

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 5/078

C07K 5/083 C07K 5/097

A61K 38/05 A61K 38/06

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99807629.5

[43] 公开日 2001 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 1306540A

[22] 申请日 1999.6.24 [21] 申请号 99807629.5

[30] 优先权

[32] 1998.6.24 [33] DE [31] 19828113.7

[86] 国际申请 PCT/EP99/04382 1999.6.24

[87] 国际公布 WO99/67278 德 1999.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2000.12.20

[71] 申请人 前体生物药物开发有限公司

地址 德国哈雷

[72] 发明人 汉斯-乌尔里希·德穆特

托尔斯滕·霍夫曼 达格玛·施伦齐希

苏珊·曼哈特

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 DPIV 抑制剂的前药

[57] 摘要

本发明涉及二肽基肽酶 IV (DP IV) 的抑制剂的前药化合物, 该化合物具有通式 A-B-C, 其中 A 是氨基酸, B 是 A 和 C 之间的化学键或者是氨基酸, 而 C 是 DP IV 的稳定抑制剂。该前药化合物可用于治疗哺乳动物中受损葡萄糖耐量、葡萄糖、高脂血、代谢酸中毒、糖尿病、糖尿病性神经病和肾病、以及糖尿病的后遗症。

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

权 利 要 求 书

1、二肽基肽酶 IV (DP IV) 的抑制剂的前药化合物, 该前药化合物具有通式 A-B-C, 其中

A 是氨基酸,

B 是 A 和 C 之间的化学键或者是氨基酸, 而

C 是 DP IV 的稳定抑制剂。

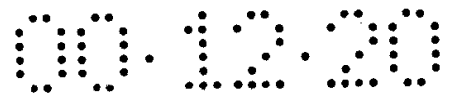
2、如权利要求 1 所述的前药化合物, 其特征在于, B 是脯氨酸、羟基脯氨酸、噁唑烷羧酸、脱氢脯氨酸、2-哌啶酸、氮杂环丁烷羧酸或者氮丙啶羧酸。

3、如权利要求 1 或 2 所述的前药化合物, 其特征在于, B 是脯氨酸和羟基脯氨酸。

4、如任一前述权利要求所述的前药化合物, 其特征在于, C 是氨基酰基吡咯烷化物、氨基酰基噁唑烷化物或者 N-二肽基、O-酰基羟胺。

5、如任一前述权利要求所述的前药化合物, 其特征在于, 所述抑制剂为盐的形式。

6、如任一前述权利要求所述的前药化合物, 其特征在于, A-B 是式 Ile-Pro 或 Gly-Pro 的二肽。



7、特别是用于口服给药的药物组合物，其特征在于包括至少一种如任一前述权利要求所述的前药化合物以及任选的常规载体或赋形剂。

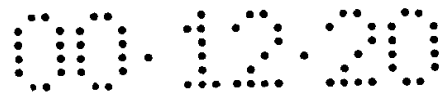
8、如任一前述权利要求所述的前药化合物或者药物组合物在制备用于暂时性受控体内抑制 DP IV 的药物中的应用。

9、如权利要求 1-6 之一所述的前药化合物或药物组合物在细胞、组织或器官特异性抑制 DP IV 中的应用。

10、如权利要求 1-6 之一所述的化合物或药物组合物在治疗哺乳动物中可通过调节哺乳动物的 DP IV 活性来治疗的疾病中的应用。

11、如权利要求 9 所述的应用，其是用于治疗人的代谢紊乱。

12、如权利要求 9 所述的应用，其是用于治疗哺乳动物中受损葡萄糖耐量、葡萄糖尿、高脂血、代谢酸中毒、糖尿病、糖尿病性神经病和肾病、以及糖尿病的后遗症。



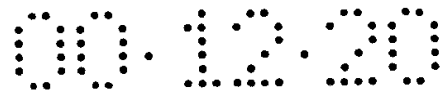
说明书

DP IV 抑制剂的前药

本发明涉及二肽基肽酶 IV (DP IV) 抑制剂的前药化合物, 该前药化合物的通式为 A-B-C, 其中 A 是氨基酸, B 是 A 和 C 之间的化学键或者是氨基酸, 而 C 是 DP IV 的稳定抑制剂。

