

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 14/725

C07K 14/47 A61K 38/08

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97192467.8

[43]公开日 1999年4月7日

[11]公开号 CN 1213379A

[22]申请日 97.2.18 [21]申请号 97192467.8

[30]优先权

[32]96.2.23 [33]GB [31]9603855.9

[32]96.10.5 [33]GB [31]9620819.4

[86]国际申请 PCT/GB97/00438 97.2.18

[87]国际公布 WO97/31023 英 97.8.28

[85]进入国家阶段日期 98.8.21

[71]申请人 曾尼卡有限公司

地址 英国英格兰伦敦

[72]发明人 R·科顿 P·N·埃瓦德斯

R·W·A·鲁克

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 齐曾度

权利要求书 5 页 说明书 78 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 肽衍生物

[57]摘要

本发明涉及式(I)的药学上有用的肽衍生物: $P-R^1-R^2-R^3-R^3$,其中P, R^1 , R^2 , R^3 和 R^3 具有本文所定义的各种含义;本发明也涉及所述肽衍生物的药学上可接受的盐和含有它们的药物组合物。这些新肽衍生物在治疗MHC II类依赖性T-细胞介导的自身免疫或炎症性疾病中是有价值的,所说的疾病例如风湿性关节炎。本发明还涉及制造所述新肽衍生物的方法以及这些化合物在医疗上的用途。

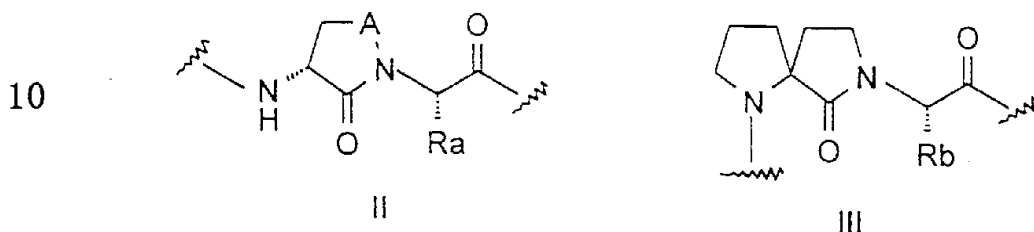
ISSN 1000-84274

权 利 要 求 书

1. 一种式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐: $P-R^1-R^2-R^3-R^4$, 其中

P 是疏水残基;

- 5 R^1 是 5 个 L-氨基酸的序列, R^3 是单个 L-氨基酸; 或者
 R^1 是 3 个 L-氨基酸的序列, R^3 是 3 个 L-氨基酸的序列;
 R^2 是式 II 或式 III 的基团



其中 Ra 和 Rb 分别选自氢和 (1-4C) 烷基, A 是亚甲基或氧; 并且

- 15 R^4 是 OH, NH_2 或 $NRcRd$, 其中 Rc 选自 (1-4C) 烷基、2-氨基甲酰基环戊基、2-吡啶甲基、4-氨基甲酰基环己基、4-氨基甲酰基环己基甲基、3-氨基甲酰苯基、4-氨基甲酰苯基、4-(氨基甲酰甲基)苯基、4-(羧甲基)苯基、4-(甲氧羰基甲基)-苯基、2-吗啉代乙基和式 $-A^1-G^1$ 的基团, 其中 A^1 是 (3-7C) 亚烷基或 A^1 选自

- 20 (1) 式 $-A^2-B^2-$ 的基团, 其中 A^2 是 p-亚苯基或 1, 4-亚环己基, B^2 是 (1-4C) 亚烷基, 或者 A^2 是亚甲基, B^2 是 p-亚苯基或 1, 4-亚环己基; 和
 (2) 式 $-A^3-B^3-C^3-$ 的基团, 其中 A^3 是亚甲基, B^3 是 p-亚苯基或 1, 4-亚环己基, 且 C^3 是 (1-3C) 亚烷基; 并且

- 25 G^1 是式 $-N=C[N(Rp)_2]_2$ 的基团, 其中各个 Rp 分别选自氢、甲基、乙基和丙基; 或者

A^1 是式 $-A^4-B^4-$ 的基团, 其中 A^4 是 p-亚苯基, B^4 是 $-CH_2-CO-$, 且 G^1 是 2-吗啉代乙基或 4-[2-(2-羟乙氧基)乙基]哌嗪-1-基;

和 Rd 是氢或 (1-4C) 烷基; 或者

- 30 R^4 是 1-哌嗪基、4-甲基-1-哌嗪基、4-咪基-1-哌嗪基、4-(2-(2-羟乙氧基)乙基)-1-哌嗪基、1-哌啶基或 4-取代的-1-哌啶基, 其中 4-取代基选自羧基、氨基甲酰基、N-(2-氨基乙基)氨基甲酰基和 N-(4-氨基丁基)氨基甲酰基; 或者

R⁴是1-6个氨基酸的序列或其酰胺。

2. 如权利要求1所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中P是5-20个碳原子的脂肪族、芳香族或混合脂肪族/芳香族有机基团, 或者5-20个碳原子和1、2或3个选自氧、硫和氮的杂原子的杂芳香族或混合脂肪族/杂芳香族有机基团。

3. 如权利要求1或2所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中R⁴是OH、NH₂或NRcRd, 其中Rc选自(1-4C)烷基、2-氨基甲酰环戊基、2-吡啶甲基、4-氨基甲酰环己基、4-氨基甲酰基环己基甲基、3-氨基甲酰苯基、4-氨基甲酰苯基、4-(氨基甲酰甲基)苯基、4-(羧甲基)苯基、2-吗啉代乙基和式-A¹-G¹的基团, 其中A¹是(3-7C)亚烷基或A¹选自

(1)式-A²-B²-的基团, 其中A²是p-亚苯基或1, 4-亚环己基, B²是(1-4C)亚烷基, 或者A²是亚甲基, B²是p-亚苯基或1, 4-亚环己基; 和

(2)式-A³-B³-C³-的基团, 其中A³是亚甲基, B³是p-亚苯基或1, 4-亚环己基, 且C³是(1-3C)亚烷基; 并且

G¹是式-N=C[N(Rp)₂]₂的基团, 其中各个Rp分别选自氢、甲基、乙基和丙基;

且Rd是氢或(1-4C)烷基; 或者

R⁴是1-哌嗪基、4-甲基-1-哌嗪基、4-咪基-1-哌嗪基、4-(2-(2-羟乙氧基)乙基)-1-哌嗪基、1-哌啶基或4-取代的-1-哌啶基, 其中4-取代基选自羧基、氨基甲酰基、N-(2-氨基乙基)氨基甲酰基和N-(4-氨基丁基)氨基甲酰基; 或者

R⁴是1-6个氨基酸的序列或其酰胺。

4. 如权利要求1、2或3所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中P是5-20个碳原子的脂肪族、芳香族或混合脂肪族/芳香族有机基团: 包括R¹和R³在内的L-氨基酸独立地选自Ala、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Asn、Gln、Arg、Thr和Val;

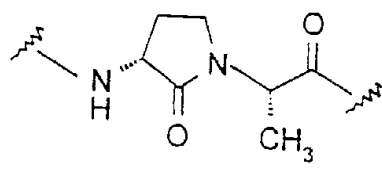
并且R⁴是OH、NH₂、NHRc, 其中Rc选自(1-4C)烷基、2-氨基甲酰环戊基、2-吡啶基甲基、4-氨基甲酰环己基、4-氨基甲酰环己基甲基、3-氨基甲酰苯基、4-氨基甲酰苯基、4-(氨基甲酰甲基)苯基; 或者R⁴是1-哌嗪基、4-甲基-1-哌嗪基、4-咪基-1-哌嗪基、1-哌啶基或4-取代的-1-哌啶基, 其中4-取代基选自羧基、氨基甲酰基、N-(2-氨基乙基)

氨基甲酰基和 N-(4-氨基丁基)氨基甲酰基; 或者 R⁴ 是 1-6 个氨基酸的序列或其酰胺。

5. 如权利要求 1、2 或 3 所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R¹ 是由 AA1-AA2-AA3-AA4-AA5 代表的 5 个 L-氨基酸的序列, 其中
- 5 AA1 选自 Ala、Ile、Tyr、Val、Glu、Lys、Arg、Gly、Gap、GapMe₄ 和 3, 3, 3-三氟丙氨酸;
- AA2 选自 Ala、Lys、Glu、Sar、Val、Arg、Gly、Pro、Ile、Tic、3, 3, 3-三氟丙氨酸和 N⁶-二乙基 Lys;
- AA3 选自 Ala、His、Gln、Val、Thr、Glu、Gly、Asp、Asn 和 N³-二乙基 Dap;
- 10 AA4 选自 Ala、Lys、Asn、Arg、Thr、Gln、Sar、Gly、Pro、His 和 N⁶-二乙基 Lys;
- AA5 选自 Thr、Val、Ala、Gly、Dap、Dab、Pro、Hyp、Asn 和 N³ 二乙基 Dap; 和
- 15 R³ 是选自 Ala、Gly、Dap、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸的单个氨基酸。

6. 如权利要求 1、2 或 3 所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R¹ 是由 AA1-AA2-AA3 代表的 3 个 L-氨基酸的序列, 其中
- AA1 选自 Ala、Ile、Tyr、Val、Glu、Lys、Arg、Gly、Gap、GapMe₄ 和 3, 3, 3-三氟丙氨酸;
- 20 AA2 选自 Ala、Lys、Glu、Sar、Val、Arg、Gly、Pro、Ile、Tic、3, .3, 3-三氟丙氨酸和 N⁶-二乙基 Lys; 和
- AA3 选自 Ala、His、Gln、Val、Thr、Glu、Gly、Asp、Asn 和 N³-二乙基 Dap;
- 并且 R³ 选自由 AA6-AA7-AA8 代表的 3 个 L-氨基酸的序列, 其中
- 25 AA6 选自 Gly、Leu、Lys、Ala、Pro、Glu、Sar、His 和 Dap;
- AA7 选自 Pro、Ala、Lys、Arg、Glu、Sar、Gly、Oic 和 Dic; 和
- AA8 选自 Ala、Gly、Dap、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸。

7. 如以上权利要求之任一所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R² 是式 IIb 的基团



IIb

5

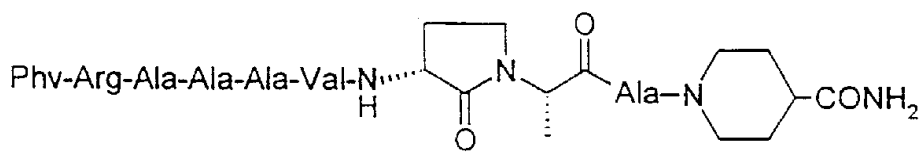
8. 如以上权利要求之任一所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中疏水基团 P 是 5-苯基戊酰基。

9. 如以上权利要求之任一所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R⁴ 是 4-氨基甲酰基-1-哌啶基, 4-(氨基甲酰甲基)苯胺基或 4-(2-胍乙基)苯胺基。

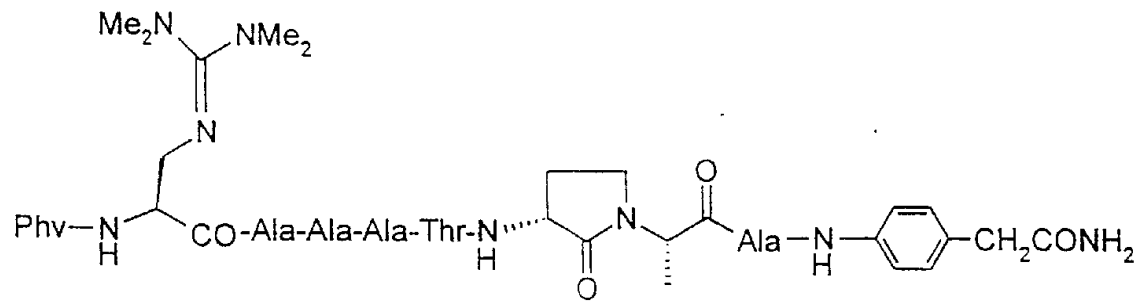
10

10. 如权利要求 1 所要求的肽衍生物或其药学上可接受的盐, 其选自

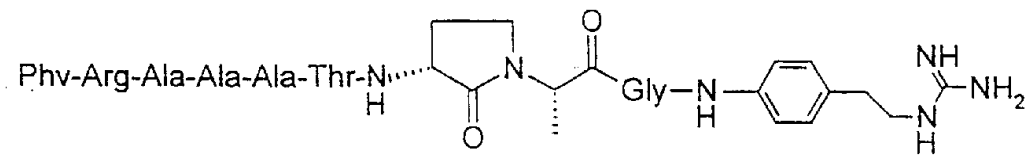
自



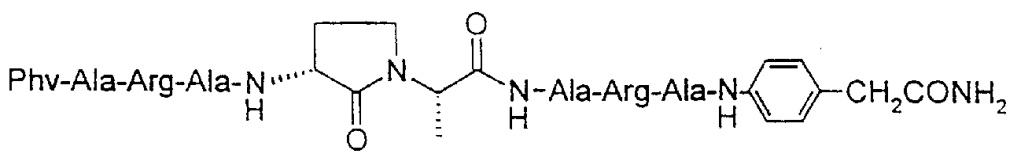
15



20

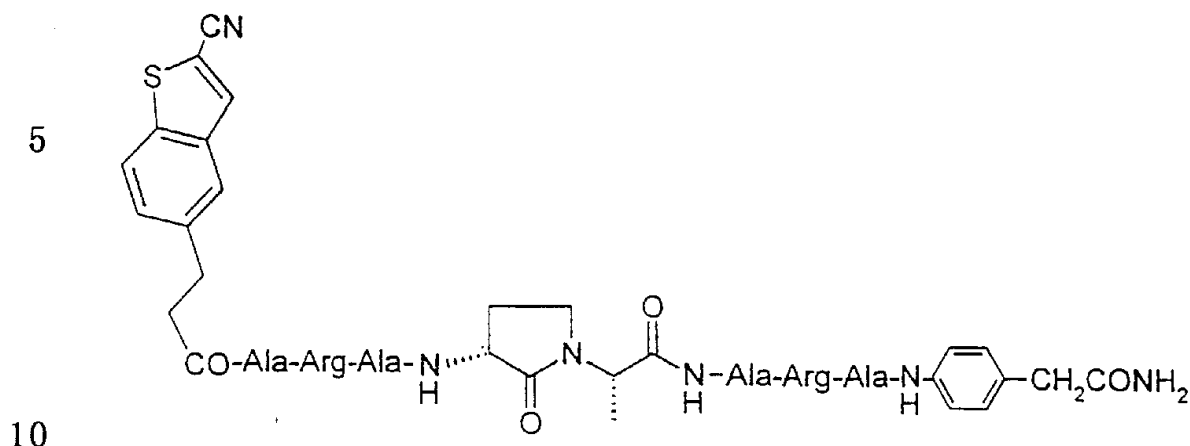


25



30

和



或它们的药学上可接受的盐，其中 Phv 代表 5-苯基戊酰基团。

11. 一种药物组合物，该组合物包含与药学上可接受的稀释剂或载体组合的

式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐。

12. 一种制备如权利要求 1 所要求的肽衍生物或其药学上的可接受的盐的方法，该方法包括以适当的次序偶联适当保护的氨基酸或者两个或多个适当保护的氨基酸的序列、适当保护的式 H-II-OH 或 H-III-OH 的基团和可有可无的适当保护的式 R³-H 的基团，接着可以也可以不进行 N 端氨基的官能团修饰，以引入疏水基团 P，并除去任何保留的保护基和任何固相载体。

13. 一种治疗 MHCII 类依赖性 T-细胞介导的自身免疫或炎症性疾病的方法，该方法包括向需要这种治疗的温血哺乳动物施用有效量的式 I 的肽衍生物或其药学上的可接受的盐。

14. 如权利要求 14 的方法，其用于治疗类风湿性关节炎或多发性硬化。

15. 式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐在生产新药物上的用途，所说的新药物是用于治疗 MHCII 类依赖性 T-细胞介导的自身免疫或炎症性疾病的药物。

说明书

肽衍生物

5 本发明涉及某些新肽衍生物，这些新肽衍生物具有在用于治疗自身免疫病或病态中有用的药理学性质，所说的疾病如类风湿性关节炎和其它 MHCII 类依赖性 T-细胞介导的疾病。本发明也包括所说的新化合物的药物组合物、它们的制备方法、以及它们在治疗一种或多种前述疾病或病态上或者在产生用于这些医学治疗中的新的药物上的用途。

10 人免疫应答的刺激依赖于 T 细胞对蛋白质抗原的识别。然而，T 细胞不能对抗原单独地作出反应仅当抗原与抗原传递细胞表面上的主要组织相容性复合物 (MHC) 分子复合时，触发，所说的细胞如 B 细胞，巨噬细胞或树状细胞。

15 MHCI 类分子激发 T-杀伤细胞应答，这一应答导致携带抗原的细胞的破坏。MHCII 类分子激发 T-辅助细胞应答，这一应答控制选择的 B 细胞的扩展和成熟(即产生抗原-特异性抗体)和巨噬细胞的活化。

20 对免疫系统关键性的要求是区别“自身”和“非自身”(即外源)抗原的能力。为了使免疫系统能够对侵入的外源病原体作出反应而保持耐受自身蛋白质，从而防止对正常组织的损害，这一区别能力是所要求的。当自身-耐受出现障碍，使免疫系统对自身组织发生反应时，就发生自身免疫病，所说的自身组织例如类风湿性关节炎中的关节。人们认为，保持所说的耐受并由此避免发生自身免疫病关键取决于 MHC 分子的功能。

25 许多自身免疫病与特定的 MHC 等位基因的遗传相关联的观察结果说明 MHC 分子在自身免疫病的发病机理中的关键作用。例如，多发性硬化与 HLA-DR2 的遗传相关联，胰岛素依赖性糖尿病与 HLA-DR3 和/或 HLA-DR4 相关联，桥本氏甲状腺炎与 HLA-DR5 相关联。具体地说，特别强的关联存在于发生慢性炎症性关节疾病类风湿性关节炎的素因和 HLA-DR4Dw4 和/或 HLA-DR4w14 和/或 HLA-DR1 的遗传之间。人们认为，
30 自身免疫病相关的 MHC 分子结合某些自身抗原，并将它们传递到 T 细胞，由此刺激自身免疫应答。以下肽可以特异性地抑制自身免疫应答：能够结合自身免疫相关 MHC 分子和/或阻止结合或转移已经结合的自身

-抗原, 和/或抑制 T 细胞活化(尤其是病原性 T 细胞(例如 Th1 细胞)的活性), 和/或提高保护性 T 细胞(例如 Th2 细胞)的活性的肽, 或者以另一种作用机制与 MHC 分子相互作用, 以阻止或改变经所说的 MHC 分子介导的自身免疫应答的刺激作用的肽。

5 这一类的药剂会对自身免疫病提供治疗, 而避免对免疫系统的总的抑制, 由此限制有害的副作用。所描述的这一类药剂会有超过疾病(如类风湿性关节炎)的现行治疗法的明显的优点。当代的实践是首先用症状缓解剂(如 NSAIDs)治疗类风湿性关节炎, 所说的缓解剂对疾病发展确实不具有任何有益的效果, 并且经常与不希望的副作用相联系。更严重的疾病的治疗依赖于使用所谓的二线药剂。这些通常是一般的细胞毒性化合物, 它们具有有限的功效, 并且可以产生严重的毒性问题。因此, 一种有合理基础的没有相关的非特异性细胞毒性的疾病缓和剂在类风湿性关节炎的治疗中将提供明显的益处。

15 国际专利申请出版物 W092/02543, W093/05011 和 W095/07707 中公开了结合 MHC 分子并且抑制 T-细胞活化的一些肽。

虽然已发现通过结合 HLA-DR 分子抑制 HLA-DR 限制的 T 细胞活化的大量肽, 但仍然需要一些可替的化合物, 这些化合物结合这些分子和/或阻止结合或转移已经结合的自身-抗原和/或抑制 T 细胞活化和/或提高保护性 T 细胞的活性, 或者以另一种作用机制与 MHC 分子相互作用, 以阻止或改变引起以上提及的疾病和病态的自身免疫应答的刺激作用。

20 我们已发现, 本发明的肽衍生物(以下指出)惊人地具有这样的药理学上有用的性质, 并且这是本发明的基础。

按照本发明的一个方面, 本发明提供了一种式 I(在以下给出)的肽衍生物或其药学上可接受的盐

其中

P 是疏水残基; R^1 是 5 个 L-氨基酸的序列, R^3 是单个 L-氨基酸; 或者 R^1 是 3 个 L-氨基酸的序列, R^3 是 3 个 L-氨基酸的序列;

