

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 5/12
C07K 7/64
/(C07K105 : 00)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95105200.4

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 11 日 [11] 授权公告号 CN 1161374C

[22] 申请日 1995.4.28 [21] 申请号 95105200.4 [30] 优先权 [32] 1994. 4.30 [33] DE [31] P4415310.4 [71] 专利权人 默克专利股份有限公司 地址 联邦德国达姆施塔特 [72] 发明人 A·琼兹希克 G·霍尔泽曼 S·古德曼 H·凯斯勒 R·豪布纳 J·沃玛司 审查员 沈志红	[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 3 页 说明书 22 页	

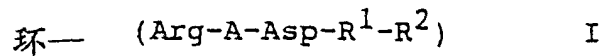
[54] 发明名称 环肽

[57] 摘要

本发明涉及式 I 的新的环肽及其盐：cyclo -
(Arg - A - Asp - R¹ - R²) I 这些化合物作为整合蛋白抑制剂，尤其可用于循环、骨骼等疾病的预防和治疗以及肿瘤的治疗，并且可用作抗微生物和抗病毒活性物质。

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

1. 式 I 的环肽或其可作药用的盐:



其中,

A 为 Gly 或 Ala,

R^1 为 2-羧基-8-氨基-4-硫代毒芹侧碱-9-酮(Btd)、O-氨基甲基-O'-羧基联苯(Biph)、2-氨基甲基-5-羧基甲基-噻吩(Act)、6-氨基己酸残基(Aha) 2-(1,7-二氮杂螺[4.4]壬-7-基)-4-甲基戊酸((S,S)螺-Pro-Leu) 2-(3-氨基-1-吡咯烷-2-酮基)-4-甲基戊酸残基((S) Gly [ANC-2]-Leu 或 (R) Gly [ANC-2]-Leu), 在每一种情况下残基通过肽键键合,

R^2 不存在或者为 Val。

2. 权利要求 1 中的环肽或其可作药用的盐, 其选自

- (a) 环—(Arg-Gly-Asp-(S)Gly[ANC-2]-Leu);
- (b) 环—(Arg-Gly-Asp-(R)Gly[ANC-2]-Leu);
- (c) 环—(Arg-Gly-Asp-(S,S)spiro-Pro-Leu);
- (d) 环—(Arg-Gly-Asp-Act);
- (e) 环—(Arg-Gly-Asp-Btd);
- (f) 环—(Arg-Gly-Asp-Aha);
- (g) 环—(Arg-Gly-Asp-Btd-Val);
- (h) 环—(Arg-DAla-Asp-Btd-Val).

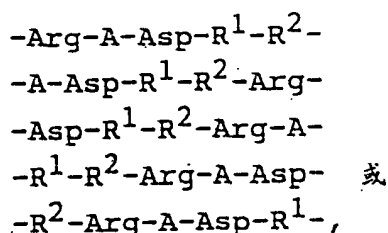
3. 权利要求1所述的式I环肽或其可作药用的盐。

4. 权利要求1所述的式I环肽或其可作药用的盐的制备方法，其特征在于它是通过用溶剂解或氢解试剂处理从其一种功能性衍生物中释放出来，

或在于用环化剂处理式II的肽或其反应性衍生物，



其中Z为



和/或在于通过用酸或碱处理使式I碱性或酸性化合物转化为其一种盐。

5. 一种制备药品的方法，其特征在于将权利要求1的式I环肽和/或其可药用的盐与至少一种固体或半固体赋形剂或助剂一起制成合适的剂型。

6. 一种药品，其特征在于它含有至少一种权利要求1的式I环肽和/或其一种可作药用的盐。

7. 权利要求1的式I环肽或其可作药用的盐用于制备预防和治疗血液循环失调、血栓形成、心肌梗塞、冠状动脉血栓形成心脏病、动脉硬化、动脉粥样硬化、炎症、中风、心绞痛、肿瘤、溶骨病、血管形成术后的血管生成和心瓣再狭窄以及在伤口治疗过程中具

