[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 38/09
C07K 7/23 A61P 31/18

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94192470.X

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1136915C

[22] 申请日 1994.4.2 [21] 申请号 94192470.X
[30] 优先权
[32] 1993.6.18 [33] DE [31] P4320201.2
[86] 国际申请 PCT/EP94/01037 1994.4.2
[87] 国际公布 WO95/00168 德 1995.1.5
[85] 进入国家阶段日期 1995.12.18
[71] 专利权人 赞塔里斯股份公司
地址 联邦德国德累斯顿
[72] 发明人 J·恩盖尔 B·库彻尔
M·伯恩德 U·尼美尔
审查员 马文霞
[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 杜京英

权利要求书 3 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 九肽和十肽在治疗艾滋病药物的制备中的应用

[57] 摘要

描述了适用于制备治疗 AIDS 和 ARC 的药物及用于制备免疫激活剂药物的抗 LHRH 和抗铃蟾肽的九肽和十肽。

ISSN1008-4274

1. 一种用于抗 AIDS 的药物，其中至少含有一种通式 I 的化合物

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(pCl)-xxx-A-

-B-yyy-zzz-Arg-C-D-Ala-NH_2

其中:

xxx=D-Pal(3), D-Phe(4C1), D-Trp

yyy=D-Cit, D-Lys(R), D-Arg, D-HCi

R 可为（C_1－C_4）－酰基或（C_1－C_{10}）－烷基，

zzz=L-Leu, Nle, Nva, t-Leu

A=Ser, Ser（糖）

糖的含义为葡萄糖、半乳糖、阿洛糖、阿卓糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖或塔罗糖，

B=Tyr, Lys(Nic), Mop

C=Pro,Ala，前提条件是当 C 为 Ala 时，所述化合物具有下列氨基酸序列:

[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, Ala^9, D-Ala^{10}]-LHRH。

及这些肽的药物可接受的盐，

但下列化合物除外:

[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Trp^3, D-Cit^6, D-Ala^{10}]-LHRH，通式IV

[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, D-Ala^{10}]-LHRH,通式V

[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Hci^6, D-Ala^{10}]-LHRH,通式VI。

2. 如权利要求 1 的抗 AIDS 的药物，所述药物可接受盐为盐酸盐、三氟乙酸盐、乙酸盐、硫酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐或甲苯磺酸盐。

3. 如权利要求 1 或 2 的一种抗 AIDS 药物，其中通式 I 化合物具有通式 II 的氨基酸序列：

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, Nle^{7}, D-Ala^{10}]-LHRH。

4. 如权利要求 1 或 2 的一种抗 AIDS 药物，其中通式 I 化合物具有通式 III 的氨基酸序列：

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, Nva^{7}, D-Ala^{10}]-LHRH。

5. 如权利要求 1 或 2 的一种抗 AIDS 药物，其中通式 I 化合物具有通式 VII 的氨基酸序列：

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, t-Leu^{7}, D-Ala^{10}]-LHRH。

6. 如权利要求 1 或 2 的一种抗 AIDS 药物，其中通式 I 化合物具有通式 VIII 的氨基酸序列：

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, Ala^{9}, D-Ala^{10}]-LHRH。

7. 通式 I－VIII 的化合物或药物可接受盐在制备抗 AIDS 的药物中的应用。

8. 具有通式 II 的氨基酸序列的肽或其药物可接受的盐:

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, Nle^{7}, D-Ala^{10}]-LHRH。

9. 具有通式 III 的氨基酸序列的肽或其药物可接受的盐:

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, Nva^{7}, D-Ala^{10}]-LHRH 。

10. 具有通式 VII 的氨基酸序列的肽或其药物可接受的盐:

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, t-Leu^{7}, D-Ala^{10}]-LHRH。

11. 具有通式 VIII 的氨基酸序列的肽或其药物可接受的盐:

[Ac-DNal(2)^{1}, D-Phe(pCl)^{2}, D-Pal(3)^{3}, D-Cit^{6}, Ala^{9}, D-Ala^{10}]-LHRH。