30 R^2 是式 II(在以下给出)或式 III(在以下给出)的基团, 其中 R_a 和 R_b 分别选自氢和(1-4C)烷基, A 是亚甲基(CH_2)或氧; 并且

R^4 是 OH、 NH_2 或 $NRcRd$, 其中 Rc 选自(1-4C)烷基、2-氨基甲酰环戊基、2-吡啶甲基、4-氨基甲酰环己基、4-氨基甲酰环己甲基、3-氨基甲酰

苯基、4-氨基甲酰苯基、4-(氨基甲酰甲基)苯基、4-(羧甲基)苯基、4-(甲氧羰基甲基)-苯基、2-吗啉代乙基和式-A¹-G¹的基团，其中A¹是(3-7C)亚烷基或A¹选自

5 (1)式-A²-B¹-的基团，其中A²是p-亚苯基或1,4-亚环己基，B¹是(1-4C)亚烷基，或者A²是亚甲基，B¹是p-亚苯基或1,4-亚环己基；和

(2)式-A³-B³-C³-的基团，其中A³是亚甲基，B³是p-亚苯基或1,4-亚环己基，且C³是(1-3C)亚烷基；并且

G¹是式-N=C[N(Rp)₂]₂的基团，其中各个Rp分别选自氢、甲基、乙基和丙基；或者

10 A¹是式-A⁴-B⁴-的基团，其中A⁴是p-亚苯基，B⁴是-CH₂-CO-，且G是2-吗啉代乙基或4-[2-(2-羟乙氧基)乙基]哌嗪-1-基；

和Rd是氢或(1-4C)烷基；或者

15 R⁴是1-哌嗪基、4-甲基-1-哌嗪基、4-脒基-1-哌嗪基、4-(2-(2-羟乙氧基)乙基)-1-哌嗪基、1-哌啶基或4-取代的-1-哌啶基，其中4-取代基选自羧基、氨基甲酰基、N-(2-氨基乙基)氨基甲酰基和N-(4-氨基丁基)氨基甲酰基；或者

R⁴是1-6个氨基酸的序列或其酰胺。

要理解的是，R⁴的氨基酸可以分别具有D-或L-立体化学构型。此外，当R⁴被定义为羟基(OH)时，应理解为是R³的C端氨基酸的羟基。

20 同样地，当R⁴被定义为NH₂、NRcRd、哌嗪基、哌啶基等时，其意指R³的C端氨基酸羟基被这样一种基团取代。也要理解，当提到氨基酸时，其意指α-氨基酸。也要理解的是，当提到L-氨基酸时，其也包括象Gly、2,2-二乙基Gly、氮杂-丙氨酸和氮杂-甘氨酸在内的没有手性碳原子的一些氨基酸。还要理解的是，当碳数量允许时，如“烷基”一类的术语包括直链和支链异构体。相同的规定适用于其它基团。

25 本领域熟知，具有手性中心的化合物可以以外消旋体(或在具有一个以上手性中心时以非对映异构体的混合物)形式存在或以有旋光活性的对映体或非对映异构体形式存在。本领域也熟知，与外消旋或非对映体混合物相联系的特殊的生物活性可以大量地或单独地从单个有旋光活性的异构体产生。因此，可以理解，本发明涉及式(I)的肽衍生物的任何形式，其具有上述药学上有用的性质。本领域熟知如何获得单一的有旋光活性的异构体，例如通过利用常规技术(如层析)从包含异

构体的外消旋或非对映体混合物中分离，或者通过利用适当的有旋光活性的起始物质或中间体手性合成，正如本文所列举的。本领域也熟知如何测定这样的外消旋或非对映体混合物和单一的有旋光活性的异构体的药理学性质，例如利用本文所描述的测定法测定。因此本领域技术人员能够容易地获得具有本文提及的有益的药理学性质的式 I 的肽衍生物的特定的异构体。

也要理解的是，本发明也包括具有本文提及的有益的药理学性质的式 I 的肽衍生物的任何多态形式，任何互变异构体或任何溶剂化物，或它们的任何混合物。

10 包括 R^1 和 R^3 在内的 α -氨基酸的合适的各个氨基酸包括，例如，由遗传密码编码的 20 种天然存在的氨基酸，特别是丙氨酸 (Ala)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、赖氨酸 (Lys)、天冬酰胺 (Asn)、谷氨酰胺 (Gln)、精氨酸 (Arg)、苏氨酸 (Thr)、缬氨酸 (Val) 和脯氨酸 (Pro)。氨基酸如肌氨酸 (Sar)、3, 3, 3-三氟丙氨酸、2, 2-二乙基甘氨酸、2, 3-二氨基丙酸 (Dap)、2, 4-二氨基丁酸 (Dab)、2-氨基丁酸 (Abu)、高精氨酸、高苯基丙氨酸、反式-4-羟基脯氨酸 (Hyp)、氮杂-丙氨酸 [$H_2N-N(CH_3)-COOH$; Azala]、氮杂-甘氨酸 [$H_2N-NH-COOH$; Azgly]、1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸 (Tic)、八氢吲哚-2-羧酸 (Oic)、十氢异喹啉-3-羧酸 (Dic) 是也合适的 (在提及 Dic 时，其意指这样的形式，其中在环的连接处两者具有 R 构型或两者具有 S 构型)。也可以利用相应的 N^2 -甲基化的氨基酸，以及这样的相应的氨基酸，其中一个游离的侧链羧酸官能团是酯化的 (例如，以 (1-6C) 烷基或苄基酯形式)，并且一个游离的侧链氨基是烷基化的 (例如，甲基化的)、乙酰化的或被转化成氨基甲酸酯 (例如，氨基甲酸烷基酯 (例如甲酯或乙酯，苯酯或苄酯))。 R^1 和 R^3 的其它合适的氨基酸包括，例如，2-取代的甘氨酸，其中 2-取代基是式 $-(CH_2)_sNH_2$ 的基团，其中 s 是 1-3; 或式 $-(CH_2)_pN(Re)_3^+ \cdot X^-$ 的基团，其中 p 是 2-4, X^- 是反离子 (如乙酸根，三氟乙酸根，氢氧根或氯离子); 或式 $-(CH_2)_qN(Re)_2$ 的基团，其中 q 是 0-4; 或式 $-(CH_2)_rN=C[N(Re)_2]_2$ 的基团，其中 r 是 1-4, 在这些基团中，最后 3 个基团的各 Re 分别选自氢和 (1-4C) 烷基 (例如甲基或乙基)。

当 R^1 是 5 个氨基酸的序列时，其特别重要的序列包括，例如其中第五个 (从左向右阅读) 氨基酸是 Val 或 Thr 的序列，和其中第四个和

第五个氨基酸是 Lys-Val, Arg-Val, Lys-Thr, Arg-Thr, Ala-Val 或 Ala-Thr 的序列。

当 R^1 是 5 个氨基酸的序列时, 其特别的序列包括, 例如 Ala-Ala-Ala-Lys-Val、Ala-Lys-Ala-Ala-Val、Ala-Ala-Ala-Arg-Val、Ala-Arg-Ala-Ala-Val、Ala-Lys-Ala-Lys-Val、Ala-Arg-Ala-Arg-Val、Ala-Arg-Ala-Lys-Val、Ala-Lys-Ala-Arg-Val、Ile-Ala-Ala-Arg-Thr、Arg-Ala-Ala-Ala-Val、Arg-Ala-Ala-Ala-Thr、Ala-Ala-Ala-Arg-Thr、Ala-Arg-Ala-Arg-Thr、Ala-Ile-Ala-Arg-Val、Ala-Arg-Ala-His-Val、Ala-Arg-Ala-Ala-Thr、Ala-Ala-Asn-Arg-Val 或 X-Ala-Ala-Ala-Thr, 其中 X 是 $-\text{NH}\cdot\text{CH}[\text{CH}_2\text{NH}\cdot\text{C}(=\text{NH})\cdot\text{NH}_2]\cdot\text{CO}-$ (此后称为 "Gap"), 或 $-\text{NH}\cdot\text{CH}(\text{CH}_2\text{N}=\text{C}[\text{N}(\text{CH}_3)_2]_2)\cdot\text{CO}-$ (此后称为 "GapMe₄"), 在这些基团中, Ala-Ala-Ala-Lys-Val、Arg-Ala-Ala-Ala-Val、Arg-Ala-Ala-Ala-Thr、Ala-Ala-Ala-Arg-Thr、Ala-Arg-Ala-Arg-Thr、Gap-Ala-Ala-Ala-Thr 和 GapMe₄-Ala-Ala-Ala-Thr 是优选的。Arg-Ala-Ala-Ala-Val 和 Arg-Ala-Ala-Ala-Thr 是特别优选的。

当 R^1 是 3 个氨基酸的序列时, 其特别重要的序列包括, 例如其中与 R^2 邻接的氨基酸是 Ala 的序列, 其中第二个和第三个氨基酸 (从左至右阅读) 是 Lys-Ala, Arg-Ala, Ile-Ala 和 Ala-Ala 的序列。

当 R^1 是 3 个氨基酸的序列时, 其特别重要的序列包括, 例如, Ala-Lys-Ala、Ala-Arg-Ala、Arg-Ala-Ala、Arg-Ile-Ala 和 Ile-Arg-Ala, 尤其是 Ala-Arg-Ala。

当 R^3 是 3 个氨基酸的序列时, 其特别重要的序列包括, 例如, 其中第一个氨基酸 (从左至右阅读, 即与 R^2 邻接) 是 Ala 或 Leu 的序列。

当 R^3 是 3 个氨基酸的序列时, 其优选的序列包括, 例如, Ala-Ala-Ala, Leu-Arg-Ala, 尤其是 Ala-Arg-Ala。

当 R^3 是单个氨基酸时, 其优选的氨基酸包括, 例如, Ala, Gly 和 Azgly, 尤其是 Ala。

当 R_a 和 R_b 是烷基时, 其特别的基团包括, 例如, 甲基, 乙基和丙基。

R_a 和 R_b 的优选的基团包括, 例如, 氢和甲基。

疏水残基 P (最好是连接到 R^1 的 N 端氨基酸的氨基上) 的合适的基团包括例如, 有机疏水基团如 5-20 个碳原子 (对包含杂芳香族的基团

有选自氧、硫和氮的 1、2 或 3 个杂原子)的疏水脂肪族, 芳香族, 杂芳香族或混合脂肪族/芳香族或脂肪族/杂芳香族有机基团, 例如式 R-、R·CO-、R·SO₂-、R·O·CO-、R·NHCO-、R·O·CS-、R·S·CO-、R·NHCS-、R·S·CS-和 R·CS-基团, 其中 R 包括, 例如, (5-10C)烷基、芳基、杂芳基、芳基(2-10C)烷基、杂芳基(2-10C)烷基、二芳基(2-8C)烷基、芳基(2-10C)烯基、芳基环丙基、(5-10C)环烷基、(5-10C)环烷基(2-6C)烷基、3-联苯基、4-联苯基、4-环己基苯基、2-萘氧甲基、3-萘氧甲基、苯氧苯基和 R 可以携带一个或多个(1-4C)烷基、卤素、氰基或(1-4C)烷氧基取代基的四氢萘基、芳基或杂芳基。本发明的一个特定的实施方案包括, 例如, 其中 P 是如以上定义的 R·CO-的式 I 的肽衍生物。本发明的另一个特定的实施方案包括, 例如, 其中 P 是 5-20 个碳原子的疏水脂肪族、芳香族或脂肪族/芳香族有机基团的式 I 的肽衍生物。

R 特别的基团包括, 例如, 当它是(5-10C)烷基时: 戊基、异戊基、叔戊基、2-甲基戊基、己基、异己基、5-甲己基和辛基; 当它是芳基时: 苯基、萘基和茚基; 当它是杂芳香基时: 2-, 3-, 5-或 6-吡啶基、2-, 3-, 5-or6-二氢吡啶基、2-, 3-, 5-或 6-苯并[b] 苯硫基(2-, 3-, 5-or 6-Beno[b]thiophenyl)基、噻吩基、2-, 4-或 5-苯并噻唑基、2-, 4-或 5-苯并恶唑基、2-, 4-或 5-苯并咪唑基、连接在 2-, 3-, 6-或 7-位上的 1, 4-苯并二氧六环基、2-, 3-, 5-或 6-苯并咪喃基; 当它是芳基(2-10C)烷基时: 芳基(2-6C)烷基(其中芳基部分包括, 例如, 以上给出的芳基的任何特别的基团, (2-6C)烷基部分包括, 例如, 亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基和五亚甲基)、如 2-苯乙基、3-苯丙基、4-苯丁基和 5-苯戊基; 当它是杂芳基(2-10C)烷基时: 杂芳基(2-6C)烷基(其中杂芳基部分包括, 例如, 以上给出的杂芳基的任何特别的基团, (2-6C)烷基部分包括, 例如, 亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基和五亚甲基)、如 2-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基)乙基; 当它是二芳基(2-8C)烷基时: 二芳基(2-6C)烷基, 如, 2, 2-二苯乙基、3, 3-二苯丙基和 4, 4-二苯丁基; 当它是芳基(2-10C)烯基时: 芳基(2-6C)烯基, 如苯乙烯基、3-苯基丙烯-2-基和 4-苯基丁烯-1-基; 当它是芳基环丙基时: 苯基环丙基、1-萘基环丙基、2-萘基环丙基; 当它是(5-10C)环烷基时: 环戊基、环己基和 1-金刚烷基; 并且当它是(5-10C)环烷基(2-6C)烷基时: 2-(环己基)乙基、3-(环己基)丙基

和 4-(环己基)丁基。R 的芳基上的取代基的特别的基团包括, 例如, 甲基、乙基、氯、溴、碘、甲氧基、乙氧基和氰基。

5 疏水残基 P 也包括, 例如, 疏水性 L-氨基酸, 如苯丙氨酸(Phe)和其氢化的类似物, 如环己基丙氨酸(Cha)、对-氯 Phe、3-(2-噻吩基)丙氨酸、酪氨酸(Tyr)、Tyr(O 甲基)、色氨酸(Trp)、二苯基丙氨酸、3-(1-萘基)丙氨酸、3-(2-萘基)丙氨酸和其氢化的类似物、3-(1-金刚烷基)丙氨酸(Ada)、Glu(O 苯甲基)、3-(苄氧基)Ala、3-(苄硫基)Ala 和 9-苄基 Gly, 它们各自在 N-端可以携带或不携带如以上定义的或例举的疏水脂肪族、芳香族、杂芳香族或混合的脂肪族/芳香族或脂肪族/杂芳香族有机基团。此外, 所说的疏水性氨基酸可以携带或不携带, 例如, 选自以上所限定的 R¹ 和 R³ 的任何序列的 1-3 个氨基酸的其它序列。例如 P 包括特定的序列 Ala-Cha、Ala-Ala-Cha、Tyr-Ala-Ala-Cha、Tyr-Ala-Ala-Phe、Ala-Phe-Phe-Phe 和 Ala-Ala-Ala-Phe。这种 1-3 个氨基酸的其它序列的第一个(从左至右阅读)氨基酸可以是 L-或 D-氨基酸, 并且也可以携带或不携带如以上限定的或例举的疏水脂肪族, 芳香族, 杂芳香族或混合的脂肪族/芳香族或脂肪族/杂芳香族有机基团。

20 P 的其它特别的基团包括, 例如, 3-(苄氧羰基)丙酰基-Phe、3-(苄氧羰基)丙酰基-Cha、4-(苄氧羰基)丁酰基-Phe、4-(苄氧羰基)丁酰基-Cha、(5-氧代-吡咯烷-2-基)羰基-Phe-Tyr、(5-氧代-吡咯烷-2-基)羰基-Glu(O 苄基)-Tyr、乙酰基-Glu(O 苄基)-Tyr、二苯甲基·CONH·CH₂CH₂·CO-Cha、二苯甲基·CONH·CH₂CH₂·CO-Tyr、二苯甲基·CONH·CH₂CH₂CH₂·CO-Cha、二苯甲基·CONH·CH₂CH₂CH₂·CO-Tyr、二苯甲基·NHC·CH₂CH₂CH₂·CO-Cha、二苯甲基·NHC·CH₂CH₂CH₂·CO-Tyr、苄基·NHC·CH₂CH₂·CO-Cha、苄基·NHC·CH₂CH₂·CO-Tyr、N-乙酰基-4-氯-β-羟基 Phe、4-苄氧苄基·NHC·、苄基·NHC·CH₂CH₂·CO·(N-甲基 Phe)、苄基·NHC·CH₂CH₂·CONH·CH(CHPh₂)·CO、苄基·NHC·CH₂CH₂·CO-Tyr、3, 3-二苯基丙酰、反式-肉桂酰基、5-苄基戊酰基和 3-(2-氰基苯并[b]噻吩-5-基)丙酰基。

30 P 的特别重要的基团包括, 例如, Ph·(CH₂)₄·CO-(5-苄基戊酰基(Phv))、Ph·(CH₂)₄·CS-和 3-(2-氰基苯并[b]噻吩-5-基)丙酰基。

P 疏水残基的更优选的基团包括, 例如, 3-(2-氰基苯并[b]噻吩-5-

基)丙酰基和 5-苯基戊酰基(Phv), 尤其是后者。

当 Rc 是式 $-A^1-G^1$ 时, A^1 的特别的基团, 当它是亚烷基时包括, 例如, 亚甲基、亚乙基、亚丙基和亚丁基; G^1 特别的基团, 当是 (1-4C) 亚烷基时包括, 例如, 亚甲基、亚乙基和亚丙基; C^3 的特别的基团, 当它是 (1-3C) 亚烷基时包括, 例如, 亚甲基、亚乙基和亚丙基。

$-A^1-G^1$ 特别的基团包括, 例如, 3-胍丙基、4-(2-胍乙基)苯基、4-(2-吗啉代乙基-NH-CO-CH₂)苯基和 4-(4-[2-(2-羟乙氧基)乙基]哌嗪-1-基-CO-CH₂)苯基。

R^4 的特别的基团, 当它是 1-6 个氨基酸的序列或其酰胺时包括, 例如, 分别选自以上所限定的 R^1 和 R^3 的任何序列的 L-氨基酸的序列 (如 Ala-Thr-Gly-OH), 或它们的 D-类似物, 或包含 D-和 L-氨基酸两者的序列, 或其酰胺, 如从氨衍生的酰胺, (1-4C) 烷基胺 (如甲基胺或二 (1-4C) 烷基胺 (如二甲基胺)。一组特别的 R^4 的基团包括, 例如, 本文所限定的基团, 其中 R^4 不是 1-6 个氨基酸的序列。

R^4 的优选的基团包括, 例如, 4-氨基甲酰基-1-哌啶基 (哌啶-4-碳酰胺)(carboxamide) (Pip-NH₂) 的残基)、4-羧基-1-哌啶基 (哌啶-4-羧酸 (Pip-OH) 的残基)、4-(氨基甲酰甲基)苯胺基 (4-氨基苯基乙酰胺 (Papa-NH₂) 的残基)、4-(羧甲基)苯胺基 (4-氨基苯基乙酸 (Papa-OH) 的残基) 和 4-(2-胍乙基)苯胺基 (2-(4-氨基苯基)乙基胍 (Pape-NHC(=NH)NH₂) 的残基)。

一组特别的 R^4 的基团包括, 例如, Pip-NH₂、Papa-NH₂、Pape-NHC(=NH)NH₂ 和 NHRc, 其中 Rc 是 3-胍丙基, 2-吗啉代乙基或 4-(2-(2-羟乙氧基)乙基)-I-哌嗪基。

R^2 的优选的基团包括, 例如, 式 II, 尤其是 IIa, 更优选的是 IIb 的基团。

优选的一组式 I 的肽衍生物包括, 例如, 其中 R^1 是五个 L-氨基酸的序列和 R^3 是单个 L-氨基酸的肽衍生物。其中序列 R^1 和 R^3 具有以上限定的任何序列, 包括 R^1 和 R^3 的特别的和优选的序列。在这一组内, 特别优选的肽衍生物的一个亚组包括, 例如, 其中 R^2 是式 II, 尤其是 IIa, 更优选的是 IIb 的基团的那些。特别优选的肽衍生物的另一亚组包括, 例如, 其中 R^4 是 -Pip-OH、-Pip-NH₂、-Papa-OH 或 Papa-NH₂ 的那些。所说化合物的一个特别优选的亚组包括, 例如, 其中 R^3 与 R^4 一起

是 Ala-Pip-NH₂ 或 Ala-Papa-NH₂ 的那些。

本发明的另一组优选的肽衍生物包括，例如，其中 R¹ 是由 AA1-AA2-AA3-AA4-AA5 所代表的 5 个 L-氨基酸的序列的那些，其中：

5 AA1 选自 Ala、Ile、Tyr、Val、Glu、Lys、Arg、Gly、Gap、GapMe₄ 和 3, 3, 3-三氟丙氨酸，特别是 Ala、Ile、Arg、Gap 和 GapMe₄，尤其是 Ala、Arg 和 GapMe₄，更优选的是 Ala 和 Arg；

AA2 选自 Ala、Lys、Glu、Sar、Val、Arg、Gly、Pro、Ile、Tic、3, 3, 3-三氟丙氨酸和 N⁶-二乙基 Lys，特别是 Ala、Arg、Ile、Lys 和 Tic，尤其是 Ala、Arg、Lys 和 Ile，更优选的是 Ala 和 Arg；

