



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89107673.5

[51] Int.Cl.<sup>5</sup>  
C07K 5/10

[43] 公开日 1990年4月18日

[22] 申请日 89.9.30

[30] 优先权

[32] 88.9.30 [33] US [31] 252,505

[71] 申请人 免疫生物学研究所有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 乔治·希夫纳 塔潘·欧德希耶  
吉迪恩·戈尔茨坦

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司  
代理人 曹恒兴

A61K 37/02

说明书页数: 26 附图页数: 1

[54] 发明名称 具有 T 细胞抑制基因活性的肽的合成方法

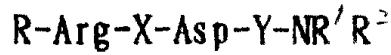
[57] 摘要

本发明介绍了在羧基末端具有一定酰胺取代物的肽, 它们具有分子人 thymopentin 的生物活性, 还提供了含该类肽的药物组合物及其使用方法。

< 20 >

# 权 利 要 求 书

1. 一种具有增加人 T 细胞系 CEM 中 cGMP 活性能力并选自由下式的肽组成的肽



式中:

R 是 H, 低级烷基, 乙酰基, 甲酰基, 低级链烷基;

X 是 Pro, 脱氢 Pro, 羟基 Pro, D-Lys, Aib 或 Lys;

Y 是 Gly 或选自 Val, Ala, Ile, Leu, Asp, Glu, Gln 或 Lys 的 D 或 L 氨基酸;

R' 是 H;

R<sup>2</sup> 是具有 1-10 个碳原子的低级烷基或链烯基, 具有 4-8 个碳原子的环烷基或链烯基, 芳基或 NHR<sub>3</sub> (其中 R<sub>3</sub> 是具有 1-10 个碳原子的低级烷基, 具有 4-8 个碳原子的环烷基或链烯基, 或芳基) 或

R' 和 R<sup>2</sup> 一起构成 4-7 个碳原子的亚甲基链。

2. 按权利要求 1 的肽, 其中 X 系 Pro 或 Lys, Y 系 Val。

3. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺。

4. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺。

5. 按权利要求 1 的肽, 其含有甲酰 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺。

6. 按权利要求 1 的肽, 其含有乙酰 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺。

7. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺。

8. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Lys-Asp-Val-甲酰胺。

9. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰肼。

10. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Lys-Asp-Val-哌啶酰胺。

11. 按权利要求 1 的肽, 其含有 Arg-Lys-Asp-Val-环己基酰肼

1 2 . 按权利要求1 的肽，其含有Arg-Lys-Asp-Val-异丙酰胺。

1 3 . 一种药物组合物，其在药物上可接受的配制剂中至少含有一种按权利要求1 至12的肽的有效治疗量。

1 4 . 按权利要求13的组合物，其适宜于口服给药。

1 5 . 调节生物体中 T细胞功能缺陷或过度的方法，包括将权利要求1 至12中至少一种肽的有效治疗量施用于生物体。

1 6 . 生产具有增加人 T细胞系CEM 中cGMP活性能力并选自由下式肽组成的肽的方法，该方法包括在固相中合成所述的肽，



式中：

R 是H ，低级烷基，乙酰基，甲酰基，低级链烷基；

X 是Pro ，脱氢Pro ，羟基Pro ，D-Lys ，Aib 或Lys ；

Y 是Gly 或选自Val ，Ala ，Ile ，Leu ，Asp ，Glu ，Gln 或Lys 的D 或L 氨基酸。

R<sup>1</sup>是H ；

R<sup>2</sup>是具有1-10个碳原子的低级烷基或链烯基，具有4-8 个碳原子的环烷基或链烯基，芳基或NHR<sub>3</sub>（其中R<sub>3</sub>是具有1-10个碳原子的低级烷基，具有4-8 个碳原子的环烷基或链烯基，或芳基）；或

R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>一起构成4-7 个碳原子的亚甲基链。

1 7 . 按权利要求16的方法，其中所述肽中的X 系Pro 或Lys ，Y系Val 。

1 8 . 按权利要求16的方法，其中所述肽选自：

Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺

甲酰基 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

乙酰基 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-哌啶酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-环己基酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-异丙酰胺

19. 制备具有增加人T细胞系CEM中cGMP活性能力并选自由下式的肽组成的肽的方法，该方法包括在溶液中合成所述的肽，



式中：

R 是H，低级烷基，乙酰基，甲酰基，低级链烷基，

X 是Pro，脱氢Pro，羟基Pro，D-Lys，Aib 或Lys；

Y 是Gly 或选自Val，Ala，Ile，Leu，Asp，Glu，Gln 或Lys 的D或L氨基酸；

R' 是H；

R<sup>2</sup>是具有1-10个碳原子的低级烷基或链烯基，具有4-8个碳原子的环烷基或链烯基，芳基或NHR<sub>3</sub>（其中R<sub>3</sub>是具有1-10个碳原子的低级烷基，具有4-8个碳原子的环烷基或链烯基，或芳基）；或

R'和R<sup>2</sup>一起构成4-7个碳原子的亚甲基链。

20. 按权利要求19的方法，其中所述肽中的X系Pro 或Lys，Y系Val。

21. 按权利要求19的方法，其中所述肽选自：

Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺

甲酰基 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

乙酰基 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-哌啶酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-环己基酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-异丙酰胺

