〔19〕中华人民共和国专利局

[11]公开号 CN 1040594A

〔12〕发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89106526.1

[51] Int.Cl[5]
C07K 7/10

〔43〕公开日 1990年3月21日

[22]申请日 89.8.25

[30]优先权

[32]88.8.26 [33]US [31]237,599

[71]申请人 默里尔多药物公司

地址 美国俄亥俄州

[72]发明人 约翰·L·克拉提娜斯基

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利代理部

代理人 唐 跃

C07K 7/50

说明书页数: 12 附图页数:

[54]发明名称 神经肽Y拮抗剂的制法

[57]摘要

本文叙述了NPY的拮抗剂(它是天然存在的NPY的衍生物)及其制法。该拮抗作用可用传统的竞争结合以及生物化学试验来确证,本文还叙述了上述衍生物在涉及神经肽Y的许多情况下的应用。

(BJ)第1456号

权 利 要 求 书

1.制备下式肽衍生物或其可药用盐的方法，

其中X_2为S或A；

X_3为S或A；

X_4为L、I、M、Nle或V；

X_5为L、I、M、Nle或V；

Tc为OR′或NHR′，其中R′为氢或（C_1～C_4）烷基；

θ为下式结构的基团，

$-NH-(CH_2)_n-CO_2-$，其中n为整数1－11，该方法包括：将适当保护的酪氨酸连接到活性树脂载体上，然后将从脯氨酸到羧基末端的酪氨酸的其它α－氨基受保护的氨基酸连结到生长中的肽链上的已同时通过脱去其氨基保护基而暴露出来的末端氨基上，从树脂上切下受保护的肽，脱去所有保护基，使直链肽氧化缩合，最后分离环化的肽。

2.权利要求1所述的方法，其中X_2为A。

3.权利要求1 所述的方法，其中X_3 为S。

4.权利要求1 所述的方法，其中X_4 为I。

5.权利要求1 所述的方法，其中X_5 为I。

6.权利要求1 所述的方法，其中θ为Aoc。

7.权利要求1 所述的方法，其中Tc 为NH_2。

8.权利要求1 所述的肽衍生物是：

Y-P-S-K-P-D-c-Aoc-A-R-C-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-I-R-Y-#

说　　明　　书

神经肽Y拮抗剂的制法

本申请是编号为237,599 的专利申请（申请日1988年8 月26日）的部分继续申请。

本发明是关于新的肽衍生物及其制法；这些衍生物是神经肽Y的拮抗剂。

猪的神经肽Y（pNRY）是有36个氨基酸残基的肽，它属于在中枢神经系统和外周神经系统有广泛分布的唯一的一类肽。人们发现在中枢和外周神经系统中存在神经肽Y（NPY）的受体。在脑中，NPY是食物摄取的有效刺激质，它刺激促黄体激素、生长激素和催乳激素，并且产生心血管抑制作用。NPY也是有效的外周血管收缩剂，还有报道认为它可引起患者暂时的心肌缺血并伴有心绞痛。预计对上述现象的拮抗作用可导致血压降低，因此预计对NPY的拮抗剂可用于治疗高血压、血管痉挛和绞痛，也可以用于抑制食欲。已经表明，NPY是有效的支气管收缩剂，并且与其余气管节的调整有一定的关系。NPY拮抗剂将阻止NPY引起的收缩，并将导致支气管扩张。

式1 的新肽衍生物及其可药用盐是神经肽Y的拮抗剂，

$$\mathrm{Y\text{-}P\text{-}S\text{-}K\text{-}P\text{-}D\text{-}c\text{-}\theta\text{-}X_2\text{-}R\text{-}C\text{-}Y\text{-}X_3\text{-}A\text{-}L\text{-}R\text{-}H\text{-}Y\text{-}X_4\text{-}N\text{-}L\text{-}X_5\text{-}T\text{-}R\text{-}I\text{-}R\text{-}Y\text{-}Tc}$$

