

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93106340.X

[51]Int.Cl<sup>5</sup>

[43]公开日 1994 年 12 月 7 日

C07K 9/00

[22]申请日 93.4.28

[30]优先权

[32]92.4.28 [33]SE[31]9201338

[32]92.9.7 [33]SE[31]9202553

[32]92.12.23[33]SE[31]9203897

[32]93.4.6 [33]SE[31]9301141

[71]申请人 阿斯特拉公司

地址 瑞典南泰利耶

[72]发明人 M·扬达尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗才希

A61K 37/02

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 新的活性化合物

[57]摘要

本发明涉及一类新的生物活性化合物,其制备方法及其在治疗上的用途。更具体地说,本发明提供致免疫共轭物,该共轭物用于产生对与肿瘤有关的碳水化合物结构或在感染病原体上和/或被感染宿主细胞上表达的碳水化合物结构的T细胞免疫性。所述的致免疫共轭物包括,(i)能够连接MIC I类分子的肽组分;以及(ii)碳水化合物组分,该组分具有所述碳水化合物结构的致免疫特异性。

## 权利要求书

---

1. 一种能够产生对碳水化合物结构的T细胞免疫性的肽/碳水化合物共轭物，所述的共轭物包括(i)能够连接MHC I类分子的肽组分；以及(ii)碳水化合物组分，该组分具有所述碳水化合物结构的致免疫特异性。

2. 根据权利要求1的共轭物，其能够产生对与肿瘤有关的碳水化合物结构的T细胞免疫性，所述的共轭物包括(i)能够连接MHC I类分子的肽组分；以及(ii)碳水化合物组分，该组分具有所述与肿瘤有关的碳水化合物结构的致免疫特异性。

3. 根据权利要求1的共轭物，其产生对在感染病原体和/或被感染宿主细胞上表达的碳水化合物结构的T细胞免疫性，所述的共轭物包括(i)能够连接MHC I类分子的肽组分；以及(ii)碳水化合物组分，该组分具有在感染病原体和/或被感染宿主细胞上表达的所述碳水化合物结构的致免疫特异性。

4. 根据权利要求1-3的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分由5-25个氨基酸组成。

5. 根据权利要求1-4的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分由8-12个氨基酸组成。

6. 根据权利要求1-5的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分由9个氨基酸组成。

7. 根据权利要求1-6的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分能够连接人类MHC I类分子。

8. 根据任一前述权利要求的共轭物，其中肽组分在 6 位具有氨基酸 V、I、L 或 T。

9. 根据权利要求 8 的共轭物，其中肽组分在 6 位具有氨基酸 V。

10. 根据权利要求 1 - 9 的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分在 C-端位置具有氨基酸 V 或 L。

11. 根据权利要求 1 - 10 的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分在 C-端位置具有氨基酸 L。

12. 根据权利要求 1 - 11 的任一个权利要求的共轭物，其中肽组分具有序列 G I L G F V F T L (在序列表中 SEQ ID NO: 3)。

13. 根据权利要求 1 - 12 的任一个权利要求的共轭物，其中碳水化合物组分与肽组分共轭的位置使得碳水化合物组分连接 T 细胞受体的高可变区域。

14. 根据权利要求 1 - 13 的任一个权利要求的共轭物，其中碳水化合物组分的大小使得 T 细胞受体能够包围所述碳水化合物结构的抗原决定基。

15. 根据权利要求 1 - 14 的任一个权利要求的共轭物，其中碳水化合物组分是说明书的表 1 中定义的任意碳水化合物。

16. 一种药物制剂，其含有作为活性成分的根据权利要求 1 - 15 的任一个权利要求的共轭物。

17. 用于治疗根据权利要求 1 - 15 的任一个权利要求的共轭物。

18. 一种在病人体中刺激产生毒性 T 细胞 (CTL) 的方法，其中所述的 CTL 具有杀死或削弱带有与特性疾病有关的碳水化合物

结构的细胞的能力，该方法包括向病人给药有效剂量的权利要求 1 - 15 的任一个权利要求要求保护的共轭物。

19. 一种产生毒性 T 细胞 (CTL) 的方法，CTL 具有杀死或削弱与疾病有关的细胞的能力，这些细胞带有与特性疾病有关的碳水化合物结构，该方法包括使细胞群与权利要求 1 - 15 任一权利要求要求保护的共轭物接触，其中所述的细胞群包括 (a) 带有能够连接所述共轭物肽组分的 MHC I 类分子的细胞和 (b) 能够转化为 CTL 的细胞，CTL 具有所述的与细胞 (a) 相互作用的能力，而细胞 (a) 具有连接 MHC I 类分子的所述共轭物。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中所述的细胞群包括可从动物体取出或分离的细胞。

21. 根据权利要求 20 的方法，其包括将如此制备的 CTL 引入动物体的步骤，该动物体带有所述的与疾病有关的细胞。

22. 根据权利要求 1 - 15 中任一共轭物用于制备在病人体中刺激产生毒性 T 细胞 (CTL) 的药物组合物，其中所述的 CTL 具有杀死或削弱带有与特性疾病有关的碳水化合物结构的细胞的能力。

23. 根据权利要求 1 - 15 中任一共轭物用于制备产生毒性 T 细胞 (CTL) 的药物组合物的用途，CTL 具有杀死或削弱与疾病有关的细胞的能力，这些细胞带有与特性疾病有关的碳水化合物结构，该方法包括使细胞群与所述的共轭物接触，其中所述的细胞群包括

(a) 带有能够连接所述共轭物肽组分的 MHC I 类分子的细胞和 (b) 能够转化为 CTL 的细胞，CTL 具有所述的与细胞 (a) 相互作用的能力，而细胞 (a) 具有与 MHC I 类分子相

连的所述共轭物。

2 4 . 根据权利要求 2 3 的用途，其中所述的细胞群包括从动物体中取出或分离的细胞。

2 5 . 根据权利要求 2 4 的用途，其包括将如此制备的 C T L 引入动物体步骤，该动物体带有所述的与疾病有关的细胞。

2 6 . 权利要求 1 - 1 5 中任一要求保护的共轭物用于生产在病人体中诱发所需的免疫状态的药物组合物的用途，其中所述的免疫状态产生自所述共轭物和 M H C I 类分子间的相互作用，从而免疫系统的细胞成分被刺激，以诱发与所述碳水化合物结构有关的特异反应。

2 7 . 一种在病人体中诱发所需免疫状态的方法，其中所述的免疫状态产生自所述共轭物和 M H C I 类分子间的相互作用，从而免疫系统的细胞成分被刺激，以诱发与所述碳水化合物结构有关的特异反应，该方法包括用有效剂量的权利要求 1 - 1 5 中任一要求保护的共轭物给药。

2 8 . 根据权利要求 1 - 1 5 中任一的共轭物在制备治疗恶性疾病的药物的用途。

2 9 . 根据权利要求 2 8 的用途，用于制备治疗黑瘤、乳腺癌、肺癌或胃肠癌的药物。

3 0 . 根据权利要求 1 - 1 5 中任一的共轭物在制备治疗感染疾病的药品中的用途。

3 1 . 根据权利要求 3 0 的用途，用于制备治疗寄生病原体引起的感染疾病的药物。

3 2 . 根据权利要求 3 1 的用途，用于制备治疗细胞内病原体引

起的感染疾病的药物。

3 3 . 一种治疗恶性疾病的方法，该方法将治疗有效量的根据权利要求 1 - 1 5 中任一 的共轭物给药于需要这种治疗的宿主。

3 4 . 根据权利要求 3 3 的方法，其中治疗黑瘤、乳腺癌、肺癌或胃肠癌。

3 5 . 一种治疗感染疾病的方法，包括将治疗有效量的根据权利要求 1 - 1 5 中任一 的共轭物给药于需要这种治疗的宿主。

3 6 . 根据权利要求 3 5 的方法，其中治疗由寄生病原体引起的感染疾病。

3 7 . 根据权利要求 3 5 的方法，其中治疗由细胞内病原体引起的感染疾病。

3 8 . 一种制备权利要求 1 - 1 5 中任一要求保护的肽 / 碳水化合物共轭物的方法，包括一个或多个下列工艺步骤：

( a ) 通过已知的肽合成技术合成共轭物的肽组分，

( b ) 通过已知的碳水化合物合成技术合成共轭物的碳水化合物组分，

( c ) 在肽组分共价偶合到碳水化合物组分上之前，保护肽组分的一个或多个  $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$  或  $-SH$  基团，

( d ) 在碳水化合物组分与肽组分共价偶合前，保护碳水化合物组分的一个或多个  $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$  或  $=CO$  基团，

( e ) 活化碳水化合物组分未保护的  $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$  或  $=CO$  基团。

( f ) 活化肽组分未保护的  $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$  或

— S H 基团，

( g ) 使碳水化合物组分和肽组分的至少一个与双功能团连接试剂反应，

( h ) 使碳水化合物组分和肽组分共价反应，从而形成所需的共轭物，所述组分被适当地保护，活化和 / 或与双功能团连接试剂反应，

( i ) 使中间保护的肽 / 碳水化合物共轭物进行去保护基步骤。

# 说明书

---

## 含结合肽及碳水化合物结构的共轭物

本发明涉及一类新的活性化合物，它们的制备方法以及它们在治疗上的用途。更具体地，本发明提供了用于产生T细胞免疫性的致免疫共轭物，该T细胞免疫性针对与肿瘤有关的碳水化合物结构或表达在感染病原体和/或感染宿主细胞上的碳水化合物结构。

### 以细胞为媒介的免疫性

脊椎动物免疫系统对侵入肌体的微生物和恶性细胞始终是有有效的。众所周知，适应性免疫系统第二次遇到抗原要比第一次遇到抗原显示出强得多的响应。这一事实可通过接种得到开发应用，其原理是诱发被称为免疫记忆的长期免疫状态。免疫记忆需要活化专属于感染病原体的T细胞。T细胞通过识别——借助于T-细胞接收器(TCR)——来自于病原体的肽片段检测出细胞内的感染。然而，大多数T细胞都是“MHC限制的”，即它们仅能识别结合在高度多形态膜蛋白上的，被主要组织相容性复合物(MHC)的I类和II类基因编码的以及呈现在附属细胞(指定为抗原呈现细胞或APC)表面上的肽的复合物，抗原在附属细胞中处理。

根据粘接受体分子的种类，可将T细胞分类为CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>。CD4粘附接受体识别MHC II类分子，CD8连接I类分子；而且，对MHC的限制又进一步取决于MHC分子对TCR某些部位的直接键合(Jorgensen 等，1992)。

CD 4<sup>+</sup> T细胞（辅助性T细胞）激活巨噬细胞和产生抗体的B细胞，而CD 8<sup>+</sup> T细胞（毒性T细胞，CTL）杀死被病毒和胞内细菌感染的细胞。抗原可通过两种途径中的一种产生，这取决于抗原的起源。在第一种途径中，细胞外的异物被特殊的含抗原细胞（通常是巨噬细胞或B-细胞）吞噬，该含抗原细胞分解异物，使生成的抗原与II类MHC分子相连。该复合体被运送至细胞表面并给予辅助性T细胞。第二种途径通常涉及对在病毒感染的或恶性细胞内制备的蛋白质的处理。在细胞内处理这些蛋白质，也就是使这些蛋白质部分分解，从而形成肽碎片。然后，这些肽碎片与I类MHC分子结合，被送至细胞表面给予毒性T细胞。

通过分离的途径产生抗原具有生物学意义。从环境得到的这些抗原最终会诱发B细胞产生抗体，这些抗体能够保护有机体免受外源性抗原的后续侵袭。另一方面，在畸型或不良细胞（例如病毒感染细胞或恶性细胞）中产生畸型结构的抗原的情况下，最好是使免疫系统激活，从而最终导致杀死不良细胞。

#### MHC-连接的肽

最近几年，对与MHC I和II类分子相结合的肽的分析有了显著进步（综述可参考例如：Janeway, 1991; Rotzschke & Falk, 1991; Stauss, 1991; Tsomides & Eisen, 1991）。因此已发现，MHC I类分子连接只含约8-12个氨基酸的短链肽，MHC II类分子连接约10-17个氨基酸的肽。

进一步发现，从制备抗原产生的肽片段被转移至细胞表面，该细胞表面连接于MHC分子的细胞外部分上的沟中。对于MHC I型分子，发现位于沿肽链确切位置上的单氨基酸侧链连在肽连接的沟中

( Madden 等, 1991 )。连接它们的这些袋囊和氨基酸的位置对于不同的等位基因变种可以不同。因此, 不同的MHC I类分子可以连接不同的组合肽链, 并且为各种MHC等位基因找到了特定等位基因型主( Van Bleek & Nathenson, 1990; Falk等, 1991; Jardetzky 等, 1991 )。例如, 连接HLA-A 2.1的肽优选在2位含有L或M以及在9位, 即C-端位置含有V或L( Rotzschke & Falk, 1991 )。

在鼠体中能够连接MHC I类分子的肽的例子是A S N E N M E T M 和 S G P S N T P P E I ( S E Q I D N O : 1 和 2 ), 它们都存在于H-2-D<sup>b</sup>分子中。在人体中能够连接MHC I类分子的肽的一个实例是G I L G F V F T L ( S E Q I D N O : 3 ), 其存在于HLA-A 2.1分子中( Falk等, 1991 )。

Elofsson 等( 1991 )描述了将MHC ( II类 ) 连接的肽D Y G I L Q I N S R ( S E Q I D N O : 19 ) 与碳水化合物4-O- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖相结合。

W O 89 / 07448披露了调节宿主免疫反应的组合物, 使用了与肽连接的MHC I类分子同源的肽。

#### 作为T细胞特定抗原决定基载体的合成肽

C T L : s 可从涂覆三硝基氯苯( T N P ) 的小鼠脾制备, 并为杀死T N P - 涂覆的同源靶细胞而选择。现已发现, 一些如此制备的C T L : s 能够识别短MHC I类( K<sup>b</sup> ) 键合的10氨基酸肽, 对于该肽, T N P 连到内部( 6位 ) 的赖氨酸残基上。而且, 一些C T L : s 可杀死处理和提供连在不同载体蛋白质( M S A、B S A 和

K L H ) 上的 T N P 的同源靶细胞, 还可杀死 T N P - 涂覆的同种靶细胞 ( Ortmann 等, 1992 )。

### 与肿瘤有关的抗原

能够从外部通过免疫系统 ( 基于肿瘤细胞的畸型特征 ) 识别肿瘤的可能性为发展有效的癌治疗提供了很有价值的机会。在实验系统中, 肿瘤显示出高的致免疫性, 并且触发的免疫反应足以使得肿瘤细胞减少。但在临床阶段, 作为多重遗传性和适应性变异产物的肿瘤, 当其成为医学上的难题时, 却具有很低的致免疫性。因此, 几乎没有发现真正的与肿瘤有关的蛋白质抗原, 即仅在肿瘤细胞中发生作用的抗原。

与缺乏同肿瘤有关的蛋白质抗原相反, 针对肿瘤细胞提出了各种畸变的碳水化合物 ( C H O ) 结构 ( 综述参见 Hakomori , 1991 )。在决定 C H O 链组合的酶系统中, 这些碳水化合物是作为畸变的结果而形成的。由于 C H O 抗原决定基 ( 在正常细胞上不存在或被掩盖 ) 在肿瘤细胞上的表达, 这些 C H O 链常常被缩短。

畸变 C H O 结构在肿瘤细胞上以糖蛋白、糖脂的形式存在, 或以这两种形式的复合物形式存在。糖蛋白通常被分泌进入体液, 而糖脂在很大程度上限于膜的范围内。

与肿瘤有关的碳水化合物抗原的实例有 G M 3 神经节苷脂, 其已在小鼠黑瘤 B 1 6 细胞里得到鉴定 ( Nores 等, 1987 ); 与人黑瘤细胞有关的 G D 3 神经节苷脂 ( Portoukalian 等, 1979 ); 以及在 Burkitt 淋巴瘤细胞中得以表达 G b 3 神经节苷脂 ( Wiels Brodin 等, 1988 )。

### 与传染性疾病有关的碳水化合物

与传染性疾病有关的碳水化合物可在传染性病原体、从这些病原

体上分泌或脱出的物质或在感染宿主细胞表面上得以表达。

有一些被证实的或公认的碳水化合物类T细胞反应的实例，其与被感染病原体如鼠伤寒沙门菌（Robertsson 等，1982），利什曼原虫属菌（Moll 等，1989）、白色念珠菌（Domer 等，1989）和分枝杆菌（Crowle，1988）引起的疾病有关。

Hansen 等（1990）描述了与HIV感染有关的碳水化合物抗原。

### 肿瘤的免疫疗法

肿瘤的免疫疗法在医学上已有很长的历史，并尝试过非专一性疗法和专一性疗法。在非专一性疗法中，通过各种因子如BCG、IL-2等活化免疫系统，以便提高业已存在的对肿瘤的本底免疫性。在专一性疗法中，使用肿瘤细胞或由此得到的物质培养疫苗。

以T细胞为中介的免疫反应在抗肿瘤免疫方面起着关键作用。尽管T细胞对蛋白质反应的活化机理在某种程度上（参见上文）已进行了表征，但对碳水化合物来说这种活化机理基本上是未知的。由于MHC蛋白质的肽连接沟施加的结构上的限制，对MHC分子来说，碳水化合物抗原是差的候选对象。然而，Ishioka 等（1992）指出CHO部分可以成为能够为T细胞识别的抗原决定簇的重要组成部分，并提出虽然存在对产生CHO特异性T细胞反应的限制，但这种反应仍能通过将碳水化合物地放入MHC-键合肽而产生。

Longenecker 及其合作者（WO 88/00053；Henningson 等，1987）描述了使用“合成的 与肿瘤结合的糖共轭物”（S-TAG）刺激抗癌T细胞免疫性。在这些实验中，将在大部分人腺癌上表达的合成的 Thomsen - Friedenreich

(TF)和Tn抗原、碳水化合物与载体蛋白质共轭，并用来说明迟发型超敏反应(DTH)效应体细胞能够识别和与碳水化合物决定基相对应。由TF抗原组成的S-TAG偶合到载体(锁眼链血兰蛋白)上并用Ribi辅药乳化，而后施于有TA3-Ha腺癌的小鼠。当给药前用环磷酸胺处理时，观察到有50-90%的宿主长时间存活(Fung等，1990)。

Thurin等(1991)描述了包含下列成分的共轭物：(i)关于肿瘤的碳水化合物半抗原；(ii)含有病毒小鼠辅性T细胞抗原决定基的肽；以及(iii)基于辅药的Quil-A糖苷。用该共轭物免疫的小鼠显示出对病毒抗原决定基半抗原及辅性T细胞反应性专一IgM反应。

本发明的主要目的是提供产生对碳水化合物结构的T-细胞免疫性，尤其是对碳水化合物抗原的抗肿瘤免疫性的方法。

虽然现有技术指出对碳水化合物抗原的抗肿瘤免疫性可用合成疫苗提高，但实践过程中为此目的而取得的进展仍不能令人满意。例如，Longenecker的S-TAG(在前面的段落中已有叙述)使用普通蛋白质作为碳水化合物结构的载体。该糖蛋白在其呈现在细胞表面以前须进行蛋白分解，这意味着对最终产生TCR不能进行控制。而且，大的载体蛋白质含有几个不同的抗原决定基，将竞争T细胞。

进一步说，尽管已进行了较多的研究，现有技术对研制癌症免疫疗法的努力还是取得了令人失望的结果。而且，现有技术中刺激对与碳水化合物有关的抗原的免疫反应只取得了有限的成功，尤其是在需要刺激对与疾病有关的碳水化合物结构的免疫反应的情况下更是如此，例如碳水化合物结构是在肿瘤细胞上表达的，而不是在正常细胞上表

达的。

本发明优于现有技术的地方在于提供了一类新的含有MHC I类结合肽以及碳水化合物结构的共轭物，该共轭物可特别用于能诱发抗肿瘤免疫性的合成疫苗的研究之中。而且本发明的共轭物能够对该碳水化合物结构产生毒性T细胞反应而不是辅性T细胞反应。另外，本发明的共轭物可提供对（1）所产生的抗原决定基的特性以及（2）T细胞克隆的扩展的高度控制。

本发明的另一个目的是使用I类MHC-键合肽制备碳水化合物特异T细胞，即毒性T细胞。按照本发明制备的碳水化合物特异T细胞不须要进行MHC-限制。因此，用某一个体制备的细胞可以与来自另一个体的细胞、来自同种甚至另一种属的细胞反应。

按照本发明制备碳水化合物特异T-细胞与现有技术的实验具有很大的不同。在现有技术中，制得的辅性T细胞反应是直接针对肽抗原决定基的，因为这里的半抗原与载体蛋白质共轭以获得对半抗原的抗体反应；或者是Thurin等人将该概念扩展到限定的MHC II类-键合肽的应用之中。

正如所指出的那样，通过将能够连接MHC I类分子的适宜的肽共轭到适当的碳水化合物结构上达到了本发明的目的。将碳水化合物共轭到肽上最适宜的位置，碳水化合物抗原可以获得对TCR的高的亲和性，这就使得反应独立于粘附载体，即T细胞将不受MHC限制。这将从毒性及辅性T细胞产生CHO-特异反应。

### 应用领域

本发明的共轭物可用于治疗恶性肿瘤疾病，包括黑瘤、乳腺癌、肺癌和胃肠癌，还可用于治疗被感染剂引起碳水化合物靶分子表达

的疾病。

本发明的共轭物可在体内用于诱导T细胞反应，以消除肿瘤和／或感染。它们还可在体外用于诱导T细胞反应，采用体外刺激技术，随后将激活的T细胞用于病人。

根据要获得的免疫反应的种类，共轭物可以一次给药，或者如果必要的话，进行连续的常规的免疫作用。

本发明首先提供了能够对碳水化合物结构产生T细胞免疫性的共轭物，所述共轭物包括：(i)能够键接MHC I类分子的肽；和(ii)带有所述碳水化合物结构的致免疫特性的碳水化合物成分。

本发明还提供了在病人体内刺激产生毒性T细胞(CTL)的方法，其中所述的CTL有能力杀死或削弱呈现特性疾病的碳水化合物结构的细胞，该方法包括将有效剂量的本文定义的共轭物向病人给药。

本发明还进一步提供了产生毒性T细胞(CTL)的方法，该毒性T细胞能够杀死或削弱带有与特性疾病有关的碳水化合物结构的疾病细胞，该方法包括将细胞群与本文定义的共轭物相接触，所述的细胞群包括(a)带有MHC I类分子的细胞，该I类分子能够键接在所述共轭物的肽阻分上；和(b)能够转化为CTL的细胞，CTL具有所述的与带有连在MHC I类分子上的共轭物细胞(a)相互作用的能力。

CTL还可按照下述的方法的制备，即将肽／碳水化合物共轭物给药于动物，这样就在体内制得了CTL。另一方面，CTL还可在体外制备，即将从动物体取出的细胞与肽／碳水化合物共轭物相接触。这样制得的CTL可作为治疗方法的一部分进行用药(例如，可将其用于相同或不同的动物)。

本发明还提供了使用本文描述的肽／碳水化合物共轭物制备药物组合物的方法。

更具体地说，本发明提供使用共轭物制备能够病人所须要的免疫状态的药物组合物，其中所述的免疫状态由所述共轭物与MHC I类分子的相互作用得到，这样免疫系统的细胞成分被刺激产生了与所述碳水化合物结构特别有关的反应。

本发明优选的肽组分、碳水化合物组分以及碳水化合物具有下面几段所述的性质。

### 肽组分

本发明的肽／碳水化合物共轭物的一个重要特点是，其肽组分应能够键接MHC I类分子。对于给定的肽，键接MHC I类分子的能力可由几种方法测定。例如，肽可带有某些选择的结构特征，如肽链的大小或在具体位置上存在特定的氨基酸残基。另一方面，待选多肽键接MHC I类分子的能力可通过一个或多个免疫实验进行经验性评价。再一方面，本发明肽／碳水化合物共轭物的肽组分可带有与通过拆分天然存在的肽与MHC I类分子间的复合物而分离出的肽基本上一致的序列。这些中每个表示肽对MHC I类分子键合能力的因素将在下文更详细地描述。

Science (257卷，1992，8，14)上发表的三篇文章(Fremont 等，1992；Matsamura 等，1992；和Latron 等)在此引作具体的参考文献。

这些文章描述了能够键接MHC I类分子的肽序列特征。对于MHC I型分子，特别提到了鼠类MHC I类分子H-2K<sup>b</sup>和人类I类分子HLA-A2(后者存在于约40%的人口)。

与其键接一类特性识别肽能力有关的MHC I类分子的特征是存在限制一毓通常为六个叫作“袋”的肽连接沟，这六个所谓的“袋”容纳或固定可被键接的肽的结构单元。该肽连接沟或裂缝的侧面被两个 $\alpha$ -螺旋结构限定，而其底面限定在 $\beta$ -褶面上。

