

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94115973.6

[51]Int.Cl⁶

[43]公开日 1995 年 10 月 11 日

A61K 38/04

[22]申请日 94.6.24

[30]优先权

[32]93.6.24 [33]JP[31]153393/93

[71]申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪市

[72]发明人 猪狩康孝 池田衡 津田昌夫
山本一路 胁光广

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝

A61K 47/34 A61K 9/52

C07K 7/64

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 抗内皮素物质的持续释放制剂

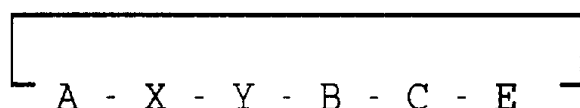
[57]摘要

本发明公开了含有抗内皮素物质和生物降解聚合物的持续释放制剂。

本发明的持续释放制剂可持续释放抗内皮素物质,它可用于治疗与内皮素有关的疾病。

权 利 要 求 书

1. 一种持续释放制剂,包括抗内皮素物质和生物降解聚合物。
2. 权利要求1的持续释放制剂,其中抗内皮素物质是内皮素拮抗剂。
3. 权利要求2的持续释放制剂,其中内皮素拮抗剂是肽。
4. 权利要求2的持续释放制剂,其中内皮素拮抗剂是下面通式的肽,或其酯,或其盐:



其中X和Y各自代表 α -氨基酸基;A代表D-酸性- α -氨基酸基;B代表中性 α -氨基酸基;C代表L- α -氨基酸基;E代表具有芳环基的D- α -氨基酸基。

5. 权利要求4的持续释放制剂,其中肽是式为环[-D-Asp-Asp(R1')-Asp-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的化合物,其中Asp代表天冬氨酸;Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺;Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸;Leu代表亮氨酸;Trp代表色氨酸。

6. 权利要求4的持续释放制剂,其中A是用烷基酯化的D-酸性- α -氨基酸基。

7. 权利要求4的持续释放制剂,其中Y是L-酸性- α -氨基酸基。

8. 权利要求4的持续释放制剂,其中Y是用烷基酯化的L-酸性- α -氨基酸基。

9. 权利要求4的持续释放制剂,其中肽是式为环-[-D-Asp(OC₂H₅)

-Asp(R1')-Asp(OC₂H₅)-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的化合物,其中Asp代表天冬氨酸;Asp(R1')代表天冬氨酸β-4-苯基哌嗪酰胺;Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸;Leu代表亮氨酸;Trp代表色氨酸。

10. 权利要求4的持续释放制剂,其中盐是多价金属盐。

11. 权利要求10的持续释放制剂,其中多价金属盐是锌盐。

12. 权利要求1的持续释放制剂,其中生物降解聚合物是脂族聚酯。

13. 权利要求12的持续释放制剂,其中脂族聚酯是羟基乙酸和乳酸的共聚物。

14. 权利要求13的持续释放制剂,其中共聚物具有重均分子量为约2,000至50,000,它是用凝胶渗透色谱测定的。

15. 权利要求13的持续释放制剂,其中共聚物的分散度为约0.2至4.0。

16. 权利要求1的持续释放制剂,它还包括有机碱性物质。

17. 权利要求1的持续释放制剂,它还包括水溶性多价金属盐。

18. 权利要求1的持续释放制剂,它用于治疗由内皮素引起的疾病。

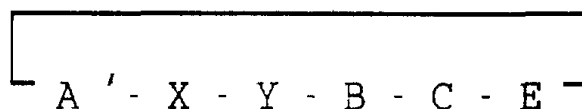
19. 权利要求18的持续释放制剂,其中疾病是慢性疾病。

20. 权利要求19的持续释放制剂,其中慢性疾病是糖尿病的慢性并发症。

21. 权利要求20的持续释放制剂,其中慢性并发症是糖尿病性肾病。

22. 一种注射制剂,包括权利要求1所定义的持续释放制剂。

23. 下列通式的肽或其盐:



其中X和Y独自代表 α -氨基酸基;A'代表用烷基酯化的D-酸性- α -氨基酸基;B代表中性 α -氨基酸基;C代表L- α -氨基酸基;E代表具有芳环基的D- α -氨基酸基。

24. 权利要求23的肽, 其中X是L-异构体。

25. 权利要求23的肽, 其中Y是L-异构体。

26. 权利要求23的肽, 其中A'是用烷基酯化的D-谷氨酸或天冬氨酸。

27. 权利要求23的肽, 其中B是D-异构体。

28. 权利要求23的肽, 其中B选自D-亮氨酸, D-别异亮氨酸, D-叔亮氨酸, D- γ -甲基亮氨酸, D-苯基甘氨酸, D-2-噻吩基甘氨酸, D-3-噻吩基甘氨酸, D-2-环戊基甘氨酸, D-苯丙氨酸, D-2-噻吩基丙氨酸, D-缬氨酸, D-2-呋喃基甘氨酸和D-3-呋喃基甘氨酸基。

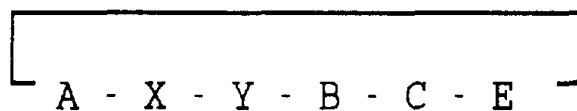
29. 权利要求23的肽, 其中C选自L-亮氨酸, L-苯丙氨酸和L-色氨酸基。

30. 权利要求23的肽, 其中E选自D-色氨酸或其衍生物, D-1-萘基丙氨酸, D-2-萘基丙氨酸, D-苯并噻吩基丙氨酸, D-4-联苯基丙氨酸和D-五甲基苯丙氨酸基。

31. 权利要求23的肽, 其中Y是具有用烷基酯化的羧基的 α -氨基酸基。

32. 下式的肽或其盐: 环-[D-Asp(OC₂H₅)-Asp(R1')-Asp(OC₂H₅)-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-], 其中Asp代表天冬氨酸; Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺; Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸; Leu代表亮氨酸; Trp代表色氨酸。

33. 由下面通式代表的肽的锌盐:



其中X和Y独自代表 α -氨基酸基;A代表D-酸性- α -氨基酸基;B代表中性- α -氨基酸基;C代表L- α -氨基酸基;E代表具有芳环基的D- α -氨基酸基。

抗内皮素物质的持续释放制剂

本发明涉及抗内皮素物质例如内皮素拮抗剂的持续释放制剂，其用于治疗与内皮素有关的疾病，特别是慢性疾病，例如糖尿病的慢性并发症。

显示各种有效力的生理作用的肽已应用于多种尝试的药物中。但是，它们的生物半衰期通常是很短的。为了具有持续的药理学作用，必须经常服用肽，结果引起病人的剧烈的病痛。内皮素，即为由血管内皮分泌的一种肽，其显示了有效力的和能持续的血管平滑肌的收缩作用。因此，内皮素在生理学上和病理学上都是很重要的。并且，已存在具有很强期望的以肽为基础的内皮素拮抗剂的开发的报道，它们是抗内皮素物质如内皮素受体拮抗剂，其将对治疗与内皮素有关的多种疾病作出贡献。然而，由于上述的理由，将这种以肽为基础的拮抗剂应用作为药物已受到限制。此外，在常规的内皮素拮抗剂的治疗应用方面，已存在通过在急性疾病如急性心肌梗塞的发作和休克中的抗与内皮素有关的反应来企图阻止病理状态的开始和进展。虽然已提出应用于治疗高血压、心脏/大脑循环疾病、肾疾病和其他疾病，但没有特殊的例证。也尚未发现，对于慢性疾病如糖尿病性肾病来说，在阻止与内皮素有关的病理状态的开始和进展中，服用内皮素拮抗剂是有效的。

多种持续释放制剂是已知的，这些制剂包括基于含有分散于

聚(丙交酯-乙交酯)共聚物中的多肽的聚合基质的释放速率控制系统,其描述于日本专利未审查公开号2930/1988(EP-A-251476)中。

日本专利未审查公开号40329/1992(日本专利未审查公开号118512/1982, EP-A-52510)公开了一种组合物,其包括在生物学上可与黄体化的释放激素的激素(LH-RH)或其类似物和水溶性多肽相配伍的生物降解聚(丙交酯-乙交酯)共聚物,其能够经至少1个月持续释放有效量多肽。

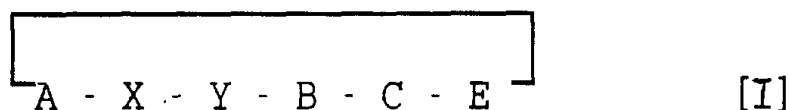
日本专利未审查公开号124814/1990(EP-A-350246)所公开的技术是,其中将水溶性药物有效地包于微胶囊中,其是通过添加药物保持物质(包括有机碱性物质如碱性氨基酸)和使用由聚合物制成的壁层来达到的,并且恰好在服用后过量的药物释放被抑制。

不存在持续释放制剂,其包括抗内皮素物质与生物降解聚合物相结合,并且以几乎恒定的速率能够有效持续释放抗内皮素物质。

相对于上述的背景技术来说,需要优良的持续释放制剂,以便治疗内皮素引起的慢性疾病。

根据本发明,其提供:

- (1)持续释放制剂,其包括抗内皮素物质和生物降解聚合物,
- (2)上述(1)的持续释放制剂,其中抗内皮素物质是内皮素拮抗剂,
- (3)上述(2)的持续释放制剂,其中内皮素拮抗剂是肽,
- (4)上述(2)的持续释放制剂,其中内皮素拮抗剂是下列通式的肽:



式中X和Y独自代表 α -氨基酸基；A代表D-酸性- α -氨基酸基；B代表中性- α -氨基酸基；C代表L- α -氨基酸基；E代表具有芳环基的D- α -氨基酸基，或其酯，或其盐，

(5) 上述(4)的持续释放制剂，其中肽是式为环[-D-Asp(R1')-Asp-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的化合物，式中Asp代表天冬氨酸；Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺；和Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸；Leu代表亮氨酸；Trp代表色氨酸，

(6) 上述(4)的持续释放制剂，其中A是用烷基酯化的D-酸性- α -氨基酸基，

(7) 上述(4)的持续释放制剂，其中Y是L-酸性- α -氨基酸基，

(8) 上述(4)的持续释放制剂，其中Y是用烷基酯化的L-酸性- α -氨基酸基，

(9) 上述(4)的持续释放制剂，其中肽是式为环[-D-Asp(OC₂H₅)-Asp(R1')-Asp(OC₂H₅)-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的化合物，式中Asp代表天冬氨酸；Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺；Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸；Leu代表亮氨酸；和Trp代表色氨酸；

(10) 上述(4)的持续释放制剂，其中盐是多价金属盐；

(11) 上述(10)的持续释放制剂，其中多价金属盐是锌盐；

(12) 上述(1)的持续释放制剂，其中生物降解聚合物是脂族聚酯，

(13) 上述(12)的持续释放制剂, 其中脂族聚酯是羟基乙酸和乳酸的共聚物,

(14) 上述(13)的持续释放制剂, 其中共聚物具有重均分子量为约2,000至50,000, 其用凝胶渗透色谱测定,

(15) 上述(13)的持续释放制剂, 其中共聚物具有分散度为约0.2至4.0,

(16) 上述(1)的持续释放制剂, 其中还包括有机碱性物质,

(17) 上述(1)的持续释放制剂, 其中还包括水溶性多价金属盐,

(18) 上述(1)的持续释放制剂, 其用于治疗由内皮素引起的疾病,

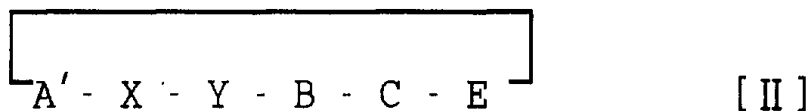
(19) 上述(18)的持续释放制剂, 其中所说的疾病是慢性疾病,

(20) 上述(19)的持续释放制剂, 其中所说的慢性疾病是糖尿病的慢性并发症,

(21) 上述(20)的持续释放制剂, 其中所说的慢性并发症是糖尿病性肾病,

(22) 可注射的制剂, 其包括上述(1)的持续释放制剂,

(23) 下列通式的肽:



式中X和Y独自代表 α -氨基酸基; A'代表用烷基酯化的D-酸性- α -氨基酸基; B代表中性2-氨基酸基; C代表L- α -氨基酸基; E代表

具有芳环基的D- α -氨基酸基, 或其盐,

(24) 上述(23)的肽, 其中X是L-异构体,

(25) 上述(23)的肽, 其中Y是L-异构体,

(26) 上述(23)的肽, 其中A'是用烷基酯化的D-谷氨酸或D-天冬氨酸,

(27) 上述(23)的肽, 其中B是D-异构体,

(28) 上述(23)的肽, 其中B选自D-亮氨酸基、D-别异亮氨酸基、D-叔亮氨酸基、D- γ -甲基亮氨酸基、D-苯基甘氨酸基、D-2-噻吩基甘氨酸基、D-3-噻吩基甘氨酸基、D-2-环戊基甘氨酸基、D-苯基丙氨酸基、D-2-噻吩基丙氨酸基、D-缬氨酸基、D-2-呋喃基甘氨酸基和D-3-呋喃基甘氨酸基,

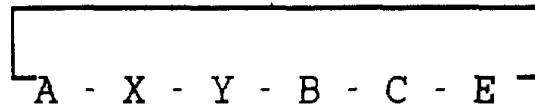
(29) 上述(23)的肽, 其中C选自L-亮氨酸基、L-苯基丙氨酸基和L-色氨酸基,

(30) 上述(23)的肽, 其中E选自D-色氨酸基或其衍生物基、D-1-萘基丙氨酸基、D-2-萘基丙氨酸基、D-苯并噻吩基丙氨酸基、D-4-联苯基丙氨酸基和D-五甲基苯基丙氨酸基,

(31) 上述(23)的肽, 其中Y是具有用烷基酯化的羧基的 α -氨基酸基,

(32) 式为环[-D-Asp(OC₂H₅)-Asp(R1')-Asp(OC₂H₅)-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的肽, 式中Asp代表天冬氨酸; Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺, Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸; Leu代表亮氨酸; 和Trp代表色氨酸, 或其盐, 和

(33) 由下列通式代表的肽的锌盐:



[I]

式中X和Y独自代表 α -氨基酸基；A代表D-酸性- α -氨基酸基；B代表中性 α -氨基酸基；C代表L- α -氨基酸基；E代表具有芳环基的D- α -氨基酸基。

通过医学和药理学的促进，当糖尿病患者的病理状态被较处理好时，糖尿病患者的寿命也增加了。然而，在糖尿病患者的疾病延续期间已引起了慢性并发症特别是血管疾病的问题。已知血管疾病可引起各种器官的疾病，因为前者出现在冠状动脉、大脑动脉和微脉管如视网膜和肾小球的微脉管中。糖尿病的慢性并发症的实例是肾病。尽管当糖尿病性肾病处于开始阶段时提出了许多因素，但一些病理因素表示了肾小球膜增厚和肾小球膜细胞增生。已作出假定，这种肾小球膜增厚最后破坏肾小球，结果引起末端肾衰竭。已知的是，由血管内皮细胞分泌的内皮素是来自受损害的脉管而进行大量释放的。基于的事实是，在肾小球膜细胞中，内皮素刺激了与细胞增生有关的各种反应，例如胸苷的摄入、 Na^+/H^+ 交换和c-fos表达，提出的可能性是，长期曝露于过量的内皮素中可产生开始的刺激，以便引起了肾小球膜细胞的增生，结果提出了在糖尿病性肾病中涉及到内皮素。在除肾病之外的并发症(如糖尿病性心肌病和糖尿病性视网膜病)中，由血管疾病引起的内皮素同样与病理状态的慢性结合有关。此外，因为经常在糖尿病中看到动脉硬化和高血脂，并同时具有某些内皮细胞的疾病，因此怀疑在这些病理状态中涉及内皮素。存在其他与内皮素有

