

长效 LHRH 拮抗剂的设计、合成和生物活性

周宁¹, 荣嫡², 程军平¹, 周文霞¹, 张永祥¹, 程卯生², 刘克良¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016)

摘要 根据抗蛋白酶降解的长效肽设计思想, 合成了一系列新型结构的 LHRH 拮抗剂类似物. 体内生物活性评价结果表明, 所设计的多肽具有比母体肽和阳性对照更长的体内抑制睾酮作用时间和较低的最低有效剂量, 证实了该设计思想的可行性, 并为开发长效 LHRH 拮抗剂药物提供了新的候选化合物.

关键词 LHRH 拮抗剂; 长效肽; 睾酮

中图分类号 O629.7

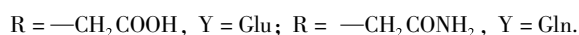
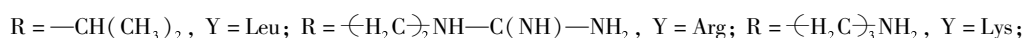
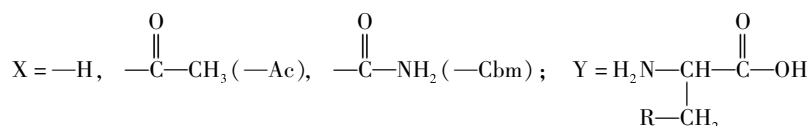
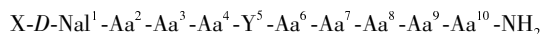
文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)06-1141-04

黄体生成素释放激素(Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH)是一种由下丘脑分泌的十肽激素, 其主要作用是促进垂体合成并释放黄体生成素(LH)和卵泡生成素(FSH), 激发青春期发育和调节生殖、生育及性激素相关过程^[1]. LHRH 类似物可分为激动剂和拮抗剂, 目前已用于与性激素分泌相关的疾病治疗, 如前列腺癌^[2,3]、子宫内膜异位症^[3]、儿童性早熟^[4]以及控制生育^[5,7]等. 目前, LHRH 激动剂是临床上治疗该类疾病的一线药物. 但与激动剂相比, LHRH 拮抗剂则可以直接阻断 LHRH 受体, 抑制垂体 LH 和 FSH 的释放, 从而使性激素分泌迅速减少, 因而具有见效快, 无上冲现象、停药后恢复快等优点, 因此在临床上将最终取代激动剂^[8].

与其它的肽类药物相似, 目前少数已上市的包括 Cetrorelix 在内的 LHRH 拮抗剂药物仍存在体内半衰期短的缺点, 不利于其临床治疗. 如何在保持较高活性的基础上进一步延长其体内半衰期, 得到长效的 LHRH 拮抗剂药物已成为发展该类药物的主要任务之一.

根据蛋白酶活性中心的结构特点及其水解肽键的机制^[9], 我们提出了一个新的长效肽设计思路, 即含有易形成氢键功能基的多肽可能通过与蛋白酶的活性中心竞争性结合, 形成可逆复合物, 阻断或减缓蛋白酶对肽键的水解, 从而延长多肽的体内半衰期, 达到长效的目的. 在 LHRH 拮抗剂的芳香性氨基酸上引入这类基团后, 得到的多肽比母体肽具有更长的体外半衰期和体内作用时间, 初步验证了我们的设计思路^[10]. 为了从多个角度验证该设计思想, 并拓宽其应用范围, 本文以 LHRH 拮抗剂为模型肽, 通过引入一系列侧链含有易形成氢键的直链氨基酸, 以期寻找到能够有效地抑制蛋白酶对多肽降解的功能基, 得到新的长效的高活性 LHRH 拮抗剂候选药物. LHRH 类似物的构效关系研究和体内代谢研究结果表明, N 端、5-位和 6-位是容易酶解的敏感位点, 且对生物活性的影响较小^[11,12]. 因此, 为了既增加代谢稳定性, 又能保持或增强其生物活性, 分别选择 LHRH 拮抗剂的 N 端和 5-位引入易形成氢键的功能基(如胍基、氨基、羧基、酰胺基), 合成了一系列新结构的 LHRH 类似物, 并对其进行了大鼠体内抑制睾酮的生物活性评价, 所设计多肽的序列通式如下:



收稿日期: 2007-10-25.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30500629)和北京市科委基础研究专项基金(批准号: Z0005187040531)资助.

