

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 5/113

A61P 43/00 C07K 7/04

A61K 38/07 A61K 38/08



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00116876.2

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1154656C

[22] 申请日 2000.6.30 [21] 申请号 00116876.2

[71] 专利权人 上海中科英泰生物技术有限公司

地址 201203 上海市张江高科技园区郭守敬路 351 号 651-17 室

[72] 发明人 杜雨苍 沈金焕

审查员 于 群

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 费开逵

权利要求书 1 页 说明书 6 页

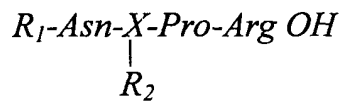
[54] 发明名称 一类记忆增强肽和它们的用途

[57] 摘要

本发明对记忆增强肽通过化学合成多肽结构改进，通过动物试验证明该类化合物具有较明显的生理活性有望对改善成年人智力障碍或健忘症并促进未成年儿童的智力发育，甚至可为老年痴呆患者的临床药物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、一类记忆增强肽，其特征在于它的化学结构式为



$X$  为 *Ala; Leu; Ile; Cys; Phe; Tyr; Val;*

$R_1$  为 *PyroGlu; H;*

$R_2$  为 *S-S-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>* 或 *S-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.*

- 2、根据权利要求 1 所述的一类记忆增强肽的制备方法，其特征在于该方法为固相多肽合成法或液相多肽合成法。

- 3、根据权利要求 1 所述的一类记忆增强肽在制备改善记忆障碍或促进儿童智力发育的药物或保健品中的应用。

## 一类记忆增强肽和它们的用途

### (一) 技术领域

本发明涉及多肽及它的类似物的合成,更具体的说是记忆增强肽和它的类似物的合成与应用。

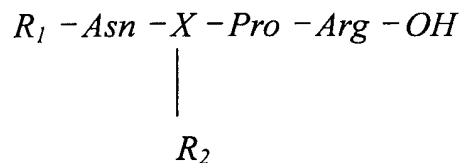
### (二) 背景技术

有关垂体后叶加压素 (AVP) 等多肽能影响动物的记忆过程,而对学习未发现有明显作用已经有了报导。由于 AVP 是一类增加血压和抗利尿的体内激素,因此它不适合用于增强记忆方面的临床治病,为此我们在发明专利记忆增强肽及其应用 (ZL 93112493.X) 的基础上,继续对其结构进行改造,药理试验,希望能改进现有专利存在的缺陷,寻找出结构简单、生产便利、药理作用更强的新记忆增强肽,能在临床上对未成年儿童智力发育,改善成年人智力障碍或健忘症,促进人的记忆功能。

### (三) 发明内容

本发明目的是提供一类能增加记忆的记忆增强肽,促进未成年儿童的智力发育,改善成年人智力障碍或健忘症,甚至作为对老年性痴呆患者病情的改善的药物。

本发明结合生物活性的测定设计出一类具有记忆、学习功能的新化合物,它的结构通式如下:



$X$  为 *Ala*, *Leu*; *Ile*; *Cys*; *Phe*; *Tyr*; *Val*;

$R_1$  为 *PyroGlu*; *H*

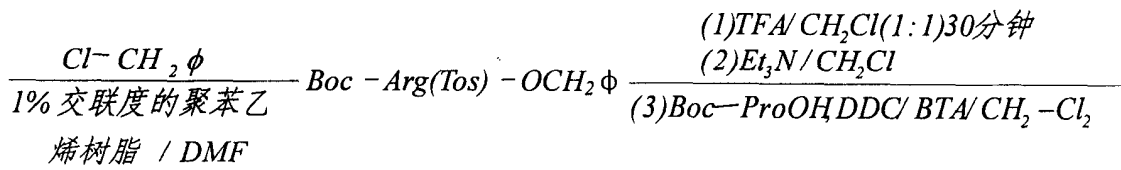
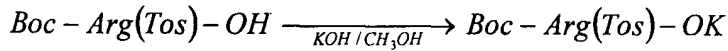
$R_2$  为  $S - S - (CH_3)_3$  或  $S - (CH_3)_3$ 。

本发明可通过固相多肽合成法或液相多肽合成法逐步合成制得,以下是合

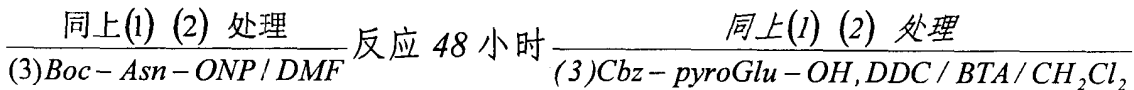
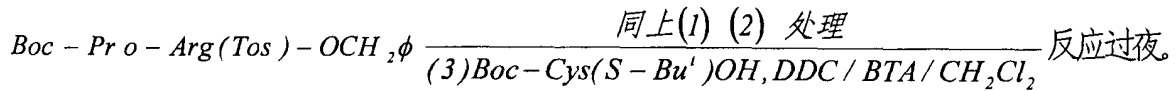
成步骤:

1、 *PyroGlu-Asn-Cys-Pro-Arg(I)* 肽的合成  

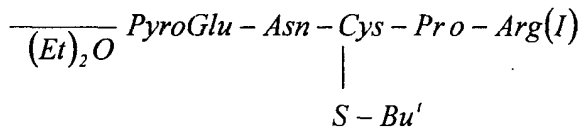
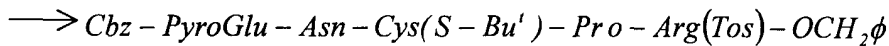
$$\begin{array}{c} | \\ S-Bu' \end{array}$$



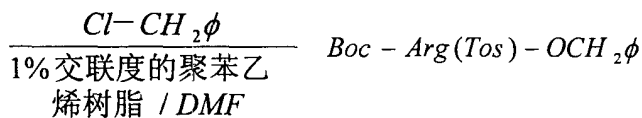
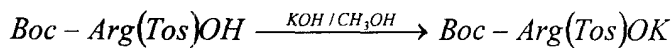
反应过夜。



反应过夜。



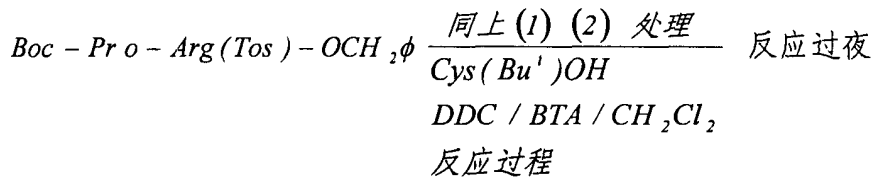
2、 *Asn·Cys(Bu')·Pro·Arg* 的化学合成



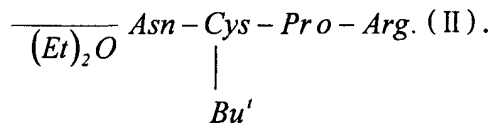
(1) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1:1)30分钟

(2) Et<sub>3</sub>N/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

(3) Boc-Pro-OH, DDC / BTA / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 反应过夜,



同上 1, 2 处理。



本发明所合成的记忆增强肽的药理试验采用分成给药组、对照组及模型组三组动物分别给记忆肽、生理盐水、生理盐水及东莨菪硷等实验组,除对照组外的各组动物在给药后 50 分钟注射东莨菪硷,10 分钟后开始训练,将动物放入反应箱内适应环境 3 分钟,然后即通以 36V 的交流电。动物受到电击,其正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激,多数动物可能再次或多次跳至铜栅上,受到电击又迅速跳回平台上,反复训练 5 分钟记录第一次跳下平台的潜伏期和 5 分钟内的错误次数以此作为学习成绩。24 小时后重新测验,以此作为记忆保持测验。实验证明从表 1 可见,记忆增强肽能明显改善东莨菪硷所致小白鼠学习记忆功能障碍。

与模型组比较 0.5  $\mu\text{g}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  剂量,记忆增强肽明显改善东莨菪硷所致的学习记忆障碍,其潜伏期的延长和错误次数的减少均有显著性差异( $P < 0.01$ )与石杉硷甲(100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )比较;记忆增强肽(0.5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )对东莨菪硷所致学习障碍的改善作用比石杉硷甲好。

表1 记忆肽 MEP-531 对小白鼠学习记忆的影响

组别	给药剂量 μg/Kg	东莨菪硷 mg/Kg	学习 成绩		记忆 成绩	
			潜伏期 (s)	错误次数	潜伏期 (s)	错误次数
对照组	生理盐水	-	131.4 ± 98.3	0.9 ± 0.87	285.4 ± 22.6	0.4 ± 0.51
模型组	生理盐水	1	27.5 ± 29.4 ▲▲	2.3 ± 1.4 ▲	140 ± 117 ▲▲	1.9 ± 1.2 ▲▲
石杉硷甲	100	1	120.5 ± 114.9*	1.3 ± 2.3**	231.9 ± 78**	0.9 ± 0.7**
MEP-531	0.25	1	78.8 ± 118.7	0.3 ± 0.48**	197.6 ± 75.1	0.9 ± 0.56**
MEP-531	0.5	1	241.6 ± 51.9**	0.2 ± 0.4**	245.5 ± 62.9**	0.5 ± 0.5**
MEP-531	1	1	267.6 ± 31.4**	0.3 ± 0.5**	282.8 ± 33.4**	0.3 ± 0.5**