在这六个袋（通常称作A、B、C、D、E和F）中，一般有两个用来分别容纳肽的 $-NH_2$ 端和 $-COOH$ 端。

共轭物的肽组分优选地选自具有连接MHC I类分子的最佳数目氨基酸的肽，即具有5-25个氨基酸，尤其是8-12个氨基酸，所选择的肽链的大小便于在肽连接沟中获得适宜的连接。能够在MHC I类分子的沟中获得充分连接的最佳肽链带有8或9个氨基酸，特别优选带有9个氨基酸的肽链。

本发明共轭物最优选的肽组分在C-端位置带有一个疏水氨基酸，用来加强在F袋中的连接。肽组分的其他氨基酸优选地选自那些在肽连接裂缝中适于其他袋囊的氨基酸。正如Masazumi（1992）所描述的那样，对适宜的和优选的氨基酸残基的选择可借助于基于计算机的分子模拟技术。

肽可通过已知的方法合成。通过化学改性可进一步提高共轭物中肽部分的致免疫性。包含该改性肽的共轭物也是本发明的一部分。

被合成的肽可选自那些文献中已知的肽或选自那些其致免疫性已被已知方法确定的肽。在后一种情况下，肽可从全细胞溶解产物或从纯化的MHC分子中离析出来，并通过例如高效液相色谱分离。肽对MHC分子的最佳连接体现为在抗原呈现细胞表面上的肽-MHC复合物的高度稳定性。

本发明进一步提供了制备上面定义的肽/碳水化合物共轭物的方

法，其包括一个或多个下面的工艺步骤：

(a) 通过合成肽的已知技术合成共轭物的肽组分；

(b) 通过合成碳水化合物化合物的已知技术合成共轭物的碳水化合物组分；

(c) 在将肽组分共价偶合到碳水化合物组分上之前保护肽组分的一个或多个  $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$  或  $-SH$  基团；

(d) 在将碳水化合物组分共价偶合到肽组分上之前保护碳水化合物组分的一个或多个  $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$  或  $=CO$  基团；

(e) 活化碳水化合物组分中未被保护的  $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$  或  $=CO$  基团；

(f) 活化肽组分中未被保护的  $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$  或  $-SH$  基团；

(g) 使碳水化合物组分和肽组分中的至少一个与双功能团连接试剂反应；

(h) 使碳水化合物组分和肽组分进行共价反应形成所需要的共轭物，所述组分被适宜地保护、活化和/或与双功能团连接试剂反应；

(i) 使中间保护的肽/碳水化合物共轭物进行去保护基步骤。

在本文中，“能够键合MHC I类分子”的肽可进一步定义为那些与MHC I类分子的复合的肽，其在呈现抗原细胞表面上是稳定的。

上述复合物的稳定性可通过本领域技术人员熟知的体外实验测定。由于复合物离解得很慢，其稳定性测定可在细胞表面上长时间进行。另一个反映高稳定性的特征是肽浓度很低情况下的靶细胞对相应

C T L : S 的致敏作用。稳定性还可反映为，在体外和低摩尔浓度下，肽对某些靶细胞上相应 I 类分子表达调节的能力。

当短链肽直接注入小鼠体内时，稳定性还与体内的高度致免疫性有关。

糖肽被 M H C I 类分子连接的能力可通过设计的免疫实验测定一种或多种下列性质来评价：

( 1 ) 糖肽连到溶解的 M H L - I 上导致形成的复合物可采用常规的生化技术检测，例如，用依赖于构型的单克隆抗体，或用与标记的  $\beta_2$  - 微球蛋白结合；

( 2 ) 当糖肽连到位于变异宿主细胞 ( R M A - S 和 T<sub>2</sub> 细胞 ) 表面上的空 M H L - I 分子上后，对 C H O 部分进行表征，随后 C H O 部分可被 C H O 特异的单克隆抗体如 M C 2 1 0 1 ( G a l<sub>2</sub> 特异 ) 检测；

( 3 ) 用 M H C - I 特异性单克隆抗体通过糖肽调节相应的 M H C - I 限制单元；

( 4 ) 糖肽的循环能力 ( 参见下文第 3 部分 - “内在化后外部的 M H C - I 连接肽循环至细胞表面 ) 。

为了进行这些测定，可使用能够检测 M H C I 类分子的抗体及能够检测特定碳水化合物化合物的抗体。后者的一個具体实例是市场上可以买到的单克隆抗体 M C 2 1 0 2 ( New Biocarb , Lund , 瑞典 ) ，该抗体能检测碳水化合物 G a l<sub>2</sub> 。

按照下述方法，这些步骤可用来评价给定的肽被连到 M H C I 类分子上的能力。

首先合成糖肽，其中 G a l<sub>2</sub> 共价连到肽上。然后就可以在带抗

原靶细胞上测定糖肽连到MHC I类分子上的能力，以及测定被表达的碳水化合物部分、即被连到构型上的情况，在构型中，Gal<sub>2</sub>表位处在可被特异性抗体检测的位置上。另外，对相应MHC-I限制单元的调节可通过测定带抗原细胞与抗MHC I类抗体的相互作用来评价。

共轭物的循环能力可通过在37℃培养细胞（连接共轭物）来评价，此时糖肽将内在化。然后可降低温度，并用蛋白分解酶（如链霉蛋白酶）处理剥去暴露的肽/碳水化合物共轭物。再加热时，通过使用抗-Gal<sub>2</sub>抗体探测Gal<sub>2</sub>抗原决定基可检测到循环的共轭物。

在另一实验中，共轭物可用免疫实验检测，并可评价其刺激形成CTL的能力。在对比实验中，相对于肽组分（没有碳水化合物组分）测定产生的CTL，用来说明观察到的CTL-刺激与碳水化合物有关（参见下面的“实验测定体系”）。

#### 碳水化合物组分

共轭物的碳水化合物部分可用已知方法合成，并优选地选自下列碳水化合物结构：

（a）能稳定地在靶细胞上表达，因此总是相同的部分被暴露在T细胞受体表面上；

（b）在靶细胞上具有较高的密度，这样T细胞受体可以独立于MHC的限制以及粘附受体而被引发；以及

（c）具有较强的连接膜，这样就可避免进入总循环的分泌。可由于诱发T细胞的外围抑制并阻止保护性免疫的产生，溶解的碳水化合物相对来说容易产生不良的结果。

选择在靶细胞上具有高度表征性的碳水化合物的另一个优点是，

该高度表征性可导致膜中的二次改性，从而提高暴露的CHO抗原决定基的靶细胞特异性。

碳水化合物的大小应使T细胞受体能够包围CHO抗原决定基。优选碳水化合物的尺寸是肽长度的一半。但本发明并不仅限于此是肽长度的一半。

虽然并不排除单糖部分，但本发明共轭物的碳水化合物组分优选含有至少两个连接的糖单元，即是二糖或低聚糖。连接的糖单元的精确数目取决于碳水化合物结构的致免疫特异性，但通常含有3、4、5或更多的连接的糖单元。

优选的碳水化合物组分的尺寸上限要符合这样的要求，即其大小应能使T细胞受体同时包围碳水化合物结构的抗原决定基以及I类限制单元。一般的上限不超过10个糖单元；优选的不超过8个，最优选地不超过5个糖单元。因此，优选的范围是1-10、更优选1-8、最优选1-5个糖单元。对每个上述的优选范围，如果需要可将下限1提高至2、3、4、或5。

单个的糖单元优选地选自戊醛糖、戊酮糖；乙醛糖和己酮糖。它们可以是线性或环状结构，如果需要，可通过氧化、还原、胺化、乙酰化或这些作用的组合制得。氧化作用包括将一个或多个 $-CH_2OH$ 基团转化为 $-CHO$ 或 $-COOH$ 基团，以及将 $-CHOH-$ 基团转化为 $-CH_2-$ 基团。还原作用包括这些转化的任意逆转化。戊醛糖包括D-核糖、D-阿糖、D-木糖和D-来苏糖，以及这些糖的其他立体异构体，即L-异构体。己醛糖包括D-阿洛糖、D-阿卓糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-古洛糖、D-艾杜糖、D-半乳糖和D-塔罗糖，以及这些糖的其他立体异构体，即L-异构体。戊酮糖

包括 D-核酮糖和 D-木酮糖，以及这些糖的其他立体异构体，即 L-异构体。己酮糖包括 D-阿洛酮糖、D-果糖、D-山梨糖和 D-塔格糖，以及这些糖的其他立体异构体，即 L-异构体。当环化后，糖单元可呈  $\alpha$ -或  $\beta$ -构型以及呈（如果合适的话）吡喃糖或呋喃糖形式。

最优选的碳水化合物组分所含的一个或多个糖单元，其选自那些通常存在于糖脂和糖蛋白中的糖部分的单元。这些糖单元包括  $\beta$ -L-果糖 (Fuc)、 $\beta$ -D-半乳糖 (Gal)、 $\beta$ -D-N-乙酰基半乳糖胺 (Gal NAC)、 $\beta$ -D-N-乙酰基葡萄糖胺 (Glc NAC)、 $\beta$ -D-甘露糖 (Man)、神经氨酸 (Neu) 和唾液酸 (Sia)。

与糖脂中神经节苷脂的球形的神经节系列的 CHO 部分相对应的碳水化合物组分是适宜的肿瘤靶的又一实例，因它们大部分是膜连接的并且不能被分泌（参见 Oettgen, 1989；第六章“与肿瘤有关的抗原的一般概念：抗原的化学、物理和酶基础”）。

连接相邻糖单元的方式不是关键性的，也就是说，使用戊糖的 1-5 个碳原子中的任一个和己糖的 1-6 个碳原子的任一个均可进行键合。而且键合可以是  $\alpha$  型或  $\beta$  型。最优选的键合涉及到 3 位和 4 位碳原子，并且优选键合  $\beta$  构型。

碳水化合物组分和肽组分可通过任意方便的方法共轭（或共价连接到一起）。在肽组分中包括带羟基氨基酸（如在丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸中）的情况下，可以通过 O-糖苷键。在肽组分中包括含有一  $\text{NH}_2$  侧链（如在天冬酰胺中）的氨基酸的情况下，键合可以通过 N-糖苷键。

另一方面，连接会涉及到在碳水化合物组分和肽组分之间引入所谓的“间隔臂”。例如，在肽组分包括含有-SH侧链的氨基酸（半胱氨酸）的情况下，碳水化合物组分可通过 $-(C_nH_{2n})-O-$ 键合到-SH侧链上，其中 $n$ 大于2，优选2-4。

碳水化合物组分在肽/碳水化合物共轭物中的位置应当优选地这样选择，即当连到MHC I类分子上时，碳水化合物组分占据肽连接沟的大致中间位置，并且至少有部分碳水化合物组分从沟中伸出，使其呈现给CTL。

#### 适于共轭的碳水化合物的实例

与人类肿瘤或感染疾病有关的，并适于共轭的碳水化合物结构的实例在下列表1中给出。提到的肿瘤是为了举例说明能用本发明的共轭物治疗的癌症种类。为了叙述的需要，术语“碳水化合物结构”应理解为包括举例说明的碳水化合物的衍生物，如内酯和内酰胺。

表 1

| 与人类肿瘤有关的碳水化合物 |                                                                                                                                       |              |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.            |                                                                                                                                       |              |
| 5             | 1.1 大多数肿瘤                                                                                                                             |              |
|               | Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer                                                                                                          | 乳糖酰基鞘氨醇      |
|               | 1.2 黑 瘤                                                                                                                               |              |
| 10            | NeuAc $\alpha$ 8NeuAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer                                                                          | GD3          |
|               | 9-O-Ac-GD3                                                                                                                            |              |
|               | NeuAc $\alpha$ 8NeuAc $\alpha$ 3(GalNAc $\beta$ 4)Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer                                                        | GD2          |
|               | 9-O-Ac-GD2                                                                                                                            |              |
|               | 这些物质的内酰胺形式                                                                                                                            |              |
| 15            | 1.3 结肠癌和其他种类的癌:                                                                                                                       |              |
|               | GalNAc $\alpha$ -Ser(Thr) ( 糖蛋白 )                                                                                                     | Tn- 抗 原      |
|               | NeuAc $\alpha$ 6GalNAc $\alpha$ -Ser(Thr)                                                                                             | 唾液基-Tn-抗原    |
|               | Gal $\beta$ 3GlcNAc                                                                                                                   | I 型链         |
| 20            | NeuAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)GlcNAc $\beta$                                                                           | 唾液基 Lewis a  |
|               | NeuAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)[NeuAc $\alpha$ 6]GlcNAc $\beta$                                                         | 二唾液基-Lewis a |
|               | Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)GlcNAc $\beta$ Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)GlcNAc $\beta$                                               | 二聚 Lewis a   |
|               | NeuAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$                                                                           | 唾液基 Lewis x  |
|               | Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$                                              | 二聚 Lewis x   |
| 25            | Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ | 三聚 Lewis x   |
|               | NeuAc $\alpha$ 3- 二聚 Lewis x                                                                                                          |              |
|               | NeuAc $\alpha$ 3- 三聚 Lewis x                                                                                                          |              |
|               | NeuAc $\alpha$ 6- 低聚 Lewis x                                                                                                          |              |
| 30            | 在唾液酸的情况下这些物质的内酰胺形式                                                                                                                    |              |

## 1. 4 肺癌和其他类型的癌

$\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta$

i - 抗原 (表示  
乳糖胺)

$\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta \text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta$

Lewis a - Lewis x

$\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\beta 4(\text{NeuAc}\alpha 3)\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$

Fuc-GM1

Fuc - GM1 的内酰胺形式

## 1. 5 Burkitt 氏淋巴瘤

$\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$

Gb3

## 1. 6 乳腺癌

$\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$

Fuc-Globopenta

T<sub>n</sub> - 抗原

唾液基 - T<sub>n</sub> - 抗原

## 1. 7 畸胎瘤

$\text{NeuAc}\alpha 3\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$

唾液基Globopenta

上述物质的内酯形式

## 2. 与实验性肿瘤有关的碳水化合物:

### 2. 1 黑瘤 (仓鼠)

$\text{NeuAc}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta \text{Cer}$

GM3

GD3

9-O-Ac-GD3

GD2

这些物质内酯形式

### 2. 2 黑瘤 (小鼠)

GM3

## GM 3 的内酯形式

### 3. 与感染病原体有关的碳水化合物

得自白色念珠菌的甘露聚糖

得自牛结核分枝杆菌 BCG 菌株的多糖离析物

得自利什曼原虫属的磷脂聚糖

得自鼠伤寒沙门菌的 O - 抗原性聚糖

### 4. 与 HIV 有关的碳水化合物

Fuc $\alpha$ 2gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$

GalNAc $\alpha$ 3(Fuc $\alpha$ 2)Gal $\beta$ 3GlcNAc $\beta$

NeuAc $\alpha$ 6GalNAc $\alpha$ -Ser(Thr)

GalNAc $\alpha$ -Ser(Thr)

Lewis y

A<sub>1</sub> 血型

唾液基 T<sub>n</sub> - 抗原

T<sub>n</sub> - 抗原

---

### 共轭物的优选性质

碳水化合物可以偶合到载体肽的氨端、羧端、或偶合到内部的氨基酸上。正如所指出的那样，内部偶合是优选的。

而且，如上所述，特异固定型氨基酸，连在 MHC 分子上的袋囊中，在文献中被确定为连接各种 MHC 分子的肽。这些固定型氨基酸最好不用于同碳水化合物结构的共轭。

当与载体肽共轭时，合成的碳水化合物应当具有高度的分子稳定性，以便高特异性地暴露碳水化合物的抗原决定基。碳水化合物在共

轭物中的位置应当使T细胞受体能够识别CHO抗原决定基，从而产生T细胞的最佳引发。

而且，CHO的大小和位置应当最有利于被TCR识别。尤其是被第三辅助性决定区域(CDR3)识别。优选的位置是位于糖肽的中心，但本发明并不限制于此。

CHO和肽可通过任意的连接单元共轭，这些连接单元可以是另外的氨基酸，如半胱氨酸，或是其他适宜的化合物。

### 实验检测系统

---

本发明共轭物的致免疫性可用本领域技术人员熟知的免疫实验测定。CHO特异性可通过“交叉交叉”实验分析：对共轭物“CHO-A”反应的T细胞用CHO-A测定，其中A表示肽；用肽A单独测定；用CHO-B测定，其中B表示不同于A的肽；以及单独用肽B测定。例如，如果对CHO-A反应的CTL还杀死带有CHO-B的细胞，但不能杀死仅带有肽的细胞，可得出结论该反应是CHO-特异的。而且，T细胞可相对于糖脂形式中带CHO部分的靶细胞进行测定。

### 药物制剂

---

本发明的共轭物可以常规的药剂形式使用。当以疫苗形式使用时，优选地包括一种或多种适宜的辅药。

已经发现，使用本发明的肽/碳水化合物共轭物可以导致共轭物连到细胞表面的空MHC分子上。这种连接之所以可能是因为糖肽已实际上被预先合成出来，即糖肽不必再进入细胞溶质进行合成。

另一方面，共轭物可以嵌入到能够促使进入细胞溶质的结构之中，以便获得与MHC分子的较早连接。这些结构可以是脂质体或“刺激免疫复合物”（iscoms）（Morein 等，1984）。

下列实施例描述本发明共轭物的合成方法。

## 1. 糖共轭物的制备

---

### 1.1. 糖肽的合成

---

可通过例如偶合预先制备的间隔臂糖苷和含巯基官能团的肽合成糖肽。

于是，将半胱氨酸部分引入肽序列，利用半胱氨酸硫原子的亲核性质在肽和以糖苷连到碳水化合物部分的亲电间隔臂之间生成一个硫醚连接键。使用的间隔臂是3-溴-2-溴甲基丙-1-基（DIB）（Magnusson 等，1982）和2-溴乙基（Dahmen 等，1983b）基团。通过这种方法，可将代表各种抗原决定基的碳水化合物和抗原决定基偶合到同一个肽序列上。后者也可通过标准的肽合成技术获得，并在共轭前进行生物活性评价。这样就使合成肽所需的时间维持最短。

偶合反应在二甲基亚砷或N，N-二甲基甲酰胺中进行。

偶合前，使用N，N，N，N-四丁基氟化铵除去DIB基团中的氢溴酸（Magnusson 等，1982）。得到的烯丙基溴再与含半胱氨酸的肽反应。由于副反应，如形成不反应的烯丙基溴，该方法不能得到用于回收的过量的碳水化合物衍生物。

当使用2-溴乙基糖苷时，碳酸铯用作促进剂（Dahmen 等，

1983b)。

偶合时需要的N，N，N，N-四丁基氟化铵或碳酸铯的用量取决于所用的肽中包括的三氟乙酸量。包括的三氟乙酸量随肽的批量和结构而变化。溶剂的选择和用量由肽的溶解性能决定。

偶合反应用HPLC监测，并通过加入含0.1%三氟乙酸的水中止。用制备HPLC纯化得到的糖肽，而产物的分子量则用FABMS确定。

据报道，丙基溴和烯丙基溴都能与未被保护的肽中的半胱氨酸硫醇反应得到作为主要产物的S-烷基化肽。

在N，N-二甲基甲酰胺/二甲基亚砜/乙腈的混合物中和PH 6-9的情况下，Yang 等人(1991)使含有半胱氨酸的八肽和十五肽与法尼基溴反应制得法尼基化的肽。N，N-二异丙基乙胺被用作促进剂。据报道，即使在PH 10-12时也生成全部的S-烷基化产物。

含半胱氨酸的肽的选择的S-烷基化还可使用各种烷基化试剂，如一级溴丙基衍生物，在甲醇胺或乙醇胺中进行(Or 等人，1991)。

## 1.2. 间隔臂苷的合成(图1和2)

用于偶合的间隔臂糖苷举例说明如下：

NeuNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc(3"-唾液基乳糖)的DIB $\beta$ -糖苷和2-溴乙基 $\beta$ -糖苷、Gal $\alpha$ 4Gal和Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc的2-溴乙基 $\beta$ -糖苷以及“GM3内酰胺”的2-溴乙基糖苷(分别是化合物9、15、28、48和

55)。

3''-唾液基乳糖的D1B $\beta$ -糖苷(9)可从2-三甲基硅基乙基2,3,6-三-O-乙酰基-4-O-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(1)用11个步骤合成(Jansson等,1988)。对(1)去乙酰基化得到(2),对(2)进行异亚丙基化和苄基化得到苄基保护的3',4'-O-异亚丙基乳糖衍生物(3)。水解3',4'-缩醛得到总产率为51%的糖基受体(4)。在乙腈中和-23℃下对乳糖衍生物(4)进行糖基化(Marra和Sinaÿ,1990)使用唾液酸甲酯的乙酰基保护的 $\alpha$ -黄原酸酯(5)(Marra和Sinaÿ,1989)作为糖基给体,使用三氟甲基磺酸的二甲基(甲硫基)硫鎓盐(DNTST)作为促进剂,在去苄基和乙酰基化后得到产率为17.5%的三糖衍生物(6)。当反应产物的不反应羟基官能团的乙酰基化在苄基醚氢解前进行时,(6)的纯化难易程度和其产率可得到少许的改善。将2-三甲基硅基乙基糖苷(6)转化为相应的1 $\beta$ -乙酸酯(7)(Jansson等,1988),(7)在路易斯酸催化的3-溴-2-溴甲基丙-1-醇的糖基化中用作糖基给体,得到保护的 $\beta$ -糖苷(8),产率46%。先用甲醇钠再用甲醇钠-氢氧化钠水溶液除去(8)的保护基,得到3''-唾液基乳糖的D1B $\beta$ -糖苷(9)。对(9)去除HBr后得到相应的2-溴甲基丙-2-烯-1-基糖苷,其用作与肽的偶合。

3''-唾液基乳糖的2-溴乙基 $\beta$ -糖苷(15)也可以通过五个顺序步骤从乙酰基保护的乳糖的2-溴乙基糖苷(10)合成(Magnusson等,1982)。对(10)去乙酰基化得到(11),

对 (11) 异亚丙基化 (Catelani, 1988) 得到产率为 86% 的 3', 4' - O - 异亚丙基衍生物 (12)。在 -60℃ 部分苯甲酰化 (Murase 等, 1989), 接着水解 3', 4' - 缩醛得到产率为 31% 的 2, 6, 6' - 三 - O - 苯甲酸酯 (13)。使用黄原酸酯 (5) 作为糖基给体以及三氟甲基磺酸的甲基硫脲盐作为促进剂, 对乳糖衍生物 (13) 在 -60℃ 进行糖基化 (Lönn 和 Stenvall, 1992) 得到保护的三糖衍生物 (14), 产率 75%。象对 (8) 那样对 (14) 去保护基得到产率为 96% 的 2 - 溴乙基糖苷 (15)。

### 1. 3. 实验

除非另有说明, 用 Varian Gemini 300 分光计分别在 300 和 75 MHz 并在 CDCl<sub>3</sub> 中记录 <sup>1</sup>H - 和 <sup>13</sup>C - NMR 谱, 分别在 7.25 和 77.0 ppm 的未氘代溶剂信号用作内参信号。

用 Perkin Elmer 241 旋光仪测定旋光度。

在 Merck DC - Fertigplatten (硅胶 60 F<sub>254</sub> 0.25 mm) 上进行薄层色谱实验, 通过喷涂 10% 硫酸并接着在高温下碳化和 / 或喷涂钼磷酸 / CeSO<sub>4</sub> / 稀硫酸并接着加热来观察色谱点 (Renaud 和 Seebach, 1986)。Matrex<sup>TM</sup> 硅胶 Si 0.35 - 0.70 μ 用于制备色谱。

使用 Beckman System Gold 色谱系统在 Beckman Ultrasphere C-18 (4.6 × 150 mm) 柱上用含 0.1% 三氟乙酸的乙腈 - 水混合物进行 HPLC 实验。对于制备性的操作, 使用

Beckman Ultraprep C-18 (10  $\mu$ , 21.2  $\times$  150 mm) 柱。  
色谱 214 mm 操作。

2-三甲基甲硅烷基乙基 4-O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基- $\beta$ -

---

D-吡喃葡萄糖苷 (2)

---

将 2-三甲基甲硅烷基乙基 2,3,6-三-O-乙酰基-4-O-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (1) (Janssen 等, 1988)  
(29.4 g, 40 mmol) 在甲醇钠 (5.8 mM, 515 ml) 中  
搅拌 1.5 小时。用乙酸中和, 蒸发并用乙醇结晶得到 (2)  
(14.6 g, 82%)。

m.p. 175-177°C

$[\alpha]_D^{22}$ : +18.5° (c 1.0, 水)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CD}_2)_2\text{COONa}$ )  $\delta$ : 4.51 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1/H-1'), 4.46 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-1/H-1'), 4.10-3.50 (13 H), 3.30 (t, 1H,  $J=8.5$  Hz), 1.09 (td, 1H,  $J=13, 13$  和 6 Hz,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.98 (td, 1H,  $J=13, 13$  和 5.5 Hz,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.04 (s,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CD}_2)_2\text{COONa}$ )  $\delta$ : 105.7 (C-1/C-1'), 104.2 (C-1/C-1'), 81.2, 78.2, 77.6, 77.4, 75.7, 75.4, 73.8, 71.4, 71.2, 63.8, 62.9, 20.4 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.4 ( $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