联系人简介: 刘克良, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事多肽药物、核酸化学和药用高分子研究. E-mail: keliangliu@yahoo.com

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

MBHA 树脂(质量分数为 1% 的 DVB, 100 ~ 200 目, 0.6、0.67、0.96 mmol/g) 为天津南开合成责任有限公司产品; Boc-Leu-OH, Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH 和 Boc-Gln-OH 为上海吉尔生化公司产品; TFA 和 DIEA 为 Acros 公司产品; D-Nal·HCl 为成都凯泰公司产品; 其它试剂如不特别说明均为国产分析纯试剂。

D-tBu-Cbm-Nal-OH 按如下方法合成: 5 °C 下, 向 65 mL 甲醇中滴加 6.5 mL(90 mmol) SO₂Cl₂, 滴完后反应 1 h, 加入 D-Nal·HCl 6.5 g(24.4 mmol), 反应 48 h 后旋转蒸发除去甲醇, 加入乙醚重结晶, 得 D-Nal-OCH₃·HCl 白色晶体 6.3 g(产率 97.25%); 将该晶体溶于 100 mL 水中, 冰浴下加入 10% 碳酸钠水溶液 50 mL(51.26 mmol) 和 100 mL 二氧六环, 再滴入氯甲酸苯酯 2.91 mL(23.3 mmol), 室温搅拌 2 h 后旋转蒸发除去二氧六环, 用乙酸乙酯萃取, 酯层先后用水和饱和食盐水洗后, 用无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压浓缩, 加入石油醚, 得到白色晶体 D-PhOCO-Nal-OCH₃(7.13 g, 产率 91.4%, m. p. 79 ~ 80 °C); 将 D-PhOCO-Nal-OCH₃(6 mmol, 2.13 g) 溶于 60 mL 乙酸乙酯中, 加入叔丁胺(60 mmol, 9.6 mL), 在室温下搅拌 15 h 后旋转蒸发除去乙酸乙酯, 加入 40 mL 水, 用 1 mol/L 盐酸酸化至 pH = 2, 用乙酸乙酯萃取, 酯层先后用水和饱和食盐水洗, 用无水硫酸钠干燥. 经过滤、减压浓缩后, 加入石油醚析晶. 得白色晶体 D-tBu-Cbm-Nal-OCH₃(1.4 g, 产率 71.1%, m. p. 154 ~ 155 °C); 将其溶于 14 mL 甲醇中, 在冰浴下加入 2 mol/L NaOH 水溶液 14 mL, 室温下搅拌 5 h 后用 1 mol/L 盐酸酸化至 pH = 7, 旋转蒸发除去甲醇后, 用 1 mol/L 盐酸酸化至 pH = 2, 用乙酸乙酯萃取, 酯层先后用水和饱和食盐水洗, 用无水硫酸钠干燥. 经过滤、减压浓缩后, 加入石油醚析晶. 得白色固体 D-tBu-Cbm-Nal-OH(1.1 g, 产率 82.1%, m. p. 161 ~ 163 °C).

SD 雄性大鼠, 体重 230 g 左右(北京维通利华实验动物中心提供).

Biotage Inc. 中压液相色谱仪; Agilent 1100 型高效液相色谱仪; C₁₈ 反相分析柱(4.6 mm × 150 mm); ABI 公司 API3000 型质谱仪; 贝克曼化学发光仪 Beckman Coulter Access Immunoassay System.

