



(12) 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89103990.2

[91] Int. Cl.⁴
C07K 7/08

[43] 公开日 1990年1月17日

[22] 申请日 89.6.12

[30] 优先权

[32] 88.6.14 [33] HU [31] 3037/88

[71] 申请人 里希特 热代翁 委诺埃斯蒂 吉阿 R·T

地址 匈牙利布达佩斯

[72] 发明人 伊什特万·舍恩

奥尔加·尼基·内·库普林娜

拉约什·基什福卢迪

拉斯洛·代内什

捷尔吉·哈琼斯

拉斯洛·绍博尔斯卡

[74] 专利代理机构 上海专利事务所

代理人 吴小燕

C07K 7/00 A61K 37/02

说明书页数: 16 附图页数:

[54] 发明名称 抑制免疫系统功能的新型肽, 含有它们的药物组合物及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及能抑制免疫系统功能的新型肽和它们的酸加成盐, 含有这些肽的药物组合物以及制备这些肽和组合物的方法。

新型肽对于治疗需要减少免疫系统的活性的疾病是有用的。

< 20 >

权 利 要 求 书

1. 抑制免疫系统的功能的肽，其特征在于它为分子式(1) — (16)

的肽：	D-Arg-Lys-D-Asp,	(1)
	Arg-D-Lys-Asp,	(2)
	D-Arg-D-Lys-D-Asp,	(3)
	Arg-D-Lys-D -Asp,	(4)
	D-Arg-Lys-Asp,	(5)
	D-Arg-D-Lys-Asp,	(6)
	Arg-Lys-D-Asp,	(7)
	Arg-Lys-D-Asp-Val,	(8)
	Arg-Lys-Asp-D-Val,	(9)
	D-Arg-Lys-Asp-Val,	(10)
	Arg-D-Lys-Asp-Val,	(11)
	Lys(Arg)-Asp,	(12)
	Lys(Arg)-D-Asp,	(13)
	Arg-Lys(Arg)-Asp,	(14)
	Arg-Lys-Asp(Val),	(15) 和
	Arg-Lys-D-Asp(Val)	(16)

以及能抑制免疫系统功能的它们的酸加成盐。

2. 一种能抑制免疫系统功能的药物组合物，其特征在于它包括呈游离或酸加成盐形式的，作为活性组分的如权利要求1中所定义的分
子式(1) — (16)的一种或多种肽，它以治疗有效的量与稀释剂、填料、
稳定剂、影响 pH和渗透压的作用剂以及添加剂和能促使配方可于药
物工业通常应用的辅助材料混合。

3. 一种制备分子式(1) — (16)的新型肽：

D-Arg-Lys-D-Asp,	(1)
Arg-D-Lys-Asp,	(2)
D-Arg-D-Lys-D-Asp,	(3)
Arg-D-Lys-D -Asp,	(4)
D-Arg-Lys-Asp,	(5)
D-Arg-D-Lys-Asp,	(6)
Arg-Lys-D-Asp,	(7)
Arg-Lys-D-Asp-Val	(8)
Arg-Lys-Asp-D-Val,	(9)
D-Arg-Lys-Asp-Val,	(10)
Arg-D-Lys-Asp-Val,	(11)

- Lys(Arg)-Asp, (12)
 Lys(Arg)-D-Asp, (13)
 Arg-Lys(Arg)-Asp, (14)
 Arg-Lys-Asp(Val), (15) 和
 Arg-Lys-D-Asp(Val) (16)

以及它们的酸加成盐的方法，其特征在于它包括逐步采用活性酯方法和/或混合酸酐方法的偶合步骤，以及结合氨基的步骤。

(a) 从以含有可通过氢化或酸解而除去的基团所酯化的羧基的 C 末端氨基酸衍生物，和随机地，一种保护的侧链氨基和/或一种或多种通过氢化或酸解可除去的基团所酯化的羧基和一种游离氨基开始，得到分子式(1) — (16)的肽的衍生物，它们的羧基上进行了酯化，在不包含于肽链中的侧链氨基上具有保护基团 Boc和/或 Z。

(b) 然后，通过氢化和/或酸解除去所存在的保护基团，和

(c) 如果需要的话，通过用酸处理将分子式(1) — (16)的游离肽转化成它们的酸加成盐。

4.如权利要求3所述的方法，其特征在于它包括在活化酯偶合方法中使用由 N- 羧基琥珀酰亚胺所保护的酯。

5.如权利要求3所述的方法，其特征在于它包括在混合酸酐偶合方法中使用用氯甲酸异丁基酯所形成的混合酸酐。

6.如权利要求3 — 5 中任一项所述的方法，其特征在于它包括制备在不包含于肽链中的氨基上具有保护基团 Z，和在羧基上具有苄基或硝苄基酯基团的保护的衍生物，并通过酸解而从中除去保护基团。