有辅助作用的药物的用途。

8. 权利要求 1 的式 I 环肽或其可作药用的盐用于制备抗微生物或抗病毒药物的用途。

9. 权利要求 1 的式 I 环肽或其可作药用的盐在生产用于亲和层析柱的固定化配体中的应用。

10. 权利要求 1 的式 I 环肽或其可作药用的盐在通过亲和层析纯化整合蛋白中的应用。

环肽

技术领域

本发明涉及新的环肽化合物。

背景技术

相似的化合物可从 Pharmazie 40(8), 532-5, (1985) 中知道。

发明内容

本发明涉及式 I 的新的环肽

环 - (Arg-A-Asp-R¹-R²) I

其中

A 为 Gly 或 Ala,

R¹ 为 2—羧基—8—氨基—4—硫代毒芹侧碱—9—酮 (Btd)、O—氨基甲基—O'—羧基联苯 (Biph)、2—氨基甲基—5—羧基甲基—噻吩 (Act)、或 6—氨基己酸残基 (Aha) 或 2—(1, 7—二氮杂螺 [4.4] 壬—7—基)—4—甲基戊酸 ((S, S) 螺—Pro—Leu) 或 2—(3—氨基—1—吡咯烷—2—酮基)—4—甲基戊酸残基 ((S) Gly [ANC—2] —Leu 或 (R) Gly [ANC—2] —Leu), 在每一种情况下残基通过肽键键合,

R² 不存在或者为 Val,

和它们的生理上可接受的盐。

本发明的目的是发现具有有价值的性质的新的化合物，特别是那些能够被用于药剂制备中的化合物，现已发现式1化合物和它们的盐具有非常有用的特性。它们特别适用于整合蛋白抑制剂，在本文中它们特别地抑制了 β_3 —或 β_5 —整合蛋白受体与配体间的相互作用。这些化合物对整合蛋白 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 和 $\alpha_{4,5}\beta_3$ 尤其有效，这种作用可被，例如J. W. Smith等认在J. Biol. Chem. 256, 12267—12271 (1990)中所述的方法证实。除此之外它们还有消炎作用。所有这些作用可用文献中已知的方法来证实。

这些化合物能用作人和兽类药物中药剂的活性物质，尤其适于预防和治疗血液循环失调、血栓形成、心肌梗塞、冠状动脉血栓形成心脏病、动脉硬化、动脉粥样硬化、炎症、中风、心绞痛、肿瘤、溶骨病、特别是骨质疏松、血管形成术后的血管生成和心瓣再狭窄。此外，它们在伤口治疗过程中可以具有辅助作用。

上文和下文中给定的氨基酸残基的缩写表示下列的氨基酸残基：

Act	2—氨基甲基噻吩—5—乙酸
Aha	6—氨基己酸
Ala	丙氨酸
Asn	天冬酰胺
Asp	天冬氨酸
Asp (OR)	天冬氨酸 (β —酯)

Arg	精氨酸
Biph	O—氨基甲基联苯基—O'—羧酸
Btd	8—氨基—4—硫代毒芹侧碱— 9—酮—2—羧酸
Cys	半胱氨酸
Gln	谷氨酰胺
Glu	谷氨酸
Gly	甘氨酸
Gly [ANC—2]—Leu	2—(3—氨基—1—吡咯烷 —2—酮基)—4—甲基戊酸
His	组氨酸
Ile	异亮氨酸
Leu	亮氨酸
Lys	赖氨酸
Met	蛋氨酸
Nle	正亮氨酸
Orn	鸟氨酸
Phe	苯丙氨酸
Pro	脯氨酸
螺—Pro—Leu	2—(1, 7—二氮杂螺[4, 4]—6 氧代壬—7—基)—4—甲基戊酸

Ser	丝氨酸
Thr	苏氨酸
Trp	色氨酸
Tyr	酪氨酸
Val	缬氨酸

此外，下文所用的缩写具有下面的定义：

BOC	叔丁氧基羰基
CBZ	苄氧基羰基
DCCI	二环己基碳化二亚胺
DMF	二甲基甲酰胺
EDCI	N—乙基—N'—(3—二甲基氨基丙基)碳化二 亚胺盐酸盐
Et	乙基
Fmoc	9—芴基甲氧基羰基
HOBt	1—羟基苯并三唑
Me	甲基
Mtr	4—甲氧基—2, 3, 6—三甲基苯基磺酰基
OBu ^t	叔丁氧基
OMe	甲氧基
OE ^t	乙氧基

POA	苯氧基乙酰基
TBTu	2—(1H—苯并三唑—1—基—1, 1, 3, 3 —四甲基四氟硼酸脲
TFA	三氟乙酸

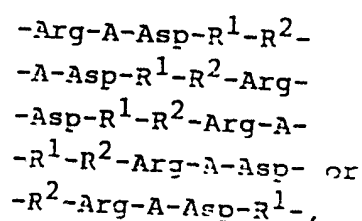
上述氨基酸可能存在有两种或多种对映体形式，则在上文和下文中，例如作为式 I 化合物的组成部分包括所有对映体形式以及它们的混合物（例如 DL 形式）。作为式 I 化合物组成部分的氨基酸可进一步被适当的保护基保护。