10 AA3 选自 Ala、His、Gln、Val、Thr、Glu、Gly、Asp、Asn 和 N³-二乙基 Dap，特别是 Ala、His、Asp 和 Asn，尤其是 Ala 和 Asn，更优选的是 Ala；AA4 选自 Ala、Lys、Asn、Arg、Thr、Glu、Sar、Gly、Pro、His 和 N⁶-二乙基 Lys，特别是 Ala、Arg、Lys 和 His，尤其是 Ala、Arg 和 His，更优选的是 Ala；和

15 AA5 选自 Thr、Val、Ala、Gly、Dap、Dab、Pro、Hyp、Asn 和 N³-二乙基 Dap，特别是 Thr、Val 和 Dap，尤其是 Thr 和 Val；并且 R³ 是选自 Ala、Gly、Dap、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸，特别是 Ala、Gly 和氮杂甘氨酸，尤其是 Ala 和 Gly，更优选的是 Ala 的单个 L-氨基酸；并且其中 P、R² 和 R⁴ 是以上限定的任何基团，包括特别的和优选的基团。

20 在这一组内，所说化合物的特别的亚组包括，例如其中 AA1-AA2-AA3-AA4-AA5 选自 Ala-Ala-Ala-Lys-Val、Ile-Ala-Ala-Arg-Thr、Arg-Ala-Ala-Ala-Val、Arg-Ala-Ala-Ala-Thr、Ala-Ala-Ala-Arg-Val、Ala-Arg-Ala-Arg-Val、Ala-Ile-Ala-Arg-Val、Ala-Arg-Ala-His-Val、Ala-Ala-Asn-Arg-Val、Ala-Arg-Ala-Ala-Thr、Ala-Arg-Ala-Arg-Thr、Gap-Ala-Ala-Ala-Thr、GapMe₄-Ala-Ala-Ala-Thr 和 Ala-Ala-Ala-Arg-Thr 的那些。其中 R⁴ 是 Pip-NH₂、Papa-NH₂ 和 Pape-NHC(=NH)NH₂ 的化合物是优选的。

本发明的另一组优选的肽衍生物包括，例如，其中 R¹ 是由 AA1-AA2-AA3 所代表的 3 个 L-氨基酸的序列的那些，其中：

30 AA1 选自 Ala、Ile、Tyr、Val、Glu、Lys、Arg、Gly、Gap、GapMe₄ 和 3, 3, 3-三氟丙氨酸，特别是 Ala、Ile、Arg、Gap 和 GapMe₄，尤其是 Ala、Arg 和 GapMe₄，更优选的是 Ala 和 Arg；

AA2 选自 Ala、Lys、Glu、Sar、Val、Arg、Gly、Pro、Ile、Tic、
3, 3, 3-三氟丙氨酸和 N⁶-二乙基 Lys, 特别是 Ala、Arg、Ile、Lys
和 Tic, 尤其是 Ala、Arg、Lys 和 Ile, 更优选的是 Ala 和 Arg;

AA3 选自 Ala、His、Gln、Val、Thr、Glu、Gly、Asp、Asn 和 N³-
5 二乙基 Dap, 特别是 Ala、His、Asp 和 Asn, 尤其是 Ala 和 Asn, 更优
选的是 Ala;

并且 R³ 是 AA6-AA7-AA8 所代表的 3 个 L-氨基酸的序列, 其中:

AA6 选自 Gly、Leu、Lys、Ala、Pro、Glu、Sar、His 和 Dap, 特
别是 Ala、Leu 和 Pro, 尤其是 Ala;

10 AA7 选自 Pro、Ala、Lys、Arg、Glu、Sar、Gly、Oic 和 Dic, 尤
其是 Ala 和 Arg; 和

AA8 选自 Ala、Gly、Dap、氮杂丙氨酸和氮杂甘氨酸, 特别是 Ala、
Gly 和氮杂甘氨酸, 尤其是 Ala; 并且 P、R² 和 R⁴ 是以上限定的任何基
团, 包括特别的和优选的基团。在这一组内, 所说化合物的特别的亚
15 组包括, 例如其中序列 AA1-AA2-AA3 选自 Ala-Lys-Ala 和 Ala-Arg-
Ala, 序列 AA6-AA7-AA8 选自 Ala-Ala-Ala 和 Ala-Arg-Ala 的那些化合
物, 其中 R⁴ 是 Pip-NH₂、Papa-NH₂ 和 Pape-NHC(=NH)NH₂ 的那些化合物
是优选的。

本发明的一个优选的方面包括其中 R² 是式 II (尤其是其中 A 是亚
20 甲基), 尤其是 IIb, 并且 P、R¹、R³ 和 R⁴ 是以上限定的任何基团, 包
括特别的和优选的基团的式 I 的肽衍生物。

本发明的另一个优选的方面包括含有精氨酸残基的式 I 的肽衍生
物, 特别是其中在 R¹ 是 5 个 L-氨基酸的序列时, R¹ 的第一个氨基酸残
基(从左至右阅读时)是精氨酸的化合物(如 Arg-Ala-Ala-Ala-Val 和
25 Arg-Ala-Ala-Ala-Thr), 和其中在 R¹ 是 3 个 L-氨基酸的序列时, R¹ 的
第二个氨基酸残基是精氨酸的化合物和/或当 R³ 是 3 个 L-氨基酸的序
列时, R³ 的第二个氨基酸残基是精氨酸(如, 当 R¹ 是 Arg-Ala-Ala 和 R²
是 Ala-Ala-Ala 时或当 R¹ 和 R² 两者都是 Ala-Arg-Ala 时)的化合物。

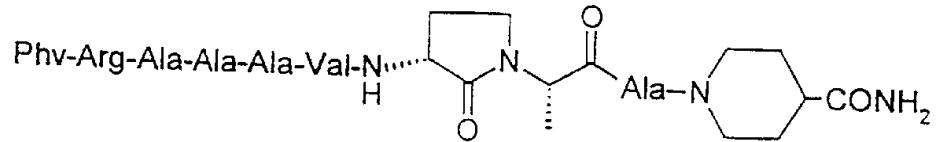
本发明的另一方面包括其中 R² 是式 IIIa 或 IIIb, 并且 P、R¹、R³
30 和 R⁴ 是以上描述的任何基团, 包括特别的和优选的基团的式 I 的肽衍
生物。

特别重要的本发明的化合物包括, 例如, 此后在伴随实施例中提

出的特定的具体例。实施例 5、16、19、23 和 24 的化合物是特别重要的，并且这些化合物或其药学上的可接受的盐作为本发明的进一步的特征被提供。

5

(SEQ ID NO:5)

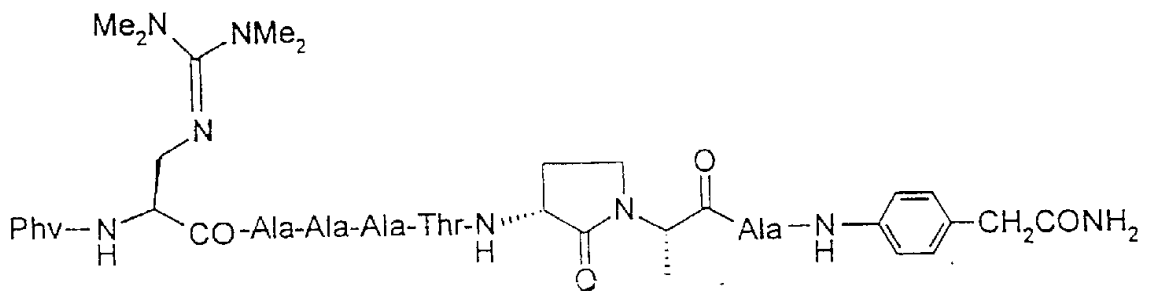


10

实施例 5

(SEQ ID NO: 17)

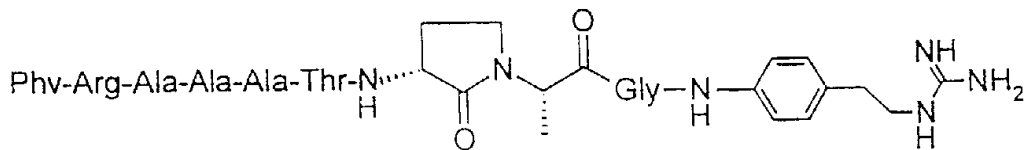
15



实施例 16

20

(SEQ ID NO:20)

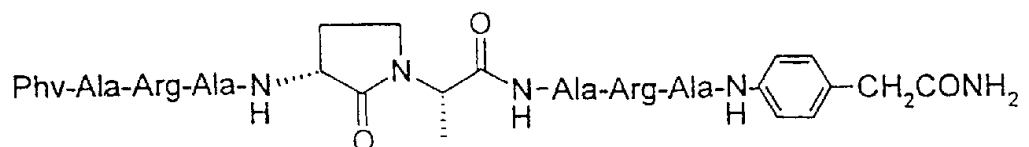


25

实施例 19

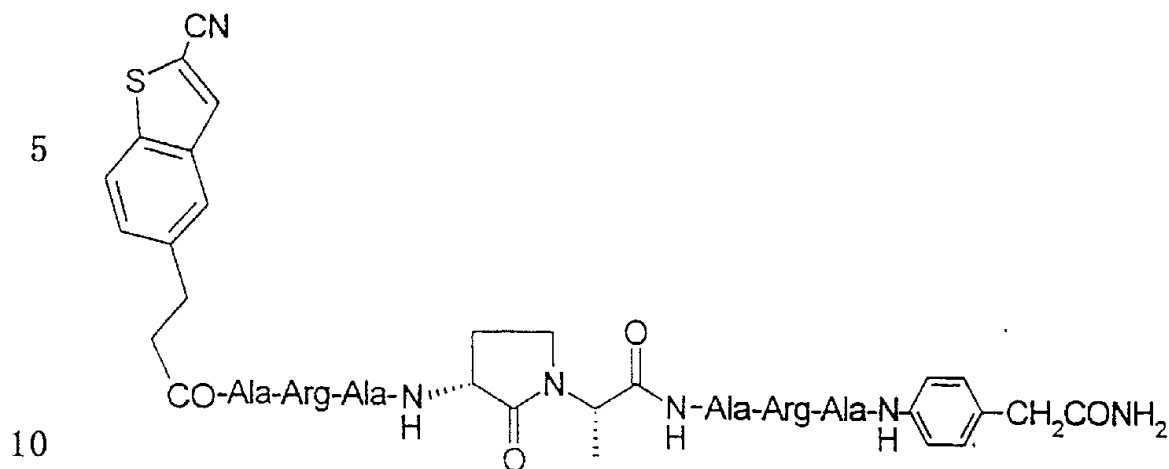
(SEQ ID NO:24)

30



实施例 23

(SEQ: ID NO: 25)



实施例 24

15 药学上可接受的盐包括，例如，对完全为碱性的肽衍生物(例如具有游离氨基的那些)而言，与形成药学上可接受的阴离子酸的盐，如与无机酸和与有机的酸的盐，所说的无机酸如氢卤化物(如氯化物和溴化物)、硫酸和磷酸，所说的有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、苦杏仁酸、p-甲苯磺酸、甲磺酸、三氟乙酸等；对完全为酸性的肽衍生物(例如具有游离羧基的那些)而言，与形成药学上可接受的阳离子的酸的盐，如与碱金属(如钠和钾)、碱土金属(如镁和钙)的盐，铝和铵盐以及与合适的有机碱的盐，所说的有机碱例如乙醇胺、甲基胺、二乙胺、异丙基胺、三甲基胺等。

20 如上所述，式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐在温血动物(包括人)中对一系列自身免疫病或病态具有有益的药理学作用，用于治疗疾病和作为疾病缓解剂或作为预防性治疗剂。这样的疾病可以包括，例如，类风湿性关节炎、多发性硬化、古德帕斯彻氏综合征、特发性血小板减少性紫癜、少年类风湿性关节炎、腹腔疾病、全身性红斑狼疮、僵硬脊椎炎、斯耶格伦氏综合征、重症肌无力、1型(胰岛素依赖性)糖尿病、桥本氏病、Grave's 病、阿狄森氏病、硬皮马勃菌病、多肌炎、皮肤肌炎、寻常天疱疮、大疱类天疱疮、自身免疫血溶胞贫血、恶性贫血、肾小球性肾炎、移植植物排斥等，尤其是类风湿性关节炎和多发性硬化。

25

30 可以用各种标准的试验和临床研究方法评价式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐的效用，所说的方法包括在国际专利申请出版物 W092/02543, W093/05011 和 W095/07707 中所描述的那些(或者其修改的方法)以及以下所描述的那些。在一个或多个这样的试验和研究中，

式 I 的肽衍生物显示出明显的活性。

试验 A: 纯化的 HLA-DR 肽体外结合测定(这一测定可以用来证明式 I 的肽衍生物与疾病-相关 MHCII 类分子的结合)将 30 μ l 在 N 端用长链生物素衍生物的生物素-FHA₃₀₇₋₃₂₀ (FHA(307-320)肽, 800nM 在磷酸缓冲盐水溶液(PBS)中的生物素-Ahx-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-OH)与 30 μ l 浓度在 0.5 和 5 μ g/ml 之间的 HLA-DR4Dw4 在有或没有抑制剂肽的情况下在 V-孔微滴板(Nunc)中一起温育 48 小时。在温育期结束时, 将 100 μ l 温育物转移到酶联免疫吸附测定(ELISA)平板(Nunc)上, 该平板预先用抗-MHC 抗体(L243-美国典型培养物保藏中心(ATCC)HB55-如 Lampson 和 Levy(1980), 免疫学杂志, 125, 293-299 所描述的)以 10 μ g/ml 浓度在室温下涂布 1 小时, 此后用在 PBS 中的 1%牛血清白蛋白(BSA)和 0.05%吐温 20 封闭 1 小时。在另外的 1 小时后, 洗去未结合的肽, 并且在室温下加入用 PBS1/4, 000 稀释的链霉抗生物素蛋白过氧化物酶(Sigma)以及 0.01%合适的去污剂如 NP-40(Sigma)2 小时。在进一步的洗涤之后, 将四甲基 benzidine (TMB) 底物溶液(在 10ml 0.1M 柠檬酸盐/乙酸盐缓冲液(pH6.0)以及 36 μ l 尿素过氧化氢(UHPO)(Fluke)中的 1 个 TMB 片(Sigma))加入到各板上。通过加入 2M 硫酸(每孔 10 μ l)终止反应, 在 450nm 读取吸收值来定量结合的肽的量。通过吸收值对浓度的作图获得肽的抑制活性。

20 可以按照以下所述获得纯化的 HLA-DR4Dw4:

(i) HLA-DR 在杆状病毒系统中的表达

在昆虫细胞中从杆状病毒载体表达重组蛋白质是已建立的获得高产率重组蛋白质的方法[Luckow, VA 和 Summers, MD, 1988, 生物技术, 6, 47-551]。为了能够从单一重组体杆状病毒载体(与获得用于 α 和 β 链的不同的重组病毒, 然后进行共转染相反)表达异源二聚体 HLA-DR, 例如 HLA-DR4Dw4, 构建携带有 α 和 β 链两者的双重组杆状病毒。

将编码 α 多肽的序列的 cDNA 克隆进转移载体 pacYM1[Matsuura, Y; Possee, RD; Overton, HA& Bishop, DHL, 1987, 普通病毒学杂志(J. Gen. Virol.), 68, 1233-1250], 以便将所说蛋白质的表达置于多角体蛋白启动子的控制之下。通过在 Sf21 昆虫细胞中的同源重组将该单位插入到杆状病毒基因组中, 以产生 α 链的单一重组体杆状病毒。Summers, MDD 和 SmithGE(1987)[杆状病毒载体和昆虫细胞培养过程的方法手册;

得克萨斯农业的实验站, 公报号 1555]充分描述了用于培养和感染供异源重组使用的昆虫细胞以及检测/分离重组病毒的技术。用于构建重组载体的分子遗传学技术同样易于从文献中找到, 并且由 Sambrook, J;Fritsch, EF 和 Maniatis T, (1989)[分子克隆. 实验室手册. 第二版. 冷泉港实验室出版社]进行了最充分的描述。

5 为了产生双-重组杆状病毒, 将编码 β 链的 cDNA 克隆进转移载体 pAcUW1[Weyer, U;Knight, S 和 Possee, RD, 1990, 普通病毒学杂志, 71, 1525-1534], 以便将所说蛋白质的表达置于 P10 启动子的控制之下。然后将这一单位插入到携带有 α 链的单一重组杆状病毒基因组中。

10 通过将用随机挑取的来自转染物的病毒感染的昆虫细胞点样到膜上, 并且使其与单克隆抗体反应来检测双-重组病毒, 所说的抗体例如 L243, 其特异性地识别 HLA-DR 异源双体。利用容易从文献中找到的标准的流式细胞术检测抗体对 Sf21 昆虫细胞的结合。将表达 HLA-DR 的稳定的双-重组杆状病毒进行噬斑纯化。

15 (ii) 从昆虫细胞纯化 HLA-DR

所利用的方法是由 Gorga 等, 1987(Gorga 等, 1987. 生物化学杂志 262, 16087-16094)描述的方法的修改的方法。通过用特氟隆玻璃匀化器的 10 个冲程匀化, 将 HLA-DR 表达杆状病毒/Sf21 细胞(10L, 约等于 2×10^{10} 个细胞)溶解在 100ml 5mMEDTA(钠盐), 50mMTris-HCl(pH8.5), 20 2%NP40, 150mMNaCl, 1mM 碘乙酰胺, 1mMPMSF 中。在 100, 000g 下将匀浆离心 1 小时, 并收集上清液。将以 50mgL243 对 10ml 蛋白质 A-琼脂糖 fastflow(Pharmacia) 的比率共价连接并用 10mMTris-HCl(pH8.0), 0.1%NP-40 预温育的抗-HLA-DR 单克隆抗体 LB3-1(Gorga 等, 1986, 细胞免疫学 103, 160-172)与所说的上清液一起温育一夜。

25 然后将树脂放到柱中, 并用 10mMTris-HCl(pH8.0), 0.1%NP-40(20 倍柱体积)洗涤, 其后用 0.15MNaCl, 50mMNa₂HPO₄(pH7.0), 1%辛基葡糖苷(20 倍柱体积)洗涤。用 50mM 二乙胺(pH11.0), 0.15MNaCl, 1%辛基葡糖苷洗脱 HLA-DR。立即用 1MTris-HCl(pH8.0)中和柱组分, 并且通过 centricon-10 膜经超速离心浓缩。由 BCA 蛋白质测定法(Pierce)测定

30 蛋白质含量, 由 SDS-PAGE 电泳测定纯度。

一般来说, 在试验 A 中试验的以上所限定的式 I 的肽衍生物在约 10 μ M 浓度或更低时显示出明显的抑制作用。

本发明的另一个优选的方面包括不结合 HLA-DR3, 但结合 HLA-DR1 和/或 HLA-DR4Dw4 和/或 HLA-DR4Dw14 的式(I)的肽衍生物或其药学上可接受的盐。HLA-DR3 是与类风湿性关节炎不相联系的一种普通的 HLA-DR 等位变体。因此, 在携带 HLA-DR3 作为他们的等位变体的一种的类风湿性关节炎患者(其约为总的类风湿性关节炎患者的三分之一)中, 这样的式 I 的肽衍生物将不干扰 HLA-DR3 在宿主防御功能中的正常的作用。因此, 这样一种肽衍生物の利用对治疗类风湿性关节炎患者是特别有利的, 因为它比用非选择性 DR 结合剂产生更低的免疫抑制作用。

10 作为试验 A 的一种变化, 可以按照以下所述评价本发明的肽结合一种或多种 HLA-DR 分子的能力:

(i) 从细胞系纯化 HLA-DR 类型

所利用的方法是由 Gorga 等, 1987, 生物化学杂志, 262, 16087-16094 所描述的方法的改进的方法。通过免疫亲和层析从各种细胞系纯化人 HLA-DR 抗原。简言之, 通过用特氟隆玻璃匀化器的 10 个冲程匀化, 将 1×10^9 - 5×10^9 个选自 Hom2 (DR1 源), BBF (DR2 源), AVL-B (DR3 源), JAH (DR4Dw4 源), JHAF (DR4Dw13 源) 或 PEI17 (DR4Dw14 源) 的合适细胞系的小球细胞于大约 4°C 下溶解在 50mM EDTA (钠盐), 50mM Tris-HCl (pH7.4), 2% NP40, 150mM NaCl, 1mM 碘乙酰胺, 1mM PMSF 中。在 100, 000g 下将匀浆离心 1 小时, 并收集上清液。将共价连接到 CNBr-琼脂糖 4B (Pharmacia) 上的抗-HLA-DR 单克隆抗体 LB3.1 (Gorga 等, 1986, 细胞免疫学, 103, 160-173) 用 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1% NP-40 预平衡, 并与上清液一起温育一夜。然后将树脂装入到柱中, 并且用 0.15M NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.4), 1% 辛基葡糖苷 (20 倍柱体积) 洗涤。用 50mM 二乙胺 (pH11.0), 0.15M NaCl, 1% 辛基葡糖苷洗脱 HLA-DR。立即用 0.5M HEPES NaOH (pH7.4) 中和柱组分。由 Biorad 蛋白质测定法测定蛋白质含量, 由 SDS-PAGE 电泳测定纯度。

