



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101983205 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 200980111919. 5

(22) 申请日 2009. 03. 30

(30) 优先权数据

08251739. 2 2008. 05. 19 EP

61/040, 973 2008. 03. 31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 09. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2009/005351 2009. 03. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/122285 EN 2009. 10. 08

(73) 专利权人 辉凌公司

地址 荷兰霍夫多普

(72) 发明人 苏达尔·阿拉加萨米

罗伯特·加雷因

卡齐米日·维希涅夫斯基

克劳迪奥·施泰加特

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 7/16(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03/072597 A1, 2003. 09. 04,

GERHARD MEISENBERG AND WILLIAM

H. SIMMONS. Behavioral Effects of Intracerebroventricularly Administered Neurohypophyseal Hormone Analogs in Mice. 《Pharmacology Biochemistry & Behavior》. 1982, 第 16 卷 819-825.

Zbigniew Grzonka et al. Synthesis and Some Pharmacological Properties of Oxytocin and Vasopressin Analogues with Sarcosine or N-Met hyl-L-alanine in Position 7. 《J. Med. Chem. 》. 1983, 第 26 卷 555-559.

Zbigniew Grzonka et al. Synthesis and Some Pharmacological Properties of [4-Threonine, 7-sarcosine]oxytocin, a Peptide with High Oxytocic Potency, and of [4-Threonine, 7-N-methylalanine]oxytocin. 《J. Med. Chem. 》. 1983, 第 26 卷 1786-1787.

审查员 陈中伟

权利要求书9页 说明书15页

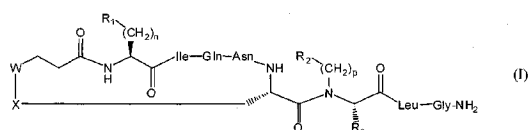
序列表1页

(54) 发明名称

催产素类似物

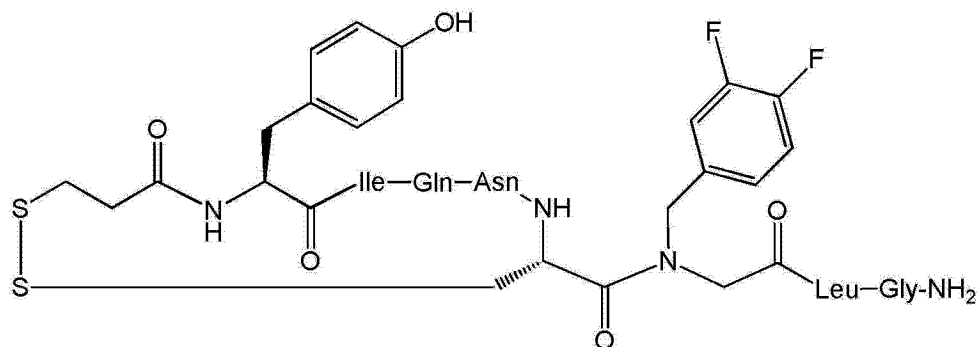
(57) 摘要

本发明涉及新的化合物、包含所述化合物的药物组合物、所述化合物在制造用于治疗尤其是泌乳功能受损病症的药物中的应用以及用于治疗所述病症的方法, 其中施用所述化合物。所述化合物由通式 (I) 表示, 如说明书中进一步所限定。

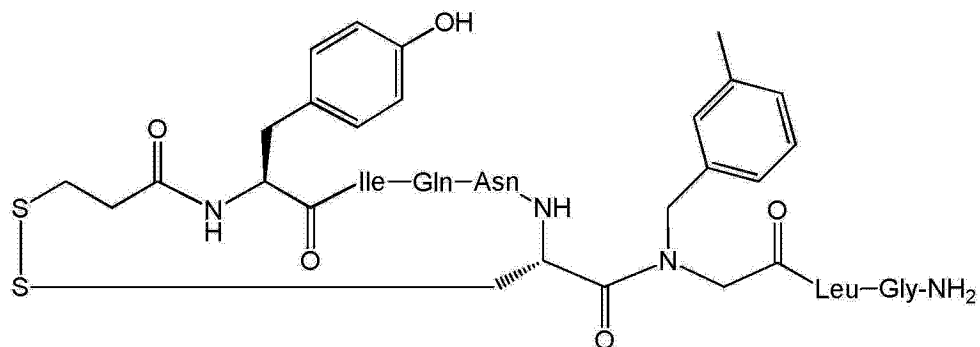


1. 化合物,选自由下列组成的组:

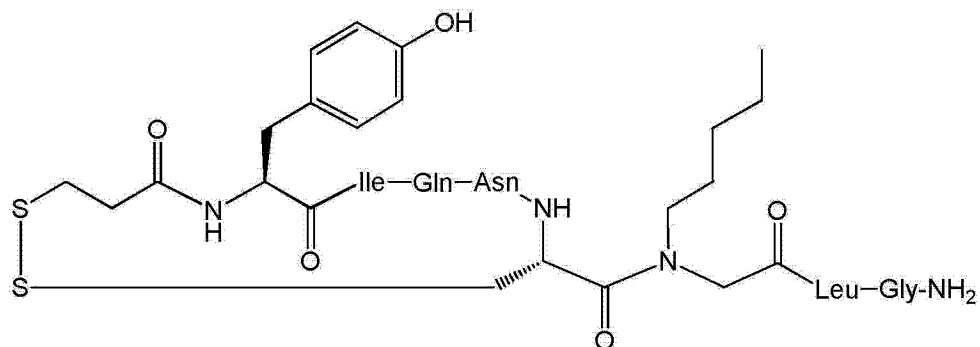
化合物 11



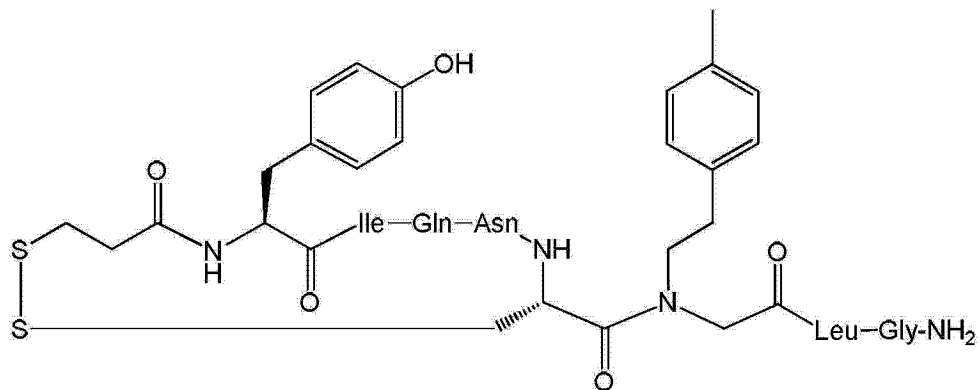
化合物 12



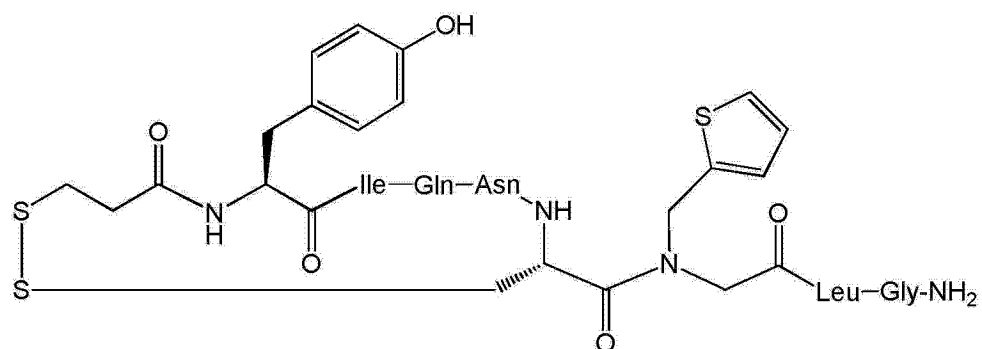
化合物 14



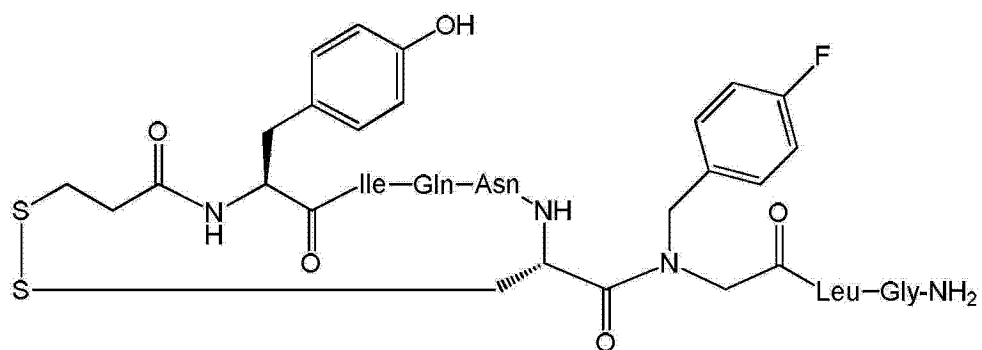
化合物 15



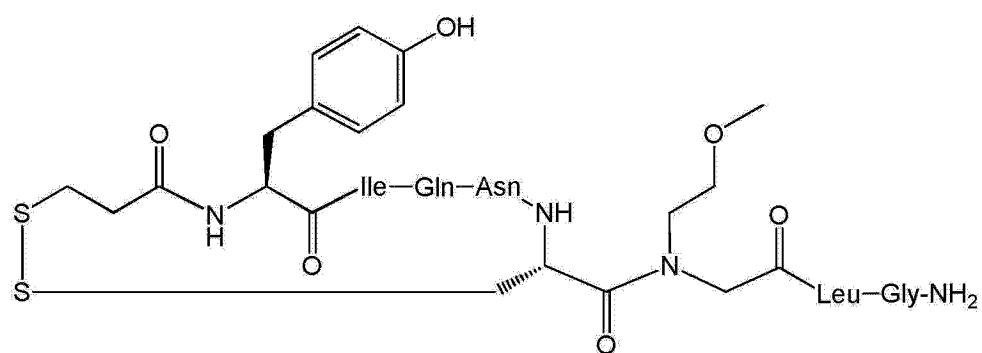
化合物 16



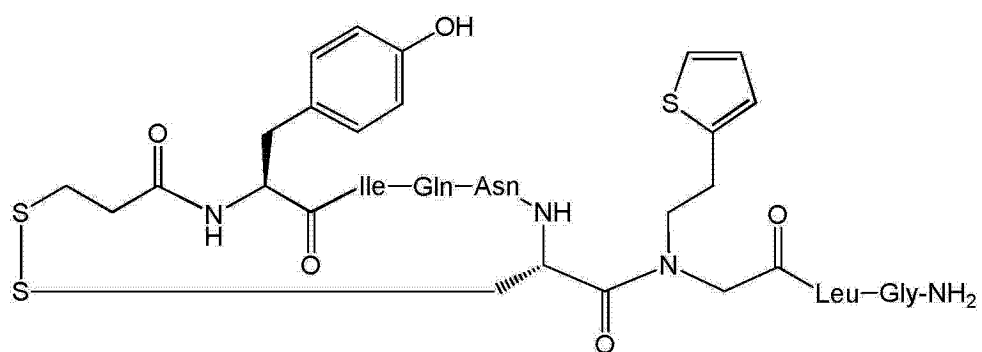
化合物 19



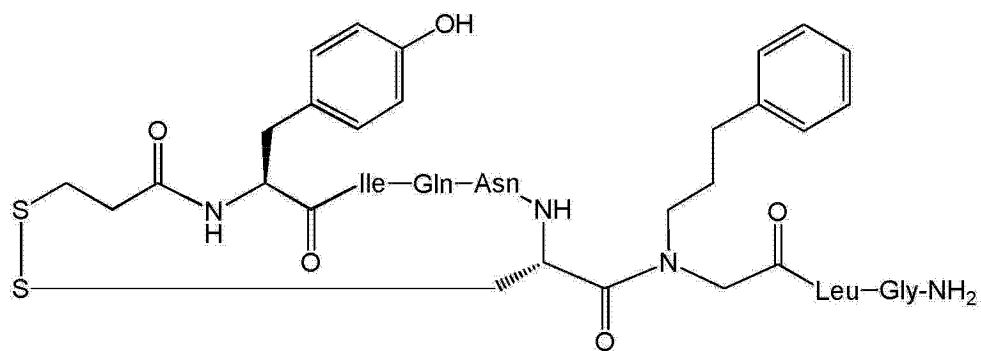
化合物 20



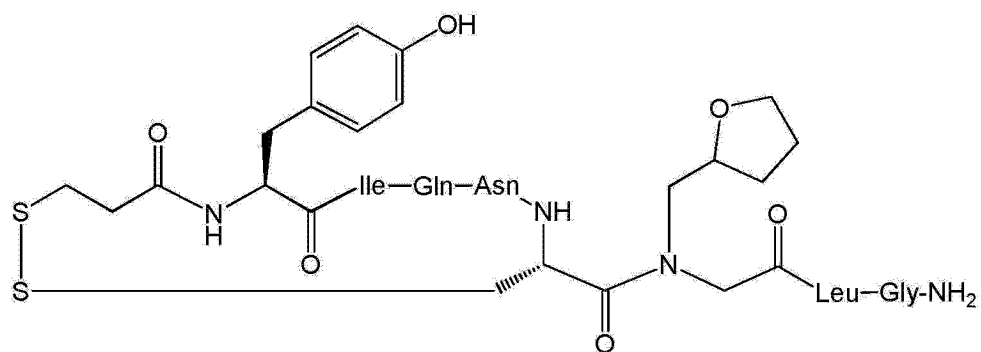
化合物 24



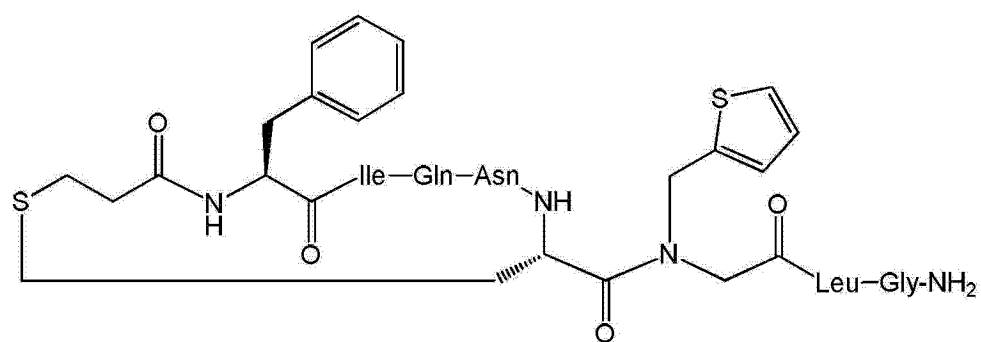
化合物 25



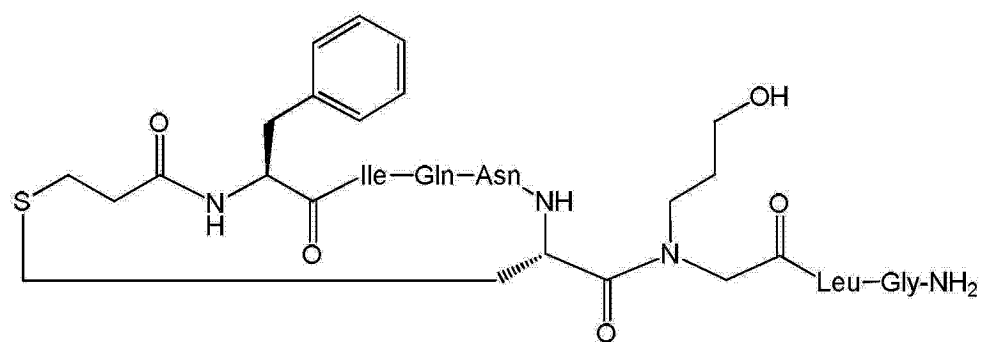
化合物 26



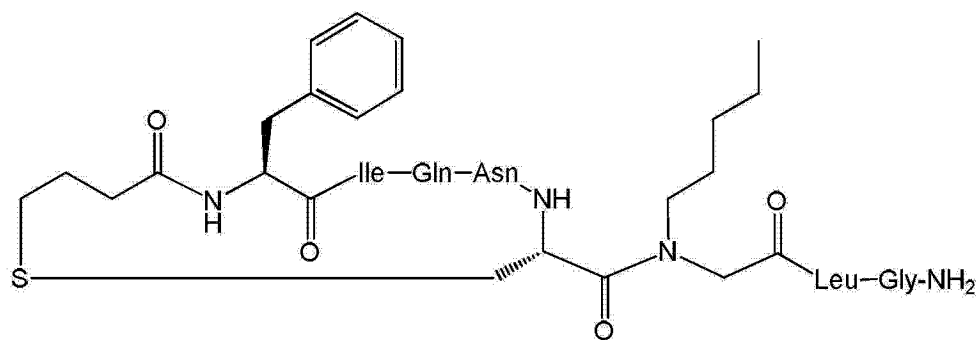
化合物 31



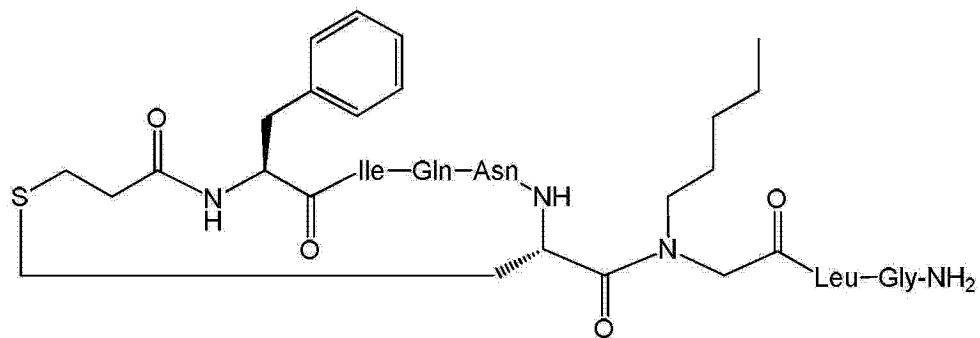
化合物 36



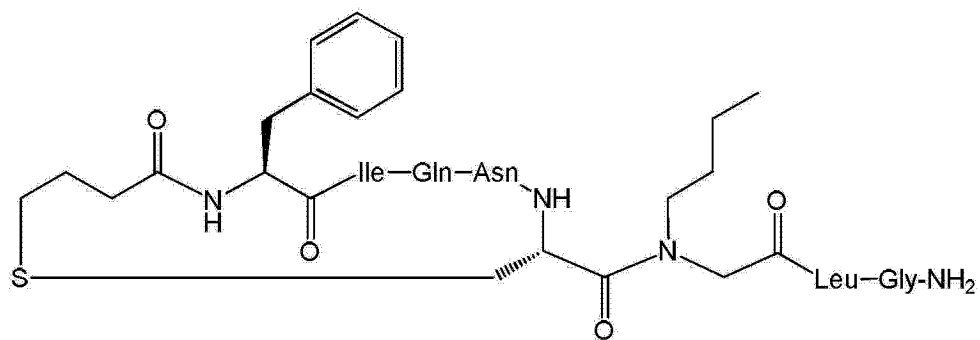
化合物 39



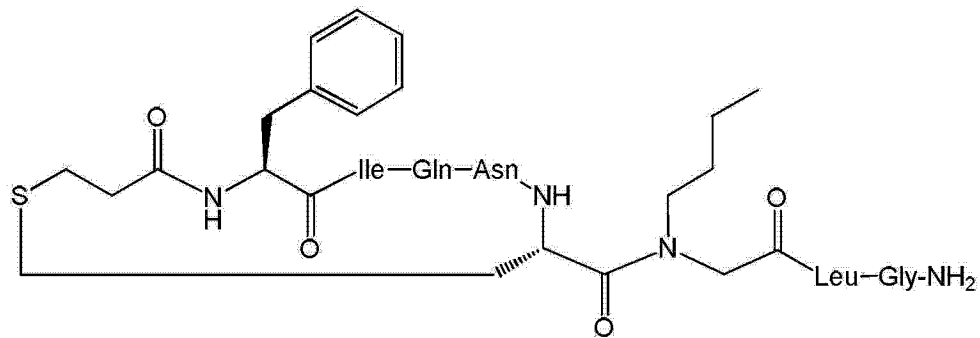
化合物 40



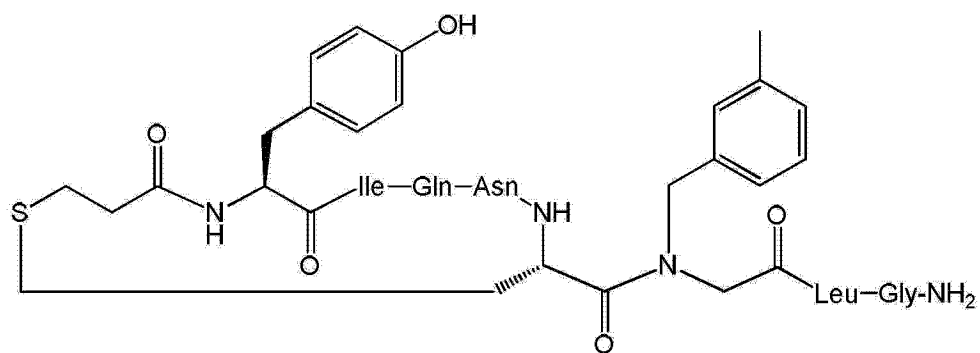
化合物 41



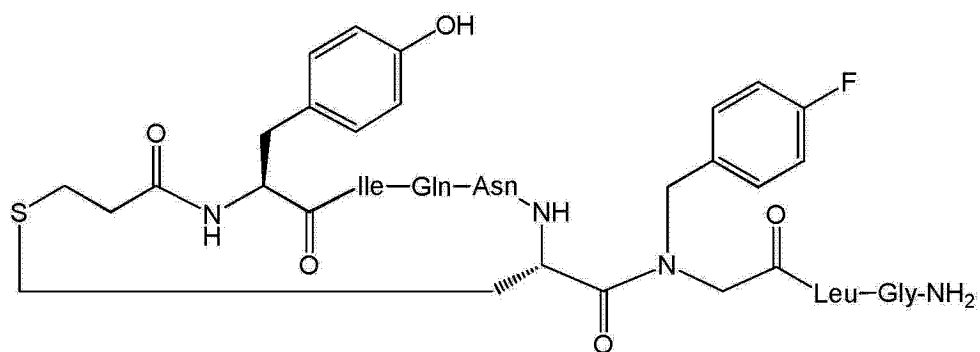
化合物 42



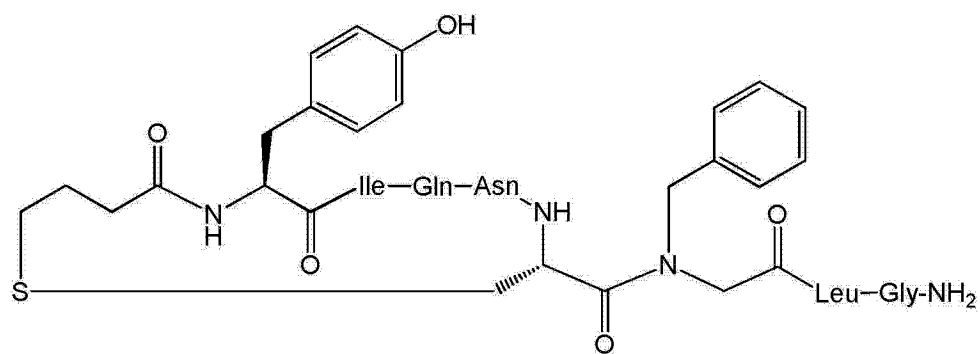
化合物 44



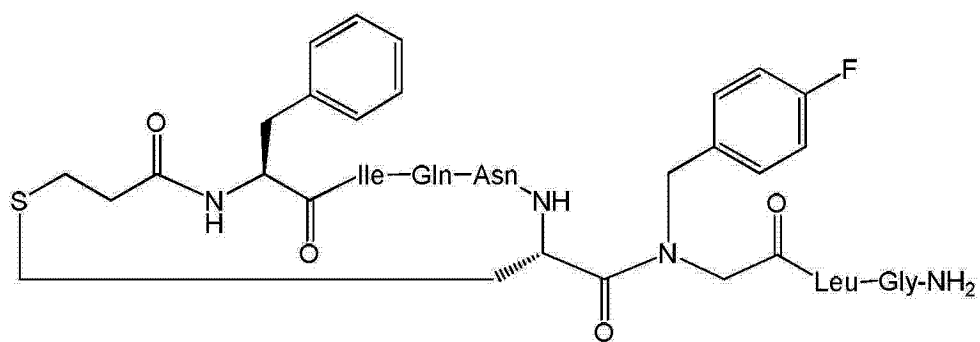
化合物 45



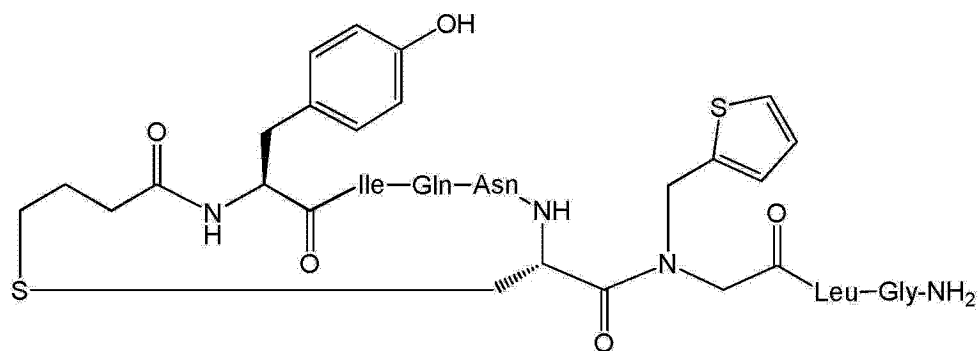
化合物 46



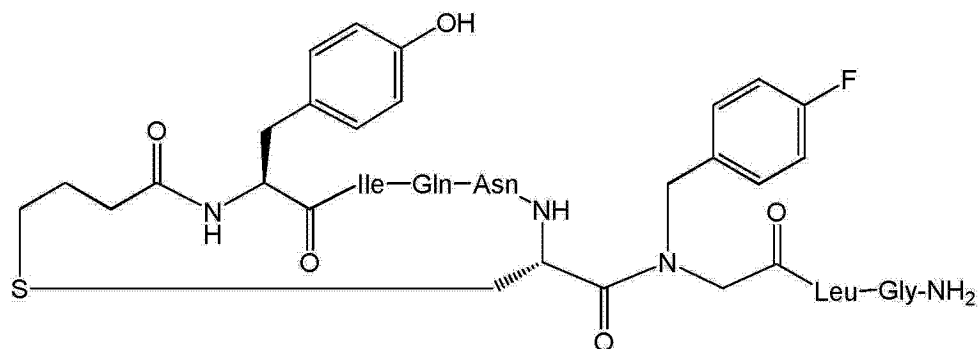
化合物 47



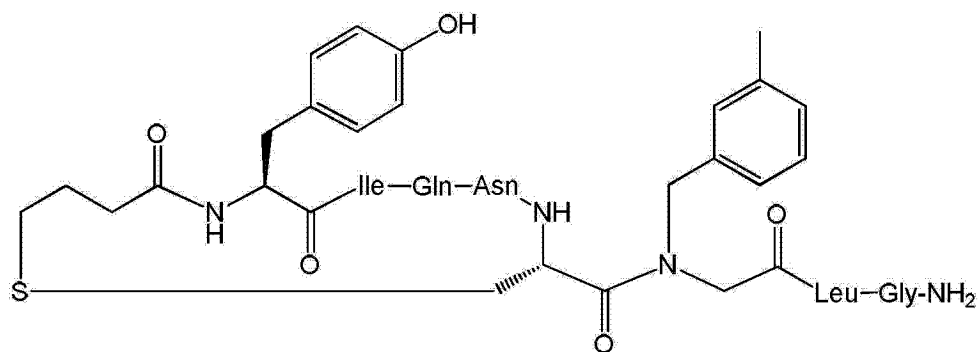
化合物 48



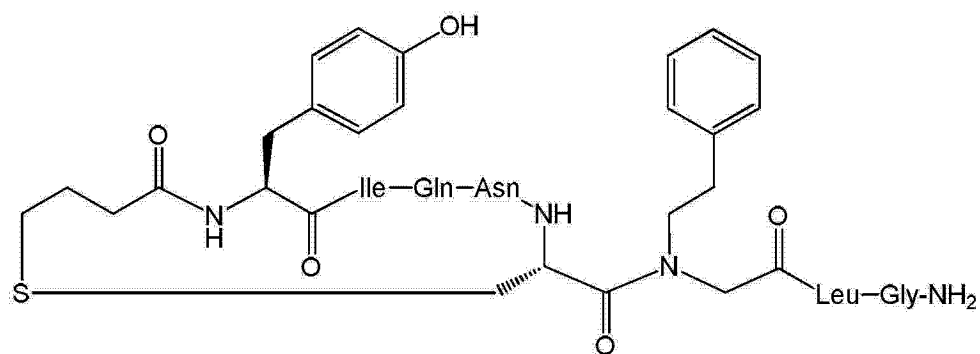
化合物 49



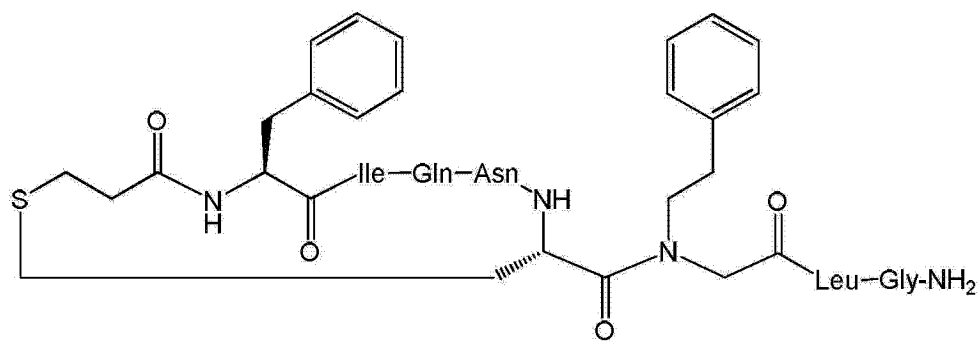
化合物 50



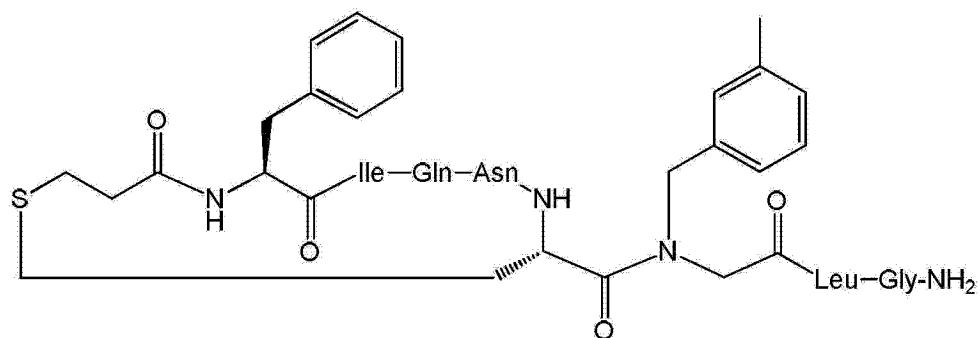
化合物 51



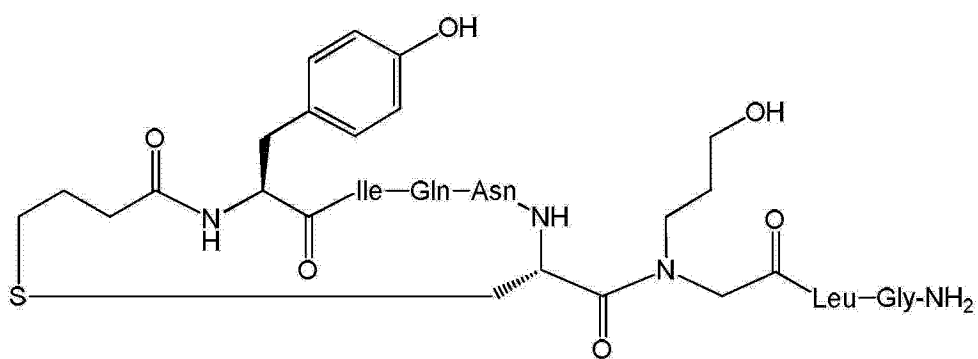
化合物 52



