



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102160890 B

(45) 授权公告日 2013.02.06

(21) 申请号 201110052022.9

C07K 7/06 (2006.01)

(22) 申请日 2001.08.06

A61P 29/02 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

137820 2000.08.10 IL

(56) 对比文件

WO 9527728 A1, 1995.10.19,

CN 85109722 A, 1986.10.08,

EP 0148133 A2, 1985.07.10,

WO 0012553 A1, 2000.03.09,

(62) 分案原申请数据

01816060.3 2001.08.06

(73) 专利权人 S·I·S·舒洛弗科学创新有限公司

审查员 马艳林

地址 以色列雷霍沃特

(72) 发明人 N·普里默 A·舒洛弗

(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 11038

代理人 李华英

(51) Int. Cl.

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

包含止痛肽的药物组合物

(57) 摘要

用于局部给药的药物组合物,其包含止痛有效量的通式(I)的包含L-氨基酸的肽:pGLU-X-Y-ZM(I)和可药用赋形剂。X是选自GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS和ARG的氨基酸,Y是TRP或THR,而Z是任何L-氨基酸,或Z不存在。当Z是任何L-氨基酸时,Y和Z之一是TRP但两者不都是TRP,而当Z不存在时,Y是TRP。烷基可以附着于所述肽的氨基酸上。同时公开了所述肽,药物组合物的制备和治疗或预防哺乳动物疼痛的局部应用方法。

1. 一种局部给药药物组合物,其包含止痛有效量的选自下组的含有 L-氨基酸的肽或肽衍生物:pGLU-ASN-TRP、pGLU-ASN-TRP-C8、pGLU-ASN-TRP-THR 和 pGLU-ASN-TRP-LYS-C8,和可药用赋形剂。
2. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述 C8 烷基是通过酰胺键附着的。
3. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述 C8 烷基是通过酯键附着的。
4. 止痛有效量的选自下组的包含 L-氨基酸的肽或肽衍生物:pGLU-ASN-TRP、pGLU-ASN-TRP-C8、pGLU-ASN-TRP-THR 和 pGLU-ASN-TRP-LYS-C8,用于制备治疗或预防疼痛的局部给药的药物组合物的用途。
5. 权利要求 4 所述的用途,其中所述 C8 烷基通过酰胺键附着的。
6. 权利要求 4 所述的用途,其中所述 C8 烷基是通过酯键附着的。
7. 一种肽或肽衍生物,其中所述肽是 pGLU-ASN-TRP-THR、且所述肽衍生物是 pGLU-ASN-TRP-LYS-C8。

包含止痛肽的药物组合物

[0001] 本申请是申请号为 01816060.3 (PCT/IL01/00724)、申请日为 2001 年 8 月 6 日、发明名称为“包含止痛肽的药物组合物”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及止痛肽及其衍生物。

背景技术

[0003] 虽然疼痛是至关重要的生理学反应,它也产生了不必要的痛苦和苦恼。对疼痛的控制和缓解是医学的重要分支。疼痛可以是疾病的结果,也可能是医学治疗如化学治疗的结果。在各种情况中,重要的是尽可能地减轻疼痛以使患者功能正常。

[0004] 涉及疼痛的两条神经途径同时在身体中起作用:(1) 感觉途径,其感觉组织损伤,随后产生疼痛的感觉;(2) 止痛途径,其减轻疼痛的感觉,并阻止疼痛的信息流向中枢神经系统(CNS),从而使有机体尽管受到损伤仍能维持其正常活动。利用抑制作为疼痛感受器的外周神经的药物或通过加强天然止痛系统可以实现止痛。由于这些是不同的途径,因而它们受不同物质的影响。例如,阿司匹林和利多卡因对外周感觉途径有活性,而吗啡和相关的物质对止痛系统有作用。