7.如权利要求3 — 5 中任一项所述的方法，其特征在于它包括制备在不包含于肽链中的氨基上具有保护基团 Boc，和在羧基上具有叔丁酯基团的保护的衍生物，和通过酸解而从中除去保护基团。

8.一种制备能抑制免疫系统的功能的药物组合物的方法，其特征在于将作为活性成分的，如权利要求3中所定义分子式(1) — (16)的一种或多种肽或它们的药理学可接受的盐以治疗有效剂量与稀释剂、

6

填料、稳定剂、影响 pH 和渗透压的作用剂以及添加剂和能促使配方于药物工业通常应用的辅助材料相混合，并将它们转化成药物组合物。

9. 一种抑制包括人在内的哺乳动物的机体的免疫系统功能的方法，其特征在于它包括施用治疗有效剂量的如权利要求 1 中所定义的分子式 (1) - (16) 的一种或多种肽和它们的酸加成盐。

说 明 书

抑制免疫系统功能的新型肽，
含有它们的药物组合物及其制备方法

本发明涉及分子式(1) — (16)的新型肽：

D-Arg-Lys-D-Asp,	(1)
Arg-D-Lys-Asp,	(2)
D-Arg-D-Lys-D-Asp,	(3)
Arg-D-Lys-D-Asp,	(4)
D-Arg-Lys-Asp,	(5)
D-Arg-D-Lys-Asp,	(6)
Arg-Lys-D-Asp,	(7)
Arg-Lys-D-Asp-Val,	(8)
Arg-Lys-Asp-D-Val,	(9)
D-Arg-Lys-Asp-Val,	(10)
Arg-D-Lys-Asp-Val,	(11)
Lys(Arg)-Asp,	(12)
Lys(Arg)-D-Asp,	(13)
Arg-Lys(Arg)-Asp,	(14)
Arg-Lys-Asp(Val),	(15) 和
Arg-Lys-D-Asp(Val)	(16)

它们的酸加成盐和含有这些肽的药物组合物。

另一方面，本发明提供了分子式(1) — (16)的新型肽和含有它们的药物组合物的制备方法。

上述分子式(1) — (16)的肽能够抑制免疫系统的某些部分的作用。

本发明还涉及通过采用上述肽或含有它们的组合物来抑制免疫系统的功能而治疗包括人在内的哺乳动物的一种方法。

本发明的化合物是胸腺生成素的活性中心的衍生物和非对映体。但是，当已知的肽 Arg- Lys- Asp, Arg- Lys- Asp- Val (匈牙利专利说明书第185,263号) 和 Arg- Lys- Asp- Val- Tyr

(匈牙利专利说明书第183,579号)被考虑作为胸腺生成素的活性中心时,会产生明显的刺激免疫效应 [Drugs of the Future 11, 764(1986), 和 Drugs of Today 22, 17(1986)], 本发明的肽甚至会显示出相反的活性。

业已知道, 几种疾病的起因或伴随综合症可归咎于免疫系统的动态功能的失调。免疫刺激剂被用于治疗遗传的, 天生的 (出生后或分娩后, 老年) 和后天的免疫缺乏疾病 (例如, 感染后和手术后, 爱滋病等)。但是, 所存在的几种疾病或症状可归因于因机体的防御机理的自发修饰而导致免疫系统功能增加或出现暂时的不需要的功能。在自身免疫疾病中, 防御系统不可能从“外源”中区别出“自身”, 因此, 它通过所产生的抗体而保护了不受自身抗原的作用。此外, 借此出现了严重的后果。过敏性疾病是由于外源物质引起抗体的产量增加而引起的。随器官移植的排异反应也是机体正常和健康的功能, 但是, 它应在短时期内停止以允许移植的外源器官在机体内组建。

环磷酸胺{2-[双(2-氯乙基)氨基]-四氢-2H-1,3,2-氧氮磷杂环己烷氧化物}, 硫唑嘌呤[6-(1-甲基-4-硝基-5-咪唑硫基)嘌呤]和皮质甾类被用于治疗自身免疫疾病, 和 H-1 阻断受体的抗阻胺药被用于治疗过敏症, 环孢菌素(cyclosporin)是一种用于器官移植的必需药, 它属于免疫抑制剂, 可抑制免疫功能的增加或抑制免疫系统的正常功能的减弱。

一些伴随的副作用可以通过免疫抑制药物的相对低的治疗指数 (< 10) 来解释。因此, 它们只能在严格的医疗控制条件下用药, 同时, 通常只能用一个有限的时期。肽型活化剂的一个特别的优点在于它们具有超高的治疗指数 (> 100 - 1000), 即通常, 它们的引发有害效应的剂量比它们的有效剂量高几个数量级, 在生理条件下, 它们迅速地降解, 不在机体内积聚。在短的使用寿命内, 它们的效应取决于

