

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 7/02
A61K 38/08 A61P 19/02
A61P 37/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97195216.7

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 10 日 [11] 授权公告号 CN 1130372C

[22] 申请日 1997. 6. 3 [21] 申请号 97195216. 7
[30] 优先权
[32] 1996. 6. 7 [33] GB [31] 9611881. 5
[32] 1996. 11. 2 [33] GB [31] 9622890. 3
[86] 国际申请 PCT/GB97/01491 1997. 6. 3
[87] 国际公布 WO97/46578 英 1997. 12. 11
[85] 进入国家阶段日期 1998. 12. 3
[71] 专利权人 曾尼卡有限公司
地址 英国英格兰伦敦
[72] 发明人 R · 科顿 P · N · 爱德华兹
R · W · A · 鲁克 K · 奥尔德哈姆
[56] 参考文献
CN1213379A 1999. 04. 07 C07K14/725
WO9526980A 1995. 10. 12 C07K7/04
IMMUNITYVOL. 1 1994 - 01 - 01 ALEXANDER, J.
ET, AL, . : " DEVELOPMENT, OF, HIGH, POTENCY, UNI

VERSAL, DR - RESTRICTED, HELPER, EPITOPES, BY,
MODIFICA
审查员 陈晓平
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 65 页

[54] 发明名称 肽衍生物
[57] 摘要

本发明涉及药学上有用的式(I)P-AA¹-AA²-AA³-AA⁴-AA⁵-AA⁶-AA⁷-AA⁸-Q 肽衍生物和其药学上可接受的盐以及含有它们的药用组合物, 其中 P、AA¹、AA²、AA³、AA⁴、AA⁵、AA⁶、AA⁷、AA⁸和 Q 具有本文定义的各种含义。 所述新的肽衍生物在治疗诸如类风湿性关节炎的 MHC II 类依赖性 T 细胞介导的自身免疫性疾病或炎症性疾病方面有价值。 本发明还涉及所述新的肽衍生物的生产方法和所述化合物在医学治疗中的用途。

1. 式 I $P-AA^1-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-AA^6-AA^7-AA^8-Q$ 的肽衍生物
或其药学上可接受的盐, 其中

5 其中 P 为 5-20 个碳原子的脂族、芳族或混合脂族/芳族有机基
团, 或为 5-20 个碳原子和选自氧、硫和氮的 1、2 或 3 个杂原子的
杂芳族或混合脂族/杂芳族有机基团,

AA^1-AA^8 当存在时选自以下氨基酸残基:

AA^1 选自 Ala、Ile、Tyr、Val、Glu、Lys、Arg、Gly、Gap、GapMe₄
10 和 3, 3, 3-三氟丙氨酸;

AA^2 选自 Ala、Lys、Glu、Sar、Val、Arg、Gly、Pro、Ile、Tic、
3, 3, 3-三氟丙氨酸和 N⁶-二乙基 Lys;

AA^3 选自 Ala、His、Gln、Val、Thr、Glu、Gly、Asp、Asn 和 N³-
二乙基 Dap;

15 AA^4 选自 Ala、Lys、Asn、Arg、Thr、Glu、Sar、Gly、Pro、His
和 N⁶-二乙基 Lys;

AA^5 选自 Thr、Val、Ala、Gly、Dap、Dab、Pro、Hyp、Asn、Ser
和 N³-二乙基 Dap;

AA^6 选自 Gly、Leu、Lys、Ala、Pro、Glu、Sar、His 和 Dap;

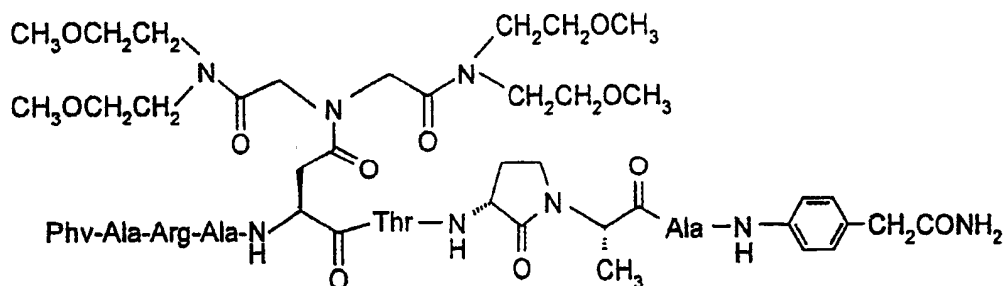
20 AA^7 选自 Pro、Ala、Lys、Arg、Glu、Sar、Gly、Oic 和 Dic;
和

AA^8 选自 Ala、Gly、Dap、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸,

Q 选自 4-氨基甲酰基-1-哌啶基和 4-(氨基甲酰基甲基)苯胺基。

25 2. 权利要求 1 中要求保护的肽衍生物或其药学上可接受的盐,
其中疏水基团 P 为 5-苯基戊酰基。

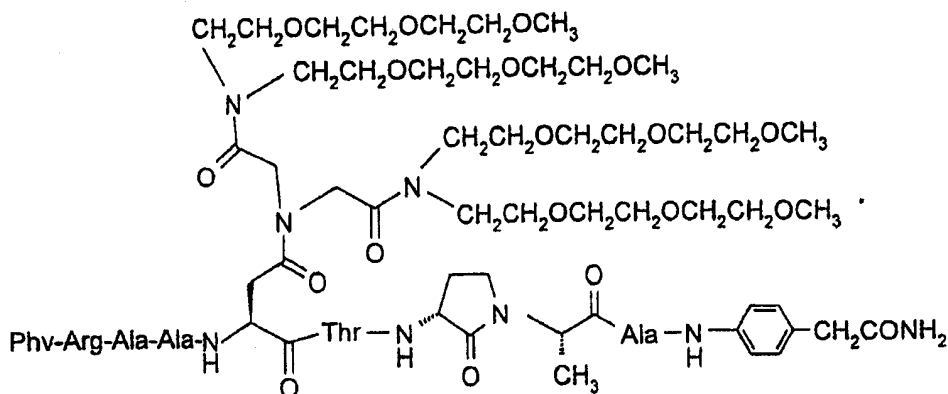
3. 权利要求 1 中要求保护的肽衍生物或其药学上可接受的盐,
它为下式化合物或其药学上可接受的盐,



其中 Phv 代表 5-苯基戊酰基。

4. 权利要求 1 中要求保护的肽衍生物或其药学上可接受的盐，
它为下式化合物或其药学上可接受的盐，

5



其中 Phv 代表 5-苯基戊酰基。

5. 药用组合物，它包含权利要求 1-4 的任一项中要求保护的式 I 肽衍生物或其药学上可接受的盐及药学上可接受的稀释剂或载体。

10

6. 制备权利要求 1 中要求保护的肽衍生物或其药学上可接受的盐的方法，包括以适当的顺序连续偶联适当保护的氨基酸或者两个或多个适当保护的氨基酸的序列、适当保护的式 H-II-OH、H-III-OH、H-IIIa-OH、H-IV-OH、H-IVa-OH、H-V-OH 或 H-Va-OH 的基团以及任选的适当保护的式 H-Q 基团，然后可任选地进行 N 末端氨基的官能团修饰，以引入疏水基团 P，并除去任何残留的保护基团和任何固相载体。

15

7. 权利要求 1 中要求保护的式 I 肽衍生物或其药学上可接受的盐在生产用于治疗 MHC II 类依赖性 T 细胞介导的自身免疫性疾病或炎症性疾病的新的药物中的用途。

5 8. 权利要求 7 中要求保护的用途，其中所述疾病是类风湿性关节炎或胆囊性纤维变性。

肽衍生物

技术领域:

- 5 本发明涉及某些具有药理学有用性质的新型肽衍生物，它们可用于治疗自身免疫性疾病或医学紊乱，诸如类风湿性关节炎和其它 MHC II 类依赖性 T 细胞介导的疾病。本发明也包括所述新肽衍生物的药组合物、其生产方法和它们在治疗一种或多种上述疾病或医学紊乱方面和生产用于这类医学治疗的新型药物生产方面的用途。

10 背景技术

人免疫应答的刺激依赖于 T 细胞对蛋白抗原的识别。然而，T 细胞不能对单独的抗原应答，仅当抗原与诸如 B 细胞、巨噬细胞或树突细胞之类的抗原提呈细胞表面上的主要组织相容性复合物 (MHC) 分子复合时，才触发 T 细胞。

- 15 MHC I 类分子引起 T 杀伤细胞导致带有该抗原的细胞破坏的反应。MHC II 类分子引起 T 辅助细胞控制选定 B 细胞的扩张和成熟 (即产生抗原特异性抗体) 以及巨噬细胞的激活的反应。

免疫系统关键性的要求是区别“自身”抗原和“非自身” (即外源) 抗原的能力。这种辨别要求能够使免疫系统封固 (mount) 对侵入性外源病原体的应答，而保持对自身蛋白的耐受，并由此防止对正常组织的损害。当自身耐受出现障碍使得免疫系统对诸如类风湿性关节炎中的关节之类的自身组织反应时，产生自身免疫疾病。人们认为，耐受的保持并由此防止自身免疫病关键取决于 MHC 分子的功能。

- 25 许多自身免疫病与特定 MHC 等位基因的遗传相关的观察，提示 MHC 分子在自身免疫病发病机理中的重要作用。例如多发性硬化症与 HLA-DR2 的遗传相关，胰岛素依赖性糖尿病与 HLA-DR3 和/或 HLA-DR4 相关，而桥本甲状腺炎与 HLA-DR5 相关。详细地说，在慢性炎症性关节疾病类风湿性关节炎的发病因素与 HLA-DR4Dw4 和/或 HLA-DR4w14
30 和/或 HLA-DR1 的遗传之间存在特别强的联系。人们认为该自身免疫病相关的 MHC 分子与某些自身抗原结合，并将它们提呈于 T 细胞，

由此刺激自身免疫应答。可以与所述自身免疫相关的 MHC 分子结合和/或或者防止该结合或者取代已经结合的自身抗原和/或抑制 T 细胞(特别是致病 T 细胞(例如 Th 1 细胞)活性)激活和/或增加保护性 T 细胞(例如 Th 2 细胞)活性的其它肽, 或与通过其它作用机制与 MHC 分子相互作用以便防止或修饰通过所述 MHC 分子介导的自身免疫应答的肽, 可以特异性地抑制自身免疫应答。

该种类的药物可能提供对该自身免疫疾病的治疗, 而避免通常的该免疫系统的抑制, 由此限制了有害的副作用。该种类的效果对于诸如类风湿性关节炎之类的疾病具有明显优于目前治疗的优点。现代的医疗实践最初用诸如 NSAID 的症状减轻药物治疗类风湿性关节炎, 所述药物对疾病进程没有有益的作用, 而常常伴随产生不良的副作用。治疗更严重的疾病依赖于使用所谓的二线药物。通常这些药物是一般的细胞毒性化合物, 它们具有有限的效力, 并可以引起严重的毒性问题。因此, 合理基础的不伴随产生非特异性细胞毒性的疾病改善药物在治疗类风湿性关节炎方面可能提供显著的益处。

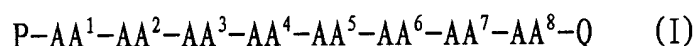
在公开号为 WO 92/02543、WO 93/05011 和 WO 95/07707 的国际专利申请中公开了与 MHC 结合并抑制 T 细胞激活的肽。

尽管已经发现了通过与 HLA-DR 分子结合而抑制 HLA-DR 限制的 T 细胞激活的许多肽, 但仍然需要与这类分析结合和/或或者防止结合或取代已经结合的自身抗原和/或抑制 T 细胞激活和/或提高保护性 T 细胞活性的其它化合物, 或通过另一作用机制与 MHC 分子相互作用以便防止或修饰引起上述疾病或紊乱的自身免疫应答的刺激。

发明内容

我们已经发现本发明的肽衍生物(下面陈述的)意外地具有这类药理学上有用的性质, 这是本发明的基础。

按照本发明的一个方面, 提供式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐,



其中

P 为疏水残基;

AA¹、AA²、AA³、AA⁴、AA⁵、AA⁶、AA⁷和AA⁸为L-氨基酸残基, 其中AA¹、AA⁴和AA⁷中的1个、2个或3个选自式II(下文陈述的)L-氨基酸残基,

5 其中n为1、2、3或4的整数;

X为-NH-CO-、-CO-(羰基)或-O.CO-(酯基);

R¹和R²选自(A)、(B)和(C), 其中

(A)为式-(CH₂)_a-CO-N(R³)(R⁴)的基团, 其中a为1或2的整数, R³和R⁴独立地选自-[(CH₂)_bO]_m-R^a的基团, 其中R^a为甲基或乙基, 而
10 m为1、2、3、4或5的整数; 当m为1时, b为2或3, 而当m为2、3、4或5时, 每个-(CH₂)_bO-单位的b值独立地选自2和3;

(B)为式-(CH₂)_cO(CH₂)_d-CO-N(R⁵)(R⁶)的基团, 其中c为2或3的整数, d为1、2或3的整数, 而R⁵和R⁶独立地选自基团-[(CH₂)_eO]_p-R^b, 其中R^b为甲基或乙基, p为1、2、3、4或5的整
15 数; 当p为1时, e为2或3, 而当p为2、3、4或5时, 每个-(CH₂)_eO-单位中的e值独立地选自2和3; 以及

(C)为式-[(CH₂)_fO]_g-R⁷的基团, 其中R⁷为甲基或乙基, 而g为1、2、3、4或5的整数; 当g为1时, f为2或3, 而当g为2、3、4或5时, 每个-(CH₂)_fO-单位中的f值独立地选自2和3;

20 或AA¹、AA²、AA³、AA⁶、AA⁷和AA⁸为L-氨基酸残基, 其中AA¹和AA⁷的一个或两个选自以上定义的式II的L-氨基酸残基, 并且AA⁴和AA⁵一起形成式III、IIIa、IV、IVa、V或Va(下文陈述的)的基团, 其中Ra、Rb和Rz独立地选自氢和(1-4C)烷基, 而A为氧或亚甲基;

25 或AA¹、AA²、AA³、AA⁴、AA⁵和AA⁸为L-氨基酸残基, 其中AA¹和AA⁴的一个或两个选自以上定义的式II的L-氨基酸残基, 而AA⁶和AA⁷一起形成式III、IIIa、IV、IVa、V或Va(下文陈述的)的基团, 其中Ra、Rb和Rz独立地选自氢和(1-4C)烷基, 而A为

氧或亚甲基;

而 Q 为 OH、NH₂、NRcRd, 其中 Rc 选自(1-4C)烷基、2-氧甲酰基环戊基、2-吡啶基甲基、4-氧甲酰基环己基、4-氧甲酰基环己基甲基、3-氧甲酰基苯基、4-氧甲酰基苯基、4-(氧甲酰基甲基)苯基、4-(羧甲基)苯基、2-吗啉代乙基和式-A¹-G¹的基团, 其中 A¹为(3-7C)亚烷基或

A¹选自

(1) 式-A²-B²-的基团, 其中 A²为对亚苯基或 1,4-亚环己基, 而 B²为(1-4C)亚烷基, 或 A²为亚甲基, 而 B²为对亚苯基或 1,4-亚环己基; 以及

(2) 式-A³-B³-C³的基团, 其中 A³为亚甲基, B³为对亚苯基或 1,4-亚环己基, 而 C³为(1-3C)亚烷基; 以及

G¹为式-N=C[N(Rp)₂]₂的基团, 其中每个 Rp 独立地选自氢、甲基、乙基和丙基; 而 Rd 为氢或(1-4C)烷基; 或 Q 为 1-哌嗪基、4-甲基-1-哌嗪基、4-(2-(2-羟基乙氧基)乙基)-1-哌嗪基、4-脒基-1-哌嗪基、1-吡啶基或 4-取代的-1-吡啶基, 其中 4-取代基选自羧基、氧甲酰基、N-(2-氧乙基)氧甲酰基和 N-(4-氧丁基)氧甲酰基; 或 Q 为 1-6 个氨基酸残基或其酰胺的序列。

按照本发明的另一方面, 提供式 I (下文陈述的)肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 AA¹、AA²、AA³、AA⁴、AA⁵、AA⁶、AA⁷和 AA⁸为 L-氨基酸残基, 其中 AA¹、AA⁴和 AA⁷的一个选自式 II (下文陈述的)的 L-氨基酸残基, 其中 n、X、R¹和 R²具有以上定义的任何含义; 或 AA¹、AA²、AA³、AA⁶、AA⁷和 AA⁸为 L-氨基酸残基, 其中 AA¹和 AA⁷的一个选自以上定义的式 II 的 L-氨基酸残基, 而 AA⁴和 AA⁵一起形成以上定义的式 IIIa 的基团; 或 AA¹、AA²、AA³、AA⁴、AA⁵和 AA⁸为 L-氨基酸残基, 其中 AA¹和 AA⁴的一个选自以上定义的式 II 的 L-氨基酸残基, 而 AA⁶和 AA⁷一起形成以上定义的式 IIIa 的基团; 而 P 和 Q 具有以上定义的任一值。

