

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C07K 7/18

A61K 38/08



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 90106915.9

[45]授权公告日 1997 年 4 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1034577C

[22]申请日 90.8.13 [24]颁证日 96.11.23

[21]申请号 90106915.9

[30]优先权

[32]89.8.14 [33]DE[31]P3926822.5

[73]专利权人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 史蒂芬·汉可 格哈德·比利泼尔

乔申·克诺利 博瓦·舒尔肯斯

荷曼·哥哈兹

[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 樊卫民

审查员 周 莉

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 制备具有血管舒缓激肽拮抗作用的肽类的方法

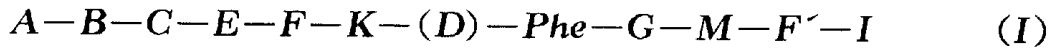
[57]摘要

式 I 的肽类具有血管舒缓激肽的拮抗作用，
A-B-C-E-F-K-(D)-Phe-G-M-F'-I

式中 A、B、C、E、F、K、D、G、M、F'和 I 的定义见说明书，它们的治疗用途包括了由于血管舒缓激肽和血管舒缓激肽的相关肽类所调解、引起或支持的所有病理状态，式 I 的肽类用肽合成的已知方法制备。

权 利 要 求 书

1. 一种制备式 I 的一种肽及其生理可容性盐的方法,



式中

A 代表氢, $H-(D)-$ 或 $H-(L)-Arg$, $H-(D)-$ 或 $H-(L)-Lys$ 或 $H-(D)-$ 或 $H-(L)-Orn$ 。

B 代表 *Arg*, *Orn* 或 *Lys* 其侧链上的胍基或氨基可被如下基团取代: 氢, $(C_1-C_6)-$ 链烷酰基, $(C_7-C_{13})-$ 芳酰基, $(C_3-C_9)-$ 杂芳酰基, (C_1-C_8) 烷基磺酰基, 或 $(C_6-C_{12})-$ 芳基磺酰基, 这里的芳基, 杂芳基, 芳酰基, 芳基磺酰基和杂芳酰基可任选地被 1, 2, 3 或 4 个相同的或相异的如下基团取代: 甲基, 甲氧基和卤素,

C 代表 *Pro-Pro-Gly*, *Hyp-Pro-Gly* 或 *Pro-Hyp-Gly*,

E 代表 *Phe* 或 *Thia*,

F 代表 *Ser*,

K 代表直接键联;

M 代表直接键联;

G 代表 *Oic*;

F' 代表 *Arg*;

I 代表 *OH*;

(D)-*Phe* 代表 D-苯丙氨酸,

该制备方法的特征是:

a) C-端有游离羧基或其活化衍生物的片断与 N-端有游离氨基的适宜的片断反应;

b) 肽的合成分步进行,按照(a)或(b)得到的化合物任选地裂解掉一个或多个为保护其它功能基而暂时引入的保护基,并将这样得到的式 I 化合物转变成生理可容性盐。

2. 权利要求 1 的方法,其特征是制备式 I 的一种肽,式中

A 代表 $H-(D)-Arg$,

B 代表 *Arg*

C 代表 *Pro-Pro-Gly* 或 *Pro-Hyp-Gly*,

F 代表 *Ser*, 和

G 代表顺,内-八氢吡啶-2-羧酸。

说明书

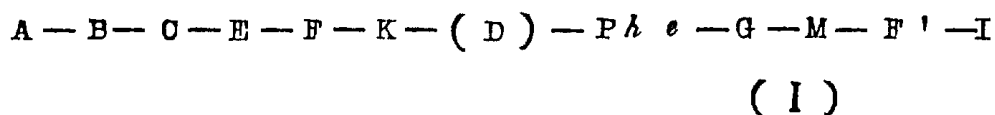
制备具有血管舒缓激肽拮抗作用的肽类的方法

本发明涉及具有血管舒缓激肽拮抗作用的新的肽类化合物及其制备方法。

WO 86 / 07263 叙述了血管舒缓激肽的拮抗肽类化合物，其中是将肽类激素血管舒缓激肽或其它血管舒缓激肽的类似物中7位上的L-脯氨酸被一个D-氨基酸取代，例如D-苯丙氨酸，D-2-噻吩丙氨酸、D-吡啶丙氨酸、氯代-D-苯丙氨酸、D-萘丙氨酸、O-甲基-D-酪氨酸、D-苯基甘氨酸、D-组氨酸、D-色氨酸、D-酪氨酸、D-高苯丙氨酸、D-缬氨酸、D-丙氨酸、D-异亮氨酸、D-亮氨酸和O-甲基-D-苏氨酸。