它们高效地启动复杂活动的的能力。

业已发现，新型的，分子式(1) — (16)的 Arg- Lys- Asp和 Arg- Lys- Asp- Val免疫刺激肽为含有D-氨基酸的非对映体和 在赖氨酸的 α - 或 α - 和 ϵ - 氨基上连接有精氨酸以及在天门冬氨酸的 β - 羧基上含有缬氨酸的所谓的异构肽所在几个免疫试验中显示了抑制效应。尽管根据迄今为止我们所得到的知识 (如可参考美国专利说明书第4,505,853号),两种类型的修饰通常是有些伴随着耐酶性的增加,肽稳定性的增强和初始生物效应的较长时间的持续。

本发明的分子式(1) — (16)的新型肽是通过在溶液中连续采用活性酯的偶合步骤而逐步使链加长的方法和/或肽化学中已知的混合酸酐方法而制备的, α - 氨基和/或 α - 和 ϵ - 氨基的结合步骤是:

(a) 从以含有可通过氢化作用或酸解而除去的基团所酯化的羧基的羧基末端氨基酸衍生物,和随机地,以一种保护氨基的侧链和/或一种通过氢化或酸解可除去的基团所酯化的羧基和一种游离氨基开始,制得分子式(1) — (16)的肽的衍生物,它们的羧基上进行了酯化,在不包含于肽链中的氨基侧链上具有保护基团 Boc和/或 Z,

(b) 然后,通过催化氢化和/或酸处理除去存在的保护基团,和,

(c) 如果需要的话,通过用酸处理而将分子式(1) — (16)的游离肽转化为它们的酸加成盐。

在合成中可以使用组合的保护基,这样,有可能选择性地除去氨基保护基,然后在合成结束时的一个单一步骤中裂解所有可能存在的保护基团。为了形成肽链,利用N-羟基琥珀酰亚胺酯(-O-Su) (E. Wunsch: Synthese Von Peptiden, Vol.2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, 149页), 五氟化苯酯(匈牙利专利说明书第168,431号)或混合酸酐(匈牙利专利说明书第183,579号)的方法被采用。

对于保护氨基组成部分 Boc 和 Z 基团来讲，用叔丁基，苄基或硝基苄基醇酯化的保护羧基可较佳地被采用。

合成完成后，随机存在的一个或多个保护基团从如此所获得的保护的肽中除去，如果需要的话，可通过酸处理而将游离肽转化为它的酸加成盐。为了除去保护基团，可采用催化氢化或酸解。

对于治疗来说，所得到的游离肽通常是足够纯的，并不需要任何进一步的纯化。但是，如果需要的话，它们可以通过硅胶柱层析而纯化。所得到的呈溶液形式的肽可以通过溶液的蒸发或冷冻干燥而分离。游离肽可以被转化为任选的盐，但是，用药物学可接受的酸，如盐酸，硫酸，磷酸，醋酸和柠檬酸将其转化为酸加成盐是较佳的。

所制得的化合物的免疫抑制效应通过采用下面所描述的方法来进行研究。

1. 对于产生抗体的细胞的效应

该研究是采用从根据 Cunningham 的方法 (Handbook of Experimental Immunology, Ed, D. M. Weir, Vol.2 Blackwell, Oxford-London, p285, 1978) 从初生大鼠中获得的脾细胞来进行的。将同一窝的12个Wistar 鼠在它们出生后12小时内，用25 μ g 试验物质进行腹膜内 (i.p.) 注射。出生后第14天，用含有5%绵羊红细胞的0.5 ml 悬浮液对该动物进行腹膜注射 (i.p.) 免疫，7 天后再断头放血。在由动物中获得的脾细胞中，用羊红细胞悬浮液和补体制得均相的悬浮液，然后将该悬浮液置入适宜于获得单细胞层的室中。在产生抗体的脾细胞周围形成了溶胞区，和所称的噬菌斑。表1 中的数据列举了用抑制物质处理的效应。表1 中所给出的形成噬菌斑的细胞的数目的变化 (治疗效应) 以百分数表示 (从未经处理的动物中获得的细胞数目作为对照)。就已知免疫刺激物质 (见表1 中化合物 “A”，“B” 和 “C”)，该百分数很明显地上升。

