

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97197122.6

[43]公开日 1999年9月1日

[11]公开号 CN 1227501A

[22]申请日 97.8.5 [21]申请号 97197122.6

[30]优先权

[32]96.8.7 [33]IL [31]119029

[86]国际申请 PCT/IL97/00265 97.8.5

[87]国际公布 WO98/05361 英 98.2.12

[85]进入国家阶段日期 99.2.8

[71]申请人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

[72]发明人 M·弗里德金 Y·谢赫特

E·格肖努韦

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

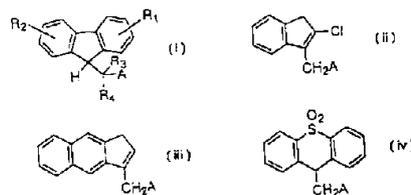
代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 31 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 长效药物及含有该长效药物的药物组合物

[57]摘要

本发明涉及带有弱碱敏感官能团并且可在生理条件下缓慢水解为原始活性药物分子的前药及其可药用盐。所述前药优选为式 X-Y, 其中 Y 为药物的组成部分, 该部分至少带有一个选自游离氨基、羧基、羟基和/或巯基的官能团; 同时, X 是选自式 (i) - (iv) 的基团, 其中 R₁ 和 R₂ 相同或不同并且分别为氢、烷基、烷氧基、烷氧基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、卤素、硝基、磺基、氨基、铵、羧基、PO₃H₂ 或 OPO₃H₂; R₃ 和 R₄ 相同或不同并且分别为氢、烷基或芳基; 同时, 当 X 基团与药物 Y 的羧基或巯基连接时 A 为共价键, 或当 X 与药物 Y 的氨基或羟基连接时 A 为 OCO-; 以及它们的可药用盐。此类前药的例子是那些 Y 为胰岛素、人或牛生长激素、抗生素、普萘洛尔等部分的前药。



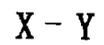
ISSN 1000-84274



权 利 要 求 书

1. 在生理条件下缓慢水解成为原始活性药物分子的前药或其可药用盐，其特征在于：该前药中至少一个原始药物分子的游离氨基、羟基、巯基和/或羧基被官能团取代，所述官能团对弱碱敏感并可在弱碱条件下脱除。

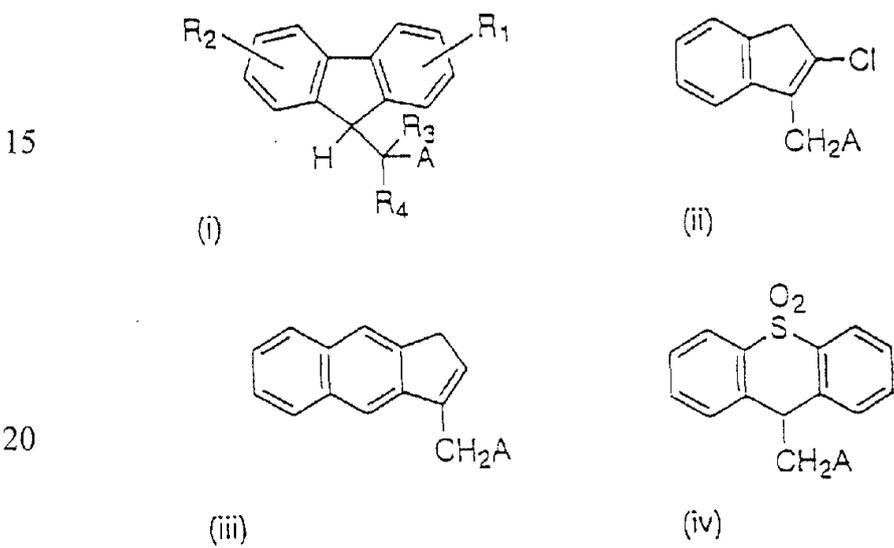
2. 根据权利要求 1 的前药，该前药如下式所示：



其中，

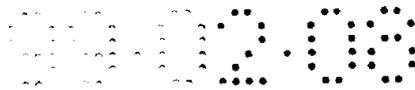
Y 为药物的组成部分，该部分至少带有一个选自游离氨基、羧基、羟基和/或巯基的官能团，和

X 是选自式 (i)-(iv) 的基团：



其中， R_1 和 R_2 相同或不同，它们分别为氢、烷基、烷氧基、烷氧基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、卤素、硝基、磺基、氨基、铵、羧基、 PO_3H_2 或 OPO_3H_2 ； R_3 和 R_4 相同或不同并且分别为氢、烷基或芳基；同时，当 X 基团与药物 Y 的羧基或巯基连接时 A 为共价键，或当 X 与药物 Y 的氨基或羟基连接时 A 为 $OCO-$ ；以及其可药用盐。

3. 根据权利要求 2 的前药，其中，Y 为适用于人体或动物的药物的组成部分，所述药物包括抗糖尿病药、抗生素、合成杀菌剂、镇痛药、抗炎药、抗变态反应药、抗哮喘药、抗高胆甾醇药、 β -肾上腺能



阻断剂、抗高血压药、抗肿瘤药以及抗病毒药。

4. 根据权利要求 2 的前药，其中，Y 部分至少被一个由基 (i) 组成的 X 基团取代，基团 (i) 中的 R_1 为氢或磺基同时 R_2 、 R_3 和 R_4 为氢。

5 5. 根据权利要求 4 的前药，其中 Y 为胰岛素的一部分，其胰岛素分子中的游离氨基和/或羧基以及任选的游离羟基至少被一个所述 (i) 基团取代。

6. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，其中一个或多个氨基被 9-芴基甲氧基羰基 (i) 取代，并且基团 (i) 中的 R_1 - R_4 为氢并且 A 为 OCO- (此后为 N-(Fmoc)-胰岛素)。

10 7. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，其中一个或多个羧基被 9-芴甲基羰基 (i) 取代，并且基团 (i) 中的 R_1 - R_4 为氢并且 A 为共价键 (此后为 C-(Fm)-胰岛素)。

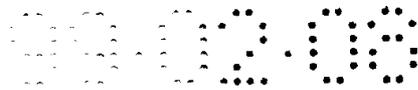
8. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，其中的一个或多个氨基被 Fmoc 基取代，同时，一个或多个羧基被 Fm 基取代 (此后为 N-(Fmoc)、
15 C-(Fm)-胰岛素)。

9. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，其中的一个或多个羧基被 Fm 基取代，同时，一个或多个羟基被 Fmoc 基取代 (此后为 C-(Fm)、O-(Fmoc)-胰岛素)。

10. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，其中的一个或多个氨基和羟基被 Fmoc 基取代，同时，一个或多个羧基被 Fm 基取代 (此后为 N, O-(Fmoc)、C-(Fm)-胰岛素)。

11. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，该衍生物在其 Gly^{A1} 、 Phe^{B1} 或 Lys^{B29} 上的游离氨基带有 1-3 个取代基，其中 A 和 B 是胰岛素分子链，该衍生物选游离 Gly^{A1} -N-(Fmoc)-胰岛素、 Phe^{B1} -N-(Fmoc)-胰岛素、
25 Lys^{B29} -N-(Fmoc)-胰岛素、 Gly^{A1}, Phe^{B1} -N-(Fmoc)₂-胰岛素、 Gly^{A1}, Lys^{B29} -N-(Fmoc)₂-胰岛素、 Phe^{B1}, Lys^{B29} -N-(Fmoc)₂-胰岛素、 $Gly^{A1}, Phe^{B1}, Lys^{B29}$ -N-(Fmoc)₃-胰岛素。

12. 根据权利要求 5 的胰岛素衍生物，该衍生物在其 Gly^{A1} 、 Phe^{B1} 或 Lys^{B29} 上的游离氨基带有 1-3 个 2-磺基-Fmoc 取代基 (此后为 Sulfmoc)，其中 A 和 B 是胰岛素分子链，该衍生物选游离 Gly^{A1} -N-(Sulfmoc)-胰岛素、 Phe^{B1} -N-(Sulfmoc)-胰岛素、 Lys^{B29} -N-(Sulfmoc)-胰岛素、
30 Gly^{A1}, Phe^{B1} -N-(Sulfmoc)₂-胰岛素、 Gly^{A1}, Lys^{B29} -N-



(Sulfmoc)₂-胰岛素、Phe^{B1},Lys^{B29}-N-(Sulfmoc)₂-胰岛素、Gly^{A1},Phe^{B1},Lys^{B29}-N-(Sulfmoc)₃-胰岛素。

13. 根据权利要求 5-12 任一项所述的 (Fmoc、Sulfmoc 或 Fm)-胰岛素衍生物，其中的胰岛素为天然、重组或突变的人、牛或猪胰岛素。

5 14. 一种 Fmoc-生长激素，它选自人和牛生长激素。

15. 一种 Fmoc 头孢氨苄，它选自 N-Fmoc-头孢氨苄和头孢氨苄苄甲酯。

16. 二-(苄基甲氧基羰基)-多粘菌素 B。

17. 哌拉西林苄甲酯。

10 18. Fmoc-普萘洛尔。

19. 一种药物组合物，该组合物包括权利要求 1-18 任一项所述的前药或其可药用盐和可药用载体。

20. 根据权利要求 19 的药物组合物，该组合物包含权利要求 5-13 任一项所述的 N-(Fmoc)-胰岛素。

15 21. 根据权利要求 20 的药物组合物，该组合物包含天然或重组的人 N-(Fmoc)₃-胰岛素和/或天然和/或重组的人 N-(Fmoc)₂-胰岛素。

22. 根据权利要求 19-21 任一项所述的药物组合物，该组合物用于皮下注射、经皮或口服给药。

20 23. 根据权利要求 1-18 任一项所述组合物在制备药物组合物中的应用。

24. 一种治疗糖尿病的方法，该方法包括给糖尿病患者施用有效量的一种或多种如权利要求 5-13 任一项所述的胰岛素衍生物。

25 25. 根据权利要求 24 的方法，其中以 5-8 天的间隔期给患者施用有效剂量的 N-(Fmoc)₂-胰岛素和 N-(Fmoc)₃-胰岛素。

26. 根据权利要求 24 或 25 的方法，其中的 N-(Fmoc)-胰岛素通过皮下注射给药。

27. 根据权利要求 24-26 任一项所述的方法，该方法进一步包括胰岛素的每日注射给药。

30

说明书

长效药物及含有该长效 药物的药物组合物

5

发明领域

本发明涉及一种新的能够在体内经化学转化作用由失活型成为生物活化型的长效前药以及含有它们的药物组合物，所述前药具有对弱碱条件敏感的官能团，更优选该前药被苄基甲氧基羰基(Fmoc-)和苄甲基(Fm-)取代。

10

发明背景

根据不同的标准可将在人体和动物治疗中都适用的常规治疗性药物分成不同类型。例如，可根据药物的分子将其类分为蛋白质-肽型(即由氨基酸结构单元组成)或非肽型；或根据与结构不相关的标准来分类，例如按照药物进入血循环内的方式来分类，即口服吸收或其他方式的给药(即注射、鼻内或局部)。

15

通常，口服吸收的药物具有低分子量、相当的稳定性、亲脂性(“油性”)以及非肽特性。事实上，所有肽类和蛋白质药物都不符合上述要求，并由此几乎必需通过注射给药，这应归因于它们的亲水本质(非亲脂性)、极性特征以及代谢不稳定性。此外，由于这些分子在体内以不同的机制(尤其是蛋白水解作用)快速降解，因此它们通常为短效类型的药物。

20

非肽型药物通常极其疏水并可以能够经胃肠道途径进入血循环中。鉴于它们相对的化学稳定性，非肽型药物常常为长效类型的药物。

25

蛋白质和肽类药物已有大量并重要的临床应用，例如，胰岛素在糖尿病治疗中、促性腺激素释放激素(GnRH)类似物在前列腺癌治疗中、降钙素在骨骼疾病治疗中的应用。虽然此类极其重要的分子的潜在性能是巨大的，但上述开发也仅仅是部分的。从广义上讲，这是由上述药物较短的体内存活期以及不方便的给药方式造成的。非肽类药物(例如抗生素)虽然相对长效，但若要保持所需的血药浓度，它们也不得不在一天给药数次并且持续一周或更长的时期。

30

口服吸收的药物在治疗人体疾病中极为需要，尤其是在长期治疗



中。结构改进的药物可使口服和局部的吸收、生物稳定性及生物利用度得到提高。许多努力都是以上述效果为目的。多数的包括对药物天然结构(即生物活性结构)进行修饰在内的方法还在被继续采用。这种天然结构能被药物靶位特异性识别并且是药物效能的必备特征。然而不幸的是,在众多种情况下,天然结构还会被“清除机械体系”识别,这种体系能够结合、降解或代谢药物,从而加速了药物的处理过程。因此,生物活性结构的稳定性应该伴随有较高的代谢稳定性。可以降低溶解性的方法及活性改性业已用来达到上述目标。

事实上,许多但不是所有市场上现存的肽类药物及非肽类药物都非常需要延长它们的半衰期或者被进一步开发,这些药物包括:抗生素、抗病毒药、抗过敏药、抗炎药、镇痛药、抗胆固醇血药、抗癌药、抗糖尿病药、生长刺激剂以及其他药物。开发那些在某些浓度阈值以上即产生毒性的药物的前药尤其有益。

发明概述

本发明的一个目的是提供新的前药,其特征在于,所述前药具有对弱碱条件的高度敏感性以及在体内生理条件下经过转化作用、由失活形式变为生物活性形式的能力。

本发明的另一个目的是提供从具有游离氨基、羧基、羟基和/或巯基基团的药物衍生得到的前药,所述前药基本上是无生物活性的,但在给药后能够自发并缓慢地在体内转化为原始活性药物的分子。