2 2 . 权利要求1 至12的肽在制备用于调节人体免疫系统的药物组合物中的应用。

2 3 . 权利要求1 至12的肽在制备用于调节人体内 T细胞功能缺陷或过度的药物组合物中的应用。

## 具有T细胞抑制基因活性的肽的合成方法

本发明涉及能刺激抑制基因T细胞活性的合成肽，本发明的肽尤其涉及以分子胸腺生成素为基础的、在羧基末端具有酰胺取代物的四肽。

免疫调节蛋白-胸腺生成素(thymopoietin)和脾素(thysplenin)已分别由小牛和人的胸腺和脾脏分离得到。此外，短肽也已化学合成成功，并且与胸腺生成素具有等效的生物活性，而脾素经进一步修饰，可提供另外的结果，例如对酶具有抗性。例见美国专利4505853和共同待批美国专利申请SN196138。

关于这类蛋白质和合成肽已发表了大量论文和专利。美国专利No.4190646公开了五肽thymopentin，它是胸腺生成素的活性部位，其氨基酸顺序为Arg-Lys-Asp-Val-Tyr，还公开了肽组合物，其中在该五肽的氨基末端和/或羧基末端上可进行各种取代。胸腺生成素和thymopentin在CEM和MOLT-4两种人体T细胞系中引起生物学变化，从而证明其在刺激T细胞的抑制基因活性和辅助活性中的作用。至今还尚未发现少于五肽(在氨基酸顺序中有5个氨基酸)的thymopentin的类似物对CEM细胞具有活性。

申请人的共同待批美国专利No.53186公开了从人体脾脏中分离得到48氨基酸免疫调节蛋白脾素。被称为SP-5的牛脾素的活性部位，其氨基酸残基32-36具有氨基酸顺序为Arg-Lys-Glu-Val-Tyr，能刺激老鼠体内的T细胞辅助活性，因此可以期望人脾素在人体内也具有类似的生物活性。在上述同一专利申请文件中介绍了人脾素能引起人体T细胞系MOLT

-4细胞内cGMP的增加。在SN56186 申请文件中介绍了人体氨基酸的活性部位为Arg-Lys-Ala-Val-Tyr 。

与胸腺生成素不同，脾素并不能使CEM 细胞生物活性发生改变。因此脾素能刺激 T细胞的辅助活性，但不刺激 T细胞抑制基因的活性。例见美国专利4190646, 4261886, 4361673, 4420424和4629723 。上述专利、专利申请和讨论其他背景材料和生物学方法的论文均列为本发明的参考文献。

1984年 1月31日授予Kisfaludy 等人的美国专利4428938 公开了具有免疫调节功能的若干肽，其中有下列四肽：

Arg-Lys-Asp-Val

Arg-Lys-Asn-Val

Arg-Lys-Ala-Val

Arg-Lys-Asp-Ala

Arg-Lys-Asp-Ile

Arg-Lys-Glu-Val

Glp-Arg-Lys-Asp

上述美国专利4428938 所用的均是这些氨基酸顺序的盐、酰胺、低级烷基酯和被护衍生物，也都能产生免疫调节作用。但是这些顺序中没有一个是酰胺与本申请具有相同的特异性，而且还讨论了使用这些顺序治疗由于胸腺缺失造成的免疫失调的方法。在这件专利中，采用离体E rosette 测定方法测定肽的活性。

申请人的共同待批美国专利申请SN196138公开了能够引起MOLT-4 T 细胞系中生物活性的大量脾素肽类似物。与以前报告的thymopentin 类似物不同，文中介绍了长度短于5 个氨基酸并与脾素有关的肽都具有刺激MOLT-4细胞中 T细胞辅助活性的作用以及脾素五肽类似物。其中还介绍了若干四肽，包括：

Arg-Pro-Asp-Val

Arg-Pro-Asp-Val-NH<sub>2</sub>

甲酰 -Arg-Pro-Asp-Val

乙酰 -Arg-Pro-Asp-Val

乙酰 -Arg-Pro-Asp-Val-NH<sub>2</sub>

乙酰 -Arg-Pro-Ala-Val-NH<sub>2</sub>

乙酰 -Arg-Pro-D-beta-Asp-Val-NH<sub>2</sub>

乙酰 -Arg-Pro-Glu-Val-NH<sub>2</sub>

乙酰 -Arg-Pro-Glu-Val

乙酰 -Arg-Aib-Ala-Val-NH<sub>2</sub>

乙酰 -Arg-Aib-Glu-Val-NH<sub>2</sub>

乙酰 -Arg-Pro-Asp-Gly-NH<sub>2</sub>

在MOLT-4测定中，发现这些肽能模拟脾素的作用，但在CEM 细胞系测定中，却不能模拟thymopentin 的活性。

在技术上仍然需要其他肽，它们可用于刺激各种 T细胞缺陷症的人体免疫系统的抑制基因活性和辅助活性。

本发明出乎意料地发现，大量含有羧基末端取代物的酰胺的四肽在对CEM 细胞的环GMP 测定中，具有thymopentin 的 T细胞抑制基因活性的特征。这个发现是惊人的，因为含有自由羧基末端或由不同羧基末端酰胺基酰胺化了的相同四肽并不产生这种 T细胞抑制基因活性。例如在前面提到的美国专利4428938 中已经鉴定含有自由羧基末端的若干四肽顺序并不产生任何 T细胞抑制基因活性。然而根据本发明在羧基末端进行一定酰胺的取代，则这些无活性的肽显示 T细胞抑制基因活性，这种活性是任何现有技术未予预料到的。