表 1
抗体产生的抑制

实验号/ 符号	肽	形成的噬菌斑的变化(%)
1	D-Arg-Lys-D-Asp	-17
2	Arg-D-Lys-Asp	-11
3	D-Arg-D-Lys-D-Asp	-13
4	Arg-D-Lys-D-Asp	-16
5	D-Arg-Lys-Asp	-44
6	D-Arg-D-Lys-Asp	-41
7	Arg-Lys-D-Asp	-43
A	Arg-Lys-Asp	+71
B	Arg-Lys-Asp-Val	+60
C	Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	+62

2. 对于初始抗体产生的效应

这些试验是用体重为23—30g 的雄性 CFIP (LAT I) 小鼠来进行的。用含1%绵羊红细胞的悬浮液0.5ml 对该动物进行腹膜内(i.p.)免疫, 洗涤3次, 然后用100mg/kg剂量的试验物质对该动物进行腹膜注射处理。该处理进行3天后, 从每一个动物中取出0.60-0.70 ml 血。静置30分钟后, 离心分离血清, 用 Takatsy 的方法 [Acta, Microbiol, Acad, Sci, Hung, 3, 191 (1955)] 测定血细胞凝集效价。表2 中所罗列的数据显示了与未经处理的动物相比较, 对于初始抗体产生的抑制效应的百分数。免疫刺激化合物“B”和“C”在相同的试验中具有相反的活性。

表 2

对于初始抗体产生的效应

实验号 / 符号	肽	对于初级抗体产生的 效应 (%)
4	Arg-D-Lys-D-Asp	-15
5	D-Arg-Lys-Asp	-15
11	Arg-D-Lys-Asp-Val	-20
B	Arg-Lys-Asp-Val	+31
C	Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	+29

3. 对于休眠的巨噬细胞的吞噬能力的效应

该试验是根据在 J. Immunopharmacol, 4, 265 (1982-1983) 中所描述的方法, 采用6个月龄的雄性 NZB (OLAC-SzKB) 小鼠来进行的。每天用 1mg/kg 皮下注射剂量的试验物质处理这些动物, 进行4天。将这些动物放血后, 用 8ml PBS 缓冲液 (pH 7.2) (每毫升含 10 国际单位的肝素) 洗涤动物的腹膜。从腹膜中洗出的细胞悬浮液通过用蒸馏水振荡而制成无红细胞的, 然后, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。通过在 1000rpm 下, 离心分离 5 分钟而得到两次洗涤之间的沉积物, 然后, 将每个细胞悬浮液的浓度调节至 10^6 个细胞/ml, 将悬浮液在 Boyden 小室中, 于 37°C 和含 5% CO₂ 的大气下放置 30 分钟。巨噬细胞粘附于玻璃壁上, 以调理素调理的酵母覆盖在上成层。除去非吞噬细胞颗粒后, 清点在每一个细胞中与巨噬细胞相掺合的那些细胞。在表 3 中给出了从未经处理的动物中分离得到的巨噬细胞作为对比, 吞噬的酵母细胞的数目的减少百分数。

表 3

对于休眠的巨噬细胞的吞噬能力的效应

实验号 / 符号	肽	对于休眠的巨噬细胞 的吞噬能力的效应 %
----------	---	-------------------------

1	D-Arg-Lys-D-Asp	-41
2	Arg-D-Lys-Asp	-63
6	D-Arg-D-Lys-Asp	-11
7	Arg-Lys-D-Asp	-21
8	Arg-Lys-D-Asp-Val	-14
10	D-Arg-Lys-Asp-Val	-25
11	Arg-D-Lys-Asp-Val	-19
12	Lys(Arg)-Asp	-42
13	Lys(Arg)-D-Asp	-50

4. 对接触性皮炎的抑制

该研究是采用 Evans 等人的方法 [Br. J. pharmacol. 43, 403 (1971)], 采用体重为 20—22g 的雄性 BALB/ C (LAT 1) 鼠来进行的。将动物腹部的毛拔去, 然后, 用 0.1ml 在葵花籽油中的 2% 的噁唑酮 (oxazolone) 溶液使每一个动物的裸露的腹部皮肤致敏。1 周后, 用 1.0mg/kg 的剂量的试验物质 (溶解于生理盐水溶液中) 对鼠进行腹膜内注射 (i.p.) 处理, 然后, 用 10 μ l 含 2% 噁唑酮的丙酮溶液直接处理动物的右耳, 而用 10 μ l 丙酮处理动物的左耳。24 小时后, 割下它们的耳朵并称重。将经处理的和未经处理的动物耳朵的重量的差异与在分别用试验物质处理和只用生理盐水处理的动物中所观察到的差异进行比较。耳朵重量的差异被认为与接触性皮炎的程度成比例, 将不用试验物质处理的动物中所测得的值作为对照, 得到试验物质的减少皮炎的效应列于表 4 中, 以百分数表示。