关的疾病，特别是慢性疾病，这些疾病的开始和进展可以通过使用。用于在生命体中持续保持抗内皮素物质的本发明的治疗来预防。

当氨基酸用缩写表示时，使用由在Biochemical Nomenclature (European Journal of Biochemistry 138, 9-37, 1984) 上的 IUPAC-IUB Commission 所推荐的缩写，或使用本技术领域通常使用的缩写。当对于任何化合物存在旋光异构体时，指的是L- 异物体，除非另有说明。

在本发明中，抗内皮素物质可通过下述物质来举例说明，抗内皮素的抗体、抗内皮素受体的抗体、由可溶性内皮素受体表示的高分子物质、由化学合成或发酵得到的内皮素拮抗剂和抑制内皮素产生的物质(内皮素转化酶抑制剂)。

本发明的抗内皮素物质抑制内皮素结合到它的受体上。例如，抗内皮素物质抑制内皮素-1 结合到由猪主动脉平滑肌的匀浆制备的膜的部分上。据报道至少有两种子型内皮素受体，它们分别称为ET-A和ET-B。本发明的抗内皮素物质抗这两种受体中的一种或两种。

在切除内皮素的细胞的猪冠状动脉的螺旋形样品、切除豚鼠气管肌的样品或切除猪大脑基础动脉的样品中，本发明的抗内皮素物质抑制由内皮素-1的施用而诱发的血管或肌肉的收缩，对抗在切除的鼠心脏中由内皮素引起的灌注压力的增加，并改善了在小鼠接受内毒素方面的死亡率。

本发明的抗内皮素物质可以是水溶性的或油溶性的。本发明的水溶解度最好辛醇/水之比不大于0.1，本发明的油溶解度最好

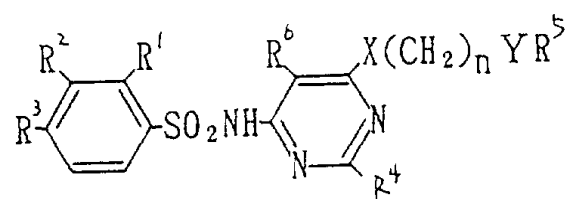
辛醇/水之比大于0.1。此外，抗内皮素物质可以不小于10mg/ml和不大于100mg/ml的浓度溶于极性溶剂如乙腈、二氯甲烷和氯仿中。它也可以是几乎不溶于乙腈、二氯甲烷和氯仿中。

在本发明中，抗内皮素物质最好是内皮素拮抗剂，作为实例的有非肽化合物、由化学合成或发酵得到的肽和其衍生物、肽和其衍生物。这里，肽可以是链状或环状的肽，或环状和链状的肽。

非肽化合物的实例包括在欧洲专利公开号510526和526708以及Wo93/08799中所述的非肽。

(1) EPA-510526

由下式代表的化合物或其盐



式中：

R¹是氢原子、低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、卤原子或三氟甲基；

R²是氢原子、卤原子、低级烷氧基、羟基低级烷氧基或三氟甲基；

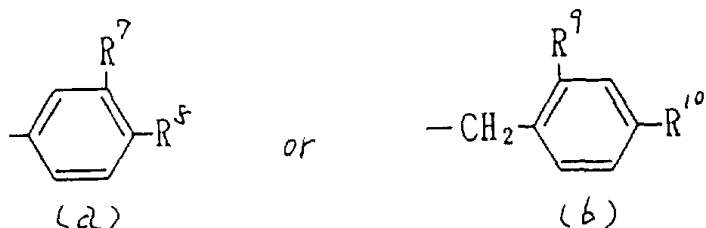
R³是氢原子、羟基、卤原子、烷硫基、环烷基、羟基低级烷基、羟基低级烷氧基、肟基低级烷基低级链烯基、氧代低级烷基、三氟甲基、三氟甲氧基、低级烷氧基、低级烷氧基低级烷氧基、芳基低级烷氧基；

R^2 和 R^3 一起形成丁间二烯基;

R^4 是氢原子、低级烷基、芳基或杂芳基;

R^5 是氢原子、低级烷基、苯甲酰基、杂环基羰基或四氢吡喃-2-基;

R^6 由下式(a)或(b)代表



R^7 是氢原子、低级烷基或硝基, 和 R^8 代表氢原子、卤原子、低级烷基、低级烷氧基、低级烷基硫基、硝基、羟基、氨基或三氟甲基;

R^7 和 R^8 一起形成丁间二烯基;

R^9 是氢原子、卤原子、低级烷基、低级烷氧基、低级烷基硫基或三氟甲基;

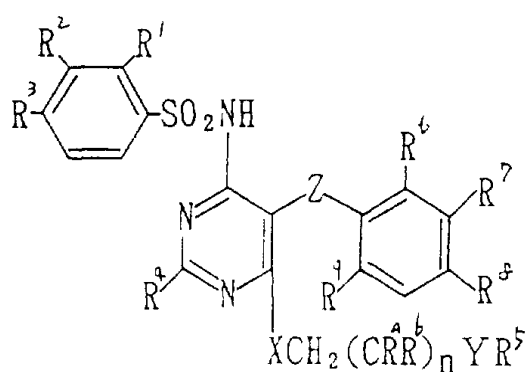
R^{10} 是氢原子、卤原子、低级烷基、低级烷氧基或低级烷基硫基;

X和Y各自为O、S或NH;

n为2、3或4;

(2) EPA-526708

由下式代表的化合物或其盐



式中：

R^1 是氢原子、低级烷氧基、低级烷硫基、卤原子或三氟甲基；

R^2 是氢原子、卤原子、低级烷氧基、三氟甲基或 $-OCH_2COOR^a$ ；

R^3 是氢原子、卤原子、低级烷基、低级烷硫基、环烷基、低级烷氧基或三氟甲基；

R^2 和 R^3 一起形成丁间二烯基、亚甲二氧基、亚乙二氧基或异亚丙二氧基；

R^4 是氢原子、低级烷基、环烷基、三氟甲基、低级烷氧基、低级烷硫基、低级烷硫基低级烷基、羟基低级烷基、羟基低级烷氧基、低级烷氧基低级烷基、羟基低级烷氧基低级烷基、羟基低级烷氧基低级烷氧基、低级烷基亚磺酰基、低级烷基磺酰基、2-甲氧基-3-羟基丙氧基、2-羟基-3-苯基丙基、氨基低级烷基、低级烷基氨基低级烷基、二低级烷基氨基低级烷基、氨基、低级烷基氨基、二低级烷基氨基、芳氨基、芳基、芳硫基、芳氧基、芳基低级烷基或杂环基；

R^5 是氢原子、低级烷基、低级烷酰基、苯甲酰基、杂环基羰基、杂环基甲基或四氢吡喃-2-基；

R^6-R^9 是氢原子、卤原子、三氟甲基、低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、羟基、羟甲基、氰基、羧基、甲酰基、甲基亚磺酰基、甲基磺酰基、甲基磺酰基氧基、低级烷氧基羰氧基；

R^7 与 R^6 或 R^8 一起形成丁间二烯基、亚甲二氧基、亚乙二氧基或异亚丙二氧基；

Z为 $-O-$ 、 $-S-$ 、亚乙基、1,2-亚乙烯基、 $-CO-$ 、 $-OCHR^{10}-$ 或 $-SCHR^{10}-$ ；

R^{10} 是氢原子或低级烷基；

X和Y各自为O、S或NH；

YR^5 是低级烷基亚磺酰基或 $-OCH_2CH(OR^c)CH_2R^d$ ；

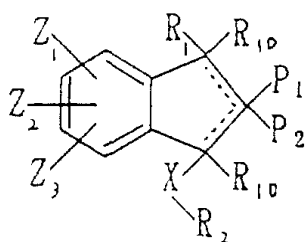
R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 是氢原子或低级烷基；

R^c 和 R^d 一起形成亚甲基、亚乙基或异亚丙基；

n为1、2或3。

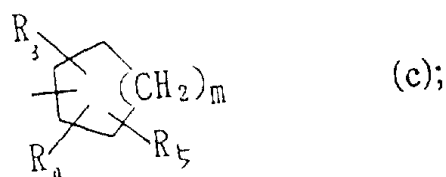
(3) WO 93/08799

下式化合物或其药物上可接受的盐



式中：

R_1 是 $X(CH_2)_nAr$ 或 $-X(CH_2)_nR_8$ 或下式(c)



R_2 是氢、Ar或(c)

P_1 是 $-X(CH_2)_nR_8$;

P_2 是 $-X(CH_2)_nR_8$ 或 $-XR_9Y$;

R_3 和 R_5 各自为氢、 R_{11} 、OH、 C_{1-8} 烷氧基、 $S(O)_qR_{11}$ 、 $N(R_6)_2$ 、Br、F、I、Cl、 CF_3 、 $NHCOR_6$ 、 $-XR_9-Y$ 或 $-X(CH_2)_nR_8$ ，其中 $-X(CH_2)_nR_8$ 的亚甲基可以被1个或多个 $(CH_2)_nAr$ 基所取代;

R_4 是氢、 R_{11} 、OH、 C_{1-5} 烷氧基、 $S(O)_qR_{11}$ 、 $N(R_6)_2$ 、 $-X(R_{11})$ 、Br、F、I、Cl或 $NHCOR_6$ ，其中 C_{1-5} 烷氧基可以被OH、甲氧基或卤素所取代;

R_6 各自为氢或 C_{1-4} 烷基;

R_7 各自为氢、 C_{1-6} 烷基或 $(CH_2)_nAr$;

R_8 是氢、 R_{11} 、 CO_2H 、 PO_3H_2 、 $P(O)(OH)R_7$ 或四唑;

R_9 是 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 链烯基或苯基，其中所用的基团可以被1个或多个OH、 $N(R_6)_2$ 、 $COOH$ 、卤素或 XC_{1-5} 烷基所取代;

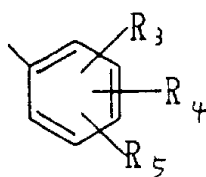
R_{10} 是 R_3 或 R_4 ;

R_{11} 是 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 链烯基、 C_{2-8} 炔基，其中所有的基团可以被1个或多个OH、 CH_2OH 、 $N(R_6)_2$ 或卤素所取代;

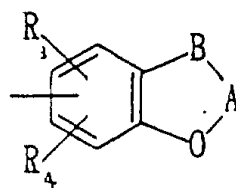
X是 $(CH_2)_n$ 、O、 NR_6 或 $S(O)_q$;

Y是 CH_3 或 $-\text{CH}_2\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{Ar}$;

Ar是



(a)



(b)

萘基、吲哚基、吡啶基或噻吩基、恶唑烷基、恶唑基、噻唑基、异噻唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、咪唑基、咪唑烷基、噻唑烷基、异恶唑基、恶二唑基、噻二唑基、吗啉基、哌啶基、哌嗪基、吡咯基或嘧啶基；其中所有的基团都可以被1个或多个 R_3 或 R_4 基所取代；

A是 $\text{C}=\text{O}$ 或 $[\text{C}(\text{R}_6)_2]_m$;

B是 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{O}-$;

Z_1 和 Z_2 各自为氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 链烯基、 C_{2-8} 炔基、 OH 、 C_{1-8} 烷氧基、 $\text{S}(\text{O})_q\text{C}_{1-8}$ 烷基、 $\text{N}(\text{R}_6)_2$ 、 Br 、 F 、 I 、 Cl 、 NHCOR_6 、 $-\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{R}_8$ 、苯基、苄基或 C_{3-6} 环烷基，其中 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 链烯基或 C_{2-8} 炔基可以被 COOH 、 OH 、 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_6)_2$ 或卤素任意取代；或 Z_1 和 Z_2 一起在邻接的碳上可以是 $-\text{O}-\text{A}-\text{O}-$;

Z_3 是 Z_1 或 XR_9Y ;

Q是0、1或2;

n是0至6的整数;

和虚线表示任意存在的双键;

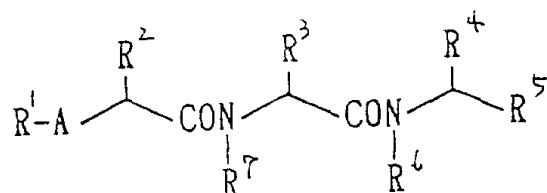
条件是,

- . 当X是S(O)_q时, R₂不是氢;
- . 当任意的双键存在时, 仅存在1个R₁。且不存在P₁;
- . 式I的化合物不是(1RS)-1, 3 - 二苯基茛-2-羧酸; (顺, 顺).-(1RS, 3SR)-1, 3 - 二苯基-1, 2-二氢化茛-2-羧酸; (1RS)-3-[3-甲基-1-苯基-(1H)-茛-2-烯-1-基]丙酸; 或(1RS)-2[1, 3 - 二苯基-(1H)-茛-2-烯-2-基]乙酸。

链状肽的实例包括在日本专利未审查公开号244097/1992、283600/1992和W093/10144中所述的肽。

(1) 日本专利未审公开号244097/1992

下式的肽或其药物上可接受的盐



式中:

R¹是氢或酰基,

R²是低级烷基、任意取代的芳(低级)烷基、环(低级)烷基(低级)烷基或任意取代的杂环(低级)烷基,

R³是任意取代的杂环(低级)烷基或任意取代的芳(低级)烷基,

R^4 是氢或任意取代的低级烷基,

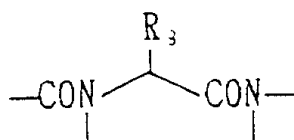
R^5 是羧基、被护羧基、羧基(低级)烷基或被护羧基(低级)烷基,

R^6 是氢或任意取代的低级烷基,

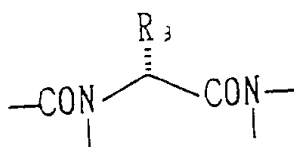
R^7 是氢或低级烷基, 和

A是 $-O-$ 、 $-NH-$ 、低级烷基亚氨基或低级亚烷基,

条件是, 当 R^2 是(S)-异丁基, R^3 是N-(二氯苄氧基羰基)吡啶-3-基甲基, R^4 是甲基, R^5 是甲氧基羰基, R^6 是氢, R^7 是氢和A是 $-NH-$ 时, 那么, 部分式:



具有绝对构型为



(2) 日本专利未审查公开号283600/1992

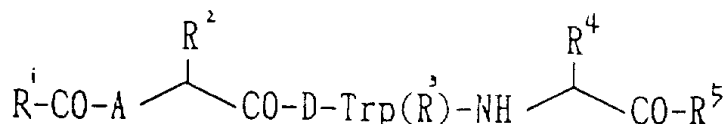
由下式代表的肽衍生物



式中 X_1 代表亮氨酸基、精氨酸基或谷氨酰胺基, X_2 代表异亮氨酸基或缬氨酸基, X_3 代表色氨酸基、酰氨基色氨酸基或D-荼基丙氨酸基, 和 R_1 代表残余的15氨基酸。

(3) W093/10144

下式的化合物或其药物上可接受的盐



式中:

R^3 是氢或低级烷基,

R^4 是吡啶基(低级)烷基; 和

R^1 是 C_3 - C_8 亚烷基氨基、N, N-二(低级)烷基氨基、N-低级烷基-N-芳基氨基、N-低级烷基-N- C_3 - C_8 环烷基氨基或 C_5 - C_{10} 侧环(bicyclic)亚烷基氨基,

R^2 是低级烷基,

R^5 是 C_3 - C_8 亚烷基氨基、N, N-二(低级)烷基氨基、吗啉代、硫代吗啉代、 N' , N' -二(低级)烷基胍基、吗啉代氨基、低级烷基哌嗪基氨基、低级烷氧基(低级)烷基氨基、吗啉代(低级)烷基氨基、 C_3 - C_8 亚烷基氨基(低级)烷基氨基, 这些基团都可以被氧代或吡啶基(低级)烷基氨基所取代, 和

A是低级亚烷基;

或

R^1 是哌啶-1-基、低级烷基哌啶-1-基、八氢吡啶-1-基、二氢吡啶-1-基、1, 2, 3, 4-四氢喹啉-1-基、N, N-二(低级)烷基氨基、N-低级烷基-N-芳基氨基、N-低级烷基-N- C_3 - C_8 环烷

基氨基或C₅-C₁₀侧环亚烷基氨基,

R²是低级烷基,

R⁵是氨基或低级烷基氨基, 和

A是低级亚烷基; 或

R¹是哌啶-1-基、八氢吡辛因-1-基、N, N-二(低级)烷基氨基或C₅-C₁₀侧环亚烷基氨基,

R²是低级烷基,

R⁵是氨基、低级烷基氨基、N, N-二(低级)烷基氨基、C₃-C₈亚烷基氨基或吗啉代, 和

A是-NH-; 或

R¹是六氢-1H-吡庚因-1-基,

R²是异丁基,

R⁵是乙氨基, 和

A是亚甲基; 或

R¹是N-[1-(二甲基氨基甲酰基)-2,2-二甲基丙基]氨基,

R²是异丁基,

R⁵是氨基, 和

A是-NH-; 或

R¹是N, N-二(低级)烷基氨基、1, 2, 3, 4-四氢喹啉-1-基、N-低级烷基-N-芳基氨基或N-低级烷基-N-C₃-C₈环烷基氨基,

R²是低级烷基,

R⁵是羟基或CO-R⁵是被护羧基, 和

A是低级亚烷基; 或

R¹是C₅-C₁₀侧环亚烷基氨基,

R^2 是低级烷基,

R^5 是羟基或 $\text{CO}-R^5$ 是被护羧基, 和

A是低级亚烷基或 $-\text{NH}-$; 或

R^1 是N-乙基-N-(1-乙丙基)氨基、N-乙基-N-异丙基氨基、
N-乙基-N-新戊基氨基或N-(1-乙丙基)-N-丙氨基,

R^2 是异丁基,

R^5 是羟基或 $\text{CO}-R^5$ 是被护羧基, 和

A是 $-\text{NH}-$; 或

R^1 是哌啶-1-基,

R^2 是异丁基,

R^5 是羟基或 $\text{CO}-R^5$ 是被护羧基, 和

A是亚甲基; 或

R^1 是六氢-1H-吡啶因-1-基,

R^2 是丙基,

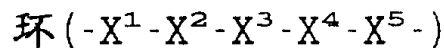
R^5 是羟基或 $\text{CO}-R^5$ 是被护羧基, 和

A是 $-\text{NH}-$;

环状肽的实例包括在日本专利未审查公开号261198/1992中所
述的肽。

日本专利未审查公开号261198/1992

下式的环状五肽或其药物上可接受的盐:



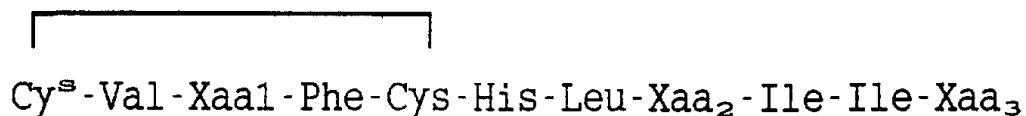
式中 X^1-X^5 代表氨基酸基, 其分别是, X^1 是D-Phe、D-Tyr、D-
-Tha、D-Tza、D-Nal、D-Bta、D-Trp、D-Trp(O)、D-Trp
(CHO)或D-Trp(CH_2) mCOR^1 , 其中m为0至6, 和 R^1 是羟基、 C_1-C_6 烷

氧基、氨基或 C_1 - C_6 单烷基氨基，条件是，当 $m=0$ 时， R^1 不是羟基； X^2 是D-Asp、D-Glu或D-Cys(O_3H)； X^3 是Pro、Hyp、Pip、Thz、 β -Ala、Gly、Ala、2-Aba、Aib、Val、Nva、Leu、Ile、Aile、Nle、Met、Met(O)、Met(O_2)、Phe、Tza、Tha、Tyr、Trp、His、Arg、Lys、Lys(CHO)、Orn、Orn(O)、Asn、Gln、Asp、Glu、Sys(O_3H)、Sys、Ser或Thr，其中在 α -氨基上具有氢原子的这些 α -氨基酸被 C_1 - C_6 烷基或 C_3 - C_7 环烷基任意取代，并任意具有选自咪唑基、羧基、磺基和羟基的基团； X^4 是D-Ala、D-Thr、D- α -Aba、D-Val、D-Nva、D-Leu、D-Ile、D-aIle、D-Nle、D-叔-Leu、D-Cpg、D-Chg、D-Dpg、D-Pen、Aib、 Ac_3C 、 Ac_4C 、 Ac_5C 、 Ac_6C 、 Ac_7C 、D-Phg、D-Thg、D-Fug、D-Tzg或D-Itg，其中在 α -位上具有氢原子的这些 α -氨基酸被 C_1 - C_3 烷基任意取代； X^5 是Pro、Pip、Thz、His、Ala、 α -Aba、Val、Nva、Leu、Ile、aIle、Nle、Met、 C_3al 、 C_4al 、 C_5al 或 C_{6a1} ，其中在 α -氨基上具有氢原子的这些氨基酸被 C_1 - C_6 烷基任意取代。

含有环状和链状肽的化合物的实例包括在日本专利未审查公开号288099/1992中所述的肽。

日本专利未审查公开号 288099/1992

由下式代表的肽：



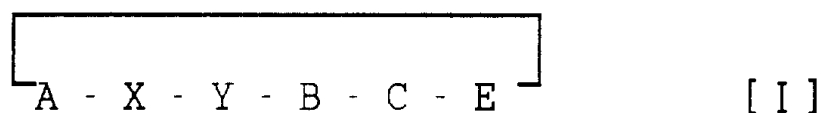
式中Xaa₁代表Tyr、Phe或Ala, Xaa₂代表Asp或Gly, Xaa₃代表Trp或Phe。

上述的内皮素拮抗剂包括由微生物产生的那些内皮素拮抗剂。
如

Cochinmicins, cyclodepsipeptide [The Journal of Antibiotics, Vol. 45, No. 11, 1709-1722 (1992)]。

抗受体ET-A和ET-B的内皮素拮抗剂的实例包括在欧洲专利公开号528312和日本专利公开号278722/1993中所述的环状肽。

更具体地说, 本发明的抗内皮素物质最好是由下列通式代表的肽:



式中X和Y独自代表 α -氨基酸基; A代表D-酸性- α -氨基酸基; B代表中性- α -氨基酸基; C代表L- α -氨基酸基; E代表具有芳环基的D- α -氨基酸基。

对于通式[I]来说, 由X或Y代表的 α -氨基酸基的母体氨基酸可以是任何氨基酸, 只要它是 α -氨基酸即可。这类氨基酸包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、2-氨基丙二酸、2-氨基己二酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、硫代脯氨酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、2-哌啶酸(哌啶-2-羧酸)、二氢吡啶-2-羧酸、四氢异喹啉-3-羧酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、5-甲基色氨酸。

酸、酪氨酸、缬氨酸、别异亮氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、叔亮氨酸、 γ -甲基亮氨酸、苯基甘氨酸、2-氨基丁酸、磺基丙氨酸、高磺基丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-噻吩基甘氨酸、3-噻吩基甘氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-联苯基丙氨酸、五甲基苯基丙氨酸、1-氨基环丙烷-1-羧酸、1-氨基环丁烷-1-羧酸、1-氨基环戊烷-1-羧酸、1-氨基环己烷-1-羧酸和1-氨基环庚烷-1-羧酸。当这些 α -氨基酸具有官能团(例如羟基、巯基、氨基、亚氨基和羧基)时, 所说的官能团可以被适合的取代基所取代。

被取代的羟基包括 C_{1-6} 烷酰氧基(如甲酰氧基、乙酰氧基和丙酰氧基)、 C_{4-9} 脂环羧氧基(如环戊烷羧氧基和环己烷羧氧基)、 C_{7-15} 芳基羧氧基(如苯甲酰氧基和4-甲基苯甲酰氧基)、 C_{8-16} 芳烷基羧氧基(如苯基乙酰氧基、2-苯基丙酰氧基、3-苯基丙酰氧基和联苯基乙酰氧基)、芳族杂环烷基羧氧基(如吡啶-2-基乙酰氧基和吡啶-3-基乙酰氧基)、 C_{1-6} 烷氧基(如甲氧基、乙氧基、正丙氧基和叔丁氧基)、 C_{3-8} 环烷氧基(如环戊氧基和环己氧基)、 C_{6-12} 芳氧基(如苯氧基和4-甲基苯氧基)和 C_{7-15} 芳烷氧基(如苄氧基、苯乙氧基和二苯甲氧基)。其中羟基被取代的 α -氨基酸包括O-乙酰基丝氨酸、O-乙酰基苏氨酸、4-乙酰氧基脯氨酸、O-苯甲酰基丝氨酸、O-苯甲酰基苏氨酸、4-苯甲酰氧基脯氨酸、O-苯基乙酰基丝氨酸、O-苯基乙酰基苏氨酸、4-苯基乙酰氧基脯氨酸、O-乙基丝氨酸、O-乙基苏氨酸、4-乙氧基脯氨酸、O-环己基丝氨酸、O-环己基苏氨酸、4-环己氧基脯氨酸、O-苯基丝氨酸、O-苯基苏氨酸、4-苯氧基脯氨酸、O-苄基丝氨酸、O-

苄基苏氨酸、4-苄氧基脯氨酸、O-二苄基甲基丝氨酸、O-二苄基甲基苏氨酸和4-二苄基甲氧基脯氨酸。

被取代的巯基包括C₁₋₆烷酰巯基(如甲酰巯基、乙酰巯基和丙酰巯基)、C₄₋₉脂环羧巯基(如环戊烷羧巯基和环己烷羧巯基)、C₇₋₁₅芳基羧巯基(如苯甲酰巯基和4-甲基苯甲酰巯基)、C₈₋₁₆芳烷基羧巯基(如苯乙酰巯基、2-苄基丙酰巯基、3-苄基丙酰巯基和二苄基乙酰巯基)、C₁₋₆烷巯基(如甲巯基、乙巯基、正丙巯基和叔丁巯基)、C₃₋₈环烷巯基(如环戊巯基和环己巯基)、C₆₋₁₂芳巯基(如苯巯基和4-甲基苯巯基)和C₇₋₁₅芳烷巯基(如苄巯基、苄乙巯基和二苄基甲巯基)。其中巯基被取代的 α -氨基酸包括S-乙酰基半胱氨酸、S-苯甲酰基半胱氨酸、S-苄基乙酰基半胱氨酸、S-乙基半胱氨酸、S-环己基半胱氨酸、S-苄基半胱氨酸和S-苄基半胱氨酸。

被取代的氨基包括C₁₋₆烷基氨基(如N-甲基氨基、N-乙基氨基和N-叔丁基氨基)、C₃₋₈环烷基氨基(如N-环戊基氨基和N-环己基氨基)、C₆₋₁₂芳氨基(如N-苯氨基和N-{4-甲基苯基}氨基)、C₇₋₁₅芳烷基氨基(如N-苄氨基、N-苄乙基氨基、N-{2-氯苄基}氨基、N-{3-氯苄基}氨基、N-{4-氯苄基}氨基、N-{2-甲苄基}氨基、N-{3-甲苄基}氨基、N-{4-甲苄基}氨基、N-{2-甲氧基苄基}氨基、N-{3-甲氧基苄基}氨基和N-{4-甲氧基苄基}氨基)、芳族杂环C₁₋₆烷基氨基(如2-咪唑基甲氨基、3-咪唑基甲氨基、2-噻吩基甲氨基、3-噻吩基甲氨基、吡啶-2-基甲氨基和吡啶-3-基甲氨基)和C₁₋₆脂族酰氨基(如甲酰氨基、乙酰氨基和丙酰氨基)、C₄₋₉脂环酰氨基(如环戊烷甲酰氨基和环己烷甲酰氨基)、C₇₋₁₅芳酰

氨基(如苯甲酰氨基和4-甲基苯甲酰氨基)、 C_{8-16} 芳烷基酰氨基(如苯基乙酰氨基、2-苯基丙酰氨基、3-苯基丙酰氨基、二苯基乙酰氨基、1-萘基乙酰氨基和2-萘基乙酰氨基)、芳族杂环酰氨基(如吡啶-2-基酰氨基和吡啶-3-基酰氨基)、芳族杂环烷基酰氨基(如吡啶-2-基乙酰氨基和吡啶-3-基乙酰氨基)和磺酰氨基(如苯磺酰氨基、对甲苯磺酰氨基和4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰氨基)。在被取代的亚氨基或酰亚氨基中的取代基与在每种被取代的氨基或酰氨基中的取代基相同。其中氨基被取代的 α -氨基酸包括N-甲基甘氨酸(肌氨酸)、N-乙基甘氨酸、N-甲基亮氨酸、N-乙基亮氨酸、N-甲苯基丙氨酸、N-乙苯基丙氨酸、N(α)-甲基色氨酸、N(α)-乙基色氨酸、N-环戊基甘氨酸、N-环己基甘氨酸、N-苯基甘氨酸、N-苯基亮氨酸、N-苄基甘氨酸、N-苄基亮氨酸、N(π)-苄基组氨酸、N(τ)-苄基组氨酸、N(π)-苯甲酰甲基组氨酸、N(π)-苄氧基甲基组氨酸、N^o-苯磺酰基精氨酸、N^o-对甲苯磺酰基精氨酸、N^o-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基)精氨酸、N(ϵ)-苯磺酰基赖氨酸、N(ϵ)-对甲苯磺酰基赖氨酸、N(ϵ)-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基)赖氨酸、Nⁱⁿ-甲基色氨酸、Nⁱⁿ-乙基色氨酸、Nⁱⁿ-甲酰基色氨酸、Nⁱⁿ-乙酰基色氨酸、N(ϵ)-苄基赖氨酸、N(ϵ)-({2-呋喃基甲基})赖氨酸、N(ϵ)-({2-噻吩基甲基})赖氨酸、N(ϵ)-({吡啶-3-基甲基})赖氨酸、N(ϵ)-苯乙酰基赖氨酸、N(ϵ)-({2-呋喃基}乙酰基)赖氨酸、N(ϵ)-({2-噻吩基}乙酰基)赖氨酸、N(ϵ)-({吡啶-3-基}乙酰基)赖氨酸、N(ϵ)-苯甲酰基赖氨酸、N(ϵ)-(3-苯基丙酰基)赖氨酸、N(δ)-苄基鸟氨酸、N(δ)-