其中X_2为S或A；

X_3为S或A；

X_4为L、I、M、Nle或V；

X_5为L、I、M、Nle或V；

Tc为OR′或NHR′，其中R′为氢或（C_1～C_4）烷基；

θ为具有下式结构式的基团：

$-NH-(CH_2)_n-CO_2-$，其中n为整数1－11。

上述肽衍生物可以抑制由NPY引起的小白鼠脾的收缩。

本申请说明书中应用了下列氨基酸以及氨基和羧基末端基团的通用缩写符号：

Ala（或A）－丙氨酸

Val（或V）－缬氨酸

Leu（或L）－亮氨酸

Ile（或I）－异亮氨酸

Pro（或P）－脯氨酸

Met（或M）－蛋氨酸

Ser（或S）－丝氨酸

Thr（或T）－苏氨酸

Cys（或C）－半胱氨酸

cys（或c）－D－半胱氨酸

Tyr（或Y）－酪氨酸

Asn（或N）－天冬酰胺

Asp（或D）－天冬氨酸

Lys（或K）－赖氨酸

Arg（或R）－精氨酸

His（或H）－组氨酸

Nle－正亮氨酸

Aoc－8-氨基辛酸

－－ NH_2

烷基包括直链、支链或环状烷基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、仲戊基、环戊基、己基、异己基、环己基和环戊甲基。2－10个碳原子的酰基包括每个基团中有1或2个羰基的直链、支链、环状、饱和以及不饱和的酰基，例如乙酰基、苯甲酰基、琥珀酰基、马来酰基和戊二酰基。其中氨基末端氨基酸的氨基用两个烷基或酰基取代的上述肽，也被认为在本发明的肽的范围内。

除了甘氨酸以外，上述天然氨基酸均含有手性碳原子。除非另有说明，这里所指的有旋光性的氨基酸都是L－构型的。

式1的多肽可以与任何无毒的有机酸或无机酸形成药用盐。可形成适用盐的无机酸有盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸，以及酸性金属盐，例如正磷酸一氢钠和硫酸氢钾。可形成适用盐的有机酸包括一元、二元或三元羧酸，其实例有乙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、马来酸、羟基马来酸、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯基乙酸、肉

桂酸、水杨酸、2-苯氧基苯甲酸，以及磺酸，例如甲磺酸和2-羟基乙磺酸。羧基末端氨基酸部分的盐包括与合适的无机碱或有机碱形成的无毒羧酸盐。举例来说，这些盐包括碱金属盐，例如钠盐和钾盐；碱土金属盐，例如钙盐或镁盐；包括铝在内的III_A族轻金属盐；有机伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐，例如三烷基胺盐，包括三乙胺盐、普鲁卡因盐、二苄基胺盐、1-乙烯胺（1-ethenamine）盐、N，N′-二苄基乙二胺盐、二氢枞胺盐、N-（低级）烷基哌啶盐以及其他合适的胺盐。

对于任何一大类化合物来说，其中都有一组是比较好的。申请人优选X_2为丙氨酸（A）的上述式1肽衍生物。申请人还优选下述式1肽衍生物：其中X_3为丝氨酸；其中X_4或X_5为异亮酸（I）；其中Tc $=NH_2$；以及其中$\theta=A_{oc}$。最优选的式1肽衍生物是以下式2的肽衍生物：

Y-P-S-K-P-D-c-Aoc-A-R-C-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-I-R-Y-# 2

本发明的蛋白质可以用易为本技术领域专业人员所知的各种方法制备。这些方法包括固相顺序法，该方法可以应用已建立的自动方法进行，例如应用自动的肽合成器来进行。

应用的树脂载体可以是本技术领域中常用于以固相法制备多肽的任何适用的树脂，最好是与0.5％－约3％二乙烯苯交联的聚苯乙烯，它已被转变为对甲基二苯甲基胺或二苯甲基胺衍生物（对于C-末端酰胺），或者已被氯甲基化或羟甲基化以提供与最初引入

的α-氨基受保护的氨基酸（为了得到C-末端烷基酰胺）和酯形成酯的位点。

Bodanszky 等叙述了羟甲基树脂的实例[Chem. Ind.（London）38，1597—98（1966）]。氯甲基化树脂可从Bio Rad Laboratories（加利福尼亚，里士满）买到；这种树脂的制备方法已由Stewart 等叙述[“Solid Phase Peptide Synthesis”（Freeman and co.，旧金山1969），第1章，p.1—6]。可以用Gisin 的方法将受保护的氨基酸连到树脂上[Helv. Chem. Acta，56，1476（1973）]。许多连接在树脂上的受保护氨基酸都是可以买到的。例如，为了制备羧基末端为Thr残基的本发明的多肽，可以应用连接在苄基化、羟甲基化的苯乙酰胺基甲基（PAM）树脂上的叔丁氧羰基（Boc）保护的Thr，它是可以买到的。

