

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C07K 7/22

A61K 38/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95191462.6

[43]公开日 1997 年 1 月 8 日

[11] 公开号 CN 1139931A

[22]申请日 95.1.10

[30]优先权

[32]94.2.3 [33]US[31]08 / 191,571

[86]国际申请 PCT / US95 / 00296 95.1.10

[87]国际公布 WO95 / 21187 英 95.8.10

[85]进入国家阶段日期 96.8.2

[71]申请人 默里尔药物公司

地址 美国俄亥俄州

[72]发明人 T·J·奥温 E·M·库德拉兹

S·H·布克

S·L·哈尔布桑

[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 黄革生

权利要求书 9 页 说明书 51 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 环状神经激肽A拮抗剂

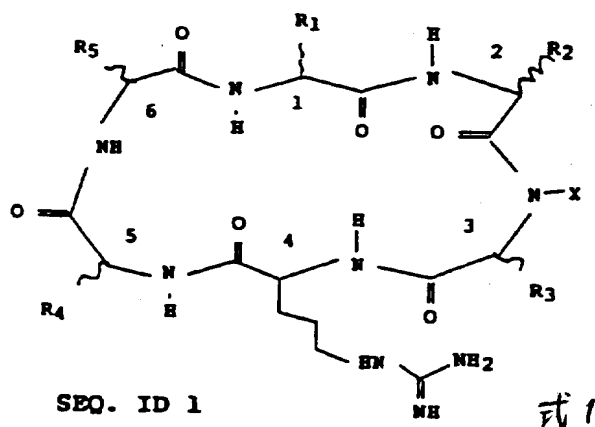
[57]摘要

描述了作为新的环状六肽和八肽化合物的神经激肽 A 拮抗剂。还描述了在神经激肽 A 所牵涉的各种条件下,使用常规竞争结合和生物化学检测法以及常规生理学试验证实这些衍生物对神经激肽 A 的拮抗作用。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 下列结构式的化合物或其水合物、立体异构体、电子等排物或其医药上可接受的盐：



其中

R_1 是苄基、对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R_2 是苄基、3-吲哚基甲基或 $(CH_2)_2 - CONH_2$ ；

R_3 是 C_{1-5} 线性或支链烷基且 X 是 H 或 R_3 与 X 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ ；

R_4 是 H、苄基、3-吲哚基甲基或对羟基苄基；

R_5 是 H、甲基或 3-吲哚基甲基；

条件是当 R_2 是 $(CH_2)_2 - CONH_2$ 时， R_1 是对羟基苄基并且连接有 R_1 的碳是(R)的绝对构型的。

2. 权利要求 1 的化合物或其水合物、电子等排物或其医药上可接受的盐，该化合物中

R_1 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R_2 是 3-吲哚基甲基；

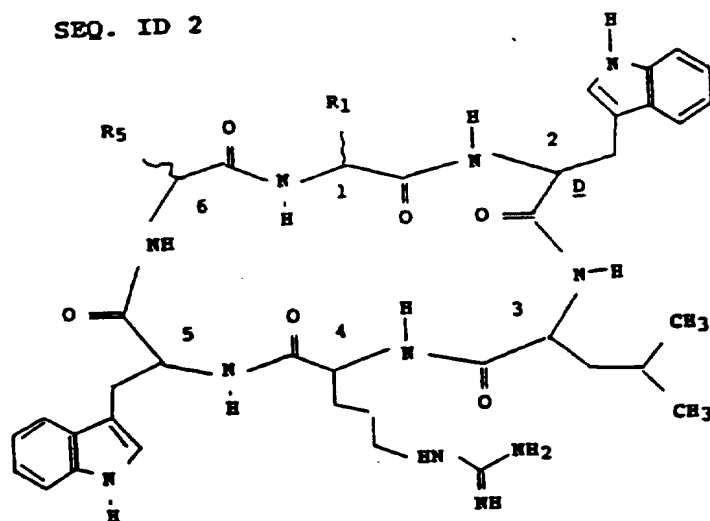
R_3 是 $CH_2CH(CH_3)_2$ ，且 X 是 H；

R_4 是 3-吲哚基甲基；

R₅ 是 H 或甲基。

3. 权利要求 2 的化合物, 其中 R₅ 是 H。

4. 下列结构式的化合物或其水合物, 电子等排物或医药上可接受的盐:



其中 R₁ 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基, 且 R₅ 是 H 或甲基。

5. 权利要求 1 的化合物, 其中所说的化合物选自:

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly], SEQ. ID 6

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly], 或 SEQ. ID 7

环[tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly], SEQ. ID 8

6. 权利要求 1 的化合物, 其中所说的化合物选自:

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly], SEQ. ID 9

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Ala], 或 SEQ. ID 10

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-ala], SEQ. ID 11。

7. 权利要求 1 的化合物, 其中所说的化合物选自:

环[Tyr-Trp-Leu-Arg-Trp-Gly], SEQ. ID 12

环[Tyr-trp-Ala-Arg-Trp-Gly], 或 SEQ. ID 13

环[Tyr-trp-Leu-Arg-trp-Gly], SEQ. ID 14。

8. 权利要求 1 的化合物, 其中所说的化合物选自:

环[tyr-Gln-Leu-Arg-Trp-Gly], SEQ. ID 15

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Ala], 或 SEQ. ID 16

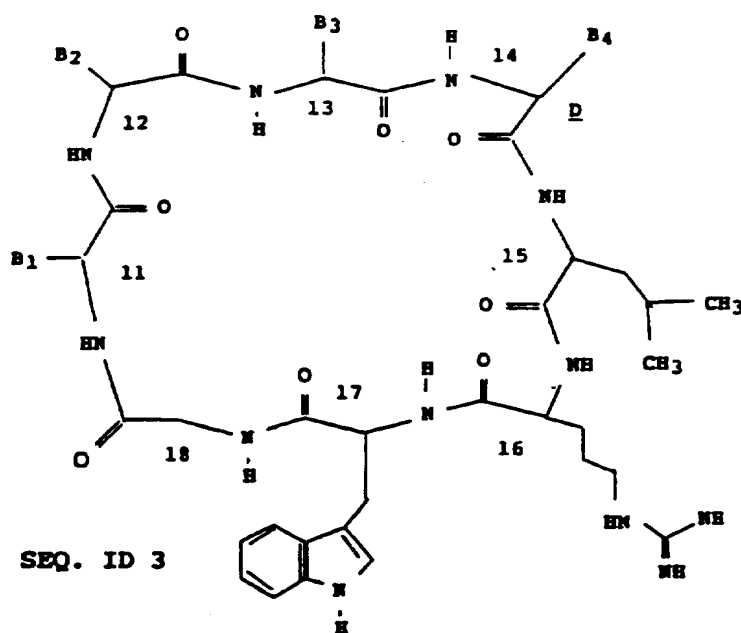
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Gly-Trp], SEQ. ID 17

9. 权利要求 1 的化合物, 其中所说的化合物选自:

环[Tyr-trp-Pro-Arg-Trp-Gly]或 SEQ. ID 18

环[Phe-phe-Pro-Arg-Phe-Gly], SEQ. ID 19

10. 下列结构式的化合物或其生理上可接受的盐



其中

B₁ 是 C₁₋₅ 线性或分支烷基、苄基、对羟基苄基或 3-吲哚基甲基;

B₂ 是 (CH₂)₄-NH₂、(CH₂)₃-NH₂、(CH₂)₃-NHC(=NH)NH₂ 或 3-吲哚基甲基;

B₃ 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基;

B₄ 是 H 或 (CH₂)₂-CONH₂。

11. 权利要求 10 的化合物, 其中 B₁ 是 CH₂CH(CH₃)₂ 或对羟基苄基, B₂ 是 (CH₂)₃-NHC(=NH)NH₂ 或 3-吲哚基甲基。

12. 权利要求 10 的化合物, 其中 B₁ 是 CH₂CH(CH₃)₂, B₂ 是 (CH₂)₃-NHC(=NH)NH₂, B₃ 是 3-吲哚基甲基并且 B₄ 是 H, 或者 B₁ 是对羟基苄基, B₂ 是 3-吲哚基甲基, B₃ 是对羟基苄基并且 B₄

是 $(\text{CH}_2)_2 - \text{CONH}_2$ 。

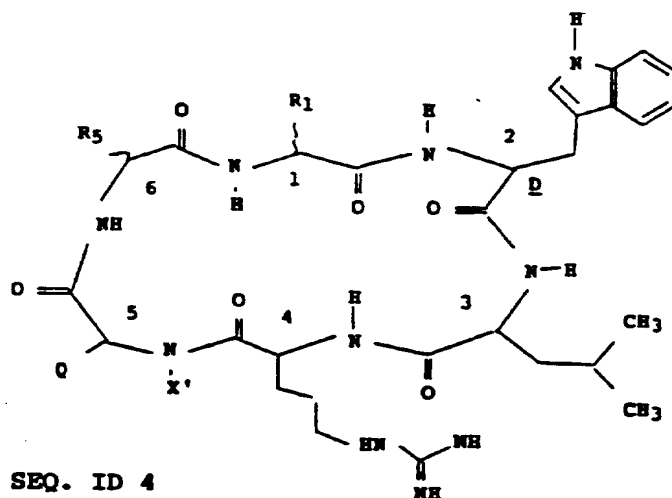
13. 权利要求 10 的化合物, 其中所说的化合物选自:

环[Leu - Arg - Trp - Gly - Leu - Arg - Trp - Gly] 或 SEQ. ID

20

环[Tyr - Trp - Tyr - glu - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 21。

14. 下列结构式的化合物或其医药上可接受的盐:

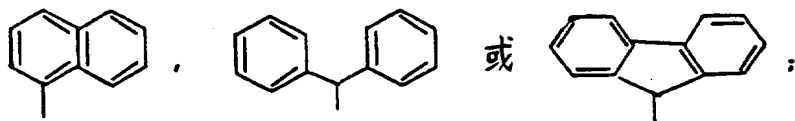


其中

R_1 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基;

R_5 是 H 或甲基; 并且

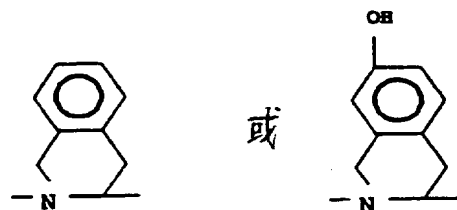
Q 是对氯苄基、对硝基苄基、对 NH_2 -苄基、对甲氧基苄基或有
下列结构式的基团:



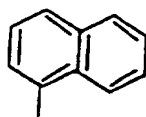
X' 为 H;

其中 Q 和 X' , 连同它们各自连接的碳和氮可连接形成有下列结构式

的基团：



15. 权利要求 14 的化合物, 其中 Q 是对氯苄基、对硝基苄基、对 NH_2 -苄基或下列结构式的基团：



16. 权利要求 14 的化合物, 其中所说的化合物选自：

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Nal - Gly], SEQ. ID 22

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (p - NO_2 - Phe) - Gly], SEQ. ID 23

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (p - NH_2 - Phe) - Gly], SEQ. ID 24

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (p - Cl - Phe) - Gly], SEQ. ID 25

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Tiq - OH) - Gly], SEQ. ID 36

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (tiq) - Gly], SEQ. ID 35

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Tiq) - Gly], SEQ. ID 34

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Me - Tyr) - Gly], SEQ. ID 33