2-三甲基甲硅烷基乙基 2,3,6-三-O-苄基-4-O-(2,

6-二-O-苄基-3,4-O-亚异丙基-β-D-吡喃半乳糖

---

基)-β-D-吡喃葡萄糖苷 (3)

---

向化合物 (14.5 g, 32.9 mmol) 在 2,2-二甲氧基丙烷 (250 ml) 中的溶液中加入对甲苯磺酸-水合物 (1.6 g)。搅拌该混合物 165 分钟, 然后加入三乙胺 (9 ml), 再蒸发混合物。剩余物 (含缩醛混合物) 用 5% 乙酸水溶液 (100 ml) 处理 50 分钟, 再蒸发得到 (依据 TLC) 主要产物和微量的次要成分 (估计可能是 4', 6'-缩醛)。

将粗产物 (15.5 g) 的一部分 (11.9 g, 25.3 mmol) 在氮气下溶于干燥的 N,N-二甲基甲酰胺中。加入氢化钠 (60%, 6.16 g, 154 mmol), 搅拌混合物达 1 小时。然后在 15 分钟时间内加入苄基溴 (21 ml, 177 mmol), 继续搅拌 14 小时, 向混合物中加入甲醇, 接着加水, 然后使混合物在二氯甲烷和水之间分配。水相用二氯甲烷萃取一次, 合并的有机相经干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、过滤和蒸发。再通过色谱分离 (甲苯-乙酸乙酯) 得到糖浆状的化合物 3 (1.5 g, 7.3%)。

$[\alpha]_D^{22}$ : +16.5° (c 1.2, 氯仿 )

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 7.45-7.25 (25H, Ar-H), 5.0-4.3 (12H, 异头物和苄基信号 ), 4.15-3.90 (4H), 3.85-3.30 (10H), 1.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.14-0.97 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.05 (s,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 139.3, 139.0, 138.8, 138.7, 138.6, 128.5-127.4, 109.9 ( $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}$ ), 103.3 (C-1/C-1'), 102.0 (C-1/C-1'), 83.1, 82.0, 80.7, 79.9, 75.4, 75.1, 74.9, 73.6, 73.4, 73.2, 72.0, 68.9, 68.34, 67.3, 27.8, 26.2, 18.3 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), -1.7 ( $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

2 - 三甲基甲硅烷基乙基 2 , 3 , 6 - 三 - O - 苄基 - 4 - O -

---

( 2 , 6 - 二 - O - 苄基 -  $\beta$  - D - 吡喃半乳糖基 ) -  $\beta$  - D - 吡喃

葡萄糖苷 ( 4 )

---

将在 80 % 乙酸水溶液 ( 110 ml ) 中的化合物 3 ( 14 . 9 g , 15 . 9 mmol ) 在 80 °C 下搅拌 30 分钟 , 然后蒸发。通过色谱分离 ( 甲苯 - 乙酸乙酯 4 : 1 ) 得到化合物 4 ( 12 . 3 g , 86 % ) 。分析样品用庚烷结晶。

m.p. 98.8-100.1°C

$[\alpha]_D^{22}$ : +15.6° (c 1.4, 氯仿)

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 7.45-7.20 (25H, Ar-H), 5.05-4.56 (7H), 4.50-4.35 (5H), 4.10-3.30 (14H), 2.53 (bs, 1H, OH), 2.45 (bs, 1H, OH), 1.13-0.97 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.04 (s,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 139.4, 139.0, 138.6, 138.5, 138.2, 128.7-127.4, 103.3 (C-1/C-1'), 102.7 (C-1/C-1'), 82.9, 82.6, 80.1, 76.7, 75.2, 74.1, 74.9, 73.5, 73.46, 73.2, 72.8, 68.8, 68.6, 68.4, 67.4, 18.3 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), -1.7 ( $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

2 - 三甲基甲硅烷基乙基 2, 3, 6 - 三 - O - 乙酰基 - 4 -

O - { 2, 4, 6 - 三 - O - 乙酰基 -  $\alpha$  - O - [ ( 5 - 乙酰胺基 -

4, 7, 8, 9 - 四 - O - 乙酰基 - 3, 5 - 二脱氧 - D - 甘油基 -

$\alpha$  - D - 半乳糖基 - 2 - 壬酮吡喃糖 ) 羧酸甲酯 ] -  $\beta$  - D - 吡喃半

乳糖基 } -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷 ( 6 )

在氮气下, 将干燥乙腈 ( 114 ml ) 中化合物 4 ( 8.8 g, 9.9 mmol )、化合物 5 ( 2.93 g, 4.9 mmol ) 和粉末状分子筛 ( 3A, 12 g ) 冷却至 -23°C。搅拌下向该混合物加入三氟甲

磷酸二甲基（甲硫基）硫脲盐（Marra 和 Sinaÿ, 1990）  
 （25.7 mmol）的乙腈（50 ml）溶液（50 ml），反应混合物在  
 -23℃下搅拌2小时，然后用硅藻土过滤，并在饱和的碳酸氢钠水  
 溶液和二氯甲烷之间分配。用二氯甲烷萃取水相一次，合并的有机相  
 经干燥（Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>），过滤和蒸发。并通过色谱分离（甲苯-乙  
 酸乙酯-甲醇，35：35：1）得到含有一个主要成分和两个次要  
 成分的级分（1.96 g）。在乙酸酐-吡喃（1：1）中乙酰化  
 12小时，蒸发后得到粗产物，对该粗产物在35 p s i下和冰醋酸  
 中用10%钯/碳作为催化剂（50 ml乙酸、0.75 g 10% Pd  
 /C（每克基础物）氢化4.5小时。过滤、蒸发并通过色谱分离  
 （甲苯-乙醇，6：1）得到主要级分。对该级分象上面那样乙酰化。  
 再经色谱分离（甲苯-乙醇，18：1→10：1），得到无定形化  
 合物6（1.0 g，17.5%）。

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup>: -8.8°（C 1.2，氯仿）

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 5.54 (ddd, 1H,  $J=9.5, 5.0$  和  $2.5$  Hz, H-8''), 5.38 (dd, 1H,  $J=9.5$  和  $2.8$  Hz, H-7''), 5.17 (t, 1H,  $J=9.5$  Hz, H-3), 5.08 (d, 1H,  $J=10.5$  Hz, NH), 4.97-4.82 (4H, H-2, H-2', H-4', H-4''), 4.62 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1'), 4.54-4.37 (4H, 特别是 H-1, H-3'), 4.18 (dd, 1H,  $J=12$  和  $5.5$  Hz), 4.1-3.8 (10H), 3.83 (s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.65-3.49 (3H), 2.58 (dd, 1H,  $J=12.5$  和  $4.5$  Hz, H-3''ekv.), 2.23, 2.15, 2.07, 2.05, 2.03, 2.02, 2.0 和 1.84 (单峰每个  $3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.06 (s, 6H,  $2\times\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.67 (t, 1H,  $J=12.5$  Hz, H-3''ax.), 1.01-0.81 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), -0.015 (s,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 171.2, 170.9 (2C), 170.8, 170.7, 170.5, 170.1, 170.0, 169.94, 169.88, 168.3 (C-1''), 101.1 (C-1/C-1'), 100.0 (C-1/C-1'), 96.8 (C-2''), 76.4, 73.6, 72.5, 72.0, 71.9, 71.4, 70.4, 69.9, 69.3, 67.7, 67.4, 67.3, 66.9, 62.3, 62.2, 61.4, 53.0 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 49.0 (C-5''), 37.2 (C-3''), 23.0, 21.3, 20.7-20.4, 17.7 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), -1.8 ( $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ) ppm.

#### 元素分析

对  $\text{C}_{49}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{29}\text{Si}$  的计算值: C, 50.4; H, 6.2; N, 1.2. 实验值: C, 50.3; H, 6.4; N, 1.2.

1, 2, 3, 6 - 四 - O - 乙酰基 - 4 - O - { 2, 4, 6 - 三  
 - O - 乙酰基 - 3 - [ ( 5 - 乙酰氨基 - 4, 7, 8, 9 - 四 - O -  
 乙酰基 - 3, 5 - 二脱氧 - D - 甘油基 -  $\alpha$  - D - 半乳糖基 - 2 - 壬  
 酮吡喃糖 ) 羧酸甲酯 ] -  $\beta$  - D - 吡喃半乳糖基 } -  $\beta$  - D - 吡喃葡

## 糖苷 ( 7 )

---

将化合物 6 ( 840 mg, 0.72 mmol ) 溶于甲苯 ( 5.6 ml ) 和乙酸酐 ( 1.06 ml ) 的混合物中, 向该溶液中加入醚合三氟化硼 ( 0.36 ml, 2.91 mmol ) 的甲苯 ( 2.04 ml ) 溶液 ( 1.45 ml )。搅拌反应混合物 140 分钟, 然后将其在二氯甲烷和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。水相用二氯甲烷萃取一次, 合并的有机相经干燥 (  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  )、过滤和蒸发得到粗产物 ( 7 ) ( 815 mg )。用甲醇结晶得到化合物 7 ( 586 mg )。母液经色谱分离 ( 甲苯-乙醇, 20:1  $\rightarrow$  10:1 ) 得到另外的化合物 ( 7 ) ( 154 mg )。( 7 ) 的总产量为 740 mg ( 92% )。根据 NMR, 化合物 ( 7 ) 中包含了结晶时用的甲醇, 其摩尔比为 0.5 摩尔甲醇对 1 摩尔 ( 7 )。NMR 检测到少于 5% 的 1- $\alpha$  差向异构体。

$[\alpha]_D^{22}$ :  $-0.2^\circ$  (c 1.9, 氯仿 )

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 5.67 (d, 1H,  $J=8.5$  Hz, H-1), 5.51 (ddd, 1H,  $J=9.5, 4.5$  和 2.5 Hz, H-8''), 5.40 (dd, 1H,  $J=9.5$  和 2.5 Hz, H-7''), 5.22 (t, 1H,  $J=9$  Hz, H-3), 5.08 (d, 1H,  $J=10.5$  Hz, NH), 5.04 (dd, 1H,  $J=9.5$  和 8.5 Hz, H-2), 4.96-4.83 (3H, H-2', H-4' 和 H-4''), 4.65 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1'), 4.50 (dd, 1H,  $J=10.5$  和 3.5 Hz, H-3'), 4.42 (dd, 1H,  $J=12.5$  和 2 Hz, H-9''), 4.42 (dd, 1H,  $J=12.5$  和  $<2$  Hz, H-6/H-6'), 4.20 (dd, 1H,  $J=12$  和 5 Hz, H-9''), 4.08-3.80 (9H), 3.84 (s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.75 (ddd, 1H,  $J=10, 5$  和 2 Hz, H-5/H-5'), 3.62 (dd, 1H,  $J=11$  和 3 Hz, H-6/H-6'), 3.45 (d, 1.5 H,  $J=5.5$  Hz,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), 2.57 (dd, 1H,  $J=12.5$  和 5 Hz, H-3''ekv.), 2.24-1.83 ( $\text{CH}_3\text{CO}$  信号 ), 1.67 (t, 1H,  $J=12.5$  Hz, H-3''ax.), 1.09 (q, 0.5 H,  $J=5.5$  Hz,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ppm。

$^{13}\text{C-NMR}$  ( (测定经过色谱分离的, 不含甲醇的样品) )  $\delta$ : 171.2, 170.9, 170.7, 170.66, 170.61, 170.5, 169.94, 169.9, 169.8, 169.2, 168.2, 101.0 (C-1'), 96.8 (C-2''), 91.6 (C-1), 75.7, 73.5, 73.1, 71.9, 71.3, 70.6, 70.4, 69.8, 69.2, 67.7, 67.2, 66.7, 62.0, 61.8, 61.5, 53.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 49.0 (C-5''), 37.2 (C-3''), 22.9, 21.3, 20.7, 20.6, 20.5, 20.5, 20.4 ppm。

3 - 溴 - 2 - 溴甲基丙 - 1 - 基 2, 3, 6 - 三 - O - 乙酰基 -  
4 - O - ( 2, 4, 6 - 三 - O - 乙酰基 - 3 - O [ ( 5 - 乙酰胺基  
- 4, 7, 8, 9 - 四 - O - 乙酰基 - 3, 5 - 二脱氧 - D - 甘油基  
-  $\alpha$  - D - 半乳糖基 - 2 - 壬酮吡喃糖 ) 羧酸甲酯 ] -  $\beta$  - D - 吡喃

## 半乳糖基 ) - $\beta$ - D - 吡喃葡萄糖糖苷 ( 8 )

将化合物 7 ( 0 . 9 6 g , 0 . 8 6 mmol ) 和 3 - 溴 - 2 - 溴甲基丙 - 1 - 醇 ( Ansari 等 , 1 9 8 7 ) ( 1 . 5 g , 6 . 5 mmol ) 溶于干燥二氯甲烷 ( 3 0 ml ) 中 , 然后冷却至 0  $^{\circ}$ C 。加入醚合三氟化硼 ( 1 . 9 ml , 1 5 mmol ) , 在 0  $^{\circ}$ C 下搅拌该混合物 4 0 分钟。除去冷却浴 , 继续搅拌 5 小时。然后用二氯甲烷稀释混合物 , 并用冰冷的饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。二氯甲烷相经干燥 (  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ) 、过滤和蒸发。并经过色谱分离 ( 甲苯 - 乙醇 , 2 0 : 1  $\rightarrow$  1 2 : 1 ) , 得到无定形的化合物 8 ( 5 1 2 mg , 4 6 % )。

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ : -0.5 (c 2.6, 氯仿 )

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 5.54 (ddd, 1H,  $J=9.5, 5$  和  $2.5$  Hz, H-8''), 5.40 (dd, 1H,  $J=9.5$  和  $3$  Hz, H-7''), 5.19 (t, 1H,  $J=9.5$  Hz, H-3), 5.04 (d, 1H,  $J=10$  Hz, NH), 4.97-4.82 (4H), 4.67 (d, 1H,  $J=8$  Hz, h-1'), 4.54-4.37 (4H), 4.19 (dd, 1H,  $J=12$  和  $5.5$  Hz, H-9''), 4.10-3.80 (10H), 3.84 (s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.66-3.42 (8H), 2.58 (dd, 1H,  $J=12.5$  和  $4.5$  Hz, H-3 ekv.), 2.38-2.22 (m,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ), 2.24 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.68 (t, 1H,  $J=12.5$  Hz, H-3''ax.) ppm。

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 171.1, 170.94, 170.9, 170.7, 170.6, 170.6, 170.5, 170.0, 169.97, 169.7, 169.8, 166.2 (C-1''), 101.1, 100.8, 96.8 (C-2''), 76.2, 73.1, 72.7, 72.0, 71.6, 71.3, 70.4, 69.6, 69.2, 69.1, 67.7, 67.2, 66.8, 62.1, 61.4, 53.0 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 47.0 (C-5''), 42.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ), 37.2 (C-3''), 32.7 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 31.6 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 22.9, 21.3, 20.7, 20.5, 20.4, 20.4 ppm。

3 - 溴 - 2 - 溴甲基丙基 4 - O - { 3 - O - [ ( 5 - 乙酰胺  
 基 - 3 , 5 - 二脱氧 - D - 甘油基 -  $\alpha$  - D - 半乳糖基 - 2 - 壬酮吡  
 喃糖 ) 羧酸钠 ] -  $\beta$  - D - 吡喃半乳糖基 } -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷

( 9 )

将化合物 8 ( 384 mg, 0.30 mmol ) 溶于甲醇钠  
 ( 0.03 M, 60 ml ) 并搅拌过夜。加入水 ( 100  $\mu$ l ), 用二  
 氧化硅中和混合物, 经过滤、浓缩和色谱分离 ( 氯仿 - 甲醇 - 水,  
 65 : 53 : 6 ), 得到无定形的化合物 9 ( 189 mg, 74 % )。

$[\alpha]_D^{22}$ : -3.4° (c 0.3, 甲醇 )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 4.44 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1/H-1'), 4.31 (d, 1H,  $J=8$   
 Hz, H-1/H-1'), 2.86 (dd, 1H,  $J=12.5$  和 3.5 Hz, H-3''ekv., 实际上是偶  
 合的), 3.43-2.31 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 1.73  
 (bt, 1H,  $J=12.5$  Hz, H-3''ax., 实际上是偶合的) ppm。

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 175.5, 174.9, 105.1 (C-1/C-1'), 104.6 (C-1/C-1'),  
 101.1 (C-2''), 54.0 (C-5''), 44.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ), 42.1 (C-3''), 33.9 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ),  
 33.7 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 22.7 ( $\text{NCOCH}_3$ ) ppm。

2-溴乙基 4-O-β-D-吡喃半乳糖基-β-D-吡喃葡萄糖

---

苷 (11)

---

按照 Dahmen 等人 (1983b) 的方法制备 2-溴乙基 4-O-(2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃半乳糖基)-2,3,6-三-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (0.17 mmol)。该粗产物溶于甲醇钠 (0.01 M, 1 L) 并搅拌 3 小时。混合物用二氧化硅中和, 经过滤、浓缩、色谱分离 (二氯甲烷-甲醇-水, 65:20:3), 并用乙醇结晶, 得到化合物 11 (37 g, 51%)。

m.p. 151-152°C

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 丙酮) δ: 4.57 (d, 1H, J=8.0 Hz, H-1), 4.45 (d, 1H, J=8 Hz, H-1'), 4.26-4.19 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), 3.98 (dd, 1H, J=12.5 和 1 Hz, H-6/H-6'), 3.93 (d, 1H, J=3.5 Hz, H-4'), 3.55 (dd, 1H, J=10 和 8 Hz, H-2'), 3.40-3.30 (m, 1H, H-2) ppm。

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 丙酮) δ: 105.7 (C-1'), 104.9 (C-1), 75.5 (C-2'), 73.7 (C-2), 71.3 (C-4'), 63.8 (C-6/C-6'), 62.9 (C-6/C-6'), 33.9 (CH<sub>2</sub>Br) ppm。

2-溴乙基 4-O-(3,4-O-亚异丙基-β-D-吡喃半

---

乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷 (12)

---

将化合物 11 (35 g, 78 mmol) 和对甲苯磺酸 (1.5 g,

8 mmol) 在 2, 2-二甲氧基丙烷 (800 ml) 中的混合物在 50 °C 下搅拌 1 小时, 然后在室温下搅拌过夜。加入三乙胺 (12 ml, 80 mmol), 搅拌混合物 30 分钟, 浓缩, 并用甲苯蒸发, 除去过量的三乙胺。粗产物溶于甲醇-水 (10:1, 900 ml), 并回流 2 小时。加入饱和的碳酸氢钠水溶液 (20 ml), 并浓缩混合物。经快速色谱分离 (氯仿-甲醇-三乙胺, 10:1:0.01) 和用乙醇结晶得到化合物 12 (32.7 g, 86%)。

m.p. 171-172°C

$[\alpha]_D^{22}$ : +11.1 ( $c$  0.7, 甲醇)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 丙酮)  $\delta$ : 4.56 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1), 4.49 (d, 1H,  $J=8.5$  Hz, H-1'), 4.37 (dd, 1H,  $J=5.5$  和 1.5 Hz, H-4'), 3.51 (dd, 1H,  $J=8$  和 8.0 Hz, H-2'), 3.36 (dd, 1H,  $J=9.0$  和 8 Hz, H-2), 1.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 丙酮)  $\delta$ : 113.7 ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ), 104.9 (C-1/C-1'), 81.4 (C-5), 81.3 (C-3'), 77.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 77.0 (C-3), 76.5 (C-4'), 76.2 (C-5'), 75.5 (C-2/C-2'), 63.5 (C-6/C-6'), 62.8 (C-6/C-6'), 33.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 29.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 28.1 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ) ppm.

#### 元素分析

对  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{BrO}_{11}$  的计算值: C, 41.7; H, 6.0 实验值: C, 41.5; H, 6.0。

2-溴乙基 2, 6-二-O-苯甲酰基-4-(6-O-苯甲酰

基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (13)

将化合物 12 (9.0 g, 18.4 mmol) 溶于干燥吡啶 (60 ml) 和二氯甲烷 (150 ml) 的混合物中, 并冷却至  $-50^{\circ}\text{C}$ 。在 3 小时内滴加在干燥二氯甲烷 (150 ml) 中的苯甲酰氯 (10.5 ml, 90.6 mmol), 混合物再继续搅拌 1 小时。然后加入甲醇, 浓缩溶液。将残余物溶于二氯甲烷 (500 ml), 并用盐酸 (2 M, 250 ml), 和饱和碳酸氢钠水溶液 (250 ml) 和饱和氯化钠水溶液 (250 ml) 洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 浓缩。粗产物溶于 80% 乙酸水溶液 (250 ml), 在  $80^{\circ}\text{C}$  下搅拌 30 分钟, 然后浓缩。经色谱分离 (二氯甲烷-甲醇, 30:1) 得到无定形的化合物 13 (4.3 g, 31%)。

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ :  $+15.8^{\circ}$  (c 1.0, 氯仿)。

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 8.24-8.02 (m, 15 H, Ar-H), 5.19 (dd, 1H,  $J=9.5$  和 8 Hz, H-2), 4.84 (dd, 1H,  $J=12.0$  和 1.5 Hz, H-6/H-6'), 4.66 (dd, 1H,  $J=12$  和 3.5 Hz, H-6/H-6'), 4.64 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1), 4.48 (dd, 1H,  $J=12.0$  和 6 Hz, H-6/H-6'), 4.37 (dd, 1H,  $J=12$  和 9 Hz, H-6/H-6'), 4.35 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 166.8, 166.6, 165.5, 104.1 (C-1'), 101.0 (C-1), 81.7, 73.5, 73.2, 73.1, 73.02, 72.96, 70.8, 69.6, 68.9, 64.1 (C-6/C-6'), 63.9 (C-6/6'), 29.6 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ) ppm.

元素分析

对  $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{BrO}_{14}$  的计算值: C, 55.2; H, 4.9。实验值: C, 55.2; H, 4.9。

2-溴乙基 2, 6-二-O-苯甲酰基-4-O-(6-O-苯

甲酰基 - 3 - O - [ ( 5 - 乙酰胺基 - 4 , 7 , 8 , 9 - 四 - O - 乙  
 酰基 - 3 , 5 - 二脱氧 - D - 甘油基 -  $\alpha$  - D - 半乳糖基 - 2 - 壬酮  
 吡喃糖 ) 羧酸甲酯 ] -  $\beta$  - D - 吡喃半乳糖基 } -  $\beta$  - D - 吡喃葡糖  
 苷 ( 14 )

在氩气下，将化合物13 ( 200 mg, 0.26 mmol )、化合物5  
 ( 263 mg, 0.44 mmol ) 和粉末状分子筛 ( 3A, 300 mg ) 在  
 乙腈和二氯甲烷 ( 9 : 4, 8 ml ) 的混合物中的溶液搅拌1小时。加  
 入三氟甲基磺酸银 ( 118 mg, 0.45 mmol )，将反应混合物冷却  
 至 - 60 °C。在5分钟内滴加甲基亚磺酰溴 ( Dasgupta 和 Garegg ,  
 1988 ) 的二氯甲烷溶液 ( 3.48 M, 126  $\mu$ l, 0.44  
 mmol )，然后搅拌混合物1小时。加入二异丙胺 ( 0.7 ml, 2.6  
 mmol )，继续搅拌0.5小时。混合物升至0 °C，过滤、浓缩、经色  
 谱分离 ( 氯仿 - 甲醇, 50 : 1 ) 得到无定形的化合物14 ( 244  
 mg, 75 % )。

$[\alpha]_D^{22}$ : +14.9° (c 1.0, 氯仿 )

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 5.33 (m, 1H, H-8''), 5.28 (dd 1H,  $J=8.0$  Hz, H-7''), 5.26 (dd, 1H,  $J=9.5$  Hz, H-2), 5.03-4.93 (m, 2H, H-4'', H-6/H-6'), 4.74 (dd, 1H,  $J=12$  和 3.5 Hz, H-6/H-6'), 4.70 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1), 4.59 (d, 1H,  $J=8$  Hz, H-1'), 4.50 (dd, 1H,  $J=12$  和 6 Hz, H-6/H-6'), 2.70 (dd, 1H,  $J=13.0$  和 4.5 Hz, H-3''ekv.) ppm<sub>D</sub>

(H-3, H-2' 和 H-4' 在 1 4 乙酰化后移至低场)

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 170.7, 170.4, 170.3, 170.1, 170.1, 168.1 (C-1'',  $J_{\text{C-1''-H-3''ax}}=6.1$  Hz), 166.6, 166.1, 165.4, 104.4 (C-1'), 101.1 (C-1), 97.6 (C-2''), 82.2, 76.4, 73.4, 73.0, 72.9, 63.7, 63.4, 62.4 (C-6, C-6', C-6''), 53.2 (CH<sub>3</sub>O), 49.6 (C-5''), 37.6 (C-3''), 29.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), 23.1 (NCOCH<sub>3</sub>), 21.0, 20.7, 20.6, 20.5 ppm<sub>D</sub>

元素分析:

对 C<sub>55</sub>H<sub>64</sub>BrNO<sub>26</sub> 的计算值: C, 53.5; H, 5.2。实验值: C, 53.5; H, 5.5。

2-溴乙基 4-O-{ 3-O-[ ( 5-乙酰胺基-3, 5-二

脱氧-D-甘油基- $\alpha$ -D-半乳糖基-2-壬酮吡喃糖) 羧酸钠 ]

- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基 } - $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 ( 1 5 )

化合物 1 4 ( 200 mg, 0.16 mmol ) 溶于甲醇钠 ( 0.03 M, 50 ml ), 并搅拌 6 小时。加入 50  $\mu$ l 水, 搅拌混合物 5 分钟,

用二氧化硅中和、经过滤、浓缩和色谱分离（氯仿—甲醇—水，6：4：1）得无定形的化合物 25（118 mg，96%）。

$[\alpha]_D^{22}$ : -0.9 (c 1.0, 水)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 丙酮)  $\delta$ : 4.57 (d, 1H,  $J=8\text{Hz}$ , H-1/H-1'), 4.54 (d, 1H,  $J=8.5\text{ Hz}$ , H-1 or H-1'), 2.77 (dd, 1H,  $J=12.2$  和  $4.3\text{ Hz}$ , H-3e''), 2.03 (s, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 1.81 (bt, 1H, H-3a'').