已经发现, 因为酶活性的相关的暂时性下降, 给药哺乳动物血液中 DP IV 或者 DP IV 类似酶活性的抑制剂 (效应物), 可使 DP IV 和 DP IV 样酶导致的内源性 (或者其他外源性给药的) 促胰岛素肽胃抑制剂多肽 1-42 (GIP₁₋₄₂) 和胰高血糖素样肽酰胺-17-36 (GLP-1₇₋₃₆) (或者 GLP-1₇₋₃₇ 或者其类似物) 分解的下降, 因此减少或延迟了这些肽激素或其类似物浓度的下降。(内源性存在或者外源性引入的) 肠降血糖素或其类似物的更高稳定性, 其是由于 DP IV 效应物的作用, 增加了胰腺中 Langerhans 细胞的肠降血糖素的促胰岛素性刺激作用的有效性, 并改变了身体本身的胰岛素作用, 导致对治疗生物中碳水化合物代谢的刺激作用。其结果是, 所治疗生物的血清中的血糖浓度下降至高血糖的特征葡萄糖浓度以下。因此, 用 DP IV 抑制剂可防止或者缓解代谢异常, 如过重、葡萄糖尿、高脂血、以及可能严重的代谢酸中毒和糖尿病, 它们是血糖浓度长期升高的结果 (参见 DE 196 16 486)。

借助于 DP IV 抑制剂还可经验性地防止 HIV 对 CD 26 (DP IV) 阳性细胞的渗透 (参见 WAKSELMAN, M., NGUYEN, C., MAZALEYRAT, J. -



P., CALLEBAUT, C., KRUST, B., HOVANESSIAN, A. G. 用 CD 26 的 DPP IV 活性的强效环肽抑制剂抑制 HIV-1 对 CD 26 阳性而不是 CD26 细胞的感染 (Inhibition of HIV-1 infection of CD 26+ but not CD 26-cells by a potent cyclopeptidic inhibitor of the DPP IV activity of CD 26). Abstract P 44 of the 24th European Peptide Symposium 1996)。

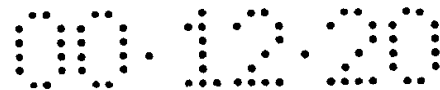
还发现 DP IV 可调节神经活性肽的活性，如神经肽 Y 和 CLIP (参见 MENTLEIN, R., DAHMS, P., GRANDT, D., KRUGER, R., 用二肽基肽酶 IV 对神经肽 Y 和肽 YY 的蛋白酶解加工 (Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV). Regul. Pept. 49, 133 (1993); WETZL, W., WAGNER, T., VOGEL, D., DEMUTH, H. -U., BALSCHUN, D., CLIP 片段 ACTH 20-24 对 REM 睡眠期持续时间的作用 (Effects of the CLIP fragment ACTH 20-24 on the duration of REM sleep episodes). Neuropeptides, 31, 41 (1997))。

因此，本发明的目的是提供 DP IV 的效应物，其与已知的抑制剂相比具有更高的作用，而且可暂时限制作用的启动。

该目的是通过二肽基肽酶 IV (DP IV) 抑制剂的前药化合物来解决的，该前药化合物具有通式 A-B-C，其中 A 是氨基酸，B 是 A 和 C 之间的化学键或者是氨基酸，而 C 是 DP IV 的稳定抑制剂。

令人惊奇的是，该类掩蔽成前药的抑制剂与未经掩蔽的抑制剂相比具有显著增加的活性：当使用相同量的未掩蔽抑制剂和根据本发明的前药化合物时，如表 4 所示，在 Wistar 大鼠中使葡糖耐量提高最多至 75%。

鉴于以下事实该提高更是令人惊奇的，即、已经发现 100% 的 DP IV 未



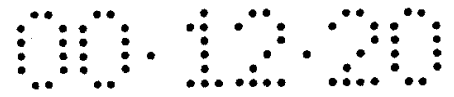
掩蔽抑制剂被哺乳动物的胃肠道吸收，并进入身体的血管腔中。因此，人们一直认为仅是用于防止口服给药的化合物在胃肠道中分解的前药化合物不会使抑制剂的活性增加。另外，还应提到的是没有任何原因可以使本领域技术人员在上述事实的基础上寻求改性抑制剂，即使前药化合物本身是已知的；例如参见 PCT/US97/09421。