因此，本发明提供了下式酰胺化肽：



式中：

R 是H，低级烷基，乙酰基，甲酰基，低级链烷基；

X 是Pro，脱氢Pro，羟基Pro，D-Lys，Aib 或Lys；

Y 是Gly 或选自Val，Ala，Ile，Leu，Asp，Glu，Gln 或Lys 的D 或L 氨基酸；

R' 是H；

R<sup>2</sup>是具有1-10个碳原子的低级烷基或链烯基，具有4-8个碳原子的环烷基或链烯基，芳基或NHR<sub>3</sub>（其中R<sub>3</sub>是具有1-10个碳原子的低级烷基，具有4-8个碳原子的环烷基或链烯基，或芳基）；或

R'和R<sup>2</sup>一起构成4-7个碳原子的亚甲基链。

这些酰胺化肽和含有这些肽的组合物具有人thymopentin 对CEM 细胞的生物活性。因此可以推论出这些肽在人体内产生类似体内生物活性。大量这种肽的特征在于增加对消化道和血清中肽链内切酶和肽链外切酶和类似胰蛋白酶攻击的抗性。因此，这些肽在治疗免疫缺陷方面具有显著的优点。

本发明还包括含有这些肽的治疗用组合物以及这些肽在需要治疗免疫调节的各种病症时的使用方法。

本发明的其他方面和优点将在下面予以详细说明。

图1 表示CEM 和cGMP测定，给出肽浓度(ug/ml)对cGMP量(微微克/毫升)曲线图，并且将thymopentin(TP-5)和本发明肽与对照进行对比。

本发明令人惊奇地提供了具有T细胞抑制基因活性并以式R-Arg-X-Asp-Y-NR'R<sup>2</sup>表示的化合物(其中R，X，Y，R'和R<sup>2</sup>的含义同上)。

为方便起见，本文中的肽的氨基酸组分及其制备所用的某些材料均用简略符号表示，极大多数的氨基酸3字母符号都是众所周知的，已知少数简略符号，如Glp表示焦谷氨酰基(即p-Glu)，Aib表示氨基异丁

酸。除了另有说明外，所有氨基酸均为L 异构型，如果需要D 异构型，则会予以说明。

本发明的某些优择肽是式中第二个氨基酸为Pro 或Aib 的那些肽。含有第二个氨基酸X 为Pro 或Aib 的羧基末端酰胺的四肽可以期望具有对由消化酶和血清酶引起降解的抗性的增加。这类优择肽包括：

Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺

Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

乙酰 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

甲酰 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺

本发明其他优择肽包括：

Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-甲酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-哌啶酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-环己基酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-异丙酰胺

令人惊奇而又未曾预料的取代四肽的活性提供了新的非显而易见的化合物，与现有技术相比更是如此。尽管本发明的四肽顺序以前已被揭示，例如美国专利4428938 中的Arg-Lys-Asp-Val 顺序，但本发明令人惊奇地发现，在这些顺序的羧基末端进行有选择的酰胺化就可提供具有T细胞抑制基因活性的化合物。此外，申请人还发现，上述若干肽还令人惊奇而又难以解释地显示出其类似于T细胞抑制基因活性和辅助活性。如上所述，这些肽包括Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺，甲酰基 -Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺和Arg-Lys-Asp-Val-异丙酰胺。

因此，本发明还提供了用作药物的新的化合物。具体酰胺的选择必须能产生上述四肽顺序的活性化合物，它们在现有技术中既没有提出

过，而且本发明有选择地酰胺化是由若干具有自由羧基末端的无生物活性的四肽中产生具有生物活性的化合物。此外，上述四肽顺序在其羧基末端进行酰胺化时，并不全都显示其类似于thymopentin的这种T细胞抑制基因生物活性。分析测定时，大量现有技术中的四肽在酰胺化时并不能显示这种T细胞抑制基因活性。本发明化合物采用一般方法并不能预测这类顺序的酰胺显示其作用于免疫系统或刺激T细胞辅助活性的能力。例如下列肽并不显示thymopentin的T细胞抑制基因的刺激活性，但是它们与Kisfaludy的美国专利4428938或申请人的共同待批专利SN196138中所述的肽顺序是相同或相似的。所述的这些肽为：

Arg-Pro-Asp-Val-吗啉代酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-二甲基酰胺

Arg-Lys-Asp-Val-2-萘酰胺

乙酰基 -Arg-Pro-Glu-Val-乙酰胺。

本发明的肽一般可采用下述已知方法制备。为方便起见，合成本发明的肽可采用固相合成法或常规溶液合成法。例如，Merrifield在J.A.C.S.(85:2149-2154, 1963)中所介绍的固相合成法颇易掌握，而且是制备肽的一般方法。固相合成法包括逐步将被护氨基酸加到生长的肽链上，这种肽链是通过共价键与固体树脂颗粒结合。采用这种方法，通过过滤去除试剂和副产物，因此可省略纯化中间产物的步骤。这种方法的基本原理是将链上的第一个氨基酸通过共价键连接到固体聚合物上。然后每次一个或分段逐步将被护氨基酸加上，直至形成所需的顺序。最后，移去固体树脂载体上的被护肽，切去保护基团。

氨基酸可以连接到用作树脂的任何适合的聚合物上。树脂必须含有通过共价键能与第一被护氨基酸牢固连接的官能团。各种聚合物都适用于该目的，例如纤维素、聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸甲酯、N-烷基苄胺、N-烷基二苄胺和聚苯乙烯树脂。可用于这类合成的适合的保护基团

包括：叔丁氧羰基(BOC)、苄基(Bzl)、叔戊氧羰基(AOC)、甲苯磺酰基(Tos)、O-溴-苄甲氧羰基(BrZ)和苄甲氧羰基(Z或CBZ)。其他的保护基团在前文和J.F.W.McOmie的“Protective Groups in Organic Chemistry”一书(Plenum Press, New York, 1973)中均已有介绍, 这些书刊也系本申请的参考文献。