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Dpa) - Gly](II), SEQ. ID 32

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Dpa) - Gly](I), SEQ. ID 31

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Flg) - Gly](II)或 SEQ. ID 30

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Flg) - Gly](I), SEQ. ID 29。

17. 含有权利要求 1 之化合物和医药上可接受之载体的药物组合物。

18. 含有权利要求 1 的化合物和载体的组合物。

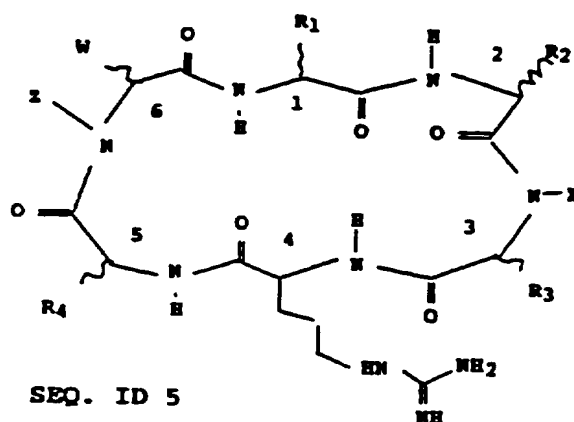
19. 含有权利要求 10 的化合物和医药上可接受之载体的药物组合物。

20. 含有权利要求 10 的化合物和载体的组合物。

21. 含有权利要求 14 之化合物和医药上可接受之载体的药物组合物。

22. 含有权利要求 14 的化合物和载体的组合物。

23. 下列结构式的化合物或其水合物、立体异构体、电子等排物或其医药上可接受的盐在制备治疗呼吸道疾病之药物中的应用, 所说的化合物中:



R₁ 是苄基、对羟基苄基或 3-吡啶基甲基;

R₂ 是苄基、3-吡啶基甲基或(CH₂)₂-COOH;

R₃ 是 C₁₋₅ 线性或分支烷基, 且 X 是 H, 或者 R₃ 和 H 连接在一起形成 -(CH₂)₃-;

R₄ 是 H、苄基、3-吡啶基甲基或对羟基苄基;

W 是 H、甲基或 3-吡啶基甲基, 且 Z 是 H, 或者 W 和 Z 连接在一起形成 -(CH₂)₃-; 条件是当 R₂ 是(CH₂)₂-COOH 时, R₁ 是对羟基苄基, 并且连接有 R₁ 的碳是(R)绝对构型的。

24. 根据权利要求 23 的应用, 所说的化合物或其水合物、电子等

排物或医药上可接受的盐中：

R₁ 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R₂ 是 3-吲哚基甲基；

R₃ 是 CH₂CH(CH₃)₂ 并且 X 是 H；

R₄ 是 3-吲哚基甲基；

R₅ 是 H 或甲基并且 Z 是 H, 或 R₅ 和 Z 连接在一起形成 - (CH₂)₃ -。

25. 根据权利要求 23 的应用, 其中化合物选自：

· 环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 6

环[Trp - trp - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 7

环[tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 8

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Tyr - Gly], SEQ. ID 9

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Ala], SEQ. ID 10

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - ala], SEQ. ID 11

环[Tyr - Trp - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 12

环[Tyr - trp - Ala - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 13

环[Tyr - trp - Leu - Arg - trp - Gly], 或 SEQ. ID 14

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Pro], SEQ. ID 26。

26. 根据权利要求 23 的应用, 其中所说的呼吸道疾病是哮喘。

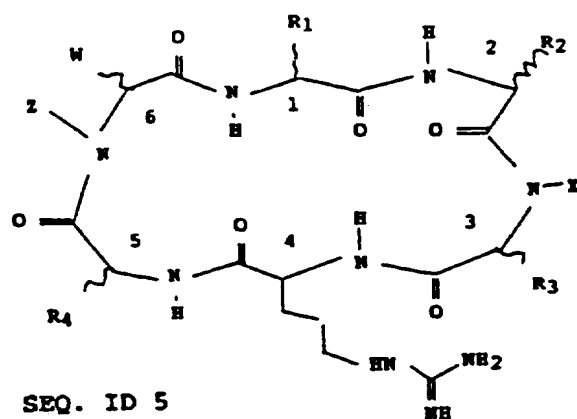
27. 根据权利要求 10 - 13 中任何一项的化合物用于制备治疗呼吸道疾病的药物。

28. 根据权利要求 27 的应用, 其中所说的呼吸道疾病是哮喘。

29. 根据权利要求 14 - 16 中任何一项的化合物用于制备治疗呼吸道疾病的药物。

30. 根据权利要求 29 的应用, 其中所说的呼吸道疾病是哮喘。

31. 下列结构式的化合物或其水合物、立体异构体、电子等排物或其医药上可接受的盐用于制备止痛, 所说的化合物中: R₁ 是苄基、



对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R_2 是苄基、3-吲哚基甲基或 $(CH_2)_2 - COOH$ ；

R_3 是 C_{1-5} 线性或分支烷基，且 X 是 H，或者 R_3 和 H 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ ；

R_4 是 H、苄基、3-吲哚基甲基或对羟基苄基；

W 是 H、甲基或 3-吲哚基甲基，且 Z 是 H，或者 W 和 Z 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ ；条件是当 R_2 是 $(CH_2)_2 - COOH$ 时， R_1 是对羟基苄基，并且连接有 R_1 的碳是 (R) 绝对构型的。

32. 根据权利要求 31 的应用，所说的化合物或其水合物、电子等排物或医药上可接受的盐中：

R_1 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R_2 是 3-吲哚基甲基；

R_3 是 $CH_2CH(CH_3)_2$ ，并且 X 是 H；

R_4 是 3-吲哚基甲基；

R_5 是 H 或甲基，且 Z 是 H，或者 R_5 和 Z 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

33. 根据权利要求 31 的应用，其中化合物选自：

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]，SEQ. ID 6

环[Trp-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]，SEQ. ID 7

环[tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 8

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Tyr - Gly], SEQ. ID 9

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Ala], SEQ. ID 10

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - ala], SEQ. ID 11

环[Tyr - Trp - Leu - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 12

环[Tyr - trp - Ala - Arg - Trp - Gly], SEQ. ID 13

环[Tyr - trp - Leu - Arg - trp - Gly], 或 SEQ. ID 14

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Pro], SEQ. ID 26。

34. 根据权利要求 10 - 13 中任何一项的化合物用于制备止痛药。

35. 根据权利要求 14 - 16 中任何一项的化合物用于制备止痛药。

说明书

环状神经激肽 A 拮抗剂

发明的背景

本发明涉及作为神经激肽 A 和其医药上可接受之盐的拮抗剂的新的环肽化合物。因此本发明的目的是提供新的和有用的化合物和其医药上可接受的盐。

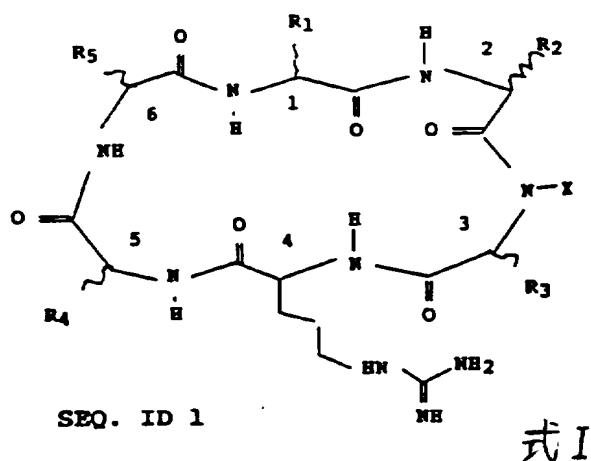
神经激肽 A 和相关速激肽、物质 p 和神经激肽 B 是一组显示在身体组织内有广泛分布并产生无数生物学效应的天然肽。虽然有关于速激肽在中枢神经系统中发挥作用的证据,但研究表明它们大部分作用是发生在外周组织。例如,神经激肽 A 强有力地接触呼吸道平滑肌,同时对粘膜分泌、血管舒张及微血管渗漏产生一定作用,从而提示这些化合物主要是用作新的抗支气管收缩剂。已显示神经激肽在其中产生平滑肌收缩作用的其他组织包括虹膜括约肌、胃肠道的各个部分、维管结构、包括输尿管、肾盂和膀胱在内的尿路系统,此提示可使用速激肽拮抗剂作为抗痉挛剂。

本发明的再一个目的是提供用于治疗 and 预防有需要之病人的各种疾病的化合物,或其医药上可接受的盐。因为一般认为速激肽参与炎症和免疫功能。所以它们可用于治疗与炎症相关的疾病,其中所说的炎症包括哮喘、变态反应、支气管炎、鼻炎、Crohn 氏病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、偏头痛、膀胱炎、超敏感性反应。速激肽拮抗剂亦适用于治疗咳嗽、疼痛、外周神经病变、疱疹后神经痛、不良免疫反应、呕吐、由于血管舒张引起的血流紊乱、眼病如结合膜炎,及皮肤病如接触性皮炎、特异性皮炎、荨麻疹等。还可以用速激肽拮抗剂治疗焦虑、抑郁、神经病、精神分裂症及痴呆等各种中枢神经系统疾病。

发明概要

本发明涉及式(1)、(2)、(3)和(4)的化合物及其水合物、立体异构体、电子等排物及医药上可接受的盐。具体地说,式 1 的化合物包

括有下列结构式的环六肽或其水合物、电子等排物或医药上可接受的盐：



其中

R_1 是苄基、对羟苄基或 3-吲哚基甲基；

R_2 是苄基、3-吲哚基甲基或 $(CH_2)_2 - CONH_2$ ；

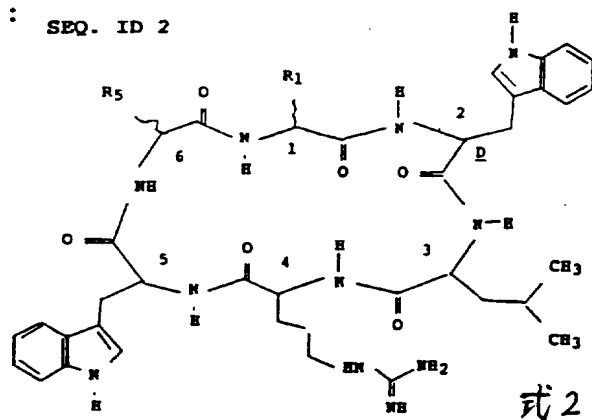
R_3 是 C_{1-4} 线性或分支烷基、X 是 H, 或者 R_3 和 X 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ ；

R_4 是 H、苄基、3-吲哚基甲基或对羟苄基；

R_5 是 H、甲基或 3-吲哚基甲基；

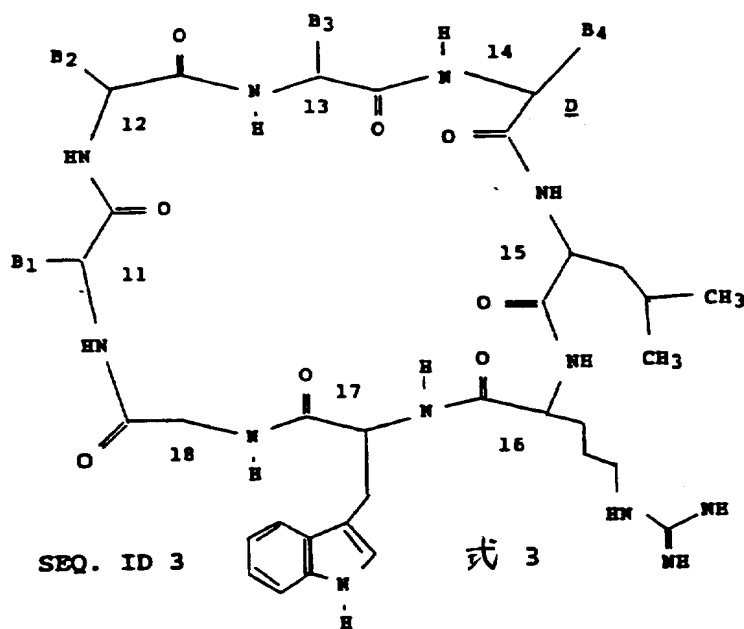
条件是当 R_2 是 $-(CH_2)_2 - CONH_2$ 时 R_1 是对羟苄基, 且其上连接有 R_1 的碳是(R)绝对构型的。