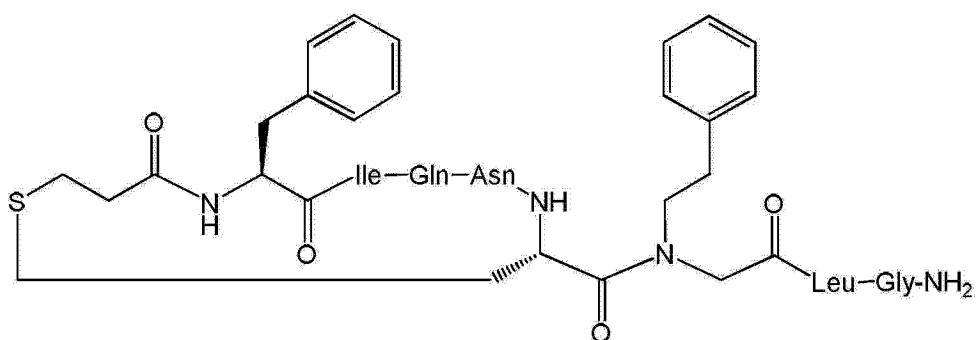
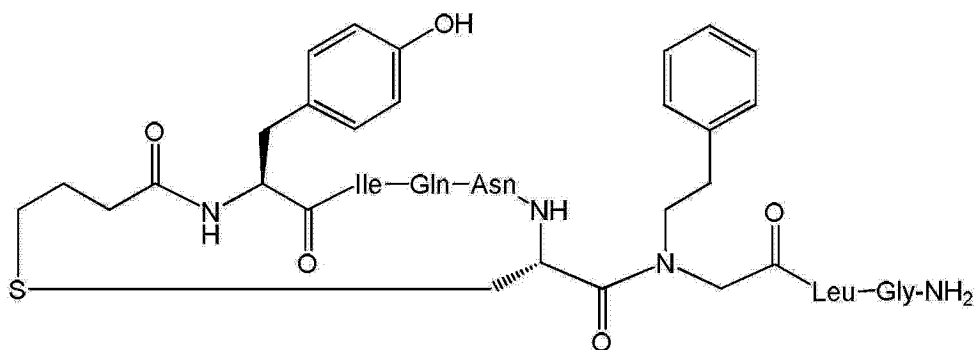
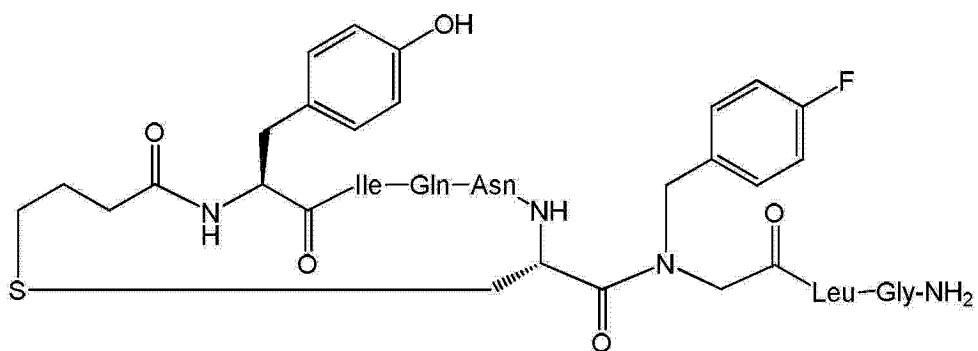
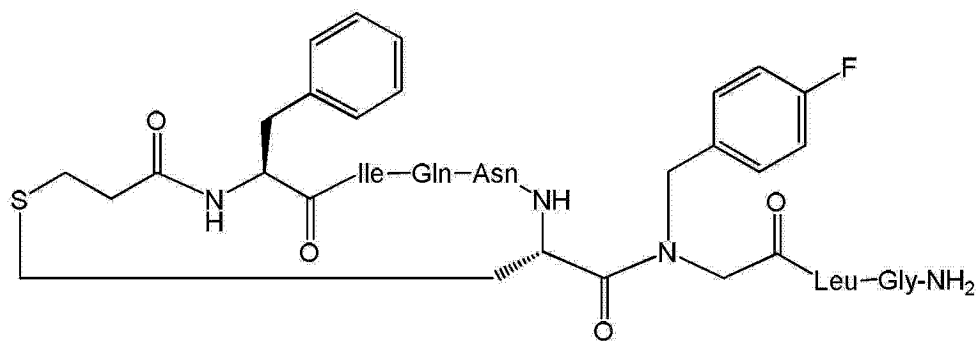
化合物 53



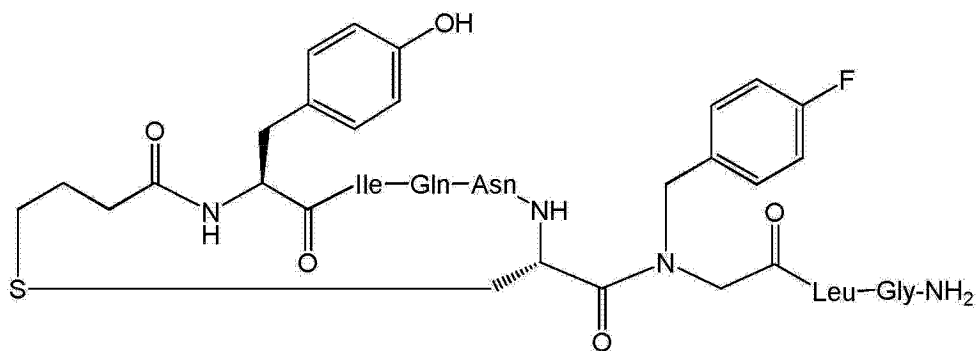
化合物 54



2. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中所述化合物选自由下列各项组成的组:



3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述化合物是:



4. 药物组合物,其包含作为活性成分的根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物和药用佐剂、稀释剂或载体。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物在制造用于治疗泌乳功能受损病症、引产损伤、子宫收缩乏力病症、大量出血、炎症、疼痛、男性性功能障碍、女性性功能障碍、肠易激综合征 (IBS)、便秘、胃肠梗阻、孤独症、应激、焦虑症、抑郁症、外科手术失血、产后出血、伤口愈合、胎盘分娩损伤或骨质疏松症的药物中的应用。

6. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物在制造用于治疗腹痛或背痛的药物中的应用。

7. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物在制造用于治疗焦虑障碍的药物中的应用。

8. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物在制造用于治疗乳腺炎的药物中的应用。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物在制造用于诊断癌症和胎盘功能不全的药物中的应用。

催产素类似物

[0001] 发明的领域

[0002] 本发明涉及新化合物、包含所述化合物的药物组合物、所述化合物在制造用于治疗尤其是泌乳功能受损病症 (compromised lactation conditions) 的药物中的应用以及用于治疗所述病症的方法, 其中施用所述化合物。

[0003] 背景

[0004] 肽类催产素受体激动剂包括天然激素催产素和卡贝缩宫素 (carbetocin)。

[0005]