制备本发明肽的一般方法包括：先将被护羧基末端氨基酸连接到树脂上, 连接后树脂进行过滤、洗涤和除去羧基末端氨基酸的 $\alpha$ -氨基上的保护基团(适合的基团为BOC)。这些保护基团必须去除, 当然无需打开氨基酸与树脂之间的键。然后将倒数第二个羧基末端被护氨基酸偶合到生成的树脂肽上, 这种偶合可采用第2氨基酸的自由羧基与树脂连接的第1氨基酸的氨基之间形成酰胺键的方法完成。该顺序可用相邻氨基酸重复进行, 直到所有氨基酸都连接到树脂上。

最后, 通过本领域专业人员熟知的适宜常规技术, 从树脂上切下被护肽, 例如采用环己基酰胺进行氨基分解和除去保护基团, 以显示所需的肽。将肽与树脂分离和除去保护基团所采用的切割方法决定于树脂和保护基团的选择, 这类方法在肽合成专业领域中均是众所周知的。

肽合成的其他方法在由Bodanszky 等著的“Peptide Synthesis”(second edition, John Wiley and sons, 1976)一书中也作了介绍, 例如本发明的肽也可通过常规的溶液肽合成方法合成, 包括采用酰胺键形成的化学方法或酶方法, 逐步或分段将氨基酸或肽片段进行偶合。这些溶液合成法在本领域中也是众所周知的。

业已发现, 本发明肽的生物活性与上述美国专利、专利申请和论文中所公开的人thymopentin相似。这种生物活性最初是通过与人thymopentin对比, 测定其使人T细胞系CEM中产生环GMP得到证实的。在该测定中, 由本发明的肽使之产生cGMP, 证明能使肽在该细胞上与人thymopentin受体部位相结合, 并且产生类似于人thymopentin的生物

活性。

本发明的许多肽还具有其他显著的优点，其特征在于对由消化道酶或血清酶引起的酶降解的抗性。因此；将其注入到生物体内时，能在体内延长半寿期。其中许多肽的另一个优点是能够口服。

由于本发明肽的免疫调节特征，它们可用于治疗人和动物的疾病，因为它们具有诱导T细胞分化和成熟的能力，这种T细胞能在生物体内给予免疫应答。因此，其结果是本发明的肽具有多种治疗用途。

本发明的肽可用于提高生物体的集体免疫，它们在体内将增加或参与治疗性刺激细胞免疫。本发明的肽或含有这类肽的药物组合物通常可用于细胞免疫有问题的，特别是有免疫缺陷的任何部位，因此可用于治疗包括变态反应和自身免疫反应等种种疾病。

因此，凡是由于T细胞不平衡引起产生抗体或细胞免疫过度，本发明的肽通过刺激抑制基因T细胞作用可调整这种病症。所以它们可用于治疗某些引起破坏抗体的自身免疫疾病，例如全身性红斑狼疮和类风湿性关节炎等。

作为最广泛的应用，本发明的肽或含有该肽的药物组合物可用于调节需要调节的人或动物的免疫系统。本文所述“调节”意指本发明化合物可使免疫系统由不正常的病态转变为正常的平衡态。尽管这种调节可以在校正免疫缺陷（例如狄乔治综合症）方面获得广泛的应用，而且还可应用于校正过量免疫活性（例如自身免疫症）的种种病症。

因此，本发明包括调节需要这种调节的人或动物免疫系统的方法，包括为了实施这些方法，将至少一种肽及其药物组合物的免疫调节有效量施用于人或动物。

本发明还提供了由人或动物免疫系统相对或绝对缺陷，尤其是T细胞抑制基因功能引起的各种病症的治疗方法，包括将至少一种本发明肽的有效治疗量施用于人或动物。

本文所述的“有效治疗量”意指可有效地治疗上述各种病症的用量。本发明还提供了诱导T细胞分化和成熟的方法，包括将至少一种本发明的肽的有效诱导量施用于人或动物。

本发明还提供了实施上述方法的药物组合物。为了制备本发明的药物组合物，可按常规药物配制方法，将作为活性成分的本发明的肽与药物载体充分混合。这种载体可根据用药所需的制剂形式采用各种不同的载体，例如适用于口服、舌下、直肠、鼻腔或非经肠道等各种载体。

在制备优先用于口服剂量形式的组合物时，任何常用的药物介质均可使用。水、油、醇、调味剂、防腐剂 and 着色剂等介质均可用于口服液体制剂（例如悬浮制剂、乳剂和溶液制剂）。载体中例如淀粉、糖、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘结剂和制粉剂等都可用于制备口服固体制剂（例如粉末、胶囊剂和片剂）。还可采用控释制剂形式。片剂和胶囊剂最适于用作口服剂量单位，因为它们使用方便，其中固体药物载体显然也可使用。如果需要，片剂可按常规方法包糖衣或肠衣。

用于非经肠道的制剂中，载体通常包括无菌水，其他成份例如有助于溶解或防腐的载体也可包含在内。还可制备注射用悬浮制剂，在这种情况下，适宜的液体载体和悬浮剂等都可使用。

以大约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）的量，优选大约 $0.001-10\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）的量用药时，本发明的肽一般都有药效作用，当然较低剂量也可使用。一般说来，相同的剂量范围都可用于上述必须治疗的免疫缺陷的各种病症。较大剂量（例如大约 $10-100\text{mg}/\text{kg}$ （体重））通常用于抑制免疫活性过度。