根据本发明的优选实施方案，所用的前药化合物中 B 是脯氨酸、羟基脯氨酸、噻唑烷羧酸、脱氢脯氨酸、2-哌啶酸、氮杂环丁烷羧酸或者氮丙啶羧酸，其中特别优选脯氨酸和羟基脯氨酸。B 优选代表在 A 和 C 之间的肽键或者通过肽键连接在 A 和 C 上。

根据本发明的前药化合物还具有根据个体患者的需要释放 DP IV 抑制剂的优点。

当根据本发明的前药化合物与 DP IV 分子相互作用时，其被酶断裂为 A-B 基团和抑制剂 C。抑制剂 C 将抑制 DP IV 分子，使其不能进一步断裂该化合物。如果还存在 DP IV 分子，前药化合物将继续被断裂（如果已给药足够量的相应化合物），直至抑制最后的 DP IV 分子。剩余的化合物不再被分解，并由此构成抑制剂储存，直至 DP IV 分子的浓度又一次升高或者抑制剂分子被 DP IV 置换或者抑制剂分子被消除或失活，根据本发明的前药化合物再被断裂并由此释放抑制剂。

因此本发明的再一个优点是，每种生物将释放抑制已有 DP IV 所需要的精确量的抑制剂，其在每个情况下都是不同的。例如如果患者具有高浓度的 DP IV，则就释放大量的抑制剂；而如果仅有略高浓度的 DP IV，则释放少量的抑制剂。



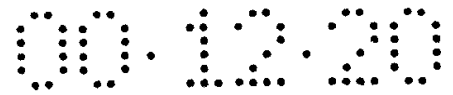
另外，根据本发明优选的前药化合物是其中 C 为氨基酰基吡咯烷化物 (pyrrolidide)、氨基酰基噻唑烷化物 (thiazolidide) 或者 N-二肽基、O-酰基羟胺的化合物。这些抑制剂已经表明它们本身是特别有活性的 DP IV 抑制剂。此等抑制剂的例子可以是 Ile-Thia、Ile-Pyr、Val-Thia 和 Val-Pyr。

根据本发明抑制剂 (组分 C) 也可以是盐形式，优选为有机盐，如乙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、或富马酸盐，或者优选是无机酸盐如硫酸盐或者磷酸盐。特别优选的是富马酸盐。

特别优选的化合物是其中 A-B 是式 Ile-Pro 或者 Gly-Pro 的二肽。

本发明因此涉及丝氨酸蛋白酶二肽基蛋白酶 IV 抑制剂的新型前药化合物，该前药化合物可用于治疗各种疾病，特别是治疗与糖尿病有关的代谢紊乱。

本发明前药化合物的再一个优点是，合适地选择基团 A-B 可以暂时性控制 DP IV 抑制剂的作用起始和作用持续时间。具体而言，从根据本发明的前药化合物中释放基团 A-B 取决于基团 A 氨基酸的性质：对于基团 A，DP IV 从前药化合物 A-B-C 中释放基团 A-B 的速率具体顺序如下：Ile < Val < Phe < Pro < Ala < Gly。相应的 DP IV 催化释放速率常数为 $1-100 \text{ s}^{-1}$ 。因此就有了以精确暂时性的限定方式释放 DP IV 抑制剂的手段：如果例如在摄入富葡萄糖的营养物时酶立即作用，所选择的化合物 A-B-C 中例如具有氨基酸 Gly 作为 A 基团；如果延迟抑制剂的作用，则例如选择氨基酸 Ile 作为基团 A。因此，通过根据本发明的前药化合物，可特别是几乎没有任何延迟、例如实际上与营养物摄入同时地经由小肠粘膜转运 DP IV 抑制剂。



如果 B 代表一个键，则其特别是肽键；如果 B 代表氨基酸，则其优选通过肽键连接在 A 和 C 上。

在分析 DP IV 抑制剂异亮氨酰噻唑烷化物作为哺乳动物血糖浓度调节剂的剂量—作用关系时，在向 Wistar 大鼠口服和非胃肠道给药活性物质之间发现差异：在口服给药时，在摄入活性物质时观察到饱和（根据对血清酶的抑制作用来测量），而在非胃肠道给药抑制剂时，观察到完全抑制酶。这例如用表 1 来证实。

