

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 7/23
A61K 38/09

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199752.7

[43]公开日 1999年12月8日

[11]公开号 CN 1237979A

[22]申请日 97.11.12 [21]申请号 97199752.7

[30]优先权

[32]96.11.14 [33]EP [31]96402441.8

[86]国际申请 PCT/EP97/06322 97.11.12

[87]国际公布 WO98/21229 英 98.5.22

[85]进入国家阶段日期 99.5.14

[71]申请人 塞拉麦克斯实验室公司

地址 摩纳哥摩纳哥

[72]发明人 R·德兰索恩

J·帕里斯

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 周中琦

权利要求书 5 页 说明书 41 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 构象限定的 LH-RH 类似物及其用途和
含有它们的药物组合物

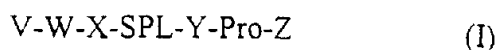
[57]摘要

本发明涉及对 LH-RH 受体有高亲和性的 LH-RH 肽类似物,具有结构式:V-W-X-SPL-Y-Pro-Z,其中 V,W,X,SPL,Y 和 Z 如说明书中所定义。本发明也涉及所述肽类似物的用途和含有它们的药物组合物。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 具结构式 I (SEQ ID No 1) 的肽:



其中:

*V 是肽 A_1A_2 , 其中:

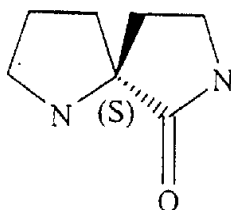
- A_1 是 pGlu, AcSar 或芳香 D-氨基酸, 并且
- A_2 是直接的键, His, DPhe, DpFPhe 或 DpClPhe;

*W 是芳香 L-或 D-氨基酸;

*X 是二肽 A_3A_4 , 其中:

- A_3 是 Ala, Thr, Ser, DSer, Ser(OBzl) 或 MeSer, 并且
- A_4 是 Tyr, Phe, cPzACAAla, L-或 D-PicLys, L-或 D-NicLys, 或 L-或 D-IprLys;

*SPL 是具以下结构式的螺旋内酰胺;

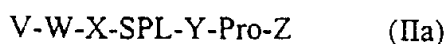


*Y 是二肽 A_5A_6 , 其中:

- A_5 是带有 $(C_1 - C_8)$ 烷基或 $(C_3 - C_6)$ 环烷基侧链的氨基酸, 并且
- A_6 是 L-或 D- (Arg, HArg, Lys, HLys, Orn, Cit, HCit 或 Aph), 其中 L-或 D- (Arg 和 HArg) 可以被一个或二个 $(C_1 - C_4)$ 烷基取代, 并且 L-或 D- (Lys, HLys, Orn 和 Aph) 可以被异丙基, 烟酰基或甲基吡啶基取代; 并且

*Z 是 $GlyNH_2$, $DAIaNH_2$, $AzaGlyNH_2$ 或 $-NHR_1$, 其中 R_1 是选择性地由羟基或几个氟原子取代的 $(C_1 - C_4)$ 烷基, $(C_1 - C_3)$ 环烷基或选自吗啉基, 吡咯烷基和哌啶基的杂环基, 以及它们药学上可接受的盐类。

2. 根据权利要求 1 所述的肽, 具结构式 IIa (SEQ ID No 2):



其中:

*V 是二肽 A_1A_2 , 其中

- A_1 是 pGlu 或 AcSar, 并且

- A_2 是 His;

*W 是芳香 L-氨基酸;

*X 是二肽 A_3A_4 , 其中:

- A_3 如权利要求 1 对 (I) 所述, 并且

- A_4 是 Tyr 或 Phe;

*SPL 如权利要求 1 对 (I) 所述;

*Y 是二肽 A_5A_6 , 其中

- A_5 如权利要求 1 对 (I) 所述, 并且

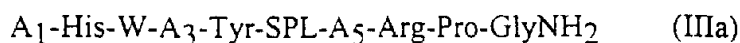
- A_6 是 Arg, Lys, HArg, HLys, Orn, Cit 或 HCit; 并且

*Z 是 $GlyNH_2$, AzaGlyNH₂ 或 $-NHR_1$, 其中 R_1 如权利要求 1 对 (I)

所述,

及其它们药学可接受的盐类。

3. 根据权利要求 2 所述的肽, 具结构式 IIIa (SEQ ID No 4):



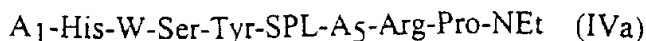
其中 A_1 , W, A_3 和 A_5 如权利要求 2 对 (IIa) 所述,

以及其药学上可接受的盐类。

4. 根据权利要求 3 所述的具结构式 (IIIa) 的肽及其药学可接受的盐类, 其中 A_1 是 pGlu, A_3 是 Ser.

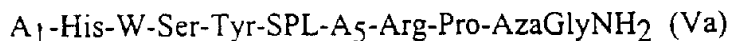
5. 根据权利要求 3 所述的具结构式 (IIIa) 的肽及其药学可接受的盐类, 其中 A_1 是 pGlu, W 是 Trp.

6. 根据权利要求 2 所述的肽, 具结构式 IVa (SEQ ID No 5):



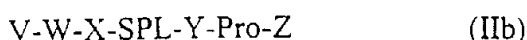
其中 A₁, W 和 A₅ 如权利要求 2 对 (IIa) 所述,
 及其药学上可接受的盐类。

7. 根据权利要求 2 所述的肽, 具结构式 Va (SEQ ID No 6):



其中 A₁, W 和 A₅ 如权利要求 2 对 (IIa) 所述,
 及其药学上可接受的盐类。

8. 根据权利要求 1 所述的肽, 具结构式 IIb (SEQ ID No 3):



*V 是二肽 A₁A₂, 其中

- A₁ 是 pGlu 或芳香 D-氨基酸; 并且

- A₂ 是直接的键, DPhe, DpFPhe 或 DpClPhe;

*W 是 Trp, DTrp, DPhe, DpClPhe, DNal, DPal 或 DBal;

*X 是二肽 A₃A₄, 其中

- A₃ 是 Ser, 并且

- A₄ 是 Tyr, Phe, cPzACAla, L- 或 D-PicLys, L- 或 D-NicLys 或 L- 或 D-IprLys;

*SPL 如权利要求 1 对 (I) 所述;

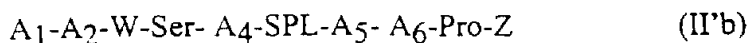
*Y 是二肽 A₅A₆, 其中

- A₅ 和 A₆ 如权利要求 1 对 (I) 所述; 并且

*Z 是 GlyNH₂ 或 DA1aNH₂,

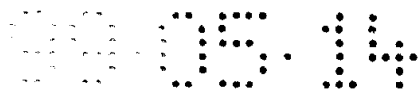
及其药学上可接受的盐类。

9. 根据权利要求 8 所述的肽, 具结构式 II'b (SEQ ID No 8):



其中 A₁, A₂, W, A₄, A₅, A₆ 和 Z 如权利要求 8 对 (IIb) 所述,
 及其药学上可接受的盐类。

10. 根据权利要求 8 所述的肽, 具结构式 IIIb (SEQ ID No 7):



A_1 - A_2 -W-Ser-Tyr-SPL- A_5 -Arg-Pro-Z

(IIIb)

其中 A_1 , A_2 , A_5 , W 和 Z 如权利要求 8 对 (IIb) 所述, 以及其药学上可接受的盐类。

11. 根据权利要求 9 所述的具结构式 (II'b) 的肽及其药学可接受的盐类, 其中 A_1 是 AcDNa1, A_2 是 DpClPhe, A_5 是 Npg, 并且 Z 是 DA1aNH₂。

12. 根据权利要求 10 所述的具结构式 (IIIb) 的肽及其药学可接受的盐类, 其中 A_1 是 AcDNa1, A_2 是 DpClPhe, 并且 Z 是 DA1aNH₂。

13. 一种药物组合物, 含有有效量的根据权利要求 1-12 中的任一项所述的肽或其药学上可接受的盐。

14. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 用于胃肠外给药。

15. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备治疗不育、性腺功能减退或性腺功能亢进情况的药物, 其中所述肽单独或与性类固醇或促性腺激素结合使用。

16. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备避孕药剂, 其中所述肽单独或与性类固醇或促性腺激素结合使用。

17. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备治疗或预防前列腺癌或前列腺肥大的药物, 其中所述肽单独或与男性激素作用抑制剂、5 α -还原酶抑制剂或 C₁₇₋₂₀ 裂解酶抑制剂结合使用。

18. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备治疗或治疗乳腺癌的药物, 其中所述肽单独或与抗雌激素物质、芳香酶抑制剂或 C₁₇₋₂₀ 裂解酶抑制剂结合使用。

19. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备治疗或预防性激素相关的恶性和良性肿瘤的药物, 其中所述肽单独或与激素的或抗肿瘤的药剂结合使用。

20. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备治疗非性激素依赖但对 LH-RH 敏感的良性或恶性肿瘤的药物, 其中

所述肽单独或与抗肿瘤剂结合使用。

21. 根据权利要求 1-12 中的任意一项所述的肽的用途, 用于制备治疗或预防良性或恶性淋巴增生紊乱的药物, 其中所述肽单独或与免疫调节剂或免疫抑制剂结合使用。

22. 根据权利要求 2-7 中的任意一项所述的具结构式 (IIa) 的肽的用途, 用于制备具有 LH-RH 兴奋剂活性的药物。

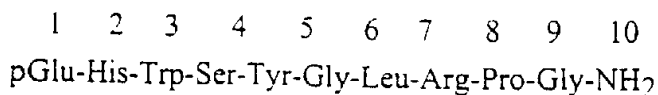
23. 根据权利要求 8-12 中的任意一项所述的具结构式 (IIb) 的肽的用途, 用于制备具有 LH-RH 拮抗剂活性的药物。

说 明 书

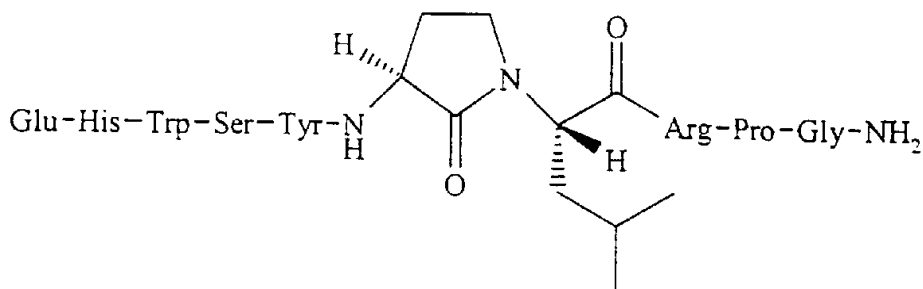
构象限定的 LH - RH 类似物及其用途和
含有它们的药物组合物

本发明涉及 LH - RH 肽类似物及其用途和含有它们的药物组合物。

LH - RH (促黄体生成激素释放激素) 是在下丘脑合成的神经介质激素, 它刺激促性腺激素, LH (黄体生成激素) 和 FSH (促卵泡激素) 的分泌, 继而调节雌性中卵巢和雄性中睾丸的内分泌和外分泌功能。它具有如下结构式:

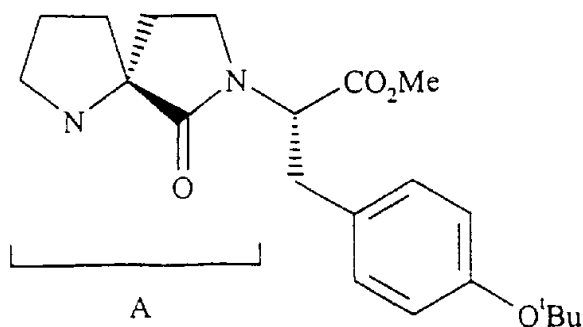


Freidinger 等 (科学, 1980, 210, 656 - 658) 报道了含有 γ - 内酰胺具有结构式:

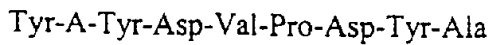


的 LH - RH 类似物在经雌二醇和孕酮预处理的卵巢切除的成年大鼠中进行体内测试时与 LH - RH 相比表现 2.4 倍的诱导 LH 释放的效力。

Hinds 等 (J. Chem. Soc., Chem. Comm, 1988, 1447 - 1449) 描述了具有结构式:

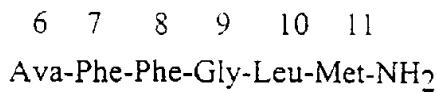


的螺旋内酰胺合成及其在通过固相法制备具有结构式:

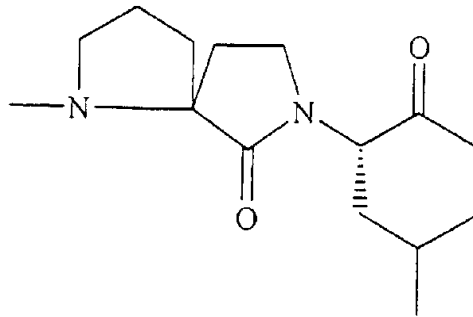


的九肽的构象锁定的类似物中的用途。

Ward 等[J. Med. Chem., 1990, 33(7), 1848 - 1851]描述了通过具结构式:



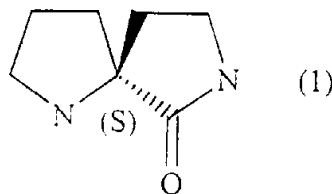
的含有螺旋内酰胺的基团替换具有结构式:



的物质 P 的六肽类似物 [Ava⁶] - SP(6 - 11) 的二肽残基 - Gly - Leu -。

含有 (R) 螺旋内酰胺的六肽类似物被描述为豚鼠回肠纵平滑肌 (GPI) 中 NK-1 受体上的完全兴奋剂, 而含有 (S) 螺旋内酰胺的六肽类似物在 GPI 中不表现兴奋剂活性。

已发现, 在 LH-RH 及其类似物的肽链的第 6 位导入如下 S 构型的螺旋内酰胺:



产生表面对 LH-RH 受体有高亲和性的化合物。

更具体地, 本发明提供对 LH-RH 受体有强亲和性的化合物。

因此, 根据本发明的一个方面, 提供具结构式 I (SEQ ID No 1) 的肽:

V-W-X-SPL-Y-Pro-Z (I)

其中:

*V 是肽 A_1A_2 , 其中:

- A_1 是 pGlu, AcSar 或芳香 D-氨基酸如 DTrp, DPhe, DpClPhe, DNal, AcDNal 或 DQal, 并且

- A_2 是直接的键, His, DPhe, DpFPhe 或 DpClPhe;

*W 是芳香 L-或 D-氨基酸如 Trp, DTrp, Nal, DNal, INal, Phe, DPhe, pClPhe, DpClPhe, Pal, DPal, Bal 或 DBal;

*X 是二肽 A_3A_4 , 其中:

- A_3 是 Ala, Thr, Ser, DSer, Ser(OBzl) 或 MeSer 并且

- A_4 是 Tyr, Phe, cPzACAla, L-或 D-PicLys, L-或 D-NicLys, 或 L-或 D-IprLys;

*SPL 是如上所述的螺旋内酰胺(1);

*Y 是二肽 A_5A_6 , 其中:

- A_5 是带有 ($C_1 - C_8$) 烷基或 ($C_3 - C_6$) 环烷基侧链的氨基酸如 Ala, Abu, Aib, Val, Nva, Leu, Ile, Tle, Nle, Hol, Npg, Cpa, Cba, Cpa 或 Cha, 并且

- A_6 是 L-或 D- (Arg, HArg, Lys, HLys, Orn, Cit, HCit 或 Aph), 其中 L-或 D- (Arg 和 HArg) 可以被一个或二个 ($C_1 - C_4$) 烷基取代, 并且 L-或 D- (Lys, HLys, Orn 和 Aph) 可以被异丙基, 烟酰基或甲基吡啶基取代; 并且

*Z 是 GlyNH₂, DAlaNH₂, AzaGlyNH₂ 或 -NHR₁, 其中 R₁ 是选择性地由羟基或几个氟原子取代的 ($C_1 - C_4$) 烷基, ($C_1 - C_3$) 环烷基或选自吗啉基、吡咯烷基和吡啶基的杂环基, 以及它们药学上可接受的盐类。

在本说明书中, 术语“($C_1 - C_4$) 烷基”代表甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