根据本发明, 还提供了下列结构式的新的肽或其水合物、电子等排物或医药上可接受的盐：



其中 R_1 是对羟苄基或 3-吲哚基甲基, 且 R_5 是氢或甲基。

同样还提供了下列结构式的新的肽或其水合物、电子等排物或医药上可接受的盐:



其中

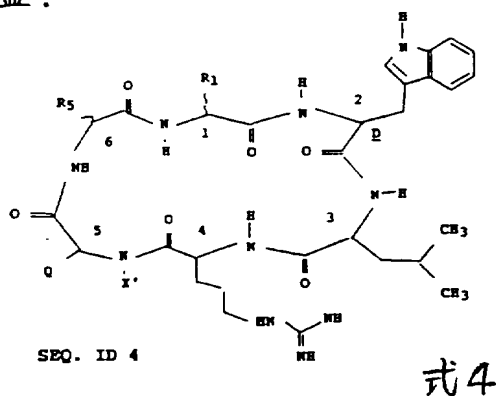
B_1 是 C_{1-4} 线性或分支烷基、苄基、对羟苄基或 3-吲哚基甲基;

B_2 是 $(CH_2)_4 - NH_2$ 、 $(CH_2) - NH_2$ 、 $(CH_2)_3 - NHC(=NH)NH_2$ 或 3-吲哚基甲基;

B_3 是对羟苄基或 3-吲哚基甲基;

B_4 是 H 或 $(CH_2)_2 - CONH_2$ 。

同样, 还提供了有下列结构式的新的肽或其水合物、电子等排物或医药上可接受的盐:

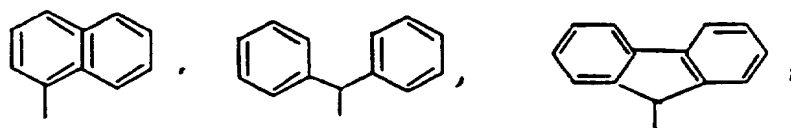


其中

R_1 是对羟苄基或 3-吲哚基甲基；

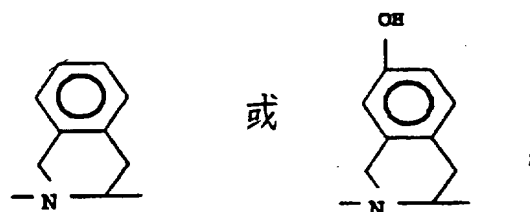
R_5 是 H 或甲基, 并且

Q 是对氯苄基、对硝基苄基、对 NH_2 -苄基、对甲氧基苄基、3-吲哚基甲基或下式的基团：

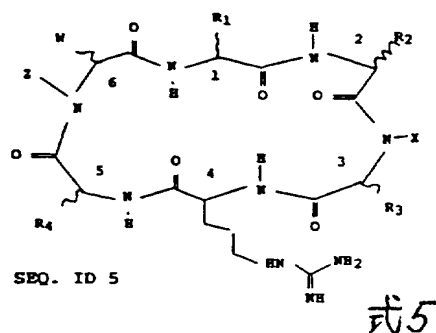


X 是 H；

其中 Q 或 X, 连同它们分别连接的碳和氮可连接形成下列结构式的基团：



本发明还提供治疗患有呼吸道疾病之病人的方法, 包括给所说的病人投用治疗有效量的下列结构式的化合物, 或其水合物或电子等排物或医药上可接受的盐：



其中

R_1 是苄基、对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R_2 是苄基、3-吲哚基甲基或 $(CH_2)_2 - CONH_2$ ；

R_3 是 C_{1-5} 线性或分支烷基，X 是 H 或 R_3 和 X 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ ；

R_4 是 H、苄基、3-吲哚基甲基或对羟基苄基；

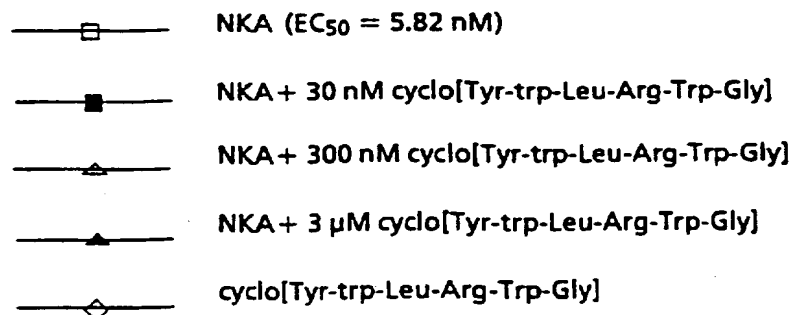
W 是 H、甲基或 3-吲哚基甲基，Z 是 H 或者 W 和 Z 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$ ；

条件是当 R_2 是 $(CH_2)_2 - COOH$ 时， R_1 是对羟基苄基，并且其上面连有 R_1 的碳是(R)绝对构型的。

另外，本发明提供了一种为有其需要的病人提供止痛效果的方法，其包括投用治疗上有效止痛量的式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物，或其立体异构体、电子等排物或医药上可接受的盐。

附图的简要描述

图 1 举例说明环肽即环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] (MDL 102,882) 在 SKLKB82 #3 细胞中产生对 NKA 诱导磷脂酰肌醇(PI)更新的剂量相关性拮抗作用的能力。数据表示为在基线水平上总磷酸肌醇酯积聚的百分刺激作用，并规度化为由 NKA 产生的最大反应。数据为四个(4)分立实验的平均值 $\pm$ S. E. M.。下面列出各剂量反应线并示于图 1 中。



发明的详细描述

本申请中使用的术语“C₁₋₅线性或分支烷基”是指那些有 1-5 个碳原子的直链或分支链烷基基团。例子包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、仲戊基、环戊基等。

术语“立体异构体”是个别分子仅仅在其原子的空间方向上不同的所有异构体的总称。其包括镜象异构体(对映体)、几何(顺式/反式)异构体及具有一个以上手性中心的化合物的异构体,所说的异构体不是另一个的镜象(非对映异构体)。就氨基酸来说,可使用如 I-UPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Eur. J. Biochem. 138:9-37(1984)中所述的符号 D/L 或 R/S。本文中的术语“(R)绝对构型”是用于描述连接有 R₁ 的碳。除甘氨酸外的天然氨基酸均含有手性碳原子。除非另外指出,优选的化合物都是 L 构型的光学活性氨基酸;然而,申请人预期式(1)、(2)、(3)或(4)化合物的氨基酸可以是 D 或 L 构型的,或者可以是 D 和 L 异构体的混合物,包括外消旋混合物。本申请中使用的符号  是指没有指明立体化学特征的键。式(2)和(4)之氨基酸位置 2 和式(3)之氨基酸位置 14 上的符号“D”用于通报存在于那些位置上的氨基酸(当那些氨基酸是甘氨酸时则除外)是“D”构型的。表 1 中列出 α 氨基酸的认定的缩写符号。

表 1

氨基酸	符号
丙氨酸	Ala
甘氨酸	Gly
异亮氨酸	Ile
亮氨酸	Leu
赖氨酸	Lys
苯丙氨酸	Phe
精氨酸	Arg
酪氨酸	Tyr
色氨酸	Trp
缬氨酸	Val
正缬氨酸	Nva
正亮氨酸	Nle
谷氨酸	Glu
脯氨酸	Pro
鸟氨酸	Orn
对氯苯丙氨酸	p - Cl - Phe
对硝基苯丙氨酸	p - NO ₂ - Phe
对氨基苯丙氨酸	p - NH ₂ - Phe
1,2,3,4-四氢-异 喹啉-7-羟基-3-羧酸	Tiq(OH)
1,2,3,4-四氢-异 喹啉-3-羧酸	Tiq
萘基丙氨酸	Nal
苄基甘氨酸	Flg
二苯基丙氨酸	Dpa

“电子等排物”指所连接的氨基酸间的正常肽键($-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$)是 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ (还原的)、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{NH}_3)(\text{N}-\text{甲酰胺})$ 、 $-\text{COCH}_2-$ (酮基)、 $-\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}_2-$ (羟基)、 $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-$ (氨基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (烃)的修饰形式的,或是颠倒的($-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$)。本发明的优选化合物不是呈等排形式的。

式(1)、(2)、(3)、(4)和(5)的化合物可以与无毒性的有机或无机酸形成医药上可接受的盐。可形成适当的盐的无机酸例如包括盐酸、氢硼酸、硫酸和磷酸,以及酸式碱金属盐如正磷酸一氢钠和硫酸氢钾。可形成适当的盐的有机酸例如包括一、二和三羧酸。这样的

酸例如可以是乙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、苹果酸、羟基马来酸、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯乙酸、肉桂酸、唾液酸、2-苯氧基苯甲酸及磺酸,如甲磺酸和2-羟基乙磺酸。

本发明主题化合物的优选实例最好在具有下列基团的式(1)、(2)、(3)、(4)和(5)的化合物中认定,其中:

R_1 是苄基、对羟苄基或3-吡啶基甲基;所说的 R_1 值是分别由下列 D 或 L 氨基酸衍生的:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;

R_2 是苄基、3-吡啶基甲基或 $(CH_2)_2-CONH_2$;所说的 R_2 值是分别由下列 D 或 L 氨基酸衍生的:苯丙氨酸、色氨酸或谷氨酰胺;

R_3 是 C_{1-5} 线性或分支烷基且 X 是 H, 或 R_3 和 X 连接在一起形成 $-(CH_2)_3-$;所说的 R_3 值或 R_3 与 X 组合的值分别是由下列 D 或 L 氨基酸衍生的:甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸或脯氨酸;

R_4 是 H、苄基、3-吡啶基甲基或对羟苄基,所说的 R_4 值是分别由下列 D 或 L 氨基酸衍生的:甘氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸;

R_5 是 H、甲基或3-吡啶基甲基;所说的 R_5 值是分别由下列 D 或 L 氨基酸衍生的:甘氨酸、丙氨酸或色氨酸;

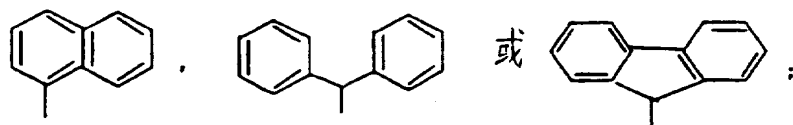
B_1 是 C_{1-5} 线性或分支烷基、苄基、对羟苄基或3-吡啶基甲基;所说的 B_1 值是分别由下列 D 或 L 氨基酸衍生的:甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸;

B_2 是 $(CH_2)_4-NH_2$, $(CH_2)_3-NH_2$, $(CH_2)_3-NHC(=NH)NH_2$ 或3-吡啶基甲基;所说的 B_2 值是分别是 D 或 L 氨基酸精氨酸或色氨酸衍生的;