本发明的一个目的还在于提供具有较高代谢稳定性以及增强的生物利用度的前药。

本发明的还一个目的在于提供具有可供选择的给药可行性的前药,例如,口服和经皮给药,以及其他能够穿过生理屏障(例如血脑屏障)的给药。

本发明的又一个目的是提供使特异性药物靶向作用于体内患病部位的前药。

因此,本发明涉及新的衍生自一种药物并被对碱敏感并在弱碱条件下(例如生理条件下)可脱除的官能团取代的前药,所述药物的分子上带有一个或多个选自游离氨基、羧基、羟基和/或巯基的基团。

本发明所述缓释药物的新意在于它们衍生成新的通常是更加疏水的药物衍生物。在此方法中,优选失去而不是保留药物的天然构象、



生物功效及被降解体系识别药物的标记。这种方式的一个优越性是实际中，改性的衍生物在体内条件下可缓慢并自发地水解并恢复成为天然活性药物。

在本发明的一个优选实施方案中，本发明所述前药如下式所示：

5

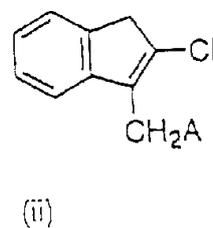
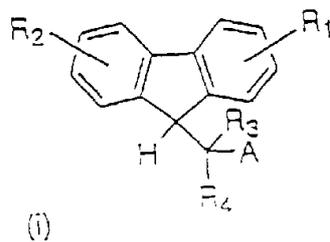
X-Y

其中，

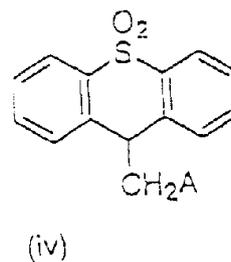
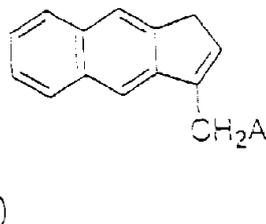
Y 为药物的组成部分，该部分至少带有一个选自游离氨基、羧基、羟基和/或巯基的官能团，和

X 是选自式 (i)-(iv) 的基团：

10



15



20

其中， R_1 和 R_2 相同或不同，它们分别为氢、烷基、烷氧基、烷氧基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、卤素、硝基、磺基(硫代)、氨基、铵、羧基、 PO_3H_2 或 OPO_3H_2 ； R_3 和 R_4 相同或不同并且分别为氢、烷基或芳基；同时，当 X 基团与药物 Y 的羧基或巯基连接时 A 为共价键，或当 X 与药物 Y 的氨基或羟基连接时 A 为 $OCO-$ 。

25

在本发明中，Y 为任何适用于人体和动物的药物组成部分，该部分至少包含一个官能团并且所述官能团选自游离氨基、羧基、羟基和/或巯基；Y 是例如但不仅仅是：胰岛素；生长激素，例如人生长激素、牛生长激素；抗生素，例如氨基苄类抗生素，具体如庆大霉素、新霉素、链霉素、 β -内酰胺；例如青霉素类类抗生素，具体如羟氨苄青霉素、氨苄青霉素、氧哌嗪青霉素；头孢菌素类抗生素，具体如头孢克

30



洛、和头孢氨苄；大环内酯类抗生素，具体如碳霉素和红霉素；多肽类抗生素，具体如杆菌肽、短杆菌肽和多粘菌素；合成抗菌素，例如甲氧苄啶、吡咯嘧啶酸和磺胺二甲嘧啶；镇痛药和抗炎药，例如对乙酰氨基酚、阿斯匹林、异丁芬酸、消炎痛；抗变态反应药和平喘药，
5 例如氨来占司和色甘酸；抗高胆固醇药，例如氯贝酸、氧烟酸和曲帕拉醇； β -肾上腺素能阻断剂和抗高血压药，例如布拉洛尔、卡托普利、茚诺洛尔、普萘洛尔和 4-氨基丁酸；抗肿瘤药，例如柔红霉素、阿扎胞苷、6-巯基嘌呤、干扰素、白介素-2、甲氧蝶呤、紫杉醇和长春花硷；抗病毒药，例如无环鸟苷、丙氧鸟苷、金刚烷胺、干扰素、AZT
10 和利巴韦林等。本发明所述药物还包括信息素。

R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 定义中的术语“烷基”、“烷氧基”、“烷氧基烷基”、“芳基”、“烷芳基”和“芳烷基”是指含有 1-8 个碳原子，
15 优选 1-4 个碳原子的烷基基团(例如甲基、乙基、丙基、异丙基和丁基)以及含有 6-10 个碳原子的芳基(例如苯基和萘基)。术语“卤素”包括溴、氟、氯和碘。

在本发明优选实施方案之一中，官能团为基团(i)，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 为氢并且 A 为 $OC(=O)-$ ，即是常见的 9-芴基-甲氧基羰基(Fmoc)基
20 团，该基团广泛地应用于肽类合成中氨基的临时性可逆保护(参见 L. A. Carpino, Acc. Chem. Res. (1987) 20, 401-407)。Fmoc 基团特别适宜肽类的合成，这应归因于该基团的引入和脱除易于操作及其作为肽类合成和常规纯化先决条件的选择稳定性。此外，相关的 9-芴甲基(Fm)也适合羧基官能团(例如氨基酸)的可逆性保护。所得的 9-芴甲基酯(Fm-酯)用弱碱处理并经过 β -消除方式生成母体的游离羧基，因此这种酯同样适于可逆性地掩蔽药物的羧基官能团。Fmoc-基团还适宜用来可
25 逆性保护酪氨酸丝氨酸及苏氨酸中的羟基。

卤代的 Fmoc 基(i)中，其中 R_1 和 R_2 至少之一是位于 2 或 7 位的卤素，
30 优选是氯和溴；2-氯-1-芴基甲氧基羰基(CLIMOC)(ii)、1-苯并[f]芴基甲氧基羰基尿烷(BIMOC)(iii)、尿烷砜基(iv)以及 A 为共价键的相应(i)-(iv)基团皆与 Fmoc 和 Fm 类似，适用于取代药物的游离氨基、羧基、羟基和巯基官能团，由此为上述基团碱性条件下(例如生理条件下)的脱除提供了更宽的敏感范围。事实上，上述基团(i)-(iv)属于普通类型中不常见的化学基团系列，它们可以在中性或弱碱性 pH



及温和条件下进行水解，因此可用于 α -和 ϵ -氨基的临时性可逆保护，例如在肽类合成中，并且这些基团在弱碱条件下通过 β -消除反应从氨基官能团上脱除掉。

5 本发明的基团(i)-(iv)中，优选与氨基和/或羟基部分共价连接的Fmoc或与羧基和/或巯基部分共价连接的Fm在体液的生理条件下，换言之在pH 7.4和37℃下，可以水解(通过 β -消除反应)出游离氨基、羟基、巯基或羧基官能团。

10 本发明所述前药可以通过药物分子与含有(i)-(iv)基团的适当反应物之间的反应制得。若干9-芴甲基(Fm)的衍生物较适用，例如9-芴甲基-N-羟基琥珀酰亚胺(Fmoc-OSu)，该物质是一种极特异的氨基官能团反应物；与氨基和羟基反应并共价连接的9-芴基甲氧基羰基氯(Fmoc-Cl)；与巯基反应并生成S-Fm-衍生物的9-氯代甲基芴(Fm-Cl) (Bodanszky & Bednarek, 1982)；以及与羧基官能团反应并酯化的9-芴基甲醇(Fm-OH)。

15 碱性条件下敏感并由不同于 β -消除的途径从氨基、羧基、羟基或巯基官能团脱除的基团也可以被采用，但是，它们通常需要繁琐的操作，这不适合用来保护药物。而一个已知的例外是三氟乙酰基(TFA)，该基团与Fmoc相当类似并十分易于从氨基脱除，但它具有潜在的毒性，因此由TFA衍生的药物不被推荐为药用。另一方面，Fmoc-氨基酸
20 (例如Fmoc-亮氨酸)在动物试验模型中显示出较低的毒性指数。

附图简述

25 图1表示Lys^{B29}-N-(Fmoc)₁-胰岛素(实心方形)、Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素(空心方形)和Gly^{A1}、Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₃-胰岛素(所有三各氨基酸位都被取代，空心圆)在无细胞生物试验(用胰岛素受体酪氨酸激酶的浓缩制剂磷酸化[聚(Glu₄Tyr)]中的活化(pH 7.4, 37℃)时间过程。

图2表示：(Fmoc)₂-胰岛素(3mg/只大鼠，以2ml 10% DMSO为溶剂)和NPH-胰岛素(3mg/只大鼠)的单剂量腹膜内给药对正常大鼠血液葡萄糖浓度的影响。

30 图3表示：(SulFmoc)₂-胰岛素和天然胰岛素(都为3mg/只大鼠，以1ml水为溶剂)的单剂量腹膜内给药对正常大鼠血液葡萄糖浓度的影响。

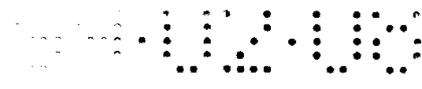


图 4 表示: 胰岛素(空心方形)和 Gly^{A1}、Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₃-胰岛素(实心方形)在胰蛋白酶和糜蛋白酶作用下的降解。

图 5 表示: 单剂量给药的 Gly^{A1}、Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₃-胰岛素(实心圆)对链脲霉素(STZ)治疗的糖尿病大鼠血液葡萄糖浓度的影响, 以天然胰岛素给药为参照(空心方形)。

图 6 表示: Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素单剂量 STZ 治疗的高血糖大鼠给药后在将血液葡萄糖浓度方面引起的延迟作用。

图 7 表示: 通过温育下生成活化的β-普萘洛尔, N-Fmoc-普萘洛尔所表现出的肾上腺素能拮抗作用。

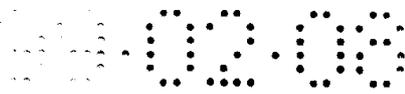
10 发明详述

本发明涉及新的前药, 该前药可用于开拓更好的给药途径并由此提高药物的稳定性和生物活性。在本发明新方案中, 优选失去而不是保留药物的天然结构、生物性能及靶向识别能力, 但一经施用, 这种改性的药物将自发并缓慢地转化并恢复为原始的活性药物分子。

15 在本发明中, 许多常用药物可以被转化为非活性前药, 这些前药成为长效型药物, 由此避免了由机体内受体介导的普通降解作用。本发明所述前药是根据在体内生理条件下以同源方式可以自发并再生为原始药物的目的来设计的。可提供多种产生前药的化学方法, 以便根据需
20 要得到快的或慢的再活化速率。此外, 改进前药的疏水指数并赋予前药在血循环中自发再生的特征都可以将非口服吸收药物转化为可胃肠渗透的前药。

本发明所述前药包括适合人和动物使用的改性药物以及改性的昆虫信息素。

25 就本发明的一个方面而言, 所述前药为改性胰岛素。目前, 胰岛素是治疗糖尿病的优势药物, 所谓糖尿病是以血糖过多、类脂、碳水化合物及蛋白代谢改变以及心血管疾病并发风险增高为特征的系列综合征。临床上可以将多数患者类分成胰岛素依赖型糖尿病(IDDM, I型)或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM, II型)。在西方国家, 约 90% 的糖尿
30 尿患者为 II 型糖尿病, 余者中的多数为 I 型糖尿病。美国约 70% 的 II 型糖尿病患者十分肥胖, 肥胖是产生胰岛素耐受性的一个重要因素。在 I 型糖尿病患者中出现胰腺β-细胞大量并选择性的损失以及胰岛素过低的状态。相反, II 型糖尿病患者中没有出现显著的胰岛β-细



胞缺失，这些患者的平均血浆胰岛素浓度在 24 小时内基本正常甚至更高，这应归因于外周阻力的激素作用。然而，II 型糖尿病个体的胰岛素相对缺失。这应归因于正常胰岛 β -细胞能够分泌一定量的胰岛素，但在对抗高血糖时这种分泌会比正常时的更高，由此使个体在适当的胰岛素耐受性时保持正常的血糖。

事实上，所有类型的糖尿病皆应归咎于循环内胰岛素浓度的减少(胰岛素缺失)、周围组织对胰岛素应答的降低(胰岛素耐受性)、抗胰岛素作用的激素过量(高血糖素、生长激素、皮质醇和儿茶酚胺)。这些激素的异常造成碳水化合物、类脂、酮类及氨基酸代谢的改变。这些综合症的核心特征为高血糖。

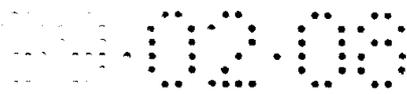
胰岛素在血浆内的半衰期约为 5-6 小时。胰岛素的降解主要在肝脏内进行并且在肾脏和肌肉内达到更低程度。约 50% 的到达肝脏门静脉中的胰岛素被破坏，从而无法进入体循环。胰岛素通过肾小球过滤并经肾小管再吸收及降解。

在肝脏内胰岛素的蛋白水解性降解主要是由受体介导的，其次，胰岛素受体结合型复合物被内化至被称为核内体的囊泡中并且在囊泡中开始降解。一些胰岛素还被转运到溶酶体内降解。在肝细胞内，约 50% 的内化胰岛素发生降解。

胰岛素不适于处置糖尿病酮酸中毒，但在非酮昏迷高血糖的治疗中以及在 I 型和 II 型糖尿病患者的近有效(perioperative)治疗中十分重要。胰岛素的皮下给药(s.c.)是所有 I 型糖尿病患者以及多数无法通过饮食和/或口服降血糖剂来充分控制的 II 型糖尿病患者的初级疗法。在所有病例中，不仅血糖而且其它造成胰岛素过低和高血糖的失衡代谢都可以被正常化。

主要基于胰岛素皮下给药的长期治疗无法模拟应答注射营养素时正常胰岛素分泌的快速升高和减退，并且表现出选择性的胰岛素外周效应而不是胰岛素肝效应，但是这种治疗获得了极大的成功。