本发明的目的是寻找对于血管舒缓激肽有拮抗作用的新的有效肽类物质。

本发明的内容是式I的肽类及其生理可溶性盐类：



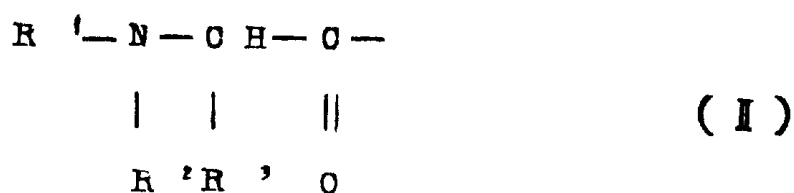
式中

A = α_1) 指氢，($\alpha_1 \sim \alpha_8$) 一烷基，($\alpha_1 \sim \alpha_8$) 一链烷酰基、($\alpha_1 \sim \alpha_8$) 一烷氧羰基或($\alpha_1 \sim \alpha_8$) 一烷基磺酰基，各基团中1、2或3个氢原子可任选地被如下的1、2或3个相同或相异的基团取代：羧基、氨基、($\alpha_1 \sim \alpha_4$) 一烷基，($\alpha_1 \sim \alpha_4$) 一烷氨基，羟基，($\alpha_1 \sim \alpha_4$) 一烷氧基，卤素、二-($\alpha_1 \sim$

α_4)—烷基氨基, 氨基甲酰基, 氨基磺酰基, $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷氧羰基, $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基和 $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基— $(\alpha_1 \sim \alpha_5)$ —烷基; 或者在前述的基团中的1个氢原子任选地被如下基团取代: $(\alpha_3 \sim \alpha_8)$ —环烷基, $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基磺酰基, $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基亚磺酰基, $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基— $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基磺酰基, $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基— $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基亚磺酰基, $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳氧基, $(\alpha_3 \sim \alpha_9)$ —杂芳基和 $(\alpha_3 \sim \alpha_9)$ —杂芳氧基; 或者在前述的基团中1个或2个氢原子任选地被如下的一个或二个相同或相异的基团取代: 羧基、氨基、 $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基氨基、羟基、 $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷氧基、卤素, 二— $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基氨基, 氨基甲酰基, 氨基磺酰基, $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷氧羰基, $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基和 $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基— $(\alpha_1 \sim \alpha_5)$ —烷基,

α_2 系指 $(\alpha_3 \sim \alpha_8)$ 环烷基, 氨基甲酰基 (氮可任选地被 $(\alpha_1 \sim \alpha_6)$ —烷基或 $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基取代), $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基, $(\alpha_7 \sim \alpha_{12})$ —芳酰基, $(\alpha_6 \sim \alpha_{12})$ —芳基磺酰基, $(\alpha_3 \sim \alpha_9)$ —杂芳基或 $(\alpha_3 \sim \alpha_9)$ —杂芳酰基, 其中在 (α_1) 和 α_2) 定义的基团中每个芳基、杂芳基、芳酰基、芳基磺酰基和杂芳酰基可任选地被如下的1, 2, 3或4个相同或相异的基团取代: 羧基, 氨基、硝基、 $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基氨基, 羟基 $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基、 $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷氧基、卤素、氰基、二— $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷基氨基、氨基甲酰基、氨基磺酰基和 $(\alpha_1 \sim \alpha_4)$ —烷氧羰基,

α_3) 代表式 I 的基团



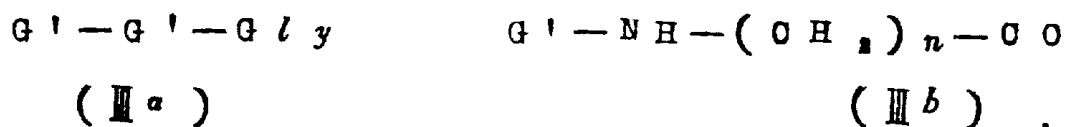
R' 的含义如 α_1) 和 α_2) 中所述的 A,

R'' 为氢或甲基,

R''' 为氢或 ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$) 一烷基, 最好是 ($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$) 一烷基, 烷基可任选地被如下基团单取代: 氨基, 取代的氨基, 羟基, 羧基, 氨基甲酰基, 胍基, 取代的胍基, 脲基, 巯基, 甲硫基, 苯基, 4-氟苯基, 4-氯苯基, 4-硝基苯基, 4-甲氧基苯基, 4-羟基苯基, 苯二甲酰亚氨基, 4-咪唑基, 3-吡啶基, 2-噻吩基, 3-噻吩基, 2-吡啶基, 3-吡啶基或环己基。其中, 取代的氨基代表化合物 $-\text{NH}-\text{A}$, 取代的胍基代表化合物 $-\text{NH}-\text{O}(\text{NH})-\text{NH}-\text{A}$, A 的含义如 α_1) 或 α_2) 中所述;

B 代表一个碱性的氨基酸, 为 L-或 D-构型, 其侧链上可被取代基取代;