表 4
对接触性皮炎的抑制

实验号 / 符号	肽	对接触性皮炎的抑制 (%)
----------	---	---------------

2	Arg-D-Lys-Asp	-22
3	D-Arg-D-Lys-D-Asp	-31
4	Arg-D-Lys-D-Asp	-19
5	D-Arg-Lys-Asp	-35
6	D-Arg-D-Lys-Asp	-19
7	Arg-Lys-D-Asp	-34
9	Arg-Lys-Asp-D-Val	-16
12	Lys(Arg)-Asp	-16

为了治疗应用，用本发明的肽和它们的酸加成盐可以配制成普通的药物组合物，以减少免疫系统的活性。使用这种新型化合物的优点在于它们基本上是彻底安全的，因为在所使用的剂量范围内，它们没有副作用。

分子式(1) — (16)的肽可以单独使用，或以它们的游离形式或酸加成盐形式，较合适的是以药物配方而使用。这些配方可以是固体，液体或半流体的，可以采用填料，稀释剂，稳定剂，影响 pH 和渗透压的作用剂以及在配方中促使该配方能作一般应用的添加剂来制备。

固体药物组合物可以是，例如粉末安瓿，适宜于制成注射用溶液。可注射的组合物和输注液是液体的。

本发明的药物组合物以含有对于获得所需要的效应所需的活性成分的剂量的量施用于病人。该剂量取决于疾病的严重性，病人的体重，病人对于活性成分的敏感性，给药的途径和每天治疗的次数。在任何情况下，所用的剂量都由了解所治疗病人的内科医生来规定。

对于一个简单的给药来说，药物组合物可以由含有一次给药的活性成分的剂量单位，或 1/2, 1/3 或 1/4 或更小的剂量单位所组成。

本发明的组合物通常每个剂量单位中含有 1 — 100mg 活性成分。但是，很显然，在一些组合物中，活性成分的量可以比上述限定的值

高些或低些。

本发明将通过下面的非限定实施例而详细列举。在说明中所用的缩写与在文献中 [Biochem. J. 219, 345 (1984)] 通常被接受的那些相对应。根据通常的经验, “D” 构型 (右旋型) 只在由符号给出的名称中才指明, 其它氨基酸都具有 “L” 构型 (左旋型)。熔点在 Dr. Tottoli 装置 (由 Büchi, Switzerland 制造) 中测定。薄层色谱检验是采用常备用吸附剂 (DC-1 ertigplatten, 由 Merck, F R G 制造) 和下面的溶剂混合物 (这里 “储备液” 是吡啶/醋酸/水为 20:6:11 的混合物) 来进行的:

- | | |
|---------------------|---------|
| 1. 乙酸乙酯/ 储备液 | 19:1; |
| 2. 乙酸乙酯/ 储备液 | 9:1; |
| 3. 乙酸乙酯/ 储备液 | 6:1; |
| 4. 乙酸乙酯/ 储备液 | 7:3; |
| 5. 正丁醇/ 储备液 | 3:7; |
| 6. 正丁醇/ 储备液 | 1:4; 和 |
| 7. 正丁醇/ 醋酸/ 乙酸乙酯/ 水 | 1:1:1:1 |

(所给出的比例是体积比)。

色谱用茚三酮检测, 或在氯化后, 用碘化钾/ 联甲苯胺试剂检测。

高效液相色谱 (HPLC) 分析系采用配备有具有可变波长的 Labor M 1M308 型紫外检测器, Labor- M 1M Loop 注射器, 由 Gilson 802 C 和 302 单元组成的进料泵, 压力检测器和 Radelkis OH 827 型记录仪的装置而进行。为了分离, 采用长为 150cm, 内径为 4.6mm, 其中颗粒粒径为 6 μm 的 Labor- M 1M 型 C-18 固定相载体。并加入浓度为 10% 的氨水溶液将 0.2% 浓度的磷酸水溶液调节至 pH 8, 该溶液被用于三肽的洗脱, 而该洗脱剂也可由 10% (体积) 的乙腈组成以洗脱三肽类。测定系在 1ml/分的流速下进行, 而溶液的吸收

则在212nm处检测。色谱(峰)用面积归一方法来估算。根据HPLC和薄层色谱(TLC)两种分析,靶化合物的纯度高于95%。

特定的光学活性在Perkin-Elmer 241型旋光计中进行。所有的溶剂都在Büchi旋转蒸发器中,在水溶液中,40℃下除去或蒸发。

中间品和靶化合物的¹H-NMR和¹³C-NMR核磁共振谱在Varian XLA400型装置中测定。在任何情况下,靶化合物均溶于D₂O。核磁共振谱与所期望的结构相一致。

靶化合物的氨基酸分析在Biotronik LC 5001型装置中进行。样品在6摩尔浓度的盐酸中,在110℃下水解24小时。任何情况下,分析结果都在±5%的偏差极限内。