传统的胰岛素皮下给药制剂按照它们的作用时间类分为短效(速效)、中效和长效胰岛素，还可以按照胰岛素的种类来源分类。人胰岛素目前被广泛利用，理论上来说，人胰岛素比猪胰岛素和牛胰岛素更不易致免疫，后两者与人胰岛素的区别之处分别在于一个和三个氨基酸。然而，当被高度纯化时，三种胰岛素都具有较低的但仍可测



出的刺激免疫应答的能力。通常，上述制剂在中性 pH 值下稳定并能够在室温下储存较长时间。出于习惯和治疗的目的，胰岛素的剂量和浓度都以单位 (U) 表示，这是基于诱发禁食兔正常血糖量所需的量。胰岛素同源制剂含有约 25 U/mg 胰岛素。几乎所有市售的胰岛素制剂都以浓度为 100U/mg 的溶液方式来供给。

短效或速效胰岛素是溶解在中性 pH 缓冲液中的胰岛素锌溶液，通常饭前 30-45 分钟时注射。这些制剂作用启动得极快并且持续时间最短。

在稳定的新陈代谢条件下，通常，正常胰岛素是以中效或长效制剂给药。中效胰岛素在水溶液中溶解度略低，因此它们在皮下给药后逐渐溶解，并且它们的作用持续时间较长。最常用的两种制剂是 NPH 胰岛素 (NPH 是指中性鱼精蛋白 hagedom) 和慢胰岛素，所述 NPH 胰岛素是一种介于磷酸盐缓冲液中并由加入的鱼精蛋白硫酸盐改性的结晶胰岛素锌缓冲液，所述慢胰岛素是介于乙酸盐缓冲液中并通过加入的氯化锌改性的使胰岛素溶解度减小的胰岛素悬浮液。

由于短效胰岛素的作用时间为 0.4-7 小时，中效胰岛素的作用持续时间为 1.5-20 小时，所以当抗调节激素 (抗胰岛素) 增加时，两种胰岛素合用的正确时间和剂量必需将已变化参数考虑在内，例如营养行为、夜间 (禁食) 低血糖和晨间的高血糖。若同时施用速效胰岛素和长效或中效胰岛素制剂时，这种药物合用的常见缺陷是：由于混用，短效胰岛素可以与长效或中效制剂的过量锌离子和鱼精蛋白复合，由此转化为中效甚至长效胰岛素。

长效胰岛素 (例如特慢胰岛素) 或扩展的胰岛素锌或胰岛素锌鱼精蛋白悬浮液都是锌、锌及鱼精蛋白过量加入的胰岛素制剂，目的在于得到不溶性的胰岛素制剂。它们是胰岛素锌微粒的悬浮液并且它们之间的区别仅在于决定作用持续时间的颗粒大小有所不同。与正常胰岛素不同的是，特慢效胰岛素启动十分缓慢并且具有延迟 (“平坦的”) 的作用峰。它们能够在全天内提供较低的基础胰岛素浓度，但它们的较长半衰期致使难以测出它们的最佳剂量，并且在达到稳态浓度前需要数天的治疗。牛和猪的特慢效胰岛素比人特慢效胰岛素具有更延迟的作用过程。据推荐，以正常日剂量作为给药剂量并每日共三次给药来开始治疗，随后采用每日一次或两次的注射。



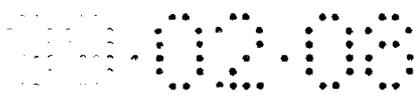
具有三个氨基酸和六个羧基的胰岛素适合被修饰。本发明的胰岛素衍生物是胰岛素 A 和 B 链被一个或多个上述 (i)-(iv) 取代基取代的胰岛素，取代位于 Gly^{A1}、Phe^{B1} 基团的一个或多个末端氨基、Lys^{B29} 的 ε-氨基、Asn^{A21} 和 Thr^{B30} 和/或 Glu^{A4}、Glu^{A17}、Glu^{B13}、Glu^{B21}。此外，如此取代的羧基和/或氨基胰岛素衍生物还可以进一步被一个或多个 (i)-(iv) 官能团在残基 Thr^{A8}、Ser^{A9}、Ser^{A12}、Tyr^{A14}、Try^{A19}、Ser^{B9}、Tyr^{B16}、Tyr^{B16}、Tyr^{B26}、Tyr^{B27}、和 Thr^{B30} 上的游离羟基位取代。

在本发明的一个优选实施方案中，胰岛素衍生物是 Gly^{A1} 和 Phe^{B1} 基团的游离末端氨基和/或 Lys^{B29} 的 ε-氨基被一个或多个 Fmoc 取代，由此得到在胰岛素分子的 A¹、B¹ 和/或 B²⁹ 位置带有 1-3 个 Fmoc 取代基的胰岛素衍生物，尤其是 Gly^{A1}-N-(Fmoc)₁-、Phe^{B1}-N-(Fmoc)₁-和 Lys^{B29}-N-(Fmoc)₁-胰岛素，Gly^{A1}、Phe^{B1}-N-(Fmoc)₂-、Gly^{A1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-和 Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-以及 Gly^{A1}、Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₃-胰岛素。

胰岛素与活化的 Fmoc，例如与 9-芴甲基-N-羧基琥珀酰亚胺 (Fmoc-OSu) 的反应生成了单-、二-和三-N-Fmoc-胰岛素，这些产物用 HPLC 方法很容易拆分开，可以分别得到它们的纯化形式。为得到产物单一的二-N-Fmoc 胰岛素，首先应将一个游离氨基例如用 t-Boc 基团保护起来，再将保护的胰岛素衍生物与过量 Fmoc-OSu 反应，随后脱除保护基制得所需的二-N-Fmoc 胰岛素。当向糖尿病患者给药时，单-、二-和三-N-Fmoc-胰岛素在体内转化为原始胰岛素并以不同的(包括延迟的)持续时间发挥抗糖尿功效。

为仅使胰岛素 (C-Fm) 的羧基被取代，即 Asn^{A21} 和 Thr^{B30} 的末端以及 Glu^{A4}、Glu^{A17}、Glu^{B13} 和 Glu^{B21} 残基中的羧基被取代，应首先保护胰岛素分子中的游离氨基，例如用 t-Boc 保护，随后进行一个三步反应，其中 (1) 游离羧基与例如邻硝基苯酚或 N-羧基琥珀酰亚胺反应，转化为活泼的酯基团；(2) 在咪唑的存在下，活化的酯基团与 9-芴甲醇反应；和 (3) 脱除 t-Boc。另一种方法是将羧基与 N,N'-二环己基碳化二亚胺、9-芴甲醇和 4-二甲基氨基吡啶直接酯化的一步反应，此后脱除 t-Boc。

当希望得到氨基和羧基同时被取代的 Fmoc-胰岛素衍生物 (N-Fmoc, C-Fm) 时，首先与 Fmoc-OSu 反应得到 N-Fmoc 衍生物，随后将



N-Fmoc 与 9-芴甲醇反应以转化为活泼的酯，如上所述。

为了制备羧基和羟基官能团取代的 Fm, Fmoc-胰岛素衍生物 (C-Fm, O-Fmoc)，首先应用 t-Boc 保护氨基，再按照上述方法制备 C-Fm 胰岛素衍生物，此后与 9-芴甲氧基碳酸酐反应并脱除 N-t-Boc 保护基。

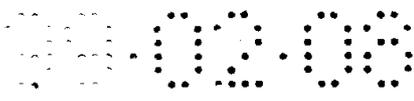
为制备在氨基、羧基和羟基官能团位取代的 Fm, Fmoc-胰岛素衍生物 (N, O-Fmoc, C-Fm)，按照上述方法制备 N-Fmoc、C-Fm 胰岛素，随后与 9-芴基甲氧基碳酸酐反应。

本发明的改性胰岛素可以从任何适用于人体的胰岛素制得，例如天然、重组或突变的人胰岛素、猪或牛胰岛素。突变型胰岛素的例子有 B16-Tyr→His 人胰岛素类似物 (Kaarsholm & Ludvigen, 1995) 和 Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素类似物 (胰岛素 lispro)，这些胰岛素中的天然氨基酸序列中的 B28 和 B29 位发生反转。胰岛素 lispro 与人胰岛素等效，但它在皮下注射位的吸收更快 (Campbell 等人, 1996)。在一个优选实施方案中，胰岛素既可以是天然的也可以是重组的人胰岛素。

本发明的单-N-Fmoc-胰岛素衍生物经 [聚(Glu₄Tyr)] 磷酸化试验测定发现，其生物功效为天然胰岛素生物的 40-80%。同样根据 [聚(Glu₄Tyr)] 磷酸化试验的测定，二-和三-N-Fmoc-胰岛素衍生物分别为天然胰岛素功效的 2-9% 和 <1%。当以正确的比例适当使用时，这三种原型可以替代现有的用于糖尿病皮下治疗的短效、中效和长效胰岛素的传统混合物。对于胰岛素，本发明提供了含有一种或多种本发明胰岛素衍生物及可药用载体的药物组合物。为达到长效作用，该组合物应优选包含单用的或两者合用的 N-(Fmoc)₃-胰岛素或 N-(Fmoc)₂-胰岛素衍生物。药物组合物可以是任意的适当形式，例如口服制剂或皮下注射制剂。

在另一实施方案中，本发明涉及用于治疗糖尿病的方法，该方法包括给予糖尿病患者有效量的一种或多种本发明胰岛素衍生物。在优选实施方案中，所用衍生物为天然的或重组的 N-(Fmoc)₃-胰岛素或 N-(Fmoc)₂-胰岛素或两者的混合物，它们以 5-8 天的间隔期给药。若需要，采用 Fmoc-胰岛素衍生物的治疗由速效胰岛素的每天给药来完成。

在长效治疗中，胰岛素主要经皮下注射给药。现有的利用长效胰



胰岛素皮下给药的治疗方法存在糖尿病患者个体吸收差异的缺陷，这应归因于所施用的物质在皮下注射位置可能发生的扩散。本发明提供的胰岛素衍生物在胰岛素分子自身中具有“内置”减小的溶解度。这样可消除较大的人体内皮下吸收的差异，同时还减小甚至消除由类似物混合造成的干扰。三种 N-(Fmoc)-胰岛素原型的适当混合物可以历经延长了的作用持续时间，这归功于混合物将速效胰岛素的需要与 N-(Fmoc)₂-胰岛素和 N-(Fmoc)₃-胰岛素的缓释作用相结合，而这样的结合没有任何干扰作用。

本发明的另一实施方案中，本发明组合物含有单-、二-和三-N-Fmoc 胰岛素衍生物的混合物。N-(Fmoc)₃-胰岛素主要是长效胰岛素；N-(Fmoc)₁-胰岛素根据 [聚(Glu₄Tyr)] 磷酸化试验的测定具有 40-80% 的生物活性，并且在水溶液中显示出较高的溶解度；N-(Fmoc)₂-胰岛素根据 [聚(Glu₄Tyr)] 磷酸化试验的测定具有 2-9% 的生物活性并且在水溶液中不易溶。三种类似物都在 37℃ 的温度下和生理 pH 值下完全转化为活性胰岛素。因此，这三种类似物的适当混合物可以提供短效、中效和长效的作用，目前此类功效需通过正常胰岛素与含锌和鱼精蛋白的制剂的多剂量注射剂来获得。

本发明的其他方面是，适合人或动物使用的前药衍生自药物，所述药物包括但不限于是抗糖尿病药、抗炎剂、杀菌剂、抗病毒剂、抗肿瘤药、抗高血压药以及治疗免疫疾病、皮肤病和神经病的药物。

本发明的药物组合物包括前药或其抗炎药盐以及可药用载体。本发明涉及了适当的给药途径，例如通过常规的注射、植入、口服、直肠或局部给药。这些制剂可以利用本领域专业人员已知的常规方法来制备，例如“Remington 氏药物科学”，A. R. Gennaro 编辑，17 版，1985，Mack 出版公司，Easton, PA，美国。

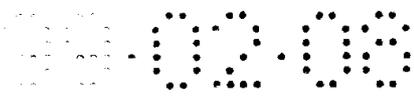
本发明将由下述非限制性的实施例进行阐述。

实施例

生物方法

(i) 链脲霉素 (STZ)-处理大鼠的准备

雄性 Wistar 大鼠 (180-200g) 由 Weizmann 科学院，激素研究部提供。按照 Meyerovitch 等人，1987 公开的方法，通过单剂量静脉内注射链脲霉素介于 0.1M 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中的新配溶液来诱发糖



尿病。

(ii) 胰岛素受体酪氨酸激酶的浓缩制剂

根据 Meyerovitch 等人, 1990 公开的方法, 从大鼠肝脏获得胰岛素受体酪氨酸激酶的浓缩制剂。简单而言, 在蛋白酶抑制剂存在的条件下将肝脏匀化, 用 1% Triton X-100 溶解并离心。令上清液穿过小麦胚凝集素 (WGA)-琼脂糖柱 (Sigma)。用 0.3M N-乙酰基-D-葡萄糖胺在 50mMHEPES 缓冲液 (pH 7.4) 中的溶液洗脱出被吸收的胰岛素受体部分, 该溶液还含有 0.1% Triton X-100、10% 甘油和 0.15M 氯化钠。利用 (iii) 和 (iv) 所述试验来评估胰岛素和胰岛素衍生物的生物功效。

(iii) 脂肪形成 (将标记的葡萄糖掺入到完整脂肪细胞的脂中)

基本采用 Rodbell, 1964 所述的方法来准备大鼠脂肪细胞。将雄性 Wistar 大鼠的脂肪垫用剪刀剪切成小块并悬浮在 3ml KRB 的缓冲液中, 该缓冲液含有 110mM 氯化钠、25mM 碳酸氢钠、5mM 氯化钾、1.2mM 磷酸二氢钾、1.3mM 氯化钙、1.3mM 硫酸镁和 0.7% BSA (pH 7.4)。在 25ml 变形塑料瓶中, 利用胶原酶并在卡波金 (含 5% 二氧化碳的氧) 的气氛、37°C 及剧烈搅拌的条件下进行消化。随后加入 5ml 缓冲液, 将细胞过筛。此后再将细胞在 15ml 塑料试管内室温下静置数分钟, 使其漂浮, 再将下层的缓冲液除去。该过程 (悬浮、飘浮、除去下层缓冲液) 重复三次。