[0005] 目前使用的大多数有效的止痛药是来源于阿片剂的吗啡相关物质,已知大脑产生多种内源性阿片剂,这解释了这些物质的强大效果。它们对神经元的作用是通过专门的受体介导的。这些受体调节的信号阻止信息从外周疼痛神经元流向 CNS。这些 CNS 神经元也对多种其它化学物质包括儿茶酚胺(5-羟色胺,去甲肾上腺素等等)、神经活性肽(神经降压肽)和抑制性氨基酸(甘氨酸和 GABA)敏感。

[0006] 授予 Di Stazio 的 U. S. 4,619,916 公开了通式 pGLU-X-TRP 的 13 种新的三肽,其中 pGLU 是环化的谷氨酸(焦谷氨酸)而 X 可以是 GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS 和 ARG。同时公开了它们的制备方法,用于口服和肠胃外给药的含有它们的药物制剂,和它们作为降压药和止痛剂的用途。进一步公开了色氨酸残基的低级烷基酯,特别是甲酯或乙酯,用作所述肽生产中的保护基团。在合成过程完成时,这些保护基团被除去。没有公开局部制剂。

[0007] WO 92/19254 公开了 α -取代的单,二,三,四和五肽,可用于治疗肥胖,焦急,胃溃疡,疼痛,中风和炎症。未公开式 pGLU-X-TRP 的肽。

[0008] 下面的通式 pGLU-X-TRP-Z 的四肽出现在文献中:

[0009] $X = \text{L-Ala}; Z = \text{L-LeuOH}, \text{L-LeuOCH}_3, \text{L-LeuNH}_2, \text{L-MetOH}, \text{L-MetOCH}_3,$ 或者 L-MetNH_2 (DE 3,340,208);

[0010] $X = \text{Lys}; Z = \text{L-AlaOH}$ 或者 L-ProOH (Freer, R. J. 和 Stewart, J. M. (1971) Cienc. Cult. 23(4):539-42; Francis, B. 和 Kaiser, I. I. (1993) Toxicon 31(7):889-899);

[0011] $X = \text{L-Pro}; Z = \text{L-ValNH}_2, \text{L-MetOH}, \text{L-MetOCH}_3, \text{L-MetNH}_2, \text{L-Met 亚砷 OH}, \text{L-Met 亚砷 OCH}_3, \text{L-Met 亚砷 NH}_2$ (DE3,340,208)。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供可以局部给药的止痛药物组合物。

[0013] 本发明的另一个目的是提供新的肽衍生物。

[0014] 在第一方面,本发明提供了用于局部给药的药物组合物,其包含止痛有效量的通式 (I) 的含有 L- 氨基酸的肽:

[0015] pGLU-X-Y-Z (I)

[0016] 其中 X 是选自 GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS 和 ARG 的氨基酸,

[0017] Y 是 TRP 或 THR,

[0018] 而 Z 是任何 L- 氨基酸或 Z 不存在,

[0019] 其中当 Z 是任何 L- 氨基酸时, Y 和 Z 之一是 TRP 但两者不都是 TRP, 而当 Z 不存在时, $Y = \text{TRP}$,

[0020] 或者止痛有效量的肽衍生物, 其中烷基附着于所述肽的氨基酸上, 和可药用赋形剂。

[0021] 现在已经发现, 某些肽可以用作局部止痛组合物中的活性成分。

[0022] 本发明组合物的活性成分是通式 (I) 的肽。本发明的肽的例子是三肽和四肽, 其中 pGLU 是 NH_2 末端的氨基酸, TRP 是在第三 (Y) 或者第四 (Z) 氨基酸位置, 优选的肽的例子是 pGLU-ASN-TRP-OH (pENW), pGLU-GLU-TRP-OH (pEEW), $\text{pGLU-ASN-TRP-THR-OH}$ (pENWT), $\text{pGLU-ASN-THR-TRP-OH}$ (pENTW) 和 $\text{pGLU-ASN-TRP-LYS-OH}$ (pENWK)。

