z-Lys(Z)-His-Leu-NH₂, 熔点为110-111°C

$^{\circ}\text{C}$, $R_f^4 -0.30$, $[\alpha]_D^{20} = -20.1^{\circ}$ ($C=1$, 甲醇)。

将1.2克(1.8毫摩尔)上面得到的保护的三肽溶解于20毫升的一种5:1:2的甲醇/水/乙酸的混合物中,并且如实施例1描述的方法进行催化氢化。滤掉催化剂后,滤液在减压下蒸发。加乙醇于残留物之后,蒸发,该残留物用乙醚研制,以得到0.57克无定形的吸湿性 Lys- His- Leu- NH_2 - 乙酸酯, $[\alpha]_D^{20} = -5.7^{\circ}$ ($C=1$, 在1摩尔/升乙酸中)。

氨基酸分析: Leu 0.95(1), His 1.03(1), Lys 1.04(1)。

表5所示的被保护的肽和表6所表明的靶化合物可按照实施例中详细描述的方法来制备。

表 5

根据上述制备实施例制得的保护肽, 制备方法和物理特性

保护肽	方法	$[\alpha]_D^{20}$	R_f (混合物)
1 Boc-Arg(HCl)-Lys(Chc)-Asp(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A	-30.8 ⁰	0.28 (4)
2 Boc-Arg(HCl)-Lys(Chc)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-20.6 ⁰	0.45 (4)
3 Boc-Arg(HCl)-Sar-Asp(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A	-37.0 ⁰	0.24 (4)
4 Boc-Arg(HCl)-Sar-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-20.4 ⁰	0.25 (4)
5 Boc-Orn(Boc)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A	-31.6 ⁰	0.76 (2)
6 Boc-Orn(Boc)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-21.3 ⁰	0.76 (2)
7 Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Aad(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A	-32.6 ⁰	0.40 (4)
8 Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Aad(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-21.2 ⁰	0.40 (4)
9 /Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-NH-CH ₂ /2	A	-80.8 ⁰	0.25 (4)
10 Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-Val-NH-CH ₂ Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-NH-CH ₂	A	-29.6 ⁰	0.35 (4)
11 /Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-Val-NH-CH ₂ /2	A	-39.0 ⁰	0.35 (4)
12 /Boc-Arg(HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-Cys-NH ₂ /2	A	-61.0 ⁰	0.50 (4)
13 Z-Lys(Boc)-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Leu-O ^t Bu	B	-29.9 ⁰	0.70 (2)
14 Z-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Leu-O ^t Bu	B	-28.6 ⁰	0.80 (2)
15 Z-Ser(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Thr(^t Bu)-O ^t Bu	B		0.80 (1)
16 Z-Lys(Boc)-Glu(O ^t Bu)-Thr(^t Bu)-O ^t Bu	B	-22.8 ⁰	0.80 (2)
17 Z-Lys(Boc)-Thr(^t Bu)-Glu(O ^t Bu)-Thr(^t Bu)-O ^t Bu	B		0.85 (2)
18 Boc-Pro-Lys(Boc)-Leu-Thr(^t Bu)-O ^t Bu	B	-58.7 ⁰	0.75 (2)
19 Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(^t Bu)-Glu(O ^t Bu)-O ^t Bu	B	-15.1 ⁰	0.77 (2)
20 Z-Lys(Z)-His-Leu-NH ₂	C	-20.1 ⁰	0.30 (4)

表 6

根据上述制备实施例制得的靶化合物及其物理特性

純化合物	$[\alpha]_D^{20}$		R _f (混合物)		(7) (原液)
	10% 1 摩尔/升	100%	(5)	(6)	
乙酸					
(1) Arg-Lys(Chc)-Asp-Val	-17.8°		0.50		
(2) Arg-Lys(Chc)-Asp	+ 1.0°		0.50		
(3) Arg-Sar-Asp-Val	-32.3°	-21.8°	0.26		0.18
(4) Arg-Sar-Asp	+11.3°	+ 9.0°	0.24		0.14
(5) Orn-Lys-Asp-Val	-25.9°		0.10		0.13
(6) Orn-Lys-Asp	- 1.5°		0.05		0.12
(7) Arg-Lys-Aad-Val	-24.4°		0.15		
(8) Arg-Lys-Aad	- 2.6°		0.07		
(9) /Arg-Lys-Asp-NH-CH ₂ /2	-18.7°				0.15
(10) Arg-Lys-Asp-Val-NH-CH ₂	0°	-57.2°			0.10
Arg-Lys-Asp-NH-CH ₂					
(11) /Arg-Lys-Asp-Val-NH-CH ₂ /2	-35.5°			0.05	
(12) /Arg-Lys-Asp-Cys-NH ₂ /2	-72.8°			0.03	
(13) Lys-Ser-Lys-Leu	-27.8°		0.19		0.19
(14) Ser-Lys-Leu	-30.0°		0.54		0.34
(15) Ser-Ser-Ser-Thr	-32.4°		0.24		0.37
(16) Lys-Glu-Thr	+ 3.5°		0.16		0.15
(17) Lys-Thr-Glu-Thr	-25.0°		0.20		0.10
(18) Pro-Lys-Leu-Thr		-57.7°	0.34		0.17
(19) Lys-Lys-Thr-Glu		-21.7°	0.12		0.10
(20) Lys-His-Leu-NH ₂		- 5.7°	0.34		0.10