本发明进一步涉及式 I 化合物或它的一种盐的制备方法，其特征是用溶剂解或氨解试剂处理使这种化合物从它的一种功能性衍生物中被释放出来

或者用一种环化剂处理式 II 的肽



其中 Z 为

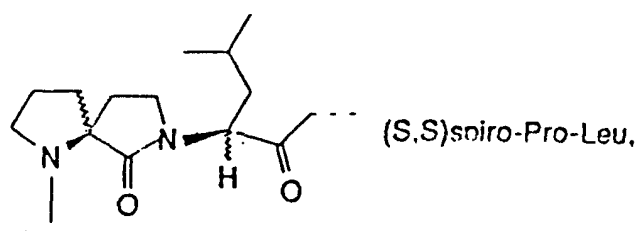


或该肽的反应性衍生物,

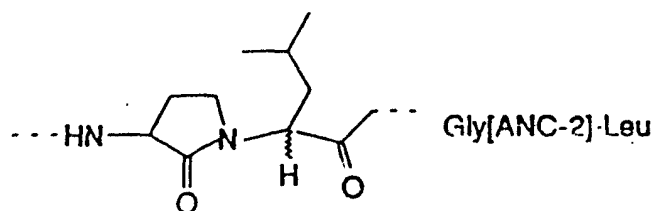
和/或通过用酸或碱处理使式 I 的碱性或酸性化合物转化为其一种盐。

除非特别说明,上、下文中的残基 Λ 、 R^1 、 R^2 和 Z 的含义与式 I 和 II 中的含义相同。

残基 (S, S) 螺—Pro—Leu 为 2—(1, 7—二氮杂螺[4, 4]—6—氧代壬—7—基)—4—甲基戊酸残基, 并具有如下结构:



残基 (S) Gly [ANC—2] —Leu 或 (R) Gly [ANC—2] —Leu 为 3 (S) —或 3 (R) —2—(3—氨基—1—吡咯烷—2—酮基)—4—甲基或酸残基,



Biph 为 O—氨基甲基联苯基—O' —羧酸残基, Biph 1 和 Biph 2

为可能的阿托异构体。

残基 R^1 如同残基 R^2 一样,所有前面给出的定义同样优选。因此本发明同样涉及环五肽和环四肽。

A 优选为 Gly,但也可为 Ala,尤其是 DAla。

式 I 的化合物,以及制备它们的反应物,是另外用已知的方法制备的,如在文献中所述(例如在标准著作如 Houben—Weyl, Methoden der Organischen Chemie [有机化学方法] (Methods of Organic Chemistry), (Georg—Thieme—Verlag. Stuttgart),尤其是在已知的并适用于所提到的反应的条件下进行。也可利用在本文中未详细提到的已知的改进方法。

(R) —和 (S) —式肽组分 Gly [ANC---2] —Leu 可按 R. M. Freidinger 等人在 J. Org. Chem. 47, 104 (1982) 中所述的方法制得。螺—Pro—Leu 成分则可按类似于 P. Ward 等人在 J. Med. Chem. 33, 1848ff (1990) 中所述的方法制得。Btd 的合成则可按 U. Nagai 等人在 Tetrahedron 49, 3577—3592 (1993) 中所述方法进行。

如果需要,起始物料也可就地形成,因此不必从反应混合物中将它们分离出来而是直接进一步反应产生式 I 的化合物。

式 I 化合物能用溶剂解,特别是水解,或用氢解的方法从它们的功能性衍生物释放出式 I 化合物来制备。

用于溶剂解或氢解的优选的起始物料是那些含有(替代一个或多个游离的氨基和/或羟基)被保护的氨基和/或羟基的化合物,优

选地是那些含有, (替代连接于一个氮原子上的一個氮原子), 一个氨基保护基, 例如那些遵从于式 I 但含有, (替代 NH_2 基) 一个 NHR' 基 (其中 R' 是一个氨基保护基, 例如: Fmoc、BOC 或 CBZ 的化合物。

另一些优选的起始物料是那些 (替代羟基中的氮原子) 带有羟基保护基的化合物, 例如那些遵从于式 I 但含有替代羟基苯基的一个 $\text{R}''\text{O}-$ 苯基 (其中 R'' 是羟基保护基) 的化合物。