将α-氨基受保护的氨基酸连接到载体树脂上之后，应用合适的方法（例如应用三氟乙酸的二氯甲烷溶液，单独用三氟乙酸或HCl的二噁烷溶液）脱去保护基。去保护是在0℃和室温之间的温度下进行。也可以采用其它用于脱去特定α-氨基保护基的普通裂解试剂和条件。脱去α-氨基保护基之后，按所需的顺序逐一连结其它氨基受保护的氨基酸。另外一种方法是，在用挂有氨基酸序列的树脂进行连结之前，多个氨基酸基团可以用溶液法连结起来。

引入多肽序列的各个氨基酸所应用的α-氨基保护基可以是本技术领域已知的保护基。在所考虑的各类α-氨基保护基中有：（1）酰基类型的保护基，例如甲酰基、三氟乙酰基、邻苯二甲酰基、

甲苯磺酰基（tosyl）、苯磺酰基、硝基苯亚磺酰基、三苯甲基亚磺酰基、邻硝基苯氧乙酰基和α-氯代丁酰基；（2）氨基甲酸芳香族酯类型保护基，例如苄氧羰基和取代的苄氧羰基，如对氯苄氧羰基、对硝基苄氧羰基、对溴苄氧羰基、对甲氧基苄氧羰基、1-（对联苯基）-1-甲基乙氧羰基、α，α-二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基和二苯甲氧羰基、9-芴基甲氧羰基（Fmoc）；（3）氨基甲酸脂肪族酯类型保护基，例如叔丁氧羰基（Boc）、二异丙基甲氧羰基、异丙氧羰基、乙氧羰基和烯丙氧羰基；（4）氨基甲酸环烷基酯类型保护基，例如环戊氧羰基、金刚烷氧羰基和环己氧羰基；（5）硫代氨基甲酸酯类型保护基，例如苯基硫代羰基；（6）烷基类型保护基，例如三苯基甲基（trityl）和苄基；以及（7）三烷基硅烷类保护基，例如三甲基硅烷。较好的α-氨基保护基是叔丁氧羰基和9-芴基甲氧羰基（Fmoc）。

合适缩合试剂的选择是本技术领域内的技能问题。如果需要加入的氨基酸是Gln、Asn或Arg，那么特别合适的缩合试剂是N，N′-二异丙基碳化二亚胺和1-羟基苯并三唑。应用上述试剂可以避免形成腈和内酰胺。其他的缩合试剂有（1）碳化二亚胺（例如N，N′-二环己基碳化二亚胺和N-乙基-N′-（γ-二甲氨基丙基碳化二亚胺）；（2）氨腈（例如N，N-二苄基氨基氰；（3）酮亚胺（Ketenimines）；（4）异噁唑鎓盐（例如N-乙基-5-苯基-异噁唑鎓-3′-磺酸盐）；（5）环中含1—4个氮原子的具有芳香族性质的含氮单杂环酰胺，例如咪唑酰胺、吡唑酰胺和1,2,4-三唑酰胺。可用的具体杂环酰胺包括N，N′-羰基二咪唑和N，N′-羰基

-二-1,2,4-三唑；(6)烷氧基化的乙炔(例如乙氧基乙炔)；(7)与氨基酸的羧基部分形成混合酸酐的试剂(例如氯甲酸乙酯和氯甲酸异丁酯)，或需缩合氨基酸的对称酸酐[例如(Boc-Ala)-O)]；以及(8)在一个环中氮原子上有羟基的含氮杂环化合物(例如N-羟基邻苯二甲酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺和1-羟基苯并三唑)。其它活化试剂及其在肽缩合中的应用已由Kapoor叙述[J. pharm. sci., 59, p.1—27(1970)]。申请人优先选用对称的酸酐作为除Arg、Asn和Gln之外的所有氨基酸的缩合试剂。

将每个已保护的氨基酸或氨基酸序列以约过量4倍的量引入到固相反应器中，并且在二甲基甲酰胺：二氯甲烷(1：1)介质中，或只在二甲基甲酰胺介质中，或者最好只在二氯甲烷介质中进行缩合。在发生不完全缩合的情况下，则在于固相反应器中缩合另一氨基酸之前，在脱去α-氨基保护基之前重复缩合操作。按照E. Kaiser等(Analyt. Biochem. 34, 595(1970))所述方法，用茚三酮反应检测各个合成阶段的缩合反应是否完成。