将脂肪细胞悬浮液 (3×10^5 细胞/ml) 分装到塑料瓶中 (每瓶 0.5ml) 并在 37°C 和卡波金的条件下与 0.2mM [$U-^{14}C$] 葡萄糖共同保温 60 分钟, 塑料瓶内含有或不含胰岛素。加入含甲苯的闪烁液 (1.0ml 每瓶) 来终止脂肪形成, 对经提取的脂类内的放射性进行计数 (Moody 等人 1974)。在常规试验中, 胰岛素刺激的脂肪形成比基础值高 4-5 倍 (基础值为 2000cpm/ 3×10^5 细胞/小时; vinsulin 8000-10000cpm/ 3×10^5 细胞/小时)。在该试验中, 胰岛素刺激脂肪形成, 其 ED_{50} 值 = 0.15 ± 0.03 ng/ml (Shechter & Ron 1986)。具有 $ED_{50} = 15$ ng/ml 的胰岛素类似物的生物功效为天然胰岛素的 ~1%。

(iv) 受体酪氨酸激酶活性的测定

在本试验中, 胰岛素将其自身受体活化为磷酸化物, 一种含有摩尔比为 4:1 的 L-谷氨酸和 L-酪氨酸的无规共聚物 [聚 (Glu₄Tyr)]。



标准酶试验混合物(终体积 60 μ l, 以 HEPES 为溶剂, pH 7.4, 0.1% Triton X-100)含有 WGA 纯化胰岛素受体(5 μ g 蛋白)、20mM 氯化镁、2mM 二氯化锰、100 μ M ATP 以及不同浓度(1ng/ml-10ng/ml)的胰岛素或胰岛素衍生物。在 22 $^{\circ}$ C 下预保温 30 分钟, 加入聚(Glu₄Tyr)(终浓度 0.7mg/ml)引发反应, 反应在 22 $^{\circ}$ C 进行 20 分钟并加入 EDTA(20mM)终止反应。通过放射免疫测定法并利用磷酸酪氨酸的特异性单克隆抗体(最终稀释度: 1:100,000)和 ¹²⁵I-BSA-磷酸酪氨酸偶联物来定量分析聚(Glu₄Tyr)中的磷酸酪氨酸。在此特定试验中, 胰岛素在 20 \pm 3ng/ml 的浓度时表现半数最高效能。具有 ED₅₀ = 2ng/ml 的胰岛素类似物的生物功效为胰岛素的~1%。

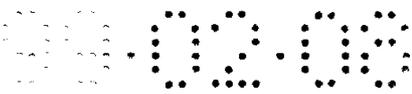
实施例 1: N-Fmoc 胰岛素衍生物的准备

(a) 合成

将人胰岛素(100mg, 17.2 μ mol)(由 Biotechnology-General, Rehovot, Israel 捐赠)悬浮在 4ml 含有 17.7mg(172 μ mole)三乙胺的分析纯二甲基甲酰胺(DMF)溶液中。加入 Fmoc-Osu(58mg, 172 μ mole)。将均匀的反应混合物在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 20 小时, 随后加入乙酸乙酯直至溶液混浊, 再加入乙醚使其沉淀完全。离心, 除去溶剂, 沉淀物分别用乙醚和水洗涤两次。由此得到单-、二-和三-N-Fmoc 胰岛素衍生物的混合物, 该混合物通过制备 HPLC 分离并纯化。用异丙醇洗涤固体粗产物可以将单修饰的 N-Fmoc-胰岛素衍生物从双-、三-修饰的衍生物中分离出来。

(b) N-Fmoc-胰岛素衍生物的分离和纯化

将固体粗产物上样到带有 HPLC 预装柱(Merck, LichrosCART 250-10mm, 含有 LICHrosob RP-18 [7 μ m])的反相 HPLC 中。线性梯度液从 0.1%三氟乙酸(TFA)的水溶液(溶液 A)和 0.1%TFA 的乙腈:水(75:25)溶液(溶液 B)开始。流速为 1ml/min。N-(Fmoc)₁-胰岛素自柱中出现的保留时间为 21.1、21.9 和 22.8 分钟。N-(Fmoc)₂-胰岛素衍生物的保留时间为 26.3、27.1 和 27.7 分钟, N-(Fmoc)₃-胰岛素的保留时间为 31.5 分钟。合并 21-23 分钟、26-28 分钟和 31.5 分钟时的馏分, 冻干并化学定性。将 21-23 分钟的相应馏分(单修饰的胰岛素)和 26-28 分钟的相应馏分(双修饰的胰岛素)进一步分别纯化为各个单-Fmoc 和二-Fmoc 胰岛素衍生物。连接在胰岛素分子上的 Fmoc 基团的



量可利用分光光度法在 301nm 下测定, 随后用含 50% 吡啶的二氯甲烷溶液处理已知量的 N-Fmoc 胰岛素衍生物。

(c) N-Fmoc 胰岛素衍生物的化学定性

5 经 HPLC 法制备性分离后, 得到 7 种 N-Fmoc-胰岛素衍生物。其中分别包括三种单修饰的、三种双修饰的和一种三修饰的衍生物(表 1)。每种化合物个体的保留时间和收率皆列于表 I 中。不同 N-Fmoc-胰岛素之间很容易被拆分, 在试验条件下可得到纯化的形式。Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素(保留时间 = 27.7 分钟)、Gly^{A1}、Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素可以通过若干方法(包括质谱)进行定性(表 10 I)。

(d) Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素的合成

15 由于生物测定揭示了 Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素特别适合作为长效胰岛素, 我们又设计了另一种合成它的方法。在预设的试验条件下, 用 t-Boc 基团将 Gly^{A1} 部分特异性保护, 其中采用了 1 当量的碳酸二叔丁酯和 DMSO/三乙胺(20:1)作为溶剂。随后用 HPLC 法分离。利用 DMF 作为溶剂并以 DIEA 作为碱, 将 Gly^{A1}-N-Boc-胰岛素与过量的 Fmoc-OSu(10 当量)反应。用 TFA 处理并在 HPLC 上纯化, 得到收率良好(~50%)的 Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素。

(e) N-Fmoc-胰岛素衍生物的生物特性

20 本发明 N-Fmoc-胰岛素的若干特征在表 II 和表 III 中列出。衍生物在水溶液中的溶解度随修饰度的增高而降低。N-(Fmoc)₁-胰岛素仅仅是略低于天然胰岛素的溶解度, 而 N-(Fmoc)₃-胰岛素约比天然胰岛素的溶解度低 20 倍。衍生物的生物功效也随衍生度的增高而降低。因此, 利用〔聚(Glu₄Tyr)〕磷酸化分析法测定, 单-、双-和三-N-Fmoc 25 胰岛素的生物功效分别为天然胰岛素的 40-80%、2-9% 和 <1%。根据更敏感的并用完整大鼠脂肪细胞来完成的脂肪形式生物试验, Fmoc-胰岛素衍生物都表现出较低的生物功效。在脂肪形成试验中, Gly^{A1}-N-Fmoc-胰岛素和二-N-Fmoc-胰岛素分别为天然胰岛素生物活性的 4.7% 和 0.4-1.4%。所有七种衍生物在 pH 8.5 下保温放置 2 天后都可以 30 反转为天然激素。这是通过全部生物功效的恢复(表 II 和 III)、衍生物峰的消失以及天然胰岛素峰(保留时间 = 15 分钟)的出现来证实的, 其中天然胰岛素峰是利用分析 HPLC 法分离的。

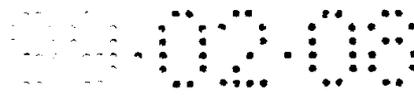


表 I: N-Fmoc 衍生物的化学特性

衍生物	保留时间 (HPLC), 分钟 ^a	收率 ^b (%)	摩尔 Fmoc/mole 胰岛素	Fmoc 插入位置	质谱 (分子量) 理论 实测 [M+H] ⁺
N-(Fmoc) ₁ -胰岛素	21.1	3	0.8	Gly ^{A1}	
N-(Fmoc) ₁ -胰岛素	21.9	6	1.2	Lys ^{B29}	
N-(Fmoc) ₁ -胰岛素	22.8	4	0.9	Phe ^{B1}	
N-(Fmoc) ₂ -胰岛素	26.3	12	1.7	Gly ^{A1} , Lys ^{B29}	
N-(Fmoc) ₂ -胰岛素	27.1	6	2.1	Gly ^{A1} , Phe ^{B1}	
N-(Fmoc) ₂ -胰岛素	27.7	14	1.9	Phe ^{B1} , Lys ^{B29}	6252 6255
N-(Fmoc) ₃ -胰岛素	31.5	30	3.4	Phe ^{B1} , Lys ^{B29} , Phe ^{B1}	6474 6475

附注: 氨基酸分析法常用于验证所有 Fmoc-衍生物的正确组成。

^a由 Merck 制造, LiChrospher 100 RP-8 (5µm) 柱, 在 40 分钟内使用由 60% 溶液 A (0.1% TFA 的水溶液) 和 40% 溶液 B (0.1% TFA 的乙腈:水, 75:25 溶液) 至 100% 溶液 B 的线性洗脱 (流速 1ml/分钟)。

^b基于由 HPLC 得到的纯原料。



表 II: Fmoc-胰岛素衍生生物的若干代表性特征

衍生物	来源	Fmoc 标入位置	在缓冲水溶液中的外观 (pH7.4)	在缓冲水溶液中的溶解度 (pH7.4, mg/ml)	生物功效 (%)	保温后的生物功效 (2天, 37°C, pH8.5)
胰岛素	人		澄清	-4 或更高	100	100
N-(Fmoc)-胰岛素	人	Gly ^{A1}	近澄清	-3	40±2	95
N-(Fmoc) ₁ -胰岛素	人	Lys ^{B29}	近澄清	-3	78±4	94
N-(Fmoc) ₁ -胰岛素	人	Phe ^{B1}	近澄清	-3	76±4	95
N-(Fmoc) ₂ -胰岛素	人	Gly ^{A1} , Lys ^{B29}	浑浊	-2	2±1	93
N-(Fmoc) ₂ -胰岛素	人	Gly ^{A1} , Phe ^{B1}	浑浊	-2	3±1	97
N-(Fmoc) ₂ -胰岛素	人	Phe ^{B1} , Lys ^{B29}	浑浊	-2	9±2	95
N-(Fmoc) ₃ -胰岛素	人	Gly ^{A1} , Lys ^{B29} , Phe ^{B1}	极浑浊	-0.2	<1	98

附注: 按照试验部分所述的两种生物分析法测定胰岛素样的功效

表 IV: 脂肪形成试验(利用完整大鼠的脂肪细胞)中数种 N-Fmoc 胰岛素的生物功效及活化时间进程

衍生物	脂肪形成 ng/mL	相对生物 功效(%)	保温后的活性		
			9 小时	20 小时	45 小时
天然胰岛素	0.2-0.4	100			
Gly ^{A1} - N - Fmoc - 胰岛素	7	4.7	50	100	
Gly ^{A1} - Lys ^{B29} - N - (Fmoc) ₂ - 胰岛素	44	0.4	10	20	97
Gly ^{A1} , Phe ^{B1} - N - (Fmoc) ₂ - 胰岛素	30	1.1	18	40	100
Phe ^{B1} - Lys ^{B29} - N - (Fmoc) ₂ - 胰岛素	12.3	1.4	10	20	98



实施例 2. N-Fmoc-胰岛素的生物活性

(a) N-Fmoc-胰岛素在 pH 7.4 下活化的时间进程

在研究 N-Fmoc-胰岛素在糖尿病大鼠体内的抗糖尿病功效前，首先在试管内测定它们的反应速率(代表它们成为天然激素的转化作用)将衍生物溶于含有 10% 二甲基亚砷(DMSO)的 Hepes-缓冲液(50mM, pH 7.4)中并在 37°C 下保温放置(即在生理 pH 条件和体温下)。在预定的时间点取样，测定出它们相对于天然胰岛素的生物功效。根据胰岛素受体酪氨酸激酶的活化试验(在生物方法, (iv) 部分中描述的无细胞试验)以及上文的生物方法中第(ii)部分所述的在完整大鼠脂肪细胞内进行的脂肪形成刺激试验来评估衍生物的生物活性。图 1 表明所得结果。N-(Fmoc)₃-胰岛素的半数最大活性是在 $t_{1/2} = 14$ 天时出现并且在温育后 21 天时几乎达到完全活化。

通常，N-(Fmoc)₂-胰岛素在 pH 7.4 时活化最快。由 N-(Fmoc)₃-胰岛素观测到的六天迟滞期在 N-(Fmoc)₂-胰岛素中并未出现。因此 N-(Fmoc)₃-胰岛素可能带有限制其反应的并且缓慢水解的 Fmoc 部分。水解后活化速率加快。从实际角度来看，这意味着两种类似物的混合物通过覆盖较早的和较后的时间阶段使该混合物以延迟的时间周期释放出活性胰岛素。较活泼的单修饰 Fmoc-胰岛素在 pH 7.4 下和 $t_{1/2} = 5$ 天时再生得到全部生物活性。

一旦在循环中活化，N-(Fmoc)₂-和 N-(Fmoc)₃-胰岛素在延迟周期内提供预期较低的激素基础浓度。这主要由失活衍生物转化为短效活性天然胰岛素的速率来决定。同时，N-(Fmoc)_{2,3}-胰岛素具有较缓慢的活化速率(如图 1 所示)。较快(突然)的速率(即以分钟而不是小时计)会导致低血糖发作。