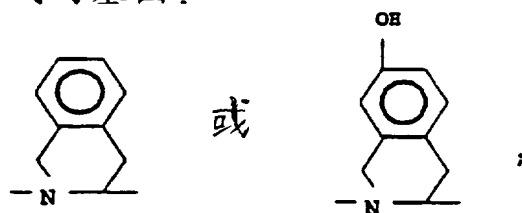
B_3 是对羟苄基或3-吡啶基甲基;所说的 B_3 值是分别是 D 或 L 氨基酸酪氨酸或色氨酸衍生的;

B_4 是 H 或 $(CH_2)_2-CONH_2$;所说的 B_4 值是分别由 D 或 L 氨基酸甘氨酸或谷氨酰胺衍生的;

Q 是对氯苄基, 对硝基苄基, 对 NH_2 苄基, 对甲氨基苄基, 或者是下列结构式的基团:



并且 X 是 H; 或者其中 Q 和 X 连同它们分别连接的碳和氮一起, 可连接形成下列结构式的基团:



所说的 Q 值, 或 Q 和 X 组合的值是分别由下列 D 或 L 氨基酸衍生的: 对氯苯丙氨酸、对硝基苯丙氨酸、对 NH_2 -苄基、甲基酪氨酸、萘基丙氨酸、苄基甘氨酸、二苄基丙氨酸、1, 2, 3, 4-甲氢-异喹啉-3-羧酸, 或 1, 2, 3, 4-四氢-异喹啉-7-羟基-3-羧酸; 并且 W 是 H, 甲基或 3-吲哚基甲基, 且 Z 是 H 或 W 与 Z 连接在一起形成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。优选的式(1)化合物是其中有下列基团的化合物:

R_1 是对羟苄基或 3-吲哚基甲基;

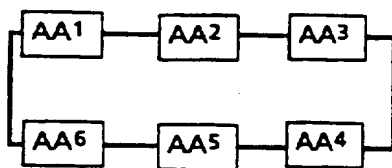
R_2 是 3-吲哚基甲基;

R_3 是 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 且 X 是 H;

R_4 是 3-吲哚基甲基;

R_5 是 H 或甲基。

表示优选之式(1)化合物的简写形式包括结构: 环[$\text{AA}^1 - \text{AA}^2 - \text{AA}^3 - \text{AA}^4 - \text{AA}^5 - \text{AA}^6$]或环结构:



其中 $AA^1 - AA^6$ 是分别表示得出如式(1)所述 $R - R_6$ 残基之上述氨基酸残基的通用代号。

最优选的式(1)化合物是其中有下列基团的化合物：

R_1 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

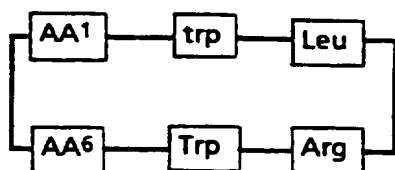
R_2 是 3-吲哚基甲基；

R_3 是 $CH_2CH(CH_3)_2$ 且 X 是 H ；

R_4 是 3-吲哚基甲基；

R_5 是 H 。

式(2)的化合物甚至是式(1)化合物的更优选的基团。氨基酸 2-5 都有固定的立体化学：氨基酸 2 是(D)构型的，而氨基酸 3-5 都是(L)构型的。表示式(2)化合物的简写形式包括结构：环 $[AA^1 - trp - Leu - Arg - Trp - AA^6]$ 或环结构：



其中 trp 是 D-色氨酸、Leu 是 L-亮氨酸、Arg 是 L-精氨酸、Trp 是 L-色氨酸、并且 AA^1 和 AA^6 是给出如式(2)中所述 R_1 和 R_6 残基之上述氨基酸残基的通用记号。

以缩写形式显示的，式(1)和(2)之新肽的有代表性的例子包括：

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 6

环[Trp - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 7

环[tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 8

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Tyr - Gly] SEQ. ID 9

环[Tyr - Trp - Leu - Arg - Trp - Ala] SEQ. ID 10

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - ala] SEQ. ID 11

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 12

环[Tyr - trp - Ala - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 13

环[Tyr - trp - Leu - Arg - trp - Gly] SEQ. ID 14

环[tyr - Gln - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 15

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Tyr - Ala] SEQ. ID 16

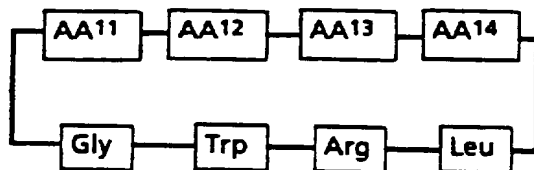
环[Tyr - trp - Leu - Arg - Gly - Trp] SEQ. ID 17

环[Tyr - trp - Pro - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 18

环[Phe - phe - Pro - Arg - Phe - Gly] SEQ. ID 19

优选的式(3)化合物是其中 B_1 为 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 或对羟基苄基, B_2 为 $(\text{CH}_2)_3 - \text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 或 3-吲哚基甲基的式(3)化合物。

优选的式(3)化合物的简写结构可以表示为: 环[$\text{AA}^1 - \text{AA}^{12} - \text{AA}^{13} - \text{AA}^{14} - \text{Leu} - \text{Arg} - \text{Trp} - \text{Gly}$]或环结构:



更优选的式(3)化合物包括其中有下列基团的式(3)化合物:

B_1 是 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$;

B_2 是 $(\text{CH}_2)_3 - \text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;

B_3 是 3-吲哚基甲基;以及

B_4 是 H;或者

B_1 是对羟基苄基;

B_2 是 3-吲哚基甲基;

B_3 是对羟基苄基;以及

B_4 是 $(\text{CH}_2)_2 - \text{COOH}$ 。

以缩写形式描述的式(3)之新肽的代表性例子包括:

环[Leu - Arg - Trp - Gly - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 20

环[Tyr - Trp - Tyr - glu - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 21

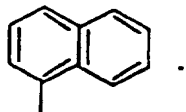
优选的式(4)化合物是其中有下列基团的式(4)化合物:

R_1 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基;

R_5 是 H 或甲基;

X 是 H;

Q 是对氯苄基、对硝基苄基、对 NH_2 -苄基或者是下列的基团



以缩写形式表示的式(4)新肽的代表性例子包括:

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Nal-Gly] SEQ. ID 22

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p- NO_2 -Phe)-Gly] SEQ. ID 23

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p- NH_2 -Phe)-Gly] SEQ. ID 24

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-Cl-Phe)-Gly]. SEQ. ID 25

优选的式(5)化合物是其中有下列基团的式(5)化合物:

R_1 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基;

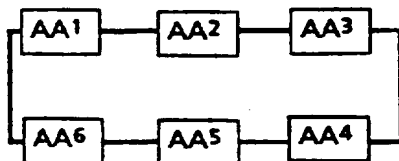
R_2 是 3-吲哚基甲基;

R_3 是 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 且 X 是 H;

R_4 是 3-吲哚基甲基;

W 是 H 或甲基且 Z 是 H, 或者 W 和 Z 连接在一起形成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

表示式(5)之优选化合物的简写形式包括结构: 环[$\text{AA}^1 - \text{AA}^2 - \text{AA}^3 - \text{AA}^4 - \text{AA}^5 - \text{AA}^6$]或环结构:



其中 AA¹ - AA⁶ 是分别给出如式(5)所述 R₁ - R₆ 残基的上述氨基酸残基的通用代号。

更优选的式(5)化合物是其中有列基团的式(5)化合物：

R₁ 是对羟基苄基或 3-吲哚基甲基；

R₂ 是 3-吲哚基甲基；

R₃ 是 CH₂CH(CH₃)₂ 且 X 是 H；

R₄ 是 3-吲哚基甲基；

R₅ 是 H。

本文以缩写形式列示的式(5)肽的代表性例子是：

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 6

环[Trp - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 7

环[tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 8

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Tyr - Gly] SEQ. ID 9

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Ala] SEQ. ID 10

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - ala] SEQ. ID 11

环[Tyr - Trp - Leu - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 12

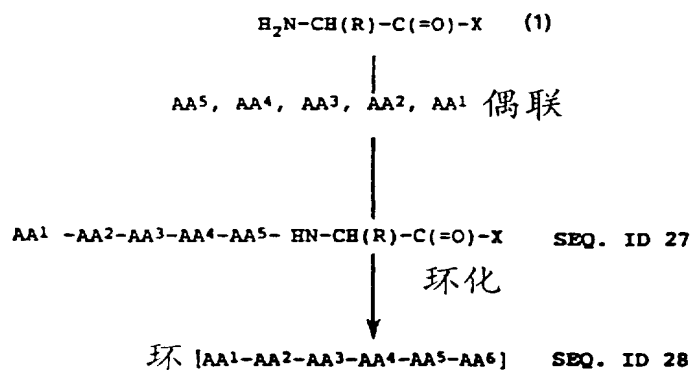
环[Tyr - trp - Ala - Arg - Trp - Gly] SEQ. ID 13

环[Tyr - trp - Leu - Arg - trp - Gly] SEQ. ID 14

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Pro] SEQ. ID 26

总地说来，可以按本领域已知的类似的标准化学方法制备相应的线性肽，然后使之环化以制成式(1) - (5)的化合物。反应流程 A 概述制备式(1)、(2)、(4)和(5)之环六肽的一般合成流程，但也可以按该流程制备式(3)的环八肽。

流程 A



流程 A 提供适于制备式(1) - (5)之化合物的通用合成流程。

AA¹、AA²、AA³、AA⁴ 和 AA⁵ 基团可连接到结构(1)之氨基酸衍生物的游离氨基基团上。可用已知的肽偶联技术将 AA¹、AA²、AA³、AA⁴ 和 AA⁵ 基团连接到未被保护的游离氨基化合物上。然后可用已知的肽环化技术使如此连接的线性肽环化。

一般说来,可将 C 末端残基的 α 氨基去保护并使用述方法通过肽键偶联下一个适当保护的氨基酸来延长肽。重复该去保护和偶联程序直到得到所需的序列。可按如流程 A 中所示的分步方式,或以片段(两个至几个氨基酸)缩合,或全用两种方法,或按照最初由 Merrifield(J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149 - 2154)描述的固相肽合成法,用组成氨基酸进行这一偶联。可使用固相合成方法时,将 C 末端羧酸连接到不溶性载体(通常是聚苯乙烯)上。这些不溶性载体含有一个与 α 羧基基团充分反应以形成适合于链延伸条件但其后又容易被裂解之键的基团。载体可以是但不限于氯代一或溴代甲基树脂、羟甲基树脂和氨甲基树脂。这些树脂中有许多是可从市场上购得的,并且是已掺入了所需之 C 末端氨基酸的。用于本发明的许多适当被保护的氨基酸都是可从商业途径获得的。虽然还不能购得氨基酸二苯基甘氨酸和苄基甘氨酸,但可用本领域已知例如 Chassaing, Josien, Lavielle, "Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium" 和 Martin J. O'Donnell and Robin L. Polt, J. Org. Chem., 1982, 47, 266 - 2666 所述的方法合成之。

另外,也可使用自动肽合成仪器合成本发明的化合物。此外,在 Stewart and Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984); Gross, Meienhofer, Udenfriend, Eds., "The Reptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 1, 2, 3, 5 和 9, Academic Press, New York, 1980 - 1987; Bodanszky, "Peptide Chemistry: A Practical Textbook", Springer - Verlag, New York (1988); 和 Bodanszky, et al., "The Practice of Peptide Synthesis", Springer - Verlag, New York (1984)中也描述了肽合成方法(上述文