应该理解, Q 的氨基酸独立地具有 D-或 L-立体化学。此外, 当 Q 定义为羟基(OH)时, 这应该理解为 C-末端氨基酸 AA⁸ 的羟基。同样, 当 Q 定义为 NH₂、NRcRd、哌嗪基、哌啶基等时, 这是指 C-末端氨基酸 AA⁸ 的羟基被这一基团取代。也应该理解, 当提到氨基酸时, 指 α-氨基酸。也应该理解, 当提到 L-氨基酸时, 也包括诸如 Gly、2,2-二乙基 Gly、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸之类的没有手性碳原子的氨基酸。还应该理解, 诸如“烷基”之类的种类术语当所述碳数允许时包括, 直链和支链变体。同样的习惯用于其它基团。

还应该意识到, 当 R¹ 和 R² 为式(A)的两个基团时, R¹ 中的 a、R³ 和 R⁴ 的值可以与 R² 中的值相同或不同。同样, 当 R¹ 和 R² 为式(B)的两个基团时, R¹ 中的 c、d、R⁵ 和 R⁶ 的值可以与 R² 中的值相同或不同; 而当 R¹ 和 R² 为式(C)的两个基团时, R¹ 中的 f、g 和 R⁷ 的值可以与 R² 中的值相同或不同。

本领域内众所周知, 具有手性中心的化合物可能以外消旋体(或有多于 1 个手性中心时为非对映异构体的混合物)形式或作为旋光性对映体或非对映异构体存在。本领域内也众所周知, 与外消旋体或非对映异构体混合物相关的特殊的生物学活性可以主要或仅仅由单一的旋光性异构体产生。因此应该理解, 本发明涉及式 I 具有上述药学有用性质的任何形式的式 I 肽衍生物。本领域众所周知如何获得单一的旋光性异构体, 例如通过采用诸如色谱之类的常规技术从含有所述异构体的外消旋体或非对映异构体混合物中进行分离, 或通过采用例如本文例举的合适的旋光性原料或中间体进行手性合成来获得。本领域也众所周知如何确定这类外消旋体或非对映异构体混合物和各个旋光性异构体的药理学性质, 例如通过采用本文所述的分析方法来确定。因此, 本领域技术人员能够容易地获得具有本文提到的有益药理学性质的式 I 肽衍生物的特定异构体。应该理解, 本发明也包括具有本文提到的有益的药理学性质的式 I 的肽衍生物的任何多晶形式、任何互变体或任何溶剂化物或它们的任何混合物。

当 α -氨基酸残基 AA^1 、 AA^2 、 AA^3 、 AA^4 、 AA^5 、 AA^6 、 AA^7 和 AA^8 不是式 II 氨基酸残基时或形成式 III、IIIa、IV、IVa、V 或 Va 基团的部分时, 其合适的独立的有用基团(values)包括例如由遗传密码编码的 20 种天然存在的氨基酸, 特别是丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)和脯氨酸(Pro)的氨基酸残基。诸如肌氨酸(Sar)、3,3,3-三氟丙氨酸、2,2-二乙基甘氨酸、2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)、2-氨基丁酸(Abu)、高精氨酸、高苯丙氨酸、反式-4-羟脯氨酸(Hyp)、氮杂丙氨酸($H_2N-N(CH_3)-COOH$; Azala)、氮杂甘氨酸($H_2N-NH-COOH$; Azgly)、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic)、八氢吲哚-2-羧酸(Oic)、十氢异喹啉-3-羧酸(Dic)之类的氨基酸残基也是合适的。(这里 Dic 是指其中环状接头二者都具有 R 构型或都具有 S 构型的形式)。相应的 N^2 -甲基化氨基酸残基也可以使用, 其中游离侧链羧酸官能团被酯化(例如作为(1-6C)烷基酯或苄基酯)和游离侧链氨基被烷基化(例如甲基化)、乙酰化或转化为氨基甲酸酯(例如氨基甲酸烷基酯(例如甲酯或乙酯)、苄基酯或苄基酯)的相应的氨基酸残基也可以使用。其它合适的有用基团包括例如 2-取代甘氨酸的残基, 其中 2-取代基为式 $-(CH_2)_sNH_2$ 的基团, 其中 s 为 1-3; 或式 $-(CH_2)_pN(Re)_3^+ \cdot X^-$ 基团, 其中 p 为 2-4, X^- 为相反离子(例如乙酸根、三氟乙酸根、氢氧化物或氯化物); 或式 $-(CH_2)_qN(Re)_2$ 基团, 其中 q 为 0-4; 或式 $-(CH_2)_rN=C[N(Re)_2]_2$ 基团, 其中 r 为 1-4, 并其中最后三个基团中每个 Re 独立地选自氢和(1-4C)烷基(例如甲基或乙基)。

疏水残基 P(应该认识到它连接到 N-末端氨基酸 AA^1 的氨基上)的合适的有用基团包括例如有机疏水基团, 诸如 5-20 个碳原子(对于含杂芳族基团还有 1、2 或 3 个杂原子, 选自氧、硫和氮)的疏水脂族、芳族、杂芳族或混合脂族/芳族或脂族/杂芳族有机基团, 例如式 R-、 $R.CO-$ 、 $R.SO_2-$ 、 $R.O.CO-$ 、 $R.NHCO-$ 、 $R.O.CS-$ 、 $R.S.CO-$ 、

R.NHCS-、R.S.CS-和R.CS-的基团,其中R包括例如(5-10C)烷基、芳基、杂芳基、芳基(2-10C)烷基、杂芳基(2-10C)烷基、二芳基(2-8C)烷基、芳基(2-10C)链烯基、芳基环丙基、(5-10C)环烷基、(5-10C)环烷基(2-6C)烷基、3-联苯基、4-联苯基、4-环己基苯基、2-萘氧甲基、3-萘氧甲基、苯氧苯基和四氢萘基,其R的有用基团可以带有一个或多个(1-4C)烷基、卤代(halogeno)、氰基或(1-4C)烷氧基取代基的芳基或杂芳基。本发明一个特定实施方案包括例如式I化合物,其中P为以上定义的R.CO-。本发明另一个具体实施方案包括例如式I的肽衍生物,其中P为5-20个碳原子的疏水脂族、芳族或脂族/芳族有机基团。

R的具体有用基团当R为(5-10C)烷基时,包括戊基、异戊基、叔戊基、2-甲基戊基、己基、异己基、5-甲基己基和辛基;当R为芳基时,包括例如苯基、萘基和茚基;当R为杂芳基时,包括2-、3-、5-或6-吡啶基、2-、3-、5-或6-二氢吡啶基、2-、3-、5-或6-苯并[b]噻吩基(thiophenyl)、噻吩基、2-、4-或5-苯并噻唑基、2-、4-或5-苯并噁唑基、2-、4-或5-苯并咪唑基、在2-、3-、6-或7-位连接的1,4-苯并二噁烷基和2-、3-、5-或6-苯并呋喃基;当R为芳基(2-10C)烷基时,包括芳基(2-6C)烷基(其中,所述芳基部分包括例如以上给出的芳基的任一具体有用基团,所述(2-6C)烷基部分包括例如亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基和五亚甲基),诸如2-苯基乙基、3-苯基丙基、4-苯基丁基和5-苯基戊基;当R为杂芳基(2-10C)烷基时,包括杂芳基(2-6C)烷基(其中所述杂芳基部分包括例如以上给出的杂芳基的任一具体有用基团,所述(2-6C)烷基部分包括例如亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基和五亚甲基),例如在2-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基)中的情况;当R为二芳基(2-8C)烷基时,包括二芳基(2-6C)烷基诸如2,2-联苯基乙基、3,3-联苯基丙基和4,4-联苯基丁基;当R为芳基(2-10C)链烯基时,包括芳基(2-6C)链烯基,诸如苯乙烯基、3-苯基丙烯-2-基和4-苯基丁烯-1-基;当R为芳基环丙基时,包括苯基环丙基、1-萘基环丙基和2-萘基环丙基;当R为(5-10C)环烷基时,包括环戊基、

环己基和 1-金刚烷基(adamantyl); 而当 R 为(5-10C)环烷基(2-6C)烷基时, 包括 2-(环己基)乙基、3-(环己基)丙基和 4-(环己基)丁基。作为 R 的芳基上取代基的具体有用基团包括例如甲基、乙基、氯代、溴代、碘代、甲氧基、乙氧基和氟基。

- 5 疏水残基 P 也包括例如疏水 L-氨基酸, 诸如苯丙氨酸(Phe)及其氢化类似物, 诸如环己基丙氨酸(Cha)、对氯 Phe、3-(2-噻吩基)丙氨酸、酪氨酸(Tyr)、Tyr(O 甲基)、色氨酸(Trp)、联苯丙氨酸、3-(1-萘基)丙氨酸、3-(2-萘基)丙氨酸和它们的氢化类似物, 诸如 3-(1-金刚烷基)丙氨酸(Ada)、Glu(氧苄基)、3-(苄氧基)Ala、3-(苄基硫烷基)Ala 和 9-苄基 Gly, 它们每个可任选地在 N-末端含有一个上述定义或列举的疏水脂族、芳族、杂芳族或混合脂族/芳族或脂族/杂芳族有机基团。或者, 所述疏水氨基酸可任选地含有例如 1-3 个氨基酸的另一序列, 其中所述氨基酸选自以上定义的 AA¹-AA⁸ 的合适的独立有用基团。例如, P 包括具体序列 Ala-Cha、Ala-Ala-Cha、Tyr-Ala-Ala-Cha、Tyr-Ala-Ala-Phe、Ala-Phe-Phe-Phe 和 Ala-Ala-Ala-Phe。这种 1-3 个氨基酸的另一序列的第一个氨基酸(从左读到右)可以是 L-氨基酸或 D-氨基酸, 也可任选地含有一个上述定义或列举的疏水脂族、芳族、杂芳族或混合脂族/芳族或脂族/杂芳族有机基团。
- 10
- 15

- P 的其它具体有用基团包括例如 3-(苄酯基)丙酰基-Phe、3-(苄酯基)丙酰基-Cha、4-(苄酯基)丁酰基-Phe、4-(苄酯基)丁酰基-Cha、(5-氧代-吡咯烷-2-基)羧基-Phe-Tyr、(5-氧代-吡咯烷-2-基)羧基-Gly(O 苄基)-Tyr、乙酰基-Glu(O 苄基)-Tyr、二苯甲基.CONH.CH₂CH₂.CO-Cha、二苯甲基.CONH.CH₂CH₂.CO-Tyr、二苯甲基.CONH.CH₂CH₂CH₂.CO-Cha、二苯甲基.CONH.CH₂CH₂CH₂.CO-Tyr、二苯甲基.NHCO.CH₂CH₂CH₂.CO-Cha、二苯甲基.NHCO.CH₂CH₂CH₂.CO-Tyr、苄基.NHCO.CH₂CH₂.CO-Cha、苄基.NHCO.CH₂CH₂.CO-Tyr、N-乙酰基-4-氯代-β-羟基 Phe、4-苄氧苄基.NHCO-、苄基.NHCO.CH₂CH₂.CO.(N-甲基 Phe)、苄
- 20
- 25

基.NHCO.CH₂CH₂.CONH.CH(CHPh₂).CO、苄基.NHCO.CH₂CH₂.CO-Tyr、3,3-二苯基丙酰基、反式-肉桂酰基、5-苯基戊酰基和3-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基)丙酰基。

5 特别感兴趣的P的有用基团包括例如Ph.(CH₂)₄.CO-(5-苯基戊酰基(Phv))、Ph.(CH₂)₄.CS-和3-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基)-丙酰基。

疏水残基P的优选有用基团包括例如3-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基)-丙酰基和5-苯基戊酰基(Phv)，尤其是后者。

10 当Rc为式-A¹-G¹的基团时，当A¹为亚烷基时，A¹的具体有用基团包括例如亚甲基、亚乙基、亚丙基和亚丁基；当B²为(1-4C)亚烷基时，B²的具体的有用基团包括例如亚甲基、亚乙基和亚丙基；当C³为(1-3C)亚烷基时，C³的具体的有用基团包括例如亚甲基、亚乙基和亚丙基。

15 -A¹-G¹的具体的有用基团包括例如3-胍基丙基、4-(2-胍基乙基)苯基、4-(2-吗啉代乙基.NH.CO.CH₂)苯基和4-(4-[2-(2-羟基乙氧基)乙基]哌嗪-1-基.CO.CH₂)苯基。

20 当Q为1-6个氨基酸残基的序列时，Q的具体的有用基团包括例如独立选自以上定义的AA¹-AA⁸的任一合适独立的有用基团的L-氨基酸残基序列(诸如Ala-Thr-Gly-OH)或它们的D-类似物或既含有D-氨基酸也含有L-氨基酸的序列或它们的酰胺，诸如由氨、(1-4C)烷基胺(诸如甲胺)或二(1-4C)烷基胺(诸如二甲胺)衍生的酰胺。

25 Q的优选有用基团包括例如4-氨基甲酰基-1-哌啶基(哌啶-4-甲酰胺的残基(Pip-NH₂))、4-羧基-1-哌啶基(哌啶-4-甲酸的残基(Pip-OH))、4-(氨基甲酰基甲基)苯胺基(4-氨基苯基乙酰胺的残基(Papa-NH₂))、4-(羧甲基)苯胺基(4-氨基苯乙酸的残基(Papa-OH))和4-(2-胍基乙基)苯胺基(2-(4-氨基苯基)乙基胍的残基(Pape-NHC(=NH)NH₂)。Pip-NH₂和Papa-NH₂为Q特别优选的有用基团，尤其是Papa-NH₂。

本发明具体的新肽衍生物包括例如以上定义的式I的肽化合物，其中：

- (1) 在式 II 中, $n = 1$, $X = -CO-$;
- (2) 在式 II 中, $n = 4$, $X = -NHCO-$;
- (3) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(A)的基团(相同或不同), 其中 $a = 1$;
- 5 (4) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(A)的基团(相同或不同), 其中 R^3 和 R^4 为式- $[(CH_2)_bO]_m-R^a$ 的基团(相同或不同), 其中 $b = 2$;
- (5) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(A)的基团(相同或不同), 其中 R^3 和 R^4 为式- $[(CH_2)_bO]_m-R^a$ 的基团(相同或不同), 其中 $m = 1$ 、2 或 3;
- (6) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(B)的基团(相同或不同), 其中 $c = 2$;
- 10 (7) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(B)的基团(相同或不同), 其中 $d = 2$;
- (8) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(B)的基团(相同或不同), 其中 R^5 和 R^6 为式- $[(CH_2)_eO]_p-R^c$ 的基团(相同或不同), 其中 $e = 2$;
- 15 (9) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(B)的基团(相同或不同), 其中 R^5 和 R^6 为式- $[(CH_2)_eO]_p-R^c$ 的基团(相同或不同), 其中 $p = 1$;
- (10) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(C)的基团(相同或不同), 其中 $f = 2$; 以及
- (11) 在式 II 中, R^1 和 R^2 为式(C)的基团(相同或不同), 其中 $g = 3$;
- 20

并且其中, 除非另外说明, 否则 AA^1 、 AA^2 、 AA^3 、 AA^4 、 AA^5 、 AA^6 、 AA^7 、 AA^8 、P 和 Q 具有上文定义的任何含义。

当 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 以及 R^1 和 R^2 选自式- $[(CH_2)_fO]_g-R^7$ 的基团时, 其具体有用基团包括例如- $CH_2CH_2OCH_3$ 、- $CH_2CH_2CH_2OCH_3$ 、- $CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 、- $CH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 、- $CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 、- $CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 和 - $CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2OCH_3$ 。

25

其它具体的本发明新肽衍生物包括例如式 I 的以下肽衍生物:

- (i) $P-AA^1-AA^2-AA^3-II-AA^5-AA^6-AA^7-AA^8-Q$;
- (ii) $P-II-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-AA^6-AA^7-AA^8-Q$;
- (iii) $P-AA^1-AA^2-AA^3-IIIa-AA^6-II-AA^8-Q$;
- (iv) $P-AA^1-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-AA^6-II-AA^8-Q$;
- (v) $P-AA^1-AA^2-AA^3-II-AA^5-IIIa-AA^8-Q$; 和
- (vi) $P-II-AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-IIIa-AA^8-Q$;

其中 II 表示上文定义的式 II 的 L-氨基酸残基, IIIa 表示下文提出的式 IIIa 的基团, 并且其中除非另外陈述, 否则 AA^1 、 AA^2 、 AA^3 、 AA^4 、 AA^5 、 AA^6 、 AA^7 、 AA^8 、P 和 Q 具有在此定义的任何含义, 包括具体和优选的有用基团。(应该认识到, 在出现 AA^1 、 AA^2 、 AA^3 、 AA^4 、 AA^5 、 AA^6 、 AA^7 或 AA^8 的基团(i)-(vi)中, 它们为 L-氨基酸残基, 具体指明了式 II 或 IIIa 基团的存在和位置)。基团(i)-(vi)为本发明其它独立的方面。

(i)-(vi)中特别感兴趣的肽衍生物包括例如这样的肽衍生物, 其中在式 II 中, $n=1$ 或 2 , X = 羧基, 以及 R^1 和 R^2 都为式(C)基团(尤其其中 $f=2$, $g=3$ 和/或 R^7 = 甲基, 诸如- $CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$)或都为式(A)基团(尤其其中 $a=1$, $b=2$, $m=1$ 或 3 和/或 R^a = 甲基, 诸如- $CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$ 或 - $CH_2CON[(CH_2CH_2O)_3CH_3]_2$ 。在(i)-(vi)的基团中, 基团(i)和(v)的肽衍生物是特别感兴趣的。优选的肽衍生物包括例如基团(v)的化合物, 其中, 在式 II 中, $n=1$, X = 羧基, 以及 R^1 和 R^2 都为式(A)基团。