表 1: 在 i.v.和 p.o.给药后在 30°C、pH 7.6 和离子强度为 0.125 的条件下相对于 0.4 mM 底物 H-Gly-Pro-pNA 的 DP IV 残留活性，其是异亮氨酰噻唑烷化物 (Ile-Thia) 剂量的函数，而且是在给药抑制剂后 30 分钟测量的

非胃肠道给药时的 Ile-Thia 剂量	DP IV 活性 (%)	口服给药时的 Ile- Thia 剂量	DP IV 活性 (%)
0 mg	100	0 mg	100
0.02 mg	80	2.5 mg	52
0.2 mg	32	5.0 mg	40
2 mg	5	10 mg	28
20 mg	0	20 mg	29

鉴于肠道中也存在能够断裂前药的可断裂基团并因此释放药物的酶的事实，特别是高浓度的 DP IV，而且如上所述，已经发现 DP IV 抑制剂定量地被胃肠道吸收，预期使用 DP IV 抑制剂的前药化合物不会在该环境下有任何改进。

因此，非常令人惊奇地发现，与相应的未掩蔽的 DP IV 抑制剂相比，



根据本发明的 DP IV 抑制剂的前药显著增强了葡糖耐量实验中的葡糖耐量。如上所述，因为前药有可能在肠道中被其中存在的酶完全断裂，所述酶例如是二肽基肽酶，并象未掩蔽的抑制剂一样不会再被转运至目标部位处，所以该性质是特别令人惊奇的。

前药化合物被 DP IV 或者肠道中存在的其他酶断裂后，立即释放根据本发明的抑制剂，其按照与使用未掩蔽的抑制剂时完全相同的方式对 DP IV 进行抑制。因此，不再发生 DP IV 对前药化合物的分解；仍未分解的所有前药化合物或者另外引入的以及过量的（也就是说未结合在 DP IV 上的）未掩蔽抑制剂未分解地从胃肠道中通过进入身体的血管腔中。如上所述，在此它们可根据个体需要用作 DP IV 抑制剂。但是，在某些时间后，结合在肠道的 DP IV 上的抑制剂也被释放，并进入血管腔中。

因此，借助于根据本发明的前药化合物还可得到所希望的体内作用增加。

而且，DP IV 抑制剂释放的部位和它们作用的部位也可以通过基团 A—B 的性质来控制。

除二肽基肽酶 IV 以外，各种其他氨基肽酶，如焦谷氨酰基氨基肽酶和脯氨酰基氨基肽酶，也存在于哺乳动物的血液中。合适地选择基团 A—B，可根据本发明测定释放 DP IV 抑制剂的氨基肽酶，并因此确定抑制剂的作用发生在何处。根据本发明的前药化合物或者相应的药物组合物还因此可用于细胞、组织或者器官特异性 DP IV 抑制中。基团 A—B 也可进行选择，使得针对仅在血管中存在并以足够快的速率释放抑制剂的酶。

总之，通过本发明的 DP IV 抑制剂的前药化合物，可完全令人惊奇

地实现以下方面：

- 1、增加抑制剂的作用；
- 2、根据患者的需要释放抑制剂；
- 3、以暂时受控的方式从前药化合物中释放抑制剂；
- 4、控制从前药化合物中释放抑制剂的部位；
- 5、提高 DP IV 抑制剂的储存；以及
6. 从其未掩蔽的时间起精确地限定作用的持续时间或者引发剂作用的结束。

根据本发明还提供特别适用于口服给药的药物组合物，其特征在于包含至少一种根据本发明的前药化合物，并任选与常规载体或赋形剂组合。

根据本发明的前药化合物或者包含该化合物的药物组合物可用于治疗或预防哺乳动物中可通过调节哺乳动物的 DP IV 活性来治疗的疾病，令人人中的代谢紊乱。

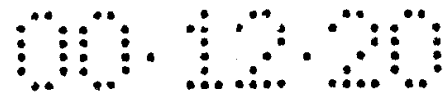
具体而言，所述化合物可用于治疗哺乳动物中的受损葡萄糖耐量、葡萄糖尿、高脂血、代谢酸中毒、糖尿病、糖尿病性神经病和肾病、以及糖尿病的后遗症。