(ii) 肽选择性结合测定

在有或没有测定缓冲液 (PBS, 0.01% NP40 (Sigma)) 中的抑制剂肽存在下, 在 V-孔微滴板 (Nunc) 中, 将在磷酸缓冲盐水 (PBS) 中的 200nM 生物素-FHA₃₀₇₋₃₂₀ 与纯化的 HLA-DR1, DR2, DR4Dw4, DR4Dw13 或 DR4Dw14 (2-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 一起温育。对 DR3 抑制作用, 将 400nM 生物素-

Ahx-(D)Ala-Ala-Ala-Che-Ile-Ala-Ala-Ala-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-(D)Ala-OH 与纯化的 DR3(20 μ g/ml)一起温育, 并且如上所述进行温育。在 48 小时之后, 如试验 A 中的描述处理温育物, 并读取吸收值。在 PC 上采用 MicrocalOrigin 软件计算以 IC₅₀ 表示的肽的抑制活性。

5 试验 B: T 细胞体外活化的抑制作用。(这一测定可以用来说明式 I 的肽衍生物抑制由或通过 MHCII 类分子介导的 T 细胞免疫应答的能力)。

 试验抑制剂肽阻断 B52.24 鼠 T 细胞杂交瘤系的刺激作用的能力, 所说的杂交瘤系对由 HLA-DR4Dw4 分子传递的 FHA₃₀₇₋₃₂₀ 肽(H-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-OH) 产生应
10 答。B52.24 是由按照 Woods 等(1994)实验医学杂志。(J. Exp. Med.)180, 173-181 的描述并依据《免疫学的当代方案》第二卷 7.21 中给出的产生 T 细胞杂交瘤的一般方法, 将从 FHA₃₀₇₋₃₂₀ 免疫的 HLA-DR3Dw4 转基因小鼠取得的淋巴结 T 细胞(国际专利申请出版物 W095/03331)与 BW5147
15 鼠 T 细胞淋巴瘤系(White 等(1989)免疫学杂志 143, 1822)融合产生的。

 在 96-孔微滴板(Nunc)中将浓度在 100 和 0.1 μ M(或更低)之间的抑制剂肽与浓度在 100 和 0.1 μ M 之间或者 10 μ M 固定浓度的抗原肽 FHA₃₀₇₋₃₂₀ 混合, 用 RPMI-1640 培养基(Gibco)稀释, 使最终体积达到 100 μ l。通过以 4X10⁶ 细胞/毫升悬浮在 1%戊二醛(Sigma)中 30 秒钟,
20 用戊二醛将表达 HLA-DR4Dw4 的 B 细胞, 例如 JAHEBV 转化的类淋巴母细胞细胞系(欧洲培养物保藏中心 ECACC85102909)或者从 HLA-DR4Dw4 纯合个体取得的并按照《免疫学的当代方案》7.22.1 中描述的方法用 EpsteinBarr 病毒转化的 B 细胞固定, 此后, 加入等体积的 200mM 赖氨酸(Sigma)3 分钟。细胞由在 300g 下的离心回收, 用 RPMI-1640 洗涤,
25 并且以 2X10⁵ 个细胞/孔的浓度加入到包含抗原和抑制剂化合物的微滴板中, 将微滴板在 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 中培养 2 小时。

 然后, 通过在 300g 下离心用 RPMI-1640 洗涤微滴板, 并且在以 10⁵ 个细胞/孔的浓度加入 B52.24T 细胞杂交瘤系之前, 用培养基(RPMI-1640, 10%胎牛血清(Gibco)和 2mM 谷氨酰胺(Gibco))抽吸两次。然后,
30 将微滴板在 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 中培养另外的两天。接着在 300g 下离心微滴板 10 分钟, 从所有的孔取出 150 μ l 上清液, 在进行 IL-2 含量的生物测定之前冷冻在-20 $^{\circ}$ C 下。

把包含将要测定的上清液的培养平板置于室温下解冻，将 100ml 上清液转移到新的 96 圆底孔平板中。用培养基进行 IL-2 的 1:1 系列稀释，以产生 250 单位/毫升至最后 0.04 单位/毫升 IL-2 的标准曲线，其中所说的培养基是 RPMI-1640(Gibco)，10%胎牛血清(高级蛋白质产
5 品公司)，100 μ g/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素(Gibco)，2mL-谷酰胺(Gibco)和 50 μ M2-巯基乙醇(Sigma)。收获 IL-2 依赖性细胞系，如 CTLL-2 细胞(自然(1977)268154-156)或 HT-2 细胞(免疫学方法杂志(1987)94-104)，在以 5×10^4 细胞/毫升悬浮之前，用培养基洗涤两次。将 100 μ l IL-2 依赖性细胞悬浮液加入到每一标准曲线与试验样品的孔中。将培养
10 板在 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 下培养 72 小时。此后，将 20 μ l(1mCi) 3H-胸腺嘧啶核甙(Amersham International)加入到每一孔中，将平板送回到培养箱中再培养 16 小时。将各板的内含物收集到玻璃纤维滤膜垫上，采用 β 平板闪烁计数器测定放射活性。

一般来说，在试验 B 中试验的以上限定的式 I 的肽衍生物在约 10 μ M
15 或更低的浓度下显示出明显的抑制作用。

试验 C: 在 BALB/C 小鼠中，肽刺激 DTH(迟发型超敏反应)。(该测定可以用来在动物模型中说明式 I 的肽衍生物的体内活性)。Balb/c 雌性小鼠(18-20g)，每组 5 只，在侧腹皮下用 0.1 毫升与完全弗氏佐剂(Sigma)1:1 v/v 混合的卵白蛋白(Sigma)(在盐水中 2 毫克/毫升)乳剂
20 免疫。七天后，用双测径器测微尺测量脚板厚度，接着用在盐水中的 1% 热-聚集卵清蛋白的 30 μ l 足底下注射液攻击一只后脚板。在抗原攻击 24 小时后，测量脚板，以与对侧对照比较注射脚板的脚板厚度的增加百分比计算 DTH 应答。以 10mg/kg/天到 0.1 μ g/kg/天范围内的剂量，通过在抗原攻击前 24 小时移植的 3-天渗透微泵(Alzet)施用抑制剂。由
25 抑制剂处理的脚板肿胀值减去载体给药的对照的值，除以对照值，乘以 100%计算抑制的程度。

一般来说，在试验 C 中试验的以上限定的式 I 的肽衍生物在约 1mg/kg/天或更低的浓度下显示出明显的抑制作用，而没有任何明显的毒理或其它不希望的药理作用。

30 试验 D: (这一测定可以用来在关节炎的动物模型中说明式 I 的肽衍生物的体内活性)。

用 0.1ml 乳剂皮下注射 Balb/c 雌性小鼠(19-21g，5-10 只/组)在

第 0 天免疫和在第 7 天加强免疫，所说的乳剂含有等体积的在盐水中的 2mg/ml 甲基化的牛血清白蛋白 (met-BSA, Sigma) 和完全弗氏佐剂 (Sigma)，其中补充了 2.5mg/ml Mycobacterium tuberculosis (MTB, 菌株 C, DT 和 PN, MAFF, Weybridge, Surrey)，因此给出 3.5mg/ml 的最终 MTB 浓度。在相同的时间给予另一种在盐水中的 10^9 个百日咳博德特氏菌有机体 (Wellcome 百日咳疫苗) 的 0.1ml i.p 注射液。十四天后，用 30G 针与汉密尔顿注射器将含有 100ug 盐水中的 met-BSA 的 10 μ l 关节内注射液注射到膝关节来攻击动物。对侧膝盖用相同体积的盐水注射，用作对照。在 13 天后，通过采用双测径器测微尺测定来确定与两个膝盖相关的发炎/肿胀程度。通过以钝剪刀和钳子在膝盖之上和之下约 5mm 的皮肤上切口，并且继续沿膝盖侧面形成一片，然后小心地切去该片，以暴露出下面的关节来进行。测量在横跨膝盖的最宽部分，平面地在夹持在固定位置上的固定肢体上进行。按下式计算与对照比较的注射抗原的膝盖中炎症的百分增加： $[\text{注射抗原的膝盖厚度} - \text{注射盐水的膝盖厚度} / \text{注射盐水的膝盖厚度}] \times 100$ 。以 10mg/kg/天到 0.1 μ g/kg/天范围内的剂量，通过在抗原激发前 24 小时移植的 14 天渗透微泵 (Alzet) 施用抑制剂。由抑制剂处理的组的肿胀值减去载体给药的对照的值，除以对照值，乘以 100%，从厚度测量值计算发炎/肿胀的百分抑制。其它的疾病评价包括 1) 在 haematoxylin 和伊红染色的固定的膝盖段上进行的发炎、关节膜炎和软骨/骨糜烂的组织学评价，和 2) 血清中急相反应物、血清淀粉样 P 和/或触珠蛋白水平的测定。

在试验 D 中试验的以上限定的式 I 的肽衍生物在约 10mg/kg/天或更低的剂量下显示出明显的抑制作用。

式 I 的特定的肽衍生物的药理学活性可以举例说明，

实施例 5, 16 和 23 的化合物都显示出，在试验 A 中在浓度小于 0.1 μ M 时明显结合 HLA-DR4Dw4，在试验 C 中在小于 0.1mg/kg/天时是有活性的。在 pH3 和 pH7.6 时，这些化合物也显示出良好的含水稳定性，在以挤压的聚合物贮存制剂形式时，显示出由于挤压降解的最小损失和从最终贮存制剂释放的最小降解。在改变的试验 A 中，实施例 23 的化合物显示出明显地结合 HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR4Dw4 和 HLA-DR4Dw14，但不明显地结合 HLA-DR3 (IC_{50} 大于 100 μ M)。

式 (I) 的肽衍生物可以由可用于类似肽合成的任何肽化学领域中已

知的方法制备。

可以采用例如，类似于 Atherton 和 Sheppard 的“固相肽合成：一种实用方法”(牛津大学出版社的 IRL 出版社出版, 1989), Stewart 和 Young 的“固相肽合成”(Pierce 化学公司出版, Illinois, 1984),
5 “肽合成原理”(Springer-Verlag 出版, 柏林, 1984)和系列“氨基酸, 肽和蛋白质”(1-25 卷; 1994 年出版的第 25 卷)(皇家化学学会出版, 剑桥, 英国)所公开的那些方法获得式 I 的肽衍生物。

优选地, 式(I)的肽衍生物由固相序列合成制备。利用这一技术, 在 α -氨基上保护将成为肽的 C 端氨基酸的氨基酸, 如果需要, 在侧链
10 中保护, 并且偶联到固相载体上, 所说的固相载体例如树脂, 如, 在裂解之后需要游离羧酸时的 2-氯三苯甲基氯化物树脂或 Merrifield 树脂(氯甲基聚苯乙烯-二乙烯基苯), 或者在裂解之后需要羧酰胺时的 Rink 酰胺树脂(4-(2', 4'-二甲氧苄基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基树脂)或 Rink 酰胺 MBHA 树脂(N-(4-(2', 4'-二甲氧苄基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基乙酰氨基-正亮氨酸基)-4-甲基二苯甲基胺树脂(所有这些都可以
15 从 Calbiochem-Novabiochem 获得)。此后除去 α -氨基上的保护基。在 α -氨基上保护将连接到 C 端氨基酸上的氨基酸, 如果需要, 在侧链中保护, 并且偶联到仍然连接在固相载体上的 C 端氨基酸上。重复 α -氨基脱保护和偶联下一个氨基酸的阶段性步骤, 产生与固相载体连接的
20 保护的或未保护的多肽。式 II 或 III 的基团 R^2 通过利用适当保护的(3-氨基-2-氧代-吡咯烷-1-基)链烷酸(对于包含 II 的肽衍生物, 其中 A= 亚甲基)或如《药物化学杂志》, 1993, 36, 256-263 的描述获得的相应的氧杂类似物, 或者通过其类似物(对于包含 II 的肽衍生物, 其中 A 是氧)或(6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4.4]酮-7-基)链烷酸(对于包含 III
25 的肽衍生物)取代保护的氨基酸而掺入到序列中。通过标准方法, 例如采用三氟乙酸, 三乙基硅烷和水的混合物从固相载体解脱保护的或未保护的多肽。可以预料的是可以在用于从固相载体解脱肽的条件下裂解侧链保护基, 或者可以在从固相载体解脱肽之前或之后作为分离步骤裂解。也可以预料的是制备多肽的方法可以通过在特定的偶联步骤
30 中使用两个或多个合适的保护的氨基酸的序列进行修改。合成可以利用手工技术或使用合成仪自动进行, 或者可以使用两种技术组合, 所说的合成仪如, Applied Biosystems 431A 或 430A 肽合成仪,

AdvancedChemtechACT357 肽合成仪或类似的自动肽合成仪。

在肽的合成期间，不参加反应的氨基酸官能团是由各种官能团保护的。例如，N端和侧链氨基可以通过使用 9-苄基甲氧羰基(Fmoc)，t-丁氧羰基(Boc)，二苄基异丙氧羰基(Bpoc)，2-[3, 5-二甲氧苄基]丙基-2-氧羰基(Ddz)，金刚烷基氧羰基(Adoc)，烯丙氧羰基(Aloc)，2, 2-2-三氯乙氧羰基(Troc)，苄氧羰基和各种所取代的苄氧羰基团保护。当需要时，这些保护基可以用标准技术除去(例如酸或碱处理，催化氢解和 Pd(0) 处理或锌/乙酸处理)。

用于在包含精氨酸残基的肽中保护侧链胍基团的合适的保护基团包括硝基，金刚烷氧羰基，4-甲氧-2, 3, 6-三甲基苯磺酰基(Mtr)，2, 2, 5, 7, 8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)和(尤其是)2, 2, 4, 6, 7-五甲基二氢苯并咪喃-5-磺酰基(Pbf)基团。

用于保护侧链羟基的合适的保护基团包括 t-丁基，苄基和三苯甲基(Trt)。用于包含组氨酸残基的肽中侧链咪唑基团的合适的保护基团包括三苯甲基，苄基，甲苯磺酰基，二硝基苄基，Adoc, Boc 或 Fmoc 基团。

用于保护侧链羧基的合适的保护基团包括各种酯(例如甲酯，乙酯，t-丁酯，苄酯，硝基苄酯，烯丙酯和 9-苄基甲酯)。

保护基裂解反应可以在 4℃ 到 40℃ 的温度范围内(优选地是在室温下)和在 10 分钟到 24 小时的时间范围内进行。

用于偶联单个氨基酸的合适的偶联方法包括通常使用的叠氮化物，对称酸酐，混合酸酐和各种活性酯和碳化二亚胺。在各种碳化二亚胺(例如二环己基或二异丙基碳化二亚胺)的情况下，也可以加入一些添加剂(例如 1-羟基苯并三唑(HOBT)和 N-羟基琥珀酰亚胺)。此外，氨基酸偶联也可以通过利用一些其它试剂完成，例如通过 1H-苯并三唑-1-基-氧-Tris-吡咯烷磷鎓六氟磷酸(PyBOP)，(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脲鎓)四氟硼酸(TBTU)和(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脲鎓)四氟硼酸(HBTU)。偶联反应可以在-20℃ 到 40℃ 的温度范围内和在 10 分钟到 24 小时的时间范围内进行。用于进行偶联反应的合适的介质包括，例如，N, N-二甲基甲酰胺(DMF)。特别合适的方法包括在 DMF 中使用 HBTU, HOBT 和二异丙基乙胺。

在本文提及的国际专利申请中例证了这些和其它肽合成方法。为式 R-, R·CO-, R·SO₂-, R·O·CO-, R·NHCO-, R·O·CS-, R·S·CO-, R·NHCS-, R·S·CS-和 R·CS-的疏水残基 P(或作为在 P 的末端氨基上存在的取代基的这样一种基团, 此时 P 是疏水氨基酸或携带其它氨基酸的疏水氨基酸) 5 可以作为例如末端氨基的烷基化, 酰基化或其它标准官能团修饰的最后步骤(例如在从载体释放肽之前或之后)掺入。当 C 端修饰(以获得 R4 特别的值)是所需的时, 它们可以通过常规官能团修饰或适当选择起始树脂或者首先偶联到树脂上的保护的整体现(例如采用式 R4-H 的合适的保护基), 在肽合成之后完成, 制备式 I 的肽衍生物的典型的例子在下文的实施例中提供。

用于测量本发明的肽衍生物的稳定性一个典型的方法如下, 其中, 为了最大限度地减少微生物污染和降解, 在高压灭菌器中灭菌用来制备肽溶液的所有设备, 并在 II 类层状柜橱中进行所有的材料转移。采用无菌 0.22μm 过滤器和 20ml 注射器, 将约 20ml 含有 0.02%叠氮化钠的 15 McIlvaine's 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH3 或 7.6)过滤到 50 毫升瓶中。在加帽的小瓶中精确地称量约 1.2mg 肽。利用无菌移液管尖端将足够量的缓冲液加入的小瓶中的肽中, 以给出 0.1mg/ml 的肽浓度。给小瓶加帽, 并且摇动使肽溶解。利用无菌移液管尖端, 将大约 1 毫升的肽溶液的等分样转移到 10 个 HPLC 小瓶中, 然后加上帽。5 个小瓶贮存在-18 20 和 37℃。在贮存开始时或在-18 和 37℃贮存 1, 2, 3 和 4 周之后, 在各时间点采用新的小瓶以及重复的样品注射, 用合适的标准经 HPLC 测定溶液的肽峰面积。从各时间点的肽峰面积与起始面积的比值确定在各时间点 37℃贮存后保留的肽的百分比。在 37℃ pH3 和 7.6 贮存之后, 本发明的优选的肽衍生物具有大于 90%, 优选大于 95%的肽保留。

25 为了治疗或预防的目的, 式 I 的肽衍生物一般以药物领域熟知的药物组合物的形式施用给需要这种治疗的温血动物(包括人)。

按照本发明的另一个特征, 本发明提供了药物组合物, 该组合物包含与药学上可接受稀释剂或载体组合在一起的式(I)的肽衍生物或其药学上可接受的盐。

30 组合物可以是适于口服使用的形式, 例如片剂, 胶囊, 含水或油的溶液, 悬液或乳剂; 适于经鼻使用的形式, 例如嗅剂, 鼻喷射剂或滴鼻剂; 适于阴道或直肠使用的形式, 例如栓剂; 适于吸入施用的形

式，例如作为充分细化的粉末或液态气溶胶；适于舌下或口腔使用的形式，例如片剂或胶囊；或适于肠胃外(包括静脉内，皮下，肌内，血管内或灌输)施用的形式，例如无菌水或油溶液或悬液。组合物可以是适于局部施用的形式，例如霜剂，软膏和凝胶。也包括皮肤补片。《综合医学化学》第5卷25.2章(编者Hansch等，Pergamon出版社，1990)综述了各种制剂。

一般来说，上述组合物可以利用常规赋形剂以常规方式制备。然而，在口服组合物的情况下，组合物包括包衣以保护多肽活性组分使之不受胃中酶的作用可能是合宜的。

10 本发明的更优选的组合物是适于口服的以单位剂量形式的一种组合物，例如片剂或胶囊，在各单位剂量中含有2.5-500mg，优选地10-100mg多肽；或者是适于肠胃外施用的一种组合物，其在每毫升溶液中含有0.5-100mg，优选地1-10mg多肽。

15 肠胃外组合物优选地是在等渗盐水或等渗葡萄糖中的溶液，如果需要，缓冲至pH5-9。此外，当使用常规可注射的制剂时，肠胃外组合物可以是缓释而设计的，在这种情况下，每单位剂量中多肽的量一般比所需的量更大。优选的缓释制剂是连续释放制剂，例如在欧洲专利申请58481中描述的一种制剂类型，或者对包含至少一个碱性基团的式I的肽而言，例如在国际专利申请出版物W093/24150中描述的制剂，
20 这些专利申请本文一并引作参考。本发明的某些肽具有可溶性特征，这使得它们特别适于制造和加工缓释的肠胃外制剂，特别是包含可生物降解的聚酯(如聚交酯)的制剂，和适于提供具有有益的释放过程的缓释制剂。此外，包含一个或多个碱性基团(特别是精氨酸)的本发明的肽也可以与具有酸末端的聚酯形成肽-聚合物盐，如聚交酯，
25 这样的肽和肽-聚合物盐构成本发明的另一方面。某些这样的盐具有可溶性特征，这使得它们特别适于制造和加工缓释的肠胃外制剂，例如在W093/24150中所描述的制剂，并适于提供具有有益的释放过程和贮存稳定性特征的缓释制剂。优选的缓释肠胃外制剂每单位剂量含有1-100mg(如5-50mg)多肽。优选的缓释肠胃外制剂也是设计使在至少5天
30 的期限内提供缓释的一种制剂。