[0023] 本发明的肽衍生物中烷基链附着于肽上。这可能是通过将脂肪酸附着于胺基团来进行的, 例如附着于赖氨酸或精氨酸残基的 ϵ - 胺基团, 从而得到肽的烷基酰胺, 或附着于羟基基团, 从而得到肽的烷基酯。烷基链可以附着于肽中能够与烷基链反应的任何氨基酸, 正如本领域技术人员熟知的。烷基链可以是任意长度, 但优选中至长链, 例如 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 或 30 个碳。肽衍生物的例子是 $\text{pGLU-ASN-TRP-LYS(辛酰基)-OH}$ (pENWK-C8) 和 pGlu-Asn-Trp-O-辛基 (pENW-C8)。

[0024] “止痛有效量”是活性成分能够产生所需要的药学效果的量, 即能够减轻或预防疼痛的量。这一量取决于多个参数如活性成分和载体的确切组合物, 给药的位置, 疼痛的来源等等。该量可以容易地由本领域的一般技术人员通过进行有限量的剂量应答实验来确定, 例如将一系列浓度的给定配方施用于身体的特定位置。已经发现有效的浓度的例子包括但不限于 0.0015-0.02mg/g 载体。

[0025] 本发明的药物组合物是配制用于局部给药的。这样的组合物还将包含一种或多种可药用载体或赋形剂, 如羊毛脂和凡士林的混合物, 用于以油膏、乳霜或药膏形式局部使用。供局部使用的其它载体是本领域技术人员已知的, 并且包括在本发明的范围内。芳香剂, 稳定剂, 色料, 增稠剂和其它常规物质也可以包括在组合物中。

[0026] 本发明还提供止痛有效量的通式 (I) 的含有 L- 氨基酸的肽的用途:

[0027] pGLU-X-Y-Z (I)

[0028] 其中 X 是选自 GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS 和 ARG 的

氨基酸,

[0029] Y 是 TRP 或 THR,

[0030] 而 Z 是任何 L-氨基酸或 Z 不存在,

[0031] 其中当 Z 是任何 L-氨基酸时,Y 和 Z 之一是 TRP 但两者不都是 TRP,而当 Z 不存在时, Y = TRP,

[0032] 或者,提供止痛有效量的肽衍生物的用途,其中烷基附着于所述肽的氨基酸,用于制备治疗或预防疼痛的局部使用的药物组合物。

[0033] 本发明的另一方面是治疗或预防哺乳动物疼痛的方法,包括对哺乳动物局部施用止痛有效量的通式 (I) 的包含 L-氨基酸的肽:

[0034] pGLU-X-Y-Z (I)

[0035] 其中 X 是选自 GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS 和 ARG 的氨基酸,

[0036] Y 是 TRP 或 THR,

[0037] 而 Z 是任何 L-氨基酸,或 Z 不存在,

[0038] 其中当 Z 是任何 L-氨基酸时,Y 和 Z 之一是 TRP 但两者不都是 TRP,而当 Z 不存在时, Y = TRP,

[0039] 或者局部施用止痛有效量的肽衍生物,其中烷基附着于所述肽的氨基酸上。

[0040] 该肽的局部给药可以采用局部给药的常规方式。

[0041] 由于本发明的组合物有时是在一个延迟期后发生作用的,可以预期,它对于慢性疼痛将特别有效,尽管它可以用于治疗任何类型的疼痛。

[0042] 在另一个方面,提供了通式 (I) 的包含 L-氨基酸的肽:

[0043] pGLU-X-Y-Z (I)

[0044] 其中 X 是选自 GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS 和 ARG 的氨基酸,