▲ < 0.05, ▲▲ < 0.01, 与对照组比较

\* < 0.05, \*\* < 0.01, 与模型组比较

由此可看出, 本发明的一类记忆增强肽可用于制备改善记忆障碍或促进儿童智力发育的药物或保健品。

#### (四) 具体实施方式

##### 实施例 1

*Asn·Cys(Bu')·Pro·Arg (MEP422)* 的化学合成

2g Merrifield Resin 开始采用 Boc-系统逐步固相法合成。

首先从  $Boc-Arg(Tos)OH \xrightarrow{KOH/CH_2OH} Boc-Arg(Tos)OK$

$\xrightarrow[1\% \text{ 交联度的聚苯乙烯树脂 / DMF}]{Cl-CH_2\phi} Boc-Arg(Tos)-OCH_2\phi$

(1)  $TFA/CH_2Cl_2(1:1)$  30 分钟

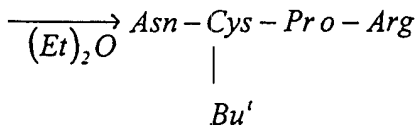
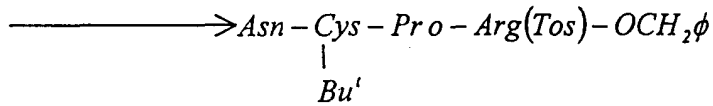
(2)  $Et_3N/CH_2Cl_2$

(3)  $Boc-Pro-OH, DDC / BTA / CH_2Cl_2$  反应过夜,  $\longrightarrow Boc-Pro-Arg(Tos)-OCH_2\phi$

同上①, ②步处理

$\alpha$ -N-叔丁氧羰基  $\beta$ -叔丁硫醚代-L-丙氨酸  $Cys(Bu')-OH$  DDC / BTA /  $CH_2Cl_2$  反应

过夜  $\xrightarrow[\text{(3) Boc-Asn-ONP / DMF}]{\text{同上1,2处理}}$  反应 48 小时



上述粗产物经硅胶柱 (Silicagel60) 分离纯化, 纯化过的产物再经  $C_{18}$  HPLC 分离纯化, HPLC 层析中的出峰时间为 19.1 分钟, 溶剂系统为 TFA/乙腈系统。

氨基酸组成合理, 分析结果如下:

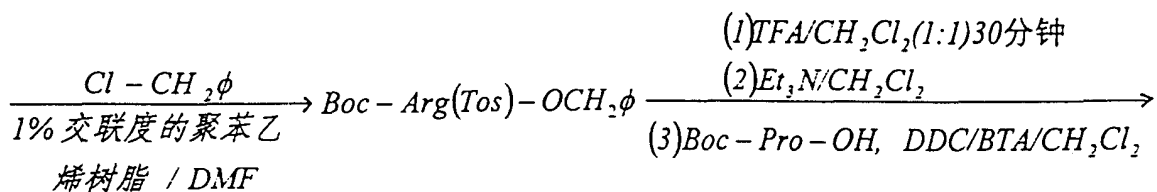
实验值:	Asn: 1.05	Arg: 0.96	Pro: 1.08	Cys: 未测
理论:	Asn: 1.00	Arg: 1.00	Pro: 1.00	
质谱分析: 分子离子峰 544.3				

X 为 Ala; Leu; Ile; Phe; Tyr; Val 时, 同样可采用上述方法制得相应产物。

实施例 2 PyroGlu-Asn·Cys(S-Bu')·Pro·Arg(MEP531) 的化学合成

2g Merrifield Resin 开始采用 Boc 系统逐步固相法合成

首先从  $\text{Boc-Arg}(\text{Tos})-\text{OH} \xrightarrow[\text{CH}_3\text{OH}]{\text{KOH}} \text{Boc-Arg}(\text{Tos})\text{OK}^-$



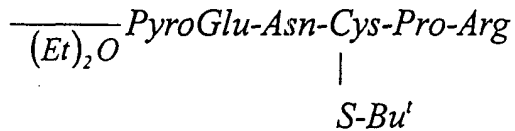
反应过夜  $\longrightarrow$   $Boc-Pro-Arg(Tos)-OCH_2\phi$

同上①, ②步处理

③  $\alpha$ -N-叔丁氧羰基  $\beta$ -叔丁硫代-L-丙氨酸  $\xrightarrow{\text{反应过夜}} \xrightarrow{\text{同上1,2处理}} Boc-Asn-ONP/DMF$   
 $Boc-Cys(S-Bu')OH, DDC/BTA/CH_2Cl_2$

反应 48 小时  $\xrightarrow{\text{同上1,2处理}} \xrightarrow{\text{反应过夜}} Cbz-PyroGlu-OH, DDC/BTA/CH_2Cl_2$

$\longrightarrow Cbz-PyroGlu-Asn-Cys(S-Bu')-Pro-Arg(Tos)OCH_2\phi$



通过上述反应得五肽粗品, 经硅胶柱层析分离纯化再经  $C_{18}$  HPLC 分离纯化, HPLC 层析中的出峰时间为 19.5 分钟, 溶剂系统为 TEA/乙腈系统。氨基酸组成合理, 分析结果如下:

实验值:	Asn: 1.01	Glu: 1.03	Arg: 0.96	Pro: 0.95	Cys: 未测
理论:	Asn: 1.00	Glu: 1.00	Arg: 1.00	Pro: 1.00	
质谱分析: 分子离子峰 687					

$X$  为 *Ala*; *Leu*; *Ile*; *Phe*; *Tyr*; *Val* 时, 同样可采用上述方法制得相应产物。