本发明的优选的肽包括这样一些肽，当以挤压聚合物贮存制剂的形式时，它们显示出对挤压降解的最小限度的损失或者在从这种贮存

制剂释放时显示出最小限度的降解。测定本发明的肽的降解水平的典型的方法如下:

制备肽的挤压聚合物贮存制剂

5 精确称量约 20mg 肽, 加入足够的聚合物, 产生约 20%W/W 的混合物, 所说的聚合物是 50/50%摩尔聚(D, L-乳酸/乙醇酸)共聚物, 当用筛析色谱相对于聚苯乙烯标准测定时, 其具有 20kD 的近似重均分子量和 1.7 的近似多分散性, 将所说的混合物溶解到无酸酐的冰乙酸中, 产生约 10%W/V 的溶液。将该溶液冷冻干燥, 在使用之前, 在真空下贮存所形成的冻干产物。

10 将 100mg 的冻干物质装入小的实验室挤压机的桶中, 将活塞推下, 以压实样品。将挤压机加热至 90 和 95℃之间, 并且在这一温度下保持 10 分钟, 然后在给出直径约 1mm 的圆柱状挤出料的压力下挤压冻干的物质。

分析肽挤压聚合物贮存制剂的肽含量

15 精确称量两个约 5mm 长的包含肽的挤压聚合物贮存制剂, 将每一个溶解到分别在 25ml 容量的烧瓶中的 1 ml 无酸酐的冰乙酸中。在约 1.5 小时之后, 用蒸馏水将各个的体积增加到 25ml, 引起聚合物沉淀。采用 0.5μm Millex PTFE 滤器滤掉固体, 并收集溶液 A。

20 从 0.5mg/ml 肽的蒸馏水贮存溶液和 2.5mg/ml 聚合物的无酸酐冰乙酸贮存溶液按以下制备一系列标准溶液, 用蒸馏水使每份溶液体积达到 10 毫升:

肽浓度(μg/ml)	贮存聚合物溶液体积(μl)	贮存肽溶液体积(μl)
50	1000	1000
40	1000	800
30	1000	600
20	1000	400
10	1000	200
5	1000	100
0	1000	0

通过 5μm Millex PTFE 滤器过滤每一个标准物, 采用重复样品注

射经 HPLC 分析以上的滤液等分样以及溶液 A 的等分样。从溶液 A 中的肽浓度计算肽的挤压聚合物贮存制剂的肽含量，所说的浓度是通过将溶液 A 中的肽峰的面积与标准溶液的肽峰比较确定的。因为本发明的优选的肽表现出对挤压降解的最小限度的损失，所以挤压聚合物贮存制剂的肽含量接近 20%W/W 的近似理论值。

5 肽从挤压聚合物贮存制剂体外释放时的降解

经 0.22 μ 滤器过滤包含 0.02% 叠氮化钠的 McIlvaine's 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH7.6) 的溶液，并且在 40 $^{\circ}$ C 下贮存。将大约 10mg 包含肽的挤压聚合物贮存制剂置于两个小小瓶中，加入 2ml 缓冲液。给小瓶加上帽，并且贮存在 37 $^{\circ}$ C 的水浴中 1 个月。在 1 个月内的合适的时间点，从各小瓶移出释放介质的 3 个 0.6 毫升等份，接着经 HPLC 分析或者在 HPLC 分析之前于 -18 $^{\circ}$ C 冰冻贮存在 HPLC 小瓶中。将 1.8ml 缓冲液加入到每一个包含贮存制剂的小瓶中，以替代在各时间点已经移出的释放介质。

15 通过将释放介质的肽峰面积与已知浓度的肽标准缓冲液的肽峰面积比较，采用重复样品注射经 HPLC 测定各时间点释放介质中的完整肽的平均量。通过将释放介质中额外的新峰面积与已知浓度的肽标准缓冲液的肽峰面积比较，并且假定消光系数不变，经 HPLC 测定在各时间点释放介质中的肽降解产物的近似平均量。完整的肽和总肽 (完整的肽和肽降解产物) 的平均值累积体外释放曲线从各时间点释放介质中的完整肽和肽降解产物的量确定。本发明的优选的肽显示出最小限度的体外释放降解，并且由此显示出在 pH7.6 和 37 $^{\circ}$ C 下体外释放进 McIlvaine's 缓冲液中 1 个月后的低于总肽 10%，优选地低于 5% 的总肽降解产物。

25 本发明的组合物一般以这样的剂量施用给人：例如，对于一个 70kg 的患者，日剂量是从 10 微克到 5000 毫克，优选地是 0.1-100 毫克，根据需要以分散剂量给药。按照医药熟知的原则，所施用的组合物的精确的量和施用途径与形式可以取决于被治疗的患者的体重、年龄和性别，和取决于所治疗的特定的疾病或病态以及其严重程度。

30 为了治疗和预防目的，式 (I) 的肽衍生物或其药学上可接受的盐也可以与一种或多种其它药剂一起有利地施用，所说的其它药剂是本领域已知在治疗或减轻以上提及的一种或多种疾病或病态的症状中有价值的 (或者是所述疾病或病态的疾病缓解剂)，例如 NSAID (如布洛芬和

吡罗昔康), 止痛药(如扑热息痛 1), 皮质类固醇, 肌肉弛缓药, 脂氧合酶抑制剂, 氨甲蝶呤, 硫唑嘌呤, D-青霉胺, 环孢菌素 A 或单克隆抗体治疗剂(如抗-CD4 或抗-TNF)。在糖尿病中, 所说的肽衍生物可以与胰岛素或糖尿病或糖尿病并发症的其它治疗剂(如醛糖还原酶抑制剂)共施用。要了解的是这样的联合治疗构成本发明的另一方面。

按照本发明的另一方面, 本发明提供了一种用于治疗 MHCII 类依赖性 T-细胞介导的自身免疫或炎症性疾病的方法。例如本文所提及的一种或多种疾病或病态, 该方法包括向需要这种治疗的温血哺乳动物(包括人)施用有效量的式 I 的肽衍生物或其药学上的可接受的盐。本发明也提供了式 I 的肽衍生物或其药学上可接受的盐在生产新药物上的用途, 所说的新药物是用于治疗 MHCII 类依赖性 T-细胞介导的自身免疫或炎症性疾病的药物。

除了它们的以上所说的在人类治疗药物中的用途外, 式 I 的肽衍生物在兽医上治疗影响有商业价值的温血动物, 如狗, 猫, 马和牛类似的疾病上也是有用的。一般来说, 对这样的治疗, 将以与以上描述的施用于人的那些类似的用量和方式施用式 I 的肽衍生物。式 I 的肽衍生物在作为开发和标准化试验系统中的药理学工具或作为诊断试剂也有价值, 所说的试验系统用于在实验动物, 如猫, 狗, 兔, 猴子, 大鼠和小鼠中评价 MHCII 类分子的作用, 作为继续研究新的和改进的治疗剂工作的一部分。

现在由下列非限制性实施例说明本发明, 其中, 除非有其它方式的说明: -

- (i) 浓缩和蒸发通过真空旋转蒸发进行;
- (ii) 操作在室温进行, 即在 18-26°C 的范围内;
- (iii) 当给出产率时, 仅仅是为了帮助读者阅读, 并不是通过勤奋的开发所能获得的必然的最大产率;

(iv) 使用了下列缩写:

Phv=5-苯基戊酰基; Boc=叔丁氧羰基; tBu=叔丁基; DMF=N,N-二甲基甲酰胺; HOBT=1-羟基-苯并三唑; Met=甲硫氨酸; Fmoc=9-芴基甲氧羰基; Fmoc-Pip-OH=N-(9-芴基甲氧羰基)哌啶-4-羧酸; Fmoc-Papa-OH=4-[N-(9-芴基甲氧羰基)氨基]苯基乙酸; Cbz=苄氧羰基; Pmc=2, 2, 5, 7, 8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基; Pbf=2, 2, 4, 6, 7-五甲基

二氢苯并咪唑-5-磺酰基; THF=四氢呋喃; DMSO=二甲亚砜; HBTU=2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脒六氟磷酸; DIPEA=二异丙基乙胺; TFA=三氟乙酸; Su 是经由环氮原子连接的琥珀酰亚胺; HPLC=高压液相色谱; 和 RP-HPLC=反相高压液相色谱(除非有其它说明, 在 VydacC18 柱 218TP54, 4.6X250mm 上进行);

(v) 闪式层析和二氧化硅上的层析在从 EMerck, Darmstadt, 德国获得的 Kieselgel60(ArtNO. 9385)上完成,

(vi) ¹HNMR 谱是采用四甲基硅烷(TMS)作为内标, 在 CDCl₃ 或 d₆-二甲亚砜(d₆-DMSO)中 200Mhz 下测定的, 并且以化学位移(δ)值(相对于 TMS, 每百万的份数)表示, 采用常规缩写标明重要的峰: s, 单峰; m, 多重峰; t, 三重峰; br, 宽峰; d, 双峰;

(vii) 下列 Fmoc-保护的氨基酸用于引入 Lys, Thr, Arg 或 His 残基: 对于 Lys: Fmoc-Lys(Boc)-OH; 对于 Thr: Fmoc-Thr(OBu)-OH; 对于 Arg: Fmoc-Arg(Pmc)-OH 或 Fmoc-Arg(Pbf)-OH; 和对于 His: Fmoc-His(Trt)-OH;

(viii) 在实施例 2 中, 当提及式 III 时, 意指其中 Rb 是甲基的式 III;

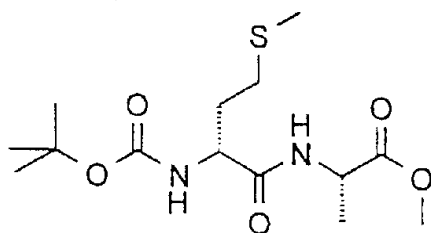
(ix) 在实施例 17 和 31 中, 当产物名称中使用术语“吗啉”时, 意指吗啉通过成环氮原子连接到邻近的亚甲基团上;

(x) 在实施例 18 中和 34 中, 当产物名称中使用式“N(CH₂CH₂)₂N”时, 其代表哌嗪环; 和

(xi) 在实施例 30 中, 当产物名称中使用式“-Lys=C(NMe₂)₂-”时, 其代表 L-氨基酸残基-HN-CH[CH₂CH₂CH₂CH₂N=C(NMe₂)₂]-CO-.

实施例 1. 制备 Phv-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-IIb-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:1)

1.1 合成 Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe

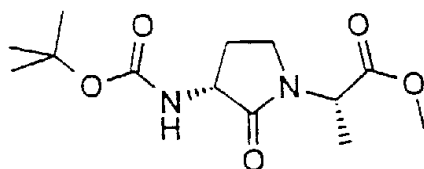


将 N-甲基吗啉(5.6g), L-丙氨酸甲酯盐酸盐(3.9g), HOBT(4.6g)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺(5.3g)加入到在干燥的 DMF(50ml)中的 Boc-(D)-甲硫氨酸溶液(7g, 0.028mol)中。将混合物搅拌过夜。

通过蒸发除去溶剂，将残余物在二氯甲烷(100ml)和 5%含水乙酸(50ml)之间分配。静置后 HOBT 结晶，并且经过滤除去，分离有机层，用含水碳酸氢钠洗涤，干燥(MgSO₄)，并且蒸发。在烧结漏斗中经闪烁层析，用二氯甲烷和乙醚的混合物(0%-100%乙醚)纯化残余物(8.5g)。合并包含产物的组分，蒸发，给出 Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe(7.2g)，其为静置时结晶的胶状物：NMR(CDCl₃): 1.4(d, 3H), 1.45(s, 9H), 1.95(m, 1H), 2.1(s, 1H), 2.1(m, 3H), 2.6(m, 2H), 3.75(s, 3H), 4.3(bs, 1H), 4.6(m, 1H), 5.3(m, 1H), 6.9(bs, 1H)。

1.2 合成 (2S)-2-[(3R)-3-(N-[叔丁氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]

10 丙酸甲酯



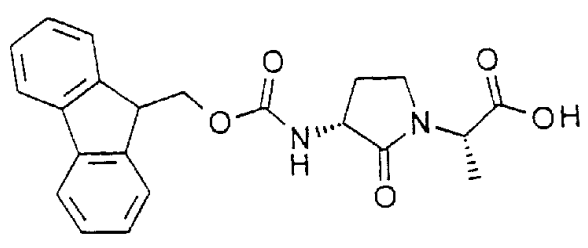
15 注：这一序列必须在干燥的条件下用干燥的溶剂实施，否则会出现差向异构化。

将碘甲烷加入到在 DMF(20ml)和二氯甲烷(20ml)混合物中的 Boc-(D)-Met-(L)-Ala-OMe(8g)中，使混合物静置 16 小时，然后蒸发至干。进一步加入二氯甲烷(2x50ml)，并蒸发除去剩余的碘甲烷，将残余物溶解在 DMF(300ml)和二氯甲烷(300ml)的混合物中。将混合物冷却至 -5℃，将氯化钠(在矿物油中的 80%分散液的 0.76g)一次加入，在这一温度把混合搅拌 2 小时。加入饱和的氯化铵水溶液(50ml)，将混合物蒸发至干，然后在水和乙醚之间分配。乙醚提取物以盐水洗涤，并且干燥和蒸发，产生胶状物，由在烧结漏斗上的闪烁层析(25%乙酸乙酯:己烷到 100%乙酸乙酯)纯化，给出 (2S)-2-[(3R)-3-(N-[叔丁氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸甲酯胶状物，其静置时结晶：NMR(CDCl₃): 1.4(s, 9H), 1.4(d, 3H), 1.8(m, 1H), 2.6(m, 1H), 3.4(m, 2H), 3.7(m, 3H), 4.2(m, 1H), 4.9(q, 1H), 5.2(bs, 1H)。

1.3 合成 (2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-芴基甲氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸(Fmoc-IIb-OH)

30

5



将(2S)-2-[(3R)-3-(N-[叔丁氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸甲酯(4g)在丙酮(60ml), 水(40ml)和浓盐酸(24ml)的混合物中回流 3 小时, 然后将混合物蒸发至干。加入水并重复蒸发。将残余物在水(15ml)中溶解, 加入过量的固体碳酸氢钠。加入在丙酮(30ml)中的 9-苄基甲基琥珀酰亚胺基碳酸盐(5.2g)。将混合物搅拌 16 小时, 然后由蒸发除去溶剂, 使残余物在水和乙醚之间分配。分离水层, 用盐酸将其 pH 调整到 - 3, 并且用二氯甲烷提取。有机层以水洗涤, 干燥(MgSO₄), 并且蒸发, 给出一种白色泡沫, 其在与乙醚研磨时结晶, 产生(2S)-2-[(3R)-3-(N-[9-苄基甲氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]丙酸白色固体(4.29g): mp. 191-3°C (分解); NMR(CDCl₃): 1.4(d, 3H), 2.0(m, 1H), 2.6(m, 1H), 3.4(m, 2H), 4.2(t, 1H), 4.4(m, 3H), 4.9(m, 1H), 5.8(bs, 1H), 7.4(m, 4H), 7.6(d, 2H), 7.7(d, 2H)。

1.4 合成 Phv-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-Iib-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:1)
 在 BondElut 管 (Varian, 15ml, 在底部装有滤器) 中, 从 FmocRink 酰胺 MBHA 树脂 (Novabiochem, 0.50g, 0.25mmoles) 开始, 用 Fmoc 固相合成法制备该肽。

(a) 用在 DMF 中的 20% 哌啶溶液使树脂脱保护 (5ml 的两次处理, 每次 10 分钟)。在脱保护后, 以 DMF 充分洗涤 (5x10ml) 树脂。

(b) 通过加入 Fmoc-Pip-OH (353mg, 1mmol), DMF (1.5ml), HOBT (165mg, 1mmol) 和二异丙基碳化二亚胺 (155 微升, 1mmol) 溶液进行酰化。使偶联进行大约 30 分钟, 用 DMF (5x10ml) 洗涤, 以小部分树脂采用 Kaiser 试验 (E. Kaiser 等, (1970), 生物化学年评, 34, 595) 检查酰化的完全程度。

采用以下物质重复以上脱保护 (a) 和偶联循环 (b)

Fmoc-Ala-OH	(311mg, 1mmol);
Fmoc-Iib-OH	(394mg, 1mmol);

Fmoc-Val-OH	(339mg, 1mmol);
Fmoc-Lys(Boc)-OH	(468mg, 1mmol);
Fmoc-Ala-OH	(311mg, 1mmol);
Fmoc-Ala-OH	(311mg, 1mmol);
Fmoc-Ala-OH	(311mg, 1mmol);和
5-苯基戊酸	(178mg, 1mmol);

在每一种情况之下, 偶联的时间是大约 30 分钟, 以小部分树脂采用 Kaiser 试验检查酰化的完全程度。苯基戊酸需要双倍量才能获得 Kaiser 试验的阳性结果。

- 5 用三氟乙酸(7.9ml)与三乙基硅烷(0.395ml)混合物从树脂上裂解下所说的肽。2 小时之后树脂以二氯甲烷(大约 150ml)洗涤, 将得到的溶液蒸发至干。使形成的固体在乙醚(25ml)和水(25ml)之间分配, 然后乙醚相用另外的水(2x25ml)进一步提取。合并水相并冻结干燥。

- 10 用制备型 RP-HPLC(Vydac218TP1022 柱, 250mmX22mm)纯化粗产物, 用含有 200 微升 DMF 的 5ml20%乙腈/水使粗提品上样。以含有 0.1%TFA 的乙腈/水梯度液(15-35%乙腈)在 80 分钟内洗脱, 流速为 10ml/分钟。合并和冻结干燥包含产物的组分, 给出 Phv-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-IIb-Ala-Pip-NH₂(SEQIDNO:1)白色固体(84mg; 35%产率)。

HPLC、质谱和氨基酸分析确定产物的特征。

- 15 RP-HPLCVydacC18 柱, 218TP54, 4.6x250mm, 以含有 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0ml/分钟, 显示 100%纯度, 保留时间为 18.56 分钟; 质谱, m/e(正电喷射(ES⁺))954.6(MH⁺); 氨基酸分析(在 130℃下用含有 1%苯酚的 6NHCl 溶液酸水解 24 小时以上)给出(Ala+IIb)4.80, Val1.11, Lys1.07。

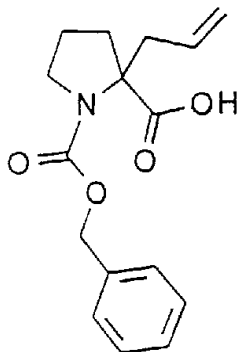
- 20 通过 E. Atherton 和 R. C. Sheppard("固相肽合成: 一种实用方法", IRL 出版社, 1989, 第 51 页)描述的用于 N-Fmoc-L-甲硫氨酸的方法类似的方法获得 Fmoc-Pip-OH:

- 25 Fmoc-Pip-OH: NMR(DMSO-d₆) 1.3(m, 2H), 1.7(m, 2H), 2.5(m, 2H), 2.9(t2H), 3.7(m, 1H), 4.2(t, 1H), 4.4(d, 2H), 7.4(m, 4H), 7.7(d, 2H), 7.9(d, 2H); 质谱 m/e(ES⁺)352.2(MH⁺)。

实施例 2Phv-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-III-Ala-Pip-NH₂ 和分离异构

体 (SEQIDNO:2)

2.1 合成 (RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰基)脯氨酸



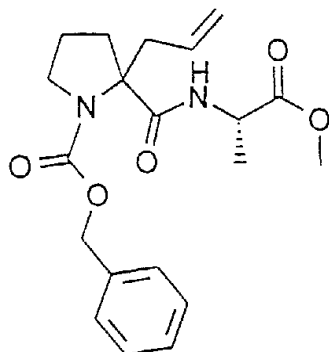
5

将在 THF (20ml) 中的 N-苄氧羰基脯氨酸甲酯 (13g) 于 -78°C 在氮氛
10 围下逐滴加入到在 THF (100ml) 中二异丙基酰胺锂 (27.5ml, 在己烷/THF
中 2M) 中。将混合物搅拌 30 分钟, 然后逐滴加入烯丙基碘化物 (5.5ml),
进一步搅拌混合物 30 分钟, 然后使其温热至室温。接着将混合物加入
到氯化铵水溶液 (200ml) 中, 并且以乙醚 (2x200ml) 提取。蒸发乙醚层,
15 采用己烷增加至 20% 的乙酸乙酯:己烷梯度液, 通过在二氧化硅上的层
析纯化残渣。将合适的组分蒸发至干, 给出 (RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰
基)脯氨酸甲酯 (9g) 油状物。

将这一物质 8.5g 溶解到甲醇 (40ml) 中, 加入在水 (20ml) 中的氢氧
化钠 (4.5g), 将混合物回流 60 分钟。然后以浓盐酸将混合物的 pH 调节
至 7, 由蒸发除去甲醇。将混合物的 pH 调节至 3, 接着用乙醚 (2x50ml)
20 提取混合物。蒸发合并的乙醚提取物, 给出 (RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰
基)脯氨酸胶状物:

NMR (d_6 -DMSO (373K)): 1.9 (m, 2H), 2.1 (m, 2H), 2.6 (q, 1H), 2.9 (q,
1H), 3.4 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 5.0 (m, 4H), 5.75 (m, 1H), 7.3 (m,
5H).