[0045] Y 是 TRP 或者 THR,

[0046] 而 Z 是任何 L-氨基酸,或者 Z 不存在,

[0047] 其中当 Z 是任何 L-氨基酸时,Y 和 Z 之一是 TRP 但两者不都是 TRP,而当 Z 不存在时, Y = TRP,

[0048] 或者提供了该肽的衍生物,其中烷基附着于氨基酸上,其中烷基的长度是 C4 或更长。

[0049] 附带条件是,当 Z 是任何 L-氨基酸时,如果 X = ALA,Z 不是 LEU 或 MET,如果 X = LYS, Z 不是 ALA 或 PRO,如果 X = PRO, Z 不是 VAL 或 MET,

[0050] 其它附带条件是当 Z 不存在时,所述肽具有附着于其氨基酸的烷基。

[0051] 这些肽在文献中是未知的。

[0052] 本发明的这一方面的其它实施方案是治疗或预防疼痛的药物组合物,其包含止痛有效量的本发明的肽或其烷基酯或酰胺。该药物组合物可以口服,肠胃外或局部给药。

具体实施方式

[0053] 方法和材料

[0054] 肽和衍生物的制备

[0055] 1. pGlu-Asn-Trp-Lys(辛酰基)-OH 的合成

[0056] 在本发明的一个实施方案中,肽的合成是通过在Fmoc-Lys(Mtt)-Wang树脂(在1g预载树脂上装填0.25毫摩尔)上的分步9-芴基甲氧羰基(Fmoc)固相肽合成(SPPS)方法手工进行的。

[0057] 在第一步,用在DCM中的1%TFA处理而选择性地除去Mtt(4-甲基三苯甲基)保护基团。通过在存在N-羟基苯并三唑(HOBt)时施加2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸(HBTU)试剂的常规偶联方法将辛酸附着于游离氨基上(通过酰胺键)。同样的偶联方法也用于其它氨基酸的附着。通过Kaiser实验检测偶联步骤的完成(用乙醇洗涤取自反应中的少量树脂小珠,转移到小玻璃管中;加入2滴以下的溶液:乙醇中的5%茚三酮,乙醇中的80%苯酚,吡啶中的0.00002M氰化钾;将样品混合,加热到120℃4-6分钟。蓝色树脂小珠指示实验阳性)。然后,用20%哌啶除去Fmoc基团,在洗涤树脂后,引入第二个氨基酸(Fmoc-Trp(Boc))再开始另一个偶联步骤。

[0058] 每次都根据肽序列加入另一个氨基酸重复这些步骤。所用的氨基酸是Fmoc-N^α保护的。三官能氨基酸如下作侧链保护:Trp(Boc),Asn(Trt)。在原位用HBTU/HOBt活化各Fmoc氨基,随后与树脂偶联50分钟。在偶联过程中将二异丙基乙胺(DIEA)用作有机碱。然后用在N-甲基吡咯烷酮(NMP)中的20%哌啶处理20分钟除去α胺上的Fmoc保护基团。三当量的活化氨基酸用于偶联反应中。加入每个随后的氨基酸时重复去保护和偶联步骤,直到完成肽的合成。先用NMP接着用DCM洗涤肽-树脂,并且真空干燥。

[0059] 在室温下,用95%的TFA,5%的三异丙基硅烷(TIS)溶液处理2小时而从树脂上将如上所述制备的这一肽裂解下来。产物通过加入10体积的醚来沉淀,过滤,在真空中干燥。通常,从1克肽-树脂可获得150毫克肽。通过LC/MS鉴定($M^+ = 684.7$)。

[0060] 纯化

[0061] 在制备型RP-HPLC柱(C₁₈ 5μmPhenomenex Luna柱,10mm I.D.x25cm)上纯化粗制肽。在下面的条件下进行层析:A = H₂O/TFA 0.05%;B = ACN/TFA 0.05%;γ = 214nm;流速 = 5ml/min。在柱上装填50mg肽。在45分钟利用15%到50%B的梯度。收集主峰的级分,通过分析型HPLC来表征。将最好的级分合并到一起,冻干得到所需要的产物,其纯度 > 95%。