献均列为本文参考文献)。

可使用标准偶联方法如叠氮化物法、混合的碳酸酐(氯代甲酸-异丁酯)法、碳二亚胺(二环乙基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺或水溶性碳二亚胺)法、活性酯(对硝基苯酯、N-羟基-琥珀酰亚胺酯)法、Woodward 试剂 K 法、羰基二咪唑法、磷试剂如 Bop-cl 或氧化-还原方法进行两个氨基酸间、氨基酸和肽间,或两个肽片段间的偶联。这些方法(特别是碳二亚胺法)中的某些可经加入 1-羟基苯并三唑得以提高效率。可在溶液(液相)或固相中进行这些偶联反应。

在偶联反应期间必须将组成氨基酸的功能性基团保护起来以避免不期望有的键的形成。在 Greene, "Protecting groups Organic Chemistry", John Wiley & Sons, New York (1981) 和 "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 3, Academic Press, New York (1981)(其内容列为本文参考文献)中列出了可使用的保护基团。

通常使用可被裂解得到羧酸的酯来保护 C 末端残基的 α -羧基基团。可使用的保护基团包括:1)烷基如甲基和叔丁基酯,2)芳基如苄基和被取代的苄基酯,或3)可经温和碱处理或温和还原方法裂解的酯如三氯乙酯和苯甲酰甲酯。

每个氨基酸的 α 氨基基团均必须得以保护。可使用本领域已知的任何保护基团。其例子包括:1)酰基型如甲酰、三氯乙酰、邻苯二甲酰和对甲苯磺酰;2)芳族氨基甲酰酯型如苄氧基羰基(Cbz 或 Z)和被取代的苄氧基羰基、1-(对双苯基)-1-甲基乙氧基-羰基和 9-苄基甲氧基羰基(Fmoc);3)脂族氨基甲酰酯型如叔丁氧基羰基(Boc)、乙氧基羰基、二异丙基甲氧基羰基和烯丙氧基羰基;4)环烷基氨基甲酰酯型环戊氧基羰基和金刚烷氧基羰基;5)烷基型如三苯基甲基和苄基;6)三烷基硅烷型如三甲基硅烷;以及 7)含硫醇型如苯基硫代羰基和二硫基琥珀酰基。优选的 α 氨基保护基团是 Boc 或 Fmoc, 更好是 Fmoc。许多用于肽合成的适当被保护的氨基酸都是可从商业途径获得的。

在偶联下一个氨基酸之前裂解掉 α 氨基保护基团。当使用 Boc

基团时,选用的方法中是使用三氟乙酸(纯净的或加在二氯甲烷中),或加于二噁烷中的 HCl。然后在偶联之前或在原位用碱性溶液如缓冲液,或溶于二氯甲烷或二甲基甲酰胺中的叔胺中和所得到的铵盐。当使用 Fmoc 基团时,所选用的试剂是加于二甲基甲酰胺中的哌啶或被取代的哌啶,但也可使用任何仲胺或碱性水溶液。在 0℃ 和室温间的温度下进行去保护。

在使用上述任何一类基团制备肽期间,必须保护带有侧链功能性的任何氨基酸。本领域技术人员将会理解到,对这侧链功能性之适当保护基团的选择和使用取决于肽中的氨基酸和及其他保护基团的存在。当在去保护和偶联 α 氨基基团期间不必除去这些保护基团的情况下,对这些保护基团的选择是十分重要的。例如,当使用 Boc 作为 α 氨基保护基团时,可利用对甲苯磺酰基部分保护氨基酸如 Lys 和 Arg 的氨基侧链。当选用 Fmoc 保护 α 氨基时,通常可利用叔丁基为基础的保护基团。例如可使用 Boc 保护精氨酸。

一旦完成肽的延长即除去所有的保护基团。在使用溶液相合成法时,可根据所选用的保护基团来确定除去保护基团的方法。这些方法是本领域技术人员已知的。

当利用固相合成法合成时,通常在从树脂上裂解掉肽的同时除去保护基团。当在合成的使用 Boc 保护程序时,从树脂上裂解掉肽的优选方法是在 0℃ 下用含无水 HF 的添加剂如二甲硫、茴香醚、茴香硫醚、对甲酚处理。也可用其他酸性试剂如三氟甲磺酸/三氟乙酸混合物完成肽的裂解。如果使用 Pmoc 保护程序则用上述试剂切掉 N 末端 Fmoc 基团。使用三氟乙酸和各种添加剂如茴香醚等的溶液从树脂上裂解其他保护基团和肽。

然后从树脂上去掉线性肽并根据需要除去任何保护基团,使用常规方法例如用溶于三甲基甲酰胺中的三乙胺和二苯磷酰基叠氮化物处理环化线性肽。在以常用方式如使用层析法纯化粗环肽之前,除去所有保留的保护和功能性基团前体,或转化成所需的基团。

下列实施例给出典型的合成实验。这些实施例应理解为举例说明而不是以任何方式限制本发明的范围。文中使用的下列术语的意

义是：“g”代表克；“mmol”代表微摩尔；“ml”指毫升；“bp”代表沸点；“℃”是指摄氏温度；“mmHg”是指毫米汞柱；“μL”代表微升；“BrZ”代表溴代苄氧基羰基；“Tos”代表对甲苯磺酰基；“Bzl”代表苄基；“NMP”代表 N-甲基吡咯烷酮；“HoBt”代表 1-羟基苯并三唑；“DCC”代表 N,N-二环己基碳二亚胺；“DCM”代表二氯甲烷；“DMF”代表二甲基甲酰胺；“DPPA”代表二苯磷酰基叠氮化物；“TEA”代表三乙胺。

实施例 1：环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 6 的制备

A. 线性肽的合成

使用 Applied Biosystems 430A 自动肽合成仪和制造商提供的程序，以标准固相法合成实施例 1 的肽。使用市售 Boc-氨基酸进行下列侧链保护：Tyr(BrZ), Arg(Tos), Glu(Bzl)。用三氟乙酸(2% 茴香醚)使市售的 Boc-Gly-PAM 树脂(0.5mmol, Applied Biosystems)去保护，并在 NMP 中与 Boc-氨基酸的 HoBt 酯(4 当量)偶联。使 Boc-氨基酸与 DCC 和 HOBT 反应以生成 Boc-氨基酸的 HOBT 酯。偶联进行 30 分钟，然后用 NMP 和 DCM 洗树脂。用乙酰酰化来反应的胺。重复进行去保护和偶联直至完成对被保护肽树脂的装配。在使线性肽去保护的同时，在茴香醚(5%)存在下用无水氯化氢(10ml)于 0℃ 处理 30 分钟以从树脂上除掉线性肽。用 50% 乙酸、水和含水乙腈提取肽并冻干之。

B. 线性肽的环化

将粗制线性肽溶解于 DMF(~5μmol/ml)中并用 DPPA(5 当量)使之环化，同时加 TEA 调到 PH9。反应(4-48 小时)完成后，除去溶剂并从乙腈/水中冻干粗制环肽。在 70% 乙酸中，使用 Spectragel GF05 柱(2.5x55cm)经凝胶过滤使环肽脱盐，并使用 0.1% 含水 TFA 和乙腈的各种梯度经反相制备性 HPLC(Dynamax C18, 21.4x250mm, Rainin)纯化之。经分析性 HPLC(Vydac 218TP54, 4.6x250mm)、FAB-MS 和氨基酸分析鉴定纯化之肽的特征。

Mol Wt:861.4

AAA:Tyr 0.95(1);Leu 0.99(1);Arg 1.01(1);Gly 1.05(1)。

FAB-MS:862.4

用与实施例1所述者相同的方法完成实施例2-29所述肽的合成。

实施例2

环[Trp-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 7 的制备
Mol Wt:884.4

AAA:Leu 0.96(1);Arg 0.99(1);Gly 1.05(1).

FAB-MS:885.4

实施例3

环[tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 8 的制备
Mol Wt: 861.4

AAA: Tyr 1.00(1);Leu 0.95(1);Arg 1.00(1);Gly 1.05(1).

FAB-MS:862.3

实施例4

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Gly]SEQ. ID 9 的制备
Mol Wt: 838.4

AAA: Tyr 1.91(2);Leu 0.91(1);Arg 1.01(1);Gly 1.17(1).

FAB-MS:839.4

实施例5

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Ala]SEQ. ID 10 的制备
Mol Wt: 875.4

AAA: Tyr 0.96(1);Leu 0.94(1);Arg 1.05(1);Ala 1.05(1).

FAB-MS: 876.3

实施例6

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-ala]SEQ. ID 11 的制备
Mol Wt: 875.4

AAA: Tyr 0.97(1);Leu 0.95(1);Arg 1.03(1);Ala 1.04(1).

FAB-MS: 876.3

实施例7

环[Tyr-Trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 12 的制备

Mol Wt: 861.4

AAA: Tyr 0.97(1); Leu 0.99(1); Arg 0.98(1); Gly 1.07(1).

FAB-MS: 862.4

实施例 8

环[Tyr-trp-Ala-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 13 的制备
Mol Wt: 819.4

AAA: Tyr 0.95(1); Arg 0.99(1); Gly 1.05(1); Ala 1.02(1).

FAB-MS: 820.4

实施例 9

环[Tyr-trp-Leu-Arg-trp-Gly]SEQ. ID 14 的制备
Mol Wt: 861.4

AAA: Tyr 0.96(1); Leu 0.99(1); Arg 1.00(1); Gly 1.06(1).

FAB-MS: 862.3

实施例 10

环[tyr-Gln-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 15 的制备
Mol Wt: 803.4

AAA: Tyr 0.95(1); Leu 1.01(1); Arg 0.92(1); Gly 1.07(1); Glx 1.04(1).

FAB-MS: 804.5

实施例 11

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Ala]SEQ. ID 16 的制备
Mol Wt: 852.4

AAA: Tyr 1.98(2); Leu 0.96(1); Arg 1.05(1); Ala 1.01(1).

FAB-MS: 853.4

实施例 12

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Gly-Trp]SEQ. ID 17 的制备
Mol Wt: 861.4

AAA: Tyr 0.83(1); Leu 0.89(1); Arg 1.10(1); Gly 1.19(1).

FAB-MS: 862.3

实施例 13

环[Tyr - trp - Pro - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 18 的制备
Mol Wt: 845.4
AAA: Tyr 0.90(1); Arg 1.01(1); Gly 1.10(1); Pro 0.98(1).
FAB - MS: 846.3

实施例 14

环[Phe - phe - Pro - Arg - Phe - Gly]SEQ. ID 19 的制备
Mol Wt: 751.4
AAA: Arg 1.03(1); Gly 1.12(1); Pro 1.02(1); Phe 2.82(3).
FAB - MS: 752.3

实施例 15

环[Leu - Arg - Trp - Gly - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 20
的制备
Mol Wt: 1024.6
AAA: Leu 2.00(2); Arg 1.90(2); Gly 2.10(2).
FAB - MS: 1025.4

实施例 16

环[Tyr - Trp - Tyr - glu - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 21
的制备
Mol Wt: 1152.5
AAA: Tyr 1.94(2); Leu 1.00(1); Arg 0.97(1); Gly 1.03(1); Glx
(1).
FAB - MS: 1153.5

实施例 17

环[Tyr - trp - Leu - Arg - Nal - Gly]SEQ. ID 22 的制备
Mol Wt: 872.5
AAA: Tyr 0.94(1); Leu 0.98(1); Arg 1.01(1); Gly 1.08(1).
FAB - MS: 873.4

实施例 18

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (p - NO₂ - Phe) - Gly]SEQ. ID 23
的制备

Mol Wt: 867.4

AAA: Tyr 0.95(1); Leu 0.97(1); Arg 1.02(1); Gly 1.08(1).