AA^1-AA^8 的优选有用基团(当 AA^1 、 AA^4 或 AA^7 不是式 II 的氨基酸残基时, 以及当 AA^4 与 AA^5 一起或 AA^6 与 AA^7 一起不是式 III、IIIa、IV、IVa、V 或 Va 的基团时)包括例如,

选自 Ala、Ile、Tyr、Val、Glu、Lys、Arg、Gly、Gap、GapMe₄ 和 3,3,3-三氟丙氨酸,特别是 Ala、Ile、Arg、Gap、GapMe₄,尤其是 Ala、Arg 和 Ile,更尤其是 Ala 和 Arg 的 AA¹;

5 选自 Ala、Lys、Glu、Sar、Val、Arg、Gly、Pro、Ile、Tic、3,3,3-三氟丙氨酸和 N⁶-二乙基 Lys,特别是 Ala、Arg、Ile、Lys 和 Tic,尤其是 Ala、Arg、Ile 和 Tic,更尤其是 Ala 和 Arg 的 AA²;

10 选自 Ala、His、Gln、Val、Thr、Glu、Gly、Asp、Asn 和 N³-二乙基 Dap,特别是 Ala、His、Asp 和 Asn,尤其是 Ala 和 Asn,更尤其是 Ala 的 AA³;

选自 Ala、Lys、Asn、Arg、Thr、Glu、Sar、Gly、Pro、His 和 N⁶-二乙基 Lys,特别是 Ala、Arg、Lys 和 His,尤其是 Ala、Arg 和 His,更尤其是 Ala 的 AA⁴;

15 选自 Thr、Val、Ala、Gly、Dap、Dab、Pro、Hyp、Asn、Ser 和 N³-二乙基 Dap,特别是 Thr、Val 和 Dap,尤其是 Thr 和 Val 的 AA⁵;

选自 Gly、Leu、Lys、Ala、Pro、Glu、Sar、His 和 Dap(尤其是 Ala 和 Pro)的 AA⁶;

20 选自 Pro、Ala、Lys、Arg、Glu、Sar、Gly、Oic 和 Dic(尤其是 Ala 和 Arg)的 AA⁷; 和

选自 Ala、Gly、Dap、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸,特别是 Ala、Gly 和氮杂甘氨酸,尤其是 Ala 和 Gly 的 AA⁸。(这里 Gap 是指 -NH.CH[CH₂NH.C(=NH).NH₂].CO- 残基,这里 GapMe₄ 是指 -NH.CH(CH₂N=C[N(CH₃)₂]₂.CO-残基)。

25 本发明肽衍生物的其它具体独立的基团包括例如式 I 的肽衍生物,其中 AA¹、AA⁴和 AA⁷中的 1 个或 2 个选自上文定义的式 II 的 L-氨基酸残基,AA¹、AA²、AA³、AA⁴、AA⁵、AA⁶、AA⁷和 AA⁸中其余的为 L-氨基酸残基(包括以上定义的合适的、具体的和优选的有

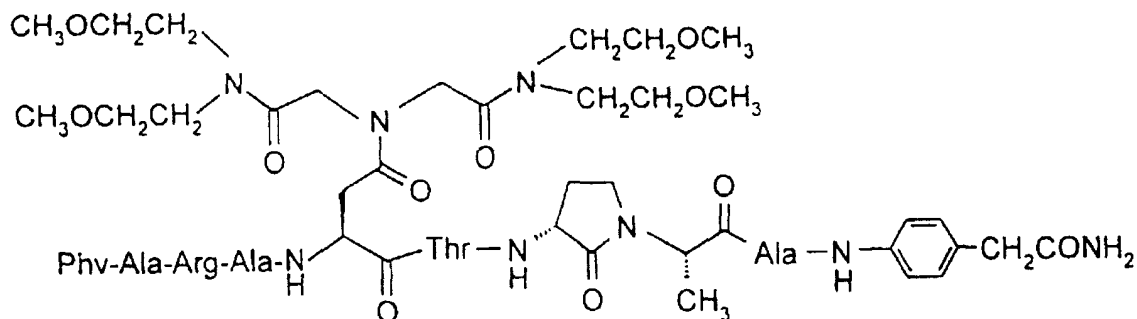
用基团)。

当式 I 肽衍生物含有式 III、IV、IVa 或 V 的基团时，式 III 中的 Ra 和 IV 和 IVa 中的 Rb 以及式 V 中的 Rz 为烷基时，它们的具体有用基团包括甲基、乙基、丙基和异丙基。在含有式 III、IIIa、IV、IVa、V 或 Va 基团的肽衍生物中，最好是含有式 IIIa 基团的肽衍生物。

本发明的另一优选方面包括含有精氨酸残基的式 I 肽衍生物，特别是其中 AA¹ 或 AA² 为精氨酸的化合物(诸如部分序列 AA¹-AA²-AA³ 为 Ala-Arg-Ala 或 Arg-Ala-Ala 的化合物)。

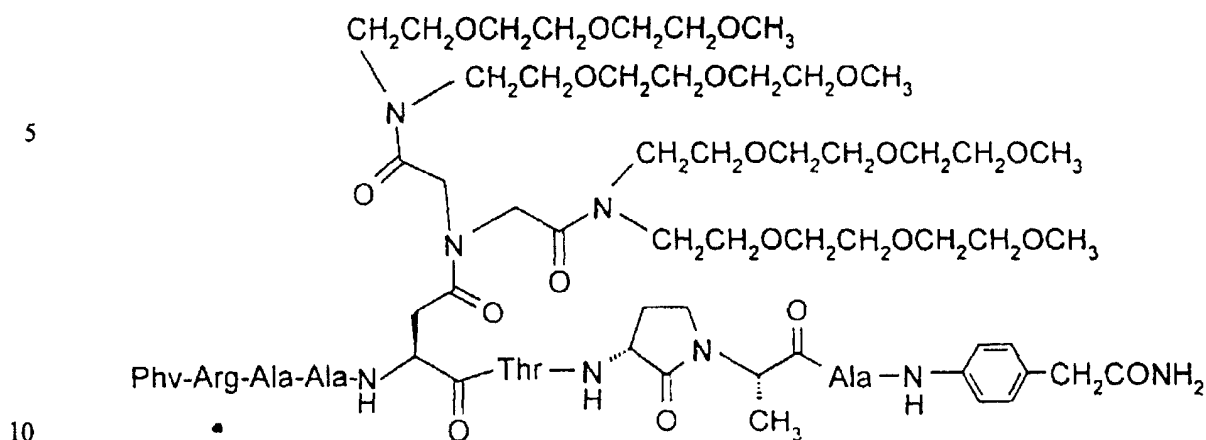
特别感兴趣的本发明的肽衍生物包括例如下文所附的实施例中提出的具体实施方案。其中实施例 3 和 6 的肽衍生物特别重要，这些化合物或其药学上可接受的盐作为本发明的其它特征被提供。

(SEQ ID NO: 3)



实施例 3

(SEQ ID NO : 6)



实施例 6

15 本发明的另一方面包括保护的(例如用 Fmoc)或未保护的式 II 氨基酸, 其中 n、X、R¹ 和 R² 具有以上定义的任何有用基团, 包括具体的和优选的有用基团。

20 对于具有足够碱性的肽衍生物, 例如具有游离氨基的肽衍生物而言, 其药学上可接受的盐包括例如与形成生理上可接受的阴离子的酸的盐, 诸如与无机酸的盐, 所述无机酸例如为卤化氢(诸如氯化氢和溴化氢)、磺酸和磷酸; 和与有机酸的盐, 所述有机酸例如为乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、三氟乙酸等等, 而对于足够酸性的肽衍生物, 例如具有游离羧酸基团的肽衍生物而言, 其药学上可接受的盐包括例如与形成生理上可接受的阳离子的碱的盐, 诸如与碱金属(诸如钠和钾)、碱土金属(诸如镁和钙)、铝和铵盐的盐以及与合适有机碱的盐, 所述有机碱诸如乙醇胺、甲胺、二乙胺、异丙胺、三甲胺等等。

25

如上所述, 式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐在温血动物(包括人类)的多种自身免疫疾病或紊乱中将具有有益的药理学作用, 以治疗症状或作为疾病改善剂或作为预防性治疗。这类疾病可以包括例如

类风湿性关节炎、多发性硬化症、Goodpasture氏综合征、特发性血小板减少性紫癜、少年性类风湿性关节炎、腹腔疾病、系统性红斑狼疮、关节强硬性脊椎炎、Sjogren综合征、重症肌无力、1型(胰岛素依赖性)糖尿病、Hashimoto氏病、Grave氏病、Addison氏病、硬皮病、多肌炎、皮肤肌炎、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、肾小球性肾炎、移植排斥等等，尤其是类风湿性关节炎和多发性硬化症。

可以采用各种各样的标准试验和临床研究，包括国际专利申请公开号WO92/02543、WO93/05011和WO95/07707(或其修改)中描述的和下述的试验或研究，评价式I肽衍生物或其药学上可接受的盐的实用性。式I肽衍生物在一个或多个这类试验或研究中表现出显著活性。

试验A：纯化的HLA-DR肽的体外结合试验。(该试验可以用来证明式I的肽衍生物与疾病相关MHC II类分子的结合。)将磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的30 μ l 800 nM的生物素-FHA₃₀₇₋₃₂₀(用长链生物素在N末端衍生的FHA(307-320)肽，生物素-Ahx-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-OH)与30 μ l浓度为0.5-5 μ g/ml的纯化HLA-DR4Dw4，在V形孔的微量滴定板(Nunc)中孵育48小时，其中加或不加抑制剂肽。孵育结束时，将100 μ l浓度为10 μ g/ml的孵育物转移至先前包被抗MHC抗体(Lampson和Levy(1980) J. Immunol. 125, 293-299中所述的L243 - 美国典型培养物保藏中心(ATCC) HB55)的酶联免疫吸附测定(ELISA)板(Nunc)上，于室温下孵育1小时，此后用PBS和0.05% Tween 20中的1%牛血清白蛋白(BSA)封闭1小时。再过1小时后，洗去未结合的肽，加入具有诸如NP-40(Sigma)的0.01%的合适洗涤剂的稀释度为1/4,000的PBS中的抗生蛋白链菌素过氧化物酶(Sigma)，于室温下孵育2小时。再次洗涤后，在每块板中加入四甲基benzidine(TMB)底物溶液(10 ml 0.1M pH 6.0 柠檬酸盐/乙酸盐缓冲液中1片TMB(Sigma)，和36 μ l过氧化氢脲(UHPO)(Fluka))。加入2M硫酸(每孔10 μ l)终止反应，于450nm下读出吸收值，以定量测定

结合肽的量。通过将吸收值对浓度作图，获得肽的抑制活性。

可以如下获得所述纯化 HLA-DR4Dw4：

(i) HLA-DR 在杆状病毒系统中的表达

5 在昆虫细胞中由杆状病毒载体表达重组蛋白是一个已建立的获得高产量重组蛋白的方法[Luckow, VA 和 Summers, MD (1988) *Biotechnology*, 6, 47-551]。为了能够表达异二聚体 HLA-DR，例如 HLA-DR4Dw4，由单重组杆状病毒载体(与具有分别用于 α 和 β 链的重组病毒，然后进行共感染不同)构建携带 α 和 β 两条链的双重组杆状病毒。

10 将编码 α 多肽序列的 cDNA 克隆到转移载体 pacYM1 [Matsuura, Y; Possee, RD; Overton, HA 和 Bishop, DHL (1987), *J. Gen. Virol.* 68, 1233-1250]中，将该蛋白的表达置于多角体蛋白启动子的控制之下。通过同源重组，将该单位插入 Sf21 昆虫细胞中的杆状病毒基因组中，以产生用于 α 链的单重组杆状病毒。Summers MDD 和 Smith GE (1987) [*A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*; Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 1555]全面描述了用于培养和感染昆虫细胞、用于同源重组和监测/分离重组病毒的技术。同样，在所述文献中可容易地得到用来构建所述重组载体的分子遗传技术，Sambrook, J; Fritsch, EF 和 Maniatis T, (1989) [*分子克隆，实验室手册，第二版*·冷泉港实验室出版社]最全面地描述了这些技术。

20 为了产生双重组杆状病毒，将编码 β 链的 cDNA 克隆到转移载体 pAcUW1 [Weyer, U; Knight, S 和 Possee, RD (1990) *J. Gen. Virol.*, 71, 1525-1534]中，以将该蛋白的表达置于 P10 启动子的控制之下。然后将该单位插入携带 α 链的单重组杆状病毒的基因组中。通过将用从所述转染物中随机挑选的病毒感染的昆虫细胞点在膜上，将其与例如 L243 的单克隆抗体反应，检测双重组病毒，所述 L243 特异性地识别

HLA-DR 异二聚体。采用在所述文献中容易得到的标准流式细胞仪技术检测该抗体与 Sf21 昆虫细胞的结合。噬斑纯化表达 HLA-DR 的稳定的双重组杆状病毒。

(ii) 从昆虫细胞纯化 HLA-DR

5 所用方法为 Gorga 等 1987 (Gorga 等, 1987. J. Biol. Chem. 262, 16087-16094)所述方法的修改方法。通过用特氟隆玻璃匀浆器进行 10 个冲程匀化, 将表达 HLA-DR 的杆状病毒/Sf21 细胞(10L, 大约等于 2×10^{10} 细胞)溶于 100ml 5mM EDTA(钠盐)、50mM Tris-HCl pH 8.5、2% NP40、150nM NaCl、1mM 碘乙酰胺、1mM PMSF 中。将匀浆液以 100,000g 离心 1 小时, 收集上清液。将以 50mg L243 对 10 ml A 蛋白-快速琼脂糖(Sepharose fast flow)(Pharmacia)的比率共价偶联并与 10mM Tris-HCl pH 8.0、0.1% NP-40 预孵育的抗 HLA-DR 单克隆抗体 LB3.1 (Gorga 等 1986, Cell. Immunol. 103, 160-172)与所述上清液孵育过夜。然后将该树脂放入柱中, 用 10mM Tris-HCl pH 8.0、0.01% NP-40 (20 个柱体积)洗涤, 然后用 0.15 M NaCl、50nM Na_2HPO_4 pH 7.0、1%辛基葡糖苷(20 个柱体积)洗涤。用 50mM 二乙胺 pH 11.0、0.15M NaCl、1%辛基葡糖苷洗脱 HLA-DR。柱流分立即用 1 M Tris-HCl pH 8.0 中和, 并通过 centricon-10 膜超速离心浓缩。通过 BCA 蛋白测定(Pierce)测定蛋白含量, 通过 SDA-PAGE 电泳测定纯度。

20 一般而言, 在试验 A 中测试的以上定义的式 I 肽衍生物在大约 10 μM 或低得多的浓度下表现出显著的抑制。

25 本发明另一优选的方面包括不与 HLA-DR3 结合而与 HLA-DR1 和/或 HLA-DR4Dw4 和/或 HLA-DR4Dw14 结合的式 I 肽衍生物或其药学上可接受的盐。HLA-DR3 为与类风湿性关节炎无关的普通 HLA-DR 等位基因。因此, 在携带 HLA-DR3 作为其中一个等位基因的类风湿性关节炎病人(大约为总的类风湿性关节炎病人中的三分之一)中。这种式 I 肽衍生物不干扰 HLA-DR3 在宿主防御功能中的正常作用。因此, 由于使用这种肽衍生物导致的免疫抑制低于用非选择性 DR 结合

物发生的免疫抑制，用这种肽衍生物对于治疗类风湿性关节炎病人特别有利。

作为试验 A 的变体，如下评价本发明肽与一种或多种 HLA-DR 分子结合的能力：

5 (i) 从细胞系中纯化 HLA-DR 类型

所用方法为 Gorga 等(1987. J. Biol. Chem. 262, 16087-16094)所述方法的修改方法。通过免疫亲和色析从不同的细胞系纯化人 HLA-DR 抗原。简单地说，用特氟隆玻璃匀浆器进行 10 个冲程的匀化，将 1×10^9 - 5×10^9 选自 Hom 2(DR1 来源)、BBF(DR2 来源)、AVL-B(DR3 来源)、JAH(DR4Dw4 来源)、JHAF(DR4Dw13 来源)或 PE 117(DR4Dw14)的合适细胞系的沉淀细胞于大约 4℃ 溶于 50ml 的 5mM EDTA(钠盐)、50mM Tris-HCl pH 7.4、2% NP40、150mM NaCl、1mM 碘乙酰胺、1mM PMSF 中。将匀浆液以 100,000g 离心 1 小时，收集上清液。将共价偶联到 CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia)上的抗 HLA-DR 单克隆抗体 LB3.1 (Gorga 等 1986, Cell. Immunol. 103, 160-173)与 150 mM NaCl、50mM Tris-HCl pH 7.4、0.1% NP-40 预平衡，并与所述上清液孵育过夜。然后将该树脂装入柱中，用 0.15 M NaCl、50mM Tris-HCl pH 7.4、1% 辛基葡糖苷(20 个柱体积)洗涤。用 50 mM 二乙胺 pH 11.0、0.15 M NaCl、1% 辛基葡糖苷洗脱出所述 HLA-DR。柱流分立即用 0.5 M HEPES NaOH pH 7.4 中和。通过 Biorad 蛋白测定法测定蛋白含量，通过 SDS-PAGE 电泳测定纯度。