O 代表式 III a 或 III b 的化合物



式中 G' 各自独立地代表式 IV 的基团



IV 式中 R' 和 R'' 同与其相连的原子共同构成具有 2~15 个碳原子的单环、双环或三环杂环系统, n 为 2~8,

E 代表芳香氨基酸,

F 各自独立地代表中性的、酸性的或碱性的, 脂肪族的或芳香族的氨基酸基, 氨基酸的侧链可以被取代, F 或者是直接键连结,

(D) —Ph 代表 D-苯丙氨酸, 苯环上可任选地被取代,

G 的含义与上述 G' 的相同, 或是直接键连结,

F' 如 F 的定义, 为 —NH—(OH_n)_n—基团, n=2~8, 或者若 G 不是直接键连结, F' 为直接键连结,

I 为 —OH, —NH₂ 或 —NHCO₂H₂,

K 系指 —NH—(OH_n)_x—OO—基团, x=1~4, 或为直接键连结,

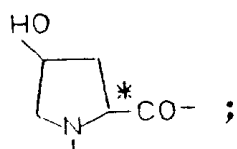
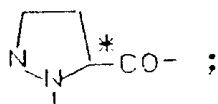
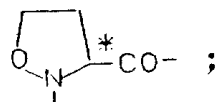
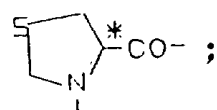
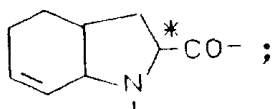
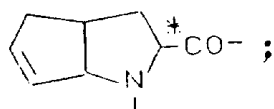
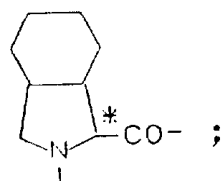
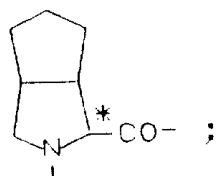
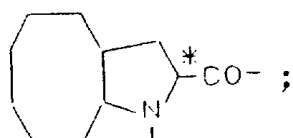
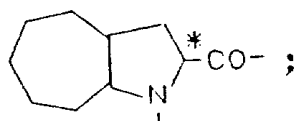
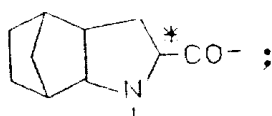
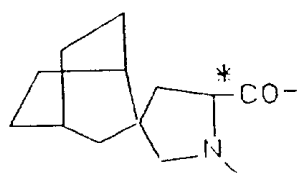
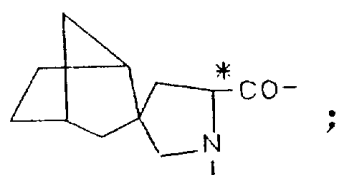
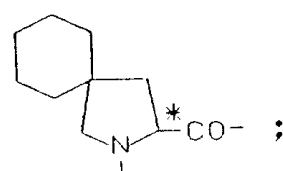
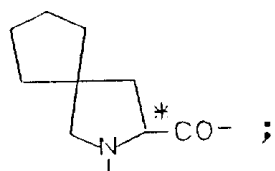
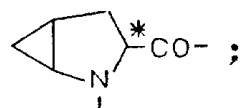
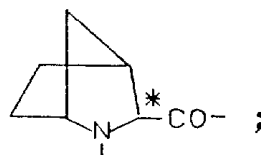
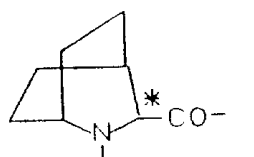
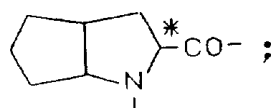
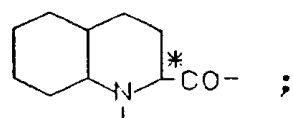
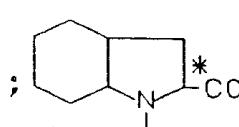
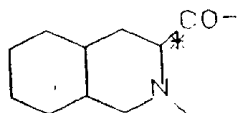
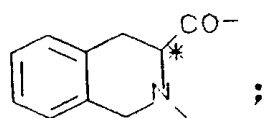
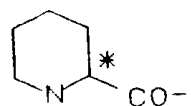
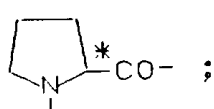
M 的含义与 F 的相同。

若未另行指出, 未指明立体构型的氨基酸基的缩写都代表 L-构型 (见 Schröder, Lübke, 肽, 卷 I, 纽约 1965, XII—XXIII 页; Houben—Weyl, “有机化学方法”, 卷 XV/1 和 2, 斯图加特 1974), 例如,

Aad, Abu, rAbu, ABz, 2ABz, eAca, Ach, AcP, Adpd, Ahb,
Atb, βAtb, Ala, βAla, ΔAla, Alg, All, Ama, Amt, APe,
APm, Apr, Arg, Asn, Asp, Asu, Aze, Azi, Bat, Bph, Can,
Cit, Cys, Cytα, Daad, Dab, Dadd, Dap, Dapm, Dasu,
Djen, DPa, Dtr, Fel, Gln, Glu, Gly, Guv, hAla, hArg, hCys,
hGln, hGlu, Hts, hIle, hLeu, hLys, hMet, hPhe, hPro,
hSer, hThr, hTrp, hTyr, Hyl, Hyp, 3Hyp, Ile, Ise, Iva,

Kyn, Lant, Lcn, Leu, Lsg, Lys, β Lys, Δ Lys,
 Met, Mtm, Min, nArg, Nle, Nva, Oly, Orn, Pan,
 Per, Pen, Phe, Phg, Phe, Pro, Δ Pro, Pse,
 Pys, Pyr, Pza, Qin, Ros, Sar, Sec, Sem, Ser,
 Thi, β Thi, Thr, Thy, Thx, Tia, Tle, Tly, Trp,
 Trta, Tyr, Val.