25 2.2) 合成 (RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰基)脯氨酸酰基]-(S)-丙氨酸甲酯



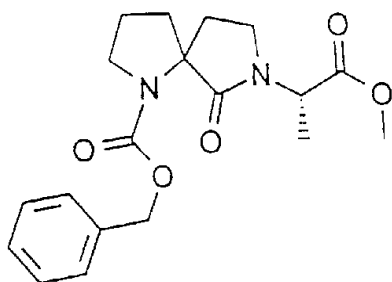
30

将 HOBT (7.7g), N-甲基吗啉 (6.6g), L-丙氨酸甲酯盐酸盐 (4.5g)

和 1-(3-二甲氧丙基)-3-乙基-碳化二亚胺 (5.7g) 加入到在 DMF (30ml) 中的 (RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰基)脯氨酸 (6.5g) 中, 将混合物搅拌 18 小时, 然后蒸发。使残余物在乙醚和水之间分配, 过滤除去 HOBT, 分离有机层。将有机层蒸发, 采用已烷中 20% 乙酸乙酯增加到已烷中 50% 乙酸乙酯的梯度液, 在二氧化硅上层析纯化残余物。合并合适的组分并蒸发至干, 产生 [(RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰基)脯氨酸酰基]-(S)-丙氨酸甲酯 (7g); NMR (d_6 -DMSO (373K)): 由于是非对映异构体混合物而为重叠峰, 1.25 和 1.3 (2d, 3H), 1.75 (m, 2H), 2.2 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.9 (m, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.65 (2s, 3H), 3.7 (m, 1H), 4.3 (2q, 10 1H), 5.0 (m, 4H), 5.7 (m, 1H), 7.3 (m, 5H), 7.4 和 7.5 (bs, 1H)。

2.3 合成 (S)-2-(1-苄氧羰基-6-氧代-1, 7-二氮杂螺环 [4, 4] 壬-7-基) 丙酸甲酯 (CbZ-III-OMe)

15



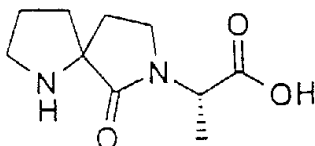
将四氧化铈 (4% 水溶液 1.5ml) 加入到在甲醇 (30ml) 和水 (20ml) 混合物中的 [(RS)-2-烯丙基-N-(苄氧羰基)脯氨酸酰基]-(S)-丙氨酸甲酯 (1.45g) 中。将混合物在氩氛围下搅拌 10 分钟, 然后分几次加入过碘酸钠 (2.45g)。搅拌混合物 2 小时, 然后加入水 (100ml), 以乙酸乙酯 (2x70ml) 提取混合物。干燥和蒸发合并的提取物, 给出胶状物 1.4g。将胶状物在二氯甲烷 (30ml) 和三乙基硅烷 (0.65g) 中溶解, 然后逐滴加入三氟乙酸 (4g)。将混合物搅拌 3 小时并蒸发, 使残余物分配在碳酸氢钠水溶液和乙醚之间。分离乙醚提取物并蒸发至干。采用已烷中 25% 乙酸乙酯增加到 100% 乙酸乙酯的梯度液, 在二氧化硅上层析纯化残余物。合并合适的组分并蒸发至干, 产生 (S)-2-(1-苄氧羰基-6-氧代-1, 7-二氮杂螺环 [4, 4] 壬 (non) -7-基) 丙酸甲酯 (0.8g); NMR (D_6 -DMSO (373K)): 一些峰加倍是由于非对映异构体混合物, 1.25 和 1.35 (2d, 3H), 1.95 (m, 6H), 3.1-3.5 (m, 4H). 3.6 和 3.65 (2s, 3H), 4.5 和 4.65 (2q, 1H), 5.05 (m, 2H), 7.25 (m, 5H)。

25

30

2.4 合成(S)-2-(6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4.4]壬(non)-7-基)丙酸(H-III-OH)

5

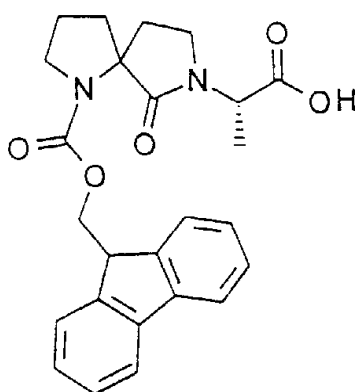


将碳酸钾(2.5g)加入到在甲醇(40ml)和水(40ml)混合物中的(S)-2-(1-苄氧羰基-6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4, 4]壬(non)-7-基)丙酸甲酯(3.3g)中。在室温搅拌混合物 10 小时。以浓盐酸将 pH 调节至 -5, 并且将混合物蒸发至干。将残余物溶解在水(40ml)中, 用浓盐酸将 pH 调节至 3。然后以二氯甲烷(2x50ml)提取混合物。干燥(MgSO₄)合并的提取物, 并且蒸发, 产生一种泡沫(2.8g)。将泡沫在甲醇(20ml)中溶解, 加入环己烯(0.7g), 其后加入 10%Pd/C(0.5g)。将混合物回流 2 小时, 冷却, 过滤, 并蒸发滤液, 给出(S)-2-(6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4.4]壬(non)-7-基)丙酸泡沫(1.9g); NMR(d₆-DMSO): 一些峰加倍是由于非对映异构体混合物, 1.25 和 1.3(2s, 3H), 1.8(m, 4H), 2.0(m, 2H), 3.0(m, 2H), 3.3(m, 2H), 4.5(m, 1H)。

15

2.5 合成(S)-2-(1-(9-苄基甲氧羰基)-6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4.4]壬(non)-7-基)丙酸(Fmoc-III-OH)

20



25

将过量的固体碳酸氢钠加入到在水(2ml)中的(S)-2-(6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4.4]壬(non)-7-基)丙酸(0.42g)中, 然后加入在丙酮(3ml)中的 9-苄基甲基琥珀酰亚胺基碳酸盐(0.7g)。将混合物搅拌 18 小时。然后将混合物加入水(10ml)中, 用乙醚(10ml)提取, 并分离水层。弃去乙醚提取物。以浓盐酸将水层的 pH 调节至 -3, 然后以二氯甲烷

30

(2x10ml)提取。分离合并的提取物,干燥(MgSO₄)并蒸发,给出(S)-2-(1-(9-苄基甲氧羰基)-6-氧代-1,7-二氮杂螺环[4.4]壬(non)-7-基)丙酸白色泡沫(0.62g); NMR(d₆-DMSO(373K)): 一些峰加倍是由于非对映异构体混合物, 1.3(2d, 3H), 1.6-2.0(m, 6H), 3.05(m, 1H),
5 3.2-3.45(m, 3H), 4.2-4.4(m, 1H), 4.5(m, 1H), 6.2(s, 2H), 7.35(m, 4H), 7.8(m, 4H).

2.6 合成 Phv-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-III-Ala-Pip-NH₂ 和分离异构体 (SEQIDNO:2)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法完成合成的第一部分,
10 但用 Fmoc-III-OH 替代 Fmoc-IIb-OH. 在这种情况下, 通过用下列方法活化酸完成酰化: 酸(1mmol), HBTU(1mmol), 二异丙基乙胺(2mmol), DMF(4ml). 在不到 45 分钟之后, Kaiser 试验显示所有偶联都是完全的. 这一方法用来给出 Fmoc-Val-III-Ala-Pip-NH-树脂. 然后将肽树脂转移到 ABI431 自动肽合成仪中, 此时, 按照制造商推荐的用于掺入
15 HBTU/HOBT 的单酰化化学法(如下)条件偶联序列中剩下的残基. 在脱保护之后, 树脂以 DMF 洗涤(10X10-20ml). 在转移到树脂上之前, 用在 DMF 中的 HBTU(1 当量), HOBT(当量)和 DIPEA(2 当量)活化羧酸(1mmol)约 11 分钟. 使酰化进行大约 60 分钟, 然后树脂以 DMF 洗涤(10X10-20ml). 在每一阶段用在 DMF 中的 20%哌啶溶液(两次用 5 ml 处理, 每次 10 分
20 钟)进行 Fmoc 脱保护. 在每一次脱保护之后, 树脂以 DMF 充分洗涤(5X10ml).

通过用三氟乙酸(TFA), 三乙基硅烷(TES)和水(10ml, 90:5:5)处理 1.5 小时从树脂上裂解下肽. 将树脂滤掉, 用 TFA 充分洗涤. 经旋转蒸发将所收集的滤液浓缩至干, 然后将所得到的残渣与乙醚一起研
25 磨, 产生 Phv-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-III-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:2), 其含有两个主要的组分(RP-HPLC(Vydac218TP54C18 柱)分析显示为 52:48 的混合物). 在 1 毫升/分钟的流速下, 20 分钟内的 20-50%梯度的乙腈:水(含有 0.1%TFA)洗脱中, 极性较大的非对映体具有 12.5 分钟的保留时间, 极性较小的非对映体具有 16.5 分钟的保留时间. 基本上
30 如实施例 1.4 所述, 进一步经制备型 RP-HPLC 纯化肽, 给出两个不同的组分, 由 RP-HPLC 检测, 两个组分的纯度都大于 95%. 在试验 A 和 B 中, 极性较大的非对映体比极性较小的非对映体更有效, 前者具有以下特

征:

RP-HPLC(20分钟内的20-50%乙腈梯度,流速1毫升/分钟)保留时间=12.3分钟;质谱, $m/e(ES^+) 994.5(MH^+)$;氨基酸分析给出 Ala3.99, Lys1.20, Val0.73.

5 实施例 3 Phv-Ala-Lys-Ala-IIb-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:3)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成和进行纯化,以合适的次序使 Fmoc-保护的氨基酸与 Fmoc-IIb-OH 偶联和脱保护。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱,采用
10 20 分钟内的 25-40%乙腈梯度,流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=5.56 分钟;质谱, $m/e(ES^+) 926.5(MH^+)$: 氨基酸分析给出 (Ala+IIb) 5.87, Lys1.12.

实施例 4 Phv-Ile-Ala-Ala-Arg-Thr-IIb-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:4)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成和进行纯
15 化,以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH(用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-IIb-OH 偶联和脱保护。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱,采用 30 分钟内的 20-50%乙腈梯度,流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=17.08 分钟;质谱,
20 $m/e(ES^+) 1048.7(MH^+)$: 氨基酸分析给出 Arg0.98, Ala3.00, IIb1.27, Thr0.86, Ile0.88.

通过 E. Atherton 和 R. C. Sheppard(“固相肽合成:一种实用方法”, IRL 出版社, 1989, 第 51 页)描述的用于 N-Fmoc-L-甲硫氨酸的方法类似的方法获得 Fmoc-Papa-OH:

25 Fmoc-Papa-OH: NMR(DMSO-d₆,) 3.5(s, 2H), 4.25(t, 1H), 4.5(d, 2H), 7.1(d, 2H), 7.4(m, 6H), 7.75(d, 2H), 7.9(d, 2H), 9.6(s, 1H); 质谱 $m/e(ES^-) 372.1(M-H)^-$.

实施例 5 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Val-IIb-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:5)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成,以合适
30 的次序使 Fmoc-保护的氨基酸与 Fmoc-IIb-OH 偶联脱保护。以与实施例 1.4 所述的方式类似的方式用制备型 RP-HPLC 纯化产物,由包含 0.1%TFA 的乙腈-水梯度液(15-40%乙腈)60 分钟内洗脱,流速 10 毫升/分钟。以

与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=18.28 分钟; 质谱, m/e(ES⁺)982.5(MH⁺): 氨基酸分析给出 Arg1.12, (Ala+Iib)3.8, Val1.12.

5 实施例 6Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-NH₂(SEQIDNO:6)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成的第一部分, 以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH(用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护, 以产生 Fmoc-Thr(OBu)-Iib.Ala-Papa-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪(ACT357)上, 按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。从树脂上裂解下肽, 以与实施例 1.4 所述的方式类似的方式用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=18.21 分钟; 质谱, m/e(ES⁺)1006.4(MH⁺): 氨基酸分析给出 Arg1.10, Ala3.88, Iib1.04, Thr0.95.

15 实施例 7Phv-Ala-Ala-Ala-Arg-Val-Iib-Ala-Papa-NH₂(SEQIDNO:7)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成的第一部分, 以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH(用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护, 以产生 Fmoc-Val-Iib-Ala-Papa-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪(ABI431)上, 按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方式类似的方式从树脂上裂解下肽并用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=20.87 分钟; 质谱, m/e(ES⁺)1004.6(MH⁺): 氨基酸分析给出 Arg0.96, (Ala+Iib)5.05, Val0.97.

25 30 实施例 8Phv-Ala-Arg-Ala-Arg-Val-Iib-Gly-Papa-NH₂(SEQIDNO:8)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成的第一部分, 以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH(用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保

护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护，以产生 Fmoc-Val-Iib-Gly-Papa-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪 (ABI431) 上，按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方式类似的方式从树脂上裂解下

5 肽并用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=18.12 分钟; 质谱, $m/e(ES^+)538.4(M+2H^+)$: 氨基酸分析给出 Arg0.92, Ala2.16. (Gly+Iib)2.12, Val0.88.

10 实施例 9Phv-Ala-Ile-Ala-Arg-Val-Iib-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:9)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成和进行纯化, 以合适的次序使 Fmoc-保护的氨基酸与 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用

15 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=23.4 分钟; 质谱, $m/e(ES^+)1024.6(MH^+)$: 氨基酸分析给出 Arg1.15, (Ala+Iib)3.88, Val0.96, Ile1.02.

实施例 10Phv-Ala-Arg-Ala-His-Val-Iib-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:10)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成的第一

20 部分, 以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH (用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护, 以产生 Fmoc-Val-Iib-Ala-Papa-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪 (ABI431) 上, 按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方式类似的方式从树脂上裂解下

25 肽并用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 20-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=18.8 分钟; 质谱, $m/e(ES^+)1070.6(MH^+)$: 氨基酸分析给出 Arg1.02, (Aia+Iib)4.12, Val0.90, His0.95.

30 实施例 11Phv-Ala-Ala-Asn-Arg-Val-Iib-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:11)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成的第一部分, 以合适的次序使 Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保

护，以产生 Fmoc-Iib-Ala-Pip-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪 (ABI431) 上，按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方式类似的方式从树脂上裂解下肽并用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所
5 描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=17.66 分钟；质谱， $m/e(ES^+)1025.5(MH^+)$ ；氨基酸分析给出 Arg1.04，Ala2.94，Val0.95, Asp1.05。

10 实施例 12 Phv-Ala-Arg-Ala-Iib-Ala-Ala-Ala-Pip-NH₂ (SEQIDNO:12)

用与实施例 2.6 所描述的方法类似的方法在 ABI431 自动合成仪上自动进行合成的第一部分，以合适的次序偶联 Fmoc-保护的氨基酸，以产生 Fmoc-Ala-Ala-Pip-NH-树脂。剩下的合成人工进行。以与实施例 1.4 所述的方法类似的方法用制备型 RP-HPLC 纯化产物。以与实施
15 例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=16.68 分钟；质谱， $m/e(ES^+)954.6(MH^+)$ ；氨基酸分析给出 Arg1.09，(Ala+Iib)5.88。

20 实施例 13 Phv - Ala - Arg - Ala - Ala - Thr - Iib - Gly - NH(CH₂)₃NH.C(=NH).NH₂ (SEQIDNO:14)

(a) 制备 Phv - Ala - Arg - Ala - Ala - Thr - Iib - Gly - NH(CH₂)₃NH₂ (SEQIDNO:13)

通过在室温下与在 DMF (4ml) 中的 1, 3-二氨基丙烷 (0.42ml) 反应 1 小时，将 2-氯三苯甲基氯化物树脂 (0.4g, 可用氯大约 0.25mmole)
25 转变成 (3-氨基丙基) 氨基-树脂，用 DMF 充分洗涤后，将该树脂转移到 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上，按照制造商推荐的条件进行合适保护的氨基酸顺序偶联和脱保护。然后用甲醇洗涤树脂并干燥 (0.722g)。从树脂上裂解下肽，以与实施例 2.6 所述的方法类似的方法用制备型 RP-HPLC 纯化产物。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式
30 经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，采用 40 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.2 毫升/分钟) 保留时间=17.76 分钟。由此获得 Phv-Ala-Arg-Ala-Ala-

Thr-IIb-Gly-NH(CH₂)₃NH₂ (SEQIDNO:13) (冻干后获得 329mg); 质谱, m/e (ES⁺) 916.5 (MH⁺).

(b) 制备 Phv - Ala - Arg - Ala - Ala - Thr - IIb - Gly - NH(CH₂)₃NH. C(=NH). NH₂ (SEQIDNO:14)

5 将 Phv - Ala - Arg - Ala - Ala - Thr - IIb - Gly - NH(CH₂)₃NH₂ (SEQIDNO:13) (329mg) 溶解到水 (5ml) 和乙腈 (5ml) 混合物中, 加入 1-H-吡唑-1-羧脒氢氯化物 (132mg, 3 当量) 和二异丙基乙胺 (52 微升, 1 当量)。在室温下搅拌混合物 4 天。以与实施例 1.4 所述的方法类似的方法用制备型 RP-HPLC 纯化混合物, 并且经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征, 由此获得 Phv-Ala-Arg-Ala-Ala-Thr-IIb-Gly-NH(CH₂)₃NH. C(=NH). NH₂ (SEQIDNO:14) (178mg); RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 40 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.2 毫升/分钟) 保留时间=18.42 分钟; 质谱, m/e (ES⁺) 958.5 (MH⁺); 氨基酸分析给出 Thr0.86, Gly0.90, Ala3.20, Arg1.00.

15 实施例 14 Phv-Ala-Arg-Ala-Arg-Thr-IIb-Gly-NHEt (SEQIDNO:15)

从 Boc-Gly-O-苄基酯树脂 (Merrifield 树脂) (0.54g, 0.25mmole) 开始, 在 Applied Biosystems 430A 合成仪上进行合成的第一部分, 并且按照制造商推荐的条件使适当保护的氨基酸顺序偶联和脱保护。树脂以甲醇洗涤, 并且干燥 (871mg), 然后在室温下与 DMF (10ml) 和在甲醇 (10ml) 中的 2M 乙胺一起轻轻搅拌 7 天。RP-HPLC 分析表明迅速将甲基酯释放进溶液中, 其后缓慢地转变为稍微更亲水的 N-乙基酰胺。过滤混合物, 以 DMF 洗涤树脂。蒸发溶剂, 产生粗的为 N-乙基酰胺的保护肽。用 TFA, TES 和水 (90:5:5) 的混合物使肽脱保护, 采用与实施例 2.6 中所描述的类似的方法经制备型 RP-HPLC 纯化, 得到 Phv-Ala-Arg-Ala-Arg-Thr-IIb-Gly-NHEt (SEQIDNO:15) (168mg)。以与实施例 1.4 所述的方法类似的方法经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征; RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 40 分钟内的 10-50% 乙腈梯度, 流速 1.2 毫升/分钟) 保留时间=17.85 分钟; 质谱, m/e (ES⁺) 972.5 (MH⁺); 氨基酸分析给出 Thr0.83, Gly1.03, Ala2.17, IIb0.9, Arg2.00.