2-呋喃基甲基)鸟氨酸、N(δ)-(2-噻吩基甲基)鸟氨酸、N(δ)-(吡啶-3-基甲基)鸟氨酸、N(δ)-苯甲酰基鸟氨酸、N(δ)-苯基乙酰基鸟氨酸、N(δ)-(3-苯基丙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({2-甲苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({3-甲苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({4-甲苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({2-氯苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({3-氯苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({4-氯苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({2-甲氧基苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({3-甲氧基苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-({4-甲氧基苯基}乙酰基)鸟氨酸、N(δ)-4-联苯基乙酰基)鸟氨酸、N(γ)-苄基-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-(2-呋喃基甲基)-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-(2-噻吩基甲基)-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-(吡啶-3-基甲基)-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-苯甲酰基-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-苯乙酰基-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-3-苯基丙酰基)-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-(2-呋喃基乙酰基)-2,4-二氨基丁酸、N(γ)-(2-噻吩基乙酰基)-2,4-二氨基丁酸和N(γ)-({吡啶-3-基}乙酰基)-2,4-二氨基丁酸。

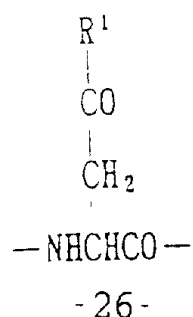
被取代的羧基包括氨基甲酰基($-\text{CONH}_2$)和取代的氨基甲酰基如N-C₁₋₆烷基氨基甲酰基(如甲基氨基甲酰基、乙基氨基甲酰基、正丙基氨基甲酰基和叔丁基氨基甲酰基)、C₃₋₈环烷基氨基甲酰基(如环戊基氨基甲酰基和环己基氨基甲酰基)、C₆₋₁₂芳基氨基甲酰基(如苯基氨基甲酰基和4-甲基苯基氨基甲酰基)、C₇₋₁₅芳烷基氨基甲酰基(如苄基氨基甲酰基、苯乙基氨基甲酰基和1,2-二苯基乙基氨基甲酰基)、芳族杂环C₁₋₆烷基氨基甲酰基(如2-{吡啶-2-基}乙基氨基甲酰基和2-{吡啶-3-基}乙基氨基甲酰基)、

哌啶羧基、哌嗪羧基、 N^4 - C_{1-6} 烷基哌嗪羧基(如 N^4 -甲基哌嗪羧基和 N^4 -乙基哌嗪羧基)、 N^4 - C_{3-8} 环烷基哌嗪羧基(如 N^4 -环戊基哌嗪羧基和 N^4 -环己基哌嗪羧基)、 N^4 -5-7元杂环哌嗪羧基(如 N^4 -吡啶基哌嗪羧基、 N^4 -呋喃基哌嗪羧基和 N^4 -噻吩基哌嗪羧基)、 N^4 - C_{6-12} 芳基哌嗪羧基(如 N^4 -苯基哌嗪羧基和 N^4 -{4-甲基苯基}哌嗪羧基)、 N^4 - C_{7-15} 芳烷基哌嗪羧基(如 N^4 -苄基哌嗪羧基、 N^4 -苯乙基哌嗪羧基和 N^4 -{1,2-二苯基乙基}哌嗪羧基)、 N^4 -{芳族杂环基 C_{1-6} 烷基}哌嗪羧基(如 N^4 -[2-{咪唑-2-基}乙基]哌嗪羧基和 N^4 -[2-{咪唑-3-基}乙基]哌嗪羧基)、 N^4 - C_{1-6} 脂族酰基哌嗪羧基(如 N^4 -乙酰基哌嗪羧基和 N^4 -丙酰基哌嗪羧基)、 N^4 - C_{4-9} 脂环酰基哌嗪羧基(如 N^4 -环戊基羧基哌嗪羧基和 N^4 -环己基羧基哌嗪羧基)、 N^4 - C_{7-15} 芳酰基哌嗪羧基(如 N^4 -苯甲酰基哌嗪羧基和 N^4 -{4-甲基苯甲酰基}哌嗪羧基)、 N^4 - C_{8-16} 芳烷酰基哌嗪羧基(如 N^4 -苯乙酰基哌嗪羧基、 N^4 -{2-苯丙酰基}哌嗪羧基、 N^4 -{3-苯丙酰基}哌嗪羧基、 N^4 -二苯基乙酰基哌嗪羧基、 N^4 -{1-萘基乙酰基}哌嗪羧基和 N^4 -{2-萘基乙酰基}哌嗪羧基)、 N^4 -{芳族杂环羧基}哌嗪羧基(如 N^4 -{咪唑-2-基羧基}哌嗪羧基和 N^4 -{咪唑-3-基羧基}哌嗪羧基)和 N^4 -{芳族杂环烷基羧基}哌嗪羧基(如 N^4 -{咪唑-2-基乙酰基}哌嗪羧基和 N^4 -{咪唑-3-基乙酰基}哌嗪羧基)和 C_{1-6} 烷氧基羧基(如甲氧基羧基、乙氧基羧基和正丙氧基羧基)、 C_{3-8} 环烷氧基羧基(如环戊氧基羧基和环己氧基羧基)和 C_{7-15} 芳烷氧基羧基(如苄氧基羧基、苯乙氧基羧基、1-苯基乙氧基羧基和二苯基甲氧基羧基)。上述取代的氨基甲酰基包括具有 α -氨基酸的酰胺和具有低聚肽(如二肽、三肽和四肽)的酰胺。其中羧基被取代

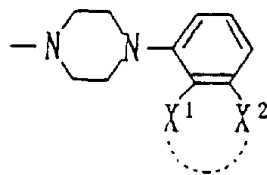
的 α -氨基酸包括 N^4 -甲基天冬酰胺、 N^4 -苯基天冬酰胺、 N^4 -苄基天冬酰胺、 N^4 -苄乙基天冬酰胺、 N^4 -(2-{咪唑-3-基}乙基)天冬酰胺、 N^5 -甲基谷氨酰胺、 N^5 -苯基谷氨酰胺、 N^5 -苄基谷氨酰胺、 N^5 -苄乙基谷氨酰胺、 N^5 -(2-{咪唑-3-基}乙基)谷氨酰胺、天冬氨酸 β -甲基酯、天冬氨酸 β -环丙基酯、天冬氨酸 β -苄基酯、天冬氨酸 β -苄乙基酯、天冬氨酸 β - N^4 -苯基哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(2-甲苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(3-甲苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(4-甲苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(2-甲氧基苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(3-甲氧基苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(4-甲氧基苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(2-氯苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(3-氯苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(4-氯苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(4-硝基苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(4-氟苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(3-三氟甲基苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(2,3-二甲基苯基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(2-吡啶基)哌嗪酰胺、天冬氨酸 β - N^4 -(2-嘧啶基)哌嗪酰胺、谷氨酸 γ -甲基酯、谷氨酸 γ -环丙基酯、谷氨酸 γ -苄基酯和谷氨酸 γ -苄乙基酯。

对于通式(I)来说,由X或Y代表的 α -氨基酸基的母体 α -氨基酸可以是任何异构体,或者是D、L,或者是DL,而对于X和Y优选L-异构体。

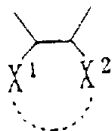
X最好代表-Asp(R^1), -Asp(R^1)代表



式中 R^1 代表由下式代表的基团：



式中 X^1 和 X^2 各自代表氢原子、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤原子或硝基，并且 X^1 和 X^2 可一起结合形成环

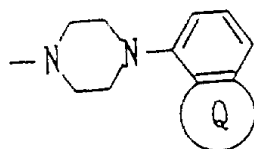


由 X^1 和 X^2 代表的 C_{1-6} 烷基的实例为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基和正己基，其中 C_{1-3} 烷基如甲基、乙基、正丙基和异丙基是优选的，最优选的是甲基。

由 X^1 和 X^2 代表的 C_{1-6} 烷氧基的实例为甲氧基、乙氧基、正丙氧基、正丁氧基、正戊氧基和正己氧基，其中 C_{1-3} 烷氧基如甲氧基、乙氧基和正丙氧基是优选的，最优选的是甲氧基或乙氧基。

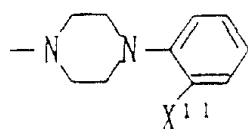
由 X^1 和 X^2 代表的卤原子的实例是氟、氯、溴和碘，其中氯是优选的。

在 X^1 和 X^2 一起结合形成环的 R^1 的实例是由下式代表的。



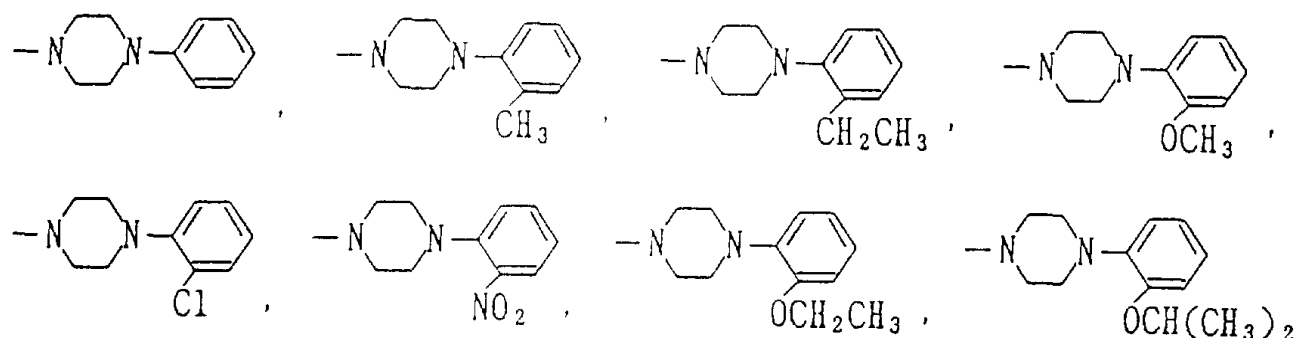
Q环的实例是可含有选自O、N或S的1至3个杂原子的4至7元环(如饱和碳环、芳族碳环、饱和杂环和芳族杂环)。

R^1 最好由下式代表:



式中 X^{11} 代表氢原子、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤原子或硝基。

R^1 优选的实例是



上述-Asp(R^1)可以是任何异构体, 或者是D、L, 或者是DL, 而优选L-异构体。

对于通式(I)而言, 由A代表的D-酸性- α -氨基酸基的母体氨基酸是通过在其侧链上具有酸性基团如羧基、磺基或四唑基的氨基酸来举例说明的, 所说的氨基酸包括D-谷氨酸、D-天冬氨酸、

D-磺基丙氨酸、D-高磺基丙氨酸、D- β -(5-四唑基)丙氨酸和D-2-氨基-4-(5-四唑基)丁酸, 而优选D-谷氨酸、D-天冬氨酸和D-磺基丙氨酸。

对于通式[I]来说, 由B代表的中性- α -氨基酸基的母体氨基酸可通过 α -氨基酸来举例说明, 例如这些 α -氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、别异亮氨酸、正亮氨酸、叔亮氨酸、 γ 甲基亮氨酸、苯基甘氨酸、苯基丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、2-哌啶酸(哌啶-2-羧酸)、2-噻吩基丙氨酸、2-噻吩基甘氨酸、3-噻吩基甘氨酸、1-氨基环丙烷-1-羧酸、1-氨基环丁烷-1-羧酸、1-氨基环戊烷-1-羧酸、1-氨基环己烷-1-羧酸、1-氨基环庚烷-1-羧酸、2-环戊基甘氨酸和2-环己基甘氨酸。如果中性- α -氨基酸包括L-和D-构型, 那么D-构型是优选的。更优选的是D-亮氨酸、D-别异亮氨酸、D-叔亮氨酸、D- γ 甲基亮氨酸、D-苯基甘氨酸、D-2-噻吩基丙氨酸、D-2-噻吩基甘氨酸、D-3-噻吩基甘氨酸和D-2-环戊基甘氨酸。这些中性- α -氨基酸的 α -氨基可被 C_{1-6} 烷基(如甲基、乙基、正丙基或叔丁基)所取代。这类 α -氨基酸包括N-甲基亮氨酸、N-甲基别异亮氨酸、N-甲基叔亮氨酸、N-甲基 γ 甲基亮氨酸和N-甲基苯基甘氨酸, 优选D-构型。

β 最好代表 $-\text{NH}-\text{CHR}^2-\text{CO}-$, 式中 R^2 代表 C_{1-6} 烷基、 C_{3-7} 环烷基、 C_{3-7} 环烷基 C_{1-3} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-3} 烷基、 C_{3-7} 环烷硫基 C_{1-3} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-3} 烷基、 C_{3-7} 环烷氧基- C_{1-3} 烷基、 C_{1-6} 烷硫基、 C_{3-7} 环烷硫基、 C_{1-6} 烷氧基或 C_{3-7} 环烷氧基。

由 R^2 代表的 C_{1-6} 烷基的实例是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、(1-甲基)丙基、叔丁基、正戊基、(2-甲基)丁基、(3-甲基)丁基、新戊基、正己基、(2, 2-二

甲基) 丁基和(3,3- 二甲基) 丁基, 其中优选的是 C_{4-6} 烷基如正丁基、 异丁基、 (1-甲基)丙基、 叔丁基、 正戊基、 (2-甲基)丁基、 (3-甲基)丁基、 新戊基和正己基。

由 R^2 代表的 C_{3-7} 环烷基的实例是环丙基、 环丁基、 环戊基、 环己基和环庚基, 其中优选的是 C_{5-7} 环烷基如环戊基、 环己基和环庚基。

由 R^2 代表的 C_{3-7} 环烷基 C_{1-3} 烷基的实例是环丙基甲基、 环丁基甲基、 环丁基乙基、 环丁基丙基、 环戊基甲基、 环戊基乙基、 环戊基丙基、 环己基甲基、 环己基乙基、 环己基丙基、 环庚基甲基和环庚基乙基, 其中优选的是 C_{3-7} 环烷基甲基如环丙基甲基、 环丁基甲基、 环戊基甲基、 环己基甲基和环庚基甲基。

由 R^2 代表的 C_{1-6} 烷硫基 C_{1-3} 烷基的实例是甲硫基甲基、 甲硫基乙基、 甲硫基丙基、 乙硫基甲基、 乙硫基乙基、 正丙硫基丙基、 异丙硫基甲基、 正丁硫基甲基、 叔丁硫基甲基、 正丁硫基乙基、 叔丁硫基丙基和(1, 1 - 二甲基)丙硫基甲基, 其中优选的是 C_{3-7} 烷硫基甲基如异丙硫基甲基、 正丁硫基甲基、 叔丁硫基甲基和(1, 1 - 二甲基)丙硫基甲基。

由 R^2 代表的 C_{3-7} 环烷硫基 C_{1-3} 烷基的实例是环丙硫基甲基、 环丙硫基乙基、 环丙硫基丙基、 环丁硫基甲基、 环丁硫基乙基、 环丁硫基丙基、 环戊硫基甲基、 环戊硫基乙基、 环己硫基甲基和环庚硫基甲基, 其中优选的是 C_{4-7} 环烷硫基甲基如环丁硫基甲基、 环戊硫基甲基、 环己硫基甲基和环庚硫基甲基。

由 R^2 代表的 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-3} 烷基的实例是甲氧基甲基、 甲氧基乙基、 甲氧基丙基、 乙氧基甲基、 乙氧基乙基、 正丙氧基甲基、