式IV的杂环系统的适宜的基团,尤其是如下的杂环基团:吡咯烷
 —2—羧酸, 哌啶—2—羧酸, 1,2,3,4—四氢异喹啉—3—
 羧酸, 十氢异喹啉—3—羧酸, 八氢吲哚—2—羧酸, 十氢喹啉—2—
 羧酸, 八氢环戊并[*b*]吡咯—2—羧酸, 2—氮杂—双环并
 [2,2,2]辛烷—3—羧酸, 2—氮杂双环并[2,2,1]庚
 烷—3—羧酸, 2—氮杂双环并[3,1,0]己烷—3—羧酸, 2
 —氮杂螺[4,4]壬烷—3—羧酸, 2—氮杂螺[4,5]癸烷—
 3—羧酸, 螺[(双环[2,2,1]—庚烷)—2,3—吡咯烷—
 5—羧酸], 螺[(双环[2,2,2]—辛烷)—2,3—吡咯烷
 —5—羧酸], 2—氮杂三环[4,3,0,1^{6,9}]癸烷—3—羧
 酸, 十氢环庚并[*b*]吡咯—2—羧酸, 十氢环辛并[*b*]吡咯—2
 —羧酸, 八氢环戊并[0]吡咯—2—羧酸, 八氢异吲哚—1—羧酸,
 2,3,3 α ,4,6 α —六氢环戊并[*b*]吡咯—2—羧酸,
 2,3,3 α ,4,5,7 α —六氢吲哚—2—羧酸, 四氢噻唑—4
 —羧酸, 异噻唑啉—3—羧酸, 吡唑啉—3—羧酸, 羟基脯氨酸—2
 —羧酸, 所有这些都可选取代。



基于上述基团的杂环是已知的，例如来自US-A-4,344,949, US-A-4,374,847, US-A-4,350,704, EP-A-50,800, EP-A-31,741, EP-A-51,020, EP-A-49,658, EP-A-49,605, EP-A-29,488, EP-A-46,953, EP-A-52,870, EP-A-271,865, DE-A-3,226,768, DE-A-3,151,690, DE-A-3,210,496, DE-A-3,211,397, DE-A-3,211,676, DE-A-3,227,055, DE-A-3,242,151, DE-A-3,246,503和DE-A-3,246,757。

某些杂环还在DE-A-3,818,850.3中提及了。

除非另行指出，在各个情况下烷基可以是直链或支链。这也同样适用于由烷基衍生出的基团，如烷氧基、芳烷基和链烷酰基。

($O_6 \sim O_{12}$)—芳基最好是苯基、萘基或联苯基。由此而衍生出的基团，如芳氧基，芳烷基或芳酰基也同样是这样。

卤素代表氟、氯、溴或碘，最好是氯。

可用的盐有，特别是碱金属或碱土金属的盐，与生理可容的胺形成盐，与无机或有机酸形成的盐，例如， HCl ， HBr ， H_2SO_4 ， H_3PO_4 ，马来酸，富马酸，柠檬酸，酒石酸和乙酸。

式I的优选的肽类是这些化合物，其中

B代表精氨酸(Arg)，赖氨酸(Lys)，鸟氨酸(Orn)，

2, 4-二氨基丁酰基或 L-高精氨酸基, 在每种情况下侧链上的氨基或胍基可被 α_1) 或 α_2) 中所述的 A 取代,

E 代表 L-或 D-构型的芳香氨基酸基, 芳环上含有 6~14 个碳原子的环系, 例如苯丙氨酸 (可任选地在 2-、3-或 4-位被卤素取代), 酪氨酸, O-甲基酪氨酸, 2-噻吩丙氨酸, 2-吡啶丙氨酸或萘丙氨酸。

F' 系指 L-或 D-构型的碱性氨基酸基, 例如 Arg 或 Lys, 其侧链上的胍基或氨基可被 α_1) 或 α_2) 中所述的 A 取代, F' 或是一 $\text{NH}-(\text{CH}_2)_n$ -基团, $n=2\sim 8$,

K 代表一 $\text{NH}-(\text{CH}_2)_x-\text{OO}$ -基团, $x=2\sim 4$, 或者是直接键连结,

(D)-Ph 系指 D-苯丙氨酸, 在苯环上可任选地被卤素或 ($\text{O}_1\sim\text{O}_4$)-烷氧基取代。

式 I 的特别优选的肽类是这些化合物, 其中

B 为 Arg, Orn 或 Lys, 其侧链上的胍基或氨基或未被取代或可被如下基团取代: ($\text{O}_1\sim\text{O}_8$)-链烷酰基, ($\text{O}_7\sim\text{O}_{18}$)-芳酰基, ($\text{O}_8\sim\text{O}_9$)-杂芳酰基, ($\text{O}_1\sim\text{O}_8$)-烷基磺酰基或 ($\text{O}_8\sim\text{O}_{18}$)-芳基磺酰基, 这里的芳基、杂芳基、芳酰基、芳磺酰基和杂芳酰基可任选地被 1, 2, 3 或 4 个相同或相异的如 α_2) 中所述的基团取代,

E 系指苯丙氨酸, 2-氟苯丙氨酸, 3-氟苯丙氨酸, 4-氟苯丙氨酸, 2-氟苯丙氨酸, 3-氟苯丙氨酸, 4-氟苯丙氨酸, 酪氨酸, O-甲基酪氨酸或 β -(2-噻吩基)丙氨酸,