在得到所需要的氨基酸序列之后，将肽从树脂上切落。切落肽可以通过水解来完成，例如将连接在树脂上的多肽用甲硫醚、对甲酚和硫代甲酚在液体氢氟酸中的溶液进行处理。

正如在固相肽合成技术中已知的那样，许多氨基酸都带有在链制备过程中需要保护起来的官能团。本技术领域的专业人员都能够选用合适的保护基，这取决于要保护的氨基酸和在肽上存在的其他受保护的氨基酸残基。这种侧链保护基团的选择是很关键的，因为

在裂解α-氨基上的保护基时该侧链保护基必须不会被脱去。例如赖氨酸的合适侧链保护基是苄氧羰基和取代的苄氧羰基，其中的取代基系 选自卤素（例如氯、溴、氟）和硝基（例如2-氯苄氧羰基、对硝基苄氧羰基、3,4-二氯苄氧羰基），甲苯磺酰基、叔戊氧羰基、叔丁氧羰基和二异丙基甲氧羰基。苏氨酸和丝氨酸的醇羟基可以用乙酰基、苯甲酰基、叔丁基、三苯甲基、苄基、2,6-二氯苄基或苄氧羰基保护。天冬氨酸和谷氨酸的羧基可以用苄基或环己基保护。较好的保护基是苄基。

上述基团可以用本技术领域中人们熟知的方法脱去。通常在肽链合成结束之后脱去保护基，但是保护基也可以在任何其它合适的时间脱去。

因此，制备本发明式1 肽衍生物及其可药用盐的优选方法包括：将适当保护的酪氨酸连接到活性树脂载体上，然后将从脯氨酸到羧基末端的酪氨酸的其它α-氨基受保护的氨基酸连结到生长中的肽链上的已同时通过脱去其氨基保护基而暴露出来的末端氨基上，从树脂上切下受保护的肽，脱去所有保护基，使直链肽氧化缩合，最后分离环化的肽。

式1 的肽衍生物作为神经肽Y拮抗剂的能力，可以按照Lundberg 等的方法[Eur. J. Pcol. 145：21—9（1988）]，由该肽与碘化神经肽Y竞争受体的能力来验证。将^{125}碘-Bolton-Hunter-神经肽Y（BHNPY；Amersham）结合在猪脾粗膜中。按以前速激肽结合试验所述的方法（Buck 等，1984），用冷冻的脾制备膜。将一等分试样的膜制品（约15mg组

织）在含有该肽类似物、130mM NaCl、2.7mM KCl、2mMMg Cl_2、1.8mM Ca Cl_2、20m M N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙基磺酸（HEPES）、4 mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）、40μg/ml枯草杆菌肽、4 μg/ml亮肽素和4 μg/mol抑糜蛋白酶素的缓冲液（pH7.4）中，于室温下保温2 小时。BHNPY的浓度为0.1nM，用1 μM pNPY测定非特异性结合。样品迅速地在用0.5 %组蛋白（II-As 型；Sigma公司）预浸过夜的WhatmanGF/C滤器上过滤，并且用冰冷却的普通的HEPES-盐缓冲液(pH7.4）洗涤二次。由6 —10点竞争曲线计算试验肽的 IC_{50}值。应用该方法，实例1 肽衍生物的 IC_{50}小于300 n M。

由于本发明的肽衍生物具有神经肽Y拮抗剂的作用，因此该类化合物具有有价值的药理作用，例如抗血压过低、抗血管痉挛、血管舒张和抗高血压作用，以及降低食物摄取要求和减少促黄体激素分泌。本发明的NPY拮抗剂的重要医学用途是作为抗高血压剂、抗绞痛剂、抗血管痉挛剂和减少食欲剂。

本发明的肽衍生物拮抗神经肽Y，并因此而产生抗血压过低、抗高血压、血管舒张或其他药理学或医学作用所需的剂量为每天0.2mg/kg（患者体重）—250 mg/kg（患者体重），剂量根据患者的情况、需治疗的血栓形成的严重程度以及选用的肽衍生物而定。可以容易地确定具体患者的合适剂量。最好每天服用1 —4 次，通常每次剂量为5 mg—100 mg有效化合物。