合成的初始物质是文献中所共知的。与L-对映体一样,D-对映体用D氨基酸开始合成。

实例1: Arg-Lys-D-Asp的制备(方法“A”)

将4.06ml(29.0mmol)的三乙胺加入到含6.60g(13.8mmol) Z-Lys(Boc)-Osu和4.86g(14.5mmol) H-D-Asp(O^tBu)-O^tBu草酸盐的60ml乙酸乙酯的混合物中,然后,将混合物静置过夜。然后,依次用20ml水,每次用20ml 1M的盐酸(共3次),每次用20ml 15%的碳酸氢钾水溶液(共3次)和最后用20ml水依次洗涤之。有机相采用无水硫酸钠干燥并在减压下蒸发。

将蒸发残余物,为油状产品(重6.5g, $R_f^2=0.8$),即是:将保护二肽溶解于70ml甲醇中,加入1.5g钯炭,并在搅拌下将氢气鼓入悬浮液中,进行2小时。过滤混合物,往滤液中加入1.45g(11.5mmol)草酸二水合物。蒸发后,用乙醚研磨残余物,将所得到的悬浮液过滤,得到4.80g游离Lys-D-Asp草酸盐, m.p. 118—121℃, $[\alpha]_D^{25} = 11.0^\circ$ (C-1, 甲醇), $R = 0.25$ 。

将0.78ml(6.0mmol)氯甲酸异丁基酯逐滴加入到含1.98g(6.0mmo

1) Boc- Arg(HCl)- OH. H₂O和0.67ml(6.0mmol) N- 甲基吗啉的20ml二甲基甲酰胺的冷却到-10 °C的溶液中。将这样获得的混合酞在-10 °C下搅拌10分钟, 然后加入含3.27g(5.8mmol)上面所制得的 Lys- D- Asp草酸盐和1.28ml(11.6mmol)N- 甲基吗啉的15ml DMF的冷却剂-10 °C的溶液。然后, 使反应混合物热至室温, 放置过夜。在减压下蒸发溶剂, 将残余物溶解于50ml氯仿中, 并依次用每次20ml/1M的盐酸连续洗涤3次, 再用20ml水洗涤, 然后用无水硫酸钠干燥。过滤悬浮液后, 将滤液在减压下蒸发。通过加入二异丙醚而使油状的残余物固化。过滤悬浮液, 蒸发滤液而得到3.20g(4.18mmol)无定形的 Boc- Arg(·HCl)- Lys(Boc)- D- Asp(O^tBu)- O^tBu 三肽酯盐, $R_f^3=0.10, R_f^4=0.45, [\alpha]_D^{20}=-6.4^\circ$ (C=1, 甲醇)。

采用上述方法所制得的其他保护肽列于表5中。

用20ml三氟乙酸将上述所获得的1.60g(2.08mmol)保护的三肽酯盐处理2小时, 然后在减压下蒸发。加醚使残余物固化后, 过滤悬浮液, 用乙醚充分洗涤沉淀物。将所得到的三氟乙酸盐溶解于20ml水中, 加入5ml Dowex 2 × 8 醋酸型离子交换树脂 (由Dow Chemical Co. 制造)。30分钟后, 过滤悬浮液, 在减压下蒸发滤液, 加入甲醇使蒸发残余物固化而得到1.0g 无定形的 Ary- Lys- D- Asp. CH- COOH三肽醋酸盐, $[\alpha]_D^{20}=+1.0^\circ$ (C=1.0, 10%醋酸)。氨基酸分析: D- A S P=1.03, Lys=1.00, Ary=0.98

如上述方法所制得的分子式(1) — (16)的靶化合物的物理常数列于表6中。

实例2: Lys (Ary- Asp) 的制备 (方法“B”)

将3.08ml三乙胺加入到含有4.77g(10.0mmol) Boc- Lys(z)- OSu 和3.69g(11.0mmol) H- Asp (O^tBu)- O^tBu 草酸盐的60ml乙酸乙酯的混合物中, 将混合物反应过夜。然后, 用20ml水, 20ml (每

次)1M的盐酸(3次), 5% 碳酸氢钾(3次),和最后用20ml水依次洗涤该混合物, 用无水硫酸钠干燥, 然后在减压下蒸发。

将这样所得到的呈油状的5.6g保护二肽 ($R_f^1=0.85$) 溶解于60ml 甲醇中, 加入1.0g钨炭催化剂后, 在搅拌下将氢气鼓入悬浮液2 小时。然后过滤该悬浮液, 将1.1g草酸二水合物加入滤液中, 蒸发溶剂。将结晶的残余物悬浮于乙醚中, 过滤并干燥而得到4.4g Boc- Lys- Asp (O^tBu)- O^tBu 草酸盐, $m.p.:135-138\text{ }^\circ\text{C}$, $R_f^1=0.35$ 。