通过〔聚(Glu₄Tyr)〕磷酸化法，Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素显示出 9% 的生物活性并且表现出介于天然和 N-(Fmoc)₃-胰岛素之间的中等程度的溶解度。与 N-(Fmoc)₃-胰岛素不同的是，(N-Fmoc)₂-胰岛素在保温放置后的很短时间内就开始转化为天然激素，如图 1 所示。因此 N-(Fmoc)₂-胰岛素(预期更活泼)在给药后表现为作用启动得较快。N-(Fmoc)₂-和 N-(Fmoc)₃-胰岛素的适当结合可以成为通过单剂量给药来释放基础胰岛素的理想配方，其特征在于作用的快速启动以及较长的持续时间，这构成了本发明的一个优选实施方案。

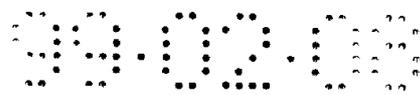


表 IV: Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素单剂量给药对于 STZ 大鼠日体重增益的影响

组	说明	日体重增益 g/只大鼠 (在第一个三天)
A(n=5)	仅接受赋形剂的 STZ 大鼠 (2.0ml, 20%DMSO/只)	2.0±0.2
B(n=5)	接受 NPH-人胰岛素单剂量皮下给药的 STZ 大鼠 (Humulin N) (3mg/只)	12.0±2
C(n=5)	接受 N-(Fmoc) ₂ -胰岛素单剂量给药的 STA 大鼠 (3mg/只)	11.5±1.3

(b) Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素的单剂量腹膜内给药对正常大鼠的作用

为进一步证实 (Fmoc)₂-胰岛素的长效性能是由生理条件下其向天然激素转化减缓所造成, 我们又设计了另外的体内试验。该试验反映了胰岛素(或胰岛素衍生物)皮下给药后在循环内的长效特征。令正常大鼠接受天然胰岛素、NPH-胰岛素和 (Fmoc)₂-胰岛素 (3mg/只) 的单剂量腹膜内注射, 并且在三天的周期内监测它们的血液葡萄糖水平。结果在图 2 中表示。天然胰岛素(图 3)和 NPH-胰岛素(图 2)分别在约 12 小时和 15 小时内诱发过低的血糖。低血糖复原所需的 t_{1/2} 分别为 8 小时和 10 小时。(Fmoc)₂-胰岛素在约 48 小时的时间内降低血液葡萄糖浓度, 并且低血糖复原的 t_{1/2} 为 26 小时。这样的结果支持了我们的下列想法: 实际上, (Fmoc)₂-胰岛素的延迟作用是鉴于其内在特性而并不基于 NPH-胰岛素的常规机理, 即在注射位置沉积并缓慢溶解-进入循环中。在本试验中, 天然胰岛素和 NPH-胰岛素之间降血糖浓度的性能差异与它们经皮下方式给药时的差异要小。该事实应归因于腹腔内存在较大体积的液体并由此造成锌结晶胰岛素的快速转化, 从而生成单体形式。其他两种 (Fmoc)₂-胰岛素衍生物, 即 [Gly^{A1}、Lys^{B29}] 和 [Gly^{A1}、Phe^{B1}] 也被合成并在本试验中受到评估。结果表明, 两种



衍生物具有与 Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素相类似的长效作用并且 t_{1/2} 为 22-24 小时。

(c) N-(Fmoc)₃-胰岛素对蛋白水解作用的耐受性

5 将天然胰岛素或 N-(Fmoc)₃-胰岛素(分别为 1mg/ml, 介于 50mM Hepes 中, pH 7.4, 10% DMSO)在 37℃ 下保温放置。随后加入糜蛋白酶和胰蛋白酶(分别为 0.5%w/w)。在预定时间取样并利用分析型 HPLC 法测定。通过测定天然胰岛素峰(保留时间 = 15 分钟)和 N-(Fmoc)₃-胰岛素峰(保留时间 = 31.5 分钟)峰面积的减少来得到降解百分比。结果如图 4 所示。

10 N-(Fmoc)₃-胰岛素在 pH 7.4 下对糜蛋白酶和胰蛋白酶混合物具有较高的耐受性。天然胰岛素和 N-(Fmoc)₃-胰岛素的蛋白水解过程分别为 t_{1/2} = 0.5 和 7.5。

15 实施例 3: Phe^{B1}, Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素和 N-(Fmoc)₃-胰岛素的单剂量皮下给药对 STZ-糖尿病大鼠的影响

STZ 大鼠是评估胰岛素体内治疗的良好模型。在该模型中, 由组织学研究(Pederson 等人, 1989)证明了β-细胞功能的约 90% 被链脲霉素破坏。大鼠出现胰岛素分泌过少(为正常胰岛素水平的 10-30%)、高血糖(>300mg/dl; 参照大鼠的正常血液葡萄糖水平为 90-100mg/dl)及分解代谢态。可观察到的外部症状是“病”态并且液体摄取和排泄尿量增加了 3-4 倍。日体重增益比参照大鼠的正常体重增益减少 10-20% (0.3-0.8g/天/只大鼠)。组织内的病理学变化极其显著。一些更显著的生化改变为糖原代谢关键酶的活性减弱、肝脏内糖原的缺失、葡萄糖转运数量及周围组织的减少, 以及胰岛素结合性能虽然增高但未伴随胰岛素应答的增强。

25 在这种糖尿病大鼠模型中, 常规的胰岛素疗法是在一周内连续给予胰岛素(5 单位/天/大鼠)。此类疗法使糖尿病大鼠的血液葡萄糖水平正常化并恢复到合成代谢的状态, 它改善了多种由高血糖和低胰岛素分泌诱发的病理效应。速效(正常)胰岛素的单剂量给药仅在数小时内有效。在为期 7 天的治疗方案结束后, 24-30 小时内就会反弹出现高血糖症。

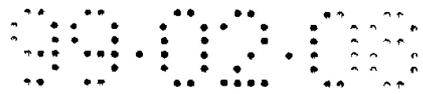
为评估 N-(Fmoc)₃-胰岛素是否具有出现抗糖尿病功效, 给糖尿病

诱发后两周的 STZ 大鼠单剂量皮下注射天然胰岛素 (A 组, 25 单位, 溶于 1.0ml 水-10% DMSO, n=4) 或 N-(Fmoc)₃-胰岛素 (B 组, 1mg, 溶于 1.0ml 水-10% DMSO, n=4)。在随后 1 天中测定血液葡萄糖水平和日体重增益。

5 所得结果如图 5 所示。各点代表 4 只大鼠血浆葡萄糖的算术均值 ±SEM。B 组的血循环葡萄糖水平明显较低。B 组自给药第 2 天始, 葡萄糖水平降低了 90-110mg/dl, 并且这种较低的葡萄糖水平维持到第 6 天。在第 7 天, 两组的血液葡萄糖水平没有显著差异。接受 N-(Fmoc)₃-胰岛素的大鼠表现出“康复”的征兆。B 组中的日体重增益约高出 3
10 倍, A 组和 B 组分别等于 0.57±0.08, 1.43±0.14g/只/天。因此, N-(Fmoc)₃-胰岛素的单剂量给药具有延迟且满意的抗糖尿病作用, 这种作用可持续 4 天(延缓开始近两天)。这样的体内长效作用可以用衍生物逃避受体介导的胞吞以及耐蛋白水解来解释。此外, N-(Fmoc)₃-胰岛素在水溶液中极易溶。因此, 在人体中, 全面的持续作用可以通过皮下给药后原型治疗物质(即缓慢溶解的“内置”不溶性胰岛素)被
15 新物质取代来达到, 换言之, 血液中的长效、共价改性的并失活的胰岛素衍生物缓慢转化为天然激素。鉴于此类胰岛素衍生物是失活的, 所以可采用大剂量给药而不必担心低血糖发作。

为测定 Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素在降低糖尿病试验大鼠的
20 血液葡萄糖水平中的作用, STZ 处理的大鼠在糖尿病诱发第 9 天接受 N-(Fmoc)₂-胰岛素的单剂量皮下注射 (A 组, 3mg/只, 在 2.0ml 20%DMSO, n=5) 或长效胰岛素的单剂量皮下注射 (NPH-人胰岛素, Humulin, HI-310) (B 组, 0.75ml (3mg) 每只鼠, n=5)。C 组仅接受赋形剂 (2.0ml 20%DMSO)。每天测定血液葡萄糖水平。

25 结果如图 6 所示。其中, 水平虚线表示参照大鼠血浆葡萄糖的算术均值。如图 6 所示, HPLC 纯化的 Phe^{B1}、Lys^{B29}-N-(Fmoc)₂-胰岛素在单剂量皮下给药的 4 天内诱发血糖正常化, 并且增加了这些分解代谢的 STZ 大鼠模型的日体重增益(表 III)。N-(Fmoc)₂-胰岛素与市售(不溶性)长效制剂一样有效。速效(可溶)胰岛素在该试验体系中的血液葡萄糖水平降低增益仅能持续数小时(未图示)。这种制剂在水溶液中相对易溶 (pH 7.4), 在这方面比不溶性 N-(Fmoc)₂-胰岛素更具有优越性, 这是由于悬浮液不能精确皮下注射给药。
30



实施例 4: (2-磺基)Fmoc-胰岛素的制备和生物活性

(a) (2-磺基)Fmoc-胰岛素(sulfmoc-胰岛素)的合成

Fmoc 本身的引入是为降低 Fmoc-胰岛素的疏水性, 由此增加它在缓冲水溶液中的溶解度并改变再生为胰岛素的速率。这可以通过将极性的或优选荷电的基团引入到芴环内来实现, 例如引入卤素、硝基、羧基、氨基、铵和磺基。亲电性取代反应首先在芴的 2 位发生取代, 通常 9 位上取代基(例如 $\text{CH}_2\text{OCO-OSu}$)的特性并不影响取代的取向。因此, 0°C 下, 用 0.9 当量氯磺酸在二氯甲烷(DCM)中处理 Fmoc-OSu, 高收率地得到 (2-磺基)Fmoc-OSu(式 (i)), 2 位的 $\text{R}_1 = \text{SO}_3\text{H}$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{A} = \text{OCO-OSu}$)。用超过 1 当量的氯磺酸处理将会导致取代发生在芴环 7 位上。

通过将活泼的 (2-磺基)Fmoc-OSu 酯与胰岛素氨基的偶联来引入 (2-磺基)Fmoc 基团。该反应是在缓冲水溶液 (pH 7.4) 中和反应物过量 (~20 当量) 的条件下进行。渗析和冷冻干燥后, 产物转化为水溶性物质。HPLC 分析试验表明: 一种占优势的主要产物显然为 $(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素, 与质谱的测定相符 (m/z 6411)。当该反应在乙腈/水, 1:1 中进行时, 主产物为 $(\text{Sulfmoc})_3$ -胰岛素, 与质谱的测定相符 (m/z 6713)。

(b) (2-磺基)Fmoc-胰岛素活化的时间进程

$(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素在 37°C 和 pH 8.5 (0.1M 碳酸氢钠) 的条件下保温放置 36 小时或在 37°C 和 pH 7.4 (50mM HEPES 缓冲液) 的条件下保温放置 10 天后可以全部再生为天然激素, 两种条件下的 $t_{1/2}$ 值分别为 12-15 天和 6 天。上述结果可根据分析型 HPLC 测定时胰岛素衍生物峰的出现以及天然激素峰的出现来得到证实。 $(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素成为天然激素的水解作用比 $(\text{Fmoc})_2$ -胰岛素 (21 天, pH 7.4, 37°C) 的水解作用快。

$(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素具有 0.5% 生物活性并且在水中显示出良好的溶解度。在 pH 8.5、 37°C 下保温后, $(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素再生为完全活性的天然胰岛素并且 $t_{1/2}$ 值为 4-6 小时, 这是根据生物功效随着时间的增高来判断(大鼠脂肪细胞内脂肪形成的试验)。

(c) (2-磺基)Fmoc-胰岛素单剂量腹膜内给药对正常大鼠的作用

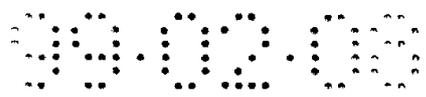
为评估 $(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素皮下吸收的长效性能, 令大鼠接受天然胰岛素、NPH-胰岛素或 $(\text{Sulfmoc})_2$ -胰岛素的单剂量腹膜内给药。

测定随后两天内的血液葡萄糖浓度。图 3 图示了由 (Sulfmoc)₂-胰岛素在 24 小时内诱发的低血糖。低血糖复原的 t_{1/2} 值 = 14 小时。对于速效胰岛素和 NPH-胰岛素，它们的 t_{1/2} 分别等于 8(图 3)和 10 小时(图 2)。因此，(Sulfmoc)₂-胰岛素的单剂量给药提供了中效抗糖尿病作用，即比速效和 NPH-胰岛素延迟了 1.5-2 倍。如此结果与由上述体外试验发现的 Sulfmoc-胰岛素水解速率的加快相吻合。位于苄环 2 位的磺酸基团加快了 9 位质子脱除速率并由此使 sulfmoc 部分的水解增快 2-3 倍。有关 Sulfmoc 基团在不同碱条件下的不稳定性的研究表明，它们的碱敏感性比母体要高。此外，例如，Sulfmoc 自甘氨酸释放的速率常数比 Fmoc 基团的更高(约 30 的因子)。因此，为增加溶解度而向胰岛素引入 Sulfmoc 反过来会降低衍生物的长效作用。因此，长效抗糖尿病作用的原理，(即通过避免受体介导的胞吞和降解)同样适用于 Sulfmoc-胰岛素衍生物。

Sulfmoc 从胰岛素上脱除速率的加快有利于某些胰岛素(中效制剂)的给药。这种制剂显然更易于完全溶解在缓冲水溶液中，这与现有市售制剂形成对照。并且，也可以在苄环中引入其他具有不同酸度和极性的基团。所以，通过控制引入到 Fmoc 上的基团的类型和数量可以决定改性胰岛素的溶解度和反应速率。