FAB-MS: 868.4

实施例 19

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (p - NH₂ - Phe) - Gly]SEQ. ID 24
的制备

Mol Wt: 837.4

AAA: Tyr 0.97(1); Leu 0.98(1); Arg 1.00(1); Gly 1.06(1).

FAB-MS: 838.4

实施例 20

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (p - Cl - Phe) - Gly]SEQ. ID 25 的
制备

Mol Wt: 857.4

AAA: Tyr 0.97(1); Leu 0.98(1); Arg 1.00(1); Gly 1.05(1).

FAB-MS: 857.3

实施例 21

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Flq) - Gly](I)SEQ. ID 29 的制备

Mol Wt: 896.5

AAA: Tyr 0.96(1); Leu 0.99(1); Gly 1.06(1).

FAB-MS: 897.5

实施例 22

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Flq) - Gly](II)SEQ. ID 30 的制备

Mol Wt: 896.5

AAA: Tyr 0.94(1); Leu 1.01(1); Gly 1.06(1).

FAB-MS: 897.5

实施例 23

环[Tyr - trp - Leu - Arg - (Dpa) - Gly](I)SEQ. ID 31 的制
备

Mol Wt: 898.5

AAA: Tyr 0.97(1); Leu 1.04(1); Gly 1.00(1).

FAB – MS: 899.5

实施例 24

环[Tyr – trp – Leu – Arg – (Dpa) – Gly](II)SEQ. ID 32 的制备

Mol Wt: 898.5

AAA: Tyr 1.00(1); Leu 1.04(1); Gly 0.97(1).

FAB – MS: 899.4

实施例 25

环[Tyr – trp – Leu – Arg – (Me – Tyr) – Gly]SEQ. ID 33 的制备

Mol Wt: 852.4

AAA: Leu 0.97(1); Arg 0.99(1); Gly 1.04(1).

FAB – MS: 853.4

实施例 26

环[Tyr – trp – Leu – Arg – (Tiq) – Gly]SEQ. ID 34 的制备

Mol Wt: 834.4

AAA: Tyr 0.96(1); Leu 0.98(1); Arg 1.00(1); Gly 1.06(1).

FAB – MS: 835.5

实施例 27

环[Tyr – trp – Leu – Arg – (tiq) – Gly]SEQ. ID 35 的制备

Mol Wt: 834.4

AAA: Tyr 0.91(1); Leu 0.96(1); Arg 1.03(1); Gly 1.10(1).

FAB – MS: 835.5

实施例 28

环[Tyr – trp – Leu – Arg – (Tiq – OH)Gly]SEQ. ID 36 的制备

Mol Wt: 850.4

AAA: Tyr 0.85(1); Leu 0.97(1); Arg 1.00(1); Gly 1.18(1).

FAB – MS: 851.4

实施例 29

环[Tyr – trp – Leu – Arg – Trp – Pro]SEQ. ID 26 的制备

Mol Wt: 901.5

AAA: Tyr 0.94(1); Leu 0.94(1); Arg 1.07(1); Pro 1.04(1).

FAB-MS: 902.5

在其他实施方案中,本发明提供治疗患有呼吸道疾病之病人的方法,包括给其投用治疗上有效量的式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物。术语“呼吸道疾病”是指以支气管收缩和粘膜过度分泌为特征的疾病或状态。特别适于用式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物治疗的呼吸道疾病包括:哮喘、支气管炎、鼻炎、咳嗽、咯痰。治疗呼吸道疾病的特别优选的式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物包括:

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 6

环[Trp-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 7

环[tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 8

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Gly] SEQ. ID 9

环[Tyr-Trp-Leu-Arg-Trp-Ala] SEQ. ID 10

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-ala] SEQ. ID 11

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 12

环[Tyr-trp-Ala-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 13

环[Tyr-trp-Leu-Arg-trp-Gly] SEQ. ID 14

环[tyr-Gln-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 15

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Ala] SEQ. ID 16

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Gly-Trp] SEQ. ID 17

环[Tyr-trp-Pro-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 18

环[Phe-phe-Pro-Arg-Phe-Gly] SEQ. ID 19

环[Leu-Arg-Trp-Gly-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 20

环[Tyr-Trp-Tyr-glu-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 21

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Nal-Gly] SEQ. ID 22

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-NO₂-Phe)-Gly] SEQ. ID 23

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-NH₂-Phe)-Gly] SEQ. ID 24

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-Cl-Phe)-Gly] SEQ. ID 25

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Pro] SEQ. ID 26

术语“治疗上有效量”是指在单一或多剂投予病人后,在缓解其与呼吸道疾病有关之症状上有效的量。文中所说的“缓解(呼吸道疾病)症状”是指与没有治疗和给药时相比降低了疾病的严重程度,而不一定使疾病完全消除或治愈。在确定治疗有效量或剂量时,临床诊断医师要考虑许多因素,其中包括但不只限于哺乳动物的种系、其体重、年龄、一般健康状况;所涉及的特定疾病;疾病的复杂或严重程度;个别病人的反应;投用的特定化合物;给药方式;所使用之制剂的生物可利用性特征;选择的剂量;合并使用的治疗;及其他相关情况。

推测式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)之化合物的治疗有效量可为大约0.1mg-100mg/kg 体重/天。优选剂量可为大约0.5-10mg/kg 体重/天。

此外,本发明提供了在有所需要的病人体内造成镇痛效果的方法,其包括给其投用治疗有效量的式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物。当病人患有急或慢性疼痛时需要镇痛处理。认定那些病人需要作镇痛处理是本领域技术人员能够作到的。为提供镇痛效果所需的特别优选的式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物包括:

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 6

环[Trp-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 7

环[tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 8

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Gly] SEQ. ID 9

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Ala] SEQ. ID 10

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-ala] SEQ. ID 11

环[Tyr-Trp-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 12

环[Tyr-trp-Ala-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 13

环[Tyr-trp-Leu-Arg-trp-Gly] SEQ. ID 14

• 环[tyr-Gln--Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 15

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Ala] SEQ. ID 16

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Gly-Trp] SEQ. ID 17

环[Tyr-trp-Pro-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 18

环[Phe-phe-Pro-Arg-Phe-Gly] SEQ. ID 19

环[Leu-Arg-Trp-Gly-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 20

环[Tyr-Trp-Tyr-glu-Leu-Arg-Trp-Gly] SEQ. ID 21

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Nal-Gly] SEQ. ID 22

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-NO₂-Phe)-Gly] SEQ. ID 23

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-NH₂-Phe)-Gly] SEQ. ID 24

环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-Cl-Phe)Gly] SEQ. ID 25

环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Pro] SEQ. ID 26

术语“治疗上有有效的镇痛量”是指在给病人进行单剂或多剂用药后，有效地提供止痛效量所需的量。本文所说的“镇痛效果”是指与没有治疗和给药相比降低了疼痛的严重程度但不一定完全消除或缓解疼痛。成功地治疗也理解为包括例如在不久的将来病人将遭受急性或慢性疼痛的手术前过程中预防病人的疼痛。临床诊断医师在确定治疗上有效镇痛量或剂量时，要考虑许多因素，其中包括但不只限于哺乳动物的品种、其体重、年龄和一般健康状况；所涉及的特殊疾病；疾病的复杂或严重程度；投用的特定化合物；给药方式；所使用之制剂的生物可利用性特征；所选择的用药程序；一并使用的治疗方法；以及其他相关情况。

预计式(1)、(2)、(3)、(4)和(5)化合物的治疗上有有效镇痛量大约0.1mg-100mg/kg 体重/天。优选的量可约为0.5-10mg/kg 体重/天。

此外，本发明的化合物以其药理学活性，例如可用作速激肽拮抗剂，特别是神经激肽 A 拮抗剂。本发明的一个目的是提供新的和有用的神经激肽 A 拮抗剂。由于本发明的化合物是速激肽拮抗剂，所以可用于治疗与炎症相关的疾病，这些疾病包括哮喘、变态反应、支气管炎、鼻炎、Crohn 氏病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、偏头痛、膀胱炎和超敏感性反应。速激肽拮抗剂也适用于治疗咳嗽、疼痛、外周神经病、疱疹后神经痛、不良免疫反应、呕吐、由于血管舒张引起的血流紊乱、眼痛如结膜炎，及皮肤病如接触性皮炎、特异性皮炎、荨麻疹等。还可以用速激肽拮抗剂治疗焦虑、抑郁、神经病、精神分裂症及痴呆等各种中枢神经系统疾病。

本发明的化合物是神经激肽 A 的强有力的拮抗剂,并且与 NK_1 受体相比较表现出对 NK_2 受体的作用选择性。据信本发明的化合物通过拮抗 NK_2 受体发挥其抑制作用,并因而释解神经激肽介导的疾病,包括但不只限于急性和慢性疼痛,以及哮喘和其他炎性肺病。但应明确的是,本发明并不受用于解释其最终应用效果所提出之特定理论或机制的限制。

在治疗患有上述疾病病人中,可按使化合物以有效量被生物利用的任何剂型和给药方式包括口服、气雾吸入和胃肠道外途经投用式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物。例如,可经口服、气雾化、皮下、肌肉内、静脉内、皮内、鼻内、直肠内、局部等给药途经投用式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物。一般优选口服或气雾给药方式。制备配制品的本领域技术人员可以根据所选化合物的特定性质、被治疗的疾病状态、疾病的阶段及其他相关情况很容易地选择适当的剂型和给药方式(参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (1980))。

本发明的化合物可以单独或与医药上可接受的载体或赋形剂联合给药,其比例和性质取决于所选化合物的溶解度及化学性质、选用的给药途经、以及标准药学实践。虽然本发明的化合物本身是有效的,但为了提高其稳定性、便于结晶及增加溶解度,可以以其医药上可接受的盐,例如酸加成盐的形式配制并使用之。

在另一个实施方案中,本发明提供了含有与一种或多种惰性载体混合之或结合之式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)之化合物的组合物。这些组合物例如可用作检测标准品,用作大批量装运的方便形式,或用作药物组合物。式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)化合物的可检测量是用本领域技术人员已知和了解的标准检测方法及技术容易检测的量。(1)、(2)、(3)、(4)或(5)化合物的可检测量一般可占组合物重量的约 0.001% 至 75%。惰性载体可以是不降解式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)之化合物或与之发生共价反应的任何材料。适当的惰性载体的例子是水;含水缓冲液如一般用于高效液相层析(HPLC)分析的缓冲液;有机溶剂如乙腈、乙酸乙酯、己烷等;以及医药上可接受的载体或赋

形剂。

更具体地说,本发明提供了含有与一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂混合或结合之治疗有效量式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)化合物的药物组合物。

按本领域技术人员已知的方法制备该药物组合物。载体或赋形剂是可用作活性成分之载体或介质的固体、半固体或液体材料。适用的载体或赋形剂是本领域已知的。药物组合物可以以片剂、胶囊、栓剂、溶液、悬浮液等剂型,经口服、胃肠道外或局部给药途径给病人投用。

本发明的化合物例如可与惰性稀释剂或可食载体一起口服给药。可将其包装在明胶胶囊内或压成片剂。为了口服治疗给药,可将化合物与赋形剂掺合并以片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、水剂、口嚼胶姆等的剂型使用。这些制剂应含有至少4%的作为活性成分的本发明化合物,但这一比例可根据剂量有所变化,常规一般可占单位剂量(重量)的4%至大约70%。存在于组合物中之化合物的量是将被获得的适当剂量。将本发明的优选组合物和制剂制成含有5.0-300mg本发明化合物的口服剂量单位。