九肽和十肽在治疗艾滋病药物的制备中的应用

1981年伊始，至今发生率不断增加的、罕见的、无法治愈的感染在纽约和旧金山的男性同性恋者中发现。在所有病人中都观察到免疫抵抗力的严重缺陷。不久后，Luc Montagnier在巴斯德研究所发现了一种新病毒，即人类免疫缺陷病毒（HIV）。

至今，只有二脱氧核苷类似物3′-叠氮基-3′-脱氧胸苷（AZT）或叠氮吲酸（INN）是注册用于治疗AIDS的。它减轻了症状并延长了AIDS病人的平均寿命（EP-A 206497）。AZT治疗伴随有耐受病毒株的产生和严重的骨髓副作用。当前更多的药物正进行临床试验。例如，德国专利公告3935580描述了使用1-十八烷基-2-甲基-甘油基-3-胆碱磷酸制备药物以对抗HIV感染。为相同的目的，EP-A 493378描述了2′-3′-二脱氧鸟苷或2′-3′-二脱氧鸟苷的单或三磷酸酯的用途。所有这些物质仍在进行临床试验并且尚未准备进入市场。

目前用于抗病毒化疗的药物没有所需的选择性。于是特别需要耐受性好、疗效高的药物，其并不只是延长疾病进程，而且能抑制病毒的增殖，此外还能稳定病人虚弱的免疫系统。

现在，在CEM-IW细胞上进行AIDS筛选试验时惊奇地发现，通式II-VIII的LHRH类十肽具有抗HIV作用和对细胞培养起生长刺激作用。

本发明的目的是基于肽LHRH拮抗剂的药物的制备。即使以最高剂量使用，这些化合物毒性也极小。

LHRH的氨基酸序列是:

LHRH=p-Glu^{1}-His^{2}-Trp^{3}-Ser^{4}-Tyr^{5}-Gly^{6}-Leu^{7}-Arg^{8}-Pro^{9}-Gly^{10}-NH_2

通式I表示本发明的肽:

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(pCl)-xxx-A-

-B-yyy-zzz-Arg-Pro-D-Ala-NH_2 通式 I

其中:

xxx=D-Pal(3), D-Phe(4Cl)

yyy=D-Cit, D-Lys(R), D-Arg, D-Hci

R可为（C_1-C_4）-酰基或（C_1-C_{10}）-烷基,

zzz=L-Leu, Nle, Nva, t-Leu

A=Ser, Ser（糖）

糖的含义为葡萄糖、半乳糖、阿洛糖、阿卓糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖或塔罗糖,

B=Tyr, Lys(Nic), Mop,

及这些肽的药物可接受的盐,如盐酸盐、三氟乙酸盐、乙酸盐、硫酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐或甲苯磺酸盐。

IUPAC-IUB生化命名委员会推荐了氨基酸、肽及其衍生物的正规缩写形式(European J. Biochem., 1986, 138, 9-37)。

不常用氨基酸的缩写形式:

Dpa代表2, 3-二氨基丙酸

Nal代表3-(2-萘基)-丙氨酸,

Thi代表β-2′-噻吩基丙氨酸,

Tpi代表2, 3, 4, 9-四氢-1H-吡啶并[3, 4-b]-吲哚-3-羧酸,

Nic代表烟酰基,

Mop代表4-(吗啉代甲基)苯丙氨酸

通式I的特别优选的化合物组成如下氨基酸序列:

通式II=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, Nle^7, D-Ala^{10}]-LHRH

通式III=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, Nva^7, D-Ala^{10}]-LHRH

通式IV=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Trp^3, D-Cit^6, D-Ala^{10}]-LHRH

通式V=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, D-Ala^{10}]-LHRH

通式VI=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-HCi^6, D-Ala^{10}]-LHRH

通式VII=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, t-Leu^7, D-Ala^{10}]-LHRH

通式VIII=[Ac-DNal(2)^1, D-Phe(pCl)^2, D-Pal(3)^3, D-Cit^6, Ala^9, D-Ala^{10}]-LHRH

本发明的寡肽按照现有技术的常规方法合成。适当的方法概述为,例如,记载于M,Bodanszky,肽合成的原理(Principles of Peptide sythesis), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1984.