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 丙酮)  $\delta$ : 177.0, 176.7, 105.6 (C-1'), 105.1 (C-1), 102.8 (C-2''), 54.7 (C-5''), 42.7 (C-3''), 34.0 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 25.0 ( $\text{NCOCH}_3$ ) ppm.

2-溴乙基 4-O-( $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基)- $\beta$ -D-吡喃

---

半乳糖苷 (28)

---

通过醚合三氟化硼催化的相应八乙酸酯的糖苷化（Dahmen 等，(1983a) P. 113）（1.25 g，异头物混合物）制备 2-溴乙基-2,3,6-三-O-乙酰基-4-O-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基)- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (27)。将粗产物悬浮于甲醇（20 ml）中，加入甲醇钠（0.2 M，4 ml），30 分钟后得到透明的溶液。反应混合物继续搅拌 30 分钟，然后用二氧化硅中和。经过滤、蒸发和色谱分离（氯仿—甲醇—水，65：35：6）得到化合物 28（335 mg，41

% )。

$[\alpha]_D^{22}$ : +69° (c 1.0, 甲醇)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 特别是 4.76 (d, 1H,  $J=2$  Hz, H-1'), 4.15 (d, 1H,  $J=7$  Hz, H-1), 4.09 (bt, 1H,  $J=6$  Hz), 3.92 (dt,  $J=11.5$  和 6.5 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 105.2, 102.5, 79.2, 76.2, 74.6, 72.7, 71.3, 71.1, 70.7, 62.7, 61.1, 30.9 ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 以丙酮 33.19 ppm 作参考):  $\delta$ : 105.9, 103.2, 80.0, 78.1, 75.2, 73.8, 73.7, 73.1, 72.1, 72.0, 71.6, 63.5, 63.0, 34.1 ppm.

元素分析:

对  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{BrO}_{11}$  的计算值: C, 37.4; H, 5.6. 实验值: C, 37.1; H, 5.9.

2-溴乙基 4-O-(4-O- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基- $\beta$ -D

-吡喃半乳糖基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (48)

通过在 10 ml 0.1 M 甲醇钠中搅拌 16 小时, 对 2-溴乙基 2, 3, 6-三-O-乙酰基-4-O-[2, 3, 6-三-O-乙酰基-4-O-(2, 3, 4, 6-四-O-乙酰基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基)-D-吡喃半乳糖基]- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (53) 进行去乙酰化 (Dahmen 等, 1984) (35 mg)。用二氧化硅中和, 过滤, 蒸发, 色谱分离 (氯仿-甲醇-水; 65:35:6), 接着进行微量过滤和冷冻干燥, 得到化合物 48 (18.6 mg, 90%)。

$[\alpha]_D^{22}$ : +51° (c 1.0, 水 )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 以丙酮 2.24ppm 作参考)  $\delta$ : 4.96 (d, 1H,  $J=4$  Hz, H-1"), 4.57 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, H-1/H-1'), 4.52 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-1/H-1), 4.37 (bt, 1H, 4.27-4.19 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$ ) 4.09-3.55 (19H), 3.36 (bt, 1H) ppm。

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 以丙酮 33.19ppm 作参考)  $\delta$ : 106.2 (C-1/C-1), 105.1 (C-1/C-1'), 103.3 (C-1"), 81.6, 80.3, 78.4, 77.8, 77.3, 75.7, 75.1, 73.9, 73.8, 73.0, 72.1, 71.9, 71.5, 63.5, 63.3, 63.0, 33.9 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ) ppm。

“GM<sub>3</sub> 内酰胺”的 2-溴乙基糖苷 (55)

---

标题化合物 (Ray 等, 1992) 相应 + 乙酸酯在 9.5 mM 甲醇钠中和室温下去 O-乙酰基 7 小时。用二氧化硅中和, 蒸发, 色谱分离 (氯仿-甲醇-水, 65:35:6) 得到化合物 55 (26 mg, 定量)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CD}_2)_2\text{COONa}$ )  $\delta$ : 特别是 3.37 (bt, 1H), 2.61 (dd, 1H,  $J=13$  和 6 Hz, H-3"e), 2.05 (s, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 1.71 (dd, 1H,  $J=11$  和 13 Hz, H-3"a) ppm.

在丝氨酸侧链 O-糖基化的肽可采用固相肽合成技术合成。用 O-乙酰化的 Gal 2.4 Gal 的  $\beta$ -硫糖苷对丝氨酸 (分别在氨基端和羧基端以 9-苄基甲氧基羰基-和五氟苯基衍生物的形式保护) 进行

糖基化，得到 O-糖基化的丝氨酸衍生物。这些衍生物用于固相肽合成中。从树脂上剥离下来并经 HPLC 纯化后，得到的糖肽在碳水化合物部分仍以酰基的形式被保护着。用碱催化进行完全地去保护，产物用 HPLC 纯化。产物 FAB-MS 数据与理论值相吻合。

SEQ ID NO:

4  
5  
6  
7  
8  
9  
21  
22  
23  
24  
13  
14  
25  
26

用于共轭的肽是：

KIASNENMDAMESSTLEC  
KIASNENMETME  
KASNENMETMC  
CASNENMETM  
CSGPSNTPPEI  
SGVENPGGYCLT  
ASNENhETM  
ASNhNMETM  
SGPSNhPPPEI  
SGPhNTPPEI  
CRGYVYQGL  
CAPGNYPAL  
RGYhYQGL  
FAPGhYPAL

化合物编号

(16)  
(17)  
(18)  
(19)  
(20)  
(26)  
(32)  
(33)  
(34)  
(35)  
(36)  
(37)  
(38)  
(39)

(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(K<sup>b</sup>-限制的)  
(K<sup>b</sup>-限制的)  
(K<sup>b</sup>-限制的)  
(K<sup>b</sup>-限制的)

SEQ ID NO:

10  
11  
12  
3  
15  
16  
17  
18

其他适于共轭的肽的例子有：

KQIASNENMETMESC  
KGPSNTPPEIC  
KSGPSNTPPEIHC  
GILGFVFTL  
MVVKLGEFYNQMM  
CPTNQVVLEGTNKTD  
MQIRGFVYFVET  
LSPGMMMGMFNM

(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(D<sup>b</sup>-限制的)  
(HLA-A2-限制的)  
(HLA-A2-限制的)  
(HLA-A2-限制的)  
(HLA-A2-限制的)  
(HLA-A2-限制的)

(h = 高半胱氨酸)

## 用于制备糖肽的方法

---

### 方法 A：通过 2-溴甲基丙-2-烯-1-基间隔臂共轭

---

在氩气下，将在 N，N-二甲基甲酰胺（100  $\mu$ l）中的 3-溴-2-溴甲基丙-1-基糖苷（10  $\mu$ mol）和 N，N，N，N-四丁基氟化铵（40-100  $\mu$ mol）的浆液搅拌 10 分钟。加入溶于 N，N-二甲基甲酰胺（DMF）或二甲亚砜（DMSO）（200-1000  $\mu$ l）中的肽（8  $\mu$ mol），混合物用声波处理 5 分钟，然后搅拌 1.5-2.5 小时。用 HPLC 监测反应。用 0.1% 的三氟乙酸溶液稀释混合物，并进行冷冻干燥。经制备的 HPLC 分离（乙腈-水-0.1% 三氟乙酸）得到所需要的糖肽（参见表 2）。

### 方法 B：通过 2-溴乙基间隔臂共轭

---

在氩气下，将肽（5  $\mu$ mol）加到 2-溴乙基糖苷（10  $\mu$ mol）和碳酸铯（20-100  $\mu$ mol）在 N，N-二甲基甲酰胺（400  $\mu$ l）中的浆液中。混合物经声波处理 5 分钟，然后搅拌 1-5 小时。用 HPLC 监测反应，用 0.1% 三氟乙酸溶液稀释反应物并冷冻干燥。经制备 HPLC 分离（乙腈-水-0.1% 三氟乙酸）得到所期望的糖肽（参见表 2）。

肽以及合成的糖肽以三氟甲基磺酸盐的形式存在。

除了使用碳酸铯作促进剂的方法外，肽共轭物 24 还可根据 Or 等人的方法制备，HPLC 对两种反应混合物的分析表明主要产物峰

具有相同的保留时间。但是，用碳酸铯作为促进剂可获得更完全的反应和更易纯化的产物。

### 糖肽制备实施例

---

#### 共轭物 2 1

---

在氩气下，将化合物 9 ( 2 . 9 mg, 3 . 4  $\mu$ mol ) 和 N, N, N, N - 四丁基氟化铵 ( 9 . 8 mg, 3 0 . 6  $\mu$ mol ) 在 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 3 5  $\mu$ l ) 中的浆液搅拌 1 0 分钟。加入溶于二甲基亚砜 ( 3 5 0  $\mu$ l ) 中的肽 1 6 ( 8 . 1 mg, 2 . 7  $\mu$ mol )，混合物声波处理 5 分钟，然后搅拌 1 5 小时。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 4 0 % 乙腈梯度， 2 0 分钟 ) 监测反应。混合物用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液稀释并冷冻干燥，经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 1 7 % 乙腈 ) 得到化合物 2 1 ( 1 mg, 1 1 % )。

保留时间 ( 分析实验 ) : 烯丙基溴 ( 来自 9 ) : 1 0 . 7 分 ;  
2 1 : 1 4 . 2 分 ; 1 6 : 1 5 . 8 分。

#### 共轭物 2 2

---

在氩气下，将化合物 9 ( 1 1 mg, 1 2 . 9  $\mu$ mol ) 和 N, N, N, N - 四丁基氟化铵 ( 3 7 mg, 1 1 6  $\mu$ mol ) 在 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 1 3 0  $\mu$ l ) 中的浆液搅拌 1 0 分钟，加入溶于二甲基亚砜 ( 7 5 0  $\mu$ l ) 中的肽 1 7 ( 2 0 mg, 1 0 . 2  $\mu$ mol )，混合物进行声波处理，再搅拌 2 . 5 小时。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶

液中的 0 - 40 % 乙腈梯度, 20 分钟) 监测反应。用 0.1 % 三氟乙酸溶液稀释混合物并冷冻干燥。经制备 HPLC 分离 (在 0.1 % 三氟乙酸溶液中的 14 % 乙腈) 得到化合物 22 (3 mg, 10 %)。

保留时间 (分析实验): 烯丙基溴 (来自 9): 10.7 分;  
22: 13.0 分; 17: 14.3 分。

#### 共轭物 23

---

在 N, N - 二甲基甲酰胺 (150  $\mu$ l) 中用 N, N, N, N - 四丁基氟化铵 (39 mg, 124.0  $\mu$ l) 处理化合物 9 (13 mg, 15.5  $\mu$ mol), 加入溶于二甲基亚砜 (600  $\mu$ l) 中的肽 18 (20 mg, 12.0  $\mu$ mol), 混合物用声波处理 5 分钟, 再搅拌 2.5 小时。用 HPLC (在 0.1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 40 % 乙腈梯度, 20 分钟) 监测反应。混合物用 0.1 % 三氟乙酸溶液稀释并冷冻干燥。经制备 HPLC 分离 (在 0.1 % 三氟乙酸溶液中的 12 % 乙腈) 得到化合物 23 (8 mg, 29 %)。

保留时间 (分析实验): 23: 12.2 分; 18: 13.5 分。

#### 共轭物 24

---

在氩气下, 将肽 19 (10 mg, 6.8  $\mu$ mol) 加到化合物 15 (10 mg, 13.6  $\mu$ mol) 和碳酸铯 (11.5 mg, 35.2  $\mu$ mol) 在 N, N - 二甲基甲酰胺 (550  $\mu$ l) 中的浆液中, 混合物用声波处理 5 分钟, 再搅拌 5 小时。用 HPLC (在 0.1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 30 % 乙腈梯度, 30 分钟) 监测反应。混合物用 0.1 % 三氟乙酸溶液稀释并冷冻干燥。经制备 HPLC 分离 (在

0.1%三氟乙酸溶液中的12-15%乙腈梯度, 30分钟)得到24 (8.5 mg, 59%)。

保留时间(分析实验): 15: 8.7分; 24: 18分;  
19: 19.3分。

根据Or等人(1991)的方法制备共轭物24

---

在氩气下将化合物15 (8 mg, 10.5  $\mu$ mol)和肽19 (2 mg, 1.4  $\mu$ mol)溶于干燥N,N-二甲基甲酰胺(400  $\mu$ l)中。该溶液用氩饱和, 搅拌1.5小时。用HPLC(在0.1%三氟乙酸溶液中0-30%乙腈梯度, 30分钟)监测反应, 表明主峰(52%)具有与按照方法B制备的化合物24相同的保留时间(18分)。

共轭物25

---

在氩气下, 将肽20 (10 mg, 6.0  $\mu$ mol)加到化合物15 (9 mg, 12.0  $\mu$ mol)和碳酸铯(39 mg, 120  $\mu$ mol)在N,N-二甲基甲酰胺(500  $\mu$ l)中的浆液中, 混合物声波处理5分钟, 再搅拌1小时。用HPLC(在0.1%三氟乙酸溶液中的0-30%乙腈梯度, 30分钟)监测反应。混合物用0.1%三氟乙酸溶液稀释并冷冻干燥。经制备HPLC分离(在0.1%三氟乙酸溶液中13-18%乙腈梯度, 30分钟)得到化合物25 (14 mg, 60%)。

保留时间(分析实验): 15: 8.7分; 25: 20.5分;  
20: 21.7分。

## 共轭物 29

---

在氩气下，将肽 20 (20.5 mg, 12.3  $\mu\text{mol}$ ) 加到化合物 28 (31.6 mg, 70.3  $\mu\text{mol}$ ) 和碳酸铯 (110.3 mg, 338  $\mu\text{mol}$ ) 在 N, N-二甲基甲酰胺 (1.6 ml) 中的浆液中，混合物用声波处理 5 分钟，接着搅拌 3 小时。用 HPLC 在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 0-30% 乙腈梯度，30 分钟) 监测反应，反应物用 0.1% 三氟乙酸溶液稀释并冷冻干燥。经制备 HPLC 分离 (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 13-18% 乙腈梯度，30 分钟) 得到化合物 29 (17.6 mg, 70%)。

保留时间 (分析实验)：28：6.2 分；29：20.8 分；20：21.8 分。

## 共轭物 30

---

在氩气下将肽 26 (10 mg, 6.5  $\mu\text{mol}$ ) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (800 ml) 中，加入化合物 28 (11.7 mg, 26  $\mu\text{mol}$ ) 和碳酸铯 (21.2 mg, 65  $\mu\text{mol}$ )。混合物用声波处理 5 分钟，再搅拌 2 小时。用 HPLC (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 0-30% 乙腈梯度，30 分钟) 监测反应。混合物用 0.1% 三氟乙酸溶液稀释并冻干。经制备 HPLC 分离 (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 13-18% 乙腈梯度，30 分钟) 得到化合物 30 (11.2 mg, 90%)。

保留时间 (分析实验，在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 0-30% 乙腈梯度，50 分钟)：28：6.2 分；30：21.5 分；26：

24.4分。

### 共轭物 31

---

在氩气下将肽 19 (15 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (1.2 ml)。加入化合物 28 (18 mg, 40  $\mu\text{mol}$ ) 和碳酸铯 (76.2 mg, 234  $\mu\text{mol}$ )。混合物用声波处理 5 分钟, 再搅拌 3 小时。用 HPLC (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 0-30% 乙腈梯度, 30 分钟) 监测反应。混合物用 0.1% 三氟乙酸溶液稀释并冻干。经制备 HPLC 分离 (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 13-18% 乙腈梯度, 30 分钟) 得到化合物 31 (13.8 mg, 75%)。

保留时间 (分析实验): 28.6.2 分; 31.17.7 分;  
19: 19.1 分。

### 共轭物 40

---

在氩气下将肽 38 (10 mg, 7.6  $\mu\text{mol}$ ) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (0.8 ml), 加入化合物 28 (13.7 mg, 30.5  $\mu\text{mol}$ ) 和碳酸铯 (24.8 mg, 76  $\mu\text{mol}$ )。混合物用声波处理 30 分钟, 再搅拌 1 小时。用 HPLC (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 0-40% 乙腈梯度, 30 分钟) 监测反应。混合物用 0.1% 三氟乙酸溶液 (16 ml) 稀释并冻干。经制备 HPLC 分离 (在 0.1% 三氟乙酸溶液中的 16-21% 乙腈梯度, 30 分钟) 得到 40 (16.6 mg, 52%)。

保留时间 (分析实验): 28: 6.7 分; 40: 18.8 分;

3 8 : 2 1 分。

#### 共轭物 4 1

---

氩气下将肽 3 9 ( 1 0 mg, 8  $\mu$ mol ) 溶于 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 0 . 8 ml ) , 加入化合物 2 8 ( 1 4 . 3 mg, 3 2  $\mu$ mol ) 和碳酸铯 ( 2 7 . 6 mg, 8 5  $\mu$ mol ) 。混合物用声波处理 1 5 分钟, 然后搅拌 6 5 分钟。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 4 0 % 乙腈, 3 0 分钟 ) 监测反应。混合物用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液 ( 1 6 ml ) 稀释并冻干。将粗产物与分别从 5 和 6 mg 肽类似制备的另外的两批产物收集在一起, 收集的产物经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中 1 9 - 2 4 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 得到化合物 4 1 ( 2 3 . 7 mg, 8 5 % ) 。

保留时间 ( 分析实验 ) : 2 8 : 6 . 7 分 ; 4 1 : 2 2 . 2 分 ; 3 9 : 2 4 . 3 分。

#### 共轭物 4 2

---

在氩气下将肽 3 6 ( 5 mg, 3 . 6  $\mu$ mol ) 溶于 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 0 . 4 ml ) 中。加入化合物 2 8 ( 6 . 4 mg, 1 4 . 3  $\mu$ mol ) 和碳酸铯 ( 1 1 . 6 mg, 3 5 . 7  $\mu$ mol ) 。混合物用声波处理 5 分钟, 再搅拌 2 小时。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中 1 7 - 2 2 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 监测反应。用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液稀释混合物并冻干。经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 1 7 - 2 2 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 得到 4 2 ( 7 . 1 mg, 9 5 % , 纯度 : 8 5 % ) 。

保留时间（分析实验）：2.8：6.2分；4.2：26.4分；  
3.6：27.6分。

共轭物 4.3

---

在氩气下将肽 3.7（10 mg, 7.35  $\mu\text{mol}$ ）溶于N, N-二甲基甲酰胺（0.8 ml）中。加入化合物 2.8（13.2 mg, 29.4  $\mu\text{mol}$ ）和碳酸铯（23.9 mg, 73.4  $\mu\text{mol}$ ）。用HPLC（在0.1%三氟乙酸溶液中的5-35%乙腈梯度，30分钟）监测反应。混合物用0.1%三氟乙酸溶液（16 ml）稀释并冻干。经制备HPLC分离（在0.1%三氟乙酸溶液中的17-22%乙腈梯度，30分钟）得到4.3（9.3 mg, 73%）。

保留时间（分析实验）：2.8：6.2分；4.3：24.6分；  
3.7：25.9分。

共轭物 4.4

---

在氩气下将肽 3.2（10 mg, 8  $\mu\text{mol}$ ）溶于二甲亚砜（0.8 ml）中。加入化合物 2.8（14.5 mg, 32  $\mu\text{mol}$ ）和碳酸铯（26 mg, 80  $\mu\text{mol}$ ）。混合物用声波处理10分钟，再搅拌1小时。用HPLC（在0.1%三氟乙酸溶液中的0-30%乙腈梯度，30分钟）监测反应。混合物用0.1%三氟乙酸溶液（16 ml）稀释并冻干。粗产物与从10 mg肽类似制得的另一批产物收集在一起，收集的产物经制备HPLC分离（在0.1%三氟乙酸溶液中的7-12%乙腈梯度，30分钟）得到4.4（14 mg, 54%）。

保留时间（分析实验）：2.6：6.2分；4.2：14.6分；

3 2 : 1 6 . 8 分。

#### 共轭物 4 5

---

在氩气下将肽 3 4 ( 1 0 mg, 6 . 8  $\mu$ mol ) 溶于 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 0 . 8 ml ) 中, 加入化合物 2 8 ( 1 1 . 2 mg, 2 5  $\mu$ mol ) 和碳酸铯 ( 2 0 . 2 mg, 6 2  $\mu$ mol )。混合物用声波处理 1 0 分钟, 再搅拌 2 小时。H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 3 0 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 监测反应。混合物用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液 ( 1 6 ml ) 稀释并冻干。经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 1 3 - 1 8 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 得到 4 5 ( 7 . 9 mg, 6 3 % )。

保留时间 ( 分析实验 ) : 2 8 : 6 . 2 分 ; 4 5 : 2 0 . 5 分 ; 3 4 : 2 5 . 2 分。

#### 共轭物 4 6

---

在氩气下将肽 3 5 ( 1 0 mg, 6 . 7  $\mu$ mol ) 溶于 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 0 . 8 ml ) 中, 加入化合物 2 8 ( 1 2 . 1 mg, 2 7  $\mu$ mol ) 和碳酸铯 ( 4 3 . 7 mg, 1 3 4  $\mu$ mol )。混合物用声波处理 2 0 分钟, 再搅拌 4 小时。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 3 0 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 监测反应。混合物用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液 ( 1 6 ml ) 稀释并冻干。经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 1 3 - 1 8 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 得到 4 6 ( 1 7 . 4 mg, 5 6 % )。

保留时间 ( 分析实验 ) : 2 8 : 6 . 2 分 ; 4 6 : 2 1 . 0 分 ;

3 5 : 2 3 . 8 分。

#### 共轭物 4 7

---

在氩气下将肽 3 3 ( 1 0 mg, 8  $\mu$ mol ) 溶于二甲亚砜 ( 0 . 8 ml ) 中, 加入化合物 2 8 ( 1 4 . 5 mg, 3 2  $\mu$ mol ) 和碳酸铯 ( 2 6 mg, 8 0  $\mu$ mol )。混合物用声波处理 1 0 分钟, 再搅拌 1 小时 5 5 分钟。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 3 0 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 监测反应。混合物用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液 ( 1 6 ml ) 稀释并冻干。粗产物与分别从 5 和 1 0 mg 肽类似制备的另外的两批产物收集在一起, 收集的产物经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 1 0 - 1 5 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 得到 4 7 ( 1 8 . 9 mg, 5 9 % )。

保留时间 ( 分析实验 ) : 2 8 : 6 . 2 分 ; 4 7 : 1 8 . 3 分 ; 3 3 : 2 0 . 6 分。

#### 共轭物 4 9

---

在氩气下将肽 2 6 ( 1 5 mg, 9 . 8  $\mu$ mol ) 溶于 N, N - 二甲基甲酰胺 ( 1 . 2 ml ) 中, 加入化合物 4 8 ( 2 3 . 8 mg, 3 9  $\mu$ mol ) 和碳酸铯 ( 3 1 . 9 mg, 9 8  $\mu$ mol )。混合物用声波处理 1 0 分钟, 再搅拌 1 小时 5 0 分钟。用 H P L C ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 0 - 3 0 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 监测反应。混合物用 0 . 1 % 三氟乙酸溶液 ( 2 4 ml ) 稀释并冻干。经制备 H P L C 分离 ( 在 0 . 1 % 三氟乙酸溶液中的 1 3 - 1 8 % 乙腈梯度, 3 0 分钟 ) 得到 4 9 ( 1 7 . 8 mg, 8 8 % )。