以下实施例用于说明本发明，但并非对本发明进行特殊的限制。实施例和说明书全文中的组分单位均以重量计，除非另有说明。

实施例中采用下列简略符号的含义为：

TFA：三氟乙酸；

HOAc：乙酸；

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 二氯甲烷,  
CH<sub>3</sub>CN : 乙腈,  
DMF : 二甲基甲酰胺,  
NH<sub>4</sub>OAc: 醋酸铵,  
n-BuOH: 正丁醇,  
pyr : 吡啶,  
DCC : 二环己基碳二亚胺,  
HOBT : 1-羟基- 苯并三唑,  
DMAP: 二甲氨基吡啶,  
TCA : 三氯乙酸,  
MeOH: 甲醇,  
TLC : 薄板层析,  
THF : 四氢呋喃,  
Et OAc: 乙酸乙酯,  
NaHCO<sub>3</sub>: 碳酸氢钠,  
MgSO<sub>4</sub> : 硫酸镁,  
NMM : N-甲基吗啉,  
Et<sub>2</sub>O: 二乙醚,  
HPLC: 高性能液相色谱,  
Pd/C: 钯- 碳,  
DIEA: 二异丙基乙胺,  
iBuOCOC1: 氯甲酸异丁酯,  
i-Pr<sub>2</sub>O: 二异丙醚,  
ONp : 对硝基苯酯,  
RPMI: 组织培养基,  
PBS : 磷酸盐缓冲盐水。

### 实施例1：Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺的合成

将2.25g BOC-Pro-(Bzl)Asp-Val溶于40ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ，溶液置于冰浴中冷却，加入0.67g HOBt和0.90g DCC的DMF(4ml)溶液。搅拌10分钟后，再加入0.30g 异丙酰胺的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5ml)溶液。混合物在冰浴中搅拌15分钟，加温至室温。3小时后过滤沉淀物，用10%柠檬酸溶液、水和饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液提取沉淀物。有机层经 $\text{MgSO}_4$ 干燥后，减压除去溶剂。得到2.32g 灰白色固体产物。经EtOAc-i-Pr<sub>2</sub>O结晶，得到1.64g 产物。m.p. 179.5-181.5 °C。

将50ml的40% TFA 的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 溶液加入0.84g 上述产物，溶液搅拌30分钟，减压去除溶剂。再将醚加到残留固体Pro-(Bzl)Asp-Val- 异丙酰胺三氟乙酸盐中。

将0.93g Boc-精氨酸溶于10ml DMF中，溶液冷却至 -20°C，先后加入0.18ml NMM和0.22g iBuOCOCl。混合物在 -15°C下搅拌20分钟，然后加入0.18ml NMM和上述三氟乙酸盐的DMF(10ml)冷却溶液。30分钟后移去冷却浴，继续搅拌2小时，减压除去大部分溶剂。将EtOAc 和水加到残渣中，液层分开后，有机层用柠檬酸提取并用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液提取两次。除去溶剂后，得到1.44g 无色玻璃状物。该产物经硅胶60快速层析纯化，用98:2  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH洗脱。先洗脱的组分是所需产物，得到0.53g 纯产物，还得到含有少量杂质的另一部分为0.32g。

0.53g 纯化过的被护四肽酰胺用1ml 甲酸的MeOH(20ml)和钨黑氢化，一小时后混合物经硅藻土过滤并用水洗涤，减压除去MeOH。残留物用水稀释后冻干，得到280mg 产物，经SP-Sephadex 层析纯化，用0.30M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ (pH5)洗脱，合并含有主峰中心的部分，冻干得到190mg 非晶形固体的Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺。

氨基酸分析：Asp, 1.01; Pro, 1.03; Val, 0.97; Arg, 1.00;  
96% 肽。

薄板层析 (硅胶60) :

$R_f(\text{I}) = 0.44$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/15:3:12:10)

$R_f(\text{II}) = 0.65$  (EtOAc:pyr:HOAc:H<sub>2</sub>O/5:5:1:3)

$R_f(\text{III}) = 0.16$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O/3:1:1)

实施例2: Arg-Lys-Asp-Val-环己基酰胺的合成

将HOBt (0.27g) 加入BOC-(Bzl)Asp-Val-ONp (1.09g, 2.00mmol) 和环己胺 (0.27ml, 1.2当量) 的THF (10ml) 溶液, 生成的黄色溶液搅拌24小时后减压蒸发。残留油用EtOAc 稀释, 再用饱和NaHCO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O、10%柠檬酸和饱和盐水洗涤。有机相经MgSO<sub>4</sub> 干燥、过滤和蒸发, 得到被护二肽酰胺。

将该被护二肽 (0.71g, 1.4mmol) 加入经过搅拌的4.2M HCl的二噁烷 (10ml) 溶液, 60分钟后减压蒸发反应物, 得到无色固体的二肽盐酸盐。

将NMM (0.18ml) 加到经过搅拌的二肽盐酸盐、(CBZ)<sub>3</sub>Arg-(CBZ)-Lys-ONp (1.34g, 1.4mmol) 和HOBt (0.19g, 1.0当量) 的DMF (10ml) 溶液中, 16小时后生成胶凝状沉淀物。反应混合物用NaHCO<sub>3</sub> 饱和溶液骤冷、过滤和用水、10%柠檬酸、水及Et<sub>2</sub>O洗涤。经4% HOAc/EtOAc 重结晶后, 得到无色固体 (CBZ)<sub>3</sub>Arg-(CBZ)-Lys-(Bzl)-Asp-Val-环己酰胺 1.36g, 73%。

在HF/ 苯甲醚 (30ml/8ml) 中于 0℃ 下, 将四肽 (1.33g) 进行60分钟的去保护, 残留物在Et<sub>2</sub>O中骤冷后过滤。再将收集到的固体溶于10% HOAc, 冻干后得到Arg-Lys-Asp-Val-环己酰胺 460mg。

肽经HPLC纯化: M-20 10/50 ODS-3柱, 10.0ml/ 分钟流速, 10% CH<sub>3</sub>CN, 0.01M (pH5) NH<sub>4</sub>OAc。将150mg 三次注射到3ml 缓冲液中, 并收集35.0-51.6 分钟间的洗脱部分, 减压部分蒸发后, 冻干得到410mg 无色固体四肽酰胺Arg-Lys-Asp-Val-环己酰胺。

氨基酸分析: Arg, 1.00; Lys, 1.00; Asp, 1.00; Val, 0.85.