正丙氧基乙基、 异丙氧基甲基、 异丙氧基乙基、 正丁氧基甲基、 正丁氧基乙基、 叔丁氧基甲基、 叔丁氧基乙基、 正戊氧基甲基、 正戊氧基乙基、 (1, 1- 二甲基)丙氧基甲基、 (1, 1- 二甲基)丙氧基乙基、 正己氧基甲基和正己氧基乙基, 其中优选的是 C_{1-6} 烷氧基甲基如甲氧基甲基、 乙氧基甲基、 正丙氧基甲基、 异丙氧基甲基、 正丁氧基甲基、 叔丁氧基甲基、 正戊氧基甲基、 (1, 1-二甲基)丙氧基甲基和正己氧基甲基, 更优选的是异丙氧基甲基、 叔丁氧基甲基、 (1, 1 - 二甲基) 丙氧基甲基和正己氧基甲基。

由 R^2 代表的 C_{3-7} 环烷氧基 C_{1-3} 烷基的实例是环丙氧基甲基、 环丙氧基乙基、 环丁氧基甲基、 环丁氧基乙基、 环戊氧基甲基、 环戊氧基乙基、 环己氧基甲基和环庚氧基甲基, 其中优选 的是 C_{3-7} 环烷氧基甲基如环丙氧基甲基、 环丁氧基甲基、 环戊氧基甲基、 环己氧基甲基和环庚氧基甲基。

由 R^2 代表的 C_{1-6} 烷硫基的实例是甲硫基、 乙硫基、 正丙硫基、 异丙硫基、 正丁硫基、 叔丁硫基、 正戊硫基、 (1, 1- 二甲基)丙硫基和正己硫基, 其中优选的是 C_{3-6} 烷硫基如正丙硫基、 异丙硫基、 正丁硫基、 叔丁硫基、 正戊硫基、 (1, 1- 二甲基)丙硫基和正己硫基。

由 R^2 代表的 C_{3-7} 环烷硫基的实例是环丙硫基、 环丁硫基、 环戊硫基、 环己硫基和环庚硫基, 其中优选的是 C_{4-7} 环烷硫基如环丁硫基、 环戊硫基、 环己硫基和环庚硫基。

由 R^2 代表的 C_{1-6} 烷氧基的实例是甲氧基、 乙氧基、 正丙氧基、 异丙氧基、 正丁氧基、 叔丁氧基、 正戊氧基、 (1, 1- 二甲

基)丙氧基和正己氧基, 其中优选的是 C_3-6 烷氧基如正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、(1, 1-二甲基)丙氧基和正己氧基。

由 R^2 代表的 C_3-7 环烷氧基的实例是环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基和环庚氧基, 其中优选的是 C_4-7 环烷氧基如环丁氧基、环戊氧基、环己氧基和环庚氧基。

R^2 优选的是 C_1-6 烷基, 更优选的是 C_4-6 烷基如正丁基、异丁基、(1-甲基)丙基、叔丁基、正戊基、(2-甲基)丁基、(3-甲基)丁基、新戊基和正己基, 而非常优选的是叔丁基和新戊基。

由 $-NH-CHR^2-CO-$ 代表的上述 α -氨基酸可以是任何异构物, 或者是D、L, 或者是DL, 而优选D-异构体。

对于通过[I]来说, 由C代表的L- α -氨基酸基的母体氨基酸可通过通常已知的L- α -氨基酸来举例说明, 例如这些通常已知的L- α -氨基酸是甘氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-正缬氨酸、

L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-叔亮氨酸、L-正亮氨酸、L-蛋氨酸、L-2-氨基丁酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-苯基丙氨酸、

L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酰胺、L-赖氨酸、L-色氨酸、L-精氨酸、L-酪氨酸和L-脯氨酸, 而优选的是L-亮氨酸、L-正亮氨酸和L-色氨酸。这些L- α -氨基酸的 α -氨基可被 C_1-6 烷基(如甲基、乙基、正丙基或叔丁基)所取代。

这类L- α -氨基酸包括L-N-甲基亮氨酸、L-N-甲基正亮氨酸和L-N(α)-甲基色氨酸。

对于通式(I)而言, 由E代表的具有芳环基的D- α -氨基酸基的母体氨基酸可通过在其侧链上具有芳环基的D- α -氨基酸来举例

说明。这类氨基酸的实例包括D-色氨酸、D-5-甲基色氨酸、D-苯基丙氨酸、D-苏氨酸、D-1-萘基丙氨酸、D-2-萘基丙氨酸、D-3-苯并噻吩基丙氨酸、D-4-联苯基丙氨酸和D-五甲基苯基丙氨酸，而优选的是D-色氨酸和D-5-甲基色氨酸。更优选的是D-色氨酸。具有芳环的这些D- α -氨基酸的 α -氨基可被C₁₋₆烷基（如甲基、乙基、正丙基或叔丁基）所取代。D-色氨酸的吲哚环的氨基可被烃基例如C₁₋₆烷基（如甲基、乙基、正丙基或叔丁基）、C₃₋₈环烷基（如环戊基或环己基）、C₃₋₈环烷基（如环戊基或环己基）、C₆₋₁₂芳基（如苯基或4-甲基苯基）或C₇₋₁₅芳烷基（如苄基或苯乙基）所取代，或可被酰基例如C₁₋₆脂肪酰基（如甲酰基、乙酰基或丙酰基）、C₄₋₉脂环酰基（如环戊烷羧基或环己烷羧基）、C₇₋₁₅芳酰基（如苯甲酰基或4-甲基苯甲酰基）、C₈₋₁₆芳烷酰基（如苯乙酰基、2-苯丙酰基、3-苯丙酰基或二苯乙酰基）或C₁₋₆烷氧基羰基（如甲氧基羰基或乙氧基羰基）所取代。这类 α -氨基酸包括D-N(α)-甲基色氨酸、D-N-甲苯基丙氨酸、D-N-甲基酪氨酸、D-N¹ⁿ-甲基色氨酸、D-N¹ⁿ-乙基色氨酸、D-N¹ⁿ-甲酰基色氨酸和D-N¹ⁿ-乙酰基色氨酸，优选的是D-N¹ⁿ-甲基色氨酸、D-N¹ⁿ-甲酰基色氨酸和D-N¹ⁿ-乙酰基色氨酸。

E最好代表Trp(N¹ⁿ-R³)，其中R³代表氢原子、C₁₋₆烷基、C₃₋₇环烷基、-COR⁴（R⁴代表氢原子、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₅芳基或C₆₋₁₅芳基C₁₋₃烷基）、-COOR⁵（R⁵代表C₁₋₆烷基、C₆₋₁₅芳基或C₆₋₁₅芳基C₁₋₃烷基）或-CONHR⁶（R⁶代表氢原子、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₅芳基或C₆₋₁₅芳基C₁₋₃烷基），并且R³直接与在色氨酸基中的吲哚基的N原子相结合。

由 R^3 代表的 C_{1-6} 烷基的实例是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、(1-甲基)丙基、叔丁基、正戊基、(2-甲基)丁基、(3-甲基)丁基、新戊基、正己基、(2, 2-二甲基)丁基和(3, 3-二甲基)丁基, 其中优选的是 C_{1-3} 烷基如甲基、乙基、正丙基和异丙基。

R^3 代表的 C_{3-7} 环烷基的实例是环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基, 其中优选的是 C_{5-7} 环烷基如环戊基、环己基和环庚基。

由 R^4 、 R^5 和 R^6 代表的 C_{1-6} 烷基的实例是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、(1-甲基)丙基、叔丁基、正戊基、(2-甲基)丁基、(3-甲基)丁基、新戊基、正己基、(2, 2-二甲基)丁基和(3, 3-二甲基)丁基, 其中优选的是 C_{1-3} 烷基如甲基、乙基、正丙基和异丙基。

由 R^4 、 R^5 和 R^6 代表的 C_{6-15} 芳基的实例是苯基、 α -萘基和 β -萘基, 其中优选的是苯基。

由 R^4 、 R^5 和 R^6 代表的 C_{6-15} 芳基 C_{1-3} 烷基的实例是苄基、苯乙基、苯丙基、 α -萘基甲基、 α -萘基乙基、 α -萘基丙基、 β -萘基甲基、 β -萘基乙基、 β -萘基丙基, 其中优选的是 C_{6-15} 芳基甲基如苄基、 α -萘基甲基和 β -萘基甲基。

$-COR^4$ 的具体实例可通过甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、异戊酰基、新戊酰基、正苄基羧基、苯甲酰基和苯乙酰基来举例说明。

$-COOR^5$ 的具体实例可通过甲氧基羧基、乙氧基羧基、苯氧基羧基和苄氧基羧基来举例说明。

-CONHR⁶的具体实例可通过氨基甲酰基、甲氧基羰基、乙氧基羰基、正丙氧基羰基、异丙氧基羰基、正丁氧基羰基、异丁氧基羰基、苯氧基羰基和苄氧基羰基来举例说明。

R³优选是氢原子和-COR⁴ (R⁴代表氢原子、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₅芳基或C₆₋₁₅芳基C₁₋₃烷基), 而更优选的是氢原子、甲酰基和乙酰基。

在由通式[I]或其盐代表的六肽中, 下述是优选的:

X是L-异构体; Y是L-异构体; A选自D-谷氨酸, D-天冬氨酸, D-磺基丙氨酸和D-四唑基丙氨酸残基; B为D-构型; B选自1-氨基环丙烷-1-羧酸, 1-氨基环丁烷-1-羧酸, 1-氨基环戊烷-1-羧酸, 1-氨基环己烷-1-羧酸和1-氨基环庚烷-1-羧酸; B选自D-亮氨酸, D-别异亮氨酸, D-叔亮氨酸, D-γ-甲基亮氨酸, D-苯基甘氨酸, D-2-噻吩基甘氨酸, D-3-噻吩基甘氨酸, D-2-环戊基甘氨酸, D-苯丙氨酸, D-2-噻吩基丙氨酸, D-缬氨酸, D-2-呋喃基甘氨酸和D-3-呋喃基甘氨酸残基; C选自L-亮氨酸, L-异亮氨酸, L-缬氨酸, L-正亮氨酸和具有芳基的L-α氨基酸残基; E选自D-色氨酸或其衍生物, D-1-萘基丙氨酸, D-2-萘基丙氨酸, D-苯并噻吩基丙氨酸, D-4-联苯基丙氨酸和D-五甲基苯丙氨酸残基; D-色氨酸衍生物选自D-N¹ⁿ-甲基色氨酸, D-N¹ⁿ-甲酰基色氨酸和D-N¹ⁿ-乙酰基色氨酸残基; 更优选的是下列化合物, A是D-天冬氨酸残基; X是色氨酸, L-(β-(4-苯基哌嗪酰氨基)天冬氨酸, L-(β-4-(2-甲氧基苯基)哌嗪酰氨基)天冬氨酸, L-N(δ)-苯乙酰基鸟氨酸(δ为上标, 以下同), L-(N⁴-[咪唑-3-基]乙酰基)鸟氨酸, L-(4-苄氧基)脯氨酸, L-(N⁵-苄基)谷氨酰胺或L-(N(δ)-[咪唑-3-基]乙基)天冬酰胺残基; Y是L-亮氨酸, L-天冬氨酸或L-O-苄

基色氨酸残基;B是D-亮氨酸,D- γ -甲基亮氨酸,D-2-噻吩基甘氨酸或D-3-噻吩基甘氨酸残基;C选自L-亮氨酸,L-苯丙氨酸和L-色氨酸残基;E是D-色氨酸残基。

本发明的抗内皮素物质优选为欧洲专利公开号528312 和日本专利申请号278722/1993中描述的肽[I]。

最优选的抗内皮素物质是下列肽:

(1) 环[-D-Asp-Asp(R1')-Asp-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-],

(2) 环[-D-Asp(OC₂H₅)-Asp(R1')-Asp(OC₂H₅)-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]

(3) 环[-D-Asp-Asp(B7)-Asp-D γ MeLeu-Leu-D-Trp-]

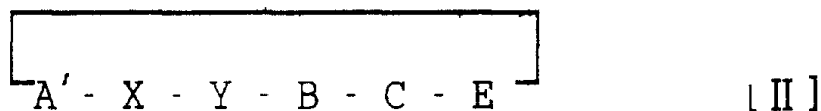
其中Asp代表天冬氨酸,Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺;Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸;Leu 代表亮氨酸;Trp 代表色氨酸;Asp(B7)代表天冬氨酸(β -4-(2-甲氧基苯基)哌嗪酰胺; γ MeLeu代表 γ -甲基亮氨酸。

上述抗内皮素物质特别是肽类可以盐形式,优选药理可接受的盐形式使用。这类盐可以是有机或无机盐。无机盐的实例包括与碱如碱金属(例如钠和钾)和多价金属如碱土金属(例如钙和镁)、锌、铜及铝形成的盐,以及与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸及磷酸)形成的盐。有机盐的实例包括与有机酸如羧酸(例如甲酸、乙酸、三氟乙酸和马来酸),有机磺酸(甲磺酸、苯磺酸和甲苯磺酸)和氨基酸(例如精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸)形成的盐,铵盐和与有机碱如叔胺(例如三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、二环己胺和N,N'-二苄基乙二胺)形成的盐。当抗内皮素物质具有酸性基团如羧基时,优选钠盐和与精氨酸的盐。当抗内皮素物质具有

碱性基团如氨基时,优选盐酸盐和乙酸盐。

上述盐可以是配合物形式。配合物的实例是与碱金属(例如钠和钾)及多价金属如碱土金属(例如钙和镁)、锌、铜和铝的配合物。优选的配合物是与多价金属如碱土金属(例如钙和镁)、锌、铜和铝的配合物,更优选的是锌配合物。

在肽[I]或其酯或其盐中,由下面通式表示的肽或其盐是新的,



其中A'代表被烷基酯化的D-酸性- α -氨基酸残基,其他符号具有与上面相同的意义。

在由A'所表示的被烷基酯化的D-酸性- α -氨基酸残基中,烷基的实例有甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基和正己基,其中优选C₁₋₃烷基如甲基,乙基,正丙基和异丙基。

肽[II]或其盐的制备是通过将肽[I]或其盐用烷基进行本身为已知的酯化反应。

当使用肽[II]或其盐制备持续释放制剂时,这样得到的持续释放制剂既能抑制药物的初始突然释放,又能使药物恒定释放。

由通式[I]所表示的肽的锌盐是新的。

肽[I]的锌盐的制备是通过将肽[I]或其水溶性盐(例如钠盐)与水溶性锌盐在水中混合。沉淀出的肽[I]的锌盐通过离心等方法来分离。将如此得到的沉淀分散于蒸馏水中并再离心。重复这些操作以得到纯化的肽[I]的锌盐。使纯化的肽[I]的锌盐经过干燥,如真空干燥和冷冻干燥。混合比(肽[I]/水溶性锌盐)(摩尔比)为

约10/1至1/10,优选约5/1至1/5。它们在水中的浓度是在各自的溶

解度范围之内并且不低于生成的配合物的溶解度。上述水溶性锌盐的实例有无机酸锌盐如卤化锌(例如,氯化锌、溴化锌、碘化锌、氟化锌),硫酸锌,硝酸锌和硫氰酸锌,和有机酸锌盐如脂族羧酸锌盐(例如,乙酸锌、羟基乙酸锌,乳酸锌,酒石酸锌)和芳族酸锌盐(例如,苯甲酸锌,水杨酸锌,苯酚硫酸锌)。水溶性锌盐优选脂族羧酸锌盐,更优选乙酸锌。