$$\begin{array}{ccccccccccc} \text{Cys} & \text{---} & \text{Tyr} & \text{---} & \text{Ile} & \text{---} & \text{Gln} & \text{---} & \text{Asn} & \text{---} & \text{Cys} & \text{---} & \text{Pro} & \text{---} & \text{Leu} & \text{---} & \text{Gly} & \text{---} & \text{NH}_2 \\ | & & & & & & & & & & | & & & & & & & & \\ \text{S} & \text{---} & & & & & & & & & \text{S} & & & & & & & & \end{array} \quad (\text{催产素})$$

[0006] 催产素是有效的子宫收缩剂, 临床上用来引产, 并且已经显示促进泌乳的发生和维持, Gimpl, G. 等, *Physiol. Rev.* (生理学评论) 81 (2001) 629-683 和 Ruis H. 等, *British Medical Journal* (英国医学杂志) 283 (1981) 340-342。卡贝缩宫素 (1-脱氨-1-carba-2-酪氨酸 (O-甲基)-催产素) 也是一种临床上用于控制子宫收缩乏力和大量出血的有效子宫收缩剂。进一步的研究表明催产素激动剂有效用于治疗炎症和疼痛, 包括腹痛和背痛; 性功能障碍, 男性和女性; 肠易激综合征 (IBS)、便秘和胃肠梗阻; 孤独症、应激 (stress)、焦虑症 (anxiety) (包括焦虑障碍 (anxiety disorder)) 和抑郁症 (Pitman R. 等, *Psychiatry Research* (精神病学研究), 48:107-117; Kirsch P 等, *The Journal of Neuroscience* (神经科学杂志), 25 (49):11489-11493); 外科手术失血, 控制产后出血, 伤口愈合和感染; 乳腺炎和胎盘分娩; 和骨质疏松症。另外, 催产素激动剂可以有效用于诊断癌症和胎盘功能不全。

[0007] 催产素和卡贝缩宫素两者的缺点是它们缺少对血管加压素受体, 尤其是 V2 受体的选择性。在施用催产素期间, 通过诸如抗利尿作用 and 低钠血症的副作用观察到此缺点。

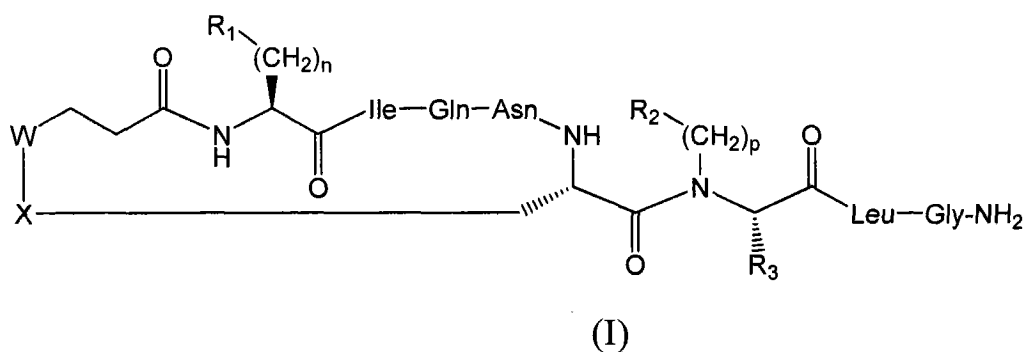
[0008] 为了改善催产素的药理性质, 已经合成了催产素的类似物。所述类似物由 Grozonka Z. 等在 *J. Med. Chem.* (药物化学杂志) 26 (1983) 555-559 和 *J. Med. Chem.* (药物化学杂志) 26 (1983) 1786-1787, 和由 Engström T. 等在 *E. J. Pharmacol.* (欧洲药理学杂志) 355 (1998) 203-210 中描述。另外, Fragiadaki M. 等在 *E. J. Med. Chem.* (欧洲药物化学杂志) (2007) 799-806 中已经描述了对催产素受体具有拮抗剂活性的催产素类似物。