20 实施例 5: 氨基末端和羧基末端修饰的胰岛素衍生物(N-Fmoc-和 C-Fm-胰岛素) 的制备

将 N-(Fmoc)₃-胰岛素(64.5mg;10μmol;60μmol 羧基，即属于链内 Glu 和两个 C-末端残基的羧基)溶于含有邻硝基苯酚(250μmol;35mg)或 N-羟基琥珀酰亚胺(250μmol;28mg)的 8ml 二甲基甲酰胺(DMF)中(Lab. Scan., Dublin, Ireland)，将该溶液冷却至 4℃。加入 N,N-二环己基碳化二亚胺(DCC; 250mmol, 53mg)溶于 0.5ml DMF 中的溶液并将反应混合物在 4℃下保持 1 小时，随后室温下保持 6 小时。通过离心除去 N,N-二环己基脲沉淀，用干燥的、经冰浴冷却的乙醚分别沉淀出 N-(Fmoc)₃-胰岛素的邻硝基苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺酯。将固体用无水乙醚洗涤两次，干燥，溶于 8ml DMF 中，加入 9-苄基甲醇(250μmol;50mg)和咪唑(250μmol;17mg)的 1ml DMF 溶液。反应混合物在室温下放置过夜。用无水乙醚沉淀，得到 62mg N-(Fmoc)₃、C-(Fm)-胰岛素。反应主产物为 N-(Fmoc)₃-胰岛素的六-9-苄甲基酯(n=6)。



实施例 6: 羧基末端 Fm-胰岛素 (C-Fm-胰岛素) 的制备

为了制备叔丁氧基羰基 (t-Boc)₃-胰岛素, 在搅拌下, 将碳酸二叔丁酯 (56mg, 259 μ mol) 加入到用冰浴冷却的含有胰岛素 (100mg, 17.2 μ mol) 和三乙胺 (174mg, 172 μ mol) 的 DMF (4mL) 悬浮液中, 将反应混合物升至室温并搅拌 5 小时 (逐渐变为澄清)。随后加入乙酸乙酯直至溶液混浊, 随即加入乙醚, 离心出沉淀, 用乙醚洗涤两次。进一步纯化所得的固体粗产物 (95mg)。分析 HPLC 表明, 主产物在 27.5 分钟时洗脱出来。

将该产物溶解在 10ml DMF 中并用邻硝基苯酚或 N-羧基琥珀酰亚胺处理 (如上所述), 生成相应的活化酯。将该酯与 9-苄基甲醇在咪唑的存在下反应, 用无水乙醚沉淀后, 得到 N-(t-Boc)₃, C-(Fm)_n-胰岛素的粉末 (87mg)。将粉末在真空和五氧化二磷下干燥并在室温下用 5ml 三氟乙酸处理 1 小时, 以有效脱除 N-末端的 t-Boc 保护基。在此过程中, 绝大多数胰岛素衍生物溶解。加入冰浴冷却的无水乙醚可以得到粉末, 离心分离, 用无水乙醚彻底洗涤。生成基本为 C-(Fm)₆-胰岛素的产物 79mg。

实施例 7: (Fmoc)₁-人生长激素 (Fmoc₁-hGH) 的制备

在正常生理条件下, 健康对象中的 hGH 水平每天以脉动方式增高数次 (昼夜)。hGH 为短效物质。现有治疗方案包括 hGH 的每日单剂量给药并且可能仅在数小时内有效。能够在昼夜 24 小时内提供阈值水平的 hGH 的长效 (缓释) hGH 制剂极其需要。

将天然 hGH (Biotechnology General, Rehovot, Israel; 9.2mg) 溶解在 0.1M 碳酸氢钠 (2.0ml; pH 8.5) 中, 加入 DMSO (0.1ml) (DMSO 的终浓度 ~5%), 将该溶液冷却至 0 $^{\circ}$ C。随后加入 10 μ l 的 1 当量 Fmoc-OSu (取自 18.5mg/ml 的 DMSO 储备液), 在 0 $^{\circ}$ C 和适当搅拌的条件下使反应进行 30 分钟。此后再加入另一个 10 μ l (含有 1 当量的 Fmoc-OSu), 30 分钟后, 将反应混合物在 7 $^{\circ}$ C 及无水条件下透析, 过夜。利用半制备型 HPLC, 得到与天然 hGH (总量的 ~20%, 保留时间 30 分钟, PR-8 柱; 250 \times 10mm, Merk) 和改性 Fmoc-hGH (总量的 ~20%, 保留时间 32 分钟) 相应的两个蛋白质主峰。

表 V 列出了 Fmoc-hGH 在 37 $^{\circ}$ C 下和 0.1M 碳酸氢钠 (pH 8.5) 中产物 hGH 的转化作用。在预定时间点, 取等份样品并利用分析 HPLC (RP-9



柱)。以天然 hGH 峰面积的增益来评估 Fmoc-hGH 向天然 hGH 的转化作用。

如表 V 所示, Fmoc-hGH 的受体结合功效为天然激素的 15%。通过 HPLC 分析法及受体结合试验, 可判断出 Fmoc-受体结合功效在 pH 8.5 (37°C) 下保温约 6 天或在 pH 10.5 (37°C) 下保温 4 天后可以生成完全活性的天然 hGH。

表 V: 由 Fmoc-hGH 经 37°C 保温生成 hGH

化合物	处理	置换碘代激素的能力 (%) ⁽¹⁾	hGH 转化 % ⁽²⁾
hGH		100	
Fmoc- hGH		15	
Fmoc- hGH	1 天, pH 10.5	25	
Fmoc- hGH	4 天, pH 10.5	100	
Fmoc- hGH	1 天, pH 8.5		23
Fmoc- hGH	2 天, pH 8.5		62
Fmoc- hGH	6 天, pH 8.5		100

(1) 按照 Gertler 等人, 1984 公开的方法进行碘代 hGH 的置换, 天然 hGH 在适用于 Fmoc-hGH 的条件下完全稳定 (pH 10.5, 37°C, 4 天)

(2) 在 37°C 和 0.1M 碳酸氢钠 (pH 8.5) 下保温 Fmoc-hGH。在预定时间点, 取样并用分析型 HPLC 鉴定。根据与天然 hGH 相应的峰面积的增益评估 Fmoc-hGH 向天然 hGH 的转化作用。

实施例 8: N-Fmoc-头孢氨苄和头孢氨苄-O-Fm 酯的制备

头孢氨苄 [7-(D- α -氨基苄基乙酰胺)脱乙酰氧基头孢菌酸] 是具有广谱抗革兰氏阳性和革兰氏阴性菌活性的 β 内酰胺抗生素。经酯化反应制得两种单取代的头孢氨苄, 它们分别是头孢氨苄的氨基 (N-Fmoc-头孢氨苄) 或羧基 (头孢氨苄-O-Fm) 与苄甲基 (Fm) 部分共价连接的产物。

(i) (a) N-Fmoc-头孢氨苄的制备

将 Fmoc-OSu (145mg, 0.432mmole) 的 DCM (2.5ml) 溶液在 5 分钟内加入到搅拌中的头孢氨苄水合物 (Sigma, USA; 50mg, 0.144mmole) 和三乙胺 (29mg, 0.288mmole) 在二氯甲烷 (DCM; 2.5ml) 中的悬浮液中。反应混合物 1 小时后变澄清, 将其在室温下搅拌过夜, 在此期间溶液变



混浊。真空下浓缩后，在混合物中加入乙醚，滤出生成的沉淀并用乙醚洗涤两次。将滤液溶于 DCM 中并用酸化的水 (pH 2)、水和盐水提取，无水硫酸镁干燥。将该溶液过滤并浓缩后加入乙醚。滤出沉淀产物并用乙醚洗涤，生成 Fmoc-头孢氨苄的纯产物，通过 TLC (1-丁醇:乙酸:水, 8:1:1) 和分析 HPLC 法 (在 33 分钟时洗脱，同样条件下天然头孢氨苄在 6.5 分钟洗脱) 的测定。质谱分析测出预期的 N-Fmoc-头孢氨苄分子量 (M/Z 570.1 $[M+H]^+$)。

(i) (b) Fmoc-头孢氨苄的抗菌性能

为了测定天然头孢氨苄和 Fmoc-头孢氨苄的抗菌效能，在处理前和处理后，将含有金黄色葡萄球菌稀释悬浮液 (0.5ml/玻璃试管) 的试管在 37°C 下以及不含或含有浓度递增的天然头孢氨苄或 Fmoc-头孢氨苄的条件下保温 6 小时，如表 VI 所示。在预定时间点取样并分析它们抑制金黄色葡萄球菌生长的性能。随后通过 700nm 下光谱测出的混浊度增加来评估细菌的生长。

15 表 VI 天然头孢氨苄和 N-Fmoc 头孢氨苄的抗菌活性

化合物	在 pH 7.4 37°C 下保温	抑制 50% 细菌生长时的浓度 (μM) (IC_{50})	抗菌功效 ⁽¹⁾ (%)
天然头孢氨苄	--	0.9	100
天然头孢氨苄	1 天	1.5	100
天然头孢氨苄	3 天	5.3	100
天然头孢氨苄	6 天	18	100
Fmoc-头孢氨苄	--	23	6
Fmoc-头孢氨苄	1 天	15	10
Fmoc-头孢氨苄	3 天	9	59
Fmoc-头孢氨苄	6 天	4.5	100

(1) 数值是指在试验中用作参照物的头孢氨苄的功效

保温是将天然头孢氨苄或 N-Fmoc 头孢氨苄 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在 pH 7.4 下和 50mM HEPES 缓冲液 (含 20% DMSO) 中进行。

20 如表 VI 所示，N-Fmoc-头孢氨苄失活 (~6%)。将其在 6 天的周期内预保温 (pH 7.4, 37°C) 可以生成天然头孢氨苄，这是根据 HPLC 的监测并通过约 50% 母体化合物抗菌功效的再生来判断的。天然头孢氨



基羧基)苯基-二甲基铈(Fmoc-DSP)可以使 Fmoc 基团插入从而将这些残基改性。Fmoc-DSP 与肽之间的摩尔比例将随 PMXB 分子的修饰程度而定。

5 为了制备 (Fmoc)₂-PMXB, 将碳酸氢钠 (0.1M, 0.15ml) 溶液滴加到搅拌中的含有 PMXB (Sigma, USA, 10mg, 7.2 μmol) 和 Fmoc-DSP (7.1mg, 14.4 μmol) 的水 (1ml) 溶液中。逐渐混浊的反应混合物在室温下搅拌过夜。将所得沉淀物离心, 用水洗涤, 溶于小体积的 DMSO 中, 用乙醚沉淀出白色固体粗产物。

化合物	处理	抑制 50% 细菌生长时的浓度 (μM)	抗菌功效 ⁽¹⁾ (%)
天然 PMXB	--	0.05	100
天然 PMXB	3 天, 37℃, pH 8.5 ⁽²⁾	0.1	100
天然 PMXB	6 天, 37℃, pH 8.5 ⁽²⁾	0.2	100
天然 PMXB	3 天, 37℃, pH 7.4 ⁽³⁾	0.055	100
天然 PMXB	6 天, 37℃, pH 7.4 ⁽³⁾	0.228	100
(Fmoc) ₂ -PMXB	--	5	1
(Fmoc) ₂ -PMXB	3 天, 37℃ pH 8.5 ⁽²⁾	0.125	80
(Fmoc) ₂ -PMXB	6 天, 37℃ pH 8.5 ⁽²⁾	0.2	100
(Fmoc) ₂ -PMXB	3 天, 37℃, pH 7.4 ⁽³⁾	0.227	25
(Fmoc) ₂ -PMXB	3 天, 37℃, pH 7.4 ⁽³⁾	0.35	64

(1) 数值是指在试验中用作参照物的 PMXB 的功效

10 (2) 在 pH 8.5 下和含 1% DMSO 的 0.1M 碳酸氢钠中将 PMXB、(Fmoc)₂-PMXB (100 μg/ml) 保温。

(3) 在 pH 7.4 下和含 1% DMSO 的 50mM HEPES-缓冲液中将 PMXB、(Fmoc)₂-PMXB (100 μg/ml) 保温。

15 由采用线性梯度液的分析 HPLC (RP-18, 250 × 4mm; Merk) 测出, 主产物在 39 分钟洗脱 (PMXB 在同样条件下的保留时间为 13.5 分钟), 所述线性梯度液是指在 40 分钟内从 70% 溶液 A (0.1TFA 的水溶液) 和 30% 溶液 B (0.1TFA 的乙腈:水, 75:25 溶液) 开始至 100% 溶液 B。将固体粗产物上样到制备 HPLC, 得到纯产物。用质谱分析 (Fmoc)₂-PMXB (FAB), 得到该化合物预期的分子量 (M/Z, 1647 [M-H]⁺)。



(Fmoc)₂-PMXB 和天然 PMXB 的抗菌功效和在不同试验条件下进行测定：将不含或含有浓度增加的 (Fmoc)₂-PMXB 和天然 PMXB 的大肠杆菌 (E. coli) 稀释悬浮液在 37℃ 下保温。在预定时间点时取样并分析它们阻止大肠杆菌生长的性能。随后通过 700nm 下光谱测出的混浊度增加来评估细菌的生长。

如表 VII 所示，(Fmoc)₂-PMXB 失活 (~1%) 并极易水解回到活性 PMXB，在 pH 8.5 和 7.4 下的 t_{1/2} 分别为 ~3 天和 ~1 天。