实施例

1、合成根据本发明的前药化合物

1.1 合成 H-Pro-Ile-Thia/HCl

将 6.5 mM 的 Boc-Pro-Ile-OH (1 当量=1 eq.) 与 N-羟基苯并三唑



(1 eq.) 和噻唑烷 (1 eq.) 悬浮在 30 ml 二氯甲烷 (DCM) 中。在 -10°C 下加入等量的 1 M 二环己基碳化二亚胺溶液并搅拌。搅拌在 -10°C 下进行，然后在室温下过夜。在进行处理时，使溶液完全过滤掉沉淀出的二环己基脒，真空除去 DCM，然后将所得残留物溶解在乙酸乙酯中。乙酸乙酯溶液用饱和碳酸氢钠水溶液至少洗涤三次，用饱和氯化钠溶液洗涤一次，用稀释的硫酸氢钾溶液洗涤三次，然后再用氯化钠溶液洗涤。乙酸乙酯相在硫酸钠上干燥，然后使用旋转蒸发器浓缩，剩余的粗产物用乙酸乙酯/戊烷重结晶。在 4°C 下 1–2 天内结晶出 Boc-Pro-Ile-Thia (产率 80%)。在 Boc-Pro-Ile-Thia 中添加 1.1 N 盐酸/冰乙酸溶液 (3 ml 每 mmol 肽)。在室温下搅拌 2 小时，添加无水乙醚，然后使用旋转蒸发器蒸发掉过量的溶液。在 4°C 下盐酸盐从无水乙醚中定量结晶。用抽滤快速分离晶体，用无水乙醚洗涤几次，然后将产物储存在氢氧化钾或五氧化二磷的干燥器中。

1.2 合成 H-Gly-Pro-Ile-Thia/HCl

将 Boc-Gly-OH (1 eq.) 溶解在 20 ml 四氢呋喃 (THF) 中，冷却至 -10°C ，然后在搅拌下顺序添加 N-甲基吗啉 (1 eq.) 和氯甲酸异丁基酯 (1 eq.)。进行活化约 20 分钟。同时，将 Pro-Ile-Thia.HCl (1 eq.) 悬浮在 10 ml 的 THF 中，平衡至 -10°C ，然后添加 N-甲基吗啉 (1 eq.) 进行中和。活化时间完成后，将两种溶液混合在一起，1–2 个小时后加热至室温并搅拌过夜。在反应混合物中添加少量的水，然后真空除去 THF。残留物溶解在乙酸乙酯中，并用饱和碳酸氢钠水溶液至少洗涤三次，

用饱和氯化钠溶液洗涤一次，用稀释的硫酸氢钾溶液洗涤三次，然后再用氯化钠溶液洗涤。乙酸乙酯相在硫酸钠上干燥，使用旋转蒸发器浓缩，产物 Boc-Gly-Pro-Ile-噻唑烷化物用乙酸乙酯/戊烷重结晶（产率 85%）。类似于 H-Pro-Ile-Thia/HCl 的合成脱除 Boc。

表 2: 二肽基肽酶 IV 抑制剂的前药的分析数据

物质	计算的 MW (g/mol)	实测的 MW M+H ⁺	CE 纯度, 保留时间(Rt)	HPLC 纯度 Rt	熔点 °C
pGlu-Ile-Thia*HCl	349.84	314.8	4.2 min	10.4 min	30-40
Pro-Ile-Thia*HCl	335.90	300.8	4.5 min	10.05 min	45-69
Gly-Pro-Ile-Thia*HCl	392.94	357.8	4.6 min	8.8 min	111-121
Ile-Pro-Ile-Thia*HCl	449.05	413.6	5.6 min	10.0 min	98-107
Pro-Pro-Ile-Thia*HCl	433.01	397.6	5.3 min	11.35 min	101-118

分析条件:

HPLC 柱: LiChrospher 250-4, 100 RP-18.5 μ m, 温度 25°C

洗脱液: 30% ACN、0.1% TFA、等梯度, 流速 0.5 ml/min

检测波长: 210 nm

CE 毛细管: 30 cm \times 50 μ m 溶凝硅石, 温度 25°C

检测波长: 200 nm

注射: 5 秒, 50 mbar

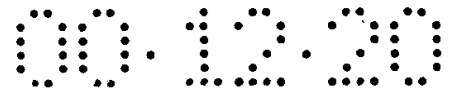
分离: 0.1 M 磷酸钠缓冲液, pH 2.5, 在 12 kV 下持续 7 分钟