术语“($C_1 - C_8$) 烷基”代表甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、

异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、仲戊基、叔戊基、丁基、庚基和辛基；

术语“(C₃-C₆)环烷基”代表环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

在本说明书和权利要求书中，使用下列缩写：

Abu: 2-氨基丁酸

AcDNaI: 乙酰基 D-3-(2-萘基)丙氨酸

AcSar: 乙酰基肌氨酸

Aib: 2-氨基异丁酸

Ala: 丙氨酸

Aph: P-氨基苯丙氨酸

Arg: 精氨酸

AzaGlyNH₂: 氮杂甘氨酸

Bal: 苯并噻吩基丙氨酸

Cba: 环丁基丙氨酸

Cha: 环己基丙氨酸

Cit: 瓜氨酸

CPa: 环丙基丙氨酸

Cpa: 环戊基丙氨酸

cPzACA1a: 顺-3-(4-吡嗪基羧基氨基环己基)丙氨酸

DAlaNH₂: D-丙氨酸

DBal: D-苯并噻吩基丙氨酸

DNal: D-3-(2-萘基)丙氨酸

DpClPhe: D-3-(4-氯苯基)丙氨酸

DpFPhe: D-3-(4-氟苯基)丙氨酸

DPal: D-3-(3-吡啶基)丙氨酸

DPhe: D-苯丙氨酸

DQal: D-3-(3-喹啉基)丙氨酸

DSer: D-丝氨酸

DTrp: D-色氨酸



Gly: 甘氨酸
GlyNH₂: 甘氨酸胺
HArg: 高精氨酸
HCit: 高瓜氨酸
His: 组氨酸
HLys: 高赖氨酸
Hol: 高亮氨酸
Ile: 异亮氨酸
IprLys: N^ε - 异丙氨赖氨酸
Leu: 亮氨酸
Lys: 赖氨酸
MeSer: N - 甲基丝氨酸
Nal: 3 - (2 - 萘基)丙氨酸
lNal: 3 - (1 - 萘基)丙氨酸
NEt: N - 乙胺
NicLys: N^ε - 烟酰基赖氨酸
Nle: 正亮氨酸
Npg: 新戊基甘氨酸
Nva: 正缬氨酸
OBzl: 苯甲基酯
Orn: 鸟氨酸
Pal: 3 - (3 - 吡啶基)丙氨酸
pClPhe: 3 - (4 - 氯酚基)丙氨酸
pGlu: 焦谷氨酸
Phe: 苯丙氨酸
PicLys: N^ε - 甲基吡啶基赖氨酸
Pro: 脯氨酸
Ser: 丝氨酸
Thr: 苏氨酸



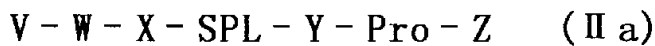
Tle: 叔亮氨酸

Trp: 色氨酸

Tyr: 酪氨酸

Val: 缬氨酸

根据本发明所述的具有 LH - RH 兴奋剂活性的肽的优选群体包括具有结构式 IIa (SEQ ID NO 2) 的肽:



其中:

*V 是二肽 A_1A_2 , 其中

- A_1 是 pGlu 或 AcSar, 并且

- A_2 是 His;

*W 是芳香 L - 氨基酸如 Trp, Nal, 1Nal, Phe, Pal, Bal 或 pClPhe;

*X 是二肽 A_3A_4 , 其中:

- A_3 如上述, 并且

- A_4 是 Tyr 或 Phe;

*SPL 如上述;

*Y 是二肽 A_5A_6 , 其中

- A_5 如上述, 并且

- A_6 是 Arg, Lys, HArg, HLys, Orn, Cit 或 HCit; 并且

*Z 是 $GlyNH_2$, $AzaGlyNH_2$ 或 $-NHR_1$, 其中 R_1 如上述,

及其它们药学可接受的盐类

根据本发明所述的具有 LH - RH 拮抗剂活性的肽的优选群体包括具有结构式 IIb (SEQ ID NO. 3) 的肽:



*V 是二肽 A_1A_2 , 其中

- A_1 是 pGlu 或芳香 D - 氨基酸如 DTrp, DPhe, DPClPhe, DNal, AcDNal 或 DQal; 并且

- A_2 是直接的键, DPhe, DpFPhe 或 DpClPhe;



*W 是 Trp, DTrp, DPhe, DpClPhe, DNal, DPal 或 DBal;

*X 是二肽 A_3A_4 , 其中

- A_3 是 Ser, 并且

- A_4 是 Tyr, Phe, cPzACAla, L- 或 D-PicLys, L- 或 D-NicLys 或 L- 或 D-IprLys;

*SPL 如上述;

*Y 是二肽 A_5A_6 , 其中

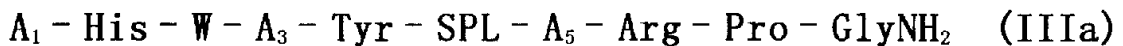
- A_5 如上述 (I), 并且

- A_6 如上述 (I); 并且

*Z 是 $GlyNH_2$ 或 $DAlaNH_2$,

及其药学上可接受的盐类。

在具有结构式 (IIa) 的肽中, 优选的群体包括具有结构式 IIa (SEQ ID NO. 4) 的肽:



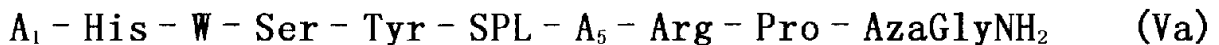
其中, A_1 , W, A_3 和 A_5 如上述 (IIa)。

肽 (IIa) 的另一优选群体包括具有结构式 IVa (SEQ ID NO. 5) 的肽:



其中, A_1 , W 和 A_5 如上述 (IIa)。

肽 (IIa) 的另一优选群体包括具有结构式 Va (SEQ ID No. 6) 的肽:



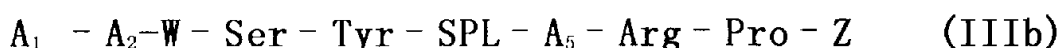
其中, A_1 , W 和 A_5 如上述 (IIa)。

具有结构式 (IIb) 的肽中, 优选的群体包括具有结构式 II'b (SEQ ID No. 8) 的肽:



其中 A_1 , A_2 , W, A_4 , A_5 , A_6 和 Z 如上述 (IIb)。

肽 (IIb) 的另一优选群体包括具有结构式 IIIb (SEQ ID No 7) 的肽:





其中 A₁, A₅, A₅, W 和 Z 如上述 (IIb)。

在肽 (IIIa) 之中, 优选 A₁ 是 pGlu 而 A₅ 是 Ser 的那些肽。并且优选 A₁ 是 pGlu 而 W 是 Trp 的肽 (IIIa)。

在肽 (II' b) 之中, 优选 A₁ 是 AcDNal, A₂ 是 DPCIPhe, 并且 Z 是 DAlaNH₂ 的那些肽。

特别优选的是下列肽:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NEt
AcSar-His-Trp-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NEt
pGlu-His-1Nal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NEt
pGlu-His-Nal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NEt
AcSar-His-Nal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NEt
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-SPL-Npg-Arg-Pro-NEt
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-SPL-Tle-Arg-Pro-NEt
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-SPL-Cha-Arg-Pro-NEt
AcDNal-DpCIPhe-DTrp-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-DAlaNH₂
AcDNal-DpCIPhe-DPal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-DAlaNH₂
AcDNal-DpCIPhe-DBal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-DAlaNH₂
AcDNal-DpCIPhe-DPal-Ser-IprLys-SPL-Npg-Arg-Pro-DAlaNH₂

带有药学上可接受的酸的盐类的例子是那些带有矿物酸的盐类如盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硼酸盐、硫酸氢盐、磷酸二氢盐或硝酸盐和那些带有有机酸的盐类如乙酸盐、草酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐、双羧萘酸盐、苹果酸盐、抗坏血酸盐、安息香酸盐、甲苯磺酸盐或萘磺酸盐。

带有药学上可接受的碱的盐类的例子是那些带有碱土金属如钠、钾、钙或锰的盐类和带有机碱如胺、缓血酸胺、N-甲基谷氨酰胺等的盐类。

根据本发明所述的肽可以通过众所周知的肽化学技术如液相肽合成法或固相肽合成法制备。一般地, 这些技术涉及逐步添加一个或多个氨基酸以形成肽链, 所加的氨基酸可以适当地受到保护。

优选地, 根据本发明所述的肽使用采用 N- α -Fmac 保护的逐步固相合成法来合成。例如, 将肽固定在 4-甲基苄基羟胺树脂 (Peninsula Laboratories, UK) 或氨基甲基树脂 (Peninsula



Laboratories, UK) 上。C-末端脯氨酸以 4-(Boc-脯氨酰羟甲基) 苯乙酸导入。随后用三氟乙酸除去 Boc 保护基团, 接着用二氯甲烷和二甲基甲酰胺 (DMF) 洗并用二异丙基乙胺中和。而且, 也可以使用采用 Fmoc/Boc 合成策略的“rink”树脂 [4-(2', 4'-二甲氧苯基)-Fmoc-氨基甲基苯氧基树脂]。

合成包括装配、切割和纯化步骤, 描述如下:

I 装配

对于所有肽, 使用下面去保护/偶联方法:

- 1 DMF 洗 (1 分钟, 3 次)
- 2 DMF 中的 25% 哌啶 (1 分钟),
- 3 DMF 中的 25% 哌啶 (15 分钟, 2 次)
- 4 DMF 洗 (1 分钟, 7 次)

对于每一步骤, 每克肽树脂使用 15ml 溶剂。

在 BOP, HoBt 和 DIEA (3) 的参与下, 在 DMF 中进行所有氨基酸 (三倍过量) 的偶联。用茚三酮试验控制每一偶联步骤的完成, 如果需要进行两次偶联。如果两次偶联之后测试仍保持阳性, 那么树脂是乙酰化的 (乙酸酐, 10 倍过量和 DIEA)。