通过混合酸酐偶合方法 (如实例1 中所描述的), 将这样所得到的草酸盐中的 Lys 的 ϵ - 氨基酰化, 然后, 从这样所获得的 (也如实例1 中所描述的) 保护三肽中移去保护基团。

如上所描述的所得到的保护的和游离肽的物理常数列于表5 和表6 中。

实例3: Arg- Lys (Arg - Asp) 的制备 (方法 "C")

将1.85g(5.5mmol)H- Asp (O^tBu)- O^tBu 草酸盐悬浮于在摆动漏斗中的50ml乙醚中, 往悬浮液中加入20ml5%的碳酸氢钾。振荡混合物直至完全溶解, 分离出水相, 用20ml 5%的碳酸氢钾溶液和20ml 水洗涤醚相, 用无水硫酸钠干燥, 在减压下将体积浓缩至20ml。加入2.49g(6.0mmol)保护的赖氨酸 Z- Lys (Z)- OH并冷却至0 $^\circ\text{C}$ 后, 加入1.20g(5.8mmol)二环己基碳化二亚胺。将混合物于0 $^\circ\text{C}$ 下维持30分钟, 然后在室温下静置过夜。滤去二环己基脲沉淀, 用10ml (每次) 1 M的盐酸(3次), 10ml (每次) 5%的碳酸氢钠溶液(3次) 和最后用20 ml水依次洗涤滤液, 用无水硫酸钠干燥后, 在减压下蒸发之。

将所得到的呈油状蒸发残余物的3.0g保护的二肽 ($R_f^2=0.80$) 溶解于50ml甲醇中, 加入1.0g钨炭催化剂后, 将氢气鼓入悬浮液中2 小时。滤去催化剂后, 往滤液中加入1.18g(9.34mmol) 草酸二水合物, 在减压下, 将混合物浓缩至10ml。加入乙醚将这样所得到的悬浮液稀

释至100ml, 过滤沉淀物, 并用乙醚洗涤。这样, 可获得1.49g H-Lys- Asp(O^tBu)- O^tBu 草酸盐 ($R_f^5=0.25$), 采用如实例1 中所描述酸酐偶合方法使赖氨酸分子的两个氨基酰化。也如实例1 中所述的, 将保护基团从这样所得到的保护三肽中移出。

保护的和游离的三肽的物理常数概括在表5 和表6 中。

实例4: D- Arg- Lys- Asp- Val的制备 (方法“D”)

将4.2ml (30mmol) 三乙胺加入到含6.3g (30mmol) H- Val- O^tBu-HCl 和11.2g (26.8mmol) Z- Asp(O^tBu)- OSu 的110ml 二甲基甲酰胺的悬浮液中后, 将混合物放置过夜, 然后, 在减压下蒸发。将油状蒸发残余物溶解于200ml 乙酸乙酯中, 用40ml (每次) 1M的盐酸 (共2次), 40ml 水, 40ml 5%的碳酸氢钠, 再用40ml 水依次洗涤之。用无水硫酸钠干燥后, 过滤溶液, 在减压下蒸发滤液。

将所得到的作为蒸发残余物的13.0g 保护的二肽 ($R_f^1=0.80$) 溶解于100ml 甲醇中, 加入1.5g 钯炭催化剂后, 在搅拌下, 将氢气鼓入悬浮液2 小时。滤去催化剂后, 在减压下蒸发滤液。将油状蒸发残余物溶解于100ml 乙醚中, 加入甲醇的氯化氢溶液, 直到 pH被调节到5。将这样得到的悬浮液冷却5 小时, 然后过滤, 用乙醚洗涤沉淀物, 干燥而得到9.0g (88.0mmol) H- Asp(O^tBu)- Val- O^tBu.HCl, m.p.: 187-189 °C, $R_f^1=0.40$ 。

以后, 再继续 实例1 中所描述的过程。

这样所获得的保护的和游离的四肽的物理常数列于表5 和表6 中。

实例5: Arg- Lys- Arg (Val) 的制备 (方法“E”)

将1.68ml (12.0mmol) 三乙胺加入到含2.58g (12.0mmol) H- Val- O^tBu.HCl 和4.62g (11.0mmol) Z- Asp(OSu)- O^tBu 的25 ml DMF 悬浮液中之后, 将混合物反应过夜, 然后, 在减压下蒸发。用20ml 水, 20ml (每次) 1M的盐酸 (共3次), 20ml (每次) 5% 的碳酸