片剂、丸剂、胶囊、锭剂等还可含有一种或多种下列辅助剂:粘结剂如微晶纤维素、黄蓍树胶或明胶;赋形剂如淀粉或乳糖;分散剂如藻酸、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotex;助流剂如胶体二氧化硅;及甜味剂如蔗糖或可以加入的糖精,或香味剂如薄荷、水杨酸甲酯或柑桔味剂。当剂量单位形式是胶囊时,除上述类型的材料外,其可含有聚乙二醇或脂脑油等液体载体。其他剂量单位形式可以含有用于修饰剂量单位之物理形式的其他各种材料,例如包衣剂。因此,可用糖、紫胶或其他肠包衣剂包被片剂或丸剂。糖浆剂除含有本化合物外,还可含有作为甜味剂的蔗糖及某些防腐剂、染料和着色剂及香味剂。用于制备这些组合物的材料应是药剂纯的并且以其所用量应是无毒的。

为了胃肠道外治疗给药,可将本发明的化合物掺入溶液或悬液中。这些制剂应含有至少0.1%的本发明化合物,但可在0.1至大

约 50% (重量) 间有所变化。这些组合物中本发明化合物的量应是将获得的适当剂量。本发明的优选组合物和制剂应制成含有 5.0 至 100mg 本发明化合物的胃肠道外给药剂量单位。

也可以气雾剂形式使用本发明的式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)化合物。术语气雾剂是指从胶体性质的系统到由加压包装组成之系统的各种系统。可通过液化或压缩气体或借助散布活性成分的适当原系统进行释放。为了释放活性成分,可以在单相、双相或三相系统中释放式(1)化合物的气雾剂。气雾剂的释放包括必要的容器、活化器、阀、辅助容器等。本领域技术人员能够确定优选的气雾剂。

本发明式(1)、(2)、(3)、(4)或(5)的化合物也可以局部给药,这种情况下所用的载体可包括溶液、软膏或凝胶基质。这些基质例如可包括下列一种或多种物质:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油,稀释剂如水和乙醇,以及乳化剂和稳定剂。局部配方可含有浓度约为 0.1 至 10% (W/V) 的式(1)化合物或其药用盐。

溶液或悬浮液也可包含一种或多种下列辅助剂:无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成的溶剂;抗菌剂如苜醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧剂如抗坏血酸或亚硫酸钠;络合剂如乙二胺四乙酸;缓冲液如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及调节离子强度的试剂如氯化钠或右旋糖。可将胃肠道外给药的制剂装在用玻璃或塑料制成的安瓶、一次性注射器或多剂量小瓶内。

本文使用的术语“病人”是指受特定炎症性疾病状况影响的温血动物如哺乳动物。豚鼠、狗、猪、大鼠、小鼠、马、牛、羊和人等动物均包括在该术语意义的范围内。

实施例 29:假定的拮抗剂对碘化的速激肽与 NK_1 和 NK_2 受体结合的拮抗作用

用粗制组织膜进行受体结合试验。用豚鼠肺估测推定的速激肽拮抗剂的 $NK-1$ 受体结合亲和力 (Keystone Biologicals, Cleveland, OH, 保存于 -80°C 备用)。用表述人空肠 $NK-2$ 受体的小鼠 3T3 成纤维细胞即 HSKR-1 细胞估测对 $NK-2$ 受体的亲和力。在 15 倍体积含有 120mM NaCl 和 5mM KCl 的 50mM Tris-HCl 缓冲液

(pH7.4, 4℃)中用 Polytron 制备组织 或细胞匀浆,并于 4℃ 以 48,000xg 离心 12 分钟。将沉淀物重新悬浮在 15 倍体积含有 10mM EDTA 和 300mM KCl 的 50mM Tris-HCl 缓冲液中,然后在水上放置 30 分钟。按上述条件离心悬浮液并经在 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.4, 4℃)中重新悬浮和离心将沉淀物洗两次。将最后的沉淀物以 20mg/ml 的浓度重新悬浮在保温缓冲液中,然后在室温下至少放置 15 分钟备用。以一式两份向 0.1nM 下列放射配体中加入 250 μ l 膜制备(最终蛋白浓度;肺 = 286 μ g/管, HSKR-1 细胞 = 100 μ g/管)以开始受体结合: NK-1 受体试验为 ¹²⁵I-Bolton-Hunter lys-3 标记的物质 p(New England Nuclear, 比活性 2000Ci/mmol); NK-2 受体试验为 ¹²⁵I 标记的组氨酸-1-神经激肽 A (Ameersham, 比活性 2000Ci/mmol), 加在终体积为 500 μ l 的含 500mM Tris-HCl(pH 7.4, 室温)、0.1% 牛血清白蛋白、2mM Mn-Cl₂、40 μ g/ml 杆菌肽、4 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽和胰凝乳蛋白酶抑制剂、1 μ M thiorphan 和各种剂量的速激肽拮抗剂的缓冲液中。于室温下保温 90 分钟(NK-1 受体试验)或 2 小时(NK-2 受体试验);加入 50mM Tris-Hcl 缓冲液(pH7.4, 4℃)终止结合并在真空下通过用 0.1% 聚乙烯亚胺(NK-受体试验)或 0.5% 牛血清白蛋白(NK-2 受体试验)预浸渍的 GF/B 滤膜过滤。非特异性结合限定为在 1 μ M 物质 p(NK-1 受体试验)或神经激肽 A(NK-2 受体试验)(Peptides International, Inc., Lounisville, KY)存在下的结合。从总结合中减去非特异结合,算出特异性组合,结果特异性结合相当于 70-90% 总结合。分析所得数据并使用累接曲线配合程序(iterative curve fitting program)(Graph PAD Inplot, San Diego, CA)以非线性回归法得到 IC₅₀ 值。用 Lowry 方法测定蛋白质浓度。

表 2 中给出了化合物的速激肽受体结合亲和性。其中包括环 [Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 6 在内的几种化合物表现有对 NK-2 受体的亲和性和选择性。

表 2: NK-1 和 NK-2 受体结合亲和性

肽序列	IC50 (nM)	
	NK-1	NK-2
环[Tyr-Trp-Leu-Arg-Trp-Gly]	10,000	305 ± 31
环[Tyr-trp-Ala-Arg-Trp-Gly]		56.7 ± 5.45
环[tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]	>10,000	4.97 ± 0.42
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Gly]	>10,000	18.9 ± 1.58
环[tyr-Gln-Leu-Arg-Trp-Gly]		407 ± 52
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-ala]		7.99 ± 1.02
环[Tyr-trp-Leu-Arg-trp-Gly]	>10,000	193 ± 11.5
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Ala]		9.90 ± 0.90
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Pro]	5167 ± 507	30 ± 2.52
环[Leu-Arg-Trp-Gly-Leu-Arg-Trp-Gly]		768 ± 75
环[Trp-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]	>4833 ± 297	4.7 ± 0.15
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Tyr-Ala]		206 ± 15
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Gly-Trp]		360 ± 21
环[Tyr-Trp-Tyr-gln-Leu-Arg-Trp-Gly]	>10,000	27.0 ± 0.82
环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]	6187 ± 277	6.79 ± 0.69
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-NH ₂ -Phe)-Gly]	>10,000	20.2 ± 2.03
环[Tyr-trp-Pro-Arg-Trp-Gly]	>10,000	5.13 ± 0.36
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-NO ₂ -Phe)-Gly]	>10,000	11.7 ± 0.44
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(p-Cl-Phe)-Gly]	~10,000	13.3 ± 1.31
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(Flg)-Gly](II)	2766 ± 16.5	993 ± 36.5
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(Dpa)-Gly](II)	4691 ± 11	878 ± 162
环[Phe-phe-Pro-Arg-Phe-Gly]	9314 ± 2074	674 ± 57
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(Flg)-Gly](1)	3642 ± 425	123 ± 1.86
环[Tyr-trp-Leu-Arg-(Dpa)-Gly](1)	12,077 ± 2044	2903 ± 371

数据是 2-72 次实验的平均值 ± S.E.M。

实施例 30: 对 NK-2 受体介导的磷脂酰肌醇更新的拮抗作用。

试验前 2-3 天, 将培养的 SKLKB82 井 3 (转染到小鼠成纤维细胞系中的牛胃 NK-2 受体) 细胞以 125,000 细胞/孔的量接种到 29 乳平板上。试验前 20-24 小时细胞内加入 0.5ml 的 0.2 μ M 肌[2-³H(N)]肌醇 (American Radiolabeled Chemicals Inc., 比活性 20Ci/mmol)。将培养的细胞保持 37℃, 5% CO₂ 环境下。试验当天, 吸出培养基并在含有 40mg/ml 杆菌肽、各 4mg/ml 亮抑蛋白酶肽和胰凝乳蛋白酶抑制剂、0.1% 牛血清白蛋白和 1 μ M thiorphan 及 10mM

Licl 的 D-MEM/F- 培养基中培养细胞。15 分钟后,以 0.1ml 体积向细胞中加入环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 6(浓度范围为 0.3nM-10 μ M)。15 分钟后以不同浓度(0.1nM-10 μ M, 体积为 0.1ml)加入 NKA 或保温缓冲液(作为对照)并以 1ml 的终体积保温 60 分钟。吸出培养基并向所有小孔内加入 0.1ml 甲醇以终止反应。向孔内加入两等份 0.5ml 甲醇以将细胞收获到氯仿抗性管内。向含有甲醇/细胞悬液的各管内加入氯仿(1ml)再加入 0.5ml ddH₂O。然后将试管涡旋 15 秒钟并以 1,700xg 离心 10 分钟。取 0.9ml 等份的水相并放在含有 2ml ddH₂O 的氯仿抗性试管中。旋转样品并加样于 1ml 50% Bio-Rad AG 1-X8(甲酸盐形式, 100-200 目)交换柱(Bio-Rad Laboratories, Hercules, (A)上。然后依次用 1) 10ml ddH₂O, 2) 5ml 5mM 四硼酸二钠/60mM 甲酸钠, 和 3) 2ml 1M 甲酸铵/0.1M 甲酸洗柱。收集第三洗脱物并在 9ml 闪烁液中计数。取 50 μ l 等份的有机(底部)相,在闪烁瓶中干燥并在 7ml 闪烁液中计数。

就每份样品计算液相等份的 DPM(总磷酸肌醇酯)对 50 μ l 有机相等份中的 DPM(所掺入的总 [³H]-肌醇)的比例。数据均作为激动剂诱导的在基线水平以上的 [³H]-肌醇磷酸酯积聚的百分数表示。拮抗剂活性是根据在环[Tyr-Trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 6 存在下对速激肽的剂量反应曲线的右移而显现的。使用三种或多种拮抗剂浓度进行 Schild 回归分析,以得出 PA₂ 和斜率值。

构成剂量反应曲线,并使用 Bristow et al., Br. J. Pharmacol., 90:211-21(1987)的方法,借助计算机程序(GrophPad Inplot)确定试验化合物抑制速激肽诱导的磷脂酰肌醇(PI)更新的能力。图 1 举例说明环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 6 在 SKLKB82 #3 细胞中产生对 NKA 诱导之 PI 更新的剂量相关拮抗作用的能力。数据表示为在基线水平上的总磷酸肌醇积聚的百分刺激率,并归一化为由 NKA 产生的最大反应。这些数据证明,环[Tyr-trp-Leu-Arg-Trp-Gly]SEQ. ID 6 没有激动剂活性(如根据其既使以