一般地, 在去保护/切割步骤之前进行三氟乙酸 (TFA) 处理。

II 切割

从树脂上切下肽并通过用液体氟化氢 (HF) 处理完全去保护。典型地, 在作为清除剂的对甲酚和乙二硫醇 (对于含有色氨酸的肽) 的参与下, 每克肽树脂使用 10ml HF 在 0°C 处理 45 分钟。

HF 挥发后, 粗反应混合物用乙醚洗, 溶于 TFA 中, 用乙醚沉淀并在逐渐减小的压力下干燥。

如果需要, 在 HF 去保护之前, 从树脂上切下肽并随后通过用乙胺处理 (每克肽树脂为 5ml 乙胺, -78°C, 20 小时) 酰胺化。

当终产物中有苄基时, 使用 TFA (10ml/g 肽树脂, 0°C, 2.5 小时) 进行最后的切割/去保护。

以体积百分比表示的切割混合物的成分如下:



TFA	: 83.3%
乙二硫醇	: 2.1%
苯甲硫醚	: 4.2%
水	: 4.2%
苯酚	: 6.2%

将树脂过滤后，通过加入大量乙醚从反应混合物中沉淀肽。粗制肽用乙醚洗几次后，在逐渐减小的压力下干燥。

III 纯化

所有肽通过反相液相色谱纯化。

对于每个肽的基本纯化方法是相同的；但是根据肽的起始保留时间调节有机溶剂的梯度。

基本纯化条件：

仪器：KRONWALD SPERATIONSTECHNIK, 装有玻璃柱的中等压力液相色谱系统(德国)

固定柱 : 硅基 Bondapack C18 (Waters) 15 - 25 μ M, 100A

柱的大小 : 40x340mm

洗脱条件 : 固相: 洗脱液 A: 水中的 0.1% TFA

洗脱液 B: CH₃CN/A 60/40 (体积)

温度 : 室温

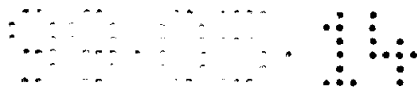
流速 : 40ml

测试 : 紫外 210nm

级分 : 每级 5ml

所有含目的化合物的组分分别用分析级 HPLC 分析。将纯度高于 95%的组分合并并冷冻干燥。如果第一次纯化后没有达到所需的纯度，进行第二次纯化步骤，如果需要，进行第三次纯化步骤。第二次和第三次纯化步骤的纯化条件与上述的那些相似，但要调整梯度的斜率以提高分辨率。

冷冻干燥后，所有纯化肽以其三氟乙酸盐存在。对应于每一肽的最后粉末用分析级 HPLC 测定。每一化合物的结构也用质谱分析测试，



并且肽净含量通过紫外吸收值测定。

根据本发明所述的肽具有对 LH-RH 受体的高亲和性。

按照下面方法测定此亲和性：

从雌性 Sprague Dawley 大鼠取出垂体并用 Potter 匀浆器在含有 0.32M 蔗糖、100 μ g/L PMSF(苯甲基磺酰氟)、5.6U/l 抑肽酶和 100 μ g/L 杆菌肽的 25mM HEPES 缓冲液(pH7.4)中匀浆。匀浆物在 700g 离心 10 分钟，上清液在 12,500g 再离心 30 分钟。将沉淀在与上述相同但无蔗糖的缓冲液中匀浆并沉淀。

所有匀浆、离心和随后的温育在 4℃ 进行。

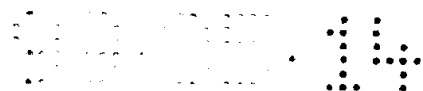
在 20 - 70pM [¹²⁵I] - buserelin (1000 - 2000Ci/mmol, 基于配体批量) 的参与下，将膜组分样品一式两份与浓度逐渐增加的测试化合物一起温育 2 小时。试验通过在吸力下 (Brander 96 孔收集器) 滤过 Whatman GF/B 玻璃滤膜终止。重复洗涤后，将滤膜放在装有闪烁剂的计数瓶中测定 ¹²⁵I 放射性。对于每一实验，残基特异的结合与所测化合物浓度的交叉曲线给出 50% 抑制浓度 (IC₅₀)。每种化合物至少在 4 次实验中得到测试。

此 LH-RH 受体实验的特征在于在有或无用于非特异结合测定的 1 μ M 未标记的 buserelin 参与时使用浓度逐渐增加的 [¹²⁵I] - buserelin 的 4 个饱和实验。特异结合的数据根据 Scatchard 方法分析。平均来说 (2 小时温育)，对于 [¹²⁵I] - buserelin 的解离常数 (Kd) 和结合位点的数目分别等于 88 \pm 6pM 和 15.6 \pm 2.9pM。

对于每一受测化合物，根据 Cheng 和 Prussof 公式： $Ki = IC_{50} / (1 + [放射性配体] / Kd)$ 从其 IC₅₀ 计算抑制常数。然后将 Ki 转为 pKi (= -Log^{Ki}) 作为亲和水平的最后表达方式。

天然配体 LH-RH 本身表现强亲和性，实验 IC₅₀ 在 10nM 范围，即 pKi 等于 8 左右。

所谓的超级兴奋剂如 buserelin、亮丙瑞林 (Leuprorelin)、色氨酸瑞林 (tryptorelin)、组氨酸瑞林 (histrelin) 或 deslorelin 和拮抗剂如抗排卵肽表现甚至更强的与 LH-RH 受体的结合力，IC₅₀ 在亚纳



摩尔范围，即 $pK_i > 9$ 。

受测的本发明肽对 LH-RH 受体的亲和性在下表 1 中给出：

表 1 对 LH-RH 受体的亲和性

化合物	pK _i
实施例 9	8.94
实施例 10	8.21
实施例 11	9.37
实施例 12	9.98
实施例 13	8.98
实施例 15	8.64
实施例 16	9.26
实施例 17	8.75
实施例 18	8.69
实施例 19	9.43
实施例 20	8.39
实施例 21	8.01
实施例 22	9.05
实施例 23	9.81
实施例 24	9.60
实施例 25	9.61
实施例 26	9.58
实施例 27	10.01
实施例 28	9.51
实施例 29	9.44
LH-RH	8.04
亮丙瑞林	9.33
色氨瑞琳	9.85
性瑞琳	8.58
Deslorelin	9.90
Buserelin	9.37
组氨瑞琳	9.98
抗排卵肽	9.22



符合基本结构式(IIa)的肽在体内对LH-RH受体表现兴奋剂活性,并在皮下注射后导致雌性中诱导排卵和在雄性中促进睾丸激素的分泌。

首先通过每日阴道涂片监测成年雌性 Wistar 大鼠的正常发情周期。在至少2次有规律的4天周期后,它们都在发情前期那天约2:00PM接受50mg/kg戊巴比妥钠腹膜内注射,这在另外只接受皮下载体(PBS:磷酸缓冲盐水,0.05M, pH7.4, 含0.1%牛血清白蛋白)的阴性对照动物中阻滞自发排卵。同时,用上述载体中的LH-RH、标准LH-RH兴奋剂或符合结构式(IIa)的实施例溶液以不同剂量皮下注射受测动物。次日早切除输卵管并小心剖析查找卵母细胞。在阴性戊巴比妥阻断的动物中没有发现任何卵母细胞。

如果有效,LH-RH兴奋剂在发情前期和发情期之间的晚间诱导排卵。排卵雌性大鼠(由两个输卵管之一中存在至少一个卵母细胞来定义)的百分率作为注射剂量的函数作图。LH-RH和兴奋剂的效力以在含6-12只动物的实验组之中产生50%排卵的剂量(ED_{50})表示。

受测的符合结构式(IIa)的肽体内诱导排卵的效力在下表2中给出:

表2 排卵的诱导

化合物	ED_{50} (ng/大鼠)
实施例9	3.5
实施例10	5.0
实施例12	4.6
LH-RH	15
亮丙瑞林	1.9
色氨瑞琳	2.9
性瑞林	4.3
Deslorelin	4.8



成年雄性 Sprague - Dawley 大鼠通过以溶于 PBS 的 30ng/kg 相同剂量的 LH - RH 兴奋剂皮下注射来处理。两小时后收集血样品用于通过直接放射免疫分析 (Immnotech) 测定总血浆睾酮激素。以此剂量, LH - RH 本身是无活性的; 标准 LH - RH 兴奋剂和所选的符合结构式 (IIa) 的实施例在下表 3 中得到比较:

表 3

化合物	总睾酮激素 (ng/ml)	每组的动物数
实施例 9	13.1 ± 1.0***	6
实施例 10	9.5 ± 3.1**	5
实施例 11	11.4 ± 2.7**	5
实施例 17	9.1 ± 1.3***	6
实施例 18	7.3 ± 1.6**	6
实施例 19	11.7 ± 1.1***	6
Buserelin	15.4 ± 0.71***	23
性瑞林	15.0 ± 2.5***	6
组氨瑞林	12.7 ± 1.9***	6
色氨瑞林	12.1 ± 0.7***	6
亮丙瑞林	11.9 ± 1.5***	6
载体 (PBS)	2.28 ± 0.40	23