[0062] 2. pGlu-Asn-Trp-O-辛基的制备

[0063] 这一肽的制备也可以通过包括以下步骤的溶液合成方案来进行:

[0064] a. 制备 Boc-Trp-O-辛基(Boc-Trp的辛酯)

[0065] 在0℃,向DCM(40ml)中引入Boc-Trp(6.1毫摩尔),辛醇(6.8毫摩尔),DMAP(0.74g,6.1毫摩尔)和二环己基碳二亚胺(DCC)(1.4g,(6.8毫摩尔))。搅拌混合物,除去冷却浴,从而使温度慢慢上升到室温。将反应物搅拌过夜,然后过滤以除去二环己基脲(DCU)。用DCM洗涤固体,将合并的母液用HCl(0.1N)调节到pH = 4-5。用水(3×30ml)洗涤有机相,经MgSO₄干燥,过滤和蒸发得到粗产物。

[0066] b. 除去 Boc 基团

[0067] 在室温下将Boc-Trp-O-辛基溶于醚中。加入在二噁烷中的HCl(4N)(4:1摩尔过量),并且将反应混合物搅拌大约1小时。去保护的产物作为HCl盐沉淀。过滤,用醚洗

涤并干燥。

[0068] c. DCC/HOBt 偶联过程

[0069] 将 DCM(35ml) 中的 Boc 保护的氨基酸 (14.2 毫摩尔) 冷却到 0℃。向反应混合物中加入 HOBt·H₂O(12.9 毫摩尔, 1.75g) 和 DCC(15.5mole, 3.2g), 剧烈搅拌 1 小时。将溶于 DCM(20ml) 中的去保护的肽 (在除去 Boc 基团之后) 和 TEA(18.1 毫摩尔) 引入反应, 在 0℃ 将混合物再搅拌 30 分钟。除去冷却浴, 将反应混合物置于室温过夜。

[0070] 在减压下将产物混合物蒸发至干, 加入 EtOAc(150ml)。通过过滤除去不溶的颗粒 (DCU), 用盐水 (2×35ml)、NaHCO₃(5%; 2×35ml) 和水 (2×35ml) 洗涤母液。用 MgSO₄ 干燥有机相, 在减压下蒸发。

[0071] 在肽合成结束时 (最后阶段是 pGlu 的偶联), 得到粗产物肽。通过 LC/MS 鉴定, 并类似于第一个肽 (pGlu-Asu-Trp-Lys(辛酰基)-OH) 进行纯化。

[0072] 3. 从蛇毒纯化

[0073] 本发明的部分肽也可以从蛇毒分离, 包括从蝰科, 眼镜蛇科和响尾蛇科的蛇得到的毒液。例如, 可以从黑唇眼镜蛇 (*Naja melanoleuca*) 毒液, 在 Mono Q 柱上利用 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 来纯化 pENW。将在 12-18 分钟从 Mono Q 柱 (峰在 14.3 分钟) 洗脱的级分如下通过 HPLC 进一步纯化: 将该级分装到 HPLC Spherisorb 5 柱 (5 μ, 250×4.6mm, 相 Sep. S/N 142110) 上, 利用 20mM NH₄Ac (pH 5.5) 和 AcN 的梯度来洗脱。在或选的纯化方法中, 可以在 Mono Q 柱上利用 20mM 的乙酸铵缓冲液 (pH6.9) 来纯化毒液。峰在 17 分钟的级分进一步通过 HPLC 纯化, 如上所述。NMR, HPLC 和 LC/MS 分析揭示合成的肽和天然的肽一致。

[0074] 同样, 从东部菱斑响尾蛇 (*Crotalus adamanteus*) 毒液中, 已经纯化了 pENW, pEEW, 和 pENTW 或 pENWT, pENW 已经从山蝰巴勒斯坦亚种 (*V. palestinae*) 毒液中纯化。