实施例 10: 哌拉西林-苄甲酯(哌拉西林-O-Fm)的制备

哌拉西林(4-乙基-2,3-二氧哌嗪羧基苄西林)是由青霉素衍生的半合成光谱抗生素，该化合物口服给药无效。

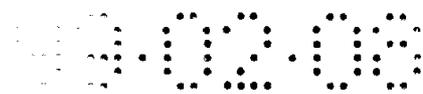
哌拉西林(游离羧基)是由哌拉西林钠盐(Sigma, USA)通过乙酸乙酯的酸性提取来制备。按照上述实施例 8 所述的头孢氨苄-O-Fm 酯的制备方法，用 1 当量的羧基与分别为 2 当量的 9-苄基甲醇、4-二甲氨基吡啶和 DCC 来反应，可制得哌拉西林-O-Fm。固体粗产物在 DCM-乙醚中重结晶，生成纯的产物，用 TLC 和 HPLC 鉴定。

实施例 11: Fmoc-普萘洛尔的制备

作为 β-阻断剂类型典型成员的普萘洛尔 [1-(异丙基氨基)-3-(萘基氧基)-2-丙醇] 是用作抗高血压药、抗心绞痛药抗心律失常药的 β-肾上腺能拮抗剂。普萘洛尔与 β-肾上腺能受体结合但不失活。与肾上腺能拮抗剂在此类位点上的竞争可以减轻病理性的高血压状态。患者口服接受日基础量的普萘洛尔。但是，众多 β 肾上腺能拮抗剂本质上具有相当的亲水性，因此口服给药时不能被有效吸收，例如乙酰丁洛尔(acetylbutolol)、atenolol、倍他洛尔、喹酮心安、纳多洛尔和索他洛尔。

为制备 Fmoc-普萘洛尔，将 Fmoc-OSu(170mg, 0.50mmol) 在 DCM(2.5ml) 中的溶液在 5 分钟内滴加到搅拌中的 (±) 盐酸普萘洛尔中 (50mg, 0.17mmol) 和三乙胺 (34mg, 0.34mmol) 的二氯甲烷 (DCM, 2.5ml) 溶液中。

室温搅拌过夜后，反应混合物用酸化的水 (pH~2)、水和盐水提取，以无水硫酸镁干燥。蒸发溶液，得到固体粗产物，随后用己烷研制，得到 Fmoc-普萘洛尔。产物用 TLC(1-丁醇:乙酸:水, 8:1:1) 和 HPLC 检验，得到纯品(在同样条件下，普萘洛尔和 Fmoc-普萘洛尔的保留



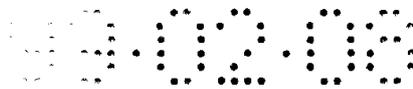
时间分别为 16 分钟和 51 分钟)。质谱得到正确的结果 $M/Z:482.2[M+H]^+$ 。

分析 Fmoc-普萘洛尔的 β -肾上腺能功效。结果如图 7 所示。在 37℃ 下将新制的大鼠脂肪细胞与异丙肾上腺素(终浓度 1 μ h/ml, 4 μ M) 以及指定浓度的普萘洛尔(圆环)、Fmoc-普萘洛尔(实心圆)一起保温 2 小时, 或将 Fmoc-普萘洛尔在 37℃ 和 pH 8.5*(方形)下保温 7 天。随后按照 Shechter, 1982 公开的方法测定释放到介质内的甘油量。IC₅₀ 是抑制半数由异丙肾上腺素介导的最大甘油释放量时的普萘洛尔或 N - Fmoc-普萘洛尔衍生物(以 μ M 计)量。

如图 7 所示, Fmoc-普萘洛尔是天然普萘洛尔功效的~7%。Fmoc-普萘洛尔在 pH 8.5(37℃)下保温 7 天后达到天然药物 β -肾上腺能功效的 50-70%。该衍生物本质上是疏水的, 这有助于在胃肠道内的吸收。

参考文献

1. Bodanszky, M. and Bednarek, M. (1982) 国际肽类和蛋白质研究杂志 20, 434-37.
2. Burch, R. M., Weitzberg, M., Blok, N., Muhlhauser, R., Martin, D., Farmer, S. G., Bator, J. M., Connor, J. R., Ko, C., Kuhn, W., MCMillan, B. A., Maureen, R., Shearer, B. G., Tiffany, C. and Wilkins, D. E. (1991) 美国国家科学院学报 88, 355-359.
3. Campbell, R. K., Campbell, L. K., White, J. R. (1996) Ann. Pharmacother. 30, 1263-71,
4. Gertler, A., Ashkenaxi, A. and Madar, Z. (1984) 细胞分子学和内分泌学 34, 51-57.
5. Karrsholm, N. C. and Ludvigsen, S. (1995) 受体学 5, 1-8.
6. Meyerovitch, J., Farfel, z., Sack, J-and Shechter, Y. (1987) 生物化学杂志 262, 6658-6662.
7. Meyerovitch, J., Kahn, C. R. and Shechter, Y. (1990) 生物化学 28, 3654-3660.
8. Moody, A. J., Stan, M. A., Stan, M. And Gliemann, J. (1974) 激素和代谢研究 6, 12-16.



9. Pederson, R. A., Ramanadham, S., Buchan, A. M. J. and MCNeill, J. H. (1989) 糖尿病学 38, 1390-1395.
10. Rodbell, M. (1964) 生物化学杂志 239, 375-380.
11. Shechter, Y. (1982) 内分泌学 110, 1579-1583
- 5 12. Shechter, Y. and Ron, A. (1986) 生物化学杂志 261, 14945-14950