**P<0.01

***P<0.001

符合基本结构式 (IIb) 的肽在体内对 LH - RH 受体表现拮抗剂活性, 导致雌性中排卵的抑制。

首先通过每日阴道涂片监测成年雌性 Wistar 大鼠的正常发情周期。在至少 2 次有规律的 4 天周期后, 它们通过在发情前期那天约 2:00PM 皮下注射接受载体本身 (0.5ml 丙二醇和水的混合物, 体积/体积: 20/80) 或溶于此载体的符合结构式 (IIb) 的 LH - RH 拮抗剂。次日



早在输卵管中发现大量卵母细胞，由此证明除了一只以外的所有载体处理的动物都自发排卵。

如果有效，LH - RH 拮抗剂完全阻滞排卵。例如用实施例 23, 25, 26, 27, 28 和 29 的化合物测定拮抗剂活性。抗排卵肽的 50%抑制剂量略低于 $1\mu\text{g}$ /大鼠。在此剂量的实施例 26 的化合物仍有活性，尽管强度略低。但是，实施例 27 的化合物在此一系列实验中确实表现比抗排卵肽更强的效力。

表 4 排卵的抑制

处理	剂量(μg 大鼠)	排卵雌鼠数/总雌鼠数
载体	--	29/30
抗排卵肽	10	0/8
	5	0/11
	2.5	2/6
	1	5/16
	0.5	4/5
实施例 23	10	1/5
	5	6/6
实施例 25	5	2/5
实施例 26	5	1/5
	1	3/5
实施例 27	5	0/5
	1	0/5
	0.5	3/5
实施例 28	5	2/5
实施例 29	5	0/5
	1	5/5



对于以药理学上有活性的剂量的本发明的肽，没有观察到毒性的征状。

因此，本发明的肽及其药理学上可接受的盐类可以用于治疗或预防其中需要 LH-RH 兴奋剂或拮抗剂活性的各种不适或疾病。

LH-RH 类似物的主要目标是脑垂体，但已有报道直接作用于性腺本身(睾丸和卵巢)、胸腺和一些淋巴细胞系、肥大细胞以及乳腺癌、前列腺癌或胰腺癌。

符合结构式(IIa)的 LH-RH 兴奋剂在通过短期快速或间歇施用，对任何 LH-RH 敏感的目标有刺激活性；或者在通过重复或连续施用时表现抑制效应、诱导脱敏和对 LH-RH 受体的负调节。以下丘脑-垂体-性腺轴线为例，延长的施用导致所谓的“化学”阉割。

符合结构式(IIb)的 LH-RH 拮抗剂首先对任何 LH-RH 敏感的目标表现抑制效应，但不连续治疗时也用于得到或计划 LH 和 FSH 反弹刺激性释放。

由于 LH-RH 兴奋剂和拮抗剂的这种双效潜力，依赖于剂量、治疗方案和施用途径，所有符合结构式(I)的类似物都可以找到单独或与其它激素或抗肿瘤剂结合用于人类和动物生殖内分泌学和治疗或预防性激素依赖的良性或恶性肿瘤的适当治疗用途。LH-RH 敏感的非性激素依赖型良性或恶性肿瘤也可以在用符合结构式(I)的 LH-RH 类似物单独或与抗肿瘤剂结合治疗时得到抑制。符合结构式(I)的 LH-RH 类似物单独或与免疫调节或抑制剂如糖皮质激素、环孢菌素、纳巴霉素、tacrolimus 和它们的衍生物等结合使用也可以调节免疫机制。因此，根据本发明所述 LH-RH 类似物在治疗和预防免疫疾病、移植排斥或遗传性过敏疾病和治疗良性或恶性淋巴增殖紊乱中很有价值。

符合结构式(I)的 LH-RH 类似物单独或与性类固醇或促性腺激素结合在体外受精方法中抑制、计划和激发排卵方面以及治疗雄和雌性不育或性腺功能减退状态中特别有用。相反，它们也可以单独或与性类固醇或促性腺激素一起用于雄性或雌性避孕或性腺功能亢奋状态的



治疗。这应用于男性或女性，但也应用于野生或家养动物，用于比如改善或控制生殖能力或作为优化繁育策略的工具。

符合结构式(I)的 LH-RH 类似物单独或以男性激素作用抑制剂即抗雄激素物质如醋酸环丙孕酮(cyproterone acetate)、Osaterone acetate、醋酸氯地孕酮(chlormadinone acetate)、氟利坦(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)或 bicalutamide 等，或与 5α -还原酶抑制剂如芬甾酮、epristeride 或 turosteride 等，或 C_{17-20} 裂解酶抑制剂如 abiraterone 等结合在治疗男人晚期前列腺癌中尤其有用，但也可用于此适应症和良性前列腺肥大的第一线治疗。

符合结构式(I)的 LH-RH 类似物单独或与抗雌激素物质如三氯氧胺、raloxifen 或 droloxifen 等，或与芳香酶抑制剂如阿他美坦(atamestane)、福美坦(formestane)、letrozole、anastrozole 等，或与 C_{17-20} 裂解酶抑制酶如 abiraterone 等结合在治疗或预防女性和男性乳腺癌，尤其雌激素受体阳性肿瘤和某些对 LH-RH 类似物的直接影响反应或间接对它们的生殖腺抑制活性反应的雌受体阳性肿瘤中尤其有用。

其它妇科病如子宫内膜增生、平滑肌瘤、腺肌瘤、子宫内膜炎、多囊卵巢综合症、多毛症和良性肿瘤疾病(痛、囊肿或纤维化)也可以通过或受益于用符合结构式(I)的 LH-RH 类似物单独或与抗雌激素物质(上述)，孕酮如醋酸环丙孕酮、osaterone acetate、醋酸氯地孕酮、nomegestrol acetate、丙甲雌烯酮(promegestone)、地美孕酮(demegestone)、trimegestone 等结合处理或它们与雌激素如雌二醇或乙炔雌二醇结合的避孕或绝经后替代配制品来防止。本发明的肽也可以单独或与雌激素(上述)、抗孕酮物质如米非司酮(mifepristone)或前裂腺素类似物如磺前列酮(Sulprostone)结合通过诱导流产或引发分娩来干预妊娠。

在兽医药中对于雌性或雄性家养或野生动物，可能遇到相似的可能需要使用符合结构式(I)的 LH-RH 类似物的适应症。

因此，本发明的另一方面是单独含有有效量的至少一种具结构式



(I)的肽或其药学上可接受的盐或与适当药学上可接受的赋形剂混合的药物组合物。

本发明的另一方面涉及治疗或预防上述疾病的方法，该方法包括对需要治疗的病人或动物施用治疗有效量的具结构式 I 的肽或其药学上可接受的盐。

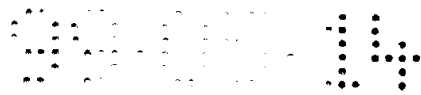
本发明的另一方面涉及具结构式 (IIa) 的肽或其药学上可接受的盐类用于制备具有 LH-RH 兴奋剂活性的药物的用途。具结构式 (IIb) 的肽或其药学上可接受的盐类用于制备具有 LH-RH 拮抗剂活性的药物的用途也在本发明的范围内。

本发明的肽优选通过胃肠外施用给药，如果剂量适当增加，通过口服配方服用也是有效的。

用于具结构式 (IIa) 的 LH-RH 兴奋剂长期垂体-生殖腺抑制药物的优选载体系统是缓释可植入的装置或可注射的可生物降解的高分子，微-或纳-颗粒或胶囊，或微-或纳-乳胶，含有肽或其适当盐类的单位剂量，即对于持续作用 1 月至一年每个病人 1-100mg。具结构式 (IIIb) 的 LH-RH 拮抗剂的长期给药在相同缓释配方中通常需要更高的用量，即对于一周至一年的活性为 10mg-1g。符合结构式 (I) 的 LH-RH 兴奋剂或拮抗剂的动物剂量根据要治疗的野生或家养品种的体重来调整。

所有其它胃肠外给药方法适用于本发明肽的立即、延迟或计划的传递、皮下、肌肉内、静脉内、生殖腺内或肿瘤们内针头注射，或使用适当泵技术的长期的连续、间歇或计划的输注或微量输入；气体推动的皮下微量注射；阴道乳膏、凝胶或栓剂；直肠灌肠剂或栓剂；经皮肤的乳膏、凝胶、洗液、溶液或离子渗透装置；鼻部喷酒或干粉吸入装置，眼用溶液、凝胶、乳膏或接触镜片；人工或用适当粉碎装置制备的微-或纳-颗粒或小滴的肺吸入。