在起始物料分子中也可能存在着两个或多个相同或不同的被保护的氨基和/或羟基, 如果存在的保护基是彼此不同的, 则在许多情况下它们可以被选择性地除去。

术语“氨基保护基”通常是已知的涉及那些具有保护 (封闭) 一个氨基不参加化学反应的能力, 但是在分子的其它部分所需要的化学反应实施完后能够很容易被除去的基团, 特别是, 这些基团代表性的是未被取代的或已被取代的酰基、芳基、芳烷氧基甲基或芳烷基。由于氨基保护基在所需的反应 (或反应序列) 后被除去, 它们的性质和大小在其它方面并不重要; 但是, 那些具有 1—20, 尤其是 1—8 个碳原子的保护基是优选的。在本发明的方法中术语“酰基”应该被认为是最广泛意义上的, 它包括从脂肪族、芳基脂肪族、芳香族或杂环羧酸或磺酸中衍生来的酰基, 尤其是烷氧基羰基、芳氧基羰基和, 特别是芳烷氧基羰基。这样的酰基的实例是烷酰基如乙酰基、丙酰基和丁酰基; 芳烷酰基如苯乙酰基; 芳酰基如苯甲酰基或

甲苯酰基；芳氧基烷酰基如 POA；烷氧基羰基如甲氧基羰基、乙氧基羰基，2, 2, 2—三氯乙氧基羰基，BOC，和 2—碘代乙氧基羰基；芳烷氧基羰基如 CBZ(苄氧基)，4—甲氧基苄氧基羰基和 Fmoc；和芳基磺酰基如 Mtr。优选的氨基保护基是 BOC 和 Mtr，还有 CBZ, Fmoc, 苄基和乙酰基。

术语“羟基保护基”同样是通常已知的和涉及那些具有保护羟基不参加化学反应能力的基团，但这些基团在分子其它部分的所需的化学反应实施完后很容易除去。这样的基团代表性的是上述未取代的或取代的芳基、芳基烷基或酰基，还有烷基。由于这些基团在所需要的化学反应或反应序列后又被除去，所以羟基保护基的性质和大小并不太重要；1—20，尤其是 1—10 个碳原子的羟基保护基是优选的。羟基保护基的实例包括苄基、对硝基苯甲酰基、对甲苯磺酰基、叔丁基和乙酰基，其中苄基和叔丁基是特别优选的。在天冬氨酸和谷氨酸中的 COOH 基以它们的叔丁酯形式（例如，Asp (OBut)）被保护较好。

被用作起始物料的式 I 化合物的功能性衍生物可以用氨基酸和肽合成的常规的方法来制备，如在上述的权威著作和专利申请中所叙述的方法，例如 Merrifield 的固相方法 (B. F. Gysin 和 R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc, 94, 3102 及下列等 (1972)) 尤其优选的是在流动反应器中按 Fmoc 方案合成，该方法由 A. Jonczyk 和 J. Meienhofer 在 Peptides, Proc. 8th. Am. Pept. Symp. 73 — 77

(1983) (Eds. V. J. Hruby. and D. H. Rich), Pierce Co. Rockford 中进行了叙述。

从式 I 化合物的功能性衍生物中释放出式 I 的化合物的实施取决于所用的保护基的性质,例如用强酸,较有利地用 TFA 或高氯酸,或用其它的强无机酸如盐酸或硫酸,强的有机羧酸,如三氯乙酸,或磺酸如苯—或对—甲苯磺酸。额外存在一种惰性溶剂是可能的但不总是必需的,适当的情性溶剂较好是有机酸,例如羧酸如乙酸,醚如四氢呋喃或二噁烷,酰胺如 DMF,卤代烃如二氯甲烷,和醇如甲醇、乙醇或异丙醇,还有水。上述溶剂的混合物也是适宜的。较好地是过量使用 TFA 而不需要加入其它溶剂,而高氯酸较好地是以乙酸和 70% 高氯酸的比率为 9:1 的混合物的形式来使用。裂解的反应温度较有利地是在大约 0℃ 至大约 50℃,优选 15 至 30℃ (室温)。

例如,基团 BOC、OBut 和 Mtr 可较有利地用 TFA 在二氯甲烷中除去或用 3~5nHCl 在二噁烷中于 15—30℃ 下除去, Fmoc 基团的除去可用大约 5~50% 浓度的二甲胺、二乙胺或哌啶等仲胺在 DMF 中的溶液于 15~30℃ 来进行。

能够被氢解除去的保护基(例如, CBZ 或苄基)能够用,例如,氢在催化剂(例如,贵金属催化剂如钯,较有利地是载于活性炭上)存在下进行处理来除去。在这方面,适当的溶剂是那些上面所给定的,特别是醇如甲醇或乙醇,或酰胺如 DMF。氢解通常是在大约 0~100℃ 的温度下和大约 1~200 巴的压力下,优选在 20~30℃