说明书附图

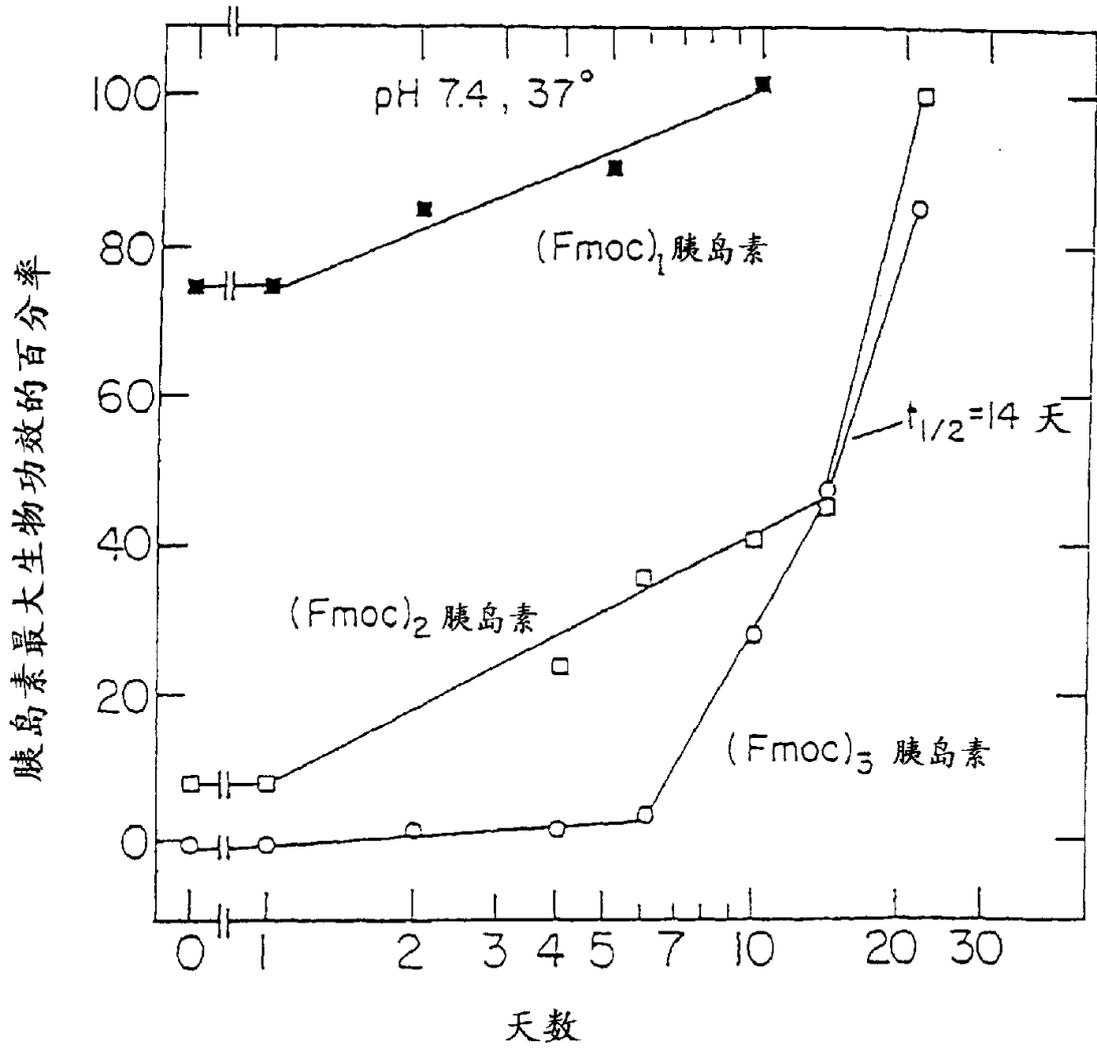


图 1

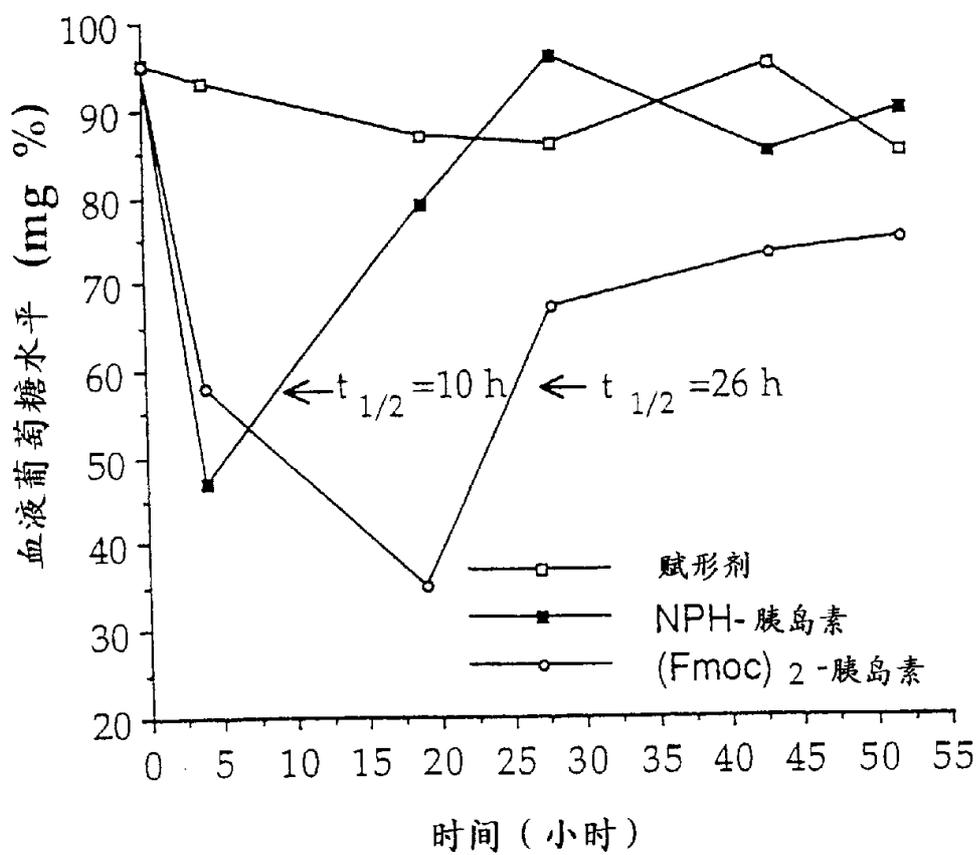


图 2

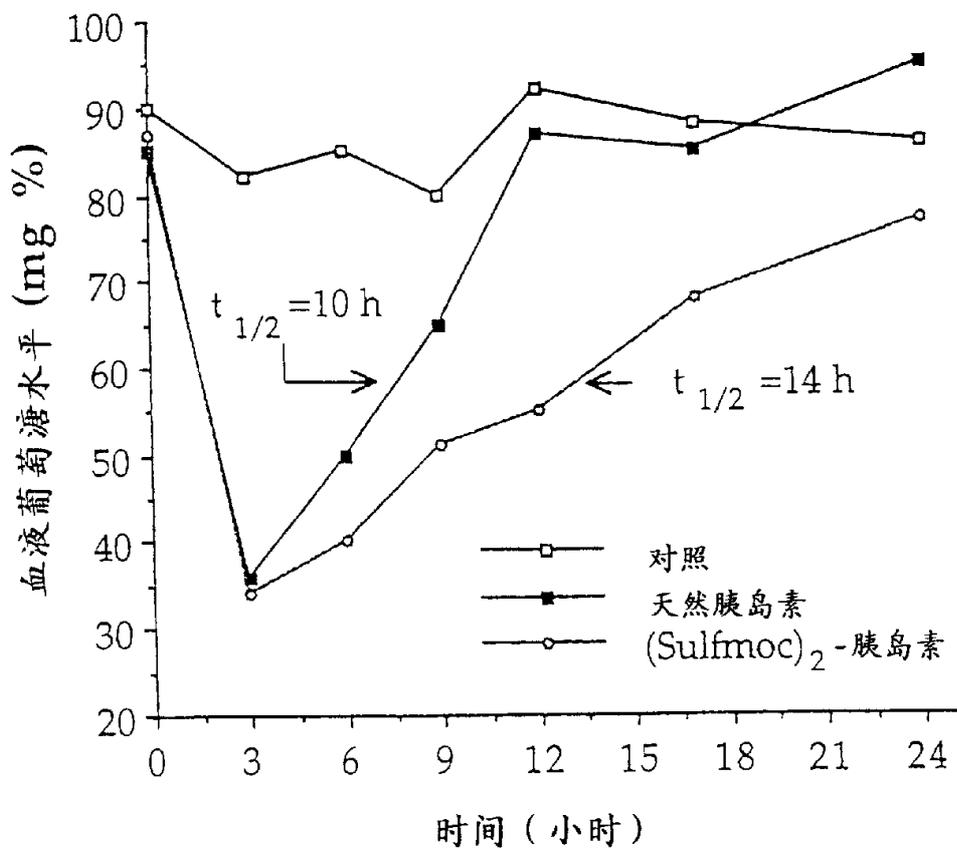


图 3

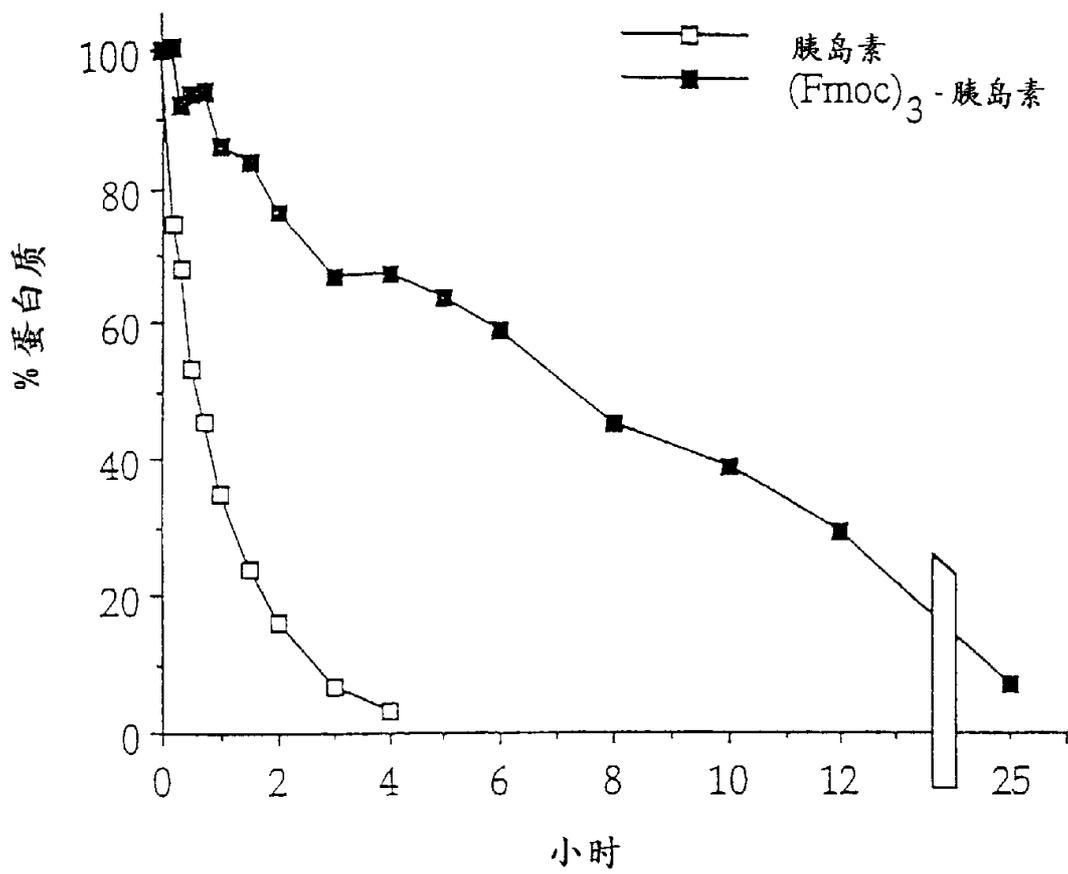


图 4

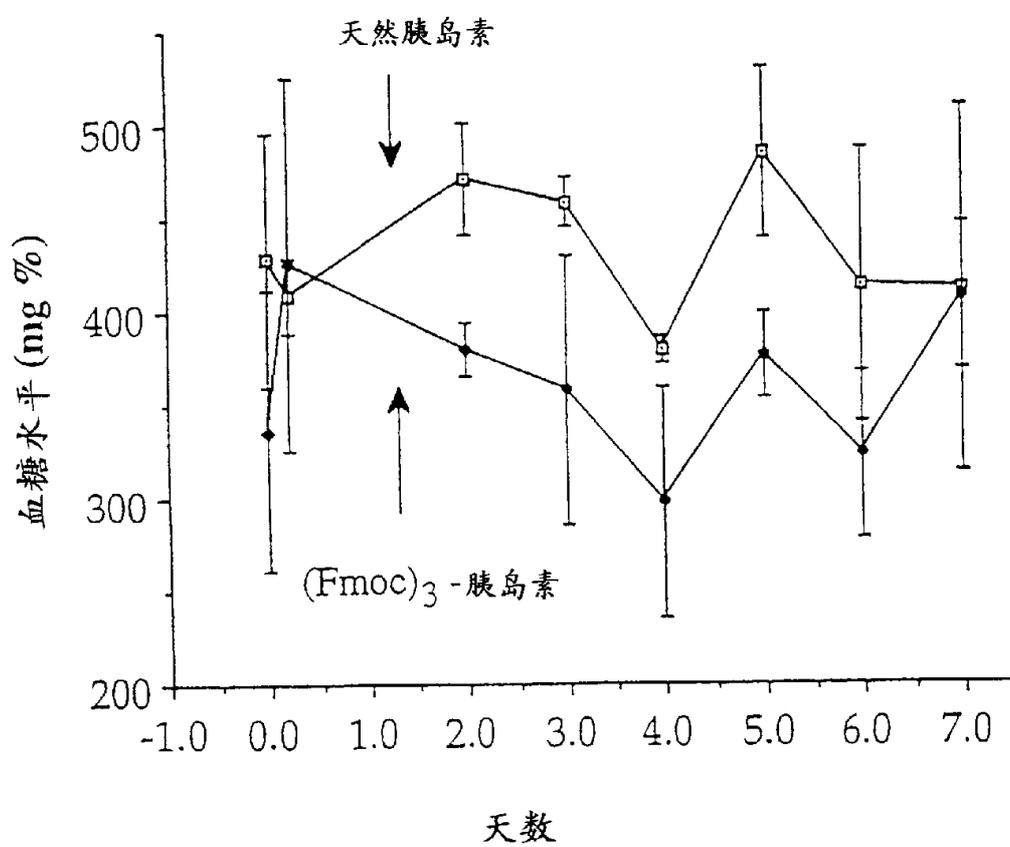


图 5

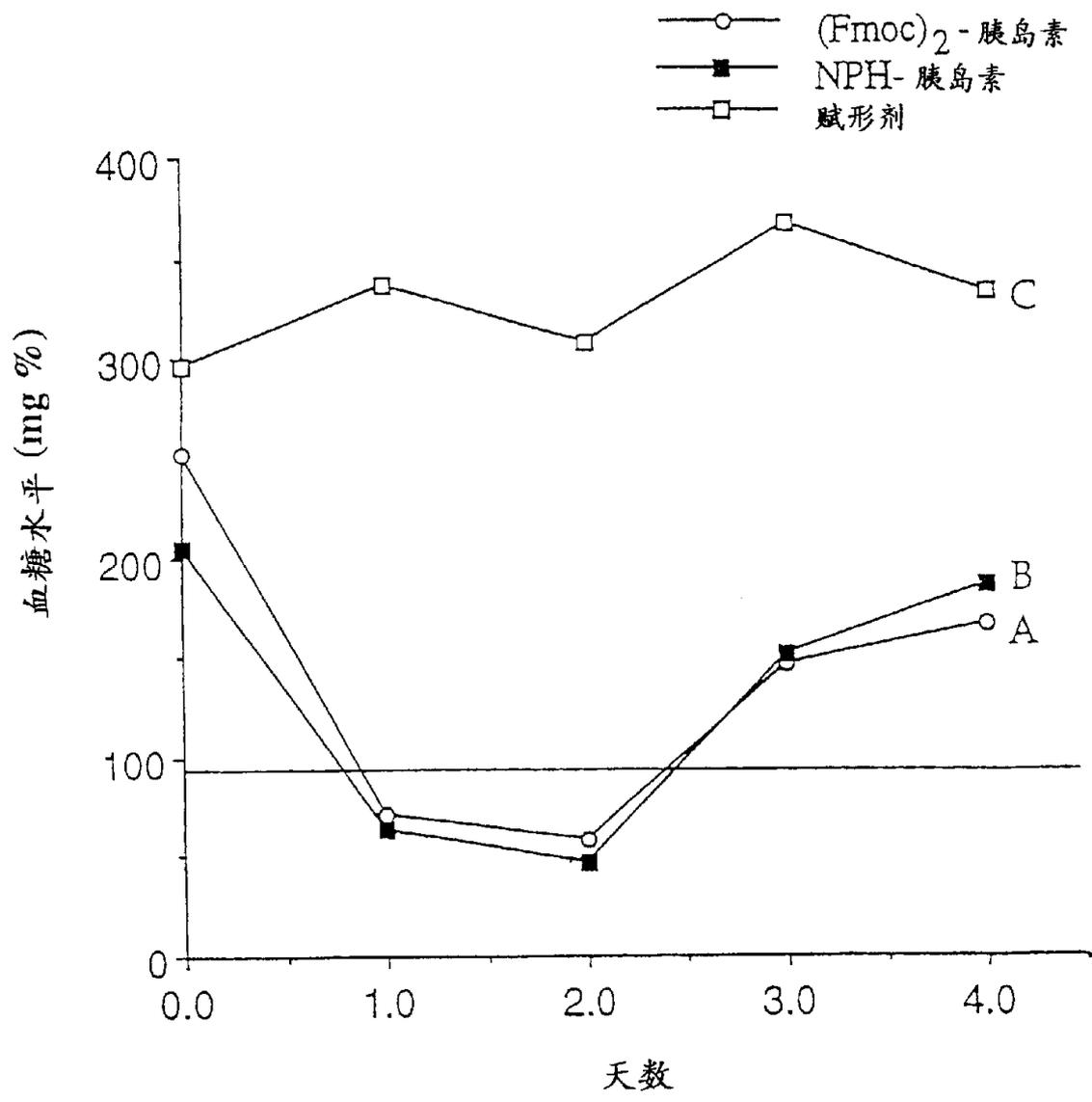


图 6

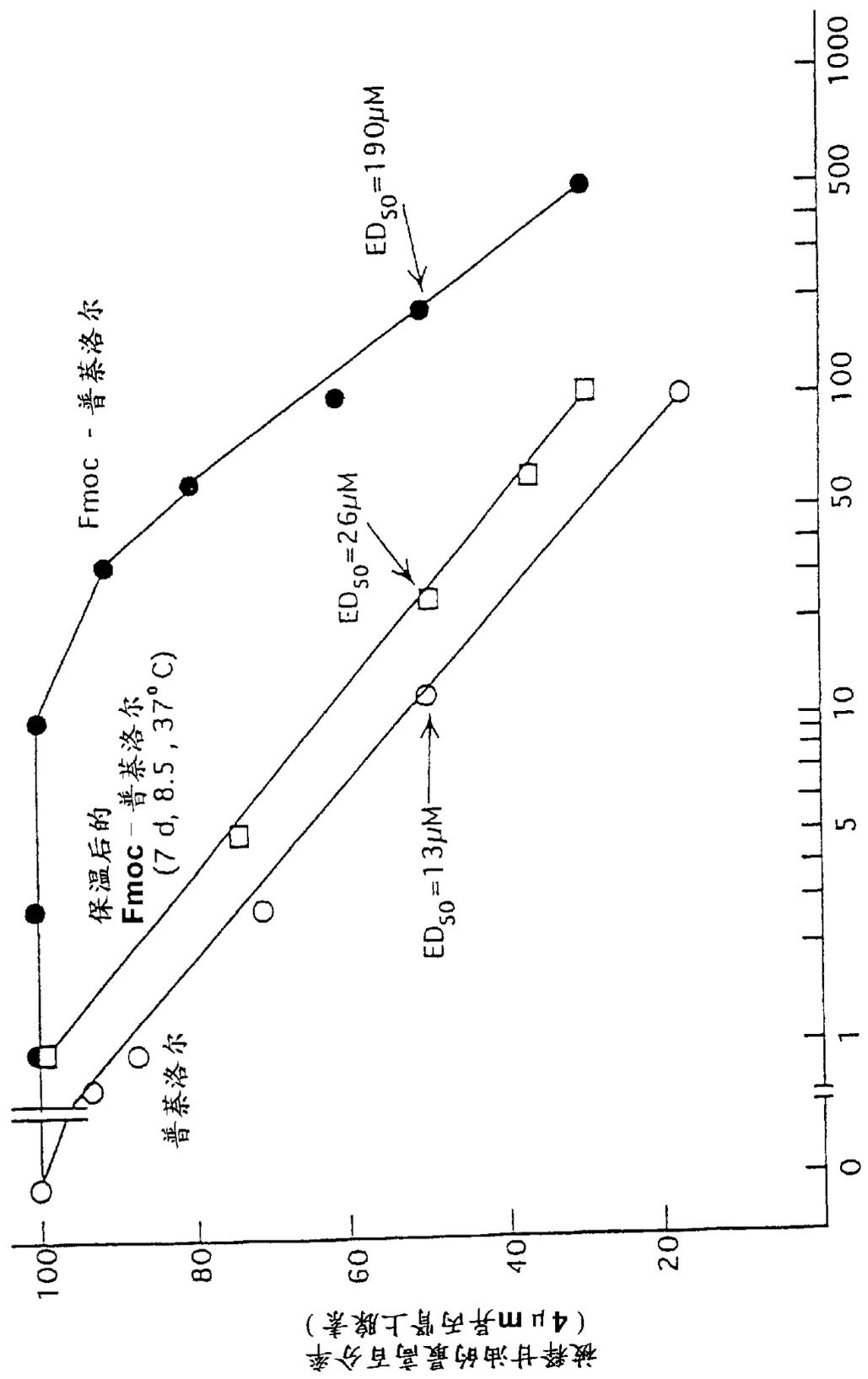


图7 普萘洛尔或Fmoc-普萘洛尔的浓度 (μM)