15 (ii) 肽的选择性结合测试

将磷酸缓冲盐水(PBS)中的 200nM 生物素-FHA₃₀₇₋₃₂₀ 在具有或不具有测定缓冲液(PBS, 0.01% NP40 (Sigma))中的抑制肽的 V 形孔微量滴定板(Nunc)中或者与纯化的 HLA-DR1、DR2、DR4Dw4、DR4Dw13 或者与 DR4Dw14 (2-20μg/ml)孵育。对于 DR3 抑制而言，将 400nM 生物素-Ahx-(D)Ala-Ala-Ala-Che-Ile-Ala-Ala-Ala-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-(D)Ala-OH 与纯化的 DR3 (20μg/ml)一起孵育并按上述孵

育。48 小时后, 处理所述孵育物, 按试验 A 中所述取吸收读数。采用 PC 上的 Microcal Origin 软件计算肽的抑制活性, 以 IC_{50} 值表示。

试验 B: T 细胞激活的体外抑制。(该测试可以用来证明式 I 肽衍生物抑制通过 MHC II 类分子介导的 T 细胞免疫应答的能力)。

5 测试抑制肽阻断 B52.24 鼠 T 细胞杂交瘤系对由 HLA-DR4Dw4 分子提呈的 FHA₃₀₇₋₃₂₀ 肽(H-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-OH)反应的刺激的能力。通过按 Woods 等(1994) (J. Exp. Med. 180, 173-181)概述的, 并按照 Current Protocols in Immunology, 第 2 卷, 7.21 中给出的用于产生 T 细胞杂交瘤的通用方法, 将取自 FHA₃₀₇₋₃₂₀ 免疫的 HLA-DR4Dw4 转基因小鼠(国际专利申请公开号 WO95/03331)的淋巴结 T 细胞与 BW5147 鼠 T 细胞淋巴瘤系 (White 等(1989) J. Immunol. 143, 1822)融合, 生产 B52.24。

15 通过在 96 孔微量滴定板(Nunc)中的 PRMI-1640 培养基(Gibco)中稀释, 将浓度为 100-0.1 μ M(或更低)的抑制肽与或者浓度为 100-1.0 μ M 或者为 10 μ M 固定浓度的抗原肽 FHA₃₀₇₋₃₂₀ 混合, 最终体积为 100 μ l。通过在 1%戊二醛(Sigma)中悬浮, 用戊二醛以 4×10^6 细胞/ml 将诸如 JAH EBV 转化类淋巴母细胞细胞系(欧洲培养物保藏中心 ECACC 85102909)的表达 HLA-DR4Dw4 的 B 细胞、或取自 HLA-DR4Dw4 纯合个体并用 EB 病毒按照 Current Protocols in Immunology 7.22.1 中所述方法转化的 B 细胞固定 30 秒, 此后, 加入等体积的 200mM 赖氨酸 (Sigma)3 分钟。通过以 300g 离心收集细胞, 在 PRMI-1640 中洗涤, 以每孔 2×10^5 细胞浓度加入含有抗原和抑制化合物的微量滴定板中。将所述微量滴定板于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 下孵育 2 小时。

25 然后通过以 300g 离心并吸出 2 次, 将所述微量滴定板在 PRMI-1640 中洗涤, 然后加入培养基(PRMI-1640, 10%胎牛血清(Gibco)和 2mM 谷氨酰胺(Gibco))中的每孔 10^5 细胞的 B52.24 T 细胞杂交瘤系。然后将微量滴定板于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 下再孵育 2 天。然后将所述板以 300g 离心 10 分钟, 从所有孔取出 150 μ l 上清液, 在生物测试 IL-2 含

量之前于-20℃冷冻。

将含待分析上清液的培养板于室温下放置解冻，将100ml上清液转移至新的96孔圆底板中。用培养基(PRMI-1640 (Gibco)、10%胎牛血清(Advanced Protein Products)、100 µg/ml 链霉素和100 U/ml 青霉素(Gibco)、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)和50µM 2-巯基乙醇(Sigma))将IL-2进行1:1连续稀释，产生最后的250单位/ml-0.04单位/ml IL-2的标准曲线。收集诸如CTLL-2细胞(Nature (1977) 268 154-156)或HT-2细胞(J. Immunol. Methods (1987) 94-104)的IL-2依赖性细胞系，在以 5×10^4 细胞/ml再悬浮之前，用培养基洗涤2次。向标准曲线样品和测试样品的每孔中加入100µl IL-2依赖性细胞悬浮液。将培养板于37℃和5% CO₂下孵育72小时。此后，每孔加入20µl (1mCi) 3H-胸苷(Amersham International)，将所述板放回培养箱中16小时。在玻璃纤维滤垫(filter mat)上收获每板的内容物，用β板(betaplate)闪烁计数器测定放射活性。

一般而言，在试验B中测试的以上定义的式I肽衍生物在大约10µM或低得多的浓度下表现出显著的抑制。

试验C：BALB/C小鼠中肽刺激的DTH(迟发型超敏反应)。(该试验可以用来证明式I肽衍生物在动物模型中的体内活性)。用0.1ml与弗氏完全佐剂(Sigma)1:1(v/v)混合的卵清蛋白(Sigma) (盐水中2mg/ml)乳液在每组5只的Balb/c雌性小鼠(18-20g)的胁腹皮下免疫。7天后，用双径卡尺测微计(dual caliper micrometer)测量爪垫的厚度，然后在一只后爪垫足底下注射30µl盐水中的1%热聚集卵清蛋白进行激发。抗原激发后24小时，测量爪垫，按与对侧对照爪垫相比，以注射爪垫的爪垫厚度增加的百分比计算DTH反应。通过在抗原激发前24小时植入的3天微型渗透泵(Alzet)给与抑制剂，剂量范围为10mg/kg/天-0.1 µg/kg/天。通过用给与溶媒的对照减去抑制剂处理的爪

垫的肿胀值, 除以该对照值再乘以 100%, 计算抑制程度。

一般而言, 在试验 C 中测试的以上定义的式 I 肽衍生物在大约 1mg/kg/天或低得多的剂量下表现出显著的抑制, 而没有任何明显的毒理学作用或其它不适当的药理学作用。

5

试验 D: (该测试可以用来证明式 I 肽衍生物在关节炎动物模型中的体内活性)。

通过皮下注射 0.1 ml 含等体积盐水中 2mg/ml 甲基化牛血清白蛋白(met-BSA, Sigma)和弗氏完全佐剂(Sigma)的乳液, 在第 0 天免疫 Balb/c 雌性小鼠(19-21g, 5-10/组), 并在第 7 天加强, 所述弗氏完全佐剂补充 2.5mg/ml 结核分支杆菌(MTB, 菌株 C、DT 和 PN、MAFF, Weybridge, Surrey), 因此产生的 MTB 终浓度为 3.5 mg/ml。同时腹腔内注射另外 0.1 ml 盐水中的 10^9 百日咳杆菌生物(Wellcome Pertussis 疫苗)。14 天后, 用 30 号针头和 hamilton 注射器, 在一个膝关节内注射含 100 ug met-BSA 的 10 μ l 盐水激发动物。对侧膝盖注射相似体积的盐水用作对照。13 天后, 通过用双径卡尺测微计测量, 测定与双膝相关的炎症/肿胀程度。通过用平头剪刀和镊子, 在所述膝盖上下大约 5mm 的皮肤做一切口并继续沿该膝盖侧, 形成一片, 然后将其小心地切下, 暴露下面的关节来做到这一点。保持在固定位置中的弯曲肢上测量该膝盖水平面的最宽部分。按照下式计算与对照相比注射抗原膝盖中炎症增加的百分比: $[\text{注射抗原的膝盖厚度} - \text{注射盐水的膝盖厚度} / \text{注射盐水的膝盖厚度}] \times 100$ 。采用抗原激发前 24 小时植入的 14 天微型渗透泵(Alzet)给与抑制剂, 其剂量范围为 10mg/kg/天-0.1ug/kg/天。从给与溶媒的对照的肿胀值减去抑制剂处理组的肿胀值, 除以对照值再乘以 100, 计算炎症/肿胀的抑制百分比。疾病的其它评价包括 1)在用苏木精和曙红染色的固定膝盖切片上进行炎症、滑膜炎和软骨/骨侵蚀的组织学评价, 以及 2)测定血清中的急性相反反应物、血清淀粉状蛋白 P 和/或触珠蛋白水平。

以上定义的式 I 肽衍生物在试验 D 中在大约 10mg/kg/天或低得多的剂量下可以表现出显著的抑制。

通过说明特定的式 I 肽衍生物的药理学活性, 实施例 3 和实施例 6 的化合物在不高于 0.1 微摩尔的浓度下表现出与试验 A(或上文所述试验 A 的变体)中的 HLA-DR4Dw4 显著结合, 在试验 C 中在 <0.1 mg/kg/天下有活性。实施例 3 的化合物也表现出与 HLA-DR4Dw14 显著结合, 但用实施例 3 或实施例 6 化合物没有发现与 HLA-DR1、HLA-DR2 或 HLA-DR3 显著结合($IC_{50} > 100$ 微摩尔)。提取的聚合物贮存制剂形式的两种化合物在 pH 3 和 pH 7.6 下都表现出良好的水稳定性, 表现出最低限度的由挤压降解引起的损失和从这种贮存制剂中释放时最低限度的降解。

用本领域已知的可用于类似肽合成的肽化学的任何方法制备式 I 的肽衍生物。

例如可以用 Atherton 和 Sheppard 的“Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach”(由牛津大学出版社的 IRL 出版社出版, 1989)中公开的类似方法, 获得式 I 的肽衍生物。Stewart 和 Young (由 Pierce Chemical Company, Illinois 出版, 1984)的“Solid Phase Peptide Synthesis”、“Principles of Peptide Synthesis”(由 Springer-Verlag, Berlin 出版, 1984)和一系列书“Amino Acids, Peptides and Proteins”(第 1-25 卷; 1994 年出版的第 25 卷)(由 the Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 出版)。

最好是, 通过固相连续合成制备式 I 的肽衍生物。采用该技术, 保护待成为该肽 C 末端氨基酸的氨基酸的 α -氨基, 必要时保护侧链中的氨基, 将所述氨基酸偶联到固相载体上, 所述固相载体如果在裂解后需要游离羧酸, 则例如为 2-氯三苯甲基氯树脂或 Merrifield 树脂(氯甲基聚苯乙烯-二乙烯基苯), 或如果裂解后需要甲酰胺, 则为 Rink 酰胺树脂(4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基树脂)或 Rink 酰胺

MBHA 树脂(N-(4-[2',4'-二甲氧基苄基-Fmoc-氧甲基)-苯氧基乙酰胺基-正亮氨酸基)-4-甲基二苯甲胺树脂(所有都可得自 Calbiochem-Novabiochem), 此后除去 α -氨基上的保护基团。保护待连接到 C 末端氨基酸的氨基酸的 α -氨基, 必要时保护侧链中的氨基, 将所述氨基酸偶联到仍连接到该固相载体上的碳末端氨基酸上。重复所述 α -氨基的去保护和偶联下一个氨基酸的分步过程, 产生连接到该固相载体上的保护或未保护的多肽。例如, 按所述实施例中所述或按下文的流程 I 中说明的方法, 或与其类似的方法, 采用对称或非对称的式 R^1R^2NH 胺, 可以获得式 II 的保护氨基酸。可以通过本领域已知的方法, 例如所述实施例中所述的或在下文流程 2 中说明的方法, 或与其类似的方法, 获得式 R^1R^2NH 胺。用来进行流程 1 和 2 反应步骤的试剂和条件是本领域已知的, 并在标准教科书中进行了描述, 所述反应步骤诸如为醇类和胺类的烷基化、胺和羧酸形成酰胺的偶联、形成脲和氨基甲酸酯和保护基团的保护和去保护。采用适当保护的(3-氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)链烷酸(对于含 III 的肽化合物, 其中 A = 亚甲基), 或按 J. Med. Chem., 1993, 36, 256-263 中所述方法或通过与类似的方法获得的相应的氧杂类似物(对于其中 A 为氧的含 III 肽化合物), 或(6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基)链烷酸(对于含 IV 的肽化合物)取代保护的氨基酸, 将式 III 或 V 的基团加入该序列中。采用按 J. Med. Chem., 1993, 36, 256-263 中所述方法(或通过与类似的方法)或按下文实施例中所述方法(或与其类似的方法)获得的适当保护的 3-氨基-2-氧代全氢化吡啶因-1-链烷酸, 可以将式 V 的基团加入该序列中。用标准方法, 例如采用三氟乙酸、三乙基硅烷和水的混合物, 从该固相载体释放所述保护或未保护的多肽。

应该认识到, 可以在用来从该固相载体释放该多肽的条件下裂解侧链保护基团, 或可以在从该固相载体释放该多肽之前或之后作为单独的步骤进行裂解。也应该认识到, 可以通过在具体的偶联步骤中采用 2 个或多个适当保护的氨基酸的序列, 修改构建该多肽的方法。该

合成可以采用人工技术或例如采用 Applied Biosystems 431A 或 430A 肽合成仪、Advanced Chemtech ACT357 肽合成仪或相似的自动肽合成仪自动进行,或可以采用两种技术的组合。

5 在装配所述肽期间,用各种官能团保护不参加所述反应的氨基酸官能团。例如采用 9-苄基甲酯基(Fmoc)、叔丁酯基(Boc)、联苯基异丙酯基(Bpoc)、2-[3,5-二甲氧基苯基]丙-2-酯基(Ddz)、金刚烷酯基(Adoc)、烯丙酯基(Aloc)、2,2,2-三氯乙酯基(Troc)、苄酯基和各种取代苄酯基保护 N-末端和侧链的氨基。需要时,可以用标准技术(例如酸或碱处理、催化氢解和 Pd(0)处理或锌/乙酸处理)裂解这些保护基团。

10 用来保护含有精氨酸残基的肽中侧链胍基的合适的保护基团包括硝基、金刚烷酯基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基(Mtr)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)和(尤其是)2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)。

15 用来保护侧链羟基的合适的保护基团包括叔丁基、苄基和三苯甲基(Trt)。用于含组氨酸残基肽的侧链咪唑基的合适的保护基团包括三苯甲基、苄基、甲苯磺酰基、二硝基苯基、Adoc、Boc 或 Fmoc 基团。

用来保护侧链羧基的合适的保护基团包括各种酯(例如甲酯、乙酯、叔丁酯、苄酯、硝基苄酯、烯丙酯和 9-苄基甲酯)。

20 进行保护基团裂解反应的温度可以为 4-40 °C(最好在周围温度下或其附近),时间为 10 分钟至 24 小时。

25 用来偶联所述各个氨基酸的合适的偶联方法包括常用的叠氮化物、对称酸酐、混合酐和各种活性酯和碳二亚胺。在各种碳二亚胺的情况下(例如二环己基-碳二亚胺或二异丙基-碳二亚胺),也可以加入多种添加剂(例如 1-羟基苯并三唑(HOBT)和 N-羟基琥珀酰亚胺)。另外,通过采用多种其它试剂,例如六氟磷酸 1H-苯并三唑-1-基-氧代-三吡咯烷基(pyrrolidino)磷(PyBOP)、四氟硼酸(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓(uronium)(TBTU)和四氟硼酸(2-(1H-苯并三唑-1-

基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗(HBTU)。进行所述偶联反应的温度为-20℃至40℃,时间为10分钟至24小时。进行所述偶联反应的合适介质包括例如N,N-二甲基甲酰胺(DMF)。特别合适的方法包括使用DMF中的HBTU、HOBT和二异丙基乙胺。

5 在本文引用的国际专利申请中例举了肽合成的这些方法和其它方法。为式R-、R.CO-、R.SO₂-、R.O.CO-、R.NHCO-、R.O.CS-、R.S.CO-、R.NHCS-、R.S.CS-和R.CS-基团(或作为P末端氨基上的取代基存在的基团,这里P为疏水氨基酸或带有其它氨基酸的疏水氨基酸)的疏水残基P可以作为最后一步,通过烷基化、酰化或其它末端氨基的标准官能团修饰而加入。当需要C末端修饰(以获得特定的Q的特定有用基团)时,它们可以在合成所述肽后,采用常规的官能团修饰进行。或者,可以通过适当选择最初的起始树脂和/或首先偶联到该树脂上的保护的实体(例如通过采用适当保护的式H-Q的基团),获得Q特定的有用基团。下文的实施例中提供制备I肽化合物的典型实例。

15 测定本发明肽衍生物稳定性的典型方法如下,其中为了最大限度地减小微生物污染和降解,用来制备肽溶液的所有设备都在高压灭菌器中灭菌,所有材料的转移都在II类层流室中进行。采用无菌0.22μm的过滤装置和20ml注射器,将大约20ml pH 3或pH 7.6、含0.02%叠氮化钠的McIlvaine氏柠檬酸-磷酸盐缓冲液过滤到50ml瓶中。在带盖管制瓶中精确地称量大约1.2 mg肽。用无菌移液吸头,将足够的缓冲液加入该管制瓶的所述肽中,使得肽浓度为0.1 mg/ml。将该管制瓶盖上盖子,震荡以溶解该肽。采用无菌移液吸头,将大约1 ml的数等份所述肽溶液转移到10个HPLC管制瓶中,然后将管制瓶盖上盖子。将5个管制瓶贮存于-18℃,5个管制瓶贮存于37℃。在初始和于-18℃和37℃贮存1、2、3和4周后,在每个时间点用含有双份样品注射液的新管制瓶,采用合适的标准品,通过HPLC测定该溶液肽峰的面积。从每个时间点所述肽峰面积与初始面积之比,测定于37℃贮存后在每个时间点的剩余肽百分比。优选的本发明肽衍生物在于37℃、

pH 3 和 pH 7.6 贮存后, 剩余的肽高于 90 %, 最好高于 95 %.