薄板层析 (250  $\mu$ 硅胶G):

$R_f$ (I) = 0.39 (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:EtOAc/1:1:1:1)

$R_f$ (II) = 0.61 (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/15:3:12:10)

$R_f$ (III) = 0.90 (EtOAc:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/5:1:3:5)

实施例3: Arg-Lys-Asp-Val-哌啶酰胺的合成

将HOBt (0.68g, 1.0当量) 加入经过搅拌的BOC-(Bzl)-Asp-Val-ONp (2.72g, 5.00mmol) 和哌啶 (0.6ml, 1.2当量) 的THF (10ml) 溶液中, 48小时后减压蒸发黄色溶液。将油状残留物溶于EtOAc中, 分别用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液和冷却的2M NaOH各洗涤1次, 再用水洗2次, 用10%柠檬酸和饱和盐水洗涤1次。有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥, 得到2.36g无色油BOC-(Bzl)-Asp-Val-哌啶酰胺。

用MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>快速层析纯化后, 得到无色固体被护二肽酰胺1.65g, 67%。

将被护二肽酰胺 (1.06g, 2.17mmol) 加到4.2M的HCl-二噁烷 (10ml) 中, 1小时后减压蒸发溶液, 再将其溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 经再蒸发后得到无色油状盐酸盐。

将NMM (0.29ml) 加到经过搅拌的(CBZ)<sub>3</sub>Arg-(CBZ)-Lys-ONp (2.08g, 2.17mmol)、上述无色油和HOBt (0.29g) 的DMF (10ml) 溶液中, 1小时后开始生成沉淀物。16小时后用水骤冷反应混合物, 产物用EtOAc提取, 再用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液、H<sub>2</sub>O、10%柠檬酸、H<sub>2</sub>O和Et<sub>2</sub>O洗涤。经HOAc/EtOAc/Et<sub>2</sub>O重结晶后, 得到无色固体(CBZ)<sub>3</sub>Arg-(CBZ)-Lys-(Bzl)-Asp-Val-哌啶酰胺2.40g, 91%。

将被护四肽 (1.87g, 1.55mmol) 与经N<sub>2</sub>清洗过的10% HOAc (100ml) 混合, 加入10% Pd/C (0.8g)。混合物在帕尔氢化器 (500ml容器, 43.5

psi)上搅拌, 48小时后反应混合物经0.45尼龙滤器过滤、部分蒸发、水稀释和冻干, 得到890mg 无色固体四肽粗制品。

用HPLC纯化肽: Whatman M-20 10/50 ODS-3柱, 10.0ml/min流速, 10% CH<sub>2</sub>CN, 0.01M, pH5, NH<sub>4</sub>OAc。用300mg 三次注射到 3ml缓冲液中, 收集23.0-44.0 分钟间的洗脱部分。减压部分蒸发和冻干后, 得到510mg 所需无色固体的四肽酰胺Arg-Lys-Asp-Val-哌啶酰胺。

氨基酸分析: Arg, 0.95; Lys, 1.00; Asp, 1.02; Val, 1.00; 肽含量54.2。

薄板层析(250 μ, 硅胶G):

R<sub>f</sub>(I) = 0.31 (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:EtOAc/1:1:1:1)

R<sub>f</sub>(II) = 0.53 (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/15:3:12:10)

R<sub>f</sub>(III) = 0.61 (EtOAc:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/5:1:3:5)

实施例4 : Arg-Pro-Asp-Val-N-甲酰胺的合成

将DCC (10.32g, 50.0mmol)加到经过搅拌的BOC-Val (10.86g, 50.0 mmol) 和DIEA (8.70ml, 1.0 当量)、甲胺·HCl (3.38g, 1.0当量) 和HOBt (7.66g, 1.0当量) 于12:5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMF (85ml)的溶液中, 生成沉淀物。2小时后, 过滤反应物, 将过滤物蒸发至干。油状残留物溶于EtOAc, 用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液、H<sub>2</sub>O、10% 柠檬酸和饱和盐水洗涤 3次。经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥后, 过滤和蒸发有机相, 得到无色固体。置于热己烷中研制, 得到所需酰胺BOC-Val-甲酰胺7.98g, 69%, m.p.120-122 °C。

将50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20ml)加到上述酰胺(4.60g, 20.0mmol) 中, 搅拌30分钟后, 在低于30°C 温度下蒸发溶液, 将油状残留物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中, 用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液洗涤 2次。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤和蒸发后, 得到Val-甲酰胺1.90g, 73%。

将DCC (3.01g, 14.6mmol) 加到经过搅拌的BOC-Bzl-Asp (4.72g,

14.6mmol)、Val-甲酰胺(1.90g, 14.6mmol)、HOBt (2.24g, 1.0当量)的DMF (20ml)溶液中, 5分钟后生成沉淀物, 16小时后过滤反应物, 过滤物用半饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液骤冷。