K 代表直接键连接;

M代表直接键联，

(D)-Phe 代表 D-苯丙氨酸，可任选地被氟、氯、溴或甲氧基取代。

式 I 的多肽中最为特别优选的化合物是，其中

A 代表氢，(D)-或(L)-H-Arg，(D)-或(L)-H-Lys，或(D)-或(L)-H-Orn，

B 代表 Arg，Orn 或 Lys，其侧链上的胍基或氨基可不被取代或可被如下基团取代：氢，(O₁~O₈)-链烷酰基，(O₇~O₁₂)-芳酰基，(O₈~O₉)-杂芳酰基，(O₁~O₈)-烷基磺酰基或(O₈~O₁₂)-芳基磺酰基，这里的芳基，杂芳基，芳酰基，芳基磺酰基和杂芳酰基可任选地被 1, 2, 3 或 4 个相同或相异的甲基，甲氧基和卤素取代，

O 系指 Pro-Pro-Gly (甘氨酸)，Hyp (羟脯氨酸)-Pro-Gly 或 Pro-Hyp-Gly，

E 系指 Phe 或 Thia；

F 系指 Ser (丝氨酸)，HSer，Lys，Leu，Val，Nle，Ile 或 Thr；

K 代表直接键联，

M 代表直接键联，

G 代表式 IV 的杂环基，优选的杂环基有：吡咯烷-2-羧酸，哌啶-2-羧酸，1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸，顺-和反-十氢异喹啉-3-羧酸，顺-内-、顺-外-、反-八氢吲哚-2-羧酸，顺-内-、顺-外-、反-八氢环戊并[*b*]吡咯-2-羧酸或羟基脯氨酸-2-羧酸，

F' 系指 *Arg*'

I 代表 OH'

(D)-*Ph e* 代表 D-苯丙氨酸。

本发明还涉及式 I 的肽类的制备方法，其特征是：

a) C-一端上有游离羧基或其活化衍生物的氨基酸片断与 N-一端有游离氨基的合适的氨基酸片断反应，

b) 分步合成肽类，按照 (a) 或 (b) 得到的化合物，任选地裂解掉一个或多个为保护其它官能团而暂时引入的保护基团，并任选地将这样得到的式 I 化合物转变成生理可容性盐。

本发明的肽类可用一般已知的肽化学方法制备，例如参见 Houben — Weyl, “有机化学方法”，卷 15/2。优选的方法是用固相合成法，如 B. Merrifield 于 J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963) 或 R. O. Sheppard, 于 Int. J. Peptide Protein Res. 21 118 (1983) 中所述，或者用等效的已知方法制备，作为 α -氨基的保护基可用脲烷保护基，例如叔-丁氧羰基 (BOC) 或苄氧羰基 (Fmoc) 保护基。若需防止副反应发生或为了合成特定的肽类，要用适宜的保护基对氨基酸的侧链上的功能基再进行保护 (例如见 T. W. Greene, “有机合成中的保护基团”)，主要用：

Arg (Tos), *Arg* (Mts), *Arg* (Mtr),
Arg (Pmc), *Asp* (OBzl), *Asp* (OBut),
Gly (4-MeBzl), *Gly* (Arm), *Gly* (SBut)
Glu (OBzl), *Glu* (OBut), *His* (Tos),
His (Fmoc), *His* (Dnp), *His* (Trt),

Lys (O^t-Z), Lys (Boc), Met (O), Ser (Bzl), Ser (But), Thr (Bzl), Thr (But), Trp (Mts), Trp (OH^o), Tyr (Br-Z), Tyr (Bzl) 或 Tyr (But)。

固相合成法从肽的 O 一端开始，将保护的氨基酸与一种适宜的树脂偶联，这类原料的获得，是将保护的氨基酸经酯或酰胺键与经氯甲基、羟甲基、二苯甲氨基 (BHA) 或甲基二苯甲氨基 (MBHA) 改性的聚苯乙烯或聚丙烯酰胺树脂相连结。作为载体物质使用的树脂可市售买到。若被合成的肽在 O 一端有游离的酰胺基时，通常要用 BHA 和 MBHA 树脂。若肽的 O 一端有仲酰胺基，要用氯甲基或羟甲基树脂，并用相应的胺进行裂解。若希望得到例如乙胺的酰胺，则可用乙胺将肽自树脂上裂解掉，然后用其它适宜的试剂将侧链上的保护基裂解掉。若想保留肽的氨基酸侧链上的叔丁基保护基，可用例如 R. O. Shepard 在 J. Org. Chem. Soc. Chem. Comm. 1982 587 中所述的方法，合成时间用 Fmoc 保护基暂时地保护氨基酸的 α-氨基，精氨酸的胍基用吡啶高氯酸盐经质子化保护，侧链上的其它功能氨基酸的保护用苄基保护基，苄基用催化转移氢化方法裂解掉 (A. Fel, x 等, J. Org. Chem. 13, 4194 (1978))，或在液氨中用钠裂解 (W. Roberts, J. Am. Chem. Soc., 76, 6203 (1954))。