正如药学领域众所周知的, 一般为了治疗或预防, 将药用组合物形式的式 I 肽衍生物给与需要这种治疗的温血动物(包括人类).

按照本发明的另一特征, 提供药用组合物, 它包含式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的稀释剂或载体.

所述药用组合物可以采用适于口服使用的形式, 例如片剂、胶囊、水溶液或油溶液、悬浮液或乳液; 适于鼻使用的形式, 例如为嗅剂、喷鼻剂或滴鼻剂; 适于阴道或直肠使用的形式, 例如为栓剂; 适于吸入给药的形式, 例如为细粉末或液体气雾剂; 适于舌下或颊使用的形式, 例如为片剂或胶囊; 或适于胃肠外使用(包括静脉内、皮下、肌肉、血管内或输注)的形式, 例如为无菌水溶液或油溶液或悬浮液. 所述组合物可以采用适于局部给药的形式, 例如为乳油、膏剂和凝胶. 也设想皮肤贴剂. 在 Comprehensive Medicinal Chemistry, 第 5 卷, 第 25.2 章(Hansch 等编辑, Pergamon Press 1990)中描述了一般的制剂.

一般而言, 可以采用常规赋形剂, 以常规方式制备以上组合物. 然而, 在口服给药组合物的情况下, 所述组合物包含包衣以保护所述多肽活性组分不受胃中酶作用可能是便利的.

优选的本发明组合物是适于口服的单位剂量形式的组合物, 例如每单位剂量含有 2.5-500 mg, 最好含有 10-100 mg 多肽的片剂或胶囊; 或适于胃肠外给药的组合物, 它每毫升含有 0.5-100mg 多肽, 最好每毫升含有 1-10mg 多肽.

胃肠外组合物最好为等渗盐水中的溶液或等渗葡萄糖缓冲的溶液, 必要时 pH 为 5-9. 或者, 所述胃肠外组合物可以为设计用于缓释的组合物, 在这种情况下, 每单位剂量的多肽量一般高于所用常规注射制剂所需的量. 优选的缓释制剂为连续释放制剂, 例如欧洲专利说明书 58481 号中描述类型的制剂, 或对于含至少一个碱性基团的式 I 肽衍生物而言, 为国际专利申请公开号 WO93/24150 中所述的制剂. 本发明的某些肽衍生物具有溶解度特性, 使得它们特别适于缓释胃肠

外制剂、特别是含有诸如聚交酯的生物可降解聚酯制剂的生产和加工，也适于提供具有有益释放分布的缓释制剂。此外，含有一个或多个碱性基团、特别是精氨酸的本发明肽衍生物，也可以与诸如聚交酯的酸封端聚酯形成肽-聚合物盐，这类肽和肽-聚合物盐构成了本发明的另一方面。某些这类盐具有溶解度特性，使得它们特别适于例如 WO93/24150 中所述的缓释胃肠外制剂的生产和加工，也适于提供具有有益释放分布和贮存稳定性特性的缓释制剂。优选的缓释胃肠外制剂每单位剂量含有 1-100 mg (诸如 5-50 mg) 多肽。优选的缓释胃肠外制剂也是设计在至少 5 天内缓释的制剂。

本发明的优选肽衍生物包括采用挤压聚合物贮存(depot)制剂时表现出最小的挤压时降解损失的那些肽衍生物，或从这种贮存制剂释放时表现出最少降解的肽衍生物。测定本发明肽降解水平的典型方法如下：

15 肽的挤压聚合物贮存制剂的制备

精确称量大约 20 mg 肽，加入足够的聚合物(50/50%(摩尔)聚(D,L-乳酸/乙醇酸)共聚物产生大约 20% (w/w)的混合物，其中所述共聚物的重均分子量通过大小排阻色谱测定相对聚苯乙烯标准物大约为 20kD，多分散性大约为 1.7。将其溶于无酸酐的冰醋酸中，产生大约 10% (w/v)的溶液。将该溶液冷冻干燥，将产生的冷冻干燥产物在使用前真空中贮存。

将大约 100mg 冷冻干燥材料加到小型实验室挤压机机筒中，压下柱塞以凝固该样品。将挤压机加热至 90-95 °C，于该温度保持 10 分钟，然后在压力下挤出所述冷冻干燥材料，产生直径大约为 1mm 的圆柱形挤出物。

25 肽的挤压聚合物贮存制剂的肽含量分析

精确称量 2 个大约长 5mm 的含肽的挤压聚合物贮存制剂，将每

个制剂在单独的 25ml 量瓶中溶于 1 ml 无酸酐冰醋酸，大约 1.5 小时后，将每个制剂的体积用蒸馏水加至 25ml，使得所述聚合物沉淀。用 0.5 μ m Millex PTFE 滤器滤出所述固体，并收集溶液 A。

5 由 0.5mg/ml 的蒸馏水中的肽贮液和 2.5mg/ml 的无酸酐冰醋酸中的聚合物贮液，用蒸馏水将每种溶液制成 10 ml，如下制备一系列标准溶液：

肽浓度 (μ g/ml)	聚合物贮液 体积 (μ l)	肽贮液体积 (μ l)
50	1000	1000
40	1000	800
30	1000	600
20	1000	400
10	1000	200
5	1000	100
0	1000	0

10 将每种标准物通过 5 μ m Millex PTFE 滤器过滤，将采用双份样品注射，通过 HPLC 分析连同数等份溶液 A 的一等份滤液。由溶液 A 中肽的浓度计算挤压聚合物贮存肽制剂的肽含量，溶液 A 的肽浓度通过将溶液 A 的所述肽峰面积与所述标准溶液的所述肽峰面积比较而测定。优选的本发明肽衍生物表现出最少的挤压降解损失，因此所述挤压聚合物贮存制剂的肽含量接近大约 20% (w/v) 的理论值。

15

体外由挤压聚合物贮存物释放时肽的降解

将含有 0.02% 叠氮化钠的 pH 7.6 McIlvaine 氏柠檬酸-磷酸盐缓冲液的溶液通过 0.22 μ 滤器过滤，并于 4 $^{\circ}$ C 下贮存。将大约 10 mg 含肽

挤压聚合物贮存物置于2个小管制瓶中,加入2ml所述缓冲液。然后给管制瓶加盖,于37℃水浴中贮存1个月。在1个月内的适当时间点,从每个管制瓶中取出三等份各0.6ml的释放介质,在通过HPLC分析之前,或者通过HPLC分析或者于-18℃冷冻贮存在HPLC管制瓶中。

5 将1.8ml所述缓冲液加入每个含所述贮存物的管制瓶中,以取代在每个时间点已经取出的释放介质。

采用双份样品注射,通过HPLC,将所述释放介质中的肽峰面积与已知肽浓度的标准缓冲液的肽峰面积相比,测定每个时间点所述释放介质中完整肽的平均量。通过HPLC,将所述释放介质中的其它新峰面积与已知肽浓度的标准缓冲液的肽峰面积相比,并且假定该消光系数未改变,测定每个时间点所述释放介质中肽降解产物的大致平均量。由每个时间点所述释放介质中完整肽和肽降解产物的量确定完整肽和总肽(完整肽和肽降解产物)的体外平均累积释放分布。优选的本发明肽衍生物表现出体外释放时最小的降解,并由此表现出于37℃下

10 在pH 7.6的McIlvaine氏缓冲液中体外释放1个月后,总肽降解产物低于总肽的10%,最好低于5%。

本发明的组合物一般给与人类,使得例如对于70kg病人而言,日剂量为10微克至5000mg,最好为0.1-100mg,必要时以均分量给与。按照医学领域熟知的原则,给与的组合物准确量和给药途径和形式可以取决于待治疗病人的体重、年龄和性别,取决于待治疗的特定疾病或症状极其严重性。

20

为了治疗和预防,也可能最好将式I的肽衍生物或其药学上可接受的盐与一种或多种其它药物一起给与,所述药物是本领域一般已知可以治疗或减轻一种或多种上文提到的疾病或病况的症状(或作为疾病改善剂)的药物,诸如NSAID(诸如布洛芬或炎痛喜康)、镇痛药(诸如对乙酰氨基酚)、皮质类固醇、肌松药、脂氧合酶抑制剂、甲胺蝶呤、硫唑嘌呤、D-青霉胺、环孢菌素A或单克隆抗体疗法(诸如抗CD-4或抗THF)。在糖尿病中,所述肽化合物可以与胰岛素或其它用于糖尿

25

病或糖尿病并发症的其它疗法(诸如醛糖还原酶抑制剂)一起共同给与。应该理解, 这种联合疗法构成本发明的另一方面。

5 按照本发明的另一方面, 提供治疗 MHC II 类依赖性 T 细胞介导的自身免疫疾病或炎症性疾病的方法, 所述疾病例如本文提到的一种或多种疾病或病况, 该方法包括给与需要这种治疗的温血哺乳动物(包括人类)有效量的式 I 肽衍生物或其药学上可接受的盐。本发明也提供式 I 肽衍生物或其药学上可接受的盐在生产用于治疗 MHC II 类依赖性 T 细胞介导的自身免疫疾病或炎症性疾病的药物中的用途。

10 除上述在人类医疗中的用途外, 式 I 肽衍生物也可用于影响有经济价值的温血动物的相似疾病的兽医治疗中, 所述动物诸如狗、猫、马和牛。对于这种治疗而言, 式 I 的肽衍生物一般以类似于上述用于给与人类的量和方式给与。在开发用于评价 MHC II 类分子在实验室动物(诸如猫、狗、兔、猴、大鼠和小鼠)中的作用的试验系统并将其标准化中作为药理学工具及作为继续寻找新的、改进治疗剂或作为诊断试剂, 式 I 的肽衍生物也是有价值的。

15 现在将通过以下非限制性实施例说明本发明, 其中, 除非另外陈述, 否则:

- (i) 通过真空旋转蒸发进行浓缩和蒸发;
- (ii) 于 18-26 °C 的室温下进行操作;
- 20 (iii) 给出收率时, 仅仅是为了帮助读者, 不必是通过努力可得到的最大值;

(iv) 使用以下缩写(以及在流程 1 和流程 2 中):

Phv = 5-苯基戊酰基; Boc = 叔丁酯基; tBu = 叔丁基; DMF = N,N-二甲基亚砜; HOBT = 1-羟基苯并三唑; Met = 甲硫氨酸; Fmoc =
25 9-芴基甲酯基; Fmoc-Pip-OH = N-(9-芴基甲酯基)哌啶-4-甲酸;
Fmoc-Papa-OH = 4-[N-(9-芴基甲酯基)氨基]苯乙酸; Z 或 Cbz = 苄酯基; Pmc = 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基; Pbf = 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基; Trt = 三苯甲基; THF = 四氢呋

喃; DMSO = 二甲基亚砷; HBTU = 六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓; DIPEA = 二异丙基乙胺; TFA = 三氟乙酸; HPLC = 高压液相色谱; 以及 RP-HPLC = 反相高压液相色谱(除非另外陈述, 否则在 Vydac C18 柱 218TP54, $4.6 \times 250\text{mm}$ 上进行);

5 (v) 在得自德国 E Merck, Darmstadt 的 Merck Kieselgel 60 (Art No. 9385) 上进行快速层析和硅胶层析;

(vi) ^1H NMR 谱用四甲基硅烷(TMS)作为内标, 在 CDCl_3 或 d_6 -二甲基亚砷(d_6 -DMSO)中于 200 Mhz 下测定, 并以相对于 TMS 的每百万中的份数表示化学位移(δ)值, 采用命名主峰的常规缩写: s, 单峰; m, 10 多重峰; t, 三峰; br, 宽峰, d, 双峰;

(vii) 用以下 Fmoc 保护的氨基酸介绍 Lys、Thr、Arg 或 His 残基: 对于 Lys: Fmoc-Lys(Boc)-OH; 对于 Thr: Fmoc-Thr-(OtBu)-OH; 对于 Arg: Fmoc-Arg(Pmc)-OH 或 Fmoc-Arg(Pbf)-OH; 及对于 His: Fmoc-His(Trt)-OH;

15 (viii) 式中出现-II-时, 这是指下文提出的式 II 的 L-氨基酸残基, n、X、 R^1 和 R^2 的特定值已给出; 以及

(ix) 式中出现-IIIa-时, 这是指下文提出的式 IIIa 基团。

具体实施方式

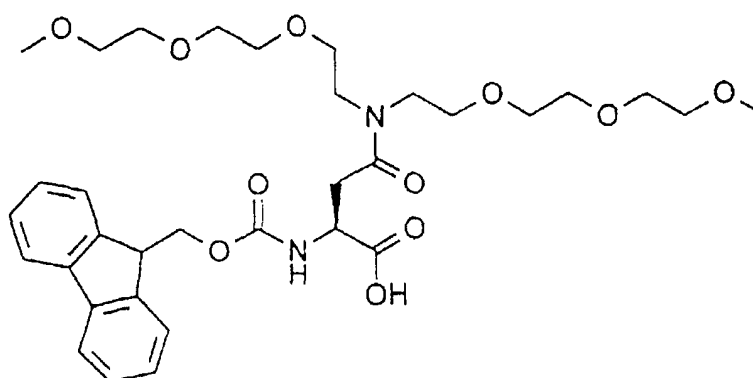
实施例 1

制备 Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (SEQ ID NO: 1)

(式 II: $n = 1$; X = 羰基; $R^1 = R^2 = -CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$)

- 5 1.1 N²-(9-苄基甲酯基)-N⁴,N⁴-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)-L-天冬酰胺的制备

10



- 15 (a) 在氮气下, 将 1-溴-2-(2-甲氧基乙氧基)乙烷(30 g)加入四氢呋喃(100ml)中的 N-苄基二乙醇胺(10g)中。然后分次加入氯化钠(5.3g 60%的矿物油中的分散液), 同时在水浴中冷却。加入完成后, 将该混合物搅拌 2 小时, 再分次加入氯化钠(4.4g 60%的矿物油中的分散液)。然后, 让该混合物于周围温度下搅拌 16 小时。小心地将水(50ml)加入该反应混合物中, 以破坏过量的氯化钠, 蒸发该混合物, 以除去有机溶剂。将水(100ml)加入该残余物中, 用浓盐酸将该混合物酸化至大约 pH 2, 然后用乙醚(2 × 100ml)萃取。弃去萃取液。然后, 加入浓氢氧化钠液, 将水层调至大约 pH 12, 用乙醚(2 × 150ml)萃取, 合并醚萃取液, 用盐水洗涤、干燥(MgSO₄)并蒸发至干。通过硅胶层析, 采用用浓氨水饱和的氯仿→ 5%甲醇/氯仿的梯度纯化该残余物, 收集适当的流分, 将其蒸发至干, 产生胶状物(12g)。加入甲醇(100ml), 然后加入 10%碳酸钡(2.5g)和甲酸铵(7.2g), 在氮气、60 °C 下搅拌该混合物 1 小时。然后将该混合物冷却、过滤并蒸发至干。通过硅胶层析, 采用浓
- 20
- 25

氨水饱和的氯仿→10%甲醇/氯仿的梯度纯化该残余物。收集适当的流分，将其合并蒸发至干，产生作为胶状物的 N,N-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)胺(7.1g); NMR (CDCl₃): 2.8 (m, 4H), 3.3 (s, 6H), 3.45 (m, 4H), 3.6 (m, 16H).

5

(b) 边搅拌边将N-甲基吗啉(1.6g)、N-叔丁酯基-L-天冬氨酸α-苄酯(2.6g)、羟基苯并三唑(2.16g)和盐酸1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(1.68g)加入二甲基甲酰胺(12ml)中的 N,N-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)胺(2.5g)中。将该混合物搅拌16小时，然后加入到水(50ml)中的2%乙酸中。用乙醚(2 × 50ml)萃取该混合物，合并的有机相用碳酸氢钠溶液洗涤并干燥(MgSO₄)。通过蒸发除去挥发性物质，产生作为胶状物的 N²-叔丁酯基-N⁴,N⁴-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)-L-天冬酰胺α-苄酯(2.8g); NMR (CDCl₃): 1.4 (s, 9H), 2.9 (m, 1H), 3.2 (m, 1H), 3.4 (s, 6H), 3.6 (m, 24H), 4.6 (m, 1H), 5.2 (q, 2H), 5.8 (d, 1H), 7.4 (s, 5H).