当使用肽[I]的锌盐制备持续释放制剂时,如此得到的持续释放制剂既能抑制药物的初始突然释放,又能保持药物的恒定释放。持续释放制剂具有高药物含量。

在本发明中,用于将抗内皮素物质持续保持在生物体内的方法的实例有:使用生物可降解聚合物的注射用持续释放制剂(例如,微胶囊和微球),和内存制剂(例如,针状制剂)。此外,电驱动泵或渗透压泵(Alzet等)可用来使给定量的抗内皮素物质持续释放。其他实例包括在某些部位的非侵害给药制剂,如皮肤(经皮制剂),粘膜(经鼻制剂,经阴道制剂等)和消化道(口服制剂、直肠栓剂等)。本文中提到的持续释放制剂可以是任何制剂,只要在单次给药后药物作用持续至少24小时,或者至少恒定有效的血液浓度持续至少24小时,优选的制剂是在单次给药后能够使药物作用或有效血液浓度持续至少72小时。尽管在短作用持续时间的口服制剂的情况下,有效血液浓度可以通过增加给药频率来持续,但增加给药频率对于病人很不方便,而且确定程度低。优选使用生物降解聚合物的微胶囊制剂,因为它们易于给药而且给药后作用持续时间长。加入微胶囊制剂中的抗内皮素物质优选为内皮素拮抗剂。尽管加入的内皮素拮

抗剂的量随着其活性,治疗疾病,作用持续时间及其他因素而变化,但相对于基体生物降解聚合物,内皮素拮抗剂的一般用量为约0.001至50%(W/W),优选约0.01至30%(W/W),更优选约0.1至20%(W/W)。

生物降解聚合物的实例包括脂族聚酯(例如,由一种或多种 α -羟基羧酸如羟基乙酸,乳酸和羟基丁酸,羟基二羧酸如羟基丁二酸,羟基三羧酸如柠檬酸等等所制备的聚合物,共聚物或其混合物),聚- α -氰基丙烯酸酯,聚氨基酸(例如,聚- γ -苄基-L-谷氨酸)以及马来酸酐共聚物(例如,苯乙烯-马来酸共聚物)。它们可以作为混合物使用。因此聚合的类型可以是无规、嵌段或接枝。

生物降解聚合物优选为脂族聚酯例如,由一种或多种 α -羟基羧酸如羟基乙酸,乳酸和羟基丁酸,羟基二羧酸如羟基丁二酸,羟基三羧酸如柠檬酸,等等产生的聚合物、共聚物或其混合物。

上述共聚物的实例包括羟基乙酸和其他 α -羟基酸的共聚物, α -羟基酸优选乳酸,2-羟基丁酸等,尽管 α -羟基羧酸可以是D-,L-或D,L-异构体,优选D-异构体/L-异构体的比例(mol%) 在约75/25至25/75的范围内。更优选 α -羟基羧酸为D-异构体/L-异构体的比例(mol%) 在约60/40至40/60范围内的羟基羧酸。

对于羟基乙酸和2-羟基丁酸的共聚物,优选羟基乙酸占约10至75%mol,2-羟基丁酸占其余部分。较优选羟基乙酸占约20至75%mol,更优选羟基乙酸占约30至70%mol。羟基乙酸共聚物的重均分子量为约2,000至50,000,优选约3,000至40,000,较优选约8,000至25,000。羟基乙酸共聚物的分散度(重均分子量/数均分子量) 优选为约1.2至4.0。较优选分散度为约1.5至3.5的共聚物。本发明的羟基乙酸共聚物可以通过已知方法制备, 如在日本专利未审公开号

28521/1986中描述的方法。 优选通过无催化剂脱水聚合缩合反应来制备该聚合物。

上述羟基乙酸共聚物可以与聚乳酸混合使用。 尽管聚乳酸可以是D-异构体,L-异构体或其混合物,优选D-异构体/L-异构体的比例(mol%) 在约75/25至20/80的范围内。较优选D-异构体/L-异构体的比例(mol%) 在约60/40至25/75范围内的聚乳酸;更优选 D- 异构体/L-异构体的比例(mol%) 在约55/45至25/75范围内的聚乳酸。优选聚乳酸的重均分子量约1,500至30,000。较优选重均分子量在约2,000至20,000范围内的聚乳酸,更优选重均分子量在约3,000至15,000范围内的聚乳酸。此外,聚乳酸的分散度优选为约1.2至4.0,较优选约1.5至3.5。

为了制备聚乳酸,已知两种方法: 乳酸的二聚体即丙交酯的开环聚合,和乳酸的脱水聚合缩合。为得到本发明的较低分子量的聚乳酸,优选乳酸的直接脱水聚合缩合。例如,该方法被描述于日本专利未审公开号28521/1986中。

本发明的羟基乙酸共聚物和聚乳酸的使用混合比例范围为约10/90至90/10(Wt%), 优选约20/80 至80/20,更优选约30/70 至70/30。

在羟基乙酸和乳酸的共聚物的情况下,含量比(乳酸/羟基乙酸)(mol%) 优选为约100/0至40/60,较优选约90/10至45/55。羟基乙酸和乳酸的共聚物的重均分子量优选为约4,000至25,000,优选约 5,000至20,000。

羟基乙酸和乳酸的共聚物分子量的分散度(重均分子量/ 数均分子量) 优选为约1.2至4.0,较优选约1.5至3.5。 羟基乙酸和乳酸

的共聚物可以通过已知方法制备，如在日本专利未审公开号 28521/ 1986中所述的方法。优选通过无催化剂的脱水聚合缩合反应来制备该共聚物。

在本发明中，通过无催化剂的脱水聚合缩合反应制备的脂族聚酯通常含有末端羧基。

生物降解聚合物较优选为具有末端羧基的脂族聚酯(例如，由一种或多种 α -羟基羧酸如羟基乙酸、乳酸和羟基丁酸，羟基二羧酸如羟基丁二酸，羟基三羧酸如柠檬酸，等等制备的聚合物，共聚物或其混合物)。

具有末端羧基的生物降解聚合物是其中通过GPC测定法得到的数均分子量与通过端基测定法得到的数均分子量几乎一致的聚合物。

为定量测定末端游离羧基，将约1至3g 的生物降解聚合物溶于丙酮(25ml)和甲醇(5ml)的混合溶剂中，该溶液用0.05N氢氧化钾醇溶液快速滴定，同时在室温搅拌下以酚酞作指示剂，测定末端羧基含量，按下式计算数均分子量：

通过端基测定法得到的数均分子量=20,000A/B

其中A是生物降解聚合物的重量(g)，B 是直至达到滴定终点所加入的0.05N氢氧化钾醇溶液的量(ml)。

在下文中该值被称作通过端基测定法的数均分子量。

例如，在由一种或多种 α -羟基酸通过无催化剂的脱水聚合缩合反应制备的具有末端羧基的聚合物的情况下，通过GPC 测定法得到的数均分子量与通过端基测定法得到的数均分子量几乎彼此一致。另一方面，在由环二聚体通过用催化剂的开环聚合反应合成的

没有末端羧基的聚合物的情况下,通过端基测定法得到的数均分子量远远高于通过GPC测定法得到的分子量。这种差别能够用来清楚地分辨出具有末端羧基的聚合物与没有末端羧基的聚合物。

尽管由端基测定法测得的数均分子量是绝对值,由GPC 测定法测得的数均分子量是相对值,它取决于各种分析条件(例如,流动相的种类,柱的种类,参比物,切片宽度,基线等);因此后者很难具有绝对数值。然而,本文中由GPC 测定法和端基测定法测得的数均分子量"几乎一致"的描述是指,后者为前者的约0.5至2倍,优选约0.8至1.5倍。此外,本文中由端基测定法测得的数均分子量"远远大于"由GPC测定法测得的数均分子量的描述是指,前者为后者的约 2 倍或更大。

在本发明中,优选的聚合物是由GPC 测定法和由端基测定法测得的数均分子量几乎一致的聚合物。

对于由GPC测定法测得的重均分子量和数均分子量,本说明书认为前者是基于聚苯乙烯,即通过凝胶渗透色谱法(GPC),用9个重均分子量分别为120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2950、1050、580和162的聚苯乙烯作参比物得到的。用GPC柱KF804L×2(由Showa Denko生产)和RI检测仪L-3300(由Hitachi,Ltd,生产)进行测定,用氯仿作流动相。

用下式计算分散度:重均分子量/数均分子量。

例如,本发明的持续释放制剂可以由W/O乳化液制备,该乳化液以含有抗内皮素物质的溶液作内水相,以含有生物降解聚合物的溶液作为油相。该制备是用已知方法进行的,包括水溶液干燥、相分离、喷雾干燥及这些方法的变形。

用于上述方法油相中的溶剂优选可溶解生物降解聚合物并具有不高于120℃沸点的有机溶剂。这些溶剂包括卤代烃(例如,二氯甲烷、氯仿和四氯化碳),醇(例如,乙醇和甲醇)和乙腈。它们可以混合使用,优选溶剂为二氯甲烷、乙腈等。

当本发明的抗内皮素物质含有羧基时,因它常常呈酸性故其水溶性很低;为增加其药物可溶性,经常使用其有机或无机盐形式。这种有机或无机盐优选碱金属盐(例如钠盐和钾盐),优选钠盐。为了包含药理必需量的药物,必需制备极高浓度的溶液,然而,由于制备上述W/O乳化液的水相体积通常很小,在此情况下,当药物水溶性低时,尽管可溶于水但却不能完全溶解,从而导致制备乳化液时不均匀混合,通过将抗内皮素物质与有机碱性物质一起溶解,可以制备可溶于水但溶解度低的抗内皮素物质的均一溶液。此外,加入有机碱性物质可以抑制药物从用生物降解聚合物制备的微胶囊中通常快速的初始释放出来,使定量的药物在给定的时间内持续释放。有机碱性物质优选碱性氨基酸,特别是精氨酸,组氨酸,赖氨酸等。有机碱性物质的实例还有包括两个或多个碱性氨基酸的肽,如精氨酸酰基精氨酸。

对于有机碱性物质的含量比,抗内皮素物质与有机碱性物质的重量比一般为1:1000至1000:1,优选1:100至100:1,较优选1:10至10:1。生物降解聚合物与有机碱性物质的重量比一般为1,000:1至5:1,优选500:1至10:1,更优选100:1至10:1。

在制备持续释放制剂的过程中,水溶性多价金属盐的加入可以抑制药物的初始突然释放,使定量的药物在给定的时间内持续释放并达到很高的药物含量。对水溶性多价金属盐没有限制,是任何一

种,只要它可溶于水并对生物体无有害影响。

水溶性多价金属盐优选在常温(约20℃)下其水溶解度超过约20mg/ml,更优选超过约100mg/ml的多价金属盐。

水溶性多价金属盐的实例有与无机酸的多价金属盐和与有机酸的多价金属盐。多价金属的实例有碱土金属(例如钙、镁),锌(II)、铁(II、III)、铜(II)、锡(II、IV)和铝(II、III)。无机酸的实例有氢卤酸(例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、氢氟酸)、硫酸、硝酸和硫氰酸。有机酸的实例有脂族羧酸(例如乙酸、羟基乙酸、乳酸、酒石酸)和芳族酸(例如苯甲酸、水杨酸、苯磺酸)。水溶性多价金属盐优选水溶性锌盐。水溶性锌盐的实例有无机酸锌盐,如卤化锌(例如氯化锌、溴化锌、碘化锌、氟化锌),硫酸锌、硝酸锌和硫氰酸锌、有机酸锌盐,如脂族羧酸锌盐(例如乙酸锌、羟基乙酸锌、乳酸锌;酒石酸锌)和芳族酸锌盐(例如苯甲酸锌,水杨酸锌、苯磺酸锌)。水溶性锌盐优选脂族羧酸锌盐,更优选乙酸锌。

对于水溶性多价金属盐的含量比,抗内皮素物质与水溶性多价金属盐的重量比优选为1:100至100:1,较优选1:10至10:1。生物降解聚合物与水溶性多价金属盐的重量比优选为1000:1至1:1,较优选100:1至2:1。

在本发明中,可以将抗内皮素物质直接溶解或悬浮于生物降解聚合物的有机溶剂溶液中。抗内皮素物质在有机溶剂中是可溶的或不可溶的。有时抗内皮素物质在生物降解聚合物的有机溶剂的溶液中是可溶的,即使当抗内皮素物质在有机溶剂中是不可溶的。任何有机溶剂都是适宜的,只要它基本上与水不混溶并能溶解生物降解聚合物,而且所得到的聚合物溶液能溶解抗内皮素物质。有机

溶剂优选在常温(20℃)下具有不高于3%的水溶解度。此外,有机溶剂的沸点优选不高于120℃。有机溶剂的实例包括卤代烃(例如,二氯甲烷、氯仿、氯乙烷、三氯乙烷和四氯化碳),醚(例如异丙醚),脂肪酸酯(例如乙酸丁酯)和芳香烃(例如,苯、甲苯和二甲苯)。它们可以按适当比例混合使用。有机溶剂优选二氯甲烷。抗内皮素物质的溶解是指在常温(20℃)下通过宏观观察在所得溶液中没有留下未溶解的抗内皮素物质。

本发明的持续释放制剂优选通过基于如下所述的水溶液干燥或相分离的微胶囊化方法或其变体来制备。

(I) 水溶液干燥法(W/O/W 法)

将抗内皮素物质溶于水,抗内皮素物质在水溶液中的浓度为约0.1至500%(W/V),优选约1至400%(W/V),更优选约10至300%(W/V)。向水溶液中加入有机碱性物质,优选碱性氨基酸(例如精氨酸)或包含两个或多个碱性氨基酸的肽(例如精氨酰基精氨酸)。用于此目的的有机碱性物质在水溶液中的浓度为约0.01至500%(W/V),优选约0.1至400%(W/V),更优选约1至300%(W/V)。按照与有机碱性物质相同的方式向该水溶液中加入水溶性多价金属。可以向该水溶液中加入PH调节剂(例如乙酸、盐酸和氢氧化钠)、稳定剂(例如血清白蛋白和明胶)、保存剂(对氧苯甲酸)和其他添加剂。将如此得到的水溶液乳化并分散于由 α -羟基羧酸合成的生物降解聚合物或共聚物的有机溶剂溶液中,以得到W/O乳化液。尽管生物降解聚合物在有机溶剂溶液中的浓度随着生物降解聚合物的分子量和有机溶剂的种类而变化,但其选择范围为约0.01至80%(W/W),优选约0.1至70%(W/W),更优选约1至60%(W/W)。

上述水溶液和生物降解聚合物的有机溶剂溶液的比例一般为1:

1000 (V/V) 至1:1 (V/V), 优选1:100 (V/V) 至1:5 (V/V), 较优选1: 50 (V/V) 至1:5 (V/V)。这种乳化作用可以用汽轮式机械搅拌器, 均化器等通过已知的分散方法来进行。

将如此制备的W/O乳化液加入水相以形成W/O/W乳化液, 然后蒸发油相中的溶剂, 得到微胶囊。所选择的水相体积范围一般为油相体积的约1至10,000倍, 优选约2至5,000倍, 较优选约5至2,000倍。