2、各种肽、DP IV 抑制剂以及前药的转运以及与肽转运蛋白 PepT1 的亲 和性

通过放射活性标记底物 D-Phe-Ala 的置换分析各种肽、DP IV 抑制剂和 DP IV 抑制剂的前药与肽转运蛋白 PepT1 的亲合性 (AMASHEH, S., WENZEL, U., WEBER, W. M., CLAUSS, W., DANIEL, H., Electrophysiological analysis of the function of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol.* 504, 169-174 (1997))。其表明, 例如四肽衍生物 Ile-Pro-Ile-Thia 结合在转运蛋白 PepT1 上, 其方式可以与所选择的氨基酸衍生物相媲美或者更好, 而且与所选择的氨基酸和肽类似物相比, 其按照类似或更好的方式转运 (表 3)。

表 3: 各种氨基酸和肽衍生物在人肽转运蛋白 PepT1 上的转运性质

氨基酸或肽衍生物	电生理学分析 (在卵母细胞中进行的 hPEPT1 实验), 以 Gly-Gln 为对照(100%)的通量%	相对于 D-Phe-Ala 与 PepT1 的结合常数 mM
Lys-Phe	95	0.08
Lys-Phe-Pro	10	0.19
Asn-Pyr	30	3.01
Asn-Thia	83	0.50
His-Pry	7	5.34
His-Thia	12	0.57
Ile-Pyr	14	2.66
Ile-Thia	25	0.98
Ile-Pro-Ile-Thia	44	0.61



在人全血中活性 DP IV 抑制剂 Ile-Thia 从根据本发明的前药中的释放

根据本发明的 DP IV 抑制剂的前药，还可使 DP IV 抑制剂在目标腔室例如在血液循环中延迟释放。

例如图 1 所示，从根据本发明的前药化合物中释放抑制剂异亮氨酰噻唑烷化物可导致对人血 DP IV 的抑制，该抑制作用作为时间的函数经历了不同的过程。在例如 DP IV 本身（Pro-Pro-Ile-Thia=PPIThia，Gly-Pro-Ile-Thia=GPIThia）或者氨基肽酶（pGlu-Ile-Thia=pEIThia，Pro-Ile-Thia=PIThia）的实施例（图 1）中，可在血液中释放掩蔽的 DP IV 抑制剂。当使用相同浓度的前药化合物时，在血液中从前药化合物中释放 DP IV 抑制剂异亮氨酰噻唑烷化物的效率有差异，与 Pro-Ile-Thia（PI Thia）和 Gly-Pro-Ile-Thia（GPI Thia）相比，Pro-Pro-Ile-Thia（PPIThia）和 pGlu-Ile-Thia（pEIThia）时显示活性物质的释放显著延迟。

3、使用前药增加 DP IV 抑制剂赋予的葡糖耐量

将活性物质异亮氨酰噻唑烷化物转化为根据本发明的前药，其结果是在口服给药后在 Wistar 大鼠中观察到明显改善的作用曲线（图 2）。与未掩蔽的活性物质 Ile-Thia 相比，根据本发明的前药化合物使得在检查期间 DP IV 抑制剂所导致的血糖浓度下降增加约 30%（表 4）。

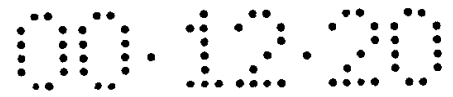


表 4: 在 p.o.血糖刺激期间和向 Wistar 大鼠 p.o.给药 Ile-Thia 或者根据本发明的前药（剂量：2.5 μ M 活性物质/300 g 动物）的血糖浓度关系