1.2 实验过程

1.2.1 LHRH 拮抗剂的合成与纯化 按照标准 Merrifield 固相合成方法^[13], 采用 MBHA 树脂及 Boc 保护策略, 肽链由 C 端向 N 端延长, 缩合方法采用 DCC/HOBt 法或 BOP/DIEA 法. 用无水 HF 切割, 冰冻干燥后用中压色谱纯化(检测波长: 210 nm; 流速: 3 mL/min; 流动相: 30% CH₃CN/0.05% TFA/H₂O). 纯化后的样品分别用反相高效液相色谱分析纯度, 并用 ESI-MS 证实了结构.

1.2.2 LHRH 拮抗剂的生物活性评价 实验前称动物体重, 用玻璃毛细管从球后静脉丛采血, 分离血清后用化学发光法测定血清睾酮含量(睾酮测定的试剂盒、发光剂和 Wash buffer 缓冲液等为北京康大贝克曼科技有限公司提供的 BECKMAN COULTER Access Immunoassay System 专用试剂, 整个测定过程由仪器按预定程序自动完成), 按睾酮含量和体重随机分组, 每组 3 只动物, 一次性皮下注射给药 500 μg/kg(量效关系研究中的剂量不同), 分别于给药后 8, 16, 24, 32, 48 和 72 h, 从球后静脉丛采血, 以 5000 r/min 的速度离心 8 min, 将分离得到的血清用化学发光法测定血清睾酮含量.

2 结果与讨论

2.1 LHRH 类似物的合成与纯化

本文共合成了 15 个 LHRH 拮抗剂类似物, 所有化合物经中压色谱纯化后, 用 HPLC 进行再分析, 结构经质谱鉴定正确. 其序列结构及其它参数列于表 1.

从各个化合物在高效液相色谱上的保留时间可以看出, N 端基团在相同的条件下, 5-位用不同氨基酸替换后的多肽其保留时间符合 Leu > Glu > Gln > Arg > Lys 的规律; 而当 5-位氨基酸相同时, 例如为亮氨酸时, N 端用不同修饰基替换后的多肽其保留时间基本符合 Cbm > Ac > H 的规律. 从表 1 可以看出, 纯化后的多肽纯度均可以达到 95% 以上, 完全可以满足体内活性测定和体外代谢评价的要求.

Table 1 Synthesized peptide sequences, MS, HPLC data and duration of inhibiting testosterone secretion in rats

Sample	X, Y	<i>m/z</i> , Obs. (Calcd.) ^a	<i>t_R</i> /min ^b	Purity (%) ^b	Duration ^c /h
Cetrorelix ^d					8
1a	Ac, Leu ⁵	1469. 6(1469. 2)	12. 84	96. 9	8
1b	Ac, Lys ⁵	1484. 8(1484. 2)	10. 45	96. 6	8
1c	Ac, Arg ⁵	1512. 6(1512. 3)	11. 10	98. 7	24
1d	Ac, Glu ⁵	1485. 8(1485. 1)	12. 22	98. 0	16
1e	Ac, Gln ⁵	1484. 6(1484. 1)	12. 08	98. 7	48
2a	Cbm, Leu ⁵	1470. 2(1470. 2)	14. 45	96. 9	8
2b	Cbm, Lys ⁵	1484. 8(1485. 2)	10. 80	95. 2	8
2c	Cbm, Arg ⁵	1513. 4(1513. 2)	11. 72	98. 1	24
2d	Cbm, Glu ⁵	1487. 4(1486. 1)	13. 21	95. 8	8
2e	Cbm, Gln ⁵	1485. 4(1485. 1)	12. 99	98. 8	32
3a	H, Leu ⁵	1426. 4(1427. 2)	10. 24	98. 1	8
3b	H, Lys ⁵	1442. 0(1442. 2)	8. 12	99. 6	8
3c	H, Arg ⁵	1470. 4(1469. 3)	8. 79	98. 5	16
3d	H, Glu ⁵	1442. 8(1443. 1)	9. 60	96. 8	<8
3e	H, Gln ⁵	1441. 8(1442. 1)	9. 53	97. 6	8