高化合物剂量也不能刺激 PI 重新 的表明的), 并且拮抗 NKA 对 SKLKB82 #3 细胞上 NK-2 受体的作用 ($pA_z = 8.45$ (95% 置信限 = 8.22 至 8.69) 并且斜率 = -0.85 (95% 置信限 = -0.94 至 -0.75))。

实施例 31: 拮抗 NKA 和辣椒碱在清醒豚鼠中诱导的呼吸效应

使用雄性 Duncan Hartley 豚鼠 (250 – 350g) 进行体内实验。使用由 4 个小型有机玻璃盒组成的改良的全身体积描记装置 (其中各有机玻璃盒均通过 Validyne DP 45 – 16 分压转换器接有其自身的参比盒) 同时监测 4 只动物的清醒呼吸曲线的改变。4 个盒上均装有一个空气供应管 (也用于气雾释放) 和一个空气排出管。供应和排出管道有同样的长度, 窄的腔径, 由共同的供应室伸出并通入共同的排出室。使用该系统以确证空气供应和大气压的波动保持同相, 并由分压转换器从净信号排除之。通过 Data Translation DT 2821 A 使模拟压力信号数字化为 D 板。以 100 个样品/秒/动物的速率收集数据。使用下列参数分析压力改变的每个周期: 在最小和最大压力间确定的上升和下降斜率、超过下降斜率的上升比例, 及初始低谷压力和峰值循环压力间改变的大小。使用这些数值 (并观察动物) 用运转 System V UNIX 操作系统 PCAT 286 将压力循环特征化为正常呼吸、用力排气 (明显的腹部隆起)、显著的呼吸过程 (SRES; 通常是咳嗽、不太常见的喷嚏或以暂时的, 可区别于噪音的极大压力增加为特征的喘息) 和运动/噪音比例。

呼吸困难定义为显著的, 持续的体积描记压力增加, 而这一压力增加是与可观察的向动物费力呼吸移动相关联的。

在典型的检测对各种支气管收缩剂的呼吸道反应的实验过程中, 使用 Devilbiss Ultraned 99 超声波喷雾器释放气雾 19 分钟 (0.33ml/分钟) 并在此期间监测动物。在喷雾之前, 收集静息呼吸 1 分钟数据以确定基线压力。在初步实验中, 估测各种浓度的支气管收缩剂, 并选定一个有最大数目的动物表现呼吸困难但反反应的严重程度又最小的浓度。因此, 以 0.05% 的终浓度释放神经激肽 A, 并以 0.001% 的终浓度释放辣椒碱。所有支气管收缩剂的喷雾载体均

为不引发呼吸效应的磷酸盐缓冲盐水(PH7.4)。在接触气雾剂之前 20 分钟投用环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6。

表 3 显示环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6 对 NKA 或辣椒碱气雾剂诱导之各种呼吸效应的影响。以 5mg/kg 的剂量(i. v.), 化合物完全抑制了清醒豚鼠的由 NKA 气雾剂诱导的呼吸效应。低剂量(0.5 - 2.5mg/kg, i, v.)环肽延迟了由速激肽产生之呼吸困难和 SRE 的发作。这些数据提示, 环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6 在豚鼠体内是其呼吸道中的 NK - 2 受体抑制剂。

环肽即环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6 还抑制在因辣椒碱气雾剂释放而产生之内源性速激肽的反应中所引起的呼吸效应(表 3)。虽然环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6 只使辣椒碱诱导之呼吸困难的发生率降低了 20%, 但呼吸困难的发作几乎延迟两倍; 在对辣椒碱反应中产生的 SRE 的数目也减少了并且增加了其发作, 此提示化合物的镇咳性质。

表 3: 环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]对 NKA 或辣椒碱在清醒豚鼠体内诱导之呼吸效应的影响

A. NKA 气雾剂

预处理	呼吸困难 发生率	呼吸困难 发作(秒)	SRE 数目	发作 (秒)
对照	100 %	403 ± 37	8.17 ± 1.92	435 ± 28
肽				
5mg/kg, iv	0% *	—	0*	
2.5mg/kg, iv	100 %	725 ± 80 *	8.00 ± 0.82	791 ± 70 *
1mg/kg, iv	100 %	729 ± 66 *	6.33 ± 0.88	816 ± 65 *
0.5mg/kg, iv	100 %	521 ± 29	7.75 ± 2.21	602.5 ± 32

数据是每项实验得自 4 - 18 只动物的平均值 ± S. E. M。SRE = 显著的呼吸过程, 通常是咳嗽和较少发生的喘息。箭头表示与对照组有显著差异($p < 0.05$)。肽 = 环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]。

B. 辣椒碱气雾剂

预处理	呼吸困难 发生率	呼吸困难 发作(秒)	SRE 数目	发作 (秒)
对照	100 %	204 ± 37	14.9 ± 2.88	288 ± 39
肽				
5mg/kg, iv	80 %	470 ± 78*	8.11 ± 1.22*	352 ± 92

数据是每项实验 10 只动物的平均值 ± S.E.M。SRE = 显著的呼吸过程,通常是咳嗽和较少发生的喘息。箭头表示与对照组有显著差异($p < 0.05$)。肽 = 环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]。

实施例 32:对乙酸诱发之小鼠痛苦表现的抑制作用

使用改动的 Whittle 的方法(Br.J. Pharmacol. 22:2246, 1964)检测本发明化合物的心痛作用。每组 5 - 10 只雄性小鼠的各组动物接受环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6 的鞘内注射(0.013 - 4 μ g)或乙醇/盐水载体注射(体积为 5 μ l)。5 分钟后,小鼠接受 0.4ml 乙酸(0.25%, V/V)腹腔内注射。5 分钟后,观察小鼠的扭动表现(腹部蠕动)并计数 15 分钟内每只小鼠的扭动次数。为了计算 ED₅₀(在 50%小鼠中产生心痛作用的剂量),试验四个或多个不同的化合物剂量并借助适当的计算机程序对结果进行可数性分析。

环肽,环[Tyr - trp - Leu - Arg - Trp - Gly]SEQ. ID 6 抑制了乙酸诱发的小鼠因痛苦而表现身体扭动,其 ED₅₀值为 0.18 μ g(95%置信限 = 0.03 - 0.58)。

序列表

(1)一般信息:略

(2)SEQ. ID NO:1 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 1:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

(2) SEQ. ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 2

(D) 其他信息: /注 = “定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸”

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 2:

Xaa Xaa Leu Arg Trp Xaa

1 5

(2) SEQ. ID NO: 3 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 3:

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Arg Trp Gly

1 5

(2) SEQ. ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的Xaa是呈D构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:4:

Xaa Xaa Leu Arg Xaa Xaa

1 5

(2)SEQ. ID NO:5的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:5:

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa

1 5

(2)SEQ. ID NO:6的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的Xaa是呈D构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:6:

Tyr Xaa Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:7 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:7:

Trp Xaa Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:8 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:8:

Xaa Xaa Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:9 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的 Xaa 是呈D构型的色氨酸”

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 9:

Tyr Xaa Leu Arg Tyr Gly

1 5

(2)SEQ.ID NO:10 的信息:

(i) 序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的 Xaa 是呈D构型的色氨酸”

(xi) 序列描述: SEQ.ID NO: 10:

Tyr Xaa Leu Arg Trp Ala

1 5

(2)SEQ.ID NO:11 的信息:

(i) 序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注:="定位 6 处的 Xaa 是呈 D 构型的丙氨酸"

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:11:

Tyr Xaa Leu Arg Trp Xaa

1 5

(2)SEQ. ID NO:12 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:12:

Tyr Trp Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:13 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注="定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸"

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:13:

Tyr Xaa Ala Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:14 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注="定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸"

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:14:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:15 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:1

(D)其他信息:/注="定位 1 的 Xaa 是呈 D 构型的酪氨酸"

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:15:

Xaa Gln Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:16 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ.ID NO:16:

Tyr Xaa Pro Arg Tyr Ala

1 5

(2)SEQ.ID NO:17 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ.ID NO:17:

Tyr Xaa Leu Arg Gly Trp

1 5

(2)SEQ.ID NO:18 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位 2 的 Xaa 是呈 D 构型的色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ.ID NO:18:

Tyr Xaa Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ.ID NO:19 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位 2 处的 Xaa 是呈 D 构型的苯丙氨酸”

(xi)序列描述:SEQ.ID NO:19:

Phe Xaa Pro Arg Phe Gly

1 5

(2)SEQ.ID NO:20 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:8 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(xi)序列描述:SEQ.ID NO:20:

Leu Arg Trp Gly Leu Arg Trp Gly

1 5

(2)SEQ.ID NO:21 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:8 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:4

(D)其他信息:/注=“定位4处的 Xaa 是呈D构型的谷氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:21:

Tyr Trp Tyr Xaa Leu Arg Trp Gly

1

5

(2)SEQ. ID NO:22 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的 Xaa 是呈D构型的色氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注=“定位5处的 Xaa 是萘基丙氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:22:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1

5

(2)SEQ. ID NO:23 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2处的 Xaa 是萘基丙氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注=“定位5处的 Xaa 是对硝基苯丙氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:23:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:24 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的 Xaa 是萘基丙氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注=“定位5处的 Xaa 是对 NH₂-苯丙氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:24:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:25 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位 2 的 Xaa 是 D-构型色氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注=“定位 5 处的 Xaa 是对氯苯基丙氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:25:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1 5

(2)SEQ. ID NO:26 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位 2 的 XaaD—构型色氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:26:

Tyr Xaa Leu Arg Trp Pro

1 5

(2)SEQ. ID NO:27 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:27:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

(2)SEQ. ID NO:28 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:28:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

(2)SEQ. ID NO:29 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa 是 D—构型色氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注 = “定位 5 处的 Xaa 是苄基甘氨酸”

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 29:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1 5

(2) SEQ. ID NO: 30 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 2

(D) 其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa D—构型的色氨酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 5

(D) 其他信息:/注 = “定位 5 处的 Xaa 是苄基甘氨酸”

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 30:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1 5

(2) SEQ. ID NO: 31 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 2

(D) 其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa D—构型的色氨酸”

(ii) 分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的 Xaa 是 D 构型色氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注=“定位5处的 Xaa 是甲基酪氨酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:33:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1

5

(2)SEQ. ID NO:34 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:6 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:环状

(ii)分子类型:肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:2

(D)其他信息:/注=“定位2的 Xaa 是 D 构型色氨酸”

(ix)特征:

(A)名称/关键词:修饰的位点

(B)定位:5

(D)其他信息:/注=“定位5处的 Xaa 是 1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸”

(xi)序列描述:SEQ. ID NO:34:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1

5

(2)SEQ. ID NO:35 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 2

(D) 其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa 是 D 构型色氨酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 5

(D) 其他信息:/注 = “定位 5 处的 xaa 是呈 D 构型的 1, 2, 3, 4 - 四氢异喹啉 - 3 - 羧酸”

(xi) 序列描述: SEQ. ID NO: 35:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1

5

(2) SEQ. ID NO: 36 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 2

(D) 其他信息:/注 = “定位 2 的 Xaa 是 D 构型色氨酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰的位点

(B) 定位: 5

(D)其他信息:/注=“定位 5 处的 Xaa 是 1,2,3,4-四氢异喹啉-7-羟基-3-羧酸”

(xi)序列描述:SEQ.ID NO:36:

Tyr Xaa Leu Arg Xaa Gly

1

5

说明书附图