[0009] 本发明可以提供选择性的有效化合物, 其在例如, 泌乳功能受损病症的治疗中提供可行的替代物和 / 或改善。

发明内容

[0010] 本发明涉及由通式 (I) 代表的化合物:

[0011]



[0012] 其中：

[0013] n 选自 0、1 和 2；

[0014] p 选自 0、1、2、3、4、5 和 6；

[0015] R_1 选自任选用至少一个 OH、F、Cl、Br、烷基或 O- 烷基取代基取代的芳基；

[0016] R_2 选自 R_4 、H、烷基、环烷基、芳基和 5 元 - 和 6 元 - 杂芳环体系；

[0017] R_3 选自 H 和，当 R_2 为 R_4 时与 R_2 形成环结构的共价键；

[0018] R_4 为用至少一个 O- 烷基、S- 烷基或 OH 取代基取代的 C_{1-6} 亚烷基部分；

[0019] W 和 X 各自独立地选自 CH_2 和 S，但不可以同时是 CH_2 ；

[0020] 烷基选自 C_{1-6} 直链和 C_{4-8} 支链烷基并且任选地具有至少一个羟基取代基；

[0021] 芳基选自苯基和单 - 或多 - 取代的苯基；

[0022] 条件是当 R_2 是 H，p 是 1， R_3 是 H，n 是 1 且 W 和 X 同时是 S 时， R_1 不是 4- 羟基苯基；

[0023] 环烷基选自 C_{3-6} 环烷基和任选地具有至少一个羟基取代基；和其溶剂化物和药用盐。

[0024] 本发明可以进一步涉及由上面式 (I) 所代表的化合物，其具有进一步的条件，即当 R_2 是 H，p 是 0， R_3 是 H，n 是 1 且 W 和 X 同时是 S 时， R_1 不是 4- 羟基苯基。因此，本发明可以涉及上面式 (I) 的化合物，其具有的条件是所述化合物不是 [1- β -Mpa, 7-Sar]OT 和 / 或不是 { 脱氨 [7- 甘氨酸] 催产素 }。

[0025] 为了本发明的目的，使用下面的术语。

[0026] C_{1-6} 直链烷基表示具有 1-6 个碳原子，包括其间的任何数目。

[0027] C_{4-8} 支链烷基表示含有 4-8 个碳原子的所有支链烷基基团，包括异 -、仲 - 和叔 - 构型，因为所述表述不涉及正在讨论的烷基链的结合位点。

[0028] C_{3-6} 环烷基表示含有 3-6 个碳原子（包括其间的任何数目）的碳环体系。该环系可以含有碳原子之间的不饱和键。

[0029] 5 元杂芳环体系是具有 5 个环原子的单环芳环体系，其中 1、2、3 或 4 个环原子独立地选自 N、O 和 S。优选的环系选自噻吩基、呋喃基、咪唑基、噻唑基、噻二唑基和四唑基组成的组。

[0030] 6 元杂芳环体系是具有 6 个环原子的单环芳环体系，其中 1、2、3 或 4 个环原子独立地选自 N、O 和 S。优选的环系选自吡啶基组成的组。

[0031] 芳基表示选自苯基和单 - 或多取代的苯基的芳族基团。

[0032] 取代基部分可以选自氟 (F)、氯 (Cl) 和溴 (Br) 原子和烷基、羟基 (-OH)、烷氧基

(-O- 烷基) 和烷硫基 (-S- 烷基)。

[0033] 药用盐的实例包括酸加成盐, 例如, 通过与氢卤酸诸如氢氯酸和无机酸, 诸如硫酸、磷酸和硝酸, 以及脂族酸、脂环酸、芳族酸或杂环磺酸或羧酸诸如甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、羟基乙酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、抗坏血酸、马来酸、羟基马来酸、丙酮酸、对羟基苯甲酸、双羟萘酸 (embonic acid)、甲磺酸、乙磺酸、羟基乙磺酸、卤代苯磺酸、三氟乙酸、三氟甲磺酸、甲苯磺酸和萘磺酸反应形成的盐。

[0034] 在优选的实施方案中, n 是 1。

[0035] 在优选的实施方案中, p 选自 1、2、3、4 和 5。

[0036] 在优选的实施方案中, R^1 选自苯基、4- 羟基苯基、4- 甲氧基苯基和 4- 乙基苯基。

[0037] 在优选的实施方案中, R^2 选自乙基、正丙基、正丁基、环丙基、2- 羟乙基、2- 甲氧基乙基、2- 苯乙基、苯基、苄基、2- 甲基苯基、3- 甲基苯基、4- 甲基苯基、4- 甲氧基苯基、4- 氟苯基、3,4- 二氟苯基、2- 噻吩基、2- 四氢呋喃基、2- 呋喃基、2- 吡啶基和 4- 吡啶基。

[0038] 在优选的实施方案中, R^3 是 H。

[0039] 在优选的实施方案中, 所述环结构选自 (R)-4- 甲氧基吡咯烷基、(R)-4- 甲基硫代吡咯烷基和 (S)-4- 羟基吡咯烷基。

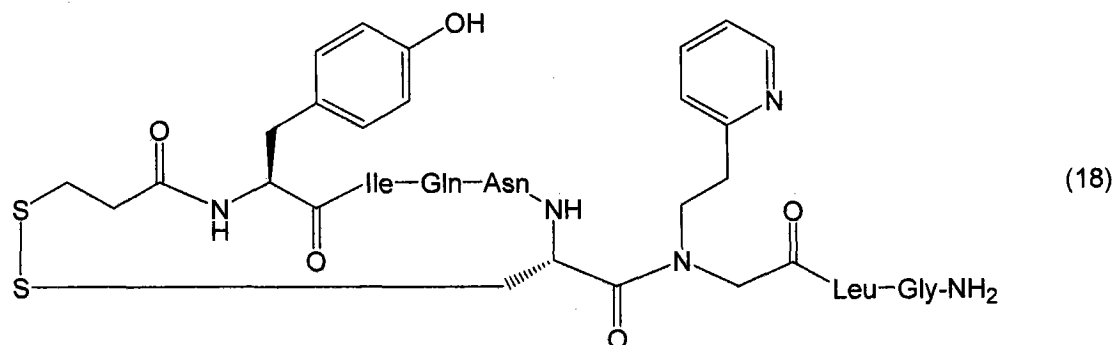
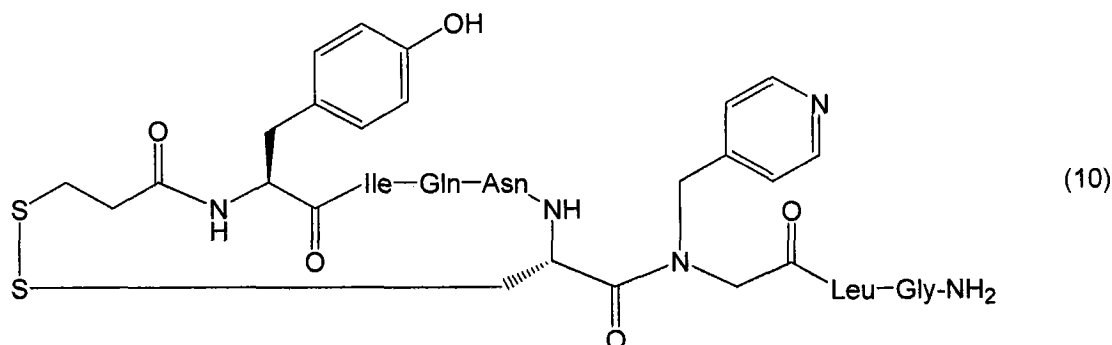
[0040] 在优选的实施方案中, W 是 CH_2 且 X 是 S。

[0041] 在优选的实施方案中, W 是 S 且 X 是 CH_2 。

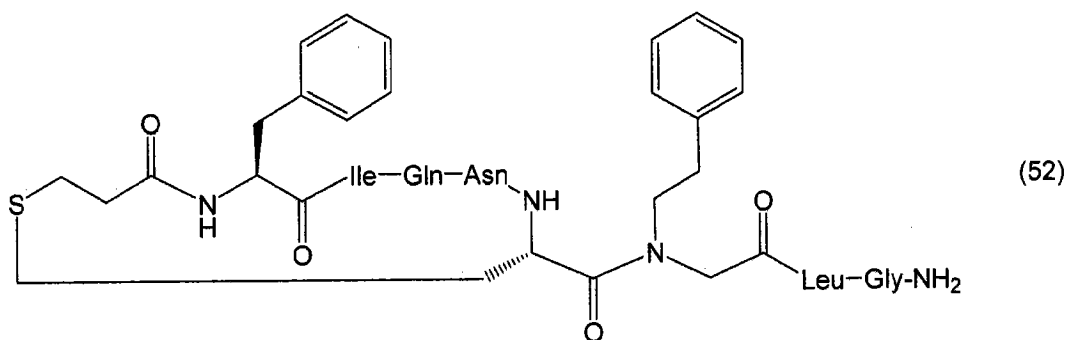
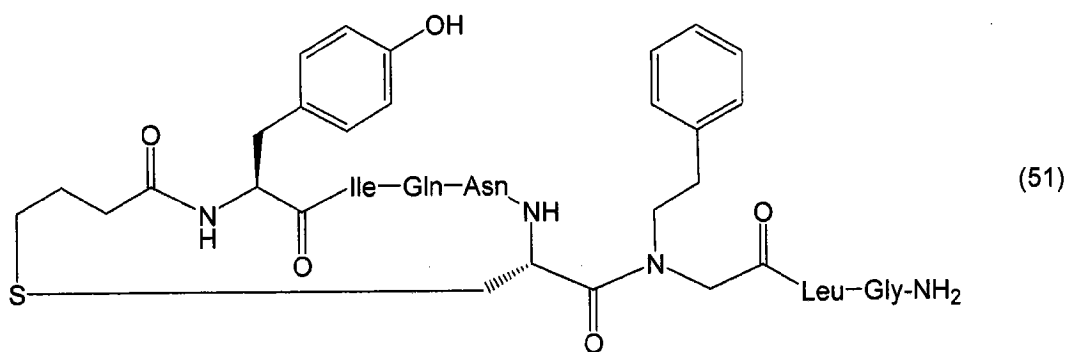
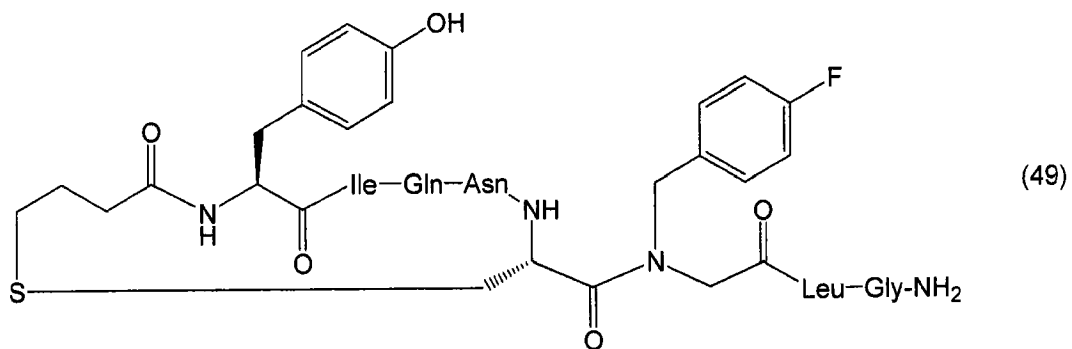
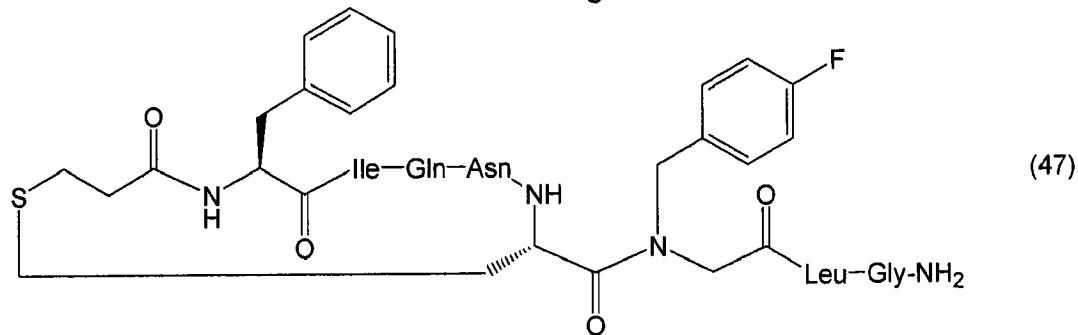
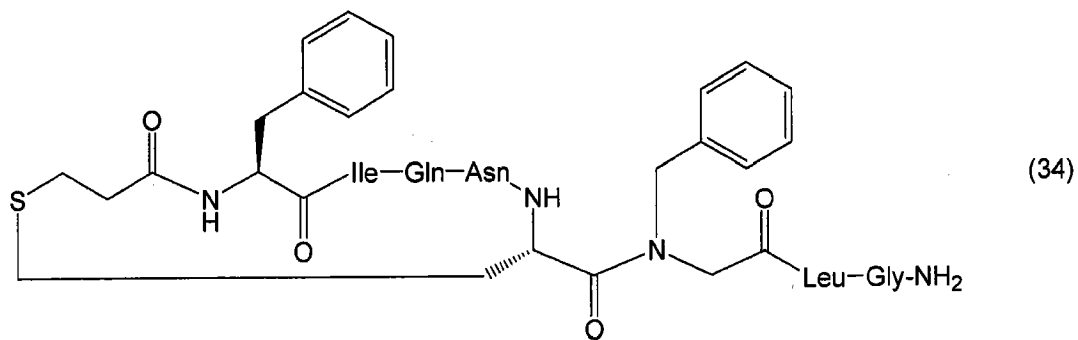
[0042] 在优选的实施方案中, W 和 X 同时是 S。