活性物质/前药	%血糖浓度
对照	100
Ile-Thia	74.4
Gly-Pro-Ile-Thia	57.1
Pro-Ile-Thia	56.1

说明书附图

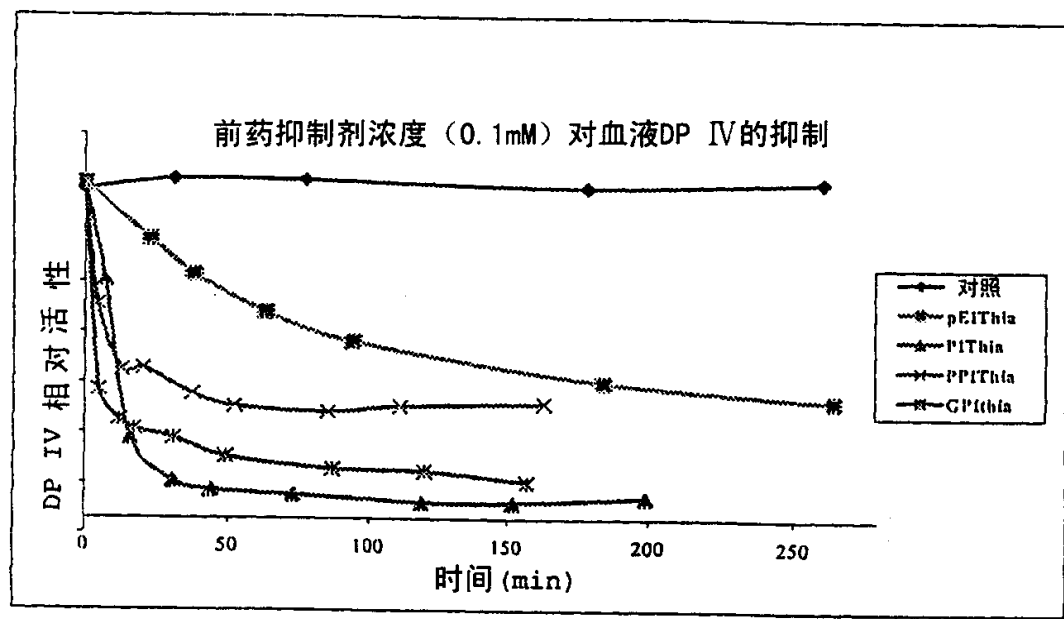


图1 从根据本发明的前药中释放的 DP IV 抑制剂 Ile-Thia 对全血中 DP IV 的抑制

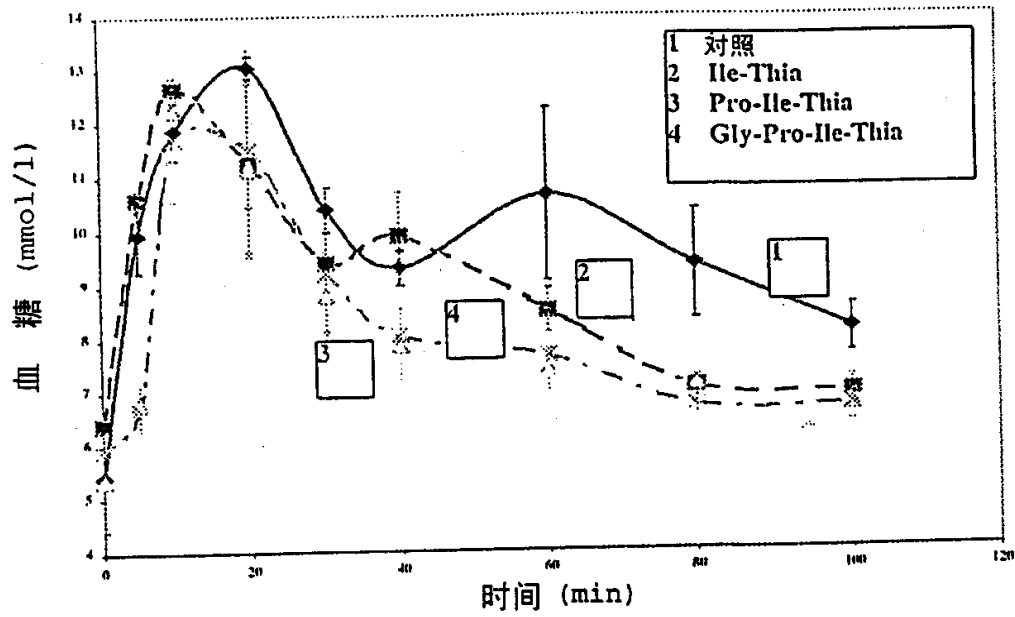


图2 在向 Wistar 大鼠口服葡萄糖刺激和口服给药前药后血清中的葡萄糖浓度