[0075] 实验

[0076] 1. 止痛实验

[0077] 在各测试中, 利用了几十只相似体重和年龄的仓鼠。根据待测试的样品数目将仓鼠分成几组。将含有测试物质的油膏 (50% 的羊毛脂和 50% 的凡士林) 涂到动物背部皮毛上。没有除去皮毛, 以保证对皮肤不造成损伤。用不含本发明组分的油膏处理对照组的仓鼠。连续局部涂敷 6, 14, 21 或 28 天来处理仓鼠。在最后一次涂敷油膏之后, 进行止痛性实验。在或选的方案中, 在单次涂敷油膏后测试止痛性。

[0078] 在涂敷油膏后, 仓鼠通过用舌头和腿将油膏分散到遍布整个身体来“清洁”自身。所以, 在口腔中也引入了一些油膏, 并可能还进入了仓鼠的肠道。

[0079] 在一个典型的测试中, 将恒定量的含或不含止痛物质的油膏应用于每只动物, 持续一天或多天的预定时间。在这一时期后, 通过在大腿区皮下注射 0.5ml 的 1N HCl/0.1kg 体重来诱发疼痛。仓鼠对注射 HCl 的反应是用舌头碰注射的区域, 这称为“舔”。在注射后 20 分钟, 观察仓鼠 60 分钟, 记数“舔”的次数。“舔”的次数作为 HCl 诱导的疼痛的定量指标。

[0080] 将对照动物中“舔”的平均次数与处理动物中的次数相比较来确定止痛效果。利用 t- 检验统计确定差异的显著性。

[0081] 实施例 1

[0082] 将 0.6mg 的 pENW, pENWK-C8 或 pENWGAT (pENW 的二聚体) 溶于 5ml DDW 中, 通过超声混合器混合 2 分钟, 然后溶于 315gr 的油膏中。最终的肽浓度是 0.002mg/gr。

[0083] 在 4 星期内, 进行 6 次涂敷。在最后一次涂敷油膏后 10 天进行止痛性测试。结果概括在下面的表中:

[0084]

活性成分	动物数	平均“舔”次数	标准差	SEM	P*
对照	25	113.9	69.1	13.8	—
pENW	27	59.7	58.9	11.3	0.0017
pENWK-C8	28	37.9	34.8	6.6	< 0.0001
pENWGAT	32	117.0	81.2	14.4	0.9872

[0085] *—Mann-Whitney 秩和检验

[0086] 可以清楚地看出, 局部涂用三肽对减轻动物的疼痛具有明显的效果, 四肽衍生物甚至更有效。在三肽的 C 末端添加 3 个氨基酸完全消除了它的活性。

[0087] 实施例 2

[0088] 如实施例 1 中所述制备浓度为 0.020mg/g 的组合物, 其含有下面的活性成分: pENW, pEEW 或 pENTW 或 pENWT。在 5 星期内涂敷 6 次。结果概括如下:

[0089]

活性成分	动物数	平均“舔”次数	SEM	p*
对照	24	117	6	—
pENW	25	44	31	< 0.05
pEEW	26	35	30	< 0.05
pENTW 或 pENWT	25	39	26	< 0.05

[0090] *—Dunn 方法

[0091] 可以看到, 所有测试的肽都具有显著的止痛活性。

[0092] 实施例 3

[0093] 如实施例 1 中所述制备含有浓度为 0.002mg/g 油膏的 pENW-C8 的组合物。对动物进行单次涂用, 在涂用后 11, 23 和 48 天时测试止痛性。将不含活性物质的油膏涂用于对照动物。

[0094] 结果概括如下:

[0095]

涂药后天数	动物数	平均“舔”次数	SEM	p [*]
对照	26	106	11.2	—
11	28	66	10	< 0.05
23	27	35.7	6.5	< 0.05
48	21	62.4	11	< 0.05

[0096] *—Dunn 方法

[0097] 结果表明,止痛效果随时间而建立起来,在约 23 天后达到峰值,随后下降。