收集生成的固体, 用H<sub>2</sub>O、10%柠檬酸、H<sub>2</sub>O和Et<sub>2</sub>O洗涤, 风干得到无色固体, 经EtOAc重结晶后, 得到所需二肽酰胺BOC-(Bzl)-Asp-Val-甲酰胺5.85g, 92%。

将50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20ml)加到二肽酰胺(3.94g, 9.05mmol)中, 搅拌30分钟后, 在低于30℃温度下蒸发溶液, 用Et<sub>2</sub>O研制, 得到无色玻璃状TFA二肽4.10g, 100%。

将DCC (1.87g, 9.05mmol)加到经过搅拌的BOC-Pro (1.95g, 9.05mmol)、TFA二肽(4.10g, 9.05mmol)、DIEA (1.73ml, 1.1当量)、DMAP(0.12g, 0.1当量)的DMF (20ml)溶液中, 5分钟后生成沉淀物, 16小时后, 过滤生成的固体, 用H<sub>2</sub>O、10%柠檬酸、H<sub>2</sub>O和Et<sub>2</sub>O洗涤, 风干得到4.15g所需三肽酰胺, 无需纯化即可使用。

将50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15ml)加到上述酰胺(4.15g, 7.78mmol)中, 搅拌30分钟后, 在低于30℃的温度下蒸发溶液, 用Et<sub>2</sub>O研制, 得到无色固体TFA三肽4.25g, 100%。

将DCC (1.61g, 7.78mmol)加到经过搅拌的86.9% AOC-Tos-Arg (39.7g, 7.78mmol)、三肽酰胺(4.25g, 7.78mmol)、NMM (0.86ml, 1.1当量)和HOBt (1.19g, 1.0当量)的DMF (15ml)溶液中, 10分钟后生成沉淀物, 16小时后过滤反应物, 过滤物用半饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液骤冷。

收集生成的固体, 用H<sub>2</sub>O、10%柠檬酸、H<sub>2</sub>O醚洗涤, 风干得到被保护四肽酰胺4.82g, 72%。

将固体的一半在50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10ml)中经过30分钟的去保护, 减压蒸发, 用Et<sub>2</sub>O研制, 生成的固体在0℃下经过60分钟用HF/苯甲醚(30ml/8ml)裂开, 残留物与EtOAc混合, 再用10% HAOC (50ml)提取2次,

将水提取物冻干，得到Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺粗制品。

粗制品肽在SPC-25 Sephadex (2.6×83cm柱，0.05-0.3M NH<sub>4</sub>OAc，pH6.5；梯度：100ml/h 流速，9.5ml/部分，206nm 检测器)。113-128部分合并后，冻干得到925mg 四肽酰胺Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺。

氨基酸分析：Arg，1.06；Pro，0.99；Asp，0.95；Val，1.00；肽含量54。

薄板层析(250 μ硅胶G)：

$R_f(\text{I}) = 0.20$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O: 上相/4:1:5)

$R_f(\text{II}) = 0.26$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/15:3:12:10)

$R_f(\text{III}) = 0.26$  (EtOAc:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/5:1:3:5)

实施例5：N-甲酰-Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺的合成

将4.5M HCl二噁烷(10ml)加到AOC-(Tos)-Arg-Pro-(Bzl)-Asp-Val-甲酰胺(1.00g，1.17mmol)中，蒸发反应物，再用H<sub>2</sub>O稀释，冻干得到无色粉末固体HCl 四肽0.92g，100%。

将该固体溶于DMF (10ml)，加入DIEA (0.93ml，4.0 当量)、DMAP (0.08g) 和甲酸对硝基苯酯(200mg，1.02当量)。2 小时后，将反应混合物与10% 柠檬酸反应，生成的固体过滤后，用水洗涤，风干得到甲酰化肽酰胺0.41g。

在 0℃下用HF/ 苯甲醚(30ml/8ml)分裂60分钟，残留物与EtOAc 混合，用1% NH<sub>4</sub>OH(50ml)提取 2次，水提取物经冻干后，得到肽粗制品N-甲酰-Arg-Pro-Asp-Val-甲酰胺。

肽粗制品在DEAE Sephadex (2.6×90cm柱，0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，非缓冲液，100ml/h 流速，10ml/ 部分，206nm 检测器)上纯化，38-43 部分合并后，冻干得到80g 酰胺化肽。

氨基酸分析：Arg，1.00；Pro，1.00；Asp，1.00；Val，1.00；肽

含量50%。

薄板层析(250  $\mu\text{m}$  硅胶G):

$R_f(\text{I}) = 0.32$  (n-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O:上相/4:1:5)

$R_f(\text{II}) = 0.38$  (EtOAc:HOAc:H<sub>2</sub>O:Pyr/5:1:3:5)

$R_f(\text{III}) = 0.34$  (三氟乙醇:NH<sub>4</sub>OH/1:1)

实施例6: Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰肼的合成

先后将NMM (2.30ml)和iBuOCOCl (2.64ml)加到在-15℃下经过搅拌的BOC-Val (4.34g, 20.0mmol)的THF(40ml)溶液中,生成的浆液搅拌15分钟,然后滴加苯酰肼(1.98ml)。在-10℃-0℃下将浆液搅拌1小时,再加温到室温,过滤反应混合物,减压蒸发过滤物。残留物溶于EtOAc,用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液、水和饱和盐水洗涤。

有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤和蒸发后,得到橙黄色固体,经CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/石油醚重结晶,得到无色固体BOC-Val-2-苯酰肼, m.p. 140-141℃, 4.96g, 74%。