除了上述添加剂, 可以向水相中加入乳化剂。乳化剂可以是任何一种, 只要它能够形成稳定的O/W乳化液。这类乳化剂的实例包括阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、聚氧乙烯蓖麻籽油衍生物, 聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、羧甲基纤维素、卵磷脂、明胶和透明质酸。它们可以单独或混合使用。可以按需要选择所用的乳化剂的浓度, 其范围一般为约0.001至20% (W/W), 优选约0.01 至10% (W/W), 较优选约0.05至5% (W/W)。

这样得到的微胶囊通过离心或过滤收集, 之后在几个循环中用蒸馏水重复洗涤, 以便除去粘附于微胶囊表面上的游离的抗内皮素物质、乳化剂等, 将其再分散于蒸馏水中, 然后冷冻干燥。必要时将微胶囊减压下加热以进一步除去水和有机溶剂。这种除去操作优选在微胶囊已达到给定温度后, 在比生物降解聚合物的中间玻璃化点高出至少5°C的温度下, 以每分钟10至20°C的加热速率, 通常在1周内或2或3天内, 较优选在24小时内进行, 所述中间玻璃化点是用差示扫描量热计测定的。

(II) 水溶液干燥方法 (O/W 法)

按照如上所述重量比, 将抗内皮素物质加入生物降解聚合物的有机溶剂溶液中, 制备含有抗内皮素物质和生物降解聚合物的有机

溶剂溶液或悬浮液。在此操作中,生物降解聚合物在有机溶剂溶液中的浓度随着生物降解聚合物的分子量和有机溶剂的种类而变化,选择的范围一般为约0.01至80%(W/W),优选约0.1至70%(W/W),较优选约1至60%(W/W)。可以向该有机溶剂溶液或悬浮液中加入水溶性多价金属盐。

将如此制备的有机溶剂溶液或悬浮液加入水相,形成O/W 乳化液,然后蒸发油相中的溶剂得到微胶囊。所选择的水相体积范围一般是油相体积的约1至10,000倍,优选约2至5000倍,较优选约5至2,000倍。

除了上述添加剂,可以将乳化剂加到水相中,乳化剂可以是任意一种,只要它能够形成稳定的O/W乳化液。这类乳化剂的实例包括阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、聚氧乙烯蓖麻籽油衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、羧甲基纤维素、卵磷脂、明胶和透明质酸。它们可以单独或混合使用。可以根据需要选择乳化剂的浓度,其范围通常为约0.001至20%(W/W),优选约0.01至10%(W/W),较优选约0.05至5%(W/W)。

将如此得到的微胶囊通过离心或过滤收集,之后在几个循环中用蒸馏水重复洗涤以除去粘附于微胶囊表面上的游离的抗内皮素物质,乳化剂等,将其再分散于蒸馏水中,然后冷冻干燥。必要时将微胶囊在减压下加热以进一步除去水和有机溶剂。这种除去操作优选在微胶囊已达到给定温度后,在比生物降解聚合物的中间玻璃化点高出至少5°C的温度下,以每分钟10至20°C的加热速率,通常在1周内或2或3天内,较优选24小时内进行,所述中间玻璃化点是用差示扫描量热计测定的。

(Ⅲ)相分离方法

在用相分离方法制备微胶囊的过程中,在搅拌时将凝聚剂逐渐加入上述W/O乳化液或有机溶剂溶液中,以使生物降解聚合物分离并固化。加入凝聚剂的量按体积计为W/O乳化液或有机溶剂溶液的约0.01至1000倍,优选约0.05至500倍,较优选约0.1至200倍。

任何凝聚剂都是适宜的,只要它是在生物降解聚合物的溶剂中可混溶的并且不溶解所述聚合物的聚合物,矿物油或植物油化合物。凝聚剂的实例包括硅油、芝麻油、豆油、玉米油、棉籽油、椰子油、亚麻子油、矿物油、正己烷和正庚烷。它们可以混合使用。

将如此得到的微胶囊通过过滤收集,之后用庚烷等重复洗涤以除去凝聚剂。按照与水溶液干燥法相同的方式除去游离的药物和溶剂。

除去溶剂的操作可以用已知方法进行,包括用螺旋桨式搅拌器或磁搅拌器在常压或逐渐减压下,搅拌过程中蒸发溶剂的方法,以及用旋转蒸发仪等调节真空度将溶剂蒸发的方法。

在水溶液干燥法或凝聚法的制备过程中,可以加入防絮凝剂以防止晶粒絮凝。防絮凝剂的实例有水溶性多糖,如甘露糖醇、乳糖、葡萄糖和淀粉(例如玉米淀粉),蛋白质如甘氨酸、血纤维蛋白和胶原蛋白,以及无机盐如氯化钠和磷酸氢钠。

在用喷雾干燥法制备微胶囊的过程中,将含有上述抗内皮素物质和生物降解聚合物的W/O乳化液或有机溶剂溶液通过喷嘴喷雾到喷雾干燥器的干燥室内,使有机溶剂在很短的时间内以细小液滴形式挥发,得到细小微胶囊。喷嘴的实例有双液流喷嘴、压力喷嘴和转盘喷嘴。需要时为防止微胶囊絮凝,可以通过另一喷嘴将上述防

絮凝剂的水溶液有效地喷雾,该喷雾是与含有抗内皮素物质和生物降解聚合物的W/O乳化液或有机溶剂溶液的喷雾同时进行的。

需要时,可以使如此得到的微胶囊中的水和有机溶剂在升温减压下除去。

上述微胶囊可以被就此给药,或以各种剂型给药,非口服制剂(例如,肌肉、皮下或内脏注射液,或内存制剂,鼻、直肠或经子宫粘膜的制剂)或口服制剂(例如,胶囊如硬胶囊和软胶囊),或固体制剂如颗粒剂及粉剂,或液体制剂如糖浆剂,乳化液和悬浮液。

除了上述微胶囊剂型,含有抗内皮素物质和生物降解聚合物的W/O乳化液或有机溶剂溶液可以制成棒状、针状、丸状、薄膜及其它形式,并且可以肌肉、皮下或内脏注射液,或内存制剂,鼻、直肠或经子宫粘膜的制剂,口服制剂(例如胶囊,如硬胶囊和软胶囊),固体制剂如颗粒剂和粉剂,以及液体制剂如糖浆剂、乳化液和悬浮液形式给药。

本发明的注射用制剂可以用已知方法制备。例如,通过将上述微胶囊等的持续释放制剂以及分散剂(例如,表面活性剂如Tween 80和HCO-60,多糖如羧甲基纤维素和藻酸钠),保存剂(例如,羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯),等渗剂(例如氯化钠、甘露糖醇、山梨糖醇和葡萄糖)悬浮于水中,得到水溶液悬浮液,或将其悬浮于植物油如芝麻油或玉米油或中链脂肪酸甘油三酯(例如Migriol 812)中,得到油悬浮液。当持续释放制剂作为注射用悬浮液被使用时,持续释放制剂的粒度选择范围为约0.1至300 μm ,只要能够满足分散度和针头通过的要求。优选粒度在约1至150 μm 范围内,较优选在约2至100 μm 范围内。持续释放制剂可以没有任何限制作为无菌制剂

来制备,其制备方法可以是整个制备过程均为无菌的方法,用 γ 射线作为灭菌剂的方法,以及加入抗菌剂的方法。

在低毒性的情况下,本发明的持续释放制剂可以安全地用于哺乳动物(例如,人、牛、猪、狗、猫、小鼠、鼠和兔子)。

本发明的持续释放制剂可用于治疗或预防与内皮素有关的疾病,特别是慢性病。这些疾病包括心/脑循环疾病、肾病、高血压(例如,肺动脉高血压),哮喘、炎症、关节炎、肝癌、肝硬化和糖尿病慢性并发症。本发明的持续释放制剂可特别用于治疗或预防动脉硬化、糖尿病性肾病、糖尿病性心肌炎和糖尿病性视网膜病。

根据活性成分抗内皮素物质的类型、含量及剂型,抗内皮素物质释放的持续时间,目标疾病(例如,糖尿病性肾病),受治疗的动物及其他因素的不同,可以将持续释放制剂的剂量定在抗内皮素物质为有效的水平上。根据需要可以选择活性成分抗内皮素物质的每次给药剂量范围,当制剂是1个月制剂时对每个成人为约0.01至100mg/kg体重。优选地按需要选择剂量范围为约0.05至50mg/kg体重。

根据需要可以选择持续释放制剂的每次给药剂量范围为每个成人约0.1至1,000mg/kg体重。较优选地,可以根据需要选择剂量范围为约0.5至500mg/kg体重。可以按需要选择给药频率,例如每周一次,每数周一次,每月一次或每数月一次,这取决于活性成分抗内皮素物质的类型,含量及剂型,抗内皮素物质释放的持续时间,治疗的疾病,受治疗的动物及其他因素。

本发明制剂可以与其他药物,特别是糖尿病性肾病的常规治疗药物如降血压药物混合使用。尽管本发明制剂可以在常温或冷处

贮存，但优选将其贮存于冷处。 本文所述的常温及冷处是按照 pharmacopoeia of Japan 所定义。

通过下列操作实施例和试验实施例将更详细地描述本发明，但它们并不能视为是对本发明的限制。

参考实施例1

环[-D-Asp-Asp(B7)-Asp-D-rMeLeu-Leu-D-Trp-]二钠盐的合成

将4.4g环[-D-Asp-Asp(B7)-Asp-D-rMeLeu-Leu-D-Trp-] (下文简称为肽B)溶于50ml甲醇中并浓缩。将浓缩液再溶于50ml 甲醇中并使其冰冷。向如此得到的溶液中滴加0.1N 氢氧化钠溶液 (46.4ml),再加入0.1N氢氧化钠溶液将溶液的PH调节到7-8。 浓缩所得溶液。加入蒸馏水后将浓缩液冷冻干燥。得到肽B二钠盐(产量 4.5g)。

元素分析:

$A_8C_{47}H_{61}N_9O_{11}Na_2 \cdot CF_3CO_2Na \cdot 0.5CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$

计算值: C, 49.18; H, 5.65; N, 10.32

实测值: C, 49.08; H, 5.50, N, 10.33

实施例1

将51mg环肽环[-D-Asp-Asp(R1')-Asp-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的二钠盐(如欧洲专利公开号528312中所述,其中Asp代表天冬氨酸; Asp(R1')代表天冬氨酸 β -4-苯基哌嗪酰胺;Thg(2)代表2-噻吩基甘氨酸;Leu代表亮氨酸; Trp 代表色氨酸)和 49mgL-精氨酸(WakoPure Chemical)溶于300 μ l蒸馏水中。将该溶液加入1.92g乳

酸-羟基乙酸共聚物(乳酸/羟基乙酸=75/25mol%, GPC重均分子量14,000, GPC数均分子量2,000, 端基测定法的数均分子量 2,200, 由WakePure Chemical Industry制备, Lot No.920729)的 2ml二氯甲烷溶液中, 用均化器(Polytron)将混合物搅拌得到W/O乳化液。冷却到17°C后, 将乳化液注入1000ml 0.1%(W/W)聚乙烯醇(EG-40, 由TheNippon Synthetic Chemical Industry, Co, Ltd生产)的水溶液中, 先调节到16°C, 然后在汽轮均混器中以7,000rpm 的速率搅拌, 得到W/O/W乳化液, 然后在室温下搅拌3小时, 使二氯甲烷挥发并使油相固化, 将其用离心机(05PR-22, Hitachi, Ltd)以2,000rpm 速率通过离心收集。再使沉淀分散于蒸馏水中, 离心并洗涤以除去游离的药物等。将收集的微胶囊再分散于少量蒸馏水中后, 加入0.3gD-甘露糖醇, 将分散液冻干得到粉状微胶囊。

实施例2

将约39mg实施例1中得到的微胶囊分散于1.95ml注射用分散剂(含有2.5mg羧甲基纤维素、0.5mg多乙氧基醚和25mg甘露糖醇的蒸馏水, 所有成分均溶于蒸馏水中)中, 得到注射制剂。

实施例3

将3.6g乳酸-羟基乙酸共聚物(乳酸/羟基乙酸= 75/25 mol%, GPC 重均分子量 15.038, GPC 数均分子量 5.195, 由 Wako PureChemical Industry生产)溶于6.6g(5ml)二氯甲烷。向此溶液中加入肽A二钠盐(250mg)和L-精氨酸(100mg)的0.5ml蒸馏水溶液, 用均化器(Polytron)将混合物搅拌约30秒钟, 得到W/O乳化液。将乳化液注入 800ml 0.1%(W/W)聚乙烯醇(EG-40, 由 The NipponSynthetic Chemical Industry, Co.Ltd生产)的水溶液中,

先调节到18℃,然后在汽轮均混器中以6,000rpm的速率搅拌,得到W/O/W乳化液,然后在室温下搅拌3小时,使二氯甲烷挥发并使油相固化,然后用离心机(05PR-22,Hitachi ,Ltd)以2000rpm 的速率通过离心收集固体。再将沉淀分散于蒸馏水中,离心并洗涤以除去游离的药物等。向收集的微胶囊中加入100mgD-甘露糖醇后,将微胶囊再分散于少量蒸馏水中,将分散液冻干得到粉状微胶囊。

将如此得到的微胶囊在含有30%(V/V)乙腈的0.1M 乙酸铵溶液中均化并萃取3小时,然后通过HPLC(高效液相色谱)分析。

结果,肽A二钠盐的含量为每100mg微胶囊5.2mg。

实施例4

按照与实施例3相同的方法制得粉状微胶囊,不同的是以L-精氨酰基精氨酸(Kokusan Chemical Works Ltd)代替L-精氨酸。

肽A二钠盐的含量为每100mg微胶囊7.4mg。

实施例5

环[-D-Asp(OC₂H₅)-Asp(R1')-Asp(OC₂H₅)-D-Thg(2)-Leu-D-Trp-]的合成

在干冰丙酮浴中将10ml乙醇冷却到-10℃,分小量加入2.6ml亚硫酸氯。5分钟后向混合物中加入1.0g肽A 二钠盐并在室温下搅拌。2小时后,减压下除去乙醇和过量亚硫酸氯,得到油状物。将此油状物溶于少量乙醇中,再于减压下除去溶剂。将此操作重复三次,加入少量乙醚得到1.05g标题化合物,对肽A二乙酯的分析结果如下。

1) 质谱(LSIMS 法):

$[M+H]^+ = 984$ (理论值=984)

$[M+Na]^+ = 1,006$ (理论值=1,006)

元素分析: $A_8C_{49}H_{61}N_9O_{11}S \cdot 2NaCl \cdot 2H_2O \cdot HCl$

计算值: C, 50.20; H, 5.67; N, 10.75

实测值: C, 50.35; H, 5.75; N, 10.81

实施例6

将0.5g乳酸-羟基乙酸共聚物(乳酸/羟基乙酸=50/50ml%, GPC重均分子量5.900, GPC数均分子量2.600, 由Wako Pure Chemical Industry 生产)溶于6.6g (5ml) 二氯甲烷中。向该溶液中加入0.15g在实施例5中得到的肽A二乙酯, 用均化器 (Polytron) 将混合物搅拌约30秒钟, 得到S/O乳化液。将乳化液注入400ml 0.1% (W/W) 聚乙烯醇 (EG-40, 由The Nippon Synthetic Chemical Industry, CO, Ltd 生产) 水溶液, 先调节到18°C, 然后在汽轮均混器中以6,000rpm 的速率搅拌, 得到S/O/W乳化液, 然后在室温下搅拌3小时, 使二氯甲烷挥发并使油相固化, 然后用离心机 (05PR-22, Hitachi, Ltd.) 以 2,000rpm 的速率通过离心收集沉淀, 再将沉淀分散于蒸馏水中, 离心并洗涤以除去游离的药物等。向收集的微胶囊中加入50mg D- 甘露糖醇后, 将微胶囊再分散于少量蒸馏水中, 将分散液冷冻干燥, 得到粉状微胶囊。