这些胃肠外给药在人体中的单位剂量对于具有结构式 (IIa) 的 LH-RH 兴奋剂是 0.001mg-10mg/天，对于具有结构式 (IIb) 的 LH-RH 拮抗剂是 0.01-100mg/天，每天 1-16 次(以间歇施用为例)。



根据本发明所述的肽的口服给药优选使用胃抗性的和延迟的肠或结肠释放的配方，可以是含有两个或多个成分的包被的药丸或药片、硬化的白明胶囊和特殊的大-、微-或纳-珠粒或设计保护它们不受胃肠降解并在需要时释放它们的任何装置。只要增加剂量，也可适当提供所有其它口服的配方如溶液、悬浮液、糖浆、凝胶等，或者舌部的、舌下的或可咀嚼的配方。

总的来说，用含有 1mg - 1g/病人剂量的上述任何配方、1 - 16 次/天都可以实现有效的口服治疗(以间歇给药为例)。

所有上述根据本发明所述的肽及其药学上可接受的盐类的口服或胃肠外配方可以包含 1 种或几种药学上适当的赋形剂、一种或几种蛋白酶抑制剂和由于特殊给药途径而需要的一种或几种抑制剂。

也可以使用根据本发明所述的纯化肽或它们药学上可接受的盐类的未加工的粉末，尤其是以冷冻干燥的形式用于速效舌下服用。

本发明参考下列实施例得到描述，但这些实施例不以任何方式限制本发明。在这些实施例中，所用的起始原料或者是可购买的或者是合成的，如下述：

- Fmoc - Glu - OH, Fmoc - Tyr(OBut) - OH, Fmoc - Trp - OH 和 Fmoc - His(Trt)购自 Propeptide(法国)。

- Fmoc - Trp(Boc)购自 Novabiochem(瑞士)。

- Fmoc - Sarcosine 和 Fmoc - D - Ser(OBut) - OH 购自 Bachem(瑞士)。

- Fmoc - Arg(Tos) - OH, Fmoc - Tyr(2 - Br - Z) - OH 和 Fmoc - Ser(Bzl) - OH 根据 Bodanszky 和 Bodanszky(5)从相应的 Boc 保护的氨基酸起始合成。

- Fmoc - β - 1 - Nal - OH, Fmoc - β - Nal - OH 和 Fmoc - pClPhe 合成为消旋物。

相应的乙酰乙酯使用枯草溶菌素酶促溶解(6)。

- MeSerMc 按照 Dermott 和 Benoiton(7)合成。

- FMoc - (S)SPL - Leu - OH 根据 Hinds 等(8)和 Wardx 等(9)得到



合成。

实施例 1: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

肽的装配和切割如实施例 2 所述的进行。得到 532mg 粗产物。

使用 35 - 50%洗脱液 B(CH₃CN/0.1% TFA, 体积/体积: 60/40) 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 56mg 纯化物质(产率约 11%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1248.4

测定值: 1248.1(平均)

净肽含量: 73.4%; 纯度: 96.4%; 保留时间: 11.62 分钟。

实施例 2: AcSar - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

合成以 1.2mmole 规模进行。加入酪氨酸后, 肽树脂分成六份用于相应序列的装配。

从 4-甲基苄基羟胺树脂起始, 使用如上本发明肽的基本合成方法中所述的 t-Boc 策略偶联甘氨酸、脯氨酸和精氨酸。使用 N- α -Fmoc 保护导入 SPL - Leu 和酪氨酸。

酪氨酸后, 使用上述 Fmoc 策略偶联后面的氨基酸。在最后 HF 裂解之前, 进行 TFA 处理以除去叔丁基侧链保护基团。

使用 15 - 70%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。冷冻干燥后, 得到 57mg 纯化物质(产率约 39%)

质谱分析 - FAB⁺模式:

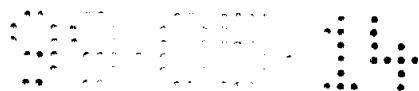
预测值: 1250.58(平均)

测定值: 1250.5(NH⁺)

净肽含量: 73.7%; 纯度: 97.1%; 保留时间 18.38 分钟。

实施例 3: pGlu - His - 1Nal - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

肽的装配和切割如实施例 2 所述的进行。



使用 25 - 75%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。
得到 54mg 纯化物质(产率约 13%)。

质谱分析 - FAB⁺模式:

预测值: 1959.6

测定值: 1959.4(NH⁺)

净肽含量: 84.6%; 纯度 95.3%; 保留时间: 14.18 分钟。

实施例 4: pGlu - His - Nal - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

肽的装配和切割如实施例 2 所述的进行。

使用 30 - 60%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。
得到 68mg 纯化物质(产率约 25%)。

质谱分析 - FAB⁺模式:

预测值: 1259.6

测定值: 1259.4(NH⁺)

净肽含量: 81.8%; 纯度 99.2%; 保留时间: 14.20 分钟。

实施例 5: pGlu - His - pClPhe - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

肽的装配和切割如实施例 2 所述的进行。

纯化分两步进行, 第一步使用 10 - 70%洗脱液 B 线形梯度, 时间为 30 分钟以上; 第二步使用 10 - 70%洗脱液线形梯度, 时间为 40 分钟以上。

得到 50mg 纯化物质(产率约 19%)。

质谱分析 - FAB⁺模式:

预测值: 1244.0

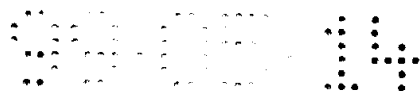
测定值: 1243.5(NH⁺)

净肽含量: 73.8%; 纯度 97.2%; 保留时间: 13.65 分钟。

实施例 6: pGlu - His - DSer - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

肽的装配和切割如实施例 2 所述的进行。

使用 30 - 50%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。



得到 75mg 纯化物质 (产率约 27%)。

质谱分析 - FAB⁺模式:

预测值: 1248.3

测定值: 1248.5 (NH⁺)

净肽含量: 68.1%; 纯度 98.6%; 保留时间: 17.78 分钟。

实施例 7: pGlu - His - Trp - Ser(OBzl) - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

按如上本发明肽的基本合成方法中所述使用 Fmol/Boc 策略通过固相合成法合成肽。

使用 25 - 80%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

冷冻干燥后得到 82mg 纯化物质 (产率 31%)。

质谱分析: - FAB⁺模式:

预测值: 1338.4 (平均)

测定值: 1338.5 (NH⁺)

净肽含量: 78.3%; 纯度 96.0%; 保留时间: 16.17 分钟。

实施例 8: pGlu - His - Trp - MeSer - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

肽的装配和切割如实施例 2 所述的进行。

纯化分 3 步进行, 第一步和第二步使用 20 - 70%洗脱液 B 线形梯度, 时间为 30 分钟以上, 第三步使用 30 - 50 洗脱液 B 线形梯度, 时间为 30 分钟以上。

得到 15mg 纯化物质 (产率约 4%)。

质谱分析 - FAB⁺模式:

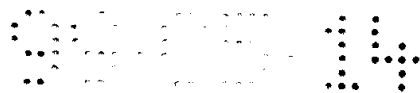
预测值: 1262.5

测定值: 1262.3 (NH⁺)

净肽含量: 68.6%; 纯度 96.3%; 保留时间: 18.58 分钟。

实施例 9: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - NEt

合成以 1.2mmole 规模进行。加入酪氨酸后, 肽树脂分成六份用于相应序列的装配。



以 4-甲基苄基树脂起始，通过如上本发明肽的基本合成法中所述的 t-Boc 策略偶联第二个氨基酸精氨酸。

通过上述 Fmoc 策略偶联后面的氨基酸。

N-末端氨基酸偶联后，将肽从树脂上切下并用乙胺通过氨解转化成乙酰胺（每克肽树脂用 5ml 乙胺，20 小时，-78℃）。

切割后，用甲醇抽提保护肽，干燥并如上所述用 HF 去保护。

纯化分二步进行，第一步使用 30-50% 洗脱液 B 线形梯度，时间为 30 分钟以上，第二步使用 25-45% 洗脱液 B 线形梯度，时间为 30 分钟以上。

得到 19mg 纯化物质（产率约 8%）。

质谱分析 - FAB⁺模式：

预测值：1219.4

测定值：1219.6 (NH⁺)

净肽含量：72.5%；纯度：95.2%；保留时间 10.28 分钟。

实施例 10：AcSar - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - NH₂

肽的装配和切割如实施例 9 所述的进行。

使用 20-70% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化，时间为 30 分钟以上。

得到 24mg 纯化物质（产率约 22%）。

质谱分析 - FAB⁺模式：

预测值：1221.4

测定值：1221.6 (NH⁺)

净肽含量：83.5%；纯度 96.1%；保留时间：15.85 分钟。

实施例 11：pGlu - His - 1Nal - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - NH₂

肽的装配和切割如实施例 9 所述的进行。

使用 20-70% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化，时间为 30 分钟以上。

得到 33mg 纯化物质（产率约 20%）。

质谱分析 - ES⁺模式：



预测值: 1229.5

测定值: 1229.9(NH⁺)