多肽的固相合成原理见J.M.Stewart和J.D. Yong编写的教材,固相肽的合成(Solid Phase Peptide Synthesis),Pierce Chem. Co.,

Rockford, I1, 1984(第二版)和:L-Barany等的综述, Int. J. Peptide Protein Res. 30, 705-739(1987).

通式II-VIII肽是按照 Advanced Chem. Tech / Louisville (Kentukey), USA中的示意流程图，在甲基-二苯甲基胺树脂（商业用盐酸盐形式）上合成的，每次在与C-末端BOC-D-Alanin结合前通过10％三乙胺的二氯甲烷溶液（V/V）将其转化成游离碱基.

所有下面Nα-Boc-保护的氨基酸在90分钟内，以过量三倍摩尔的量，在存在于二氯甲烷/DMF中的二异丙基碳化二亚胺（DIC）和1-羟基苯并三唑（HOBt）存在下，在组成为80/20（V/V）的二氯甲烷/二甲基甲酰胺的混合物中偶联，并通过与50％三氟乙酸（TFA）的二氯甲烷溶液反应半小时(裂解)Boc保护基. 剩余游离氨基官能团在过量五倍的乙酰咪唑的二氯甲烷溶液中通过乙酰化封闭. 在树脂支持的肽合成中，一系列反应步骤在示意流程图中说明. 为裂解与树脂结合的肽，每次固相合成的终产物在真空中干燥并用过量500倍的HF/茴香醚10: 1（V/V）于0℃处理45至60分钟.

真空蒸馏HF和茴香醚后，所有粗品肽酰胺通过与无水乙醚搅拌而聚集，为白色固体，通过用50％（V/V）乙酸水溶液洗涤而分离同时聚集的聚合物载体. 小心地真空浓缩乙酸溶液得到相应肽，为高粘度油，加入冷的纯乙醚后，其逐渐变成白色固体. 分离粗品肽，在玻璃珠上用纯乙醚洗涤并真空干燥.

使用高压液相色谱（HPLC）在所述条件下进行制备性纯化:

制备性HPLC参数

仪器: Shimadzu LC-泵

Shimadzu SPD-6A检测器

Shimadzu C－R4A积分仪

Shimadzu SCL－6A控制器

试剂: 乙腈Lichrosolv Merk Art.30

三氟乙酸Fluka No.91700

纯水（Seralpur 装置）

流动相A: 970ml水（VE 水，最纯）

+30ml乙腈

+1ml三氟乙酸

流动相B: 300ml水（VE水，最纯）

+700ml乙腈

+1ml三氟乙酸

流速: 40ml/min

压力: 14巴

制备阶段的平均流动时间：约30至40分钟.

通过氨基酸分析，质谱和^{1}H-NMR光谱方法，在HPLC纯化后，证明所有合成肽的正确鉴定。

LHRH肽的固相合成的示意流程图：固相合成的重复工作步骤概括在如下示意图中；步骤1至17描述了每次连接一个氨基酸的系列操作步骤:

步骤	试剂及操作	时间[min]
1	Boc-氨基酸，DIC，HOBt 1:1:1	90
2	全部反应的颜色试验，如果阳性: 重复1	
3	MeOH; 洗涤	1

4	DIPEA，于二氯甲烷中10％；中和	2
5	MeOH，洗涤	1
6	二氯甲烷；洗涤，3次	2
7	$(CH_3CO)_2O$，咪唑，1：1，乙酰化	30
8	MeOH；洗涤，两次	1
9	二氯甲烷；洗涤，3次	2
10	TFA，于二氯甲烷中50％，裂解Boc	1
11	TFA，于二氯甲烷中50％，裂解Boc	30
12	异丙醇；洗涤并脱色	2
13	DIPEA，于二氯甲烷中10％；中和	3
14	MeOH，洗涤	1
15	DIPEA，于二氯甲烷中10％；中和	3
16	MeOH，洗涤	1
17	二氯甲烷；洗涤，两次	2

按照上述示意流程图合成的产品：

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(pCl)-Xxx-A-B-Yyy-Zzz-Arg-Pro-D-Ala-NH_2

（按照通式I）

使用按照Th.Christensen; Acta Chem. Scand,B 33,763(1979)的氯醌试验和按照Stewart,Young的Kaiser′s茚三酮试验检测合成的完成程度。