保留时间（分析实验）：48：10.1分；49：21.9分；  
26：24.4分。

共轭物 50

---

在氩气下将肽32（15 mg, 21.1  $\mu\text{mol}$ ）溶于二甲亚砜（0.6 ml）和N,N-二甲基甲酰胺（0.6 ml）的混合物中，该混合物用声波处理1分钟。加入化合物48（29.6 mg, 48  $\mu\text{mol}$ ）和碳酸铯（39.4 mg, 12.1  $\mu\text{mol}$ ）。混合物用声波处理15分钟，再搅拌1小时50分钟。用HPLC（在0.1%三氟乙酸溶液中的0-30%乙腈梯度，30分钟）监测反应。混合物用0.1%三氟乙酸溶液（16 ml）稀释并冻干。粗产物与从5 mg肽类似制备的另外的一批产物收集在一起，收集的产物经制备HPLC分离（在0.1%三氟乙酸溶液中的7-12%乙腈梯度，30分钟）得到50（14.3 mg, 74%）。

保留时间（分析实验）：48：10.1分；50：15.2分；  
26：16.8分。

共轭物 51

---

在氩气下将肽19（15 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ）溶于N,N-二甲基甲酰胺（0.4 ml）中，加入化合物55（6 mg, 8.3  $\mu\text{mol}$ ）和碳酸铯（56 mg, 17.2  $\mu\text{mol}$ ）。混合物用声波处理10分钟，再搅拌2小时。用HPLC（在0.1%三氟乙酸溶液中的0-30%乙腈梯度，30分钟）监测反应。混合物用0.1%三氟乙酸溶液稀释并冻干。经制备HPLC分离（在0.1%三氟乙酸溶液中的

1.0 – 1.4 % 乙腈梯度, 30 分钟) 得到 5.1 (8.2 mg, 4.5 % )。

保留时间 (分析实验): 5.5 : 13.0 分; 5.2 : 20.3 分;  
7.9 : 21.3 分。

共轭物 5.2

---

在氩气下将肽 2.0 (5 mg, 3  $\mu$ mol) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (0.4 ml) 中。加入化合物 5.5 (4.3 mg, 6  $\mu$ mol) 和碳酸铯 (3.7 mg, 1.14  $\mu$ mol)。混合物用声波处理 5 分钟, 再搅拌 3 小时 45 分钟。用 HPLC 分离 (在 0.1 % 三氟乙酸溶液中的 0 – 3.0 % 乙腈梯度, 30 分钟) 监测反应。混合物用 0.1 % 三氟乙酸溶液 (8 ml) 稀释并冻干。粗产物与从 5 mg 肽类似制备的另外的一批产物收集在一起, 收集的产物经制备 HPLC 分离 (在 0.1 % 三氟乙酸溶液中的 1.3 – 1.8 % 乙腈梯度, 30 分钟) 得到 5.2 (9.3 mg, 6.5 % )。

保留时间 (分析实验): 5.5 : 13.0 分; 5.2 : 22.7 分;  
2.0 : 23.6 分。

表 2

| 起始原料 (序号) | 方法 | 反应条件                                          | 分离出的产物<br>(序号) | 产率<br>(%) | 分析                                                       |
|-----------|----|-----------------------------------------------|----------------|-----------|----------------------------------------------------------|
| 9 + 16    | A  | DMSO, 1000 $\mu\text{L}$ <sup>a</sup> , 1.5 h | 21             | 11        | HPLC <sup>c</sup>                                        |
| 9 + 17    | A  | DMSO, 750 $\mu\text{L}$ <sup>a</sup> , 2.5 h  | 22             | 10        | HPLC <sup>c</sup>                                        |
| 9 + 18    | A  | DMSO, 500 $\mu\text{L}$ <sup>a</sup> , 2.5 h  | 23             | 29        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1943 <sup>d</sup> |
| 15 + 19   | B  | DMF, 400 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 5 h     | 24             | 59        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1788 <sup>d</sup> |
| 15 + 20   | B  | DMF, 400 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 1 h     | 25             | 60        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1761 <sup>d</sup> |
| 28 + 20   | B  | DMF, 1300 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 3 h    | 29             | 70        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1469 <sup>d</sup> |
| 28 + 26   | B  | DMF, 615 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2 h     | 30             | 90        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1564 <sup>d</sup> |
| 28 + 19   | B  | DMF, 600 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 3 h     | 31             | 75        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1497 <sup>d</sup> |
| 28 + 38   | B  | DMF, 525 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 1.5 h   | 40             | 52        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1342 <sup>d</sup> |
| 28 + 39   | B  | DMF, 500 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 1.3 h   | 41             | 86        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1320 <sup>d</sup> |
| 28 + 36   | B  | DMF, 560 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2.1 h   | 42             | 95        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1426 <sup>d</sup> |
| 28 + 37   | B  | DMF, 545 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 1.75 h  | 43             | 73        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1273 <sup>d</sup> |

| 起始原料 (序号) | 方法 | 反应条件                                                        | 分离出的产物<br>(序号) | 产率<br>(%) | 分析                                                       |
|-----------|----|-------------------------------------------------------------|----------------|-----------|----------------------------------------------------------|
| 28 + 32   | B  | DMSO, 500 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 1.2 h                | 44             | 54        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1380 <sup>d</sup> |
| 28 + 34   | B  | DMF, 590 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2.2 h                 | 45             | 63        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1382 <sup>d</sup> |
| 28 + 35   | B  | DMF, 600 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 4.3 h                 | 46             | 56        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1395 <sup>d</sup> |
| 28 + 33   | B  | DMSO, 500 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2.1 h                | 47             | 59        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1382 <sup>d</sup> |
| 48 + 26   | B  | DMF, 612 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2 h                   | 49             | 88        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1725 <sup>d</sup> |
| 48 + 32   | B  | DMSO + DMF (1:1),<br>495 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2.1 h | 50             | 74        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1542 <sup>d</sup> |
| 55 + 19   | B  | DMF, 200 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 2.2 h                 | 51             | 45        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1759 <sup>d</sup> |
| 55 + 20   | B  | DMF, 665 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup> , 3.8 h                 | 52             | 65        | HPLC <sup>c</sup> , [M+H] <sup>+</sup> 1741 <sup>d</sup> |

a  $\mu\text{L}/10 \text{ mmol}$  肽

b  $\mu\text{L}/5 \mu\text{mol}$  肽

c. 产物总是比肽起始原料出峰快而比碳水化合物起始原料出峰慢。

d. FAB - MS数据与理论值一致。

## 2. 通过用合成的 9-链节肽免疫获得体内病毒特异性 CTL 的

### 初级诱发

#### 2.1 方法

通过使用本发明的新共轭物免疫进行毒性 T 细胞 (CTL) 的体内初级诱发, 其方法类似于下述的通过使用合成的 9-链节肽免疫进行的体内病毒-特异性 CTL 的初级诱发。

用预先处理的合成肽, 即相应于感冒 A 病毒-感染细胞中制备的内生 9-链节肽, 对大鼠接种, 产生了较强的初级 CTL 反应。生成的 CTL 有效地杀死病毒感染的靶细胞, 尤其是那些与免疫所用的肽具有相同氨基酸序列的病毒株。用溶于 IFA 的 100  $\mu$ g 肽在尾根部进行皮下注射可获得体内初级 CTL 反应的最佳条件。用最佳的低浓度肽 (0.05  $\mu$ m) 对预先已接触抗原 7-10 天的脾细胞在体外重新刺激 5 天, 并对病毒感染的和用肽处理的靶细胞测试。肽诱发的 CTL 是 MHC I 类抑制的和 CD 8 阳性的。

肽

肽 A S N E N M E T M (表示为 P e p 9 (P R 8); S E Q I D N O: 1) 和 A S N E N M D A M (表示为 P e p 9 (N T 6 0); S E Q I D N O: 4 的 3-11 残基) 分别取自感冒 A 病毒株 A / P R / 8 / 3 4 和 A / N T / 6 0 / 6 8 的 N P 3 6 6 - 3 7 4。P e p 9 (P R 8) 用 Applied Biosystems 430 A 肽

合成器 ( Applied Biosystems , Inc ., Foster City , CA )。Peptag ( NT 60 ) 通过固相 “茶袋 ( tea bag )” ( Houghten , 1985 ; Sällberg , 1991 ) 合成。所有的肽都经反相 HPLC 纯化, 并用等离子区解吸质谱分析氨基酸组成。在 PBS 中制备肽的储存溶液, 在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 免疫

---

通过在尾根部一次皮下注射溶于 IF A 中的  $100\text{ }\mu\text{g}$  不含合成肽的或通过一次静脉注射在 PBS 中稀释的  $20\text{ HAU}$  感冒 A 病毒对小鼠免疫。小鼠在免疫后 1 - 2 周期间使用。

### 体外生成感冒 A 病毒特异性 CTL

---

将免疫脾细胞制成细胞悬浮液。用每升蒸馏水中含有  $8.29\text{ g NH}_4\text{Cl}$ ,  $1.0\text{ g KHCO}_3$  和  $0.0372\text{ g EDTA}$  的溶解缓冲液 ( PH 7.4 ) 溶解红细胞。在  $50\text{-ml}$  组织培养烧瓶 ( Costar , Cambridge , MA ) 中, 使用  $10\text{ ml}$  完全介质, 在  $37^{\circ}\text{C}$  和含  $5.3\% \text{ CO}_2$  的湿润空气下, 从体内已接触抗原的小鼠得到的  $2.5 \times 10^6$  反应脾细胞与  $2.5 \times 10^6$  辐射 (  $2000$  拉德 ) 同源脾细胞共同培养 5 天, 或者是被感冒 A 病毒感染, 或者是在  $0.05$ 、 $0.5$  和  $5\text{ }\mu\text{m}$  肽存在下。

### 细胞毒性实验

---

如前所述 ( Jondal , 1975 ), 可分别通过用  $320\text{ HAU}$  病毒感染  $2 \times 10^6$  细胞 1.5 小时或在  $37^{\circ}\text{C}$  用  $50\text{ }\mu\text{m}$  肽培养

1. 5 小时制备病毒感染的或肽包覆的靶细胞。洗涤后, 用  $100 - 200 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  标记细胞 1 小时。洗涤细胞两次, 将  $50 \mu\text{l}$  中的  $10^4$  靶细胞加到  $100 \mu\text{l}$  各种数目的效应物细胞中, 后者在 96-穴 V-型底盘中的  $150 \mu\text{l}$  完全介质中, 在实验前已洗涤三次; 在  $37^\circ\text{C}$  和  $5.3\% \text{CO}_2$  条件下培养 4 小时。培养完后, 收集  $50 \mu\text{l}$  上清液, 根据下式计算特异的  $^{51}\text{Cr}$  释放的百分率:  $\% \text{特异释放} = (\text{实验} - \text{自发释放}) / (\text{最大} - \text{自发释放}) \text{cpm}$ 。自发释放总是小于  $15\%$ 。

## 2. 2. 结果

### 使用 9-链节肽抗感冒 A 病毒特异性 CTL 的体内初级诱发

如以前所述 (Townsend 等, 1985, 1986), 用 H-2<sup>b</sup> 小鼠中活性感冒 A 病毒诱发的 CTL 主要是直接针对免疫显性的 NP 365-380 抗原决定基。我们曾经根据 Alchele 等人 (1990) 描述的方案, 起初试图用得自 PR8 和 NT60 菌株的肽 NP 365-380 对小鼠免疫以诱发 CTL 反应。然而, 尽管多次提高剂量, 还是仅观察到对肽包覆和病毒感染细胞的较低水平的致死活性。但是, 当用  $100 \mu\text{g}$  短链 Pe p 9 (PR8) 皮下注射并且在体外用  $5 \mu\text{m}$  Pe p 9 (PR8) 再刺激脾细胞时, 虽然病毒感染靶细胞没被杀死, 但诱发了对 Pe p 9 (PR8) 包覆的 RMA (未示出) 和 EL4 细胞的较强的 CTL 反应 (表 3)。当用更低浓度的 Pe p 9 (PR8) 在体外再刺激时, 产生的 CTL 对 Pe p 9 (PR8) 包覆的靶细胞和病毒感染细胞具有更高的致死活性; 这些

细胞也溶解了(表3)。如表3所示,免疫的最佳剂量是 $100\mu\text{g}$ ,再刺激的最佳剂量是5或 $0.05\mu\text{m}$ 。用 $10\mu\text{g}$ 或 $1\mu\text{g}$ 免疫产生较弱的或甚至不产生CTL反应。溶于完全弗罗因德氏佐剂(CFA)或PBS中的肽不产生反应。静脉内注射肽也不产生体内初级CTL反应(未示出)。

如图3所示,另一个从NT60获得的9链节肽可给出更强的抗肽和抗病毒CTL反应。

由Pep(PR8)和Pep(NT60)诱发的CTL的特异

---

性

---

根据这些结果,我们研究了产生的CTL关于Pep9(PR8)和Pep(NT60)的精确特异性。CTL优先杀死与其相应的肽包覆和病毒感染细胞(图4)。CTL与肽包覆细胞比与病毒感染靶细胞显示出更高交叉活性。

CTL对活性病毒或肽的响应

---

用活性PR8病毒使大鼠接触抗原,并且用病毒感染刺激细胞再刺激免疫脾细胞(图5A)或者在 $0.05\mu\text{m}$  Pep(PR8)存在下用正常的同源脾细胞再刺激免疫脾细胞(图5B)。在体内用活性病毒使其接触抗原并用低浓度的Pep(PR8)使其再激活的CTL具有识别病毒感染细胞和肽包覆细胞的出色能力(图5B)。应当指出,少量的再刺激肽足以刺激在体外被病毒激活的CTL,并且与病毒感染细胞具有同样的效力。当Pep(PR8)用于体内激

活以及病毒感染细胞或 P e p ( P R 8 ) 用于体外再刺激时 ( 图 5 C 和 D ) , 产生了针对肽包覆和病毒感染细胞的 C T L 反应。活性病毒比游离肽具有更高的激活 C T L 的功效。

#### 用 P e p ( P R 8 ) 免疫后 C T L 活性的时间历程

---

为了确定用 P e p ( P R 8 ) 免疫后 C T L 活性的动力学, 用 P e p ( P R 8 ) 使小鼠接触抗原一次。用 P e p ( P R 8 ) 免疫 2 - 3 0 天后, 免疫动物的脾细胞在体外再激活, 并评价 C T L 活性。对 P e p ( P R 8 ) 包覆的 R M A 靶细胞的 C T L 活性在免疫后七天达到顶峰, 随后活性则逐渐降低 ( 图 6 ) 。激活 3 0 天后, 还能检测到较低水平的 C T L 活性。

#### C D 8 <sup>+</sup> 和 M H C I 类限制的细胞调节体内肽诱发的细胞毒性

---

如图 7 a 所示, 排除掉 C D 8 T 细胞的 P e p ( P R 8 ) 诱发的 C T L 不能溶解 P e p ( P R 8 ) 包覆的 E L 4 细胞。另一方面, 排除 C D 4 <sup>+</sup> T 细胞不影响对 P e p ( P R 8 ) 包覆的靶细胞的毒性活性。因此, P e p ( P R 8 ) 特异的 C T L 表现为 C D 4 <sup>-</sup> C D 8 <sup>+</sup> 表现型。

在被感冒 P R 8 菌株感染的同源 E L 4 ( H - 2 <sup>b</sup> ) 、同种 P 8 1 5 ( H - 2 <sup>d</sup> ) 和 L 9 2 9 ( H - 2 <sup>k</sup> ) 靶细胞上测试源于 C 5 7 B 6 / J ( H - 2 <sup>b</sup> ) 的在体内被肽激活的 C T L 。如图 7 b 所示, 对 H - 2 <sup>b</sup> 靶细胞有明显的抑制特异性。

表 3

体内激活和体外再刺激的被不同剂量的肽诱发的CTL活性。

| 激活剂量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 再刺激<br>剂量 ( $\mu\text{M}$ ) | 未处理   |      | EL4 靶细胞溶解 (%) |       |               |       |
|---------------------------|-----------------------------|-------|------|---------------|-------|---------------|-------|
|                           |                             | 40:1* | 20:1 | PR8- 感染       |       | pep9(PR8)- 包覆 |       |
|                           |                             |       |      | 40:1          | 20:1  | 40:1          | 20:1  |
| 100                       | 5.00                        | 4.61  | 4.21 | 7.00          | 8.50  | 43.68         | 34.73 |
|                           | 0.05                        | 0.12  | 0.51 | 30.76         | 30.07 | 59.42         | 50.73 |
| 10                        | 5.00                        | 5.63  | 4.19 | 15.04         | 13.98 | 23.54         | 22.09 |
|                           | 0.05                        | 5.74  | 4.14 | 31.19         | 23.75 | 45.52         | 34.60 |
| 1                         | 5.00                        | 3.34  | 2.66 | 6.88          | 5.54  | 11.85         | 9.28  |
|                           | 0.05                        | 4.08  | 3.32 | 12.43         | 10.50 | 16.44         | 15.54 |

\* 效应物：靶细胞比值。

### 3. 内在化后外部MHC-1连接的肽循环至细胞表面

已经知道连接MHC-1的外部肽可在 $B_2-M$ 存在下调节相应的限制单元的表达 ( Otten 等, 1992 )。该体外的调节反应与体内的肽致免疫性有关。正如我们已发现的那样, 核内体抑制剂氯喹抑制这种调节 (图8), 很可能是该过程需要肽的内在化和膜的循环。为了支持这种模型, 一些早期的研究发现了通过 clatrin 包覆凹六的MHC-1内在化, 还发现了MHC-1循环。

为了研究外部 M H C - 1 连接肽的可能的循环，我们合成了两个 D<sup>p</sup> 连接肽，其代表在得自腺病毒（序列 S G P S N P P E I ; S E Q I D N O : 1）的核蛋白质上的免疫显性抗原决定基。将半胱氨酸加到氨基或羧基，作为分子标记生物连接（molecular marker galabios）（G a l - G a l）的生化偶合点，为此可得到特异性单克隆抗体（M C 2 1 0 1）（Brodin 等，1988）。正如以前所报道的，将半胱氨酸加到氨基不会破坏 D<sup>p</sup> 的调节能力，或肽的体内致免疫性（Zhou 等，1992b）。将 galabios 加到同样的部位，产生的糖肽可在 E L I S A 实验中（表 4）被 galabios 特异性单克隆抗体 M C 2 1 0 1 强烈地识别。G a l<sub>2</sub> - C S G 1 1 肽（共轭物 29）比 G A L<sub>2</sub> - C A S 1 0 肽反应强烈。为了证实引入的 galabios 不改变 D<sup>p</sup> 连接能力或体内致免疫性，这两个糖肽都进行了体外 D<sup>p</sup> 调节和体内致免疫性实验。与单独的肽相比，D<sup>p</sup> 调节类似于糖肽（没有给出数据）。用糖肽体内注射或体外再刺激产生的 C T L : s，在交叉实验方式中（图 9），属于严格的肽特异性并且当以另外的肽呈现时不能识别 G a l。从这些结果我们可以得出结论，糖肽中的 G a l<sub>2</sub> 起着惰性标记作用。

为了使外部的糖肽最大数目地连到膜 D<sup>p</sup> 分子上，使用了变异 R M A - S 细胞。这些细胞由于失去了 T a p - 2 肽运输系统，本质上缺乏将过程中的肽从细胞溶质运送到 E R 区域的能力。因此，在细胞表面，R M A - S 细胞比非变异细胞显示出更高比例的空 D<sup>p</sup> 分子。这些表达的空 D<sup>p</sup> 分子可以通过低温（26℃）进一步增加以及通过在 37℃ 加入 D<sup>p</sup> 连接肽进行稳定（图 3）。因此，通过在 B<sub>2</sub> - M 存在下用高浓度糖肽处理低温诱发的 R M A - S 细胞，膜 D<sup>p</sup> 分

子的大部分变得与相同的糖肽相饱和。这样处理的 R M A - S 细胞显然已被 M C 2 1 0 1 抗体污染 (图 1 0), 说明了 G a l<sub>2</sub> 抗原决定基的膜表达, 假定是以 M H C - 1 连接糖肽的形式。通过用链霉菌蛋白酶处理, 从这些细胞中除去了所有的 D<sup>b</sup>和 G a l<sub>2</sub> 表达 (图 1 0)。如果这些细胞的温度转化为 3 7 °C, 并培养 1 小时, D<sup>b</sup>和 G a l<sub>2</sub> 表达又回到细胞表面 (图 1 0)。G a l<sub>2</sub> 抗原决定基的回复受到氯喹的抑制 (未给出数据)。由于普通的 M H C - 1 呈现通道在 R M A - S 细胞中不起作用, 因此胞液肽不能运送到 E R 区域, 结果有力地表明了 D<sup>b</sup> 连接糖肽的核内体循环。用 G a l<sub>2</sub> - C A S 1 0 糖肽获得了类似的结果 (未给出)。

为了在功能水平上证实这些结果, 产生了感冒 A (P R 8) 特异 C T L, 并针对 R M A - S 和 E L - 4 靶细胞进行了实验; 这些靶细胞相应于 G a l<sub>2</sub> - C A S 1 0 糖肽 (共轭物 3 1) 中的靶抗原决定基的肽 (A S N E N M E T M) 进行了处理。如以前报道 (Rotzshke 等, 1 9 9 0) 的那样, 两种靶细胞都可被强烈地杀死 (图 1 1)。用链霉菌蛋白酶处理这些经过肽处理的靶细胞, 除去了大部分 D<sup>b</sup>表达以及对特异 C T L : S 的大部分敏感性 (图 1 1)。在 3 7 °C 培养经链霉菌蛋白酶处理的细胞, 使 D<sup>b</sup>和有关的肽再次表达, 产生了对 C T L 致死易感性的回复。与 E L - 4 细胞相比, 对 R M A - S 细胞来说这种回复更快、更彻底, 并且这种回复可被抗 - D<sup>b</sup>单克隆抗体和氯喹阻断 (未给出数据)。

我们解释这些结果的目的是想说明, M H C - 1 连接肽通过细胞间的区域循环, 而细胞间区域类似于以前 T 细胞中的核内体。很可能该机理使肽交换发生, 以便最好地实现膜肽的表达。Hochman 等人

(1991)指出I类MHC分子在核内区域中进行了结构上的变化,表明B<sub>2</sub>-M的离去并且在重链上。因此,导致这种作用的低PH还可使肽交换发生。为了支持这种观点,Harding (1992)最近报道,使用外生抗原的 electroporation,通过低温和弱碱胺可阻止MHC-1的呈现。

已知MHC-1分子用很高的亲和性连接最佳长度的肽,而不是略长的肽;这一现象反映在许多体外实验中。这些实验包括MHC-1膜调节实验、对特异CTL的靶细胞敏感实验、肽直接连接变异细胞上的空I类链、在来自变异细胞的溶解物中肽诱发MHC-1的集结以及MHC-1连接肽的离去速率测定。最佳长度肽链上的这种更高的亲和性可能与恰好适合I类链上的肽连接沟有关,因为这种沟两端都是闭合的(Madden等,1991)。因此,大小最合适的肽可形成三肽-重链B<sub>2</sub>-M复合物,该复合物与长链肽组成的复合物相比更易于从核内体中循环出来。

在靶T细胞中,最佳MHC-1连接肽的循环可导致被本文中的相应特异CTL:S的最有效识别。迄今为止,关于MHC-1循环的大部分证据都是在T细胞中获得的。然而,如果类似的机理在某些呈现抗原的细胞中运作,在膜水平的最适宜肽的累积在免疫反应的输入臂也是重要的。尤其是树突细胞应当在这方面进行探讨;树突细胞被认为是体内和体外对CTL产生起关键作用的细胞。在肽的体外调节MHC-1表达的能力与其体内致免疫性之间存在的相互关系指出这种机理可能是系胞间反应的重要机理。

在 E L I S A 实验中单克隆抗体  
M C 2 1 0 1 对 G a l<sub>2</sub> 糖肽的识别

| 抗体     | 特异性                                    | 吸收指数                        |        |                             |        |
|--------|----------------------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
|        |                                        | Gal <sub>2</sub> -<br>CSG11 | CSG-11 | Gal <sub>2</sub> -<br>CAS10 | CAS-10 |
| MC2101 | Galabios<br>Gal-Gal                    | 1.86                        | 0.01   | 0.41                        | 0.02   |
| Pk002  | Globotriaosyl<br>Gal-Gal-Glc<br>(CD77) | 0.04                        | 0.08   | 0.04                        | 0.01   |

在 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (P H 9.6) 中稀释肽 (50 μg / ml), 以 100 μl / 穴加到平底 Costar 微型盘 (cat. No 3590) 中, 在 4℃ 下培养过夜。用 P B S 洗涤微型盘一次, 在室温下用 0.5% P B S 预培养 30 分钟, 并用 P B S / 0.05% 吐温缓冲液洗涤两次。在 0.5% 明胶 P B S / 0.05% 吐温中稀释单克隆抗体, 加到微型盘中, 在室温下培养 2 小时, 并用 P B S / 吐温快速洗涤。碱性磷酸酶共轭的家兔抗-小鼠免疫球蛋白 (Dakopatts 代码 No. S414) 在 P B S / 吐温中稀释至 1 / 1000, 加入量为 100 μl / 穴。在室温下培养 2 小时后, 用