将如此得到的微胶囊在含有50%乙腈的0.1M磷酸盐缓冲液中均化并萃取3小时, 然后通过HPLC (高效液相色谱) 分析。

结果, 肽A二乙酯的含量为每100mg微胶囊25.2mg。

实施例7

将3.2g肽A二钠盐和7.28g乙酸锌二水合物各自溶于160ml蒸馏水中, 将这样得到的两种溶液混合在一起。该混合物在4 °C保持一天, 然后用离心机 (05 PR-22, Hitachi, Ltd) 以3,000rpm 的速率离心。将这样得到的沉淀再分散于蒸馏水中, 离心并洗涤以除去游离

的药物等。向收集的沉淀中加入少量蒸馏水使沉淀再分散后,将分散液冷冻干燥,得到粗的肽A锌盐2.81g,干燥粉末。

将如此得到的干燥粉末在含有30%(V/V)乙腈的50mM EDTA溶液中均化并萃取3小时,然后通过HPLC(高效液相色谱)分析。

结果,干燥粉末中肽A含量为80.7%(W/W)。

实施例8

将0.97g乳酸-羟基乙酸共聚物(乳酸/羟基乙酸= 75/25mol%, GPC 重均分子量 15, 038, GPC 数均分子量 5, 195, 由 Wako PureChemical Industry 生产)溶于13.2g(10ml)二氯甲烷中。向此溶液中加入在实施例7中制得的粗肽A锌盐(300mg),用均化器 (Polytron)将混合物搅拌约30秒,得到S/O 乳化液。将乳化液注入400ml 0.1%(W/W)聚乙烯醇 (EG- 40, 由 The Nippon SyntheticChemical Industry ,CO.Ltd 生产)的水溶液中,先调节到18°C,然后在汽轮均混器中以6,000rpm的速率搅拌,得到S/O/W乳化液,将其在室温下搅拌3小时,使二氯甲烷挥发并使油相固化,然后用离心机(05 PR-22,Hitachi,Ltd)以2,000rpm 的速率通过离心将固体分离。再将沉淀分散于蒸馏水中。离心并洗涤以除去游离的药物等。向收集的微胶囊中加入50mg D-甘露糖醇后,将微胶囊再分散于少量蒸馏水中,分散液经冷冻干燥得到粉状微胶囊。

将如此得到的微胶囊在含有30%(V/V)乙腈的50mM EDTA(乙二胺四乙酸)溶液中均化并萃取3小时,然后通过HPLC(高效液相色谱)分析。

结果,按肽A二钠盐计的粗肽A锌盐的含量为100mg微胶囊21.2mg。

实施例9

按照与实施例3相同的方法制得粉状微胶囊,不同的是用肽B二钠盐代替肽A二钠盐。

肽B二钠盐的含量为每100mg微胶囊5.2mg。

实施例10

将1.2g乳酸-羟基乙酸共聚物(乳酸/羟基乙酸=75/25mol%, GPC重均分子量13,585, GPC数均分子量4,413, 由Wake 'Pure Chemical Industry生产)溶于26.4g (20ml) 二氯甲烷中。向此溶液中加入肽A二钠盐(400mg)和乙酸锌二水合物(400mg)在1.7ml蒸馏水中的溶液,用均化器(Polytron)将混合物搅拌约30秒,得到W/O乳化液。将乳化液注入800ml 0.1% (W/W) 聚乙烯醇 (EG-40, 由The Nippon Synthetic Chemical Industry, Co. Ltd. 生产)的水溶液中,先调节到18°C,然后在汽轮均混器中以6,000rpm 的速率搅拌,得到W/O/W乳化液,然后将其在室温下搅拌3小时,使二氯甲烷挥发并使油相固化,用离心机(05 PR-22, Hitachi, Ltd)以2,000rpm的速率通过离心收集固体。将沉淀再分散于蒸馏水中,离心并洗涤以除去游离的药物等。向收集的微胶囊中加入50mgD-甘露糖醇后,将微胶囊再分散于少量蒸馏水中,分散液经冻干得到粉状微胶囊。

将如此得到的微胶囊在含有30% (V/V) 乙腈的50mM EDTA溶液中均化并萃取3小时,然后通过HPLC(高效液相色谱)分析。

结果,肽A二钠盐的含量为每100mg微胶囊12mg。

实施例11

将1.4g乳酸-羟基乙酸共聚物(乳酸/羟基乙酸=75/25mol%, GPC重均分子量13,585, GPC数均分子量4,413, 由Wako Pure

Chemical Industry 生产)溶于6.6g(5ml)二氯甲烷中,向此溶液中加入肽A二钠盐(437mg)和乙酸锌二水合物(467mg),用均化器(Polytron)将混合物搅拌约30秒,得到S/O乳化液。将该乳化液注入800ml 0.1%(W/W)聚乙烯醇(EG-40,由The Nippon Synthetic Chemical Industry, Co. Ltd. 生产)的水溶液中,先调节到18°C,然后在汽轮均混器中以6,000rpm的速率搅拌,得到S/O/W乳化液,然后将其在室温下搅拌3小时,使二氯甲烷挥发并使油相固化,然后用离心机(05PR-22, Hitachi, Ltd.)以2,000rpm的速率通过离心并收集固体。将沉淀再分散于蒸馏水中,离心并洗涤以除去游离的药物等。向收集的微胶囊中加入50mg D-甘露糖醇后,将微胶囊再分散于少量蒸馏水中,分散液经冷冻干燥得到粉状微胶囊。

将如此得到的微胶囊在含有30%(V/V)乙腈的50mM EDTA 溶液中均化并萃取3小时,然后通过HPLC(高效液相色谱)分析。

结果,肽A二钠盐的含量为每100mg微胶囊12.2mg。

对比实施例1

按照与实施例3相同的方法得到粉状微胶囊,只是不用肽A二钠盐。

对比实施例2

将1.6g肽A二钠盐和3.65g乙酸锌各自溶于80ml蒸馏水中,将所得到的两种溶液混合在一起。将该混合物用离心机(05 PR-22, Hitachi, Ltd)以3,000rpm速率离心。将这样得到的沉淀再分散于蒸馏水中,离心并洗涤以除去游离的药物等。向收集的沉淀中加入少量蒸馏水以使沉淀再分散之后,将分散液冷冻干燥,得到粗的肽A锌盐1.23g,为干燥粉末。

试验实施例1

将实施例2中得到的注射制剂皮下给药于8周龄的雄SD 鼠的背部。给药后,在给定的间隔时将鼠处死,并取出留在给药部位的微胶囊,对药物含量进行分析。重复该步骤以得到由施予生物体的微胶囊药物释放的时间曲线。结果示于图1。经一个月或更长的时间给予生物体的微胶囊中的药物含量减少,这表明抗内皮素物质可以在生物体内持续。

试验实施例2

将如实施例1中得到的约100mg微胶囊分散在2.5ml注射用分散剂中(含有2.5mg羧甲基纤维素,0.5mg多乙氧基醚和25mg 甘露糖醇的蒸馏水,所有成分均溶于水中)。将所得分散液皮下给药于13周龄的雄Wistar多脂鼠的背部。雄Wistar多脂鼠是遗传形成肥胖症及高血糖的一组鼠,其特征不在于随着高血糖的形成尿中蛋白和白蛋白的渗漏量增加。表1中列出了未接受微胶囊的对照组和接受了微胶囊的给药组中尿蛋白和白蛋白分析的结果。

表 1

	尿白蛋白 (mg/天, 平均值)				
给药后的周数	0	2	4	6	8
对照组	9	-	32	-	37
给药组	6	-	18	-	23
	尿蛋白 (mg/天, 平均值)				
给药后的周数	0	2	4	6	8
对照组	97	98	83	112	132
给药组	98	68	68	64	92

由表1可见,在微胶囊给药后约6周期间,与初始值和对照值比较,有较小量的蛋白和白蛋白排泄在尿中。这些结果表明,当内皮素拮抗剂如试验实施例1所示在生物体内持续的过程中,作为糖尿病性肾病症状的尿蛋白和白蛋白排泄可被抑制,这暗示出本发明作为治疗糖尿病性肾病的用途。

试验实施例3

将实施例3中得到的约190mg微胶囊分散在1.5ml注射用分散剂中(含有7.5mg羧甲基纤维素,1.5mg多乙氧基醚和75mg甘露糖醇的蒸馏水,所有成分均溶于水)。将所得分散液用18G·针皮下给药于8周龄的雄Wistar多脂鼠的背部(每只鼠的肽A二钠盐的剂量为约10mg)。每月一次进行同样的给药,进行3个月。作为对照,将对实施例1中得到的不含肽A二钠盐的微胶囊皮下给药于8周龄的雄Wistar多脂鼠的背部。

给药后在一定间隔时取出排泄的尿样,分析尿白蛋白。由表2可见,给药后9和12周,与对照组比较,在接受了实施例2的微胶囊的给药组中尿白蛋白排泄被抑制了。

表 2

尿白蛋白(mg/天,平均值)

给药后的周数	0	9	12
对照组	2±1	32±8	45±10
给药组	3±1	17±4	26±11

试验实施例4

将用戊巴比妥麻醉的6周龄的雄Wistar鼠经手术取出左侧肾之后,用25mg脱氧皮质酮接种。使鼠自由饮用1%(W/V)盐水溶液3周。

将实施例3得到的微胶囊分散在注射用分散剂中(2.5mg羧甲基纤维素,0.5mg多乙氧基醚和25mg甘露糖醇,所有上述成分均溶于0.5ml蒸馏水中),使得到的分散液中达到100mg/ml肽A二钠盐。将此分散液用18G针皮下给药于鼠的背部(肽A二钠盐的剂量为100mg/kg)。作为对照,将对比实施例1中得到的不含肽A二钠盐的微胶囊皮下药于用同样方法处理的6周龄的雄Wistar鼠的背部。

结果,在给药后一周时,在接受了实施例3微胶囊的给药组中收缩压开始下降,并且直到给药后2和4周,与对照组相比该收缩压各自保持低约28和25mmHg。这些结果表明,抗内皮素物质的持续释放能够保持血压较低。

试验实施例5

用含有45mg肽A二钠盐的Mini Osmotic Pump(Alzet Model 2002,由Alza生产)给5周龄的雄Wistar鼠经手术接种,给该鼠皮下给药响尾蛇毒蛋白(100mg/kg)。2周后更换Mini Osmotic Pump。由Mini Osmotic Pump释放肽A二钠盐的速率为2.5mg/鼠/天,这是根据取出的Mini Osmotic Pump中剩余肽A二钠盐的量计算的。作为对照,将不含肽A二钠盐的Mini Osmotic Pump手术接种在5周龄的雄Wistar鼠中,将鼠接同样的方法处理。在响尾蛇毒蛋白给药4周时,在人工呼吸作用下将用戊巴妥麻醉的鼠的胸腔手术打开,在达到稳定状态后通过插入的导管监测右心室的压力。

结果,在用肽A二钠盐处理的给药组中,适当地抑制了右心室压力的升高(与对照组相比低26mmHg)。此外,与对照组相比右心室肥大不明显(低0.23g组织/g体重)。这些结果表明,在血液中内皮素拮抗剂的持续存在足以有效地改善肺动脉高血压的病状,抗内皮素

物质的持续释放制剂可用于治疗肺动脉高血压。

试验实施例6

将实施例6中得到的约30mg微胶囊分散在0.5ml 注射用分散剂中(含有2.5mg羧甲基纤维素,0.5mg多乙氧基醚和25mg 甘露糖醇的蒸馏水,所有上述组分均溶于水中)。将所得分散液用20G针皮下给药于9周龄SD鼠的背部(每只鼠的剂量是约12.6mg)。给药后在给定间隔时,从鼠尾采集血样,通过EIA(酶免疫分析法)分析血清中肽A二乙酯的浓度。由表3可见,几乎恒定的血液浓度被保持2周。

表 3

血清中的肽A二乙酯 (ng/ml)

给药后的天数	1	7	14
给药组	17.8	19.7	12.5

试验实施例7

将实施例8中得到的约50mg微胶囊分散在0.5ml 注射用分散剂中(含有2.5mg羧甲基纤维素,0.5mg多乙氧基醚和25mg 甘露糖醇的蒸馏水,它们均溶于水中)。将所得分散液用20G针皮下给药于6周龄SD鼠的背部(按肽A 二钠盐计,每只鼠的粗肽A 锌盐的剂量是约10mg)。给药后在一定间隔时,由鼠尾采集血样,通过EIA 分析血清中肽A的浓度。结果列于表4中。表中肽A锌盐的量是根据肽A 二钠盐计算的。

表 4

血清中肽A锌盐 (ng/ml)

给药后的天数	1	7	14	21
给药组	5.09	6.50	10.18	11.23

由表4可见,在接受了实施例7制剂的给药组中,几乎恒定的血液浓度被保持了3周。作为对照,将在对照实施例2中得到的粗肽A锌盐分散在注射用分散剂中,并皮下给药于鼠(按肽A二钠盐计,每只鼠的粗肽A锌盐的剂量为约10mg),给药后3天血清中肽A减少到观测不到。

试验实施例8

将实施例10中得到的约70mg微胶囊分散在0.5ml注射用分散剂中(含有2.5mg羧甲基纤维素,0.5mg多乙氧基醚和25mg 甘露糖醇的蒸馏水,所有组分均溶于水中)。将所得分散液用20G针皮下给药于6周龄SD鼠的背部(每只鼠的肽A二钠盐的剂量是约10mg)。给药后在一定间隔时,从鼠尾采集血样,通过EIA分析血清中肽A 二钠盐的浓度。结果列于表5。

表 5				
血清中的肽A二钠盐 (ng/ml)				
给药后的天数	1	7	14	21
给药组	11.12	26.77	8.37	5.74

由表5可见,在接受了实施例10制剂的给药组中,几乎恒定的血液浓度被保持2周。

试验实施例9

将实施例11中得到的约70mg微胶囊分散在0.5ml注射用分散剂中(含有2.5mg羧甲基纤维素,0.5mg多乙氧基醚和25mg 甘露糖醇的蒸馏水,所有组分均溶于水中)。将所得分散液用20G针皮下给药于6周龄的SD鼠的背部(每只鼠的肽A二钠盐的剂量是约10mg)。给药后在一定间隔时,从鼠尾采集血样,通过EIA分析血清中肽A 二钠盐

的浓度。结果列于表6中。

表 6			
血清中的肽A二钠盐 (ng/ml)			
给药后的天数	1	7	14
给药组	5.79	8.99	10.91

由表6可见,在接受了实施例11制剂的给药组中,几乎恒定的血液浓度被保持2周。

本发明的持续释放制剂可持续释放抗内皮素物质,它可以很好地治疗与内皮素有关的疾病,特别是糖尿病慢性并发症。

附图说明

图1表明在试验实施例1 中给药部位处得到的给予鼠的持续释放制剂的微胶囊中,药物保留百分比对时间的变化。

图 1