和 1—10 巴下实施,例如, CBZ 基的氢解较有利地是于 20~30℃ 用 5~10% Pd—C 在甲醇中或用甲酸铵(代替 H₂) 于 Pd—C 上在甲醇/DMF 中完成。

式 I 化合物也可在合成肽的条件下通过环化式 II 化合物获得,该反应优选按常规的肽合成法,如 Houben—Weyl, Volume 15/II, page 1—806 (1974) 中所述的方法进行。

反应优选地是在有脱水剂存在下,例如碳化二亚胺如 DCCl 或 EDCl, 和丙磷酐(比较 Angew. Chem, 92, 129 (1980), 二苯基磷酰叠氮化物或 2—乙氧基—N—乙氧基羰基—1,2—二氢喹啉在惰性溶剂中,例如卤代烃如二氯甲烷、醚如四氢呋喃或二恶烷,酰胺如 DMF 或二甲基乙酰胺,腈如丙烯腈,或在这些溶剂的混合物中,于大约 -10~40℃,优选 0~30℃ 的温度下进行。为了促进在分子间肽结合前发生分子内环化,优选在稀溶液中进行反应。

为了替代式 II 化合物在反应中也可以使用这些化合物的适当的反应性衍生物,例如那些反应性基团在中间被保护基封闭的衍生物,可以使用式 II 的氨基酸衍生物,例如,以它们的活性酯的形式,较有利地是通过加入 HOBT 或 N—羟基琥珀酰亚胺在原有位置上形成酯。

式 II 的起始物料通常是新的,它们可用已知的方法,例如用上面所给的肽合成的方法和除去保护基的方法来制备。

通常,进行合成的第一步是制备如式 R'—Z—OR'' 的被保护的

五肽酯,例如 $\text{BOC}-\text{Z}-\text{OMe}$ 或 $\text{BOC}-\text{Z}-\text{OEt}$,这些化合物水解产生式 $\text{R}'-\text{Z}-\text{OH}$ 的酸,例如 $\text{BOC}-\text{Z}-\text{OH}$;从这些酸中除去保护基 R' ,由此得到式 $\text{H}-\text{Z}-\text{OH}$ (II) 的游离肽。

用酸可将式 I 的碱转化成相应的酸加成盐,特别适用该反应的酸是那些能产生生理上可接受的盐的那些酸。例如,可被使用的无机酸的实例是硫酸、硝酸,氢卤酸如盐酸或氢溴酸,磷酸如正磷酸,氨基磺酸,和有机酸,特别是脂族、脂环,芳脂族,芳香族或杂环的单一或多元羧酸、磺酸或硫酸,例如,甲酸、乙酸、丙酸,新戊酸,二乙基乙酸、丙二酸、琥珀酸、庚二酸、富马酸、马来酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、苯甲酸、水杨酸、2-或 3-苯基丙酸、柠檬酸、葡萄糖酸、抗坏血酸、烟酸、异烟酸、甲磺酸或乙磺酸、乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘-1-磺酸和萘-2-磺酸和月桂基硫酸。与生理上不能接受的酸形成的盐,例如苦味酸盐,能被用来分离和/或纯化式 I 化合物。

另外,通过与碱反应式 I 的酸能被转化成一种它的生理上可接受的金属盐或铵盐。特别适当的盐是钠、钾、镁、钙和胺盐,还有取代的铵盐,例如二甲基铵盐,二乙基铵盐或二异丙基铵盐,单乙醇铵盐、二乙醇铵盐或三乙醇铵盐,环己基胺盐和二环己基铵盐、二苄基亚乙基二铵盐,还有例如,与 N-甲基-D-谷氨酰胺或与精氨酸或赖氨酸形成的盐。

式 I 的新的化合物,和它们的生理上可接受的盐通过将其与至

少一种赋形剂或助剂一起混和，如果需要，与一种或几种活性物质一起投入适宜的药剂形式中用于制备药物制品。这样制得的制品可被用作药物用于人体或兽医中。作为赋形剂的适宜的物质是那些适于肠道（例如，口服或直肠的），非肠道的（例如，静脉注射）或局部（例如，皮肤、表面的、眼的或鼻的）服用或适于吸入剂喷雾形式服用的并且不与新的化合物反应的有机物或无机物，实例是水或等渗的盐水溶液，低级醇、植物油、苺基醇、聚乙二醇、甘油三乙酸酯和其它脂肪酸甘油酯、明胶、大豆卵磷脂、碳水化合物如乳糖或淀粉、硬脂酸镁、滑石、纤维素和凡士林，口服形式特别是片剂、涂膜片剂、胶囊、糖浆、或滴剂；带有抗胃液涂层或胶囊套的涂膜片剂和胶囊是特别受到注意的。栓剂能被用于直肠服用，而非肠道服用则使用溶液，优选油性或水溶液，还有悬浮液，乳状液或移植物。适于局部服用的药物形式的实例是溶液，它可以眼药水滴剂的形式来使用，和其它实例是悬浮液、乳状液、霜剂、软膏或绷带。对于吸入剂喷雾的服用方式来说，可以使用含有溶解于或悬浮于推进气或推进气混合物（例如， CO_2 或氟氯烃）的活性物质的喷雾。在这种情况下活性物质优选以微粉化的形式被使用，可以存在有一种或多种外加的生理上可接受的溶剂，例如，乙醇，用通常的吸入器可配制吸入剂溶液。新的化合物可被冷冻干燥并且产生的冻干物能被用于，例如，制备注射用制品。此时注射可以巨丸剂或以连续注放（例如，静脉、肌肉、皮下或鞘内）来进行。所述制品可以消毒和/