a. API 3000 with an ESI source; *b.* agilent 1100, C₁₈ (4.6 mm × 150 mm), λ = 210 nm; flow rate: 1 mL/min, 0.1% TFA/H₂O (A), 70% CH₃CN/0.05% TFA (B); 0—15 min, 30% B—80% B; *c.* duration of inhibiting testosterone concentration in castration level in rats with single subcutaneous injections of 500 μg/kg; *d.* cetrorelix: Ac-*D*-Nal-*D*-Cpa-*D*-pal-Ser-Tyr-*D*-Cit-Leu-Arg-Pro-*D*-Ala-NH₂. General sequence: X-*D*-Nal¹-Aa²-Aa³-Aa⁴-Y⁵-Aa⁶-Aa⁷-Aa⁸-Aa⁹-Aa¹⁰-NH₂.

2.2 LHRH 拮抗剂的生物活性评价

由于下丘脑释放 LHRH 呈脉冲式, 造成血液中 LH 与 FSH 浓度也呈现脉冲式波动. 这在客观上给监测体内 LH 和 FSH 浓度变化带来困难. 由于 LH 可以刺激并调节睾丸组织中 Leydig 细胞对睾酮的合成与释放, 血液中 LH 水平下降则可直接抑制睾丸组织中睾酮的合成与分泌. 因此可以通过监测大鼠给药后血清睾酮水平的抑制作用时间和作用强度来观察化合物对于 LHRH 受体拮抗作用的有效性.

根据 N 端的结构, 所合成的 LHRH 类似物可以分为 3 组, 分别是 N 端乙酰化(化合物 1), N 端脲基化(化合物 2)和 N 端为自由氨基(化合物 3). 大鼠体内抑制睾酮的测定结果表明, 除了化合物 3d 外, 其它 14 个化合物均表现出了对睾酮的抑制活性, 有 6 个化合物将睾酮抑制到去势水平的作用时间长于阳性对照 Cetrorelix, 作用时间最长的化合物 1e 可以达到 48 h, 是阳性对照的 6 倍(表 1). N 端的结构对化合物的活性有一定影响, N 端为乙酰基和脲基化修饰比自由氨基修饰的化合物具有较长的体内作用时间.

对于同一组化合物, 例如化合物 1 的 5-位为 Gln 的化合物 1e 将大鼠体内血清睾酮抑制到去势水平的时间最长, 5-位为 Arg 和 Glu 的化合物 1c 和 1d 次之, 5-位为亮氨酸的化合物 1a 最差(图 1). 化合物 2 和 3 也具有同样的趋势. 这可能说明酰胺基、胍基和羧基这些易形成氢键的功能基在一定程度上抑制了体内蛋白酶对多肽的水解, 从而延长了多肽的体内半衰期和作用时间.

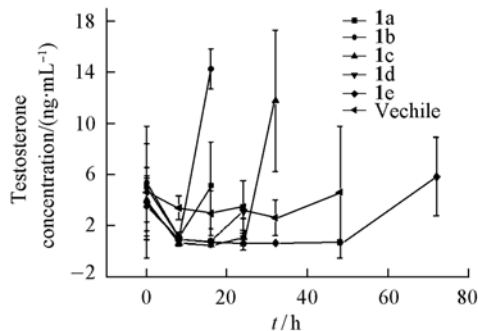


Fig. 1 Inhibitory activity of the modified peptides against testosterone production
S. C. 500 μg/kg.