净肽含量: 80.6%; 纯度 97.9%; 保留时间: 14.85 分钟。

实施例 12: pGlu-His-Nal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NH₂

肽的装配和切割如实施例 9 所述的进行。

使用 40-60%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 21mg 纯化物质(产率约 28%)。

质谱分析-ES⁺模式:

预测值: 1229.5

测定值: 1230.1(平均)

净肽含量: 74.7%; 纯度 95.2%; 保留时间: 14.80 分钟。

实施例 13: AcSar-His-Nal-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-NH₂

肽的装配和切割如实施例 9 所述的进行。

使用 20-80%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 36mg 纯化物质(产率约 15%)。

质谱分析-ES⁺模式:

预测值: 1232.5

测定值: 1232.2(平均)

净肽含量: 68.9%; 纯度 95.1%; 保留时间: 13.48 分钟。

实施例 14: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-SPL-Leu-Arg-Pro-AzaGly-NH₂

在 Rink 树脂上通过固相合成法合成肽。

C-末端 AzaGly-NH₂ 如下产生: 在 -78℃, DIEA(3 当量)存在时向 DCM 中的 1.9g 去保护的 Rink 树脂加入 0.55g(3 当量)对-硝基苯酚氯甲酸酐。反应混合物在室温搅拌 48 小时, 然后充分地冲洗树脂。

随后通过在 DIEA 存在时加入 DMF 中的 Fmoc-酰肼(1g, 3 当量)将活化的树脂转化为 Fmoc-AzaGly-Rink(72 小时)。按照前面在本发明肽的基本合成方法中所述的用 N-α-Fmoc 保护加上其它的氨基酸。



然后从树脂上切下肽并得到 0.265g 粗产物 (50% 产率)。通过反相层析分两步纯化肽, 第一步使用 10 - 80% 洗脱液 B 线形梯度 (时间为 30 分钟以上), 第二步使用 20 - 60% 洗脱液 B 线形梯度 (时间为 30 分钟以上)。

第二次纯化步骤后, 合并纯度 > 80% 的组分并冷冻干燥。得到 44mg 纯化肽 (产率 17%)。

质谱分析 - ES⁺ 模式:

预测值: 1249.5 (平均)

测定值: 1248.6 (单同位素的)

净肽含量: 80.5%; 纯度 98.2%; 保留时间: 10.46 分钟。

实施例 15: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Hol - Arg - Pro - NEt

根据 Hinds 等 (8) 和 Ward 等 (9) 合成 Fmoc - SPL - Hol - OH。通过质谱分析测定中间产物二肽。

所得值与理论一致。

使用实施例 9 所述的策略进行肽的合成和切割。

使用 20 - 80% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 26mg 纯化的物质 (产率约 10%)。

质谱分析 - FAB⁺ 模式:

预测值: 1233.5 (平均)

测定值: 1233.4 (NH⁺)

净肽含量: 73.9%; 纯度 97.5%; 保留时间: 8.77 分钟。

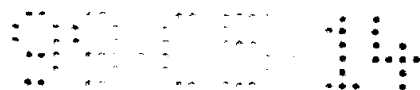
实施例 16: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Npg - Arg - Pro - NEt

根据 Hinds 等 (8) 和 Ward 等 (9) 合成 Fmoc - SPL - Npg - OH。通过质谱分析测定中间产物二肽。

所得值与理论一致。

使用实施例 9 所述的策略进行肽的合成和切割。

使用 30 - 70% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。



得到 53mg 纯化的物质 (产率约 15%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1233.5

测定值: 1233.1 (平均)

净肽含量: 72.1%; 纯度 98.1%; 保留时间: 8.52 分钟。

实施例 17: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Tle - Arg - Pro -
NEt

根据 Hinds 等 (8) 和 Ward 等 (9) 合成 Fmoc - SPL - Tle - OH。通过
质谱分析测定中间产物二肽。

所得值与理论一致。

使用实施例 9 所述的策略进行肽的合成和切割。

纯化分两步进行, 第一步使用 20 - 60% 洗脱液 B 线形梯度进行纯
化, 时间为 30 分钟以上, 第二步使用 25 - 65% 洗脱液 B 线形梯度,
时间为 30 分钟以上。

得到 6mg 纯化物质 (产率约 3%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1218.6

测定值: 1219.2 (平均)

净肽含量: 71.3%; 纯度 97.8%; 保留时间: 13.44 分钟。

实施例 18: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Nle - Arg - Pro -
NEt

根据 Hinds 等 (8) 和 Ward 等 (9) 合成 Fmoc - SPL - Nle - OH。通过
质谱分析测定中间产物二肽。

所得值与理论一致。

使用实施例 9 所述的策略进行肽的合成和切割。

使用 20 - 80% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 44mg 纯化的物质 (产率约 20%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1218.6



测定值: 1218.9(平均)

净肽含量: 69.4%; 纯度 98.3%; 保留时间: 13.91 分钟。

实施例 19: pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - SPL - Cha - Arg - Pro - NEt

根据 Hinds 等 (8) 和 Ward 等 (9) 合成 Fmoc - SPL - Cha - OH。通过质谱分析测定中间产物二肽。

所得值与理论一致。

使用实施例 9 所述的策略进行肽的合成和切割。

使用 25 - 80% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 16mg 纯化的物质 (产率约 14%)。

质谱分析 - ES⁺ 模式:

预测值: 1258.4

测定值: 1259.1(平均)

净肽含量: 72.3%; 纯度 96%; 保留时间: 14.20 分钟。

实施例 20: pGlu-DPhe - Trp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂

合成在 4 - 甲基苄基羟胺树脂上进行。使用如上本发明肽的基本合成方法中所述的 t - Boc 策略导入 D - 丙氨酸、脯氨酸和精氨酸。

合成以 Boc-Gly-OH 开始。随后的氨基酸通过如上所述的 Fmoc 策略掺入。

使用如上所述的 HF 使肽去保护并从树脂上切下肽。

使用 30 - 80% 洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 25mg 纯化物质 (产率约 5%)

质谱分析 - ES⁺ 模式:

预测值: 1257.5

测定值: 1258.3(平均)

净肽含量: 78.5%; 纯度: 97.3%; 保留时间 17.44 分钟。

实施例 21: pGlu - DPhe - Trp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro -



DAIaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 25 - 80%洗脱液 B 线形梯度进行纯化，时间为 30 分钟以上。

得到 27mg 纯化物质(产率约 6%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1272.5

测定值: 1272.6(平均)

净肽含量: 78.3%; 纯度 99%; 保留时间: 18.03 分钟。

实施例 22:AcDNal-DpClPhe-DTrp - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - DAIaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

分两步纯化，第一步使用 30 - 100%洗脱液 B 线形梯度，时间为 30 分钟以上，第二步使用 35% - 70%洗脱液 B 线形梯度，时间为 30 分钟以上。

得到 6mg 纯化物质(产率约 2%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1435.1

测定值: 1434.7(平均)

净肽含量: 78.0%; 纯度 98%; 保留时间: 16.92 分钟。

实施例 23: AcDNal-DpClPhe-DPal - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg - Pro - DAIaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 25 - 80%洗脱液 B 线形梯度进行纯化，时间为 30 分钟以上。

得到 21mg 纯化物质(产率约 5%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1397.1

测定值: 1396.8(平均)

净肽含量: 70.9%; 纯度 98.8%; 保留时间: 17.91 分钟。

实施例 24: AcDNal-DpClPhe-DBal - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg -



Pro - DAlaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 30 - 100%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 13mg 纯化物质(产率约 3%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1452.1

测定值: 1451.6(平均)

净肽含量: 82.4%; 纯度 96.4%; 保留时间: 18.52 分钟。

实施例 25: AcDNal-DpClPhe-Dpal - Ser - Tyr - SPL - Leu - Arg -

Pro - DAlaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 20 - 60%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 10mg 纯化物质(产率 4%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1410.6

测定值: 1410.7

净肽含量: 74.8%; 纯度 93.1%; 保留时间: 13.38 分钟。

实施例 26: AcDNal-DpClPhe-Dpal - Ser - NicLys - SPL - Leu - Arg

- Pro - DAlaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 20 - 60%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。

得到 73mg 纯化物质(产率 20%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1481.0

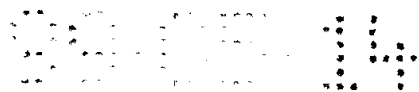
测定值: 1481.0

净肽含量: 79%; 纯度 99%; 保留时间: 17.82 分钟。

实施例 27: AcDNal-DpClPhe-Dpal - Ser - IprLys - SPL - Npg - Arg

- Pro - DAlaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。



使用 15 - 50%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。
得到 78mg 纯化物质(产率约 30%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1417.8