实施例 15 和 16

Phv - Gap - Ala - Ala - Ala - Thr - IIb - Ala - Papa - NH₂ (实施例

15) (SEQIDNO:16)

Phv - Gap (Me)₄ - Ala - Ala - Ala - Thr - Iib - Ala - Papa - NH₂ (实施例 16) (SEQIDNO:17)

(a) 制备 Phv-Dap-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:36)

5 用 FmocRink 酰胺树脂 (0.25mmole), 在 AppliedBiosystems430A 合成仪上自动完成合成, 并且按照制造商推荐的条件使适当保护的氨基酸顺序偶联和脱保护。在合成的适当阶段用 Fmoc-Dap (Boc)-OH 掺入 Dap 残基。干燥所完成的树脂。产率 1.292g (重量增加, 792mg)。从树脂上裂解下肽, 以与实施例 1.4 所述的方法类似的方法用制备型 RP-
10 HPLC 纯化。但是采用 Dynamax60A 柱 (一英寸内径), 用包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 60 分钟内的 10-40%乙腈梯度, 流速 1.2 毫升/分钟), 产生 Phv - Dap - Ala - Ala - Ala - Thr - Iib - Ala - Papa - NH₂ (SEQIDNO:36) (304mg)。以与实施例 1.4 所述的方法类似的方法经 HPLC 和质谱确定产物的特征; RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗
15 脱, 采用 40 分钟内的 10-40%乙腈梯度, 流速 12 毫升/分钟) 保留时间 =24.5 分钟; 质谱, m/e (ES⁺) 937.1 (MH⁺)。

(b) 将 (a) 的 Dap 肽溶解在水 (7ml) 和乙腈 (5ml) 中, 并且在室温下用 1-H-吡唑-1-羧脒盐酸盐 (130mg) 和二异丙基乙胺 (53 微升) 处理 1 周。RP-HPLC 分析表明仅 40% 转变成为对应的 Gap 肽。尝试的制备型 RP-HPLC
20 不能完全分离两个化合物。因此, 混合物在 DMF (50ml) 中用 HBTU (87mg) 和二异丙基乙胺 (50 微升) 处理 16 小时, 以将未改变的 Dap 肽转化成为四甲基胍 (GapMe₄) 肽。这一化合物的额外的疏水性使制备性 HPLC 更容易 (条件如 (a) 中所述)。采用在以上 (a) 中所描述的那些条件相同的条件下进行。产生

25 (i) Phv-Gap-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:16) (80mg), 以与实施例 1.4 所述的方法类似的方法经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定其特征; RP-HPLC (40 分钟内的 10-40%乙腈梯度, 流速 1.2 毫升/分钟) 保留时间 =26.2 分钟; 质谱, m/e (ES⁺) 978.5 (MH⁺); 氨基酸分析给出 Thr 0.90, Ala 4.05, Iib 存在,
30 峰在 Gap 的 Trp 位置。和

(ii) Phv - Gap (Me)₄ - Ala - Ala - Ala - Thr - Iib - Ala - Papa - NH₂ (122mg) (SEQIDNO:17), 如以上 (i) 确定其特征; RP - HPLC (如以上 (i)

的洗脱液和梯度)保留时间=28.4 分钟; 质谱, $m/e(ES^+)1034.6(MH^+)$; 氨基酸分析给出 Thr0.90, Ala4.11, Iib 存在, 峰在 $Gap(Me)_4$ 的 Trp 位置。

5 实施例 17 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Gly-NHCH₂CH₂- 吗啉 (SEQIDNO:18)

采用保护片段策略。通过在 N-二异丙基乙胺(4mmol)存在下将 Fmoc-Gly-OH(2mmol)与 2-氯三苯甲基氯化物树脂(1g, 1 mmol 在 DMF (10 ml) 中偶联, 在 AppliedBiosystems430A 合成仪上自动制备 Fmoc-Gly-O-氯三苯甲基树脂(1mmol, 1g), 并且通过双偶联策略(以与
10 实施例 2.6 中所描述的类似的方式)延长, 产生保护的肽树脂(2.15g)。在室温下用二氯甲烷(30ml), 乙酸(5ml)和三氟乙醇(5ml)从树脂上裂解 1 小时后, 滤掉树脂, 并且以二氯甲烷和乙酸洗涤。蒸发溶剂, 接着从含水乙腈冻干, 产生所需的保护的肽酸(1.23g)。以与实施例 1.4
15 中所描述类似的方式确定该肽的特征; RP-HPLC(40 分钟内 20-80%乙腈梯度, 流速 1.2ml/分钟)保留时间=26.2 分钟。

用 HBTU(76mg, 1 当量)和二异丙基乙胺(70 微升)在 DMF(10ml) 中将保护的酸(235mg, 0.2mmol)偶联到 4-(2-氨基乙基)吗啉(27 微升, 1 当量)上。用与实施例 1.4 中所描述方法类似的方法, 蒸发溶剂, 用 90%TFA/H₂O 脱保护并纯化, 产生纯化的酰胺(150mg)。以与实施例 1.4
20 所述的方法类似的方法经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定肽的特征; RP-HPLC(40 分钟内的 10-40%乙腈梯度, 流速 1.2 毫升/分钟)保留时间=18.6 分钟; 质谱, $m/e(ES^+)972.8(MH^+)$; 氨基酸分析给出 Thr0.6, Gly1.02, Ala2.94, Iib0.9, Arg1.00。

25 实施例 18 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Gly-N(CH₂CH₂)₂NCH₂CH₂O-CH₂CH₂OH (SEQIDNO:19)

采用与实施例 17 中描述方法类似的方法, 但是用 4-[2-(2-羟乙氧基)乙基]哌嗪替代 4-(2-氨基乙基)吗啉, 由此获得 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Gly-N(CH₂CH₂)₂NCH₂CH₂O-CH₂CH₂OH (SEQIDNO:19)。以
30 与实施例 1.4 所述的方法类似的方法经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定该肽的特征; RP-HPLC(采用实施例 17 中所使用的洗脱液和梯度)保留时间=20.5 分钟; 质谱, $m/e(ES^+)1016.8(MH^+)$; 氨基酸分析给出 Thr0.89, Gly1.02, Ala2.98, Iib1.05, Arg1.00。

实施例 19 Phv - Arg - Ala - Ala - Ala - Thr - Iib - Gly - Pape - NHC(=NH)NH₂ (SEQIDNO:20)

采用与实施例 17 中描述方法类似的方法，但是用 4-(2-胍乙基)苯胺替代 4-(2-氨基乙基)吗啉，由此获得 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Gly-Pape-NHC(=NH)NH₂ (SEQIDNO:20)。采用与实施例 1.4 中所描述的类似的方式经制备型 HPLC 纯化该肽，但是使用 Vydac201HS1022 柱(一英寸内径)，以 12ml/分钟的流速，用包含 0.1%TFA 的乙腈-水梯度液(10-35%乙腈)在 60 分钟内洗脱。经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定该肽的特征；RP-HPLC(采用实施例 17 中所使用的洗脱液和梯度)保留时间=24.2 分钟；质谱，m/e(ES⁺)1021.1(MH⁺)；氨基酸分析给出 Thr0.8, Gly0.95, Ala2.86, Arg1.00, Iib 存在。

4-(2-胍乙基)苯胺二氢氯化物按如下制备。室温下在乙腈(10ml)和水(10ml)中将 4-硝基苯乙胺盐酸盐(1.013g, 5mmol)，1H-吡唑-1-羧胺盐酸盐 0.733g, 5 mmol 和 N-二异丙基乙胺(0.88ml, 5mmol)搅拌 16 小时。用 Dynamax60AC18 柱(一英寸内径)以两份进行制备型 RP-HPLC，用包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱。产生纯化的 4-硝基苯乙基胍。将产物溶解在水(100ml)中，加入一滴浓盐酸，其后加入 5%钨/碳(100mg)，使氢气泡通过溶液 4 小时。通过过滤除去催化剂，并且以水洗涤。由蒸发除去易挥发的材料，给出 4-(2-胍乙基)苯胺二氢氯化物棕色泡沫(0.984g)(用氢氧化钾小球干燥后)。

实施例 20 Phv-Ala-Ala-Ala-Arg-Thr-Iib-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:21)

用与实施例 2.6 所描述的方法类似的方法，用 HBTU/DIPEA 活化，人工完成合成的第一部分，以合适的次序使 Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护，以产生 Fmoc-Iib-Ala-Papa-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪(ABI431)上，按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方式类似的方式从树脂上裂解下肽并纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，采用 20 分钟内的 20-40%乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=11.57 分钟；质谱，m/e(ES⁺)1006.4(MH⁺)，503.8(M+2H⁺)，514.8(M+H⁺+Na⁺)：氨基酸分析给出 Ala4.19, Arg0.91, Thr0.74。

实施例 21 Phv-Ala-Arg-Ala-Arg-Thr-IIb-Azgly-Papa-NH₂ (SEQIDNO:22)

用与实施例 2.6 所描述的方法类似的方法，用 HBTU/DIPEA 活化，人工完成合成的第一部分，以合适的次序和使 Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-IIb-OH 偶联和脱保护，除了掺入 Azgly 残基外。通过于 50℃ 下在 DMF 中用 HOBT (0.25 当量) 与 Fmoc-Azgly-OSu (如在 EP518655 中获得的) (4 当量) 偶联 4 小时掺入 Azgly 残基，由此获得 Fmoc-IIb-AzGly-Papa-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪 (ABI431) 上，按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方式类似的方式从树脂上裂解下肽纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，采用 20 分钟内的 15-35%乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=8.10 分钟；质谱，m/e (负电喷射) (ES⁻) 1076.4 (MH⁻)，氨基酸分析给出 Ala2.10, Arg2.00, Thr0.99。

实施例 22 Phv-Ala-Arg-Ala-Arg-Thr-IIb-Azgly-NH₂ (SEQIDNO:23)

使用与实施例 21 中所描述的方法类似的方法。用 HBTU/DIPEA 活化，人工完成合成的第一部分，给出 Fmoc-IIb-Azgly-NH-树脂。然后将肽树脂转移到自动合成仪 (ABI431A) 上，按照制造商推荐的用于掺入 HBTU/HOBT 的单酰化化学法条件偶联序列中剩下的残基。以与实施例 2.6 所述的方法类似的方法从树脂上裂解下肽并用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，采用 20 分钟内的 20-35%乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间=7.26 分钟；质谱，m/e (ES⁺) 945.6 (MH⁺)，473.4 (M+2H⁺⁺)；氨基酸分析给出 Ala2.08, Arg2.00, Thr0.78。

实施例 23 Phv-Ala-Arg-Ala-IIb-Ala-Arg-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:24)

除了采用 HBTU/DIPEA 活化人工完成全部肽装配，以合适的次序偶联 Fmoc-Papa-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-IIb-OH 和 5-苯基戊酸外，使用与实施例 2.6 描述的类似的方法。用类似于实施例 2.6 中所描述的方法从树脂上裂解下肽，以与实施例 1.4 中所描述的方式类似的方式用制备型 RP-HPLC 纯化，用包含 0.1%TFA 的乙腈-水

梯度液(15-30%乙腈)在 90 分钟内洗脱, 流速 10ml/分钟。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 15-30%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=20.02 分钟; 质谱, 5 m/e(ES⁺)1061.6(MH⁺), 531.4(M+2H⁺); 氨基酸分析给出 Ala4.16, Arg2.00, Iib 存在。

实施例 243-(2-氨基苯并[b]噻吩-5-基)丙酰基-Ala-Arg-Ala-Iib-Ala-Arg-Ala-Papa-NH₂(SEQIDNO:25)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成和进行纯 10 化, 以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH(用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-Iib-OH 偶联和脱保护。并且用 3-(2-氨基苯并[b]噻吩-5-基)丙酸代替 5-苯基戊酸。以与实施例 1.4 中所描述的方式类似的方式用制备型 RP-HPLC 纯化, 用包含 0.1%TFA 的乙腈-水梯度液 (15-40%乙腈)在 60 分钟内洗脱, 流速 10ml/分钟。以与实施例 1.4 所 15 描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 30 分钟内的 10-50%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=17.58 分钟; 质谱, m/e(ES⁺)1114.7(MH⁺); 氨基酸分析给出 Arg2.86, Ala4.12, Iib1.00。

按照以下所述获得 3-(2-氨基苯并[b]噻吩-5-基)丙酸:

20 (a)于 60℃将兰尼氏镍(1g)和胼水合物(3ml)加入到在乙醇(500ml)中的 5-硝基苯并[b]噻吩-2-羧酸乙酯(25g)(如 Syn. Comm., (1991), 21, 959-964 中所描述的方法获得)中。随后发生剧烈反应, 回流混合物。以 10 分钟的间隙再加入几份兰尼氏镍(1g)和胼水合物(3ml), 直到总 25 共加入 15ml, 然后回流混合物 90 分钟。将热的混合物过滤, 并蒸发滤液。将残余物溶解在热的乙醇(300ml)中, 向其中加入活性炭。过滤混合物, 将滤液蒸发至干, 给出 5-氨基苯并[b]噻吩-2-羧酸乙酯(18g)淡黄色固体。在 -0℃下将该固体加入到浓盐酸(50ml)和水(130ml)的搅拌混合物中。缓慢地加入亚硝酸钠(5.6g)水(20ml)溶液, 接着在 0℃下 30 进一步搅拌混合物 30 分钟。然后缓慢地加入碘化钾(130g)水(200ml)溶液。使混合物温热至室温, 并且在 50℃加热 30 分钟。使混合物冷却, 以氯仿(150ml)提取, 用焦亚硫酸钠溶液洗涤有机层。干燥(MgSO₄)有机层, 并且蒸发至给出棕色油状物。采用己烷增加至 10%的乙酸乙酯/己

烷梯度液通过硅胶层析纯化该油状物。合并适当的组分，并蒸发至给出 5-碘代苯并[b]噻吩-2-羧酸乙酯 (14g) 油状物；NMR(d_6 -DMSO): 1.35(t, 3H), 4.4(q, 2H), 7.8(dd, 1H), 7.9(d, 1H), 8.15(s, 1H), 8.45(d, 1H)。

5 (b) 将氢氧化钠 (5g) 水 (150ml) 溶液加入到在乙醇 (200ml) 中的 5-碘代苯并[b]噻吩-2-羧酸乙酯 (14g) 中，将混合物搅拌 16 小时。通过蒸发将混合物浓缩至约 150ml，由加入稀盐酸将混合物的 pH 值调节至 3。然后以二乙醚提取 (2X100ml) 混合物。干燥 ($MgSO_4$) 合并的有机提取物，并且蒸发，给出 5-碘代苯并[b]噻吩-2-羧酸 (11.7g) 固体；NMR(d_6 -DMSO): 7.8(dd, 1H), 7.9(d, 1H), 8.05(s, 1H), 8.45(d, 1H)。

10 (c) 将草酰氯 (2.7ml) 和 DMF (1 滴) 加入到在二氯甲烷 (30ml) 中的 5-碘代苯并[b]噻吩-2-羧酸 (3.05g) 中，此时开始产生气体。在气体产生停止之后，将混合物蒸发至干，使残余物在 THF (10ml) 中溶解。将溶液分成几份加入到浓氨水 (25ml) 中。在加入完全之后，将混合物搅拌 1 小时。
15 由过滤收集沉淀的固体，以水洗涤，并且在真空下干燥。将固体 (3g) 溶解在 DMF (15ml) 中，在 0℃ 下将该混合物加入到 DMF (20ml) 和磷酸氯 (3g) 的混合物中。将混合物搅拌 2 小时。然后把混合物加入，到水 (60ml) 中，通过过滤收集沉淀的固体，以水洗涤，并且在真空下干燥，给出 2-氟基-5-碘代苯并[b]噻吩 (2.65g) 淡黄色粉末；NMR(d_6 -DMSO): 7.9(dd, 1H), 8.0(d, 1H), 8.3(s, 1H), 8.45(d, 1H)。

20 (d) 将丙烯酸甲酯 (2g)，三乙胺 (2.35g) 和乙酸钨 (0.05g) 加入到在 DMF (25ml) 中的 2-氟基-5-碘代苯并[b]噻吩 (4.8g) 中，在氩氛围下 90℃ 搅拌混合物 30 分钟。使混合物冷却，然后加入水 (50ml) 中。通过过滤收集沉淀的固体，并且溶解在氯仿中。加入活性炭，过滤混合物并干燥滤液 ($MgSO_4$)。通过蒸发除去溶剂，给出 3-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基) 丙烯酸甲酯 (2.5g)；NMR(d_6 -DMSO): 3.75(s, 3H), 6.7(d, 1H), 7.8(d, 1H), 8.0(dd, 1H), 8.2(d, 1H), 8.3(d, 1H), 8.85(s, 1H)。

25 (e) 用 10% 钨/碳 (0.5g) 为催化剂在 THF (20ml) 中氢化 3-(2-氟基苯并[b]噻吩-5-基) 丙烯酸甲酯 (2.5g)。直到大多数起始物质在薄层层析 (用乙酸乙酯/己烷 1:4 洗脱二氧化硅板) 中消失。过滤混合物并蒸发，给出 2-氟基苯并[b]噻吩-5-丙酸甲酯 (1.45g)，其含有 ~ 20% 的起始物质。将氢氧化钠 (0.23g) 加入到在 THF (10ml) 和水 (3ml) 中的这一产物 (1.4g) 的混

合物中，将混合物搅拌 2 小时。混合物以浓盐酸调节至 ~ pH5，并且由蒸发浓缩除去存在的 THF。然后以浓盐酸将混合物的 pH 调节至 ~ pH3，用二氯甲烷提取混合物。干燥提取物 ($MgSO_4$)，并且蒸发。采用 C_{18} 柱和 40% 甲醇/水增加到 75% 甲醇/水的梯度液通过反相层析纯化残渣。合并适当的组分并蒸发，给出 2-氟基苯并[b]噻吩-5-丙酸 (0.28g) 白色固体；NMR ($CDCl_3$): 2.88 (t, 2H), 3.1 (t, 2H), 7.4 (d, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.8 (d, 1H), 7.85 (s, 1H)。

实施例 25 Phv-Arg-Ala-Ala-IIb-Ala-Arg-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:26)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成和进行纯化，以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH (用于代替 Fmoc-Pip-OH)，Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-IIb-OH 偶联和脱保护。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1% TFA 的乙腈和水洗脱，采用 30 分钟内的 10-50% 乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间 = 17.45 分钟；质谱， m/e (ES^+) 1061.9 (MH^+)；氨基酸分析给出 Arg 1.94, Ala 4.04, IIb 1.02。

实施例 26 Phv-Arg-Ile-Ala-IIb-Ala-Arg-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:27)

除了人工掺入 Fmoc-IIb-OH 外，用与实施例 2.6 所描述的方法类似的方法在自动合成仪 (ABI431) 上进行自动合成，以合适的次序偶联 Fmoc-Papa-OH 和 Fmoc-保护的氨基酸脱保护。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1% TFA 的乙腈和水洗脱，采用 30 分钟内的 10-50% 乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间 = 20.7 分钟；质谱， m/e (ES^+) 1103.8 (MH^+)；氨基酸分析给出 Arg 1.92, Ala 3.03, IIb 0.96, Ile 1.08。

25 实施例 27 Phv-Ile-Arg-Ala-IIb-Leu-Arg-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:28)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成和进行纯化，以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH (用于代替 Fmoc-Pip-OH)，Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-IIb-OH 偶联和脱保护。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (由包含 0.1% TFA 的乙腈和水洗脱，采用 30 分钟内的 10-50% 乙腈梯度，流速 1.0 毫升/分钟) 保留时间 = 23.8 分钟；质谱， m/e (ES^+) 1145.7 (MH^+)；氨基酸分析给出 Arg 1.98, Ala 1.92, Leu 0.99，

Ile1.09, IIb 存在。

实施例 28 Phv-Ala-Arg-Ala-IIc-Ala-Ala-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:29)

用与实施例 1.4 所描述的方法类似的方法人工完成合成, 以合适的次序使 Fmoc-Papa-OH(用于代替 Fmoc-Pip-OH), Fmoc-保护的氨基酸和 Fmoc-IIb-OH 偶联和脱保护。产物不需要经制备型 HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 20 分钟内的 20-40%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=10.45 分钟; 质谱, m/e(ES⁺)962.5(MH⁺), 492.8(M+H+Na)⁺⁺;氨基酸分析给出 Ala4.90, Arg1.00, IIc 存在。

用与实施例 1 中所描述的制备 Fmoc-IIb-OH 的方法类似的方法获得 Fmoc-IIc-OH, 但是在步骤 1.1 中用甘氨酸甲酯盐酸盐替代 L-丙氨酸甲酯盐酸盐。获得下列中间体: Boc-(D)-Met-Gly-OMe; 80%产率; NMR(CDCl₃):1.4d(s, 9H), 2.0d(m, 1H), 2.1d(m, 1H), 2.1d(s, 3H), 2.6d(t, 2H), 3.8d(s, 3H), 4.05d(m, 2H), 4.4d(m, 1H), 5.3d(bs, 1H), 6.8d(bs, 1H);

2-[(3R)-3-(N-[叔丁氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]乙酸甲酯; 50%产率; NMR(CDCl₃):1.45d(s, 9H), 2.0d(m, 1H), 2.6d(m, 1H), 3.4d(m, 2H), 3.8d(s, 3H), 4.05d(q, 2H), 4.1d(m, 1H), 5.55(bs, 1H);

2-[(3R)-3-(N-[9-苄基甲氧羰基]氨基)-2-氧代-吡咯烷-1-基]乙酸; 75%产率; NMR(d₆-DMSO):1.9d(m, 1H), 2.3d(m, 1H), 3.3d(m, 2H), 4.0d(q, 2H), 4.3d(m, 4H), 7.4d(m, 4H), 7.6d(m, 2H), 7.9d(d, 2H)。

实施例 29 Phv-Arg-Ala-Ala-IIb-Ala-Ala-Ala-Papa-NH₂ (SEQIDNO:30)

除了 Fmoc-IIb-OH 人工掺入外, 在 ACT 357 自动肽合成仪上进行自动合成(采用 Rink 酰胺树脂), 以适当的顺序偶联 Fmoc-Papa-OH 与 Fmoc-保护的氨基酸。通过在转移到树脂上之前, 在 DMF 中用二异丙基碳化二亚胺(1 当量)和 HOBT(1 当量)活化羧酸(1mmol)11 分钟, 按照制造商推荐的用于单酰化的条件完成自动偶联。使酰化进行大约 60 分钟, 以类似实施例 2.6 所描述的方法进行洗涤和脱保护过程。在 BondElut 管中用 HBTU/HOBT 化学法进行 Fmoc-IIb-OH 的人工偶联。5-苯基戊酸需要双偶联才能获得 Kaiser 试验的阳性结果。然后用类似于实施例 1.4 中所描述的方法从树脂上裂解下肽并用制备型 RP-HPLC 纯化。以与实

5 施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征: RP-HPLC(由包含 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱, 采用 15 分钟内的 20-35%乙腈梯度, 流速 1.0 毫升/分钟)保留时间=10.33 分钟; 质谱, m/e (ES^+) 976.5 (MH^+), 499.9 ($M+H+Na$)⁺⁺; 氨基酸分析给出 Ala5.02, Arg1.00, Iib1.22.