[0043] 在最优选的实施方案中, 本发明是选自由下列各项组成的组的化合物:

[0044]



[0045]



[0046] 此外,本发明涉及用作药物的如上所给出的化合物。

[0047] 因此,本发明还涉及包含作为活性成分的如上所给出的化合物和药用佐剂、稀释

剂或载体的药物组合物。

[0048] 所述药物组合物可以适于口服、静脉内、局部、腹膜内、经鼻、口腔、眼内、耳内、舌下或皮下给药或适于经呼吸道给药,例如,以气雾剂或空气中悬浮的细粉的形式。因此所述组合物可以例如采取片剂、胶囊剂、粉剂、微粒、颗粒剂、糖浆剂、混悬剂、溶液、经皮贴片或栓剂的形式。

[0049] 应当注意根据本发明的组合物可以任选地包括两种或以上的上面概述的化合物。

[0050] 本发明的药物组合物可以任选地包含,例如,至少一种另外的添加剂,所述添加剂选自崩解剂、粘合剂、润滑剂、调味剂、防腐剂、着色剂和它们的任意混合物。所述和其他添加剂的实例可见“Handbook of Pharmaceutical Excipients(药物赋形剂手册)”；A. H. Kibbe 主编,第三版,American Pharmaceutical Association(美国药学会),美国,和英国药学会出版社(Pharmaceutical Press UK),2000。

[0051] 本发明的药物组合物可以适于经鼻给药。其可以包含优选地与受者的血液等渗的本发明的化合物的无菌含水制剂。此含水制剂可以根据已知的方法使用适当的分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制。鼻腔喷雾剂**SYNTOCINON®**(催产素)是也适用于本文公开的本发明的化合物的适当的药物配方的实例。水、林格溶液和等渗氯化钠溶液是示例性的可接受的稀释剂。所述制剂还可以包含赋形剂诸如磷酸钠、柠檬酸、氯化钠、甘油、山梨醇溶液、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯和氯代丁醇。

[0052] 另外,本发明涉及如上所概述的化合物用于治疗一种或多种医学病症的应用,或在制造用于治疗一种或多种医学病症的药物中的应用,所述医学病症诸如泌乳功能受损病症;引产损伤(labour induction impairment);子宫收缩乏力病症;大量出血;炎症和疼痛,包括腹痛和背痛;性功能障碍,男性和女性两者;肠易激综合征(IBS)、便秘和胃肠梗阻;孤独症、应激、焦虑症(包括焦虑障碍)和抑郁症;外科手术失血、产后出血、伤口愈合和感染;乳腺炎和胎盘分娩损伤;和骨质疏松症;以及用于诊断癌症和胎盘功能不全的应用。在此,术语焦虑症包括焦虑障碍。焦虑障碍包括亚指征广泛性焦虑障碍(sub indications generalized anxiety disorder)、恐慌症、恐旷症、恐怖症、社交焦虑障碍、强迫症、创伤后应激障碍和分离焦虑症。

[0053] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗泌乳功能受损病症;引产损伤;子宫收缩乏力病症;大量出血;炎症和疼痛,包括腹痛和背痛;性功能障碍,男性和女性两者;肠易激综合征(IBS)、便秘和胃肠梗阻;孤独症、应激、焦虑症(包括焦虑障碍)和抑郁症;外科手术失血、产后出血、伤口愈合和感染;乳腺炎和胎盘分娩损伤;和骨质疏松症;以及诊断癌症和胎盘功能不全的方法。

[0054] 根据本发明的化合物的典型剂量在宽范围内变化,并且将取决于各种因素诸如每个患者的个体需要和给药途径。具有本领域普通技术的医生应该能够根据手边的情况对剂量进行优化。

[0055] 例如,如果本发明的组合物用于促进泌乳的发生和维持,(例如,用于鼻内给药),则典型剂量可以为每个吸奶期 0.05–1.0 μ g/kg 体重。鼻内剂量可以分为,例如,1、2 或 3 个亚剂量(例如,多次喷鼻(puffs)),例如根据需要递送至一侧或双侧鼻孔。技术人员或医生可以考虑与此剂量范围和实际实施相关的变化从而适应于手边的情况。

[0056] 在另一个实施例中,本发明的组合物可以作为静脉(iv)输注液施用,例如,用于

治疗产后出血或外科手术失血。在此实施例中,其可以在较长的时间内施用。通过静脉输注给药的剂量实例为每小时 0.5-200 $\mu\text{g/kg}$ 体重。

[0057] 在另一个实施例中,本发明的组合物可以用于皮下(sc)、鼻内或口腔给药,例如,用于治疗焦虑障碍或抑郁症。用于皮下(sc)、鼻内或口腔给药的剂量实例为 0.5-1000 $\mu\text{g/kg}$ 体重。所述剂量可以,例如,根据需要一天多次给药,例如,一天一次或两次。

[0058] 使用的缩写为:

[0059] AcOH 乙酸

[0060] Boc 叔丁氧基羰基

[0061] BOP 苯并三唑-1-基氧基三-二甲氨基磷六氟磷酸盐

[0062] Bua 丁酸

[0063] Bu 丁基-烷基残基可以进一步表示为 n(正,即,无

[0064] 支链)、i(异)、s(仲)和 t(叔)

[0065] CH_3CN 乙腈

[0066] DCC N,N'-二环己基碳二亚胺

[0067] DCM 二氯甲烷

[0068] DIC N,N'-二异丙基碳二亚胺

[0069] DIPEA N,N-二异丙基乙胺

[0070] DMF N,N-二甲基甲酰胺

[0071] 4-FBzlGly N-(4-氟苄基)甘氨酸

[0072] Fmoc 9-苄基甲氧基羰基

[0073] Fmoc-Cl 9-苄基甲氧基羰酰氯

[0074] Fmoc-OSu N-(9-苄基甲氧基羰基)琥珀酰亚胺

[0075] h 小时

[0076] HBTU O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐

[0077] Hcy 高半胱氨酸

[0078] HF 氢氟酸

[0079] HOBT 1-羟基苯并三唑

[0080] HPLC 高效液相色谱法

[0081] IPA 异丙醇

[0082] MeOH 甲醇

[0083] MBHA 4-甲基二甲苯胺(methylbenzylhydramine)

[0084] NMM 4-甲基吗啉

[0085] 4-Pic 4-吡啶甲基(4-吡啶基甲基)

[0086] PyBOP 苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷磷六氟磷酸盐

[0087] tBu 叔丁基

[0088] tBuOH 叔丁醇

[0089] TEA 三乙胺

[0090] TFA 三氟乙酸

[0091] TIS 三异丙基硅烷

[0092] Trt 三苯甲基 [三苯基甲基, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}-$]

[0093] 除非另外指明,使用 L-氨基酸和对其采用常规的氨基酸术语。

[0094] 试验(合成)

[0095] 氨基酸衍生物和树脂购自商业供应商(Bachem, Novabiochem 和 Peptides International)。N-Fmoc-N-($\text{R}_2(\text{CH}_2)_p$) 甘氨酸、Fmoc-Cys(叔丁氧基羰基丙基)-OH 和 Fmoc-Hcy(叔丁氧基羰基乙基)-OH 根据文献合成[Weber 等, J. Med. Chem. (药物化学杂志), 46 1918(2003), Prochazka 等 Collect. Czech. Chem. Commun. (捷克化学通讯), 57, 1335(1992) 和 Wisniewski 等在 WO 03/072597 中]。其他化学品和溶剂由 Sigma-Aldrich, Fluka 和 Acros Organics 提供。

[0096] 本文的化合物通过固相肽化学中的标准方法使用 Fmoc 和 Boc 方法学来合成。Fmoc-保护的氨基酸的所有偶联使用 DIC/HOBt/DMF 介导,并且 Boc-保护的氨基酸的所有偶联使用处于 DCM 中的 DIC 或 DCC 介导。使用处于 DMF 中的 20% 哌啶进行 Fmoc 基团的去除,并且使用 1% 间甲酚在 50% TFA/DCM 中进行 Boc 基团的去除,其进行 5 分钟和 25 分钟。使用 DCM、IPA、DMF 和 MeOH 进行必需的树脂洗涤。根据需要,使用 10% TEA/DCM, 5 分钟的 2 次树脂洗涤来完成中和。

[0097] 除非另外提供,所有反应在室温下进行。除了前面引用的参考文献以外,下面的标准参考文献对一般的试验装置以及所需的起始物质和试剂的可用性提供了进一步的指导:

[0098] Kates, S. A., Albericio, F., Eds., Solid Phase Synthesis: A Practical Guide(固相合成:操作指南), Marcel Dekker, New York(纽约), Basel(巴塞尔), 2000;

[0099] Stewart, J. M., Young, J. D., Solid Phase Synthesis(固相合成), Pierce Chemical Company(皮尔斯化学公司), 1984;

[0100] Bisello 等, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 1998, 273, 22498-22505; 和

[0101] Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (美国化学会会志) 1963, 85, 2149-2154.