用适宜的试剂将偶联在树脂上的氨基酸的氨基保护基裂解掉后，例如保护基是 Boc 时用三氟乙酸在二氯甲烷中裂解，Fmoc 保护基用 20% 的吡啶在二甲基甲酰胺的溶液中裂解，然后将保护的氨基酸按所希望的顺序依次偶联，中间生成的 N 一端保护的肽树脂用上述试

剂去保护基后再联结下一个氨基酸衍生物。

用于肽合成中所有可用的活化试剂都可用作偶联剂（例如可参看 *Houben-Weyl*，有机化学方法，卷 15/2），尤其是碳二亚胺类，例如 N, N' -二环己基碳二亚胺， N, N' -二异丙基碳二亚胺或 N -乙基- N' -(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺。在这种情况下偶联作用的进行，可直接地把氨基酸的衍生物和活化试剂以及必要时阻止消旋化的添加剂〔例如 1-羟基-苯并三唑（*HOBt*）（*W. König, R. Geiger, Chem. Ber.* 103, 708 (1970)）或 3-羟基-4-氧代-3,4-二氢苯并三唑（*HOObt*）（*W. König, R. Geiger, Chem. Ber.* 103, 2054 (1970)）〕加到树脂中，或者将氨基酸衍生物分别地预活化成对称酸酐或 *HOBt* 或 *HOObt* 酯，在适宜的溶剂中的活化了了的产物的溶液加到能起偶联的反应的肽树脂中。

氨基酸衍生物与上述活化试剂的偶联或活化作用可在二甲基甲酰胺， N -甲基吡咯烷酮或二氯甲烷或这些溶剂的混合物中进行。被活化的氨基酸衍生物通常用过量 1.5~4 倍。若偶联反应不完成时，可反复进行偶联反应，而不要先进行为偶联下一个氨基酸而必须的去保护操作。

偶联反应成功的程度可用茚三酮反应检验，例如 *E. Kaiser* 等在 *Anal. Biochem.* 34 595 (1970) 中所叙述。合成也可自动化地进行，例如用“应用生物系统”出品的肽合成器 430A 型进行合成，可用仪器厂家提供的合成程序控制反应，或用户自己编制合成程序，用 *Fmoc* 基保护氨基酸衍生物时，后一方法特别适用。

按前述的方法合成了肽以后，可用试剂将肽从树脂上裂解掉，例如用液态氟化氢（优选用于Boc结合成肽）或三氟乙酸（优选用于Fmoc法合成肽），这些试剂不仅将肽自树脂上裂解掉，而且也将氨基酸衍生物的侧链上其它保护基裂解掉。在这种情况下除了使用BHA和MBHA树脂外，得到的肽是游离酸的形式。用BHA或MBHA树脂时，氟化氢或三氟甲烷磺酸裂解得到的肽是酰胺。德国专利申请P 3 7 1 1 8 6 6. 8和P 3 7 4 3 6 2 0. 1叙述了制备肽酰胺的另一方法。这里将肽酰胺自树脂上裂解时，是用肽合成中通常用的中等强度酸（例如三氟乙酸）处理，其中添加有作为捕获阳离子的物质，如苯酚，甲酚，硫代甲酚，苯甲醚，硫代苯甲醚，乙二硫醇，二甲硫醚，甲乙硫醚，或者固相合成中常用的其它阳离子捕获剂单个地或以二个或多个这类辅助物的混合物形式加入，在这种情况下，三氟乙酸可用适当的溶剂，如二氯甲烷加以稀释。

若肽的侧链上要保留叔丁基或苄基保护基时，需用1%三氟乙酸在二氯甲烷的溶液对合成在特殊改性的载体树脂上的肽进行裂解，如R. O. Sheppard在J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1982, 587中所述，若要保留单个的叔丁基或苄基侧链保护基，应使用适当组合的合成和裂解方法。

为了合成具有O-端酰氨基或 ω -氨基或 ω -胍烷基的肽时，同样用Sheppard所述的改性的树脂。合成后，将侧链完全被保护的肽自树脂上裂解掉，然后用经典的合成法与适宜的胺或 ω -氨基烷胺或 ω -胍基烷胺反应，此时对存在的其它任选功能基可用已知的方法作暂时性保护。

在欧洲专利EP-A 2 6 4 8 0 2中还叙述了具有 ω -氨基

烷基的肽类的另外的制备方法。

本发明的肽类的合成，最好用固相法按两种一般的保护基方法进行。

用“*Applied Biosystems*”出品的肽自动合成器 430 A 型进行合成，用 *Boc*—或 *Fmoc*—保护基对 α —氨基作暂时性保护。

用 *Boc* 作保护基时，按合成器厂家提供的预先程序化的合成顺序进行合成。

C—端具有游离羧基的肽的合成可在“*Applied Biosystems*”厂出品的用相应的 *Boc* 氨基酸功能化的 4—(羟甲基)苯乙酰胺甲基聚苯乙烯树脂上进行 (R. B. Merrifield, J. Org. Chem. 43, 2845 (1978))。该公司出品的 MBHA 树脂可用于制备肽酰胺。N, N'—二环己基碳二亚胺或 N, N'—二异丙基碳二亚胺被用作活化试剂。活化作用是在 CH_2Cl_2 —DMF 混合液或 NMP 中以对称酸酐、HOBt 酯或 HOObt 酯的形式进行。为进行偶联反应，要用 2~4 当量的活化的氨基酸衍生物。若偶联反应进行得不完全，可反复进行反应。

用 *Fmoc*—保护基对 α —氨基作暂时性保护合成肽时，用我们自己的合成程序在“*Applied Biosystems*”出品的肽自动合成器 430 A 型上进行，该合成在 Bachem 公司出品的 P—苄氧苄醇树脂上进行 (S. Wang, J. Am. Chem. Soc. 95, 1328 (1973))，该树脂是按已知的方法用适宜的氨基酸酯化过的 (E. Atherton 等, J. Chem. Soc. Chem.