本发明涉及治疗病毒感染（优选治疗AIDS）的药物的制备方法。也描述了可用于抗病毒治疗的新肽及其合成。即使在最高剂量，肽的毒性也很低。与同时试验的参考化合物叠氮基胸苷相比，在NCI试验中，所试肽的EC50值在5.9×10^{-7}mol/l和2.0×10^{-5}mol/l之间。

同时试验的参考化合物AZT（叠氮基胸苷），例如，EC50值为3.10 $\times 10^{-9}$mol/l．所有化合物的剂量在10^{-4}至10^{-8}mol/l．因而通常所述的IC50值（在未感染培养物中细胞50％死亡的抑制浓度）比最高剂量高。

处理的感染培养物的EC50值为4.5×10^{-5}mol/l．既然处理的，未感染培养物的值未达到IC50值，只有给出最高剂量的值作为IC50值，即IC50=>3.3×10^{-5}mol/l．治疗指数（TI50=IC50/EC50）便大于7.30。

抗HIV活性筛选方法的说明

本方法适于找出在病毒增殖周期的所有阶段有效的活性物质．试验原理是基于HIV病毒对T4淋巴细胞的破坏。

向细胞培养物中加入小量的HIV病毒．需要至少两个完整的病毒增殖周期以破坏T4淋巴细胞并可以评价结果。

为了影响病毒活性并因此封闭病毒增殖，与病毒颗粒（病毒样颗粒）、细胞或病毒基因产物的反应活性物质，会保护细胞不被破坏和溶解。

试验系统自动检测大量的病毒感染的细胞．然而，降解、变性或被快速代谢的化合物使用此方法时结果不可靠。

AZT（叠氮基胸苷）和IDDC作为该试验的阳性对照。

试验方法

1.T4淋巴细胞（CEM细胞系）与病毒以病毒：细胞约1:0.05的比例在微滴定板中混合。

2.除非另有声明，试验物质溶于二甲基亚砜（DMSO）中并以1:200的比例（重量比）稀释。

其它稀释液用DMSO以半对数方式制备并加入到感染和未感染细胞培养物中。

3.培养物在37℃，5％CO_2的环境中孵育6-7天。

4.将四唑盐XTT加入细胞培养物中，细胞培养物进一步孵育以通过N-甲磺酸吩嗪酯（PMS）与存活细胞偶联产生甲簪颜色反应。

5.个体细胞培养物用分光光度计分析并在显微镜下检查寻找存活细胞，以证实保护作用。

6.处理的、病毒感染细胞与处理的、未感染细胞比较。其它比较（未处理的、感染细胞和未处理的、未感染细胞，含活性物质，无细胞的抑制）在同一块板上进行。

7.鉴定试验化合物的活性。

其余的试验细节见Weislow, J. Nat. Canc. Inst. 81(8),577页(1989)。

于是本发明的肽适于抗AIDS及抗与人类免疫缺陷病毒有关的感染性疾病（AIDS相关综合症，ARC）的药物的制备。

剂量资料

本发明药物的剂量为每天0.01mg至10mg之间。

实施例 1

通式II的肽:

质谱: $[M+H^+]=1431$

^1H-NMR-谱 (DMSO-d_6, 250MHz) δ (ppm):

8.65-7.1;多个多重峰, 芳基和NH信号; 7.0和6.6, 2.1, 4H, 芳基H Tyr; 5.95 m, $NHCONH_2$ Cit; 4.8-4.1, 几个多重峰, C_dH; 3.75和3.5, 2个重峰; 脂肪族H; 3.2-2.65, 几个多重峰, CβH脂肪基和芳香基氨基酸; 2.1-1.3, 几个多重峰, 脂肪族残基 H; 1.780, d, 3H, CH_3CO^-; 1.20, d, 3H, CβHA11a; 0.80, m, Nle.