P B S / 吐温洗涤 4 次，加入 1 0 0  $\mu$ l 碱性磷酸酶基质溶液。在室温下过 2 小时后，使用 Multiskan 系统（实验系统）在 4 0 5 n m 读取微型盘的光密度。

4 . 通过用在内部致免疫位置带有碳水化合物部分的糖肽接种产

---

生碳水化合物特异性 C T L 反应。

---

将碳水化合物 galabiose （另外，G a l -  $\alpha$  - 4 G a l 被认为是 G a l<sub>2</sub>）偶合到 1 2 - 链节肽 S G V E N P G G Y C L T （S E Q 1 D N O : 9）的内半胱氨酸（1 0 位）上，该肽代表淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（L C M V）的 H z - D<sup>b</sup>限制的 C T L 免疫显性抗原决定基（Oldstone 等人，1 9 8 8）。糖肽称为 S G V - 1 2 - G a l<sub>2</sub>（共轭物 3 0；图 1 2），如实施例 1 所述，偶合时采用 S 键连到硫羟基上。

如实施例 2 和 Zhou 等人（1 9 9 2 a）所述，小鼠用 S G C 1 2 - G a l<sub>2</sub> 糖肽免疫，用相同的 S G V 1 2 - G a l<sub>2</sub> 糖肽在体外再刺激后，针对用下列肽和糖肽包覆的 H 2 - D<sup>b</sup> 和 K<sup>b</sup> 阳性 E L - 4 细胞测试产生的毒性 T 细胞：

- 1 . S G V E N P G G Y C L T + S G V 1 2 ; S E Q 1 D N O : 9 )
- 2 . S G V 1 2 - G a l<sub>2</sub>
- 3 . A S N E N S E T M ( A S N 9 ; S E Q 1 D N O : 1 ) 与 G a l<sub>2</sub> 连到 6 位的 S 上 ( A S N 9 - 6 S - G a l<sub>2</sub> )
- 4 . A S N 9 - 6 S

5. C S G 1 1 - G a l<sub>2</sub> ( 参见实施例 3 和图 9 )
6. C S G P S N T P P E-1 ( C S G 1 1 ; S E Q I D N O : 8 )
7. C R G 与 G a l<sub>2</sub> 连到 1 位的 C 上 ( C R G 9 - G a l<sub>2</sub> )
8. C R G Y V Y Q G L ( C R G 9 ; S E Q I D N O : 1 3 )

肽 1 - 6 是已知的、改性的 D<sup>b</sup> 连接 T 细胞抗原决定基, 连到 R M A - S 细胞上, 如通过体外 D<sup>b</sup> 调节测定的那样 (未给出数据). 肽 7 - 8 表示已知的 K<sup>b</sup> 抗原决定基 ( R G Y V Y Q G L ; S E Q I D N O : 2 7 ) 并且两个肽都调节 R M A - S 细胞上的 K<sup>b</sup> (未给出数据)。通过连接糖肽的细胞表面上的 F A C S 测定 G a l<sub>2</sub> 抗原决定基的表达。使用糖肽 2, 5 和 7 发现了 G a l<sub>2</sub> 的较高表达 (未给出数据) 当连到 R M A - S 细胞上时, 糖肽 3 不能被抗 - G a l<sub>2</sub> 单克隆抗体识别。其结论是, 当在不同的载体肽上致免疫 S G V 1 2 - G a l<sub>2</sub> 时, 糖肽 5 和 7 表达了相同的 G a l<sub>2</sub> 抗原决定基。C S G 1 1 - G a l<sub>2</sub> 糖肽与 D<sup>b</sup> 相连, C R G 9 - G a l<sub>2</sub> 糖肽与 K<sup>b</sup> 相连。因此, 糖肽 2, 5 和 7 共享的唯一抗原决定基是 G a l<sub>2</sub>。

当 S G V 1 2 - G a l<sub>2</sub> 产生的 C T L 细胞针对用上述肽和糖肽包覆的 E L - 4 细胞测试时, 发现用糖肽 2 和 5 包覆的靶细胞被杀死了, 并且用糖肽 7 涂覆的靶细胞在较低含量时也可被杀死 (图 1 3)。因此, 产生的 C T L 细胞不能识别单独的载体肽 ( S G V 1 2 ) 或其他作对比实验的肽, 包括糖肽 3 (其在细胞表面水平上不能表达 G a l<sub>2</sub> 抗原决定基)。

从上面的结果可总结出，用糖肽 S G V 1 2 - G a l<sub>2</sub> 免疫可产生 G a l<sub>2</sub> 特异性 T 细胞反应。其原因可能是 G a l<sub>2</sub> 碳水化合物部分取向在 T 细胞识别的最佳位置。与糖肽 7 包覆的靶细胞相比，糖肽 5 包覆的靶细胞之所以有较高的致死率可能是因为这样一个事实，即糖肽 5 是由 D<sup>b</sup> 显示的，而糖肽 7 是由 K<sup>b</sup>1 类链显示的。

在另一组实验中（采纳与上述相同的概念），用糖肽 R G Y 8 - 4 h - G a l<sub>2</sub>（“R G Y 8”表示八肽 R G Y V Y Q G L；4 h 表示 4 位的 V 被高丝氨酸取代；G a l<sub>2</sub> 表示糖 G a l<sub>2</sub> 共轭到高丝氨酸羟基上）使小鼠免疫。如实验中所述，参考图 1 3，针对 R G Y 8 - 4 h - G a l<sub>2</sub> 和 R G Y 8 - 4 h 包覆的 E L - 4 细胞测试 R G Y 8 - 4 h - G a l<sub>2</sub> 产生的 C T L 细胞。

从图 1 4（A）显示的结果可以看出，产生了肽和糖肽特异性 C T L 细胞。

当这些不同基因的效应物细胞群在本质上针对另一载体肽（S G V 1 2 - G a l<sub>2</sub>）和 S G V 1 2 肽上的用 G a l<sub>2</sub> 包覆的 E L - 4 细胞测试时（图 1 4（B）），只杀死了用糖肽包覆的细胞。

通过“交叉”实验结果证明了 C T L 具有 G a l<sub>2</sub> 特异性（参见上述的标题为“实验测试系统部分特异”）。

这里给出的数据可总结在下面的表 5 和 6 中。

表 5

K<sup>b</sup> 连接肽和糖肽的分析

| 肽                        | ELISA | 调节 | 膜表达 | 致免疫性 | 特异性 |   |    |
|--------------------------|-------|----|-----|------|-----|---|----|
|                          |       |    |     |      | P   | G | GP |
| Gal <sub>2</sub> -CAP9   | +     | +  | —   | +    | +   |   |    |
| FAP9-5h-Gal <sub>2</sub> | +     |    |     | +    | +   | + |    |
| Gal <sub>2</sub> -CRG9   | +     | —  | +   | +    | +   |   |    |
| RGY8-4h-Gal <sub>2</sub> | +     | +  | +   | +    | +   | + |    |

| 肽                       | 致免疫性 | 评价                      |
|-------------------------|------|-------------------------|
| CAP9 (SEQ ID NO: 14)    | +    |                         |
| FAP9 (SEQ ID NO: 20)    | +    | 强, 有高 F A P 9 - 5 h 反应性 |
| FAP9-5h (SEQ ID NO: 26) | +    | 较弱, 有低 F A P 9 反应性      |
| CRG9 (SEQ ID NO: 13)    | +    |                         |
| RGY8 (SEQ ID NO: 27)    | +    | 一些 R G Y 8 - 4 h 反应性    |
| RGY8-4h (SEQ ID NO: 25) | +    | 强, 有 R G Y 8 反应性        |

表 6  
对 D<sup>b</sup>连接肽和糖肽的分析

| 肽                         | ELISA           |     | MHC-1<br>调节 | 膜表达循环 |   | 致免疫性 | 特异性 |   |    |
|---------------------------|-----------------|-----|-------------|-------|---|------|-----|---|----|
|                           | 7.4             | 9.6 |             |       |   |      | P   | G | GP |
| Gal <sub>2</sub> -CAS10   |                 | +   | +           | +     | + | +    |     |   | +  |
| GM3-CAS10                 |                 |     |             |       |   | —    |     |   |    |
| <u>GM3-laktam-CAS10</u>   |                 |     |             |       |   | 毒    |     |   |    |
| ASN9-6h-Gal <sub>2</sub>  | +               | —   | +           | +     | + | +    |     |   | +  |
| ASN9-6S-Gal <sub>2</sub>  |                 | —   | +           | —     |   | —    |     |   |    |
| ASN9-4S-Gal <sub>2</sub>  | (+)             | —   |             | —     |   |      |     |   |    |
| Gal <sub>2</sub> -CSG11   |                 | +   | +           | +     | + | +    |     |   | +  |
| GM3-CSG11                 |                 |     |             |       |   | —    |     |   |    |
| <u>GM3-laktam-CSG11</u>   |                 |     |             |       |   | +    |     |   | +  |
| SGP10-6h-Gal <sub>2</sub> | +               | +   | +           | +     | + | —    |     |   |    |
| SGP10-6S-Gal <sub>2</sub> |                 | —   | +           | —     |   | —    |     |   |    |
| SGP10-4S-Gal <sub>2</sub> | (+)             | —   |             | —     |   | —    |     |   |    |
| SGV12-Gal <sub>2</sub>    |                 | +   | +           | +     | + | +    |     |   | +  |
| 肽                         | 致免疫性            |     |             |       |   |      |     |   |    |
| CAS10                     | (SEQ ID NO: 7)  |     | +           |       |   |      |     |   |    |
| ASN9                      | (SEQ ID NO: 1)  |     | +           |       |   |      |     |   |    |
| ASN9-6h                   | (SEQ ID NO: 21) |     |             |       |   |      |     |   |    |
| ASN9-6S                   |                 |     | —           |       |   |      |     |   |    |
| <u>ASN9-4S</u>            |                 |     |             |       |   |      |     |   |    |
| CSG11                     | (SEQ ID NO: 8)  |     | +           |       |   |      |     |   |    |
| SGP10                     | (SEQ ID NO: 2)  |     | +           |       |   |      |     |   |    |
| SGP10-6h                  | (SEQ ID NO: 23) |     |             |       |   |      |     |   |    |
| SGP10-6S                  |                 |     | +           |       |   |      |     |   |    |
| SGP10-4S                  |                 |     |             |       |   |      |     |   |    |

对实验（表 5 和 6）的注释：

---

## E L I S A

---

E L I S A 实验按与表 4 有关的叙述进行。

## M H C - 1 调节

---

正如上面与图 8 和图 10 A 有关的叙述那样，其原理是肽可连到显示抗原细胞的细胞表面上的空 M H C - 1 重链上，这就导致了稳定化以及相应 M H C - 1 链的调节。

## 膜表达

---

当糖肽与细胞表面上的 M H C - 1 相连时，相应 C H O 部分的表达（及可达性）可通过 F A C S 中的抗体污染检测，这正如上面关于图 10 C 和 E 所述的那样。

## 膜循环

---

在图 10 D 和 F 中描述。

## 致免疫性

---

小鼠用糖肽免疫并在本文中描述，测定体外再激活的 C T L 细胞杀死用不同的肽和糖肽包覆的靶细胞的能力。特异性 P 是指 C T L 细胞仅识别肽部分，G 指仅识别 C H O 部分，以及 G P 指仅识别二者的组合。

## 附图的简单说明

图 1

在“间隔臂糖苷的合成”部分中叙述化合物 1 - 15 的化学结构。

图 2

在“糖肽的合成”部分中叙述糖肽产物 21 - 25 的化学结构。

图 3

p e p 9 ( N T 6 0 ) 诱发的 C T L 使用用于再刺激的 0 . 0 5  $\mu$  M p e p 9 ( N T 6 0 ) 比使用 5  $\mu$  M 和 0 . 5  $\mu$  M p e p 9 ( N T 9 0 ) 能更有效地溶解病毒特异性细胞和肽包覆的 E L 4 细胞。用一次皮下注射 1 0 0  $\mu$  g p e p 9 ( N T 6 0 ) 产生 C T L。在 ( A ) , 5  $\mu$  M ; ( B ) , 0 . 5  $\mu$  M ; 和 ( C ) , 0 . 0 5  $\mu$  M p e p 9 ( N T 6 0 ) 存在下, 用同源辐射脾细胞再刺激免疫脾细胞 5 天, 并针对未处理的 E L 4 ( O - O ) 、 N T 6 0 - 感染 ( ● - ● ) 、 p e p 9 ( N T 6 0 ) - 包覆 ( □ - □ ) 测试。

图 4

p e p 9 ( P R 8 ) ( A ) 和 p e p 9 ( N T 6 0 ) ( B ) 诱发的 C T L 特异性。效应物 C T L 针对 E L 4 未处理 ( O - O ) 、 P R 8 - 感染 ( ● - ● ) 、 N T - 6 0 感染 ( □ - □ ) 、 p e p 9 ( P R 8 ) 包覆 ( ■ - ■ ) 、 p e p 9 ( N T 6 0 ) 包覆

( $\triangle - \triangle$ ) 测试。

图 5

用活性病毒和肽激活和再刺激 CTL 反应。小鼠用 PR8 活性病毒 (A, B) 或 pep9 (PR8) (C, D) 在体内接触抗原, 并用 PR8-感染脾细胞 (A, C) 或在  $0.05 \mu\text{M}$  pep9 (PR8) 存在下用辐射脾细胞 (B, D) 再刺激。靶细胞是 EL4 未处理 ( $O - O$ )、PR8-感染 ( $\bullet - \bullet$ )、pep9 (PR8) - 包覆 ( $\square - \square$ )。

图 6

通过一次皮下注射 pep9 (PR8) 诱发的 CTL 活性动力学。用  $100 \mu\text{g}$  pep9 (PR8) 使小鼠在体内接触病原, 并在接触病原后第 2、7、10、20 和 30 天用  $5 \mu\text{M}$  pep9 (PR8) 在体外再刺激。产生的 CTL 针对 RMA 未处理 ( $O - O$ ) 和 pep9 (PR8) - 包覆 ( $\bullet - \bullet$ ), 测试。效应物: 靶细胞比值, 60 : 1。

图 7

用  $\text{CD}8^+$  和  $\text{H} - 2 \text{D}^b$  限制的 T 细胞调整肽诱发的细胞毒性。a: 通过 pep9 (PR8) 诱发 CTL。然后使用 Dynabeads 系统对等数目的 CTL 除去  $\text{CD}4^+$  和  $\text{CD}8^+$  T 细胞。对余下的细胞针对 pep9 (PR8) - 包覆的 EL4 细胞测定溶解活性。未处理 CTL ( $O - O$ )、 $\text{CD}4^+$  除去 ( $\bullet - \bullet$ ) 和  $\text{CD}8^+$

除去 (□ - □) 针对 p e p 9 ( P R 8 ) - 包覆的 E L 4 细胞测定溶解活性。b : 针对 P R 8 - 感染的 E L 4 ( O - O )、P R 8 - 感染的 P 8 1 5 ( ● - ● ) 和 P R 8 - 感染的 L 9 2 9 ( □ - □ ) 测试 p e p 9 ( P R 8 ) 诱发的 C T L。

图 8

肽中介的 H - 2 D b 调节可被氯喹抑制。在氯喹存在或不存在情况下，用感冒 A ( P R 8 ) 肽 N P 3 6 6 - 3 7 4 ( 5 0 μ M ) 培养 R M A - S 细胞 6 小时。培养后洗涤细胞，并用抗 D b ( 2 8 - 1 4 - 8 S ) 单克隆抗体在冰上污染 3 0 分钟，洗涤，用家兔抗 - 小鼠 F ( a b ' )<sub>2</sub> - F 1 T C ( F 3 1 3, Dako, 哥本哈根, 丹麦) 培养 3 0 分钟。污染的细胞用 1 % 甲醛固定，并在 F A C S c a n 流动血细胞计数器 ( Becton Dickinson : Mountain View, C A ) 上分析。

图 9

糖肽 ( A 和 C ) 的合成。通过将 2 - 溴乙基 - 4 - O - ( α - D - 吡喃半乳糖基 ) - β - D - 吡喃半乳糖苷 ( 化合物 2 8 ) 与带有硫羟官能团的肽偶合合成糖肽。将半胱氨酸部分加到母体肽序列的氨端。使用碳酸铯作为促进剂，利用半胱氨酸硫原子的亲核性质，在肽和以糖苷形式与碳水化合物部分相连的亲电间隔臂之间形成一个硫醚键，G a l<sub>2</sub> 偶合反应在 N, N - 二甲基甲酰胺中进行。偶合反应用 H P C L 监测，并通过加入含 0. 1 % 三氟乙酸的水中止。得到的糖肽 ( 共轭物 2 9 ( A ) 和 3 1 ( C ) ) 用制备色谱纯化，产物的分子

量用 F A B M S 确定。

C T L 实验 ( B 和 D )。在尾根部皮下注射不完全弗罗因德氏佐剂中的  $100\ \mu\text{g}$  糖肽使小鼠免疫。激活 10 天后, 使用与  $2.5 \times 10^6$  辐射 (  $2500$  拉德 ) 同源脾细胞共同培养的  $2.5 \times 10^6$  反应细胞在体外对脾细胞再刺激。再刺激是这样进行的: 在  $50\ \text{ml}$  组织培养烧瓶中, 在  $0.05\ \mu\text{M}$  糖肽存在下, 使用 R P M I / 10% F C S 在  $37^\circ\text{C}$  再刺激 5 天。R M A - S 靶细胞用  $50\ \mu\text{M}$  肽在  $37^\circ\text{C}$  涂覆 1 小时, 并洗涤。用  $100\ \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  在  $37^\circ\text{C}$  对细胞标记 1 小时, 洗涤两次。通过淋巴细胞离心作用分离效应物淋巴细胞, 并在 V - 形微滴定穴中以  $150\ \mu\text{l}$  / 穴的量使用  $5000\ ^{51}\text{Cr}$  标记的靶细胞在不同的比例下测定。在  $300\ \text{g}$  离心微型盘, 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养 4 小时。培养后对微型盘再次离心, 取  $50\ \mu\text{l}$  上清液用  $\gamma$  发光计数器测试。

### 图 10

A 组: 将 R M A - S 细胞在  $26^\circ\text{C}$  培养 24 小时, 以在细胞表面诱发空 D<sup>b</sup> M H C - 1 链的表达, 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养, 并污染 D<sup>b</sup> 表达。  
B 组: 用在  $26^\circ\text{C}$  下预培养的链霉蛋白酶处理的 R M A - S 细胞除去 D<sup>b</sup> 表达。用链霉蛋白酶处理 2 小时和 4 小时, 在 4 小时内完全除去 D<sup>b</sup>。C 和 E 组: 用糖肽 G a l<sub>2</sub> - C S G 1 1 ( C 组 ) 或 G a l<sub>2</sub> C A S 1 0 ( E 组 ) 以  $300\ \mu\text{M}$  的浓度在  $37^\circ\text{C}$  处理  $26^\circ\text{C}$  诱发的 R M A - S 细胞, 洗涤并污染 G a l<sub>2</sub> 表达。D 和 F 组: 如用 C 和 E 组那样, 糖肽处理的 R M A - S 细胞用链霉蛋白酶处理以除去 D<sup>b</sup> 和糖肽表达, 洗涤, 并进一步在  $37^\circ\text{C}$  下培养, 使得糖肽重新表达, 并

污染 Gal<sub>2</sub> 表达。

图 1 1

---

如同特异性 CTL 检测到的那样，用链霉蛋白酶处理后与 EL 4 (A) 和 RMA-S (B) 细胞上的肽相连的 Db 的重新表达。用肽 NP 366-374 (100 μM) 处理 EL 4 (A) 和 RMA-S (B) 细胞 1.5 小时。洗涤后，细胞用链霉蛋白酶 E (ProE, 在 RPMI 1640 中, 4 mg/ml) 处理，洗涤，在 37 °C 下培养 0, 1 和 3 小时，并在 4 小时 <sup>51</sup>Cr 释放实验中评价。CTL 的制备前面已有叙述 (Zhou 等, 1992b)。简单地说，通过静脉内注射在 PBS 中稀释的 20 HAU 感冒 A / PR / 8 / 34 病毒 (伦敦国家医学研究院的 A. Douglas 博士赠送的礼物) 使 C57B6 / J 雌性小鼠免疫。免疫 1-4 周后，用辐射的、病毒感染的同源脾细胞再刺激免疫脾细胞 5 天。

图 1 2

---

糖肽 SGV 12 - Gal<sub>2</sub> (共轭物 30)，用于产生碳水化合物特异性的 CTL 反应 (参见实施例 4)。

图 1 3

---

针对用实验组中所示的肽 / 糖肽包覆的 EL-4 细胞测试 SGV 12 - Gal<sub>2</sub> 产生的 CTL 细胞。E / T，效应物：靶细胞比值。

图 1 4 (A) 和 (B)

---

针对用所示出的肽／糖肽包覆的 E L - 4 细胞测试 R G Y 8 -  
4 h - G a l<sub>2</sub> 产生的 C T L 细胞。E / T，效应物：靶细胞比值。

以上有关的引文，已说明其作者名称以及文章发表的年份，现再将有关的书刊名称详细说明如下：

Alchele *et al.* (1990), *J. Exp. Med.* 171, 1815-

Ansari, A.A., T. Frejd and G. Magnusson (1987), *Carbohydr. Res.* 161, 225-233.

Brodin *et al.* (1988), *Int. J. Cancer* 42, 185-194.

Catelani, G. (1988), *Carbohydr. Res.* 182, 297-300.

Crowle (1988), *Infect. Immun.* 56, 2769-2773.

Dahmén *et al.* (1983 a), *Carbohydrate Res.* 113, 219-224.

Dahmén, J., T. Frejd, G. Grönberg, T. Lave, G. Magnusson and G. Noori (1983 b), *Carbohydr. Res.* 116, 303-307.

**Dahmén, J. et al. (1984), *Carbohydrate Research* 127, 15-25."**

Dasgupta, F. and P.J. Garegg (1988), *Carbohydr. Res.* 177, C13-C17.

Domer *et al.* (1989), *Infect. Immun.* 57, 693-700.

Elofsson, M., Walse, B. and Kihlberg, J. (1991), *Tetrahedron Lett.* 32, 7613-7616.

Falk *et al.* (1991), *Nature* 351, 290-296.

Fremont *et al.* (1992), *Science* 257, 919-927.

Fung *et al.* (1990), *Cancer Research* 50, 4308-4314.

Hansen *et al.* (1990), *J. Virol.* 64, 2833-2844

Hakomori (1991), *Current Opinion in Immunology* 3, 646-653.

Harding (1992), *Eur. J. Immunol.* 22, 1865-1869.

Henningsson *et al.* (1987), *Cancer Immunol. Immunother.* 25, 231-241.

Hochman *et al.* (1991), *J. Immunol.* 146, 1862-1867.

Ishioka *et al.* (1992), *J. Immunol.* 148, 2446-2451.

Janeway (1991), *Nature* 353, 792.

Jansson, K., S. Ahlfors, T. Frejd, J. Kihlberg and G. Magnusson (1988), *J. Org. Chem.* 53, 5629-5647.

- Jardetzky *et al.* (1991), *Nature* 353, 326-329.
- Jondal & Pross (1975), *Int. J. Cancer* 15, 596-
- 5 Jorgensen *et al.* (1992), *Nature* 355, 224-230.
- Latron *et al.* (1992), *Science* 257, 964-967.
- Lönn, H. and K. Stenvall (1992), *Tetrahedron Lett.* 33, 115-116.
- 10 Magnusson, G., S. Ahlfors, J. Dahmén, K. Jansson, U. Nilsson, G. Noori, K. Stenvall and A. Tjörnebo (1982), *J. Org. Chem.* 55, 3932-3946.
- Madden *et al.* (1991), *Nature* 353, 321-325.
- 15 Marra, A. and P. Sinaÿ (1990), *Carbohydr. Res.* 195, 303-308.
- Marra, A. and P. Sinaÿ (1989), *Carbohydr. Res.* 187, 35-42.
- 20 Masazuni *et al.* (1992), *Science* 257, 927-934.
- Moll *et al.* (1989), *Infect. Immun.* 57, 3349-3356
- Morein *et al.* (1984), *Nature* 308, 457-460.
- 25 Murase, T., H. Ishida, M. Kiso and A. Hasegawa (1989), *Carbohydr. Res.* 188, 71-80.
- Nores *et al.* (1987), *J. Immunol.* 139, 3171-3176.
- 30 Oettgen, H.F., Ed. (1989). *Gangliosides and Cancer*. pub. VCH.
- Oldstone *et al.* (1988), *J. Exp. Med.* 168, 559-570.
- 35 Or, Y.S., Clark, R.F. & Luly, J.R. (1991) *J. Org. Chem.* 56, 3146-3149.
- Ortmann *et al.* (1992), *J. Immunol.* 148, 1445-1450.
- Otten *et al.* (1992), *J. Immunol.* 148, 3723-3732.
- 40 Portukalain *et al.* (1979), *Eur. J. Biochem.* 94, 19-23.
- Ray, A. *et al.* (1992), *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2256-2257.
- Renaud, P. and D. Seebach (1986), *Helv. Chim. Acta* 69, 1704-1710.
- 45 Robertsson *et al.* (1982), *Infect. Immun.* 37, 737-748
- Röttschke *et al.* (1990), *Nature* 348, 252-254.