氢钠溶液 (共3次),和最后用20ml水依次洗涤在50ml乙酸乙酯中的蒸发残余物的溶液,有机相用无水硫酸钠干燥,并在减压下蒸发而获得4.3g(81.7%)保护的二肽, m.p:86.5—87.0℃, $R_f^1=0.85$ 。

将1.0g钯炭催化剂加入至含4.07g(8.5mmol)上面得到的保护二肽的40ml甲醇的溶液中之后,在搅拌下,将氢气鼓入悬浮液而使悬浮液氢化2小时。滤去催化剂后,在减压下蒸发滤液。将蒸发残余物溶解于50ml乙醚中,加入溶解于3ml 甲醇中的0.76g(8.5mmol)草酸二水合物,获得3.37g(91.6%)游离二肽草酸盐, m.p:142-143℃, $R_f^1=0.15$,然后如实例1中所描述的方法进行酰化。

这样所得到的保护的和游离的四肽的物理常数列于表5和表6中。

表5

保护肽的物理常数

号码	名称	方法	$\frac{\alpha}{D}^{20}$	R_f^3	R_f^4	R_f^5
I	Boc-D-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-D-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	+0,6 ⁰ (a)	0,1	0,45	
II	Boc-Arg(.HCl)-D-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-1,4 ⁰ (a)	0,1	0,45	
III	Boc-D-Arg(.HCl)-D-Lys(Boc)-D-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	+19,8 ⁰ (a)	0,1	0,45	
IV	Boc-Arg(.HCl)-D-Lys(Boc)-D-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	+11,8 ⁰ (a)	0,1	0,45	
V	Boc-D-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-12,4 ⁰ (a)	0,1	0,45	
VI	Boc-D-Arg(.HCl)-D-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	+5,6 ⁰ (a)	0,1	0,45	
VII	Boc-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-D-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A	-5,6 ⁰ (a)	0,1	0,45	
VIII	Boc-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-D-Asp(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A+D	+3,1 ⁰ (b)	0,25		
IX	Boc-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-D-Val-O ^t Bu	A+D	-34,5 ⁰ (b)	0,25		
X	Boc-D-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A+D	-22,6 ⁰ (b)	0,25		
XI	Boc-Arg(.HCl)-D-Lys(Boc)-Asp(O ^t Bu)-Val-O ^t Bu	A+D	-10,8 ⁰ (b)	0,25		
XII	Boc-Lys(Boc)-Arg(.HCl)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A+B		0,30		
XIII	Boc-Lys(Boc)-Arg(.HCl)-D-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A+B	-12,0 ⁰ (a)	0,05	0,35	0,20
XIV	Boc-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-Arg(.HCl)-Asp(O ^t Bu)-O ^t Bu	A+C	-15,0 ⁰ (c)			
XV	Boc-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-Asp(Val-O ^t Bu)-O ^t Bu	A+E	-14,6 ⁰ (b)	0,25		
XVI	Boc-Arg(.HCl)-Lys(Boc)-D-Asp(Val-O ^t Bu)-O ^t Bu	A+E	-22,6 ⁰ (a)	0,30		

保护的化合物的编号(罗马数字)与表6中靶化合物的编号(阿拉伯号)相一致

(a): c=1, 甲醇 ; (b): c = 二甲基酰胺 ; (c): c=0.6, 甲醇

游离肽的物理常数

号码.	名称	$[\alpha]_D^{20}$ (c=1)		R _f	(7)
		10% AcOH	AcOH		
1	D-Arg-Lys-D-Asp	-33,2°		0,15	0,09
2	Arg-D-Lys-Asp	+33,2°		0,15	0,08
3	D-Arg-D-Lys-D-Asp	-3,4°	-9,2°	0,15	0,08
4	Arg-D-Lys-D-Asp	+35,0°	+24,0°	0,15	0,08
5	D-Arg-Lys-Asp	-33,8°	-24,4°	0,15	0,08
6	D-Arg-D-Lys-Asp	-1,2°	+6,2°	0,15	0,08
7	Arg-Lys-D-Asp	+1,0°		0,15	0,08
8	Arg-Lys-D-Asp-Val	+13,7°		0,15	0,10
9	Arg-Lys-Asp-D-Val	-7,3°		0,15	0,10
10	D-Arg-Lys-Asp-Val	-47,7°		0,15	0,10
11	Arg-D-Lys-Asp-Val	+13,1°		0,15	0,10
12	Lys(Arg)-Asp		+16,4°		0,12
13	Lys(Arg)-D-Asp		+19,4°		0,12
14	Arg-Lys(Arg)-Asp		+12,7°		0,05
15	Arg-Lys-Asp(Val)	+2,9°		0,20	0,10
16	Arg-Lys-D-Asp(Val)	-12,0°		0,20	0,10