测定值: 1418.4

净肽含量: 71.2%; 纯度 98.8%; 保留时间: 16.04 分钟。

实施例 28: AcDNal-DpClPhe-Dpal - Ser - Tyr - SPL - Npg-IprLys -
Pro - DAlaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 20 - 60%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。
得到 85mg 纯化物质(产率约 20%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1424.9

测定值: 1425.1

净肽含量: 72.7%; 纯度 97.5%; 保留时间: 19.39 分钟。

实施例 29: AcDNal-DpClPhe-Dpal - Ser - Niclys - SPL - Npg-
IprLys - Pro - DAlaNH₂

合成和切割如实施例 20 所述的进行。

使用 15 - 65%洗脱液 B 线形梯度进行纯化, 时间为 30 分钟以上。
得到 97mg 纯化物质(产率约 33%)。

质谱分析 - ES⁺模式:

预测值: 1495.1

测定值: 1495.7 (NH⁺)

净肽含量: 70.5%; 纯度 97.5%; 保留时间: 18.66 分钟。

参考文献

- (1) G. BARANY 和 R. B. MERRIFIELD (1979)
肽、分析、合成、生物, 第二卷, 第一章。
- (2) E. ATHERTON 和 R. C. SHEPPARD (1980)

- 固相肽合成, IRL Press, OXFORD
- (3) D. Le NGUEN, A. HEITZ 和 B. CASTRO(1987),
J. CHEM. Soc. Perkin Trans., I, 1915
- (4) E. KAISER, R. L. COLESCOTT, C. D. BOSSINGER 和 P. I. COOK
(1970), 生物化学分析, 34, 595
- (5) M. BODANSZKY 和 A. BODANSZKY(1994)
肽合成方法, Springer Verlag Berlin
- (6) P. N. RAO, J. E. BURDETT Jr, J. W. CESSAD, C. M. DI NUNNO,
D. M. PETERSON 和 H. K. IM(1987)
Int. J. Pept. Protein Res., 29, 118
- (7) J. R. Mc ERMOTT 和 N. L. BENOITON(1973)
Can. J. Chem., 51, 1915
- (8) M. G. HINDS, N. G. J. RICHARDS 和 J. A. ROBINSON(1988),
J. Chem. Soc. Chem. Commun, 1447
- (9) P. WARD. G. B. EWAN, C. C. JORDAN, S. J. IRELAND, R. M. HAGAN 和
J. R. BROWN(1990),
J. Med. Chem., 33, 1848.



序列表

(1) 基本信息

(i) 申请人:

- (A) 名称: **Laboratoire Theramex**
- (B) 街道: **6, Avenue prince Hereditaire Albert**
- (C) 城市: **Monaco**
- (E) 国家: **Monaco**
- (F) 邮政编号(Zip): **98000**
- (G) 电话: **377 92 05 08 08**
- (H) 传真: **377 92 05 70 00**

(ii) 发明名称: **LH-RH 类似物及其用途和含有它们的药物组合物**

(iii) 序列数: **8**

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: **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)**

(2) 关于 SEQ ID NO:1 的信息

(i) 序列特征

- (A) 长度: **7 个氨基酸**
- (B) 类型: **氨基酸**
- (D) 拓扑结构: **线型**

(ii) 分子类型: **肽**

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键: **修饰位点**



(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是肽 A_1A_2 , A_1 是 pGlu、AcSar 或芳香 D-氨基酸而 A_2 是直接的键、His、DPhe、DpFPhe 或 DpClPhe ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 2

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是芳香 L-或 D-氨基酸 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 3

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是二肽 A_3A_4 , A_3 是 Ala、Thr、Ser、DSer、Ser(OBzl)或 MeSer 而 A_4 是 Tyr、Phe、cPzACAla、L-或 D-picLys、L-或 D-NicLys 或 L-或 D-IprLys ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 5

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是二肽 A_5A_6 , A_5 是带有 (C_1-C_8) 烷基或 (C_3-C_6) 环烷基侧链的氨基酸而 A_6 是 L-或 D- (Arg、HArg、Lys、HLys、Orn、Cit、HCit 或 Aph), 其中 L-或 D- (Arg 和 HArg) 可以被一个或两个 (C_1-C_4) 烷基替换而 L-或 D- (Lys、HLys、Orn 和 Aph) 可以被异丙基、烟酰基或甲代吡啶基替换 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 7

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 GlyNH₂、 AzaGlyNH₂、 DAlaNH₂ 或-NHR₁, R₁ 是 (C₁-C₄) 烷基、 (C₃-C₆) 环烷基、吗啉基、吡咯烷基或哌啶基 ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
1 5

(2) 关于 SEQ ID NO:2 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是肽 A₁A₂, A₁ 是 pGlu 或 AcSar 而 A₂ 是 His ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 2

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是芳香 L-或 D-氨基酸 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 3

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是二肽 A₃A₄, A₃ 如上对 SEQ ID NO: 1 所述而 A₄ 是 Tyr 或 Phe ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 5

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是二肽 A_5A_6 , A_5 是如上对 SEQ ID NO :1 所述而 A_6 是 Arg、HArg、Lys、HLys、Orn、Cit 或 HCit ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 7

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 GlyNH₂、AzaGlyNH₂、或 -NHR₁, R₁ 如上对 SEQ ID NO 1 所述”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2 :

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
1 5

(2) 关于 SEQ ID NO:3 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

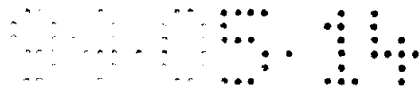
(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 1



(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是肽 A_1A_2 , A_1 是 pGlu 或芳香 D-氨基酸而 A_2 是直接的键、DPhe、DpFPhe 或 DpClPhe ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 2

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 Trp、DTrp、DPhe、DpClPhe、DNal、DPal 或 DBal ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 3

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是二肽 A_3A_4 , A_3 是 Ser 而 A_4 是 Tyr、Phe、cPzACAla、L-或 D-PicLys、L-或 D-NicLys 或 L-或 D-IprLys ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 5

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是二肽 A_5A_6 , A_5 和 A_6 如上对 SEQ ID NO 1 所述”

(ix) 特征:

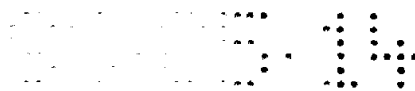
(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 7

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 GlyNH₂、DAlaNH₂ ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3 :

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
1 5



(2) 关于 SEQ ID NO:4 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 1,3,4,7

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 分别是如上对 SEQ ID NO 2 所述的 A₁, W, A₃ 和 A₅ ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺 ”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 10

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 GlyNH₂ ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4 :

```
Xaa His Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Arg Pro Xaa  
1           5           10
```

(2) 关于 SEQ ID NO:5 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型：肽

(ix) 特征：

(A) 名称/关键：修饰位点

(B) 位置：1,3,7

(D) 其它信息：/备注=“Xaa 分别是如上对 SEQ ID NO 2 所述的 A₁，W 和 A₅”

(ix) 特征：

(A) 名称/关键：修饰位点

(B) 位置：6

(D) 其它信息：/备注=“Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺”

(ix) 特征：

(A) 名称/关键：修饰位点

(B) 位置：10

(D) 其它信息：/备注=“Xaa 是 NET”

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:5：

```
Xaa His Xaa Ser Tyr Xaa Xaa Arg Pro Xaa
1                5                10
```

(2) 关于 SEQ ID NO:6 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度：10 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(D) 拓扑结构：线型

(ii) 分子类型：肽

(ix) 特征：

(A) 名称/关键：修饰位点

(B) 位置：1,3,7

(D) 其它信息：/备注=“Xaa 分别是如上对 SEQ ID NO 2

所述的 A₁, W 和 A₅”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /备注= “Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 10

(D) 其它信息: /备注= “Xaa 是 AzaGlyNH₂”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

Xaa	His	Xaa	Ser	Tyr	Xaa	Xaa	Arg	Pro	Xaa
1			5						10

(2) 关于 SEQ ID NO:7 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 1,2,3,7

(D) 其它信息: /备注= “Xaa 分别是如上对 SEQ ID NO 3 所述的 A₁, A₂, W 和 A₅”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 6



(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 10

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 GlyNH₂ 或 DAlaNH₂”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```
Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Xaa Arg Pro Xaa
1           5           10
```

(2) 关于 SEQ ID NO:8 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 1,2,3,5,7,8

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 分别是如上对 SEQ ID NO 3 所述的 A₁, A₂, W, A₄, A₅ 和 A₆”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

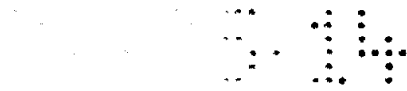
(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是在说明书中所示的 (S) 螺旋内酰胺”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 修饰位点

(B) 位置: 10



(D) 其它信息: /备注= “ Xaa 是 GlyNH₂ 或 DAlaNH₂ ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8 :

```
Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa  
1           5           10
```