实 施 例 30Phv-Lys(=C(NMe₂)₂)-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-NH₂(SEQIDNO:31)

10 用与实施例 15(a) 中所描述的类似的方法, 但是用 Fmoc-Lys(Boc)-OH 替代 Fmoc-Dap(Boc)-OH, 在从树脂上裂解下肽并用制备型 RP-HPLC 纯化后, 获得 Phv-Lys-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-NH₂(270mg)。然后将该肽(270mg)在 HBTU(94mg), 二异丙基乙胺(88 微升)和 DMF(50ml)的混合物中搅拌 16 小时的。用与实施例 15(a)中所描述的类似的方法蒸发混合物并由制备型 RP-HPLC 纯化。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC, 质谱和氨基酸分析确定产物的特征:
15 RP-HPLC(40 分钟内的 10-40%乙腈梯度, 流速 1.2 毫升/分钟)保留时间=29.83 分钟; 质谱, m/e (ES^+) 1077.27 (MH^+); 氨基酸分析给出 Thr1.0, Ala4.3, Arg1.00, Iib 存在; 四甲基高精氨酸存在。

实 施 例 31-33

20 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-NHCH₂CH₂ 吗 啉 (实 施 例 31) (SEQIDNO:32)

Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-OCH₃ (实 施 例 32) (SEQIDNO: 33)

Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-OH (实 施 例 33) (SEQIDNO:34)

25 于室温下在 DMF(5ml)和二氯甲烷(20ml)中将羟甲基聚苯乙烯树脂(1.67g, 1mmol)与 Fmoc-Papa-OH(1.5g, 4mmol), 二异丙基碳化二亚胺(0.628ml4mmol)和二甲氨基吡啶(61mg, 0.5mmol)一起搅拌 2 小时。过滤树脂, 以 DMF(5x20ml)和甲醇(5x20ml)洗涤, 并且在 40℃下真空干燥(产量 2.105g)。然后将肽树脂转移到自动合成仪(ABI431A)上, 以与
30 实施例 2.6 中所述类似的方式偶联剩下的 Fmoc-保护的氨基酸, 给出保护的肽树脂(2.992g)。然后将肽树脂悬浮在 DMF(10ml)和甲醇(10ml)和 4-(2-氨基乙基)吗啉(0.88ml)的混合物中, 随后加入催化量的氰化钾

(50mg)。在室温下 7 天之后，过滤混合物，以 DMF (5x20ml) 洗涤树脂。立即将树脂重悬于 DMF (10ml)，甲醇 (10ml) 和氰化钾 (50mg) 的混合物中。在 4 天之后，过滤混合物，以 DMF (5x20ml) 洗涤树脂。合并两次处理的所有滤液和洗涤液，并蒸发至干。在用 90%TFA/H₂O 脱保护和蒸发除去易挥发的物质之后，采用与实施例 1.4 中所描述的类似的方法经

5 制备型 RP-HPLC 纯化残余物，给出 3 种产品。各产品具有以下特征：
Phv - Arg - Ala - Ala - Ala - Thr - Iib - Ala - Papa - NHCH₂CH₂ - 吗啉 (SEQIDNO:32) (40mg)；

RP-HPLC (40 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.2ml/分钟) 保留时
10 间=19.5 分钟；质谱，m/e (ES⁺) 1119.8 (MH)⁺；氨基酸分析给出 Thr 0.58, Ala 3.84, Arg 1.16, Iib 1.00；

Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-OMe (SEQIDNO:33) (37mg)；

RP-HPLC (40 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.2ml/分钟) 保留
15 时间=27.7 分钟；质谱，m/e (ES⁺) 1021.6 (MH)⁺；氨基酸分析给出 Thr 0.61, Ala 3.80, Arg 1.22, Iib 0.97；

Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-OH (SEQIDNO:34) (155mg)；

RP-HPLC (40 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.2ml/分钟) 保留
20 时间=24.2 分钟；质谱，m/e (ES⁺) 1007.5 (MH)⁺；氨基酸分析给出 Thr 0.62, Ala 3.78, Arg 1.20, Iib 0.98。

20 实施例 34

Phv - Arg - Ala - Ala - Ala - Thr - Iib - Ala - Papa - N(CH₂CH₂)₂N - (CH₂)₂O(CH₂)₂OH (SEQIDNO:35)

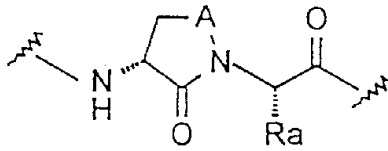
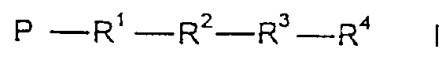
将 4-[2-(2-羟乙氧基)乙基]哌嗪 (235mg) 加入到 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-OH (135mg), HBTU (51mg), DIPEA (47 微升)
25 和 DMF (10ml) 的混合物中，搅拌混合物 60 分钟。蒸发除去易挥发的物质，用与实施例 1.4 所描述的类似的方法经制备型 HPLC 纯化残余物，给出 Phv-Arg-Ala-Ala-Ala-Thr-Iib-Ala-Papa-N(CH₂CH₂)₂NCH₂CH₂-OCH₂CH₂OH (SEQIDNO:34) (115mg)。以与实施例 1.4 所描述的方式类似的方式经 HPLC，质谱和氨基酸分析确定产物的特征：RP-HPLC (用含有
30 0.1%TFA 的乙腈和水洗脱，40 分钟内的 10-50%乙腈梯度，流速 1.2 毫升/分钟) 保留时间=18.83 分钟；质谱，m/e (ES⁺) 1163.8 (MH)⁺；氨基酸分析给出 Thr 0.62, Ala 3.80, Arg 1.22, Iib 0.97。

实施例 35

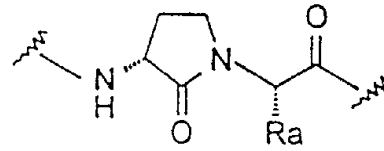
本发明的化合物可以为了治疗和预防用途以常规药物组合物的形式施用于温血动物，如人，这种组合物的一个典型的例子包括： -

可注射的溶液

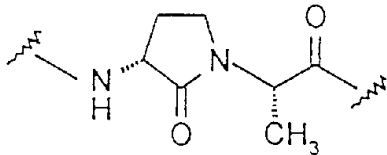
- 5 将 0.01 至 100mg 活性组分溶解在高达 2ml 的含水注射载体中，得到 0.01 至 100mg/ml 之间的活性组分浓度。所说的含水注射载体用一种药学上可接受的缓冲液(例如磷酸盐或乙酸盐缓冲液)将 pH 值缓冲至 5 和 8 之间，并且含有一种加入以获得等张性的药学上可接受的张力调节剂(例如，氯化钠或葡萄糖)。所说的载体可以含有也可以不含有其
- 10 它药学上可接受的赋形剂，例如增溶剂(如 DMSO，乙醇，丙二醇或聚乙二醇)、防腐剂 and 抗氧化剂。活性组分典型地可以是在上文中所描述的例子，并且可以方便地以一种药学上可接受的盐的形式存在。



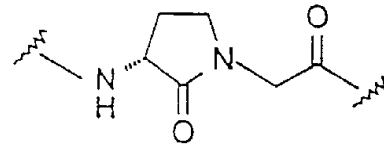
II



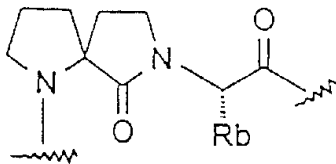
IIa



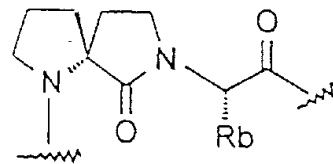
IIb



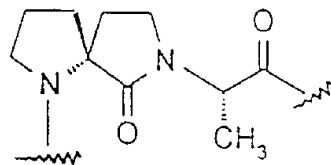
IIc



III



IIIa



IIIb

序 列 表

(1) 一般信息:

- 5 (i) 申请人:
- (A) 名称: ZENECALIMITED
 - (B) 街道: 15STANHOPEGATE
 - (C) 城市: 伦敦
 - (E) 国家: 联合王国
 - 10 (F) 邮区代码(ZIP): W1Y6LN
 - (G) 电话: 01713045000
 - (H) 传真: 01713045151
 - (I) 电传: 01718342042
- (ii) 发明名称: 肽衍生物
- 15 (iii) 序列数: 36
- (iv) 计算机可读形式:
- (A) 介质类型: 软盘
 - (B) 计算机: IBMPC 兼容机
 - (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
 - 20 (D) 软件: PatentInRelease#1.0, #1.30 版(EPO)
- (vi) 在先申请的数据:
- (A) 申请号: GB9603855.9
 - (B) 申请日: 1996 年 2 月 23 日
- (vii) 在先申请的数据:
- 25 (A) 申请号: GB9620819.4
 - (B) 申请日: 1996 年 10 月 5 日

(2) SEQIDNO:1 的信息:

- (i) 序列特征:
- 30 (A) 长度: 6 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型: 单链

- (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: 肽
- (ix) 特征:
- 5 (A) 名称/关键词: 肽
(B) 位置: 1
(D) 其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基(Phenylpentanoyl)-Ala"
- (ix) 特征:
- 10 (A) 名称/关键词: 肽
(B) 位置: 6
(D) 其它信息: /产物="其它"
/注=
"[(S((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)-丙酰基
(propanoyl)]-Ala-哌啶-4-甲酰胺"
- 15 (xi) 序列描述: SEQIDNO:1:
Xaa Ala Ala Lys Val Xaa
1 5
- (2) SEQIDNO:2 的信息:
- 20 (i) 序列特征:
(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线型
- 25 (ii) 分子类型: 肽
(ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 肽
(B) 位置: 1
(D) 其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Ala"
- 30 (ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

“[(S)-2-(6-氧代-1, 7-二氮杂螺环[4.4]壬-7-基)丙酰基]-Ala-哌啶-4-甲酰胺”

5

(xi)序列描述: SEQIDNO:2:

XaaAlaAlaLysValXaa

1

5

10 (2)SEQIDNO:3的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

15

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

20

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 4

25

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

“[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala”

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

30

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="Ala-哌啶-4-甲酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:3:

XaaLysAlaXaaAlaXaa

1 5

5 (2) SEQIDNO:4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

15 (D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ile"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

20 (D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-
4-氨基苯基乙酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:4:

25 XaaAlaAlaArgThrXaa

1 5

(2) SEQIDNO:5 的信息:

(i) 序列特征:

30 (A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链



(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

5

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

10

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基-Ala-
哌啶-4-甲酰胺"

15

(xi)序列描述: SEQIDNO:5:

XaaAlaAlaAlaValXaa

1

5

(2)SEQIDNO:6 的信息:

20

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

25

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

30

/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

5

(xi)序列描述: SEQIDNO:6:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1

5

10 (2)SEQIDNO:7的信息:

(i)序列特征:

(A)长度 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

15

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

20

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

25

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi)序列描述: SEQIDNO:7:

XaaAlaAlaArgValXaa

1

5

30

(2) SEQIDNO:8 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

10 (B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

15 (B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-
4-氨基苯基乙酰胺"

20 (xi) 序列描述: SEQIDNO:8:

XaaArgAlaArgValXaa

1 5

(2) SEQIDNO:9 的信息:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

30 (ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix)特征:

5

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-哌

10

啉-4-甲酰胺"

(xi)序列描述: SEQIDNO:9:

XaaIleAlaArgValXaa

1

5

15 (2)SEQIDNO:10 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

20

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

25

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

30

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-

4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 序列描述: SEQIDNO:10:

XaaArgAlaHisValXaa

1 5

5

(2) SEQIDNO:11 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

10

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

15

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

20

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-

Ala-哌啶-4-甲酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:11:

25

XaaAlaAsnArgValXaa

1 5

(2) SEQIDNO:12 的信息:

(i) 序列特征:

30

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链



- (D)拓扑结构: 线型
- (ii)分子类型: 肽
- (ix)特征:
 - (A)名称/关键词: 肽
 - 5 (B)位置: 1
 - (D)其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Ala"
- (ix)特征:
 - (A)名称/关键词:
 - 10 (B)位置: 4
 - (D)其它信息: 产物="其它"
/注=
"[(S-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基)-Ala]"
- (ix)特征:
 - (A)名称/关键词: 肽
 - 15 (8)位置: 6
 - (D)其它信息: /产物="其它"
/注="Ala-吡啶-4-甲酰胺"
- (xi)序列描述: SEQIDNO:12:
 - 20 XaaArgAlaXaaAlaXaa
 - 1 5
- (2)SEQIDNO:13 的信息:
 - (ii)序列特征:
 - 25 (A)长度: 6 个氨基酸
 - (B)类型: 氨基酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑结构: 线型
 - (ii)分子类型: 肽
 - 30 (ix)特征:
 - (A)名称/关键词: 肽
 - (B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

5 (B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-3-氨基苯基丙胺"

10 (xi)序列描述: SEQIDNO:13:

XaaArgAlaAlaThrXaa

1

5

(2)SEQIDNO:14的信息:

15 (i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

20 (ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

25 /注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

30 /注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-3-氨基丙基胍"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:14:

XaaArgAlaAlaThrXaa

1 5

5 (2) SEQIDNO:15 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

15 (D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

20 (D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-氨基乙基"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:15:

25 XaaArgAlaArgThrXaa

1 5

(2) SEQIDNO:16 的信息:

(i) 序列特征:

30 (A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

5

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-3-胍基Ala"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

10

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

15

(xi) 序列描述: SEQIDNO:16:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1

5

(2) SEQIDNO:17 的信息:

20

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

25

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词:

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

30

/注=

"5-苯基戊酰基-3-(四甲基胍基)Ala"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

5

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:17:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1

5

10

(2) SEQIDNO:18 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

15

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

20

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

25

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-4-(2-氨基乙基)吗啉"

30

(xi) 序列描述: SEQIDNO:18:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1

5

(2)EQIDNO:19 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

5 (B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

10 (A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

15 (A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-哌

20 嗪-4-基. CH₂CH₂OCH₂CH₂OH"

(xi)序列描述: SEOIDNO:19:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1

5

25 (2)SEQIDNO:20 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

30 (D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)称/关键词: 肽
(B)位置: 1
(D)其它信息: 、产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Arg"

5 (ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽
(B)位置: 6
(D)其它信息: /产物="其它"
/注=

10 "[S]-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Gly-4-氨基苯乙基胍"

(xi)序列描述: SEQIDNO:20:

XaaAlaAlaAlaThrXaa
1 5

15

(2)SEQIDNO:21 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸
(B)类型: 氨基酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑结构: 线型

20

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽
(B)位置: 1
(D)其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Ala"

25

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽
(B)位置: 6
(D)其它信息: /产物="其它"
/注=

30

“[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 序列描述: SEQIDNO:21:

XaaAlaAlaArgThrXaa

5 1 5

(2) SEQIDNO:22 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

10 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

15 (A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Ala"

(ix) 特征:

20 (A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

25 “[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-[NH-NH-
CO]-4-氨基苯基乙酰胺”

(xi) 序列描述: SEQIDNO:22:

XaaArgAlaArgThrXaa

1 5

30 (2) SEQIDNO:23 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 链
- (D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

5

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词:
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯戊酰基-Ala"

10

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 6
- (D) 其它信息: /产物="其它"
/注=

15

“[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-NH-NH-
CONH₂”

- (xi) 序列描述: SEQIDNO:23:
XaaArgAlaArgThrXaa
1 5

20

(2) SEQIDNO:24 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 6 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线型

25

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯戊酰基-Ala"

30

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 4

(D)其它信息: /产物="其它"/

5

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

10

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi)序列描述: SEQIDNO:24:

XaaArgAlaXaaArgXaa

1

5

15

(2)SEQIDNO:25的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

20

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

25

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="3-(2-氨基苯并[b]噻吩-5-基)丙酰基-Ala"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

30

(B)位置: 4

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

“[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala”

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

5 (D)其它信息: /产物="其它"

注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi)序列描述: SEQIDNO:25:

XaaArgAlaXaaArgXaa

1 5

10

(2)SEQIDNO:26 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型氨基酸

15 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

20 (B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

25 (B)位置: 4

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

“[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala”

(ix)特征:

30 (A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:26:

XaaAlaAlaXaaArgXaa

1 5

5

(2) SEQIDNO:27 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

10

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

15

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

20

(B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala"

(ix) 特征:

25

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:27:

30

XaaIleAlaXaaArgXaa

1 5

(2) SEQIDNO:28 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

10 (B) 位置: 1

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯戊酰基-Ile"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

15 (B) 位置: 4

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Leu"

(ix) 特征:

20 (A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

(D) 其它信息: /产物="其它"

/注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:28:

25 XaaArgAlaXaaArgXaa

1 5

(2) SEQIDNO:29 的信息:

(i) 序列特征:

30 (A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

- (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: 肽
- (ix) 特征:
- (A) 名称/关键词: 肽
- 5 (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Ala"
- (ix) 特征:
- (A) 名称/关键词: 肽
- 10 (B) 位置: 4
- (D) 其它信息: /产物="其它"
/注=
"[(R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基]乙酰基]-Ala"
- (ix) 特征:
- (A) 称/关键词: 肽
- 15 (B) 位置: 6
- (D) 其它信息: /产物="其它"
/注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"
- (xi) 序列描述: SEQIDNO:29:
- 20 XaaArgAlaXaaAlaXaa
1 5
- (2) SEQIDNO:30 的信息:
- (i) 序列特征:
- 25 (A) 长度: 6 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: 肽
- (ix) 特征:
- 30 (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

5 (B)位置: 4

(D)其它信息: /产物="其它"
/注=

"[(S-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala"

(ix)特征:

10 (A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"
/注="Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi)序列描述: SEQIDNO:30:

15 XaaAlaAlaXaaAlaXaa

1 5

(2)SEQIDNO:31 的信息:

(i)序列特征:

20 (A)长度: 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

(ii)分子类型: 肽

25 (ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-四甲基高 Arg"

30 (ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

5 (xi)序列描述: SEQIDNO:31:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1 5

(2)SEQIDNO:32 的信息:

10 (i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

15 (ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

20 /注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

25 /注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-(4-氨基苯基. CH₂. CO. NH. CH₂CH₂. 吗啉"

(xi)序列描述: SEQIDNO:32:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

30 1 5

(2)SEQIDNO:33 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

5 (D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

10 (D) 其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

15 (D) 其它信息: /产物="其它"
/注=

“[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酸甲酯”

(xi) 序列描述 SEQIDNO:33:

20 XaaAlaAlaAlaThrXaa
1 5

(2) SEQIDNO:34 的信息:

(i) 序列特征:

25 (A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

30 (ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"
/注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

5 (B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"
/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酸"

10 (xi)序列描述: SEQIDNO:34:

XaaAlaAlaAlaThrXaa
1 5

(2)SEQIDNO:35 的信息:

15 (i)序列特征:

(A)长度: 6个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线型

20 (ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1

(D)其它信息: /产物="其它"

25 /注="5-苯基戊酰基-Arg"

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 6

(D)其它信息: /产物="其它"

30 /注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰基-哌嗪-4-基-CH₂CH₂OCH₂CH₂OH"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:35:

XaaAlaAlaAlaThrXaa

1 5

5 (2) SEQIDNO:36 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1

15 (D) 其它信息: /产物="其它"

/注="5-苯基戊酰基-Dpr"

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 6

20 (D) 其它信息: /产物="其它"

/注=

"[(S)-2-((R)-3-氨基-2-氧代吡咯烷-1-基)丙酰基]-Ala-4-氨基苯基乙酰胺"

(xi) 序列描述: SEQIDNO:36:

25 XaaAlaAlaAlaThrXaa

1 5