[0102] 合成的肽的纯度可以通过分析性反相 HPLC 来确定。肽的结构完整性可以使用氨基酸分析和电喷雾质谱法来确认。

[0103] 使用 Fmoc 和 Boc 方法学来合成树脂结合的 8 位 (Leu) 和 9 位 (Gly) 二肽。

[0104] 氨基酸残基的 7 位中的氨基酸衍生物经两种途径中的一种来引入:溴乙酸与树脂结合的二肽在 DIC/HOBt/DMF 条件下偶联,并且用 $(\text{R}_2(\text{CH}_2)_p)\text{NH}_2$ 替换溴原子,从而提供树脂结合的 N-($\text{R}_2(\text{CH}_2)_p$) 甘氨酸;或 N-Fmoc-N-($\text{R}_2(\text{CH}_2)_p$) 甘氨酸或 Fmoc-pro-OH 衍生物与树脂结合的二肽根据 Fmoc 方法学偶联。除非另外指明,所有随后的氨基酸偶联遵从 Fmoc 方法学。

[0105] 在 6 位中引入的氨基酸衍生物为下面之一:Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Hcy(叔丁氧基羰基乙基)-OH 或 Fmoc-Cys(叔丁氧基羰基丙基)-OH。6 位为 Fmoc-Cys(Trt)-OH 的肽类似物需要 Mpa(Trt)-OH 与树脂结合的九肽残基的 N 端偶联。

[0106] 使用 TFA/TIS/ H_2O 95/2.5/2.5(v/v/v) 溶液将使用 rink amide 树脂支持物合成的肽和任何酸易分解保护基团诸如 Boc、三苯甲基和叔丁基一起从树脂上裂解。在从树脂上裂解肽之前将所述肽环化。使用 HF/茴香醚 14/1(v/v) 溶液将使用 MBHA 树脂支持物合成

的肽从树脂上裂解。在从树脂上裂解肽之前将所述肽环化。

[0107] 通过用碘氧化溶解在 10% TFA (aq) 中的线性肽来实现线性九肽通过形成二硫化物 (环) 的环化作用。通过用高稀释度的 HBTU/DIPEA/DMF 或 PyBOP/DIPEA/DMF 介导来实现线性九肽通过形成酰胺键的环化作用。

[0108] 肽通过在三乙基磷酸铵缓冲液 (aq) 中的制备性 HPLC 进行纯化并用乙酸 (aq) / 乙腈缓冲系统脱盐。汇集并冻干纯度超过 97% 的级分。

[0109] 表 1 列举了通过上述步骤制备的化合物。星号 “*” 标记最优选的实施方案。

[0110] 表 1 :制备的具有式 (I) 的化合物

[0111]

SEQ ID No.	W	X	R ₁	n	R ₂	p	R ₃
1	CH ₂	S	4-甲氧基苯基	1	CH ₂ -(R)-CH(OCH ₃)-CH ₂	-	键
2	CH ₂	S	4-甲氧基苯基	1	CH ₂ -(R)-CH(SCH ₃)-CH ₂	-	键
3	CH ₂	S	4-乙基苯基	1	CH ₂ -(R)-CH(OCH ₃)-CH ₂	-	键

[0112]

4	S	CH ₂	4-乙基苯基	1	CH ₂ -(S)-CH(OH)-CH ₂	-	键
5	CH ₂	S	4-甲氧基苯基	1	H	0	H
6	CH ₂	S	4-乙基苯基	1	CH ₂ -(S)-CH(OH)-CH ₂	-	键
7	S	S	4-羟基苯基	1	H	4	H
8	S	S	4-羟基苯基	1	苯基	2	H
9	S	S	4-羟基苯基	1	2-呋喃基	1	H
10*	S	S	4-羟基苯基	1	4-吡啶基	1	H
11	S	S	4-羟基苯基	1	3,4-二氟苯基	1	H
12	S	S	4-羟基苯基	1	3-甲基苯基	1	H
13	S	S	4-羟基苯基	1	2-甲基苯基	1	H
14	S	S	4-羟基苯基	1	H	5	H
15	S	S	4-羟基苯基	1	4-甲基苯基	2	H
16	S	S	4-羟基苯基	1	2-噻吩基	1	H
17	S	S	4-羟基苯基	1	4-吡啶基	2	H
18*	S	S	4-羟基苯基	1	2-吡啶基	2	H
19	S	S	4-羟基苯基	1	4-氟苯基	1	H
20	S	S	4-羟基苯基	1	甲氧基	2	H
21	S	S	4-羟基苯基	1	环丙基	1	H
22	S	S	4-羟基苯基	1	4-甲氧基苯基	1	H
23	S	S	4-羟基苯基	1	4-甲基苯基	1	H
24	S	S	4-羟基苯基	1	2-噻吩基	2	H
25	S	S	4-羟基苯基	1	苯基	3	H
26	S	S	4-羟基苯基	1	2-四氢呋喃基	1	H
27	S	S	4-羟基苯基	1	2-四氢呋喃基	1	H
28	S	CH ₂	苯基	1	甲氧基	2	H
29	CH ₂	S	苯基	1	甲氧基	2	H
30	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	甲氧基	2	H
31	S	CH ₂	苯基	1	2-噻吩基	1	H
32	S	CH ₂	4-羟基苯基	1	苯基	1	H
33	S	CH ₂	4-羟基苯基	1	苯基	2	H
34*	S	CH ₂	苯基	1	苯基	1	H
35	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	H	4	H
36	S	CH ₂	苯基	1	OH	3	H

[0113]

37	CH ₂	S	苯基	1	H	3	H
38	S	CH ₂	苯基	1	H	3	H
39	CH ₂	S	苯基	1	H	5	H
40	S	CH ₂	苯基	1	H	5	H
41	CH ₂	S	苯基	1	H	4	H
42	S	CH ₂	苯基	1	H	4	H
43	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	3,4-二氟苯基	1	H
44	S	CH ₂	4-羟基苯基	1	3-甲基苯基	1	H
45	S	CH ₂	4-羟基苯基	1	4-氟苯基	1	H
46	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	苯基	1	H
47*	S	CH ₂	苯基	1	4-氟苯基	1	H
48	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	2-噻吩基	1	H
49*	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	4-氟苯基	1	H
50	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	3-甲基苯基	1	H
51*	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	苯基	2	H
52*	S	CH ₂	苯基	1	苯基	2	H
53	S	CH ₂	苯基	1	3-甲基苯基	1	H
54	CH ₂	S	4-羟基苯基	1	OH	3	H

[0114] 提供下面的详细实施例以进一步说明合成：

[0115] 在所有的合成中，在 waters 600 液相色谱仪上进行分析性 HPLC，使用 Vydac C18，5 μ m，4.6x250mm 柱，流速为 2ml/min。在 Waters 2000 液相色谱仪上进行制备性 HPLC，使用 PrePak 47x300mm 柱体，流速为 100ml/min。最终的化合物分析在 1100Agilent 液相色谱仪上进行，使用 VydacC18，5 μ m，2.1x250mm 柱，流速为 0.3ml/min。在 Finnigan MAT 光谱仪上记录质谱。

[0116] 化合物 49 ;carba-1-[4-FBzlGly⁷]dOT：

[0117] 使用的氨基酸衍生物为 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys(叔丁氧基羰基丙基)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH 和 Boc-Tyr(tBu)-OH(Peptides International)。Fmoc-Cys(叔丁氧基羰基丙基)-OH 如上进行合成。

[0118] 完全保护的肽树脂从 1.45g(0.87mmol)Rink Amide AM 树脂(200-400 目，Novabiochem)开始手工合成。进行 DIC/HOBt/DMF 介导的与 3 倍过量的氨基酸 Gly 和 Leu 衍生物的单偶联(single coupling)。使用处于 DMF 中的 4 倍过量的 BrCH₂CO₂H/DIC/HOBt 引入 N-(4-氟苄基)甘氨酸残基，随后用处于 DMF 中的 10 倍过量的 4-氟苄胺进行溴取代。进行 DIC/DCM 介导的与 4 倍过量的 Fmoc-Cys(叔丁氧基羰基丙基)-OH 的偶联。随后进行 DIC/HOBt/DMF 介导的与 3 倍过量的氨基酸 Asn、Gln、Ile 和 Tyr 衍生物的单偶联。

使用处于 DMF 中的 20% 哌啶去除 Fmoc 基团。在完成固相合成后,所述树脂用 TFA/TIS/H₂O 96/2.5/1.5(v/v/v) 溶液 (50ml) 处理 1.5h 并滤出。滤液真空浓缩,并且用二乙醚沉淀粗制的线性肽。处于 DMF (300ml) 中的沉淀分三部分 (3x100ml) 加入至充分搅拌的处于 DMF (100ml) 中 DIPEA (1ml) 溶液中。在加入每个 100ml 部分的肽溶液后向反应混合物中加入处于 DMF (5ml) 中的 HBTU (150mg); 根据需要,通过加入纯 DIPEA 而将反应溶液的 pH 保持在 pH 9。通过分析性 HPLC 监测反应。反应溶液真空浓缩并将残渣溶解在 AcOH/CH₃CN/H₂O 中。混合物负载至 HPLC 柱上并使用 pH 5.2 的三乙基磷酸铵缓冲液纯化。使用乙腈梯度洗脱化合物。汇集纯度超过 97% 的级分,用水 (2 体积) 稀释,并且负载至用 2% AcOH(aq) 预平衡的柱上。所需的化合物用 CH₃CN 的快速 (3% /min) 梯度洗脱。对含有所需产物的级分进行汇集并冻干。获得 434mg (基于起始树脂的负载量并假设 85% 的肽含量, ~ 40% 产率) 白色非晶态粉末。HPLC :Rt = 19.4min, 梯度 :5% B 持续 0.5min., 0.5min 内 5 → 30% B, 20min 内 30 → 50% B 和 100% B 持续 5min., t = 40℃, 溶剂 A 0.01% TFA(aq), 溶剂 B 70% CH₃CN, 0.01% TFA(aq); 纯度 :99.3%; MS(M+H⁺): 预测值 1042.4, 观察值 1042.5。