实施例 2

通式III的肽:

^1H-NMR-谱 (DMSO-d_6, 250MHz) δ (ppm):

8.65-7.1;多个多重峰, 芳基和NH信号; 7.0和6.6, 2d, 4H, 芳基H Tyr; 5.9m, $NHCONH_2$ Cit; 4.8-4.1, 几个多重峰, C_2H; 3.75和3.5, 2个重峰; 脂肪族H; 3.2-2.65, 几个多重峰, CβH脂肪基和芳香基氨基酸; 2.1-1.25, 几个多重峰, 脂肪族残基H; 1.70, s, 3H, CH_3CO^-; 1.20, d, 3H, CβHA, Ala; 0.85, m, 3H, Nva.

质谱: $[M+H^+]=1417$

实施例 3

通式IV的肽:

质谱: $[M+H^+]=1469$

^1H-NMR-谱 (DMSO-d_6, 250MHz) δ (ppm):

8.2-6.5;多个多重峰，芳基和NH信号；5.8和5.4,2 m, 3H, $NHCONH_2$ Citrollia,4.5, 4.3, 4.2和4.0,多重峰，CdH; 3.8-2.6,几个多重峰；脂肪基和芳香基CβH; 2.0-1.9,几个多重峰，脂肪族残基质子；1.6,s,3H,CH_3CO^-; 1.1,d,2H,CβH Ala;0.7,d,6H,C H Leu.

实施例 4

通式V的肽，INN: cetrorelix

质谱: $[M+H^+]=1431$

^1H-NMR-谱（DMSO-d_6,250MHz）δ(ppm):

8.7-7.2;多个多重峰，芳基和NH信号；7.05和6.65,2d,4H,芳基H Tyr;5.85,m $NHCONH_2$ Cit; 4.8-4.1,几个多重峰，$C_\alpha H$; 3.8和3.55,2 m脂肪族H; 3.3-2.7,CβH脂肪基和芳香基氨基酸；2.1-1.3,几个多重峰，脂肪基残基信号；1.7,s,3H,CH_3CO^-;1.2,d,3H,CβH, Ala;0.85, 2d, 6H,CδH Leu.

实施例 5

通式VI的肽:

质谱: $[M+H^+]=1444$

^1H-NMR-谱（DMSO-d_6,250MHz）δ(ppm):

8.6-7.1;多个多重峰，芳基和NH信号；7.0和6.6,2d,4H,芳基H Tyr;4.8-4.0,几个多重峰，$C_\alpha H$; 3.7和3.5,2 m 4H;3.2-2.7,几个多重峰，CβH脂肪基和芳香基氨基酸；2.0-1.0,几个多重峰，脂肪族残基信号；1.7, s, 3H, CH_3CO; 1.2,d,3H,CβH, Ala; 0.8, dd, 6H,C H Leu.

实施例 6

通式VII的肽:

质谱: $[M+H^+]=1431$

^1H-NMR-谱 (DMSO-d_6, 250MHz) δ (ppm):

8.6-7.1;多个多重峰, 芳基和NH信号; 7.0和6.6, 2d, 4H, 芳基H Tyr; 5.9, m $NHCONH_2$ Cit; 4.8-4.0, 几个多重峰, $C_\alpha H$; 3.85和3.5, 2个多重峰 脂肪族H; 3.1-2.7, 几个多重峰, $C_\beta H$脂肪基和芳香基氨基酸; 2.1-1.3, 几个多重峰, 残基脂肪H; 1.7, s, 3H, CH_3CO^-; 1.2, d, 3H, C_β H, Ala; 0.85, s, 9H, 叔丁基, Tle。

实施例 7

通式VIII的肽:

质谱: $[M+H^+]=1405$

^1H-NMR-谱 (DMSO-d_6, 250MHz) δ (ppm):

9.1-7.3;多个多重峰, 芳基和NH信号; 7.21, dd, 4H, 芳基H p-cl-Phe; 7.0和6.6, 2d, 4H, 芳基H Tyr; 5.9和5, 4, 2m, 3H, $NHCONH_2$ Cit; 4.7-4.1, 几个多重峰, $C_\alpha H$; 3.55和2.8, 几个多重峰, $C_\beta H$ 脂肪基和芳香基氨基酸; 1.70, s, 3H, CH_3CO^-; 1.55和1, 45, 2m, 脂肪族信号Arg和Leu; 0.80, dd, 6H, $C_\delta H$ Leu。