Comm. 1981, 336), 将氨基酸衍生物活化为 HOBt 或 HOObt 酯直接在由合成器制造公司提供的氨基酸包中进行, 把二异丙基碳二亚胺的 DMF 溶液加到预先称重的氨基酸衍生物和 HOBt 或 HOObt 的混合物中。如在 EP-A-247537 中所叙述那样, 所制备的 Fmoc -氨基酸- OObt 酯基本上也可使用。

Fmoc 保护基的裂解是在反应器中用 20% 浓度的哌啶于 DMF 的溶液中进行。所用的反应的氨基酸衍生物的过量值是 1.5~2.5 当量。若偶联反应不完全, 像 Boc 方法一样重复反应。

本发明的肽类单用或者合用时具有的血管舒缓激肽的拮抗作用, 可用各种模式进行试验 (见实验药理手册, 卷 25, Springer 出版社, 1970, p. 53~55), 例如用离体大鼠子宫, 豚鼠回肠或豚鼠的离体肺动脉。

为了用离体肺动脉测定本发明肽类, 将体重为 400~450 g 的豚鼠 (Dunkin Hartley) 猛击后颈处死。

切开喉头, 仔细地剥离出肺动脉, 仔细地除去周围的组织, 将肺动脉以 45° 角螺旋式地切开。

将长 2.5 cm、宽 3~4 mm 的血管条固定在容量为 10 ml 的器官浴中, 浴内放满了林格式浴液,

该溶液的组成按 mmol/l 为

NaCl	154
KCl	5.6
CaCl_2	1.9
NaHCO_3	2.4
葡萄糖	5.0

95% O₂和5% CO₂鼓入溶液中，浴温37℃，pH 7.4，血管条的预载重为1.0g。

等张收缩的变化可用一杠杆装置和Hugo Sachs公司出品的HF modem（位置传感器）检出，并在补偿记录器上记录出（BEO, Goerz Metrawatt SE 460）。

平衡一小时后开始实验。当血管条达到最大灵敏度时（ 2×10^{-5} mol/l 血管舒缓激肽）——血管舒缓激肽使得血管条收缩——，将各个浓度为 $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/l的肽与其作用10分钟，再加入血管舒缓激肽，比较得出血管舒缓激肽的反作用效果的降低。

为了测定局部激动效应，肽的用量为 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/l。

本发明肽类的IC₅₀值是由剂量—效应曲线计算而得，示于表1。

表1

化合物	IC ₅₀ [M]
$\begin{array}{c} \text{H}-(\text{D})\text{Arg}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Hyp}- \\ \text{Gly}-\text{Phe}-\text{Ser}-(\text{D})-\text{Phe} \\ -\text{Oic}-\text{Arg}-\text{OH} \end{array}$	1.4×10^{-5}

本发明肽类的治疗用途包括所有因血管舒缓激肽和血管舒缓激肽相关的肽类所调解，引起或支持的病理状态。这包括特别是损伤，例如外伤，烧伤、皮疹，红斑，水肿，心绞痛，关节炎，哮喘，过敏，

鼻炎，休克，炎症，低血压，疼痛、搔痒和精子活动能力的改变。

因此，本发明涉及式 I 的肽类作为药物的应用，也涉及含有这些化合物的药剂。

药剂含有有效量的式 I 的活性物质——单一或多个合用——以及无机或有机药用赋形剂。

用法可以是经肠或非经肠给药——例如，皮下，肌肉或静脉注射——舌下、表皮、鼻腔、直肠、阴道、口腔或吸入用药。有效物质的剂量取决于哺乳动物的种属，体重、年龄和用药方式。

本发明的药物制剂可用已知的方法制成溶液，混合液，颗粒剂或包衣片剂。

为了口服用药或用于粘膜时，有效化合物与常规的添加剂相混合，例如赋形剂，稳定剂，或惰性稀释剂，并用常规方法做成适宜的用药剂型，例如片剂，包衣片剂，硬胶囊剂，水性、醇性或油性悬浮剂或水性、醇性或油性溶液。可以使用惰性赋形剂是，例如阿拉伯胶，氧化镁，碳酸镁，磷酸钾，乳糖，葡萄糖，富马酸十八烷醇酯镁或淀粉，尤其是玉米淀粉。在这种情况下，该制剂可以是干颗粒也可以是湿颗粒。适宜的油性赋形剂或溶剂例如是植物油或动物油，例如向日葵油和鳕鱼肝油。