10

15

(c) 将10%钨碳(0.8g)和环己烯(1.6g)加入 N²-叔丁酯基-N⁴,N⁴-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)-L-天冬酰胺α-苄酯(2.6g)的甲醇(20ml)溶液中，将该混合物于55℃加热2小时。然后将该混合物冷却、过滤并蒸发。将丙酮(20ml)和水(8ml)加入该残余物中，加入浓盐酸(2ml)。将该混合物于55℃加热1小时，冷却并用过量的固体碳酸氢钠调至大约pH 7。加入碳酸9-苄基甲基琥珀酰亚胺基(succinimidyl)酯(1.36g)，将混合物搅拌16小时。通过蒸发除去挥发性物质，在水(25ml)和乙醚(50ml)之间分配该残余物。分离水层，用浓盐酸将其酸化至大约pH 3。然后用二氯甲烷(50ml)萃取该混合物。有机萃取液用水洗涤、干燥(硫酸镁)并蒸发，产生作为胶状物的 N²-(9-苄基甲酯基)-N⁴,N⁴-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)-L-天冬酰胺[下文称为 Fmoc-Asp(PE)-OH](2g); NMR (CDCl₃): 2.8 (q, 1H), 3.4 (q, 1H), 3.4 (s,

20

25

6H), 3.6 (m, 24H), 4.2-4.6 (m, 4H), 6.3 (d, 1H), 7.42 (m, 4H), 7.6 (m, 2H), 7.8 (d, 2H).

1.2 Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ 的制备

5 (式 II: $n = 1$; X = 羧基; $R^1 = R^2 = -CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$)

通过 Fmoc 固相合成, 由 Fmoc Rink 酰胺 MBHA 树脂 (Novabiochem, 0.50g, 0.25 mmole) 开始, 通过混合物的自动合成和手动合成, 用 Bond Elut 管 (Varian, 15ml, 底部备有滤器) 制备所述肽。

首先采用 ABI 431 自动肽合成仪, 通过按照厂商建议的如下的用于引入 HBTU/HOBT 化学的单酰化条件, 用 Fmoc-Pip-OH (353 mg, 1 mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmole) 和 Fmoc-Val-OH (339 mg, 1 mmole) 去保护该树脂并且连续偶联和去保护, 获得 Fmoc-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH-树脂。去保护后, 该树脂用 DMF (10 × 10-20ml) 洗涤。
15 用 DMF 中的 HBTU (1 当量)、HOBT (1 当量) 和 DIPEA (2 当量) 活化该羧酸 (1mmole) 约 11 分钟, 然后将其转移至该树脂上。酰化进行大约 60 分钟, 然后该树脂用 DMF (10 × 10-20ml) 洗涤。每个阶段的 Fmoc 去保护用 DMF 中的 20% 哌啶溶液 (用 5ml 处理 2 次, 每次 10 分钟) 进行。每次去保护后, 用 DMF (5 × 10ml) 彻底洗涤该树脂。

20 手动相继偶联并去保护该序列中剩余的残基。加入合适的 N-Fmoc-保护的氨基酸 (1 mmole)、DMF (1.5 ml)、HOBT (165 mg, 1 mmole) 和二异丙基碳二亚胺 (155 微升, 1 mmole) 溶液至该树脂中进行偶联。该偶联物放置大约 30 分钟, 用 DMF (5 × 10ml) 洗涤, 用 Kaiser 试验 (E. Kaiser 等, (1970), Anal. Biochem. 34, 595) 检查该树脂小部分的偶联完成情况。按上述进行去保护。这样, 将 Fmoc-Asp(PE)-OH (323 mg, 0.5 mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmole) 和 5-苯基戊酸 (178 mg, 1 mmole) 连续偶联到该树脂上。该苯戊酸需要双偶联, 以获

25

得 Kaiser 试验阳性结果。

用三氟乙酸(7.9ml)和三乙基硅烷(0.395ml)的混合物, 从该树脂裂解该肽。2 小时后, 用二氯甲烷(大约 150ml)洗涤该树脂, 将产生的溶液蒸发至干。产生的固体在乙醚(25ml)和水(25ml)之间分配, 然后用另外数份水(2 × 25ml)萃取该乙醚。将水相合并并冷冻干燥。

用制备型 RP-HPLC (Vydac 218TP1022 柱, 250mm × 22mm), 将 10ml 20% 乙腈/水中的粗物质上柱, 纯化该粗产物。用含 0.1% TFA 的乙腈-水梯度, 以 12ml/分钟的流速进行洗脱。合并含产物的部分, 将其冷冻干燥, 产生白色固体的 Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂(其中 II 为式 II L-氨基酸的残基, 其中 n = 1; X = 羰基; R¹ = R² = -CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₃)(83mg)。

该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

RP-HPLC (Vydac C18 柱, 218TP54, 4.6 × 250mm, 用含 0.1% TFA 的乙腈和水洗脱, 在 30 分钟内采用 10-50% 乙腈的梯度, 流速为 1.0 ml/min), 表明纯度为 94%, 保留时间为 23.29 分钟。

质谱, m/e (ES⁺) 1220.7 (MH⁺)。

氨基酸分析(用含 1% 苯酚的 6N HCl 溶液于 130 °C 酸水解 24 小时)产生 Ala 5.82, Val 0.98, Asp 1.19。

通过类似于 E. Atherton 和 R.C. Sheppard 所述(“Solid phase peptide synthesis: a practical approach”, IRL press, 1989, 第 51 页)用于 N-Fmoc-L-甲硫氨酸方法的方法获得 Fmoc-Pip-OH。

Fmoc-Pip-OH: NMR (DMSO-d₆) 1.3 (m, 2H), 1.7 (m, 2H), 2.5 (m, 2H), 2.9 (t, 2H), 3.7 (m, 1H), 4.2 (t, 1H), 4.4 (d, 2H), 7.4 (m, 4H), 7.7 (d, 2H), 7.9 (d, 2H); 质谱 m/e (ES⁺) 352.2 (MH⁺)

25

实施例 2

制备 Phv-II-Ala-Ala-Lys-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (SEQ ID NO: 2)
(式 II: n = 1; X = 羰基; R¹ = R² = -CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₃)

采用类似于实施例 1.2 所述的方法, 通过将 Fmoc-Lys(Boc)-OH (468 mg, 1 mmole)、Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1mmole)、Fmoc-Ala-OH(311mg, 1mmole)、Fmoc-Asp(PE)-OH (323 mg, 0.5 mmole)和 5-苯基戊酸 (178 mg, 1 mmole)连续偶联(手动)到 Fmoc-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH-树脂(采用手动偶联获得的)上, 进行该合成。用与实施例 1 所述的相似的条件, 从该树脂上裂解该肽并纯化该粗产物。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

RP-HPLC (30 分钟内的 20-50%乙腈的梯度, 流速为 1.0 ml/min) 的保留时间为 16.4 分钟。

质谱, m/e (ES^+) 1277.8 (MH^+)。

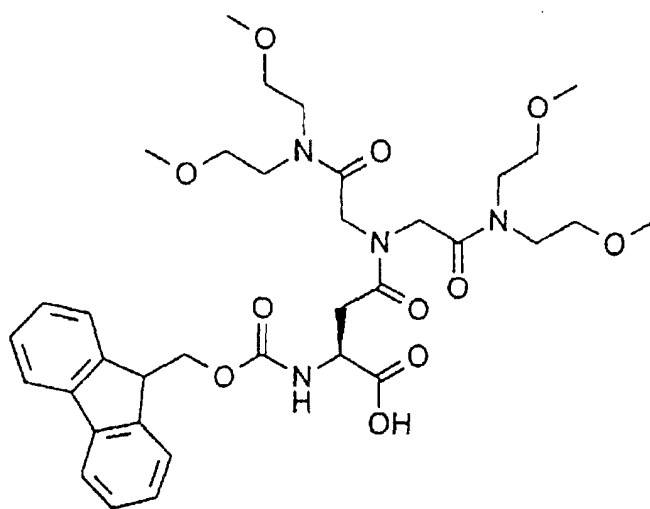
氨基酸分析给出 Asp 1.07, Lys 1.05, Ala 4.9, Val 0.92。

实施例 3

制备 Phv-Ala-Arg-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂ (SEQ ID NO: 3)

(式 II: $n = 1$; X = 羰基; $R^1 = R^2 = -CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

3.1 N²-(9-苄基甲酯基)-N⁴,N⁴-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-天冬酰胺的制备



(a) 将 N-甲基吗啉(2 g)、羟基苯并三唑(4 g)、双(2-甲氧基乙基)胺(3.5 g)和盐酸 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(3.8 g)加入二甲基甲酰胺(15ml)中的 N-(苄酯基)亚氨基二乙酸(2.7 g)中,将该混合物搅拌 16 小时。通过蒸发除去挥发性物质,将该残余物在水和二氯甲烷之间分配。用水洗涤有机萃取液、干燥(硫酸镁)并蒸发。通过硅胶层析,采用氯仿→ 10%甲醇/氯仿的梯度纯化该残余物,产生作为胶状物的 N-(苄酯基)亚氨基二-[N,N-双(2-甲氧基乙基)]乙酰胺(2.3g); NMR (d_6 -DMSO): 3.1-3.4 (由于旋转异构体有 4 个单峰, 12H), 3.5 (m, 16H), 4.2 (s, 4H), 5.05 (s, 2H), 7.3 (m, 5H).

10

(b) 将 10%钨碳(0.2g)和环己烯(2 ml)加入 N-(苄酯基)亚氨基二-[N,N-双(2-甲氧基乙基)]乙酰胺(3.5 g)的乙醇(20ml)溶液中,在氮气下将该混合物于 55 °C 搅拌 4 小时。然后将该反应混合物冷却、过滤并蒸发。边搅拌边将 N-甲基吗啉(1.4 g)、羟基苯并三唑(1.85 g)、N-叔丁酯基-L-天冬氨酸 α -苄酯(2.4 g)和盐酸 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(1.6 g)加入在二甲基甲酰胺(15ml)中的该残余物溶液中。将该混合物搅拌 16 小时,然后加入到含 2%乙酸的水溶液(50 ml)中,用乙醚(2 × 50ml)萃取。将合并的有机萃取液用碳酸氢钠溶液洗涤、干燥(硫酸镁)并蒸发,产生作为胶状物的 N²-叔丁酯基-N⁴,N⁴-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-天冬酰胺 α -苄酯(4.1 g); NMR (d_6 -DMSO): 1.4 (s, 9H), 2.6 (m, 2H), 3.2 (由于旋转异构体产生的重叠单峰, 12H), 3.4 (m, 16H), 4.0-4.4 (m, 5H), 5.1 (s, 2H), 6.8 (d, 1H), 7.4 (s, 5H).

20

(c) 采用类似于实施例 1 的(c)部分所述的步骤,但采用 N²-叔丁酯基-N⁴,N⁴-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-天冬酰胺 α -苄酯(4 g)作为原料,因此获得作为胶状物的 N²-(9-苄基甲酯基)-N⁴,N⁴-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-天冬酰胺(下文称为 FMoc-Asp(TE)-OH) (3 g); NMR ($CDCl_3$): 2.8 (m, 1H), 3.1 (m, 1H), 3.3 (由于

25

旋转异构体产生的重叠单峰, 12H), 3.6 (m, 16H), 4.2-4.8 (m, 8H), 6.4 (d, 1H), 7.4 (m, 4H), 7.6 (d, 2H), 7.8 (d, 2H).

3.2 Phv-Ala-Arg-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂ 的制备

5 (式 II: $n = 1$; X = 羧基; $R^1 = R^2 = -CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

采用类似于实施例 1.2 所述的方法, 通过用 Fmoc-Papa-OH、Fmoc-Ala-OH、(2S)-[(3R)-3-(N-9-苄基甲酯基氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸(Fmoc-IIIa-OH)、Fmoc-Thr(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(TE)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ala-OH 和 5-苯基戊酸在适当的偶联阶段去保护该树脂并且连续偶联和去保护, 进行该合成, 所有步骤都手动进行。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

RP-HPLC (30 分钟内的 10-50%乙腈的梯度, 流速为 1.0 ml/min) 保留时间为 21.88 分钟。

15 质谱, m/e (ES^+) 1395.8 (MH^+).

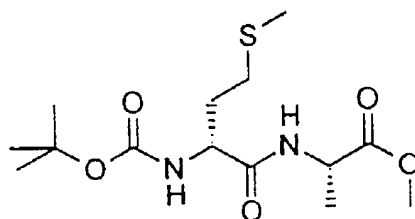
氨基酸分析给出 Asp 1.04, Thr 0.93, Ala 3.12, Arg 0.92.

通过类似于 E. Atherton 和 R.C. Sheppard 所述("Solid phase peptide synthesis: a practical approach", IRL press, 1989, 第 51 页)用于 *N*-Fmoc-L-甲硫氨酸方法的方法获得 Fmoc-Papa-OH:

20 Fmoc-Papa-OH: NMR (DMSO- d_6) 3.5 (s, 2H), 4.25 (t, 1H), 4.5 (d, 2H), 7.1 (d, 2H), 7.4 (m, 6H), 7.75 (d, 2H), 7.9 (d, 2H), 9.6 (s, 1H); 质谱 m/e (ES^-) 372.1 ($M-H$)

25 如下获得(2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-苄基甲酯基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸(Fmoc-IIIa-OH):

(I) Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe 的合成



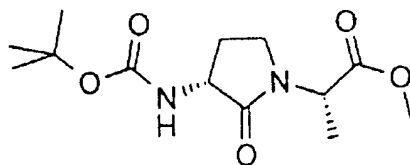
5

将 N-甲基吗啉(5.6 g)、盐酸 L-丙氨酸甲酯(3.9 g)、HOBt (4.6 g)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(5.3 g)加入在干燥 DMF (50 ml)中的 Boc-(D)-甲硫氨酸(7 g, 0.028mol)的溶液中。搅拌该混合物过夜。通过蒸发除去溶剂, 将该残余物在二氯甲烷(100ml)和 5%乙酸水溶液(50 ml)之间分配。放置时, HOBt 结晶, 并通过过滤将其除去, 分离有机层, 用碳酸氢钠水溶液洗涤、干燥(硫酸镁)并蒸发。通过在烧结玻璃漏斗中的快速色谱, 用二氯甲烷和乙醚(0-100%乙醚)的混合物洗脱, 纯化该残余物(8.5 g)。合并并蒸发含产物的部分, 产生放置时结晶的作为胶状物的 Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe (7.2 g); NMR (CDCl₃): 1.4 (d, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.95 (m, 1H), 2.1 (s, 3H), 2.1 (m, 1H), 2.6 (m, 2H), 3.75 (s, 3H) 4.3 (bs, 1H), 4.6 (m, 1H), 5.3 (m, 1H), 6.9 (bs, 1H).

15

(ii) (2S)-2-[(3R)-3-(N-[叔丁酯基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基] 丙酸甲酯的合成

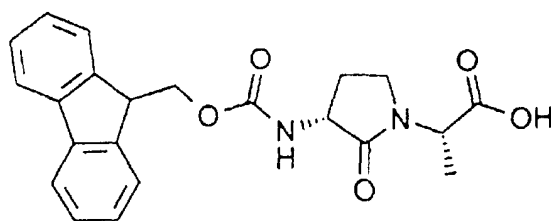
20



25

注意: 该反应必须在干燥条件下用干燥溶剂进行, 否则将发生差向异构。将甲基碘(10ml)加入含 Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe (8 g)的 DMF (20ml)和二氯甲烷(20ml)的混合物中, 将该混合物静置 16 小时, 然后蒸发至干。再加入二氯甲烷(2 × 50ml), 蒸发除去残留的甲基碘, 将

- 该残余物溶于 DMF (300ml)和二氯甲烷(300ml)的混合物中。将该混合物冷却至 $\sim 5^{\circ}\text{C}$ ，一次性加入氯化钠(0.76g 80%的矿物油中的分散体)，于该温度下将该混合物搅拌 2 小时。加入饱和氯化铵溶液(50ml)，将该混合物蒸发至干，然后在水和乙醚之间分配。乙醚萃取液用盐水洗涤，干燥并蒸发，产生的胶状物通过在烧结漏斗上进行快速色谱进行纯化(25%乙酸乙酯:己烷至 100%乙酸乙酯)，产生静置时结晶的作为胶状物的(2S)-2-[(3R)-3-(N-[叔丁酯基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸甲酯(4.2g): NMR (CDCl_3): 1.4 (s, 9H), 1.4(d, 3H), 1.8 (m, 1H), 2.6(m, 1H), 3.4(m, 2H), 3.7(m, 3H), 4.2(m, 1H), 4.9(q, 1H), 5.2(bs, 1H).
- (iii) (2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-苄基甲酯基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸(Fmoc-IIIa-OH)的合成



- 将(2S)-2-[(3R)-3-(N-[叔丁酯基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸甲酯(4g)在丙酮(60ml)、水(40ml)和浓盐酸(24ml)的混合物中回流 3 小时，然后将该混合物蒸发至干。加入水，重复蒸发。将该残余物溶于水(15ml)中，加入过量的固体碳酸氢钠。加入含 9-苄基甲基琥珀酰亚胺基碳酸酯(5.2g)的丙酮(30ml)。将该混合物搅拌 16 小时，然后蒸发除去溶剂，将该残余物在水和乙醚之间分配。分离水层，用盐酸将其 pH 调至 ~ 3 ，用二氯甲烷萃取。有机层用水洗涤，干燥(硫酸镁)并蒸发，产生白色泡沫，用乙醚研磨结晶，产生(2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-苄基甲酯基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸(4.2 g)白色固体，熔点: $191-3^{\circ}\text{C}$ (分解); NMR (CDCl_3): 1.4 (d, 3H), 2.0 (m, 1H), 2.6 (m, 1H), 3.4 (m, 2H), 4.2 (t, 1H), 4.4 (m, 3H), 4.9 (m, 1H), 5.8 (bs, 1H), 7.4 (m, 4H), 7.6 (d, 2H), 7.7 (d, 2H).