[0119] 下面是化合物 49 ;carba-1-[4-FBzlGly⁷]dOT 的示例性大规模 (即,放大) 合成:

[0120] 使用的氨基酸衍生物为 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-4-FBzlGly-OH、Fmoc-Cys (叔丁氧基羰基丙基)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH 和 Boc-Tyr (tBu)-OH (Peptides International)。Fmoc-4-FBzlGly-OH 和 Fmoc-Cys (叔丁氧基羰基丙基)-OH 如上进行合成。通过 DIC/HOBt/DMF 介导的与 3 倍过量的氨基酸衍生物的单偶联来合成肽。化合物 49 的其余的合成和表征遵循上面所提供的步骤。获得 434mg (基于起始树脂的负载量并假设 85% 的肽含量, ~ 40% 产率) 的白色非晶态粉末。

[0121] 化合物 10 ;[4-PicGly⁷]dOT:

[0122] 使用的氨基酸衍生物为 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys (Trt)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH 和 Mpa (Trt)-OH (Peptides International)。完全保护的肽树脂从 1.33g (0.65mmol) Rink AM 树脂 (200-400 目, Novabiochem) 开始手工合成。进行 DIC/HOBt/DMF 介导的与 3 倍过量的氨基酸 Gly 和 Leu 衍生物的单偶联。用处于 DMF 中的 4 倍过量的 BrCH₂CO₂H/DIC/HOBt 引入 N-(4-吡啶甲基) 甘氨酸残基并且随后用处于 DMF 中的 10 倍过量的 4-吡啶甲基胺进行溴取代。进行 DIC/DCM 介导的与 4 倍过量的 Fmoc-Cys (Trt)-OH 的偶联和进行 DIC/HOBt/DMF 介导的与 3 倍过量的氨基酸 Asn、Gln、Ile、Tyr 和 Mpa 衍生物的单偶联。用处于 DMF 中的 20% 哌啶去除 Fmoc 基团。在完成固相合成后,树脂用 TFA/TIS/H₂O 96/2/2(v/v/v) 溶液 (50ml) 处理 1.5h 并滤出。滤液真空浓缩,并用二乙醚沉淀粗制的线性肽。沉淀物溶解在纯 TFA (50ml) 中,倒入磁性搅拌的 5% 乙腈 (600ml) 水溶液上,并且通过加入处于甲醇中的 0.1M I₂ 氧化所述肽直至黄色不发生变化。过量的碘用固体抗坏血酸 (Sigma-Aldrich) 还原,并且通过加入浓氨水 (aq) 将溶液的 pH 调节至约 4。所述混合物负载在 HPLC 柱上,并使用 pH 5.2 的三乙基磷酸铵缓冲液纯化。使用乙腈梯度洗脱化合物。汇集纯度超过 97% 的级分,用水 (2 体积) 稀释,并且负载至用 2% AcOH(aq) 预平衡的柱上。所需的化合物用乙腈的快速 (3% /min) 梯度洗脱。对含有所需产物的级分进行汇集并冻干。获得 348.7mg (基于起始树脂的负载量并假设 85% 的肽含量, ~ 44% 产率) 白色非晶态粉末。HPLC :Rt = 21.7min, 梯度 :5% B 持续 0.5min., 在 0.5min 内 5 → 10% B, 在 20min 内 10 → 30% B 和

100% B 持续 5min., $t = 40^{\circ}\text{C}$, 溶剂 A 0.01% TFA(aq), 溶剂 B 70% CH_3CN , 0.01% TFA(aq); 纯度: 99.9%; MS($\text{M}+\text{H}^+$): 预测值 1043.4, 观察值 1043.4。

[0123] 化合物 29; carba-6-[Phe², MeOEtGly⁷]dOT:

[0124] 使用的氨基酸衍生物为 Boc-Gly-OH 和 Boc-Leu-OH(Bachem), Fmoc-Hcy(叔丁氧基羰基乙基)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH 和 Boc-Phe-OH(Peptides International)。Fmoc-Hcy(叔丁氧基羰基乙基)-OH 如上进行合成。

[0125] 完全保护的肽树脂从 1.33g MBHA 树脂(0.94mmol, Novabiochem) 开始手工合成。使用处于 DCM 中的 10% TEA 中和所述树脂。进行 DIC/DCM 介导的与 1.7 倍过量的氨基酸 Boc-Gly-OH 和 Boc-Leu-OH 的单偶联。用处于 DMF 中的 3.6 倍过量的 $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ /DIC/HOBt 引入 N-(2-甲氧基乙基)甘氨酸残基并且随后用处于 DMF(10ml) 中的 7 倍过量的 2-甲氧基乙胺和 4 倍过量的 DIPEA 进行溴的取代; 反应搅拌 5h。进行 DIC/DCM 介导的与 4 倍过量的 Fmoc-Hcy(叔丁氧基羰基乙基)-OH 的单偶联和进行 DIC/HOBt/DMF 介导的与 3 倍过量的氨基酸 Asn 和 Gln 衍生物的单偶联。使用 DIC/DCM 进行两次最后的与 Fmoc-Ile-OH 和 Boc-Phe-OH 的单偶联, 从而提供所需的受保护的树脂结合的线性肽。用处于 DMF 中的 20% 哌啶去除 Fmoc 基团。所述树脂用 TFA/ H_2O /TIS 95/3/2(v/v/v) 处理 2h 以去除三苯甲基、Boc 和叔丁基基团。BOP(4eq) 和 DIPEA(10eq) 加入至所述树脂在 DMF(10mL) 中的搅拌悬浮液中; 2h 后加入 PyBOP(2eq) 和 DIPEA(5eq)。通过使用 70ml 含有 5ml 茴香醚的无水 HF 在 0°C 下 90 分钟从所述树脂上裂解所述肽。真空去除 HF, 并且用二乙醚(300ml) 洗涤粗制的线性肽。所述肽溶解在 AcOH/ CH_3CN / H_2O 1/2/7(v/v/v) (400ml) 中。所得的混合物直接负载在 HPLC 柱上, 并使用处于 pH 2.3 的三乙基磷酸铵缓冲液纯化。化合物用乙腈梯度洗脱。汇集纯度超过 97% 的级分, 用水(2 体积) 稀释, 并且负载至用 2% 乙酸(aq) 预平衡的柱上。所需的化合物用 1% AcOH/ CH_3CN 梯度洗脱。对含有所需产物的级分进行汇集并冻干。

[0126] 获得 292.7mg(基于起始树脂的负载量并假设 85% 的肽含量, ~27% 产率) 的白色非晶态粉末。HPLC: $R_t = 16.7\text{min}$, 梯度: 5% B 持续 0.5min., 在 0.5min 内 5 → 30% B, 在 20min 内 30 → 50% B 和 100% B 持续 5min., $t = 40^{\circ}\text{C}$, 溶剂 A 0.01% TFA(水溶液), 溶剂 B 70% CH_3CN , 0.01% TFA(aq); 纯度: 100.0%; MS($\text{M}+\text{H}^+$): 预测值 976.5, 观察值 976.3。

[0127] 通过这些合成步骤的类似变化形式制备其他化合物。

[0128] 试验(生物学测试)

[0129] 体外受体测定:

[0130] 在转录报告基因测定中通过将 hOT 受体表达 DNA 与含有调节萤火虫荧光素酶的表达的细胞内钙响应型启动子元件的报告 DNA 一起瞬时转染至中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞系中来确定化合物对 hOT 受体的激动剂活性。对于该测定的进一步指导参见 Boss, V., Talpade, D. J., Murphy, T. J. J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 1996 年 5 月 3 日; 271(18), 10429-10432。细胞暴露于稀释 10 倍/剂量的化合物的系列稀释液 5h, 紧接着溶解细胞, 确定荧光素酶活性, 并且通过非线性回归确定化合物效力和 EC_{50} 值。在每个试验中使用催产素(OT) 作为内部对照, 并且在至少三次独立的试验中测试化合物。为了确定选择性, 化合物在表达人血管加压素(hV_2) 受体的基于荧光素酶的转录报告基因测定中进一步测试。

[0131] 为了进一步比较, 卡贝缩宫素也用作参考化合物。

[0132] 体内测定的结果显示在下面的表 2 中。给出的 EC_{50} 值是以纳摩尔 /l (nM) 表示的几何平均数。选择性值作为 EC_{50} 比给出。

[0133] 表 2 :生物学测试的结果

测试的化合物	EC_{50} hOT 受体	EC_{50} hV ₂ 受体	选择性 hV ₂ /hOT
1	0.980	688.22	702
2	0.817	671.12	822
3	0.207	446.76	2158
4	0.033	17.70	544
5	0.370	448.67	1211
6	0.064	39.95	629
7	0.062	34.78	558
8	0.116	65.55	565
9	0.114	61.79	544
10	0.464	384.04	828

[0134]

[0135]

11	0.026	58.54	2217
12	0.011	29.78	2607
13	0.121	67.81	562
14	0.005	77.11	15124
15	0.040	101.77	2533
16	0.009	57.29	6067
17	0.023	47.27	2014
18	0.115	180.32	1561
19	0.012	82.03	6607
20	0.030	80.29	2659
21	0.006	9.87	1729
22	0.063	77.83	1245
23	0.148	83.55	565
24	0.016	86.10	5469
25	0.058	159.44	2736
26	0.072	226.14	3160
27	0.189	238.02	1259
28	0.847	1264.33	1493
29	0.957	1100.45	1149
30	0.109	69.68	639
31	0.297	760.80	2564
32	0.051	35.83	705
33	0.046	100.71	2203
34	0.405	718.38	1774
35	0.122	72.66	597
36	0.859	2551.62	2970
37	0.228	441.72	1941
38	0.271	227.03	839
39	0.254	2058.97	8115
40	0.069	1024.67	14945
41	0.227	1999.84	8793
42	0.086	1192.93	13901
43	0.104	123.61	1187

[0136]

44	0.023	55.14	2404
45	0.036	140.24	3914
46	0.039	140.36	3632
47	0.228	1415.28	6221
48	0.089	253.03	2854
49	0.08	328.57	4293
50	0.077	212.57	2761
51	0.045	161.91	3614
52	0.779	3005.36	3860
53	0.562	1613.76	2870
54	0.013	496.61	37735
催产素	2.34	7.33	3
卡贝缩宫素	0.70	171.98	244

[0137] 前面的结果表明实施例化合物包含在本发明的范围内,并且例如可以用于人的安全和有效的治疗以用于引产、控制子宫收缩乏力、促进和维持泌乳等。

[0138] 本发明的范围进一步在下面的权利要求中定义。

[0001]

序列表

<110> 辉凌公司
<120> 新化合物
<130> P/60712.W001
<140> PCT/IB2009/005351
<141> 2009-03-30
<150> US 61/040,973
<151> 2008-03-31
<150> EP 08251739.2
<151> 2008-05-19
<160> 1
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 二硫化物(DISULFID)
<222> (1)..(6)
<223> 链内二硫键

<400> 1
Cys Tyr Ile Gln Asn Cys Pro Leu Gly
1 5