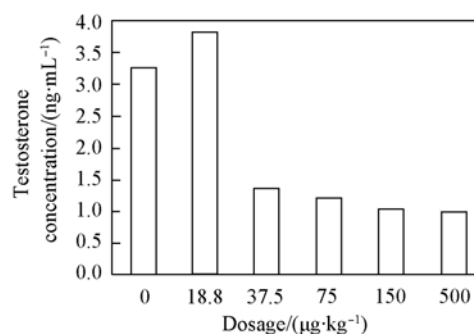


Fig. 2 Testosterone concentration in rats serum after single S. C. injection of different dosages of compound 1e after 8 h

2.3 化合物 1e 的量效关系

一次性皮下注射化合物 1e, 8 h 后, 对大鼠体内睾酮含量的测定结果表明, 18.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量无法将睾酮抑制到去势水平(与空白组相当), 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上的剂量均可以将睾酮抑制到去势水平, 继续增大剂量, 大鼠体内的睾酮浓度略有降低(图 2), 但差异不明显, 因此无法准确地计算其 IC_{50} 值. 继续延长检测时间发现, 37.5, 75 和 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量时, 将睾酮含量抑制到去势水平的时间只有 8 h, 而 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时可以达到 48 h. 这说明随着剂量的增大, 化合物 1e 对睾酮的抑制强度变化不大, 但将睾酮抑制到去势水平的时间将随之延长. 可以看出化合物 1e 的最低有效剂量为 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

总之, 本文根据所提出的长效肽设计思路, 设计合成了系列的 LHRH 拮抗剂类似物, 不仅通过体内的生物活性评价结果证实了该设计思想的可行性, 而且为开发长效的 LHRH 拮抗剂药物提供了新的候选化合物.

参 考 文 献

- [1] Herbst K. L. . Current Opinion in Pharmacology[J], 2003, **3**: 660—666
- [2] Weckermann D. , Harzmann R. . European Urology[J], 2004, **46**: 279—284
- [3] Stricher H. J. . Urology[J], 2001, **58**: 24—27
- [4] Griesinger G. , Felberbaum R. , Diedrich K. . Arch. Gynecol. Obstet. [J], 2005, **273**: 71—78
- [5] Roth C. . Expert Opin. Investig. Drugs[J], 2002, **11**: 1253—1259
- [6] Herbert C. A. , Trigg T. E. . Animal Reproduction Science[J], 2005, **88**: 141—153
- [7] Hoesla C. E. , Saadb F. , Pöppela M. , *et al.* . European Urology[J], 2005, **48**: 712—723
- [8] Padula A. M. . Animal Reproduction Science[J], 2005, **88**: 115—126
- [9] Barrett A. J. , Salvesen G. . Proteinase Inhibitors, Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, Vol. 12[M], New York: Elsevier Science Publishing Company, Inc. , 1986: 154—223
- [10] ZHOU Ning(周宁), FU Hui-Jun(付慧君), RONG Di(荣嫡), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(4): 668—671
- [11] Beckers T. , Bernd M. , Kutscher B. , *et al.* . Biochemical and Biophysical Research Communications[J], 2001, **289**: 653—663
- [12] Wen J. Y. , Ledger R. , Mcleod B. J. . Life Science[J], 2002, **71**: 3019—3030
- [13] WANG De-Xin(王德心). Solid-phase Organic —— Principle and Application Guide(固相有机合成——原理及应用指南)[M], Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 91—95

Design, Synthesis and Bioactivity of Long Acting LHRH Antagonists

ZHOU Ning¹, RONG Di², CHENG Jun-Ping¹, ZHOU Wen-Xia¹,
ZHANG Yong-Xiang¹, CHENG Mao-Sheng², LIU Ke-Liang^{1*}

(1. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China;

2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Based on a new concept of protease-resistant long acting peptides design, the functional groups with proton-donors and proton-acceptors were introduced to the N-terminal and position 6 of LHRH antagonist, and a series of novel LHRH antagonist analogues were synthesized. The bioactivity of them was evaluated in rats by a testosterone test model. The designed peptides showed a longer duration of inhibiting testosterone secretion than the parent peptide and control. Peptide 1e inhibited the testosterone secretion for 48 h in intact rats(Cetrorelix: 8 h). The experimental results not only support the proposed concept of the long acting peptide design, but also supply some new candidate compounds for the development of long acting LHRH antagonist drugs.

Keywords LHRH antagonist; Long acting peptide; Testosterone

(Ed. : H, J, Z)