实施例 4

制备 **Phv-Ala-Ala-Ala-II-Val-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂** (SEQ ID NO: 4)

(式 II: $n = 1$; $X =$ 羧基; $R^1 = R^2 = -CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

5 采用与实施例 2 所述方法相似的方法, 在适当的偶联阶段用 Fmoc-Asp(TE)-OH 代替 Fmoc-Asp(PE)-OH, 进行该合成。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

RP-HPLC (30 分钟内的 10-50% 乙腈的梯度, 流速为 1.0ml/分钟)
保留时间 = 23.9 分钟。

10 质谱, m/e (ES+) 1274.7 (MH⁺).

氨基酸分析给出 Asp 1.03, Ala 5.94, Val 0.98.

实施例 5

制备 **Phv-Arg-Ala-Ala-IIIa-Ala-II-Ala-Papa-NH₂** (SEQ ID NO: 5)

15 (式 II: $n = 1$; $X =$ 羧基; $R^1 = R^2 = -CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$)

采用与实施例 1.2 所述方法相似的方法, 通过连续偶联和去保护 (手动)Fmoc-Papa-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asp(PE)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-IIIa-OH、Fmoc-Ala-OH (2 次)、Fmoc-Arg (Pbf)-OH 和 5-苯基戊酸, 然后从该树脂上裂解, 通过制备型 RP-HPLC 进行纯化。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

20 RP-HPLC (30 分钟内的 10-50% 乙腈的梯度, 流速为 1.0ml/分钟)
保留时间 = 20.45 分钟。

质谱, m/e (ES+) 656.4 (M+2H⁺⁺).

氨基酸分析给出 Arg 1.06, (Ala + IIIa) 4.85, Asp 1.09

25

实施例 6

制备 **Phv-Arg-Ala-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂** (SEQ ID NO: 6)

(式 II: $n = 1$; $X =$ 羧基; $R^1 = R^2 = CH_2CON[(CH_2CH_2O)_3CH_3]_2$)

6.2 Phv-Arg-Ala-Ala-II-Thr-IIIa-Ala-Papa-NH₂ 的制备

(式 II: $n = 1$; $X =$ 羧基; $R^1 = R^2 = -CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_3$)

采用类似于实施例 1.2 所述的方法, 通过连续偶联和去保护(手动)Fmoc-Papa-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-IIIa-OH、Fmoc-Thr(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(TPE)-OH、Fmoc-Ala-OH(2 次)、Fmoc-Arg(Pbf)-OH 和 5-苯基戊酸, 然后从该树脂上裂解, 通过制备型 RP-HPLC 纯化, 进行该合成。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

RP-HPLC (30 分钟内的 10-50% 乙腈的梯度, 流速为 1.0 ml/分钟) 保留时间为 23.61 分钟。

质谱, m/e (ES⁺) 1748.0 (MH⁺),

氨基酸分析给出 Arg 1.01, Ala 3.18, IIIa 1.05, Asp 0.97, Thr 0.78

实施例 7

15 制备 Phv-Ala-Ala-Ala-II-Thr-Pro-Arg-Gly-Papa-NH₂ (SEQ ID NO: 7)

(式 II: $n = 1$; $X =$ 羧基; $R^1 = R^2 = -CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

采用类似于实施例 1.2 所述的方法, 通过连续偶联和去保护(手动)Fmoc-Papa-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(TE)-OH、Fmoc-Ala-OH (3 次)和 5-苯基戊酸, 然后从该树脂上裂解, 通过制备型 RP-HPLC 纯化, 进行该合成。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

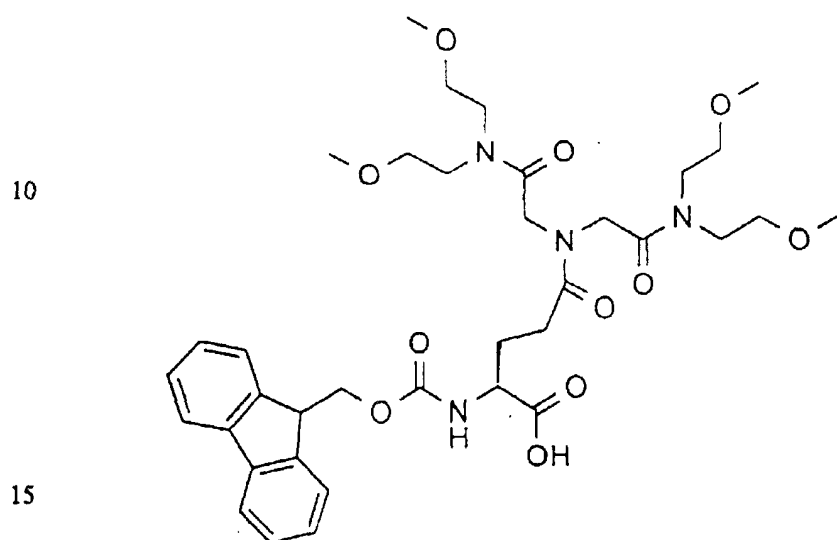
RP-HPLC (30 分钟内的 20-50% 乙腈的梯度, 流速为 1.0 ml/分钟) 保留时间为 16.07 分钟。

25 质谱, m/e (ES⁺) 1395.7 (MH⁺),

氨基酸分析给出 Arg 1.01, Ala 3.06, Asp 1.02, Thr 0.92, Pro 0.92, Gly 1.05

实施例 8**制备 Phv-II-Arg-Ala-His-Val-IIIa-Ala-Papa-NH₂ (SEQ ID NO: 8)**(式 II: $n = 2$; $X =$ 羰基; $R^1 = R^2 = -CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

- 5 8.1 N²-(9-苄基甲酯基)-N⁴,N⁴-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-谷氨酰胺的制备



采用类似于实施例 3.1 中所述的步骤, 制备 Fmoc-Asp(TE)-OH, 但在部分(b)中用按比例量的 N-叔丁酯基-L-谷氨酸 α -苄酯代替 N-叔丁酯基-L-天冬氨酸 α -苄酯, 由此获得作为油的 N²-(9-苄基甲酯基)-N⁴,N⁴-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-谷氨酰胺(下文称为 Fmoc-Glu(TE)-OH); NMR (CDCl₃): 2.0-2.4 (m, 4H), 3.3 (m, 12H), 3.5 (m, 16H), 4.2-4.6 (m, 8H), 7.4 (m, 4H), 7.6 (m, 2H), 7.8 (d, 2H).

20

进行步骤(b)时获得以下中间产物:

作为胶状物的 N²-叔丁酯基-N⁴,N⁴-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基]-L-谷氨酰胺 α -苄酯; NMR (CDCl₃): 1.4 (s, 9H), 2.0(m, 1H), 2.2 (m, 1H), 2.4 (m, 2H), 3.3 (s, 12H), 3.5 (m, 16H), 4.1-4.5 (m, 5H), 5.2 (s, 2H), 7.3 (s, 5H).

25

8.2 Phv-II-Arg-Ala-His-Val-IIIa-Ala-Papa-NH₂ 的制备

(式 II: $n = 2$; $X =$ 羰基; $R^1 = R^2 = -CH_2CON(CH_2CH_2OCH_3)_2$)

采用类似于实施例 1.2 所述的方法, 通过连续偶联和去保护(手动)Fmoc-Papa-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-IIIa-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Glu(TE)-OH 和 5-苯基戊酸, 然后从该树脂上裂解, 通过制备型 RP-HPLC 纯化, 进行该合成。该产物通过 HPLC、质谱和氨基酸分析鉴定如下。

RP-HPLC (30 分钟内的 10-50% 乙腈的梯度, 流速为 1.0 ml/分钟) 保留时间= 22.23 分钟。

质谱, m/e (ES⁺) 1472.2 (MH⁺)。

氨基酸分析给出 Arg 0.95, Ala 2.17, His 0.98, Glu 0.99, Val 0.92, IIIa 0.96

15 实施例 9

对于治疗和预防使用, 将常规药用组合物形式的本发明化合物给与诸如人类的温血动物, 其典型实例包括以下内容:

注射液

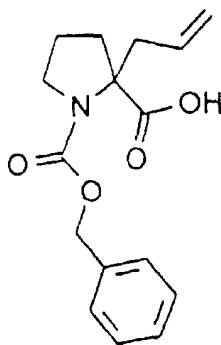
20 将 0.01-100 mg 活性组分溶于多至 2 ml 的含水注射溶媒中, 使活性组分的浓度为 0.01-100 mg/ml。所述含水注射溶媒用药学上可接受的缓冲液(例如磷酸盐或乙酸盐)缓冲至 pH 5-8, 该溶液含有加入以达到等渗性的药学上可接受的张力调节剂(例如氯化钠或葡萄糖)。该溶媒也可任选地含有其它药学上可接受的赋形剂, 诸如增溶剂(例如 DMSO、乙醇、丙二醇或聚乙二醇)、防腐剂和抗氧化剂。所述活性组分通常可以是上文描述的实例, 可以便利地以药学上可接受的盐形式存在。

注释:

(1) 对于含式 IV 基团的肽而言, 可以如下获得(S)-2-[1-(9-芴基甲酯基)-6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基]丙酸(Fmoc-IV-OH):

(i) (RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)脯氨酸的合成

5



10

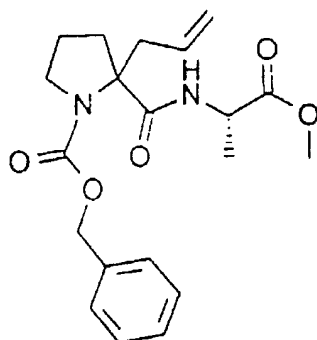
在氮气下, 于-78 °C 将含 N-苄酯基脯氨酸甲酯(13g)的 THF (20ml) 滴加到二异丙基氯化锂(27.5 ml, 2M 在己烷/THF 中的 THF(100ml)的溶液中)。将该混合物搅拌 30 分钟, 然后滴加烯丙基碘(5.5ml), 将该化合物再搅拌 30 分钟, 然后让其温热至周围温度。然后将该混合物加入到氯化铵水溶液(200ml)中, 用乙醚(2 × 200ml)萃取。蒸发乙醚层, 采用己烷 → 20% 乙酸乙酯:己烷的梯度, 通过硅胶层析纯化该残余物。将合适的部分蒸发至干, 产生作为油的(RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)脯氨酸甲酯(9g)。

15

20 将 8.5g 该物质溶于甲醇(40ml), 加入水(20ml)中的氢氧化钠(4.5g), 将该化合物回流 60 分钟。然后用浓盐酸将该混合物的 pH 调至 7, 通过蒸发除去甲醇。将该混合物的 pH 调至 3, 用乙醚(2 × 50ml)萃取该混合物。蒸发合并的乙醚萃取液, 产生作为胶状物的(RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)脯氨酸; NMR (d₆-DMSO (373K)): 1.9 (m, 2H), 2.1 (m, 2H), 2.6 (q, 1H), 2.9 (q, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 5.0 (m, 4H), 5.75 (m, 1H), 7.3 (m, 5H)。

25

(ii) [(RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)]脯氨酸-(S)-丙氨酸甲酯的合成



5

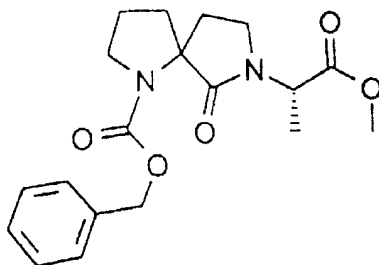
将 HOBt (7.7g)、N-甲基吗啉(6.6g)、盐酸 L-丙氨酸甲酯(4.5g)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺(5.7g)加入含(RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)脯氨酸(6.5g)的 DMF (30ml)中, 将该混合物搅拌 18 小时, 然后蒸发。将该残余物在乙醚和水之间分配, 过滤除去 HOBt, 并分离有机层。蒸发有机层, 采用己烷中 20% 乙酸乙酯增至己烷中 50% 乙酸乙酯的梯度, 通过硅胶层析纯化该残余物。合并适当的部分并蒸发至干, 产生[(RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)]脯氨酸-(S)-丙氨酸甲酯(7g);

NMR (d₆-DMSO (373K)): 由于非对映异构体的混合物使得峰有某些加倍, 1.25 和 1.3 (2d, 3H), 1.75, (m, 2H), 2.2 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.9 (m, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.65 (2s, 3H), 3.7 (m, 1H), 4.3 (2q, 1H), 5.0 (m, 4H), 5.7 (m, 1H), 7.3 (m, 5H), 7.4 和 7.5 (bs, 1H).

15

(iii) (S)-2-(1-苄酯基-6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基)丙酸甲酯的合成。(CbZ-IV-OMe)

20



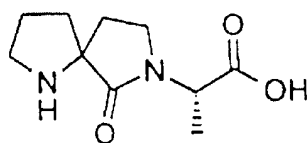
25

将四氧化钨(1.5ml 4%的水溶液)加入含[(RS)-2-烯丙基-N-(苄酯基)]脯氨酸-(S)-丙氨酸甲酯(1.45g)的乙醇(30ml)和水(20ml)的混合物

中。在氩气下将该混合物搅拌 10 分钟，然后分次加入高碘酸钠 (2.45g)。将该混合物搅拌 2 小时，然后加入水(100ml)，用乙酸乙酯(2 × 70ml)萃取该混合物。干燥并蒸发合并的萃取液，产生 1.4g 胶状物。将该胶状物溶于二氯甲烷(30ml)和三乙基硅烷(0.65g)中，然后滴加三
 5 氯乙酸(4g)。将该混合物搅拌 3 小时，蒸发，将该残余物在碳酸氢钠溶液和乙醚之间分配。分离乙醚萃取液，将其蒸发至干。采用己烷中 25%乙酸乙酯增至 100%乙酸乙酯的梯度，通过硅胶层析纯化该残余物。合并适当的部分并蒸发至干，产生(S)-2-(1-苄酯基-6-氧代-1,7-二
 10 氮杂螺[4.4]壬-7-基)丙酸甲酯(0.8g); NMR (d_6 -DMSO(373K)): 由于非对映异构体的混合物使得峰有某些加倍, 1.25 和 1.35 (2d, 3H), 1.95 (m, 6H), 3.1-3.5 (m, 4H), 3.6 和 3.65 (2s, 3H), 4.5 和 4.65 (2q, 1H), 5.05 (m, 2H), 7.25 (m, 5H)。

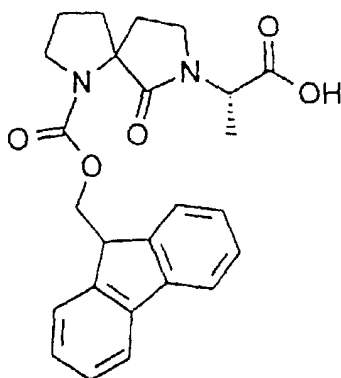
(iv) (S)-2-(6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基)丙酸(H-IV-OH)的合成

15



将碳酸钾(2.5g)加入含(S)-2-(1-苄酯基-6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基)丙酸甲酯(3.3g)的甲醇(40ml)和水(40ml)的混合物中，将该混合
 20 物于周围温度下搅拌 10 小时。用浓盐酸将 pH 调至 ~ 5，将该混合物蒸发至干。将该残余物溶于水(40ml)中，用浓盐酸将 pH 调至 3。然后用二氯甲烷(2 × 50ml)萃取该混合物。将合并的萃取液干燥(硫酸镁)并蒸发，产生泡沫物(2.8g)。将该泡沫物溶于甲醇(20ml)中，加入环己烯(0.7g)，然后加入 10% Pd/C (0.5g)。该混合物回流 2 小时，冷却，过
 25 滤，将滤液蒸发，产生作为泡沫物的(S)-2-(6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基)丙酸(1.9g); NMR (d_6 -DMSO): 由于非对映异构体的混合物使得峰有某些加倍, 1.25 和 1.3 (2s, 3H), 1.8 (m, 4H), 2.0 (m, 2H), 3.0 (m, 2H), 3.3 (m, 2H), 4.5 (m, 1H)。

(v) (S)-2-[1-(9-苄基甲酯基)-6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基]丙酸 (Fmoc-IV-OH)的合成



将过量的固体碳酸氢钠加入含(S)-2-(6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基]丙酸(0.42g)的水(2ml)中, 然后加入含 9-苄基甲基琥珀酰亚胺基碳酸酯(0.7g)的丙酮(3ml)。将该混合物搅拌 18 小时。然后将该混合物加入水(10ml)中, 用乙醚(10ml)萃取, 并分离水层。(弃去乙醚萃取液)。用浓盐酸将水层的 pH 调至 ~ 3, 然后用二氯甲烷(2 × 10ml)将其萃取。分离合并的萃取液, 干燥(硫酸镁)并蒸发, 产生作为白色泡沫物的(S)-2-[1-(9-苄基甲酯基)-6-氧代-1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基]丙酸(0.62g); NMR (d_6 -DMSO (373K)): 由于非对映异构体的混合物使得峰有某些加倍, 1.3 (2d, 3H), 1.6-2.0 (m, 6H), 3.05 (m, 1H), 3.2-3.45 (m, 3H), 4.2-4.4 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 6.2 (s, 2H), 7.35 (m, 4H), 7.8 (m, 4H)。

(2) 对于含式 Va 基团的化合物而言, 可以如下获得(3S)-3-(9-苄基甲酯基氨基)-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸(Fmoc-Va-OH):

(i) 将(3S)-3-氨基-ε-己内酰胺(25g)和三乙胺(19.7g)溶于 THF (200ml)中, 并冷却至 5 °C。在 30 分钟内滴加含氯甲酸苄酯(33g)的 THF (50ml)。将该反应混合物于周围温度下搅拌 18 小时, 然后倒入水(500ml)

中。该反应混合物用乙酸乙酯(3 × 100ml)萃取。将合并的萃取液干燥(硫酸镁)并蒸发。用乙醚(40ml)研磨该残余物, 将其过滤, 产生作为白色固体的 20g 的(S)-3-苄酯基氨基-ε-己内酰胺; NMR (d₆-DMSO): 1.1-2 (m, 6H), 2.9-3.2 (m, 2H), 4.1-4.25 (m, 1H), 5.0 (s, 2H), 7.25-7.4 (m, 5H), 7.75 (t, 1H).