或可以含有助剂，如防腐剂、稳定剂和/或润湿剂，乳化剂，影响渗透压的盐，缓冲剂物质、着色剂和/或香味剂。如果需要，它们也可以含有一种或多种其它活性物质，例如一种或多种维生素。

根据本发明的物料通常按与其它已知的商业上可得到的多肽相类似的方法服用，特别是用于与在US—A—4 472 305中所述的化合物相似的方法服用，优选的剂量是大约0.05—500mg，特别是0.5—100mg，每剂量单位。每天剂量优选大约0.01—2mg/kg体重。但是，每个特定病人的特定剂量取决于许多因素，例如，所用的特定化合物的效力，年龄、体重、健康的一般状态、饮食，给药的时间和途径、排泄速度、药物的结合和各自病情的严重性。非肠道服用是优选的。

此外，式I的新的化合物能被用作制备亲和层析柱，用于制备纯整合蛋白。

本文中，配体即式I的肽衍生物，经定位功能基共价地偶合于聚合物载体上。

适宜的聚合物载体材料是在肽化学中本身是已知的并优选地具有亲水性的固态聚合物相，实例为交联的聚糖如纤维素、Sephacrose或Sephadex[®]、丙烯酰胺、以聚乙二醇为基体的聚合物或Tentakel[®]聚合物。

连接于聚合物载体上的适当的定位基优选的是2—12个碳原子的线性亚烷基链，其一端直接连接于聚合物上，另一端带有一个功

能基如,羟基、氨基、巯基、马来酰亚胺基或 —COOH ,并适于与相应的肽的功能侧链相连接。

在这方面有可能将肽直接连接或,如果需要,经过第二个定位基定位于聚合物上。

此外,对一些是式 I 的肽的一个组成部分的氨基酸残基可以将侧链修饰以使其经过 SH 、 OH 、 NH_2 或 COOH 基有可能定位于聚合物上。

作为定位基其侧链可被直接使用的氨基酸残基的实例是例如 Arg 或 Asp。

可通过游离 NH_2 基团结合的定位基的实例是如下基团,如 $\text{—CO—C}_n\text{H}_{2n}\text{—NH}_2$ 、 $\text{—CO—C}_n\text{H}_{2n}\text{—OH}$ 、 $\text{—CO—C}_n\text{H}_{2n}\text{—SH}$ 或 $\text{—CO—C}_n\text{H}_{2n}\text{—COOH}$ 其中 $n=2\text{—}12$,亚烷基的链长不很严格;如果需要,该链可以全部或部分地被例如,适当的芳基或烷基芳基所替代。

可被连接至游离酸性基团上的 C—末端定位基的实例是 $\text{—O—C}_n\text{H}_{2n}\text{—SH}$ 、 $\text{—O—C}_n\text{H}_{2n}\text{—OH}$ 、 $\text{—O—C}_n\text{H}_{2n}\text{—NH}_2$ 、 $\text{—O—C}_n\text{H}_{2n}\text{—COOH}$ 、 $\text{—NH—C}_n\text{H}_{2n}\text{—SH}$ 、 $\text{—NH—C}_n\text{H}_{2n}\text{—OH}$ 、 $\text{—NH—C}_n\text{H}_{2n}\text{—NH}_2$ 或 $\text{—NH—C}_n\text{H}_{2n}\text{—COOH}$, n 和亚烷基链均如上段所述。