抗血压过低、抗高血压和血管舒张类治疗是指治疗和预防多种

病症，特别是冠状动脉和脑血管的疾病（例如高血压和绞痛）。在这方面有经验的人员容易判断出需要这种治疗的情况。这里应用的术语“患者”是指哺乳动物，例如灵长类（包括人）、羊、马、牛、猪、狗、猫、大鼠和小鼠。

虽然一些肽衍生物在口服之后还能在肠道中残存，但申请人还是优选非口服给药，例如最好是经皮下、静脉、肌内或腹膜内注射给药；或以下列方式给药：长效注射；植入制剂；或者例如将盛放在气溶胶罐里的本发明肽衍生物以喷雾或喷粉形式应用在粘膜上，例如应用在鼻、喉和支气管的粘膜上。

对于非经胃肠道给药，可以将化合物以可注射药剂形式注射。可注药剂的配制方法是：将本发明化合物在生理上适用的稀释剂中的溶液或混悬液与药用载体混合；药用载体可以是无菌液体，例如水或油；可以加或不加表面活性剂或其他药用辅助剂。可以应用在上述制剂中的油，其实例有石油产品，动物油，植物油或合成油，例如花生油、豆油和矿物油。一般说来，水、盐水、葡萄糖水溶液以及有关的糖溶液、乙醇、二元醇（例如丙二醇或聚乙二醇）是优选的液体载体，尤其对于注射溶液剂更是如此。

本发明的化合物可以按长效注射剂或植入制剂的形式给药，长效注射剂或植入制剂可以按能使有效成分缓释的方式配制。可以将有效成分压成小丸状或小的柱体状，并且以长效注射剂或植入制剂的形式植入皮下或肌内。植入物可以应用惰性材料，例如可生物降解的混合物或合成的硅氧烷类，例如Dow- Corning公司制造的硅橡胶、硅氧橡胶。

实　例

通过下述非限制性实例说明本发明。

实　例　1

Y- P- S- K- P- D- c - Aoc- A- R- C- Y- S-
A- L- R- H- Y- I- N- L- I- T- R- I- R- Y- #
的制备

用固相合成方法，在对甲基二苯甲基胺树脂（0.40mmol/g；Pestides Intl.）上，使用Applied Biosystems 430 - A型肽合成仪在0.5 mmol刻度下制备标题肽衍生物。除Arg和Asn是用DCC/ HOBT方法进行二次缩合（double couple）外，所有的其他残基都是以N^{α}-t-Boc- 保护的氨基酸的对称酸酐的形式进行二次缩合的。侧链保护如下：Arg（Tos），Asp（Chx），Cys(pMe Bzl)，His（Tos），Ser（Bzl），Tyr（2-Brz），Lys（2-Clz），Thr(`Bzl)。肽（理论量0.25mmol）从载体树脂上切下，并且用含5 %苯甲醚的液体氟化氢于-5℃反应40分钟脱去保护。真空除去氟化氢之后，用30%乙酸和水从树脂中提取肽。将提取液稀释至1 升，用氢氧化铵调节 pH到8 和9 之间，加入0.01N铁氰化钾，直至黄色持续存在（约需25ml）。搅拌30分钟之后，用冰醋酸使 pH降至<5，将该溶液与25ml稳定的AG3 × 4 A树脂（Bio- Rad）一起搅拌2 小时。溶液过滤除去所用树

脂，再冷冻干燥。留下的肽物质在Dynamax C-18柱（41.4×250 mm；Rainin）上用制备性高压液相色谱法纯化，以乙腈在0.1%三氟乙酸（TFA）中的溶液作为洗脱剂。用分析高压液相色谱（Vydac 218 TP54柱，4.6×250 mm，2.0 ml/分钟，t_c-1.9分钟，线性梯度15－40%的乙腈在0.1%TFA中的溶液，25分钟）、氨基酸分析（AAA）（含8%苯酚的6 N HCl；106℃；20和40小时）和快速原子轰击质谱（FAB-MS）（M-Scan公司）检验肽的纯度和对其定性。

AAA[a]：B-1.96；T-1.03；S-1.62，P-1.88；A-1.96，I-2.84；L-2.14，Y-4.04，H-1.09，R-4.06。

[a] 6 N HCl，24小时，106℃。

快速原子轰击质谱（M+H）$^+$ 3311.2±1 mu。