(ii) 在氩气流下, 将氢氧化钠(2g)在 DMF(100ml)中的混合物冷却至 0 °C。在 20 分钟内分次加入(3S)-3-苄酯基氨基-ε-己内酰胺(10g), 其加入速率为使该反应温度保持低于 5 °C。于 0 °C 继续搅拌 40 分钟, 然后在 10 分钟内滴加溴乙酸叔丁酯(8.2g)。将该反应混合物于 0 °C 搅拌 1 小时, 于周围温度下再搅拌 18 小时。将该反应混合物倒入水(600ml)中, 用乙酸乙酯(6 × 75ml)萃取。合并的萃取液用水(3 × 100ml)洗涤, 干燥(硫酸镁)并蒸发。通过硅胶 MPLC, 用 20% 乙酸乙酯/二氯甲烷洗脱, 纯化该残余物, 产生作为透明油的(3S)-3-苄酯基氨基-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸叔丁酯(15g); NMR (d₆-DMSO): 1.4 (s, 9H), 1.5-1.9 (m, 6H), 3.5-3.65 (m, 1H), 3.9-4.15 (m, 2H), 4.4 (m, 1H), 5.0 (s, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.35 (m, 5H); 质谱, m/e (ES+) 377 (MH⁺).

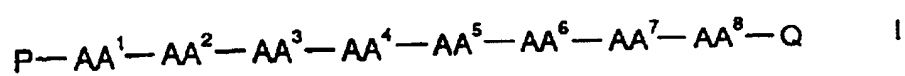
(iii) 将(3S)-3-苄酯基氨基-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸叔丁酯(15g)溶于乙醇(150ml)中, 用氩气清洗。加入 10% 钨碳(1.5g), 排空该烧瓶, 由气囊将其充满氢气。该反应混合物于周围温度下搅拌 4 小时。然后用氩气清洗该反应混合物, 并通过硅藻土过滤。蒸发该滤液, 产生作为粘性油的(3S)-3-氨基-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸叔丁酯(7.7g); NMR (CDCl₃): 1.45 (s, 9H), 1.55-2.05 (m, 6H), 3.2-3.3 (d, 1H), 3.55-3.75 (两个重叠双峰, 2H), 3.95-4.25 (q, 2H); 质谱, m/e (ES+) 243.2 (MH⁺).

(iv) 将含(3S)-3-氨基-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸叔丁酯(7g)的 THF (50me)加入含碳酸钠(3g)的水(30ml)溶液中。然后在 30 分钟内, 边搅

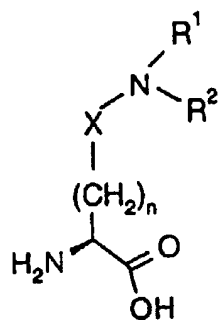
拌边滴加含 N-(9-苄基甲酯基氨基)琥珀酰亚胺(9.7g)的 THF (100ml)的
溶液中。于周围温度下将该反应混合物再搅拌 30 分钟。加入水
(200ml), 用乙酸乙酯(3 × 100ml)萃取该反应混合物。将合并的萃取液
用盐水(100ml)洗涤, 干燥(硫酸镁)并蒸发。通过硅胶 MPLC, 最初用
5 二氯甲烷, 然后逐渐增至 15%乙酸乙酯/二氯甲烷进行洗脱, 来纯化该
残余物, 产生作为透明油的(3S)-3-(9-苄基甲酯基氨基)-2-氧代全氢化吡
啶因-1-乙酸叔丁酯(10.9g); NMR (d_6 -DMSO): 1.45 (s, 9H), 1.5-2.15
(m, 6H), 3.1-3.25 (m, 1H), 3.6-3.75 (m, 1H), 4.0-4.5 (m, 5H), 6.25 (d, 1H),
7.25-7.45 (m, 4H), 7.6 (d, 2H), 7.75 (d, 2H); 质谱, m/e (ES⁺) 465.2
10 (MH⁺).

(v) 将(3S)-3-(9-苄基甲酯基氨基)-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸叔丁
酯(10.5g)溶于二氯甲烷(30ml)中, 加入三氟乙酸(20ml)。将该反应混合
物于周围温度下搅拌 18 小时。加入二氯甲烷(100ml)用水(4 × 100ml)
15 洗涤该反应混合物, 将其干燥(硫酸镁)并蒸发。通过硅胶 MPLC, 用
25%乙酸乙酯/二氯甲烷洗脱, 然后用乙酸乙酯洗脱纯化残留物, 产生
油。用异己烷研磨, 产生白色泡沫物, 将其过滤并于 60 °C 真空干燥,
产生(3S)-3-(9-苄基甲酯基氨基)-2-氧代全氢化吡啶因-1-乙酸(5.5g);
NMR (d_6 -DMSO): 1.4-1.95 (m, 1H), 3.15-3.4 (m, 1H), 3.55-3.7 (m, 1H),
20 3.9-4.2 (m, 2H), 4.25-4.45 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.25-7.45 (m, 4H), 7.75
(m, 2H), 7.85 (d, 2H); 质谱, m/e (ES⁻) 407.1 (M-H⁻).

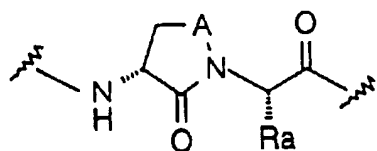
化学式



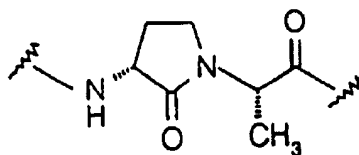
5



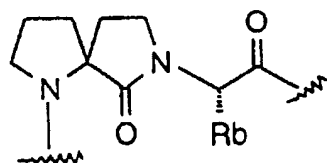
II



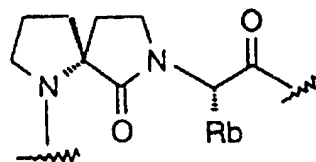
III



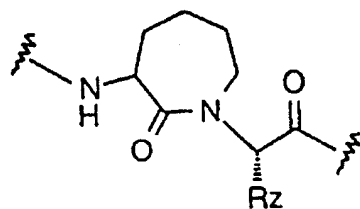
IIIa



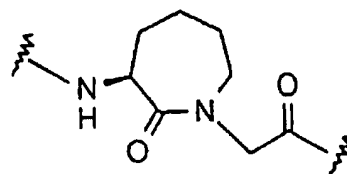
IV



IVa

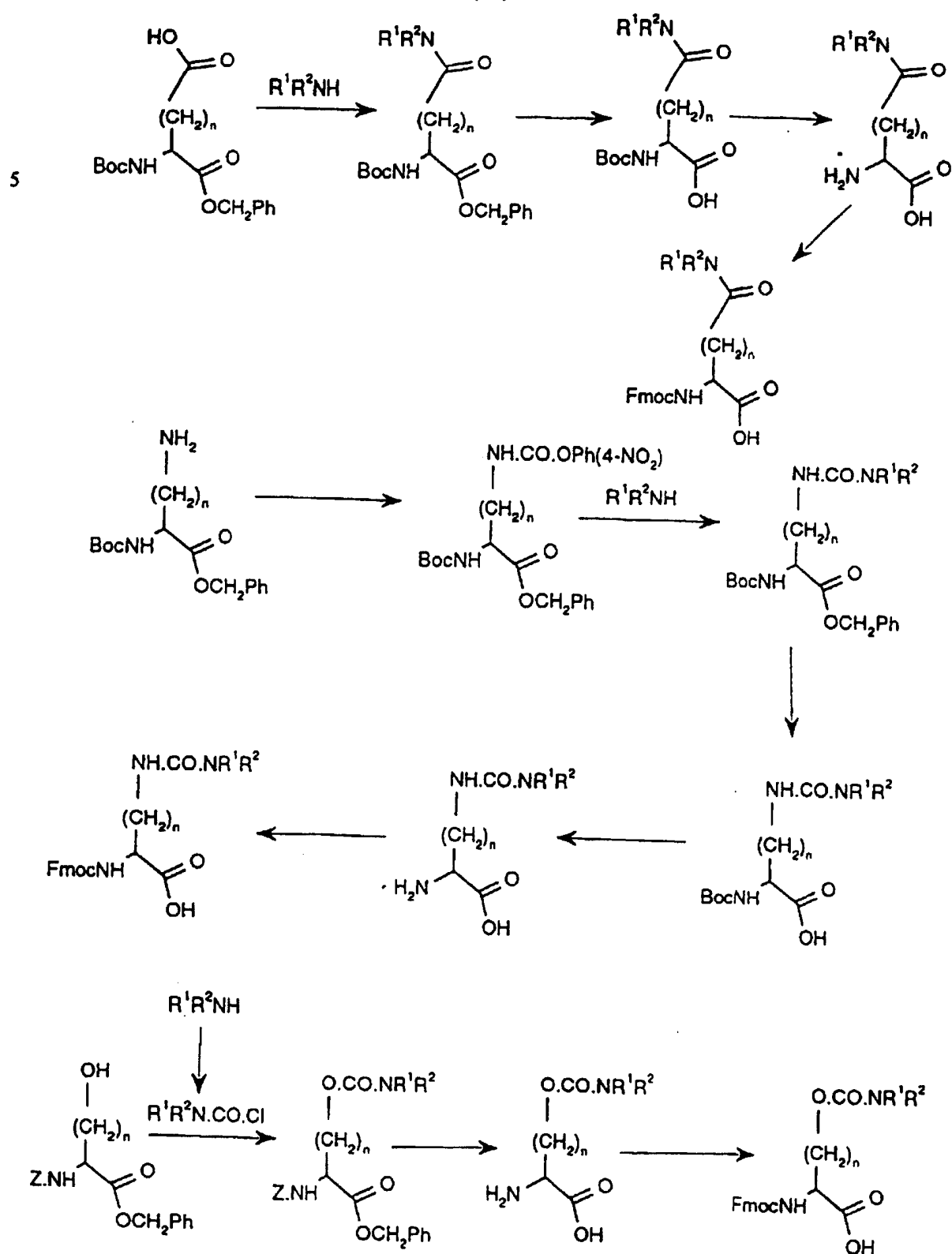


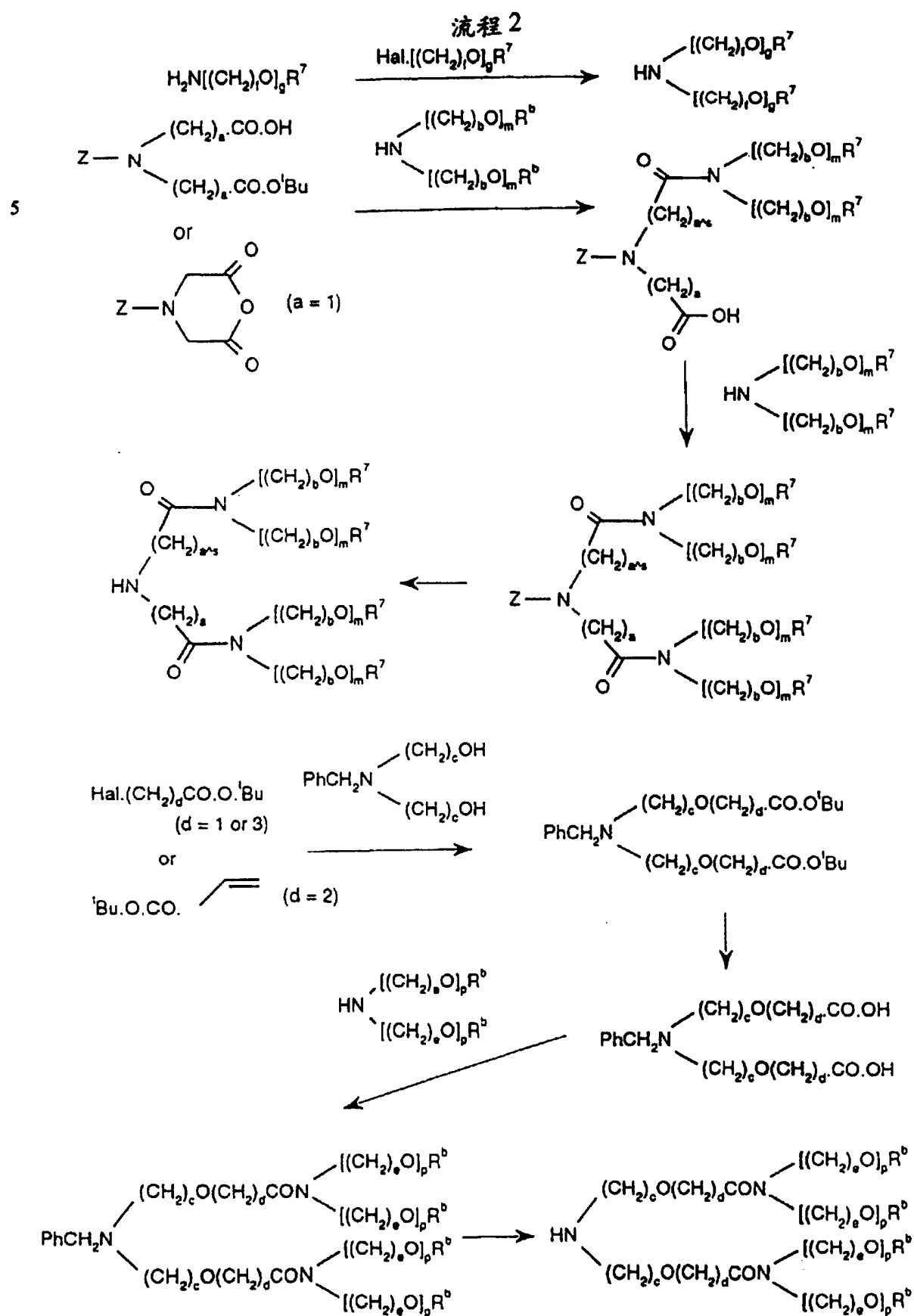
V



Va

流程 1





序列表

(1) 一般资料

(i) 申请人:

- (A) 姓名: ZENECA LIMITED
- (B) 街道: 15 STANHOPE GATE
- (C) 城市: 伦敦
- (E) 国家: 英国
- (F) 邮编(ZIP): W1Y 6LN
- (G) 电话: 0171304 5000
- (H) 传真: 0171304 5151
- (I) 电传: 0171834 2042

5

(ii) 发明名称: 肽衍生物

(iii) 序列数: 8

(iv) 计算机可读形式

- (A) 媒体类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本#1.30 (EPO)

(vi) 在先申请数据

- (A) 申请号: GB 9611881.5
- (B) 提交日期: 1996 年 6 月 7 日

(vi) 在先申请数据:

(A) 申请号: GB 9622890.3

(B) 提交日期: 1996 年 11 月 2 日

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-Ala”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “[N4,N4-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)]-Asn”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 8

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “Ala-哌啶-4-甲酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 1:

Xaa Ala Ala Xaa Val Ala Ala Xaa

1 5

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-[N4,N4-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙基])-Asn”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 8

(D) 其它信息: /产物 = “其它”
/注释 = “Ala-哌啶-4-甲酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 2:

Xaa Ala Ala Lys Val Ala Ala Xaa

1

5

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-Ala”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “(N4,N4-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基])-Asn”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 3:

Xaa Arg Ala Xaa Thr Xaa

1

5

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-Ala”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “(N4,N4-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基])-Asn”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 8

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “Ala-哌啶-4-甲酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 4:

Xaa Ala Ala Xaa Val Ala Ala Xaa

1

5

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”
/注释 = “5-苯基戊酰基-Arg”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物 = “其它”
/注释 = “[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)
丙酰基]-Ala ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 5

(D) 其它信息: /产物 = “其它”
/注释 = “[N4,N4-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙基)]-Asn ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “Ala-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 5:

Xaa Ala Ala Xaa Xaa Xaa

1 5

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-Arg”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “(N4,N4-双[N,N-双(2-[2-(2-甲氧基乙氧

基)乙氧基]乙基)氨基甲酰基甲基])-Asn ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)

丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 6:

Xaa Ala Ala Xaa Thr Xaa

1 5

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-Ala”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “(N4,N4-双[N,N-双(2-甲氧基乙基)氨基甲酰基甲基])-Asn”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 8

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “Gly-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 7:

Xaa Ala Ala Xaa Thr Pro Arg Xaa

1

5

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “5-苯基戊酰基-(N4,N4-双[N,N-双(2-甲
氧基乙基)氨基甲酰基甲基])-Gln”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物 = “其它”

/注释 = “[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)
丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 8:

Xaa Arg Ala His Val Xaa

1

5