用于纯化整合蛋白的亲合色谱材料的制备是在常规的和对于氨基酸缩合其本身是已知的和已经在式 I 化合物的制备的相关部分叙述过的条件下来实施。

对于含硫醇的定位基,加成反应,例如与聚合物结合的硫醇进

行 Michael 加成以形成马来酰亚胺衍生物或二硫化物的反应是可能发生的。

上下文中所用温度均为℃，在后面的实例中“常规操作”是指：如果必需加入水，将混合物中和，用乙醚或二氯甲烷萃取，相分离，有机相用硫酸钠干燥，过滤，蒸发浓缩和在硅胶上色谱纯化和/或结晶化。Rt=HPLC 在系统 A：Lichrosorb RP^R 选择 B (250×4; 5μm 或系统 B：Lichrosorb^R RP18 (250×4; 5μm) 上的保留时间 (分)，洗脱剂 (系统 A)：0.3% TFA 水溶液；在流速为 1ml/min 时 50 分钟形成 0—80vol% 异丙醇梯度；于 215nm 处检测。洗脱剂 (系统 B)：洗脱剂 A：0.1% TFA 水溶液；洗脱剂 B：0.1% TFA 的乙腈/水 (9:1) 溶液；梯度 20—90%B；以 1ml/min 的流速 50 分钟形成。M⁺=用“快原子轰击”(FAB) 法获得的质谱的分子峰，所示分子量与所计算的相比增加了一个质量单位。

具体实施方式

实施例 1

用 85ml 二氯甲烷稀释 0.4g H—Arg (Mtr) —Gly—Asp—Btd—ONa [它可通过用哌啶/DMF 除去 FMOC 基团并用 TFA/CH₂Cl₂ (1:1) 除去树脂而得自 FMOC—Arg (Mtr) —Gly—Asp—Btd—O—Wang, —O—Wang 为改进的 Merrifield 技术中所使用的 4—氧甲基苯氧甲基聚苯乙烯树脂的残基] 的 15ml DMF 溶液，并用 50mg NaHCO₃ 处理。在干冰/丙酮混合物中冷却后，加入 40μl 二苯基磷酰基叠氮化物。室温下静置 16 小时后，浓缩溶液。过滤浓缩物 (Sephadex

G10 柱,于异丙醇/水 8 : 2 中),然后通过 HPLC 按常规方式纯化,得到环— (Arg (Mtr) —Gly—Asp—Btd)。

类似地,通过环化相应的线性肽可得到下列环肽:

环 (Arg(Mtr)-Gly-Asp-(S)Gly[ANC-2]-Leu);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-(R)Gly[ANC-2]-Leu);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-(S,S)spiroPro-Leu);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-Biph1);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-Biph2);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-Act);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-Btd-Val);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-Btd-Val);
环— (Arg(Mtr)-Gly-Asp-Aha);
环— (Arg(Mtr)-DAla-AspBtd);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-(S)Gly[ANC-2]-Leu);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-(R)Gly[ANC-2]-Leu);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-(S,S)spiroPro-Leu);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-Biph1);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-Biph2);
环— (Arg(Mtr)-DAla-Asp-Act)。

实施例 2

将 0.28g 环— (Arg (Mtr) — Gly—Asp—Btd) [可按实施例 1 所述通过环化得到]的 8.4ml TFA 溶液、1.7ml 二氯甲烷和 0.9ml 苯硫酚于室温下静置 4 小时,然后浓缩,用水稀释并冷却干燥。在

Scphadex G10 (乙酸/水 1:1) 上凝胶过滤, 然后在所述条件下通过制备性 HPLC 纯化, 得到环—(Arg—Gly—Asp—Btd); RT=13.2; M^+ =527。

类似地, 可得到下列环肽:

- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—(S)Gly[ANC-2]—Leu) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—(S)Gly[ANC-2]—Leu); RT = 4.8;
 M^+ 525;
- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—(R)Gly[ANC-2]—Leu) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—(R)Gly[ANC-2]—Leu); RT = 6.3;
 M^+ 525;
- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—(S,S)spiroPro—Leu) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—(S,S)spiroPro—Leu); RT = 14.6;
 M^+ 565;
- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—Biph1) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—Biph1); RT = 20.7; M^+ 538;
- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—Biph2) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—Biph2); RT = 20.8; M^+ 538;
- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—Act) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—Act), RT = 14.3; M^+ 547;
- 由 环—(Arg(Mt)—Gly—Asp—Btd—Val) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—Btd—Val);
- 由 环—(Arg(Mtr)—DAla—Asp—Btd—Val) 制得:
环—(Arg—DAla—Asp—Btd—Val);
- 由 环—(Arg(Mtr)—Gly—Asp—Aha) 制得:
环—(Arg—Gly—Asp—Aha)。

实施例 3

将 80mg 环 (Arg—Gly—Asp—Btd) 溶于 0.01M HCl 中 5—6 次,

并在每一次溶解后冷却干燥。然后通过 HPLC 纯化,得到环—(Arg—Gly—Asp—Btd) × HCl。

同样地,可得到下列环肽:

由 环—(Arg-Gly-Asp-Aha) 制得:

环—(Arg-Gly-Asp-Aha) × HCl;

由 环—(Arg-Gly-Asp-Btd-Val) 制得:

环—(Arg-Gly-Asp-Btd-Val) × HCl;

由 环—(Arg-Gly-Asp-Btd-Val) 制得:

环—(Arg-DAla-Asp-Btd-Val) × HCl;

由乙酸处理环—(Arg—DAla—Asp—Btd—Val), 得到:

环—(Arg—DAla—Asp—Btd—Val) × H₃C—COOH;

由 0.01N 硝酸处理环—(Arg—Gly—Asp—Aha), 得到;

环—(Arg—Gly—Asp—Aha) × HNO₃。

实施例 4

为制备亲和相,将 0.9g Cl—(CH₂)₃—CO—NH—(CH₂)₃ 聚合物 [可通过 Cl—(CH₂)₃—COOH 与 H₂N—(CH₂)₃ 聚合物的缩合得到]悬浮于 10ml 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7) 中,并于 4° 加入 1 当量环—(Arg (Mtr) —Gly—Asp (ONa) —Btd)。搅拌反应混合物 4 小时,同时升温至室温,滤出固体残余物,并用 10ml 缓冲液 (pH7) 洗涤两次,然后用 10ml 水洗涤三次,得到环—(Arg (Mtr) —Gly—Asp (O (CH₂)₃—CONH—(CH₂)₃—聚合物) —Btd)。

实施例 5

类似地, 通过除去环—(Arg (Mtr) —Gly—Asp (—O—(CH₂)₃—CONH—(CH₂)₃—聚合物—Btd) 中的 Mtr 基团可得到环—(Arg—Gly—Asp (O—(CH₂)₃—CONH—(CH₂)₃—聚合物) —Btd)。

实施例 6

与实施例 4 类似, 通常缩合聚—O (CH₂)₃—NH₂ (市售) 和环—(Arg—Gly—Asp—Biph1) 可获得: 环 (Arg—Gly—Asp—(NH—(CH₂)₃—O—聚合物) —Biph1)。

同样, 通过缩合环—(Arg—Gly—Asp—Btd—Val) 与 H₂N (CH₂)₃—O—聚合物, 得到: 环—(Arg—Gly—Asp—(NH—(CH₂)₃—O—聚合物) —Btd—Val)。

以下实施例涉及药物制品。

实施例 A: 注射小瓶

将 100 克式 I 的环肽和 5 克磷酸氢二钠在 3 升二次蒸馏水中的溶液用 2N 盐酸调整至 pH=6.5, 过滤消毒, 将其装入注射小瓶中和然后在无菌条件下冷冻干燥, 和在无菌条件下将小瓶封口, 每个注射小瓶含有 5 毫克活性物质。

实施例 B: 栓剂

将 20 克式 I 的活性物质与 100 克大豆卵磷脂和 1400 克可可奶油的混合物融化, 倒入模具中和静置冷却, 每个栓剂含有 20 毫克活性物质。

实施例 C：溶液

将 1 克式 I 活性物质，9.38 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 、28.48 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 和 0.1 克亚苄基毒芹属氧化物溶于 940 毫升二次蒸馏水中制得一种溶液，将溶液调整至 pH=6.8，稀释至 1 升和照射消毒，该溶液能以眼药水的方式来使用。

实施例 D：软膏

在无菌条件下将 500 毫克的式 I 的活性物质与 99.5 克凡士林混合。

实施例 E：片剂

将 100g 式 I 的环肽、1kg 乳糖、600g 微结晶纤维素、600g 玉米淀粉、80g 滑石和 10g 硬脂酸镁的混合物以常规的方式压缩形成片剂，每片含有 10 毫克活性物质。

实施例 F：涂膜片剂

用与实施例 E 相类似的方法组成片剂，和然后以常规的方式用含有蔗糖、玉米淀粉、滑石、黄蓍胶和着色剂的涂层进行涂膜。

实施例 G：胶囊

以常规的方式，用式 I 的活性物质装填成硬的明胶胶囊，使每个胶囊含有 5 毫克的活性物质。

实施例 H：吸入喷雾剂

将 14g 式 I 活性物质溶于 10l 等渗 NaCl 溶液，并将该溶液注入具有泵装置的市售喷雾容器中。该溶液可被喷至口腔或鼻腔中，一

次喷雾量（约 0.1ml）相当于约 0.14mg 剂量。