- Rötzschke & Falk (1991), *Immunology Today* 12, 447-455.
- Sällberg *et al.* (1991), *Immunol. Lett.* 30, 59-
- 5      Stauss (1991), *Current Biology* 1, 328-330.
- Thurin, Hackett, Otvos & Loibner, *In Thurin: Abberant Glycosylation in Human Melanoma and Carcinoma* (Doctorate in medical science, University of Gothenburg, 1991, ISBN-91-628-0389-1).
- 10      Townsend *et al.* (1985), *Cell* 42, 457-
- Townsend *et al.* (1986), *Cell* 44, 959-
- 15      Tsomides & Eisen (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3357-3360.
- Van Bleek & Nathenson (1990), *Nature* 348, 213-216.
- Wiels *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6485-
- 20      Yang, C.C., Marlowe, C.K. & Kania, R. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 3177-3178.
- Zhou *et al.* (1992 a), *J. Immunol. Methods* 153, 193-200.
- 25      ( 发表于 1 9 9 2 年 8 月。 )
- Zhou *et al.* (1992 b), *Eur. J. Immunol.* 22, 3085-3090.
- ( 发表于 1 9 9 2 年 1 1 月。 )

## 序列表

### ( I ) 概况 :

#### ( i ) 申请人 :

( A ) 名称 : A B A S T R A

( B ) 街道 : Kvarnbergagatan 1 6

( C ) 城市 : Sodertalje

( E ) 国家 : 瑞典

( F ) 邮政编码 : ( Z I P ) : S - 1 5 1 8 5

( G ) 电话 : + 4 6 - 8 - 5 5 3 2 6 0 0 0

( H ) 传真 : + 4 6 - 8 - 5 5 3 2 8 8 2 0

( I ) 电传 : 1 9 2 3 7 astra s

#### ( ii ) 发明名称 : 新的活性化合物

#### ( iii ) 序列数 : 2 7

#### ( iv ) 计算机可读形式 :

( A ) 媒体类型 : 软盘

( B ) 计算机 : I B M P C 兼容机

( C ) 操作系统 : P C - D O S / M S - D O S

( D ) 软件 : PatentIn Release #1.0 ,Version #1.25

( E P O )

#### ( vi ) 优先申请资料 :

( A ) 申请号 : S E 9 2 0 1 3 3 8 - 2

( B ) 申请日 : 9 2 . 4 . 2 8

#### ( vi ) 优先申请资料 :

( A ) 申请号 : S E 9 2 0 2 5 5 3 - 5

( B ) 申请日 : 9 2 . 9 . 7

( vi ) 优先申请资料 :

( A ) 申请号 : S E 9 2 0 3 8 9 7 - 5

( B ) 申请日 : 9 2 . 1 2 . 2 3

( vi ) 优先申请资料 :

( A ) 申请号 : S E 9 3 0 1 1 4 1 - 9

( B ) 申请日 : 9 3 . 4 . 6

( 2 ) S E Q I D N O : 1 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 9 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Asn | Glu | Asn | Met | Glu | Thr | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 2 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 0 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Pro | Ser | Asn | Thr | Pro | Pro | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |
| Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 10  |     |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 3 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 9 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 3 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ile | Leu | Gly | Phe | Val | Phe | Thr | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 4 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 8 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 4 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ile | Ala | Ser | Asn | Glu | Asn | Met | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |
| Ala | Met | Glu | Ser | Ser | Thr | Leu | Glu | Cys |
| 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 5 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 3 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 5 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ile | Ala | Ser | Asn | Glu | Asn | Met | Glu | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Met | Glu | Cys |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 6 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 1 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 6 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ala | Ser | Asn | Glu | Asn | Met | Glu | Thr | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Cys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 7 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 0 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构：直链

( ii ) 分子类型：肽

( xi ) 序列描述：S E Q I D N O : 7 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ala | Ser | Asn | Glu | Asn | Met | Glu | Thr | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

( 2 ) S E Q I D N O : 8 的资料：

( i ) 序列特征：

( A ) 长度：11 个氨基酸

( B ) 类型：氨基酸

( D ) 拓朴结构：直链

( ii ) 分子类型：肽

( xi ) 序列描述：S E Q I D N O : 8 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ser | Gly | Pro | Ser | Asn | Thr | Pro | Pro | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

Ile

( 2 ) S E Q I D N O : 9 的资料：

( i ) 序列特征：

( A ) 长度：12 个氨基酸

( B ) 类型：氨基酸

( D ) 拓朴结构：直链

( ii ) 分子类型：肽

( xi ) 序列描述：S E Q I D N O : 9 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Val | Glu | Asn | Pro | Gly | Gly | Tyr | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

Leu Thr

( 2 ) S E Q I D N O : 1 0 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 5 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 0 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Gln | Ile | Ala | Ser | Asn | Glu | Asn | Met | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Thr | Met | Glu | Ser | Cys |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 15  |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 1 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 1 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 1 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Gly | Pro | Ser | Asn | Thr | Pro | Pro | Glu | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Cys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 2 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 3 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q 1 D N O : 1 2 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ser | Gly | Pro | Ser | Asn | Thr | Pro | Pro | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

Ile His Cys

( 2 ) S E Q 1 D N O : 1 3 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 9 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q 1 D N O : 1 3 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Arg | Gly | Ayr | Val | Tyr | Gln | Gly | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q 1 D N O : 1 4 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 9 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q 1 D N O : 1 4 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ala | Pro | Gly | Asn | Tyr | Pro | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 5 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 3 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 5 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Val | Val | Lys | Leu | Gly | Glu | Phe | Tyr | Asn |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Gln | Met | Met |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 6 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 6 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 6 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Pro | Thr | Asn | Gln | Gln | Val | Val | Leu | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Gly | Thr | Asn | Lys | Thr | Asp |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 15  |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 7 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 2 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 7 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gln | Ile | Arg | Gly | Phe | Val | Tyr | Phe | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Glu | Thr |     |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 8 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 2 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 8 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Pro | Gly | Met | Met | Met | Gly | Met | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |
| Asn | Met |     |     |     |     |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q I D N O : 1 9 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 0 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

(ii) 分子类型：肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO: 19:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Tyr | Gly | Ile | Leu | Gln | Ile | Asn | Ser | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

(2) SEQ ID NO: 20 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 直链

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Ala | Pro | Gly | Asn | Tyr | Pro | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

(2) SEQ ID NO: 21 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 直链

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键: 改性点

(B) 位置: 6 . . 7

(D) 其他信息: / 标记 = X a a

/ 特征 = “高半胱氨酸”

(xi) 序列描述：S E Q I D N O : 2 1 :

Ala Ser Asn Glu Asn Xaa Glu Thr Met  
1 5

( 2 ) S E Q I D N O : 2 2 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 9 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( ix ) 特征 :

( A ) 名称 / 关键 : 改性点

( B ) 位置 : 4 . . 5

( D ) 其他信息 : / 标记 = X a a

/ 特征 = “高半胱氨酸”

(xi) 序列描述：S E Q I D N O : 2 2 :

Ala Ser Asn Xaa Asn Met Glu Thr Met  
1 5

( 2 ) S E Q I D N O : 2 3 的资料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 1 0 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

( ii ) 分子类型 : 肽

( ix ) 特征 :

(A) 名称 / 关键 : 改性点

(B) 位置 : 6 . . 7

(D) 其他信息 : / 标记 = X a a

/ 特征 = “高半胱氨酸”

(xi) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 3 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Pro | Ser | Asn | Xaa | Pro | Pro | Glu | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

(2) S E Q I D N O : 2 4 的资料 :

(i) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 0 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓朴结构 : 直链

(ii) 分子类型 : 肽

(ix) 特征 :

(A) 名称 / 关键 : 改性点

(B) 位置 : 4 . . 5

(D) 其他信息 : / 标记 = X a a

/ 特征 = “高半胱氨酸”

(xi) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 4 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Pro | Xaa | Asn | Thr | Pro | Pro | Glu | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

(2) S E Q I D N O : 2 5 的资料 :

(i) 序列特征 :

(A) 长度 : 8 个氨基酸



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Ala | Pro | Gly | Xaa | Tyr | Pro | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

( 2 ) S E Q   I D   N O : 2 7 的資料 :

( i ) 序列特征 :

( A ) 长度 : 8 个氨基酸

( B ) 类型 : 氨基酸

( D ) 拓朴结构 : 直链

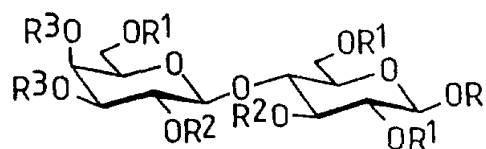
( ii ) 分子类型 : 肽

( xi ) 序列描述 : S E Q   I D   N O : 2 7 :

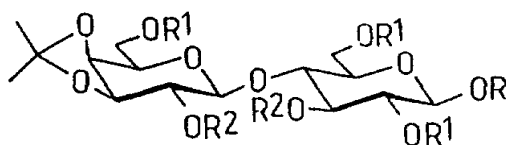
|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Gly | Tyr | Val | Tyr | Gln | Gly | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |

图

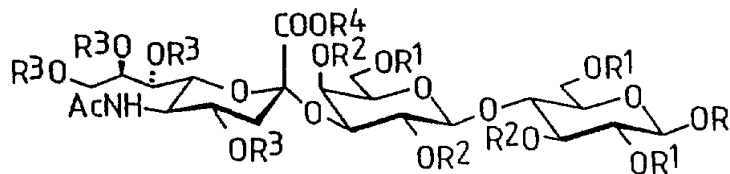
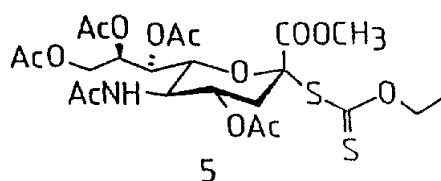
1



- 1:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{Ac}$   
 2:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{H}$   
 4:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ;  $R^1, R^2 = \text{Bzl}$ ;  $R^3 = \text{H}$   
 10:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{Ac}$   
 11:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{H}$   
 13:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ;  $R^1 = \text{Bz}$ ;  $R^2, R^3 = \text{H}$



- 3:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ;  $R^1, R^2 = \text{Bzl}$   
 12:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ;  $R^1, R^2 = \text{H}$



- 6:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{Ac}$ ;  $R^4 = \text{CH}_3$   
 7:  $R, R^1, R^2, R^3 = \text{Ac}$ ;  $R^4 = \text{CH}_3$   
 8:  $R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{Ac}$ ;  $R^4 = \text{CH}_3$   
 9:  $R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{H}$ ;  $R^4 = \text{Na}^+$   
 14:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ;  $R^1 = \text{Bz}$ ;  $R^2 = \text{H}$ ;  $R^3 = \text{Ac}$ ;  $R^4 = \text{CH}_3$   
 15:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ;  $R^1, R^2, R^3 = \text{H}$ ;  $R^4 = \text{Na}^+$

图 2

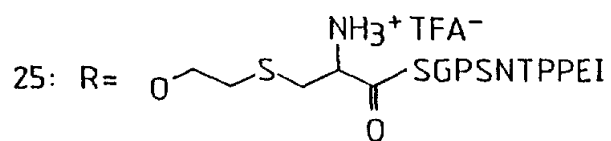
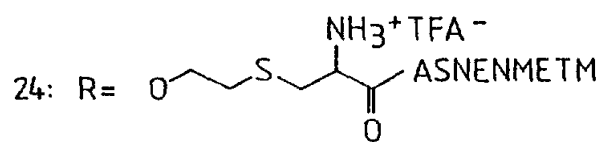
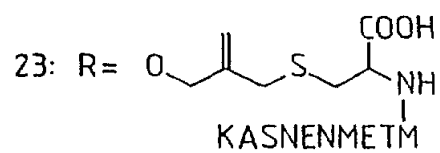
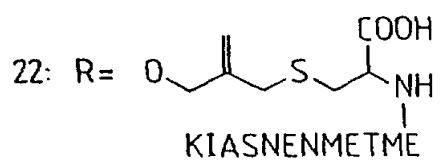
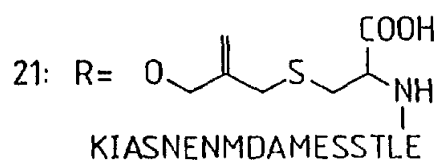
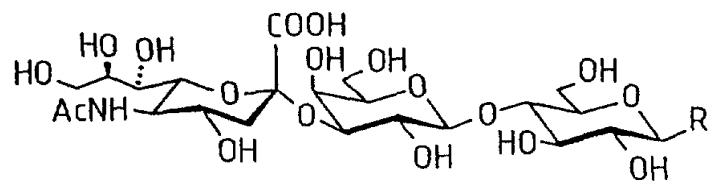