局部用药的制剂可以是水性或油性溶液，洗剂、乳剂，胶剂，油膏或脂肪油膏，或者如若可能用喷雾剂，此时必要时加入可以改善粘合力的聚合物。

为了鼻腔给药，化合物可以用常规使用的助剂相混合，例如稳定剂或惰性稀释剂，以用常规方法制成适宜的用药剂型，例如水性、醇性或油性悬浮剂或水性、醇性或油性溶液。螯合剂如乙二胺—N，

N, N', N'—四乙酸, 柠檬酸, 酒石酸或它们的盐可以加到水性鼻剂中。鼻腔用药的溶液可用计量的喷雾器给药, 或用有增粘度成分的滴鼻剂, 或用鼻凝胶, 或用鼻霜。

为了吸入给药, 可以用雾化器或充有惰性载气的压缩气包。

为了静脉、皮下、表皮或皮内注射用药, 有效化合物或它们的生理可溶性盐制成溶液、悬浮液或乳液, 若需要时可加入药剂学上常规用的助剂, 例如调整渗透压或pH剂, 增溶剂, 乳化剂或其它助剂。

某些药物由于在体液内的半衰期较短, 此时用可注射的缓释制剂则有效。可使用的药物剂型例如有, 油性结晶悬浮剂, 微型胶囊, 棒剂或植入剂, 后者可以由同组织兼容的聚合物合成, 特别是可生物降解的聚合物, 例如那些基于聚乳酸/聚羟基乙酸的共聚物或人体白蛋白的聚合物。

局部用药和吸入用药的剂型的适宜剂量是溶液中含有0.01~5mg/ml, 全身用药的合适剂量为0.01~10mg/kg。

缩写字一览表

用于氨基酸的缩写字是肽化学中常规的三字母编码, 如在Europ. J. Biochem 138, 9 (1984)中所述。另外所用的缩写字列于下面:

Ac	乙酰氨基
ε-Ahx	ε-氨基己酰基
Aoc	顺-内-2-氮杂双环并[3, 3, 0]辛烷-3-8-羰基
Boc	叔-丁氧羰基
But	叔丁基

B z l	苄基
O D F	氯代-(D)-苯丙氨酸基
O h a	环己基丙氨酸基
O h g	环己基甘氨酸基
O l - z	4-氯苄氧羰基
D M F	二甲基甲酰胺
D O M T	O-甲基-(D)-苏氨酸基
D n p	2,4-二硝基苯基
F m o c	9-芴甲氧羰基
M D Y	O-甲基-(D)-酪氨酸基
M e	甲基
4 - M e b z l	4-甲基苄基
M t r	4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基
M t s	苯-2-磺酰基
N a l	萘丙酰基
N M P	N-甲基吡咯烷
N p g	新戊基甘氨酸基
O t c	顺-内-八氢吡啶-2-羧基
O p r	异噁唑啉-3-羧基
P a l	吡啶丙氨酸
P m c	2,2,5,7,8-五-甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基
T b g	叔丁基甘氨酸基
T F A	三氟乙酸

T c s	4-甲基苯磺酰基
T h t a	2-噻吩丙氨酰基
T i c	1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羰基
T r t	三苯甲基

下面的实施例是为了对本发明的肽类的固相合成的优选方法加以说明，但本发明并不限于此。

下面的氨基酸衍生物被使用：Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Boc-(D)-Arg-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Hyp-OH, Fmoc-Pro-OObt, Fmoc-Gly-OObt, Fmoc-Phe-OObt, Fmoc-Ser(tBu)-OObt, Fmoc-(D)-Phe-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Aoc-OH, Fmoc-Thia-OH, Fmoc-Opt-OH, Fmoc-(D)-Asn-OH, Fmoc-β-Ala-OH, Fmoc-Oic-OH。

实施例 I

H-(D)-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-(D)-Phe-Oic-Arg-OH的合成是分步进行的，用“Applied Biosystems”出品的430型肽合成器、Fmoc方法，在Novabiochem出品的经Fmoc-Arg

(Mtr)-OH酯化的P-苄氧苄醇树脂(树脂载量 0.5 mmol/g)上合成。用树脂 1 g ，合成是在Fmoc法改良的合成程序控制下进行的。

在每种情况下 1 mmol 的有游离羧基的氨基酸衍生物和 0.95 mmol 的HOObt称量到合成器筒内。通过用 4 ml DMF溶解并在DMF中加入 2 ml 0.55 mmol 二异丙基碳二亚胺的方法直接在筒内予活化这些氨基酸。

其它氨基酸的HOObt酯溶解在 6 ml NMP中，然后按类似的如同氨基酸就地预活化方法，偶联到预先用 20% 哌啶在DMF中的溶液脱去保护基的树脂上，合成完毕后，用作为阳离子捕获剂的硫代苯甲醚和乙二硫醇使生成的肽从树脂上裂解掉，同时用三氟乙酸除去侧链上的保护基。去掉三氟乙酸得到的残留物反复用乙酸乙酯溶解并离心。留下的剩余物在交联葡聚糖凝胶^① LH20上用 10% 乙酸进行层析。含有纯肽的组分合并后冷冻干燥。

MS(FAB): 1292.4 (M+H) 。