图 3

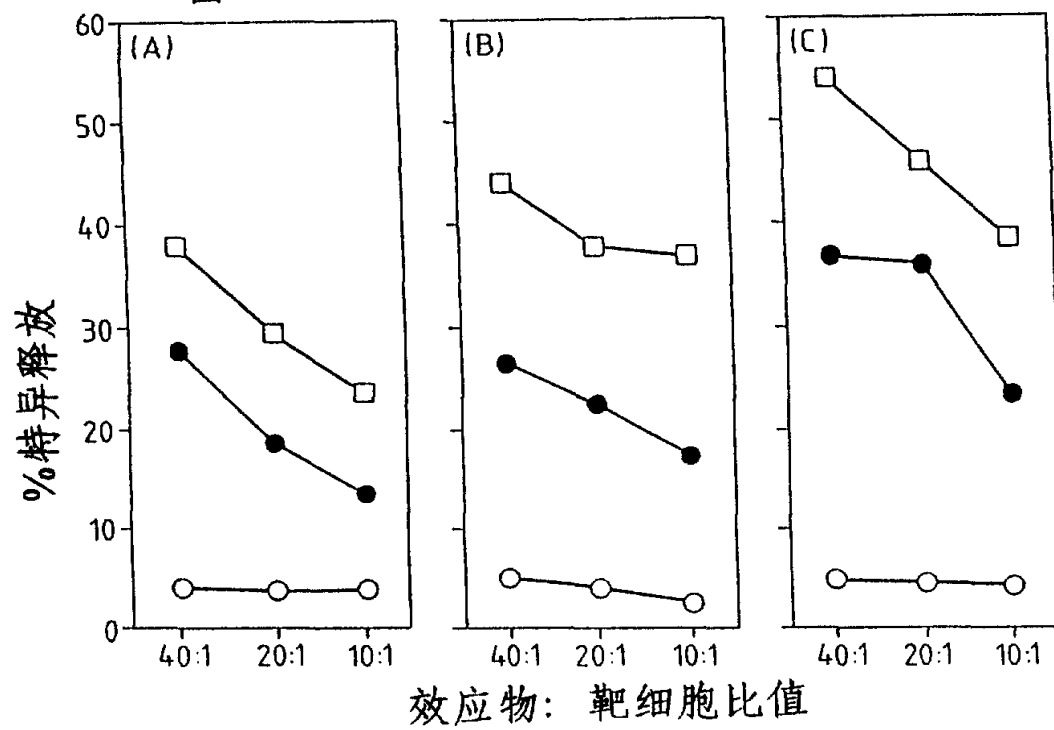


图 4

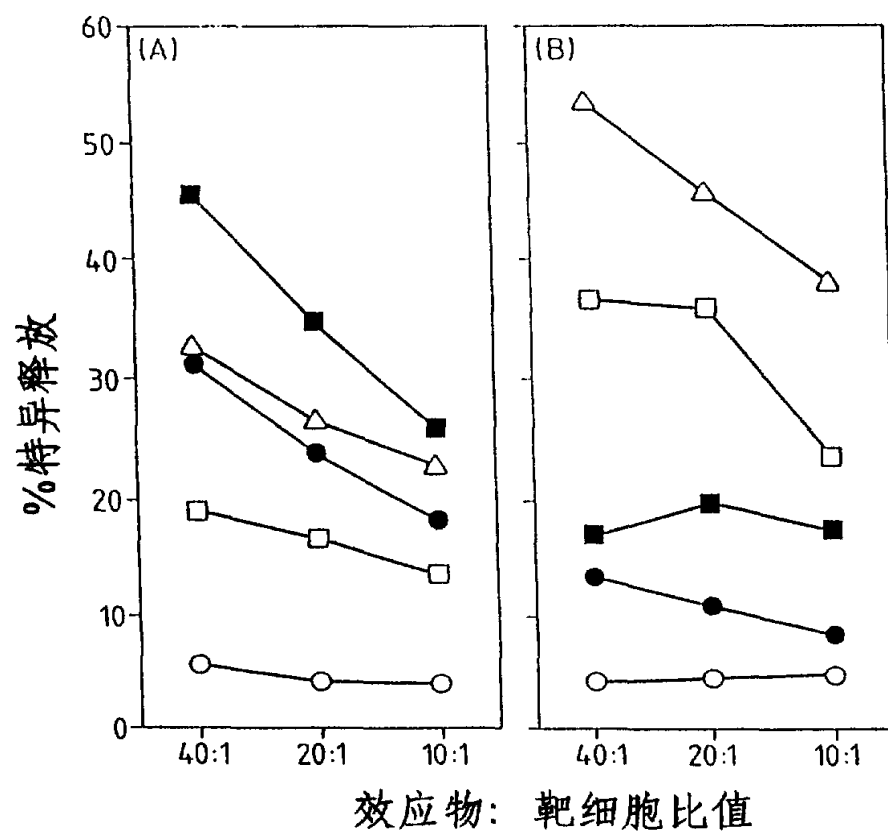


图 5

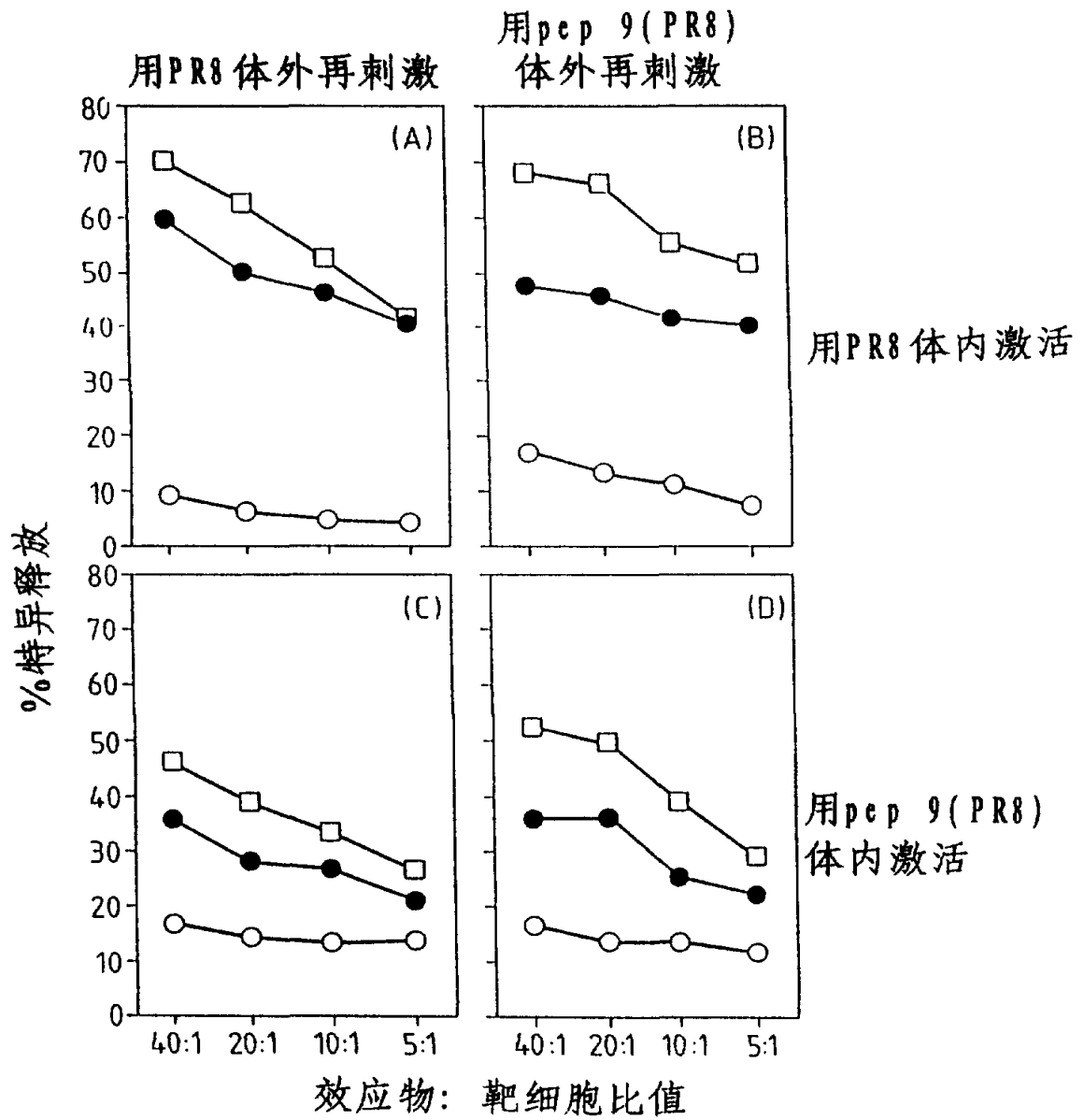


图 6

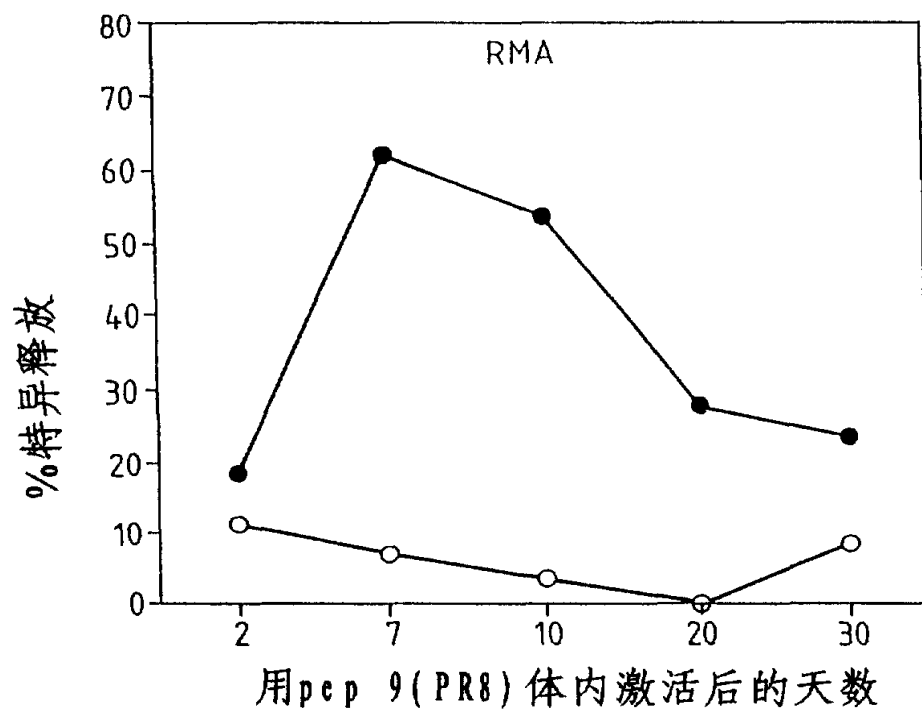


图 8

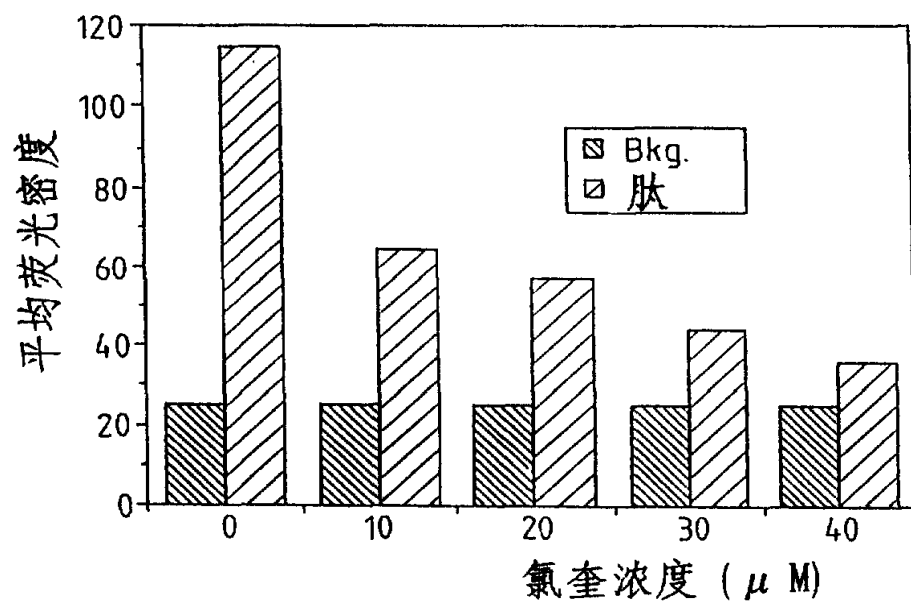


图 7

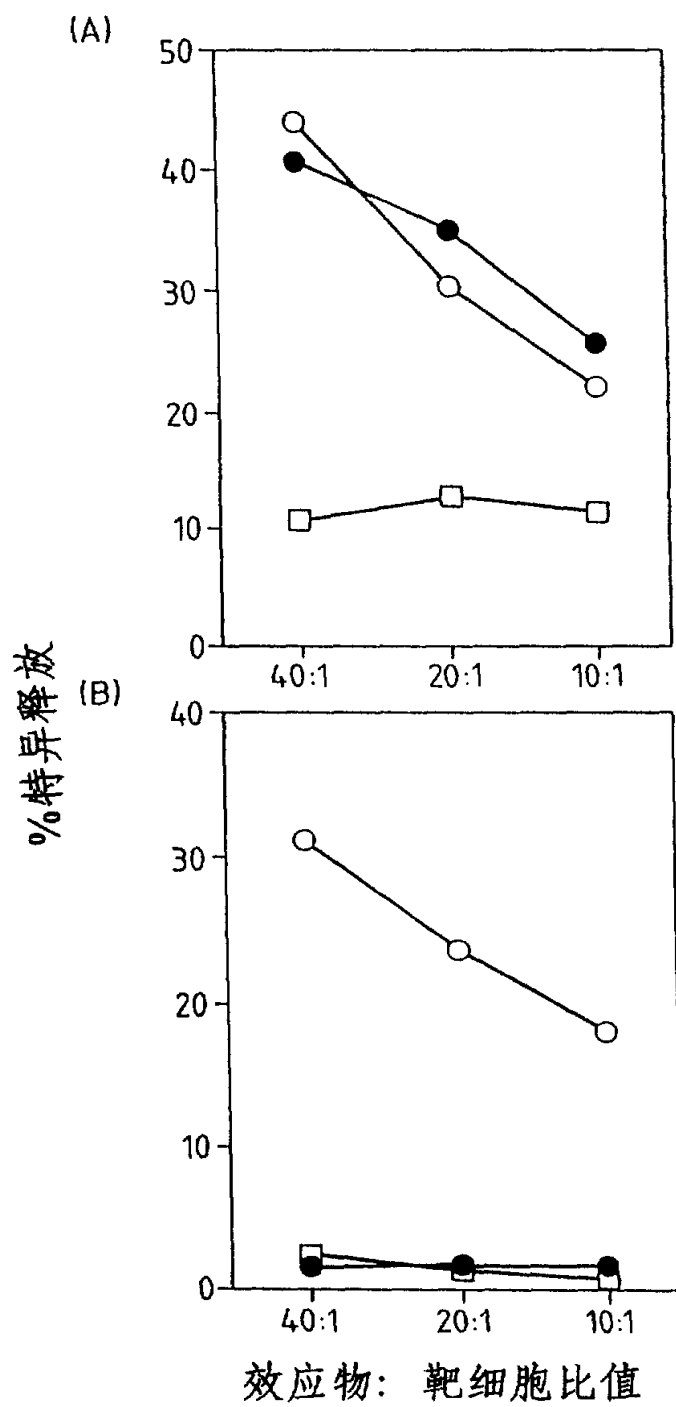


图 9

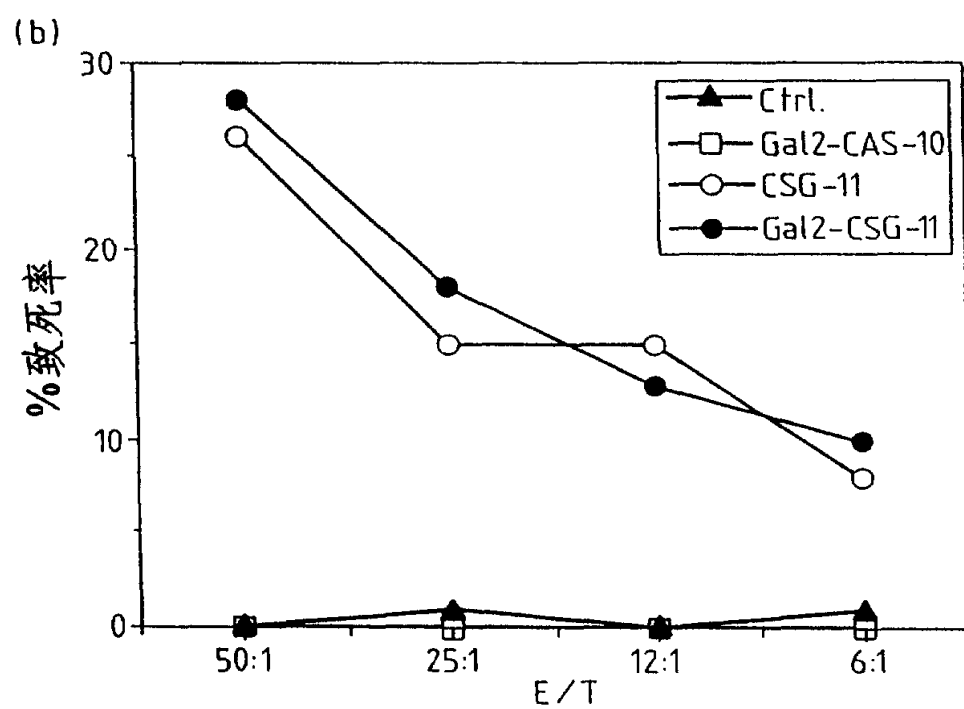
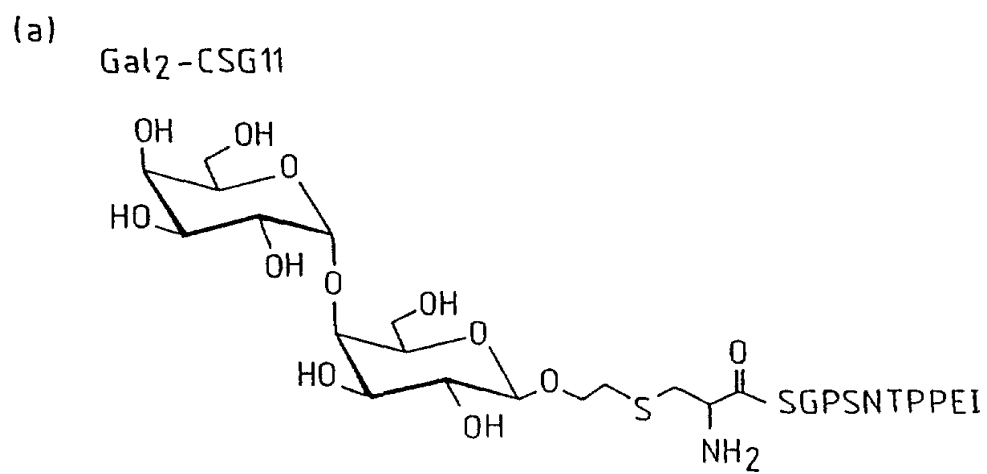


图 9 (续)

(c)

Gal<sub>2</sub>-CAS10

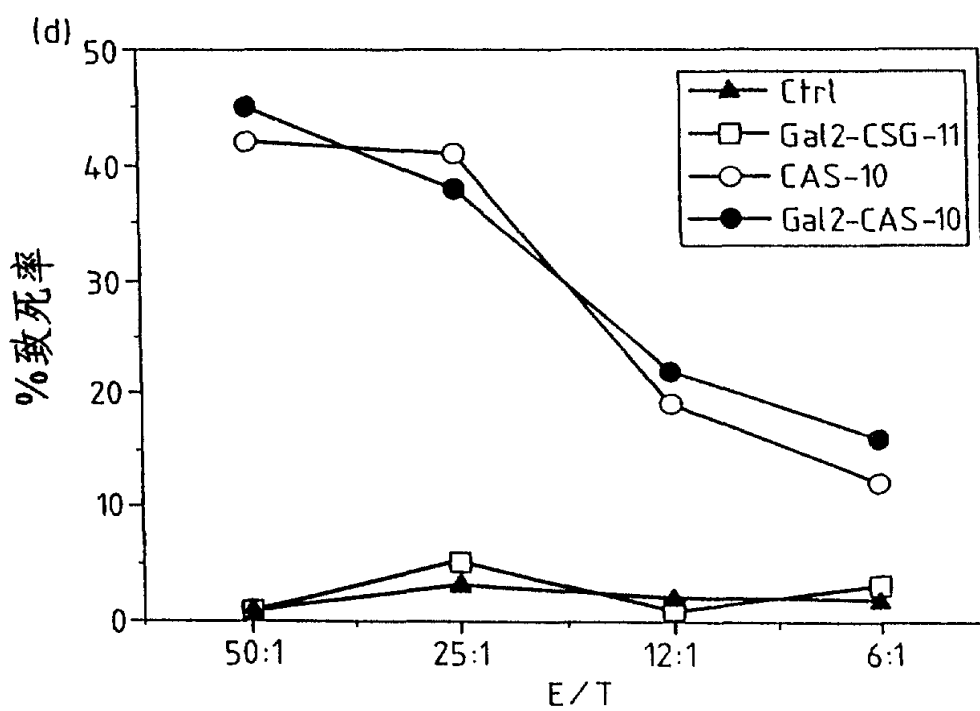
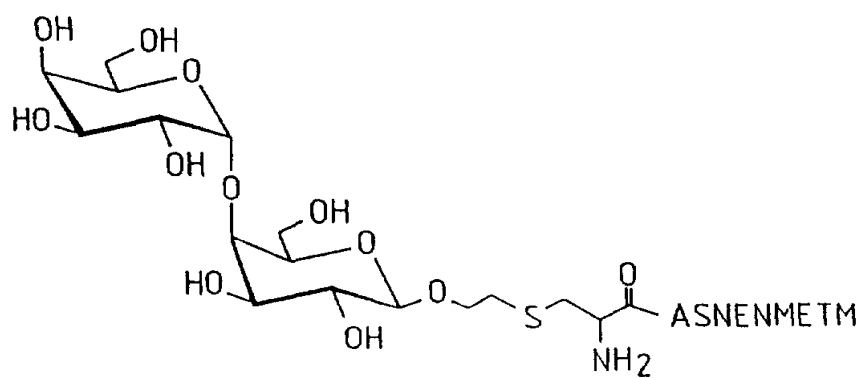


图 10

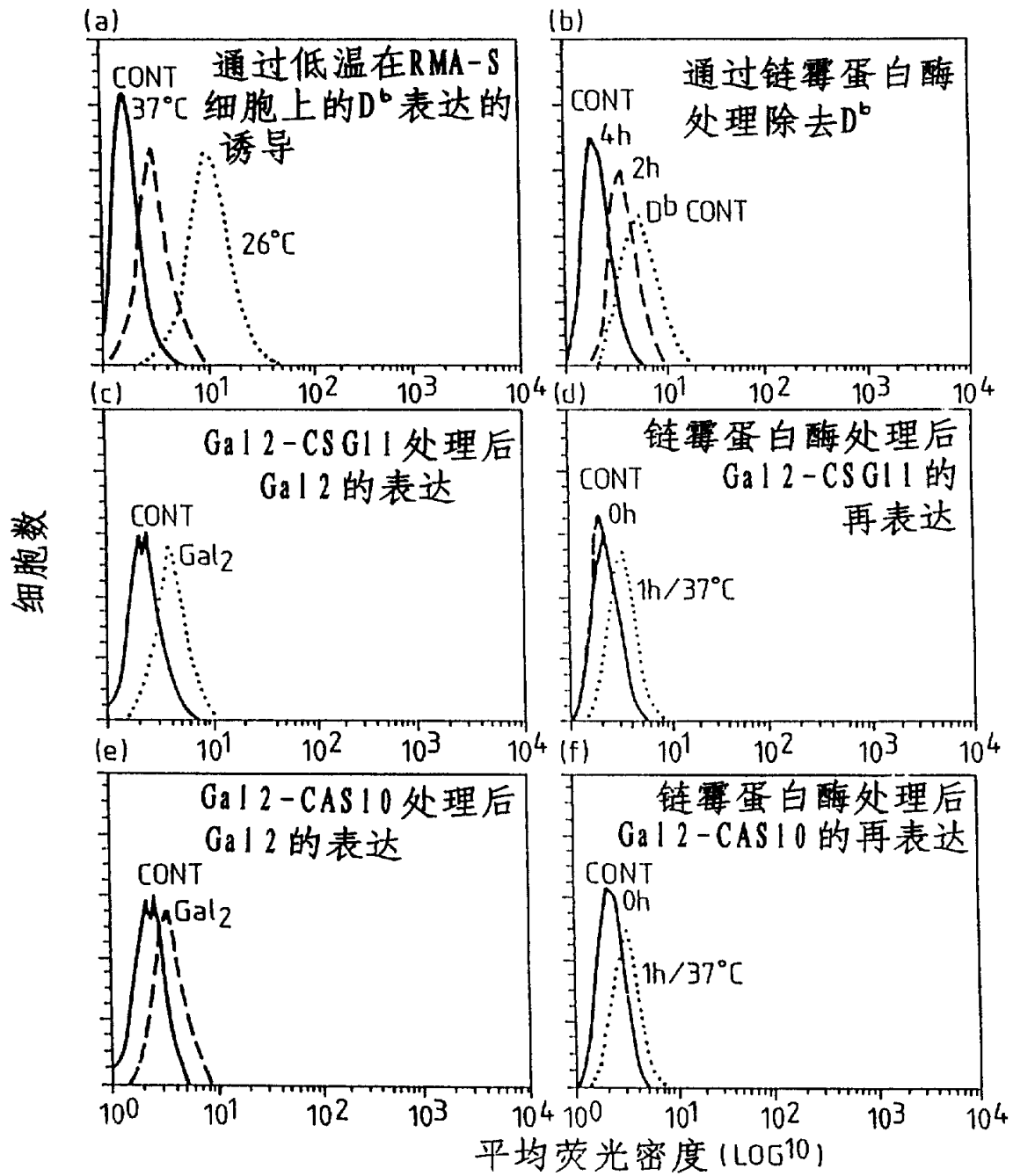


图 11

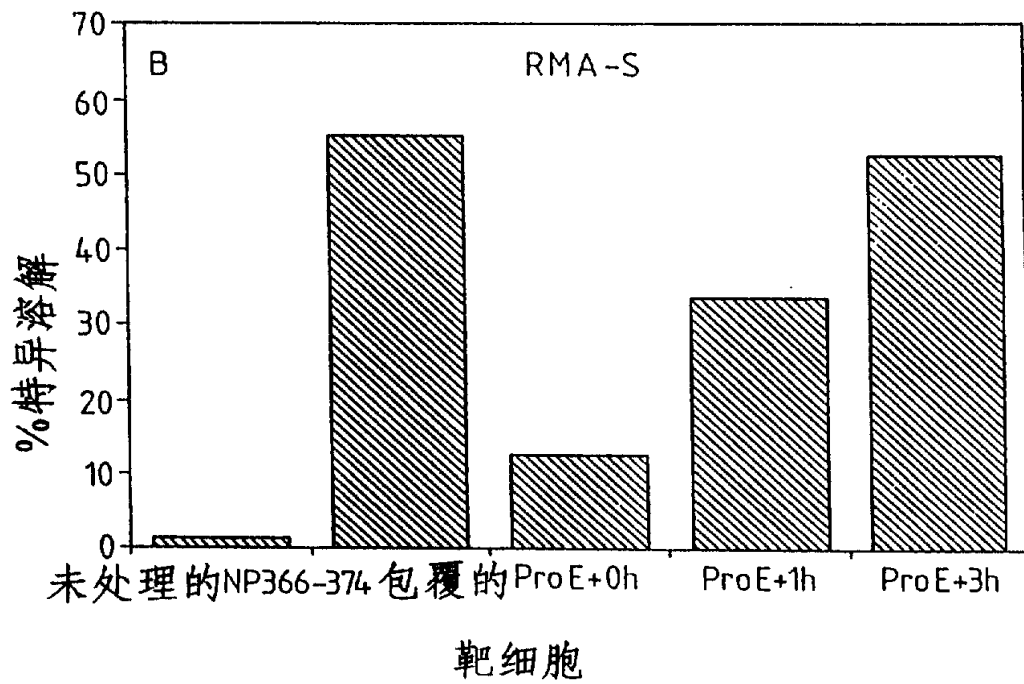
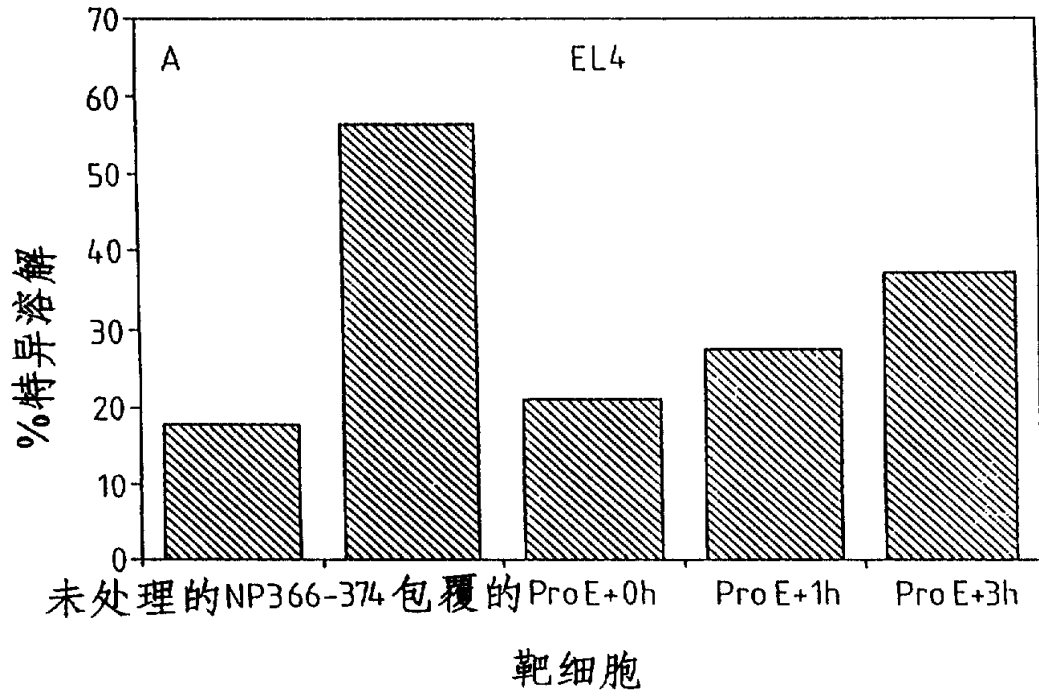


图 12

Gal-Gal-SGV-12

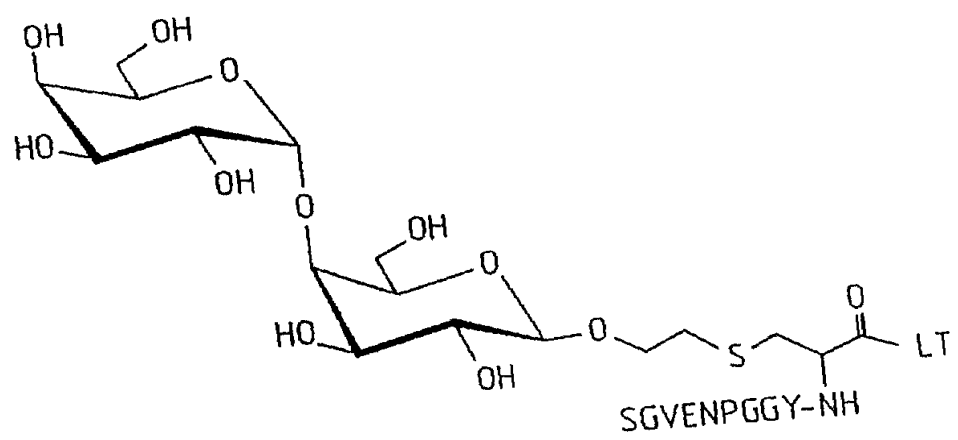


图 13

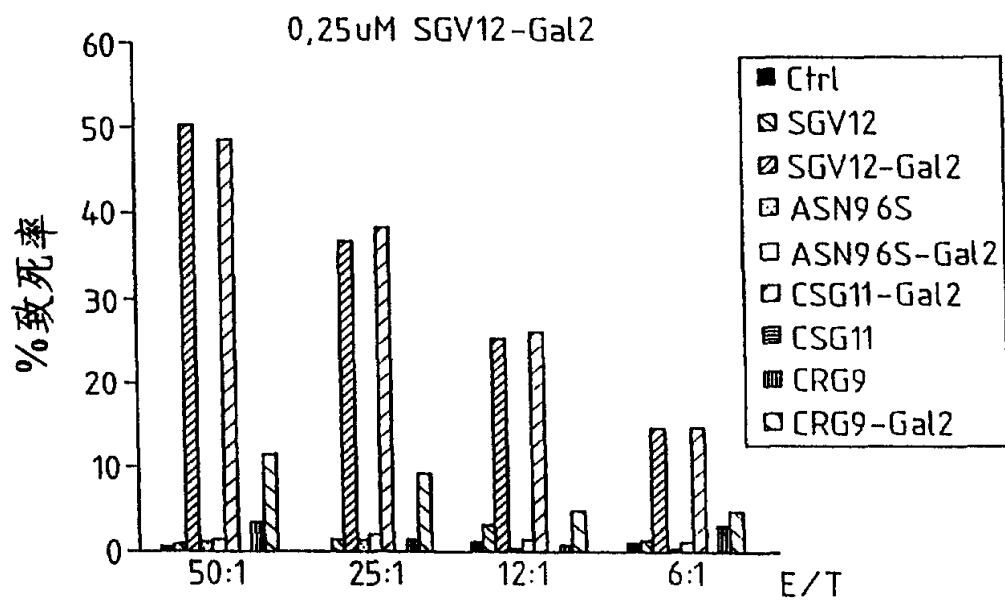
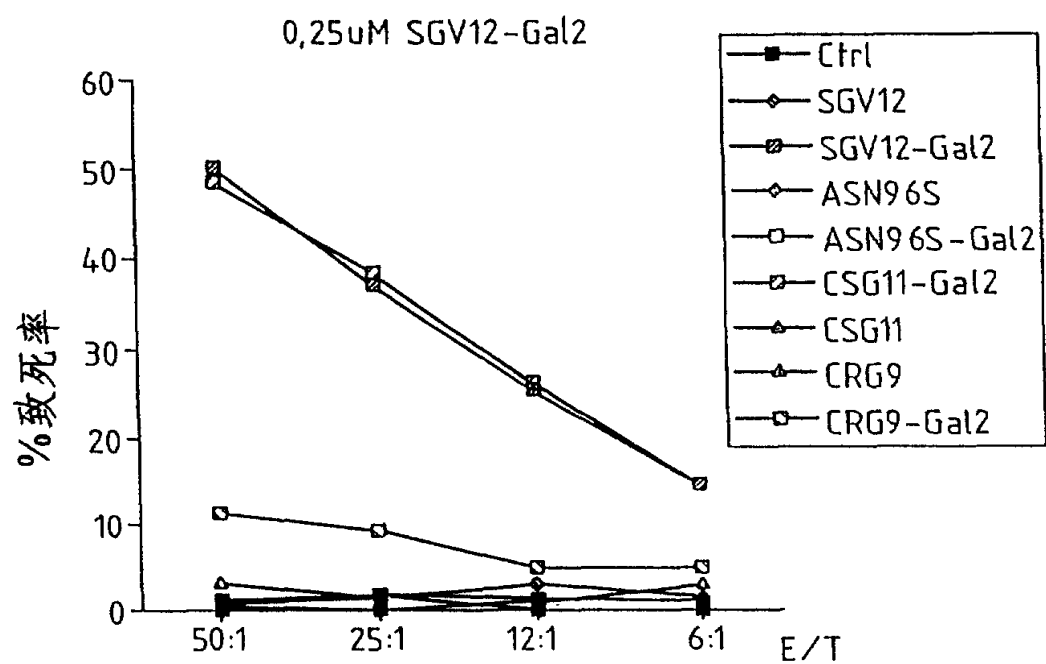


图 14