将BOC-Val-2-苯酰肼(1.13g, 3.68mmol)加到经过搅拌的4.2M HCl二噁烷(10ml)中, 1小时后减压蒸发反应物,在Et<sub>2</sub>O中研制,过滤得到Val-2-苯酰肼二盐酸盐,无色固体, 1.03g。

先后将NMM (0.60ml)和DCC(0.56g)加到经过搅拌的二盐酸盐(1.03g, 3.68mmol)、BOC-(Bzl)-Asp(0.88g)和HOBT(0.37g)的THF(10ml)的溶液中,几乎立即生成沉淀物,16小时后,过滤反应混合物,减压蒸发过滤物,将残留物溶于EtOAc,用NaHCO<sub>3</sub>饱和和溶液和饱和盐水洗涤。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤和减压蒸发,再用EtOAc/己烷重结晶,得到无色固体BOC-(Bzl)-Asp-Val-2-苯酰肼1.07g, 64%。

将BOC二肽苯酰胺(1.07g, 1.75mmol)加到经过搅拌的4.2M HCl二噁烷1溶液(10ml),60分钟后,减压蒸发溶液,得到无色油(Bzl)-Asp-

Val-2-苯酰肼盐酸盐。

将NMM(0.6ml)加到经过搅拌的(CBZ)<sub>3</sub>Arg-(CBZ)-Lys-ONp(1.68g)、油和HOBt(0.24g)的DMF(6ml)溶液中,16小时后生成胶凝状沉淀物,用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液使反应混合物骤冷,收集固体,用水、10%柠檬酸、水和Et<sub>2</sub>O洗涤,经2%HOAc/EtOAc重结晶,得到无色固体(CBZ)Arg-(CBZ)-Lys-(Bzl)-Asp-Val-2-苯酰肼2.15g,92%。

在0℃下将被保护肽(1.88g)置于HF/苯甲醚(30ml/8ml)中裂解60分钟,残留物在Et<sub>2</sub>O中骤冷,过滤。固体用10%HOAc(100ml)提取1小时,过滤,提取物冻干后得到890mg无色固体Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰肼。

肽粗制品在CM Sephadex(2.6×88cm柱,0.3M NH<sub>4</sub>OAc,非缓冲液,100ml/h流速,12.5ml/部分,225nm检测器)。合并270-310部分,冻干得到390mg最终产物Arg-Lys-Asp-Val-2-苯酰肼。

氨基酸分析:Arg,0.98;Lys,1.03;Asp,1.00;Val,0.99,肽含量83。

薄板层板(250 μ硅胶G):

$$R_f(\text{I}) = 0.39 \quad (\text{n-BuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{EtOAc}/1:1:1:1)$$

$$R_f(\text{II}) = 0.51 \quad (\text{n-BuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{Pyr}/15:3:12:10)$$

$$R_f(\text{III}) = 0.59 \quad (\text{EtOAc}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{Pyr}/5:1:3:5)$$

实施例7:Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺的合成

将DCC(4.12g,20.0mmol)加到在室温下经过搅拌的BOC-Val(4.35g,20.0mmol)、苯胺(3.0ml,1.05当量)和HOBt(3.09g,1.0当量)的DMF(20ml)溶液中,在5分钟内生成很稠的沉淀物,4小时后过滤反应物,将过滤物倒入半饱和NaHCO<sub>3</sub>(500ml)溶液中,生成并收集沉淀物,固体用水(1:1)洗涤,风干,经己烷/异丙醇重结晶,得到无色固体N-酰苯胺BOC-Val-苯胺酰胺3.76g,64%。

将BOC-Val-苯胺酰胺(2.50g, 8.55mmol)溶于50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml), 搅拌30分钟, 室温下减压蒸发反应混合物, 残留物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 该溶液用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液洗涤2次, 经MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤和蒸发后, 得到淡黄色油Val-苯胺酰胺1.42g, 88%。

将DCC(1.52g, 1.0当量)加到BOC-(Bzl)-Asp(2.38g, 1.0当量)、Val-苯胺酰胺和HOBT(1.13g)的DMF(7.5ml)溶液中, 生成沉淀物, 反应物搅拌3小时, 过滤混合物, 过滤物用NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液骤冷, 收集生成的固体, 用水洗涤, 风干, 经EtOAc/石油醚重结晶, 得到无色的BOC二肽酰胺BOC-(Bzl)-Asp-Val-苯胺酰胺, m.p. 121-122 °C, 1.74g, 46%。

将BOC二肽(1.71g, 3.44mmol)溶于50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10ml), 搅拌30分钟, 室温下减压蒸发反应混合物, 残留物在醚中研制, 过滤和风干。

将NMM(0.46ml, 1.2当量)和*i*BuOCOC(0.46ml, 1.01当量)先后加到在-20 °C下经过搅拌的BOC-(CBZ)-Lys(1.33g, 3.50mmol)的DMF(10 ml)溶液中, 生成的浆料搅拌30分钟, 再先后加二肽TFA盐和NMM(0.46 ml), 搅拌反应物, 加温至室温。1小时后, 将反应混合物倒在半饱和的NaHCO<sub>3</sub>溶液(200ml)中, 生成无色的固体, 收集这些固体后风干, 经EtOAc/*i*-Pr<sub>2</sub>O重结晶, 得到BOC三肽酰胺2.05g, 78%, m.p. 164-167 °C。

将BOC三肽酰胺(2.00g, 2.63mmol)溶于50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6ml)中, 搅拌30分钟, 室温下减压蒸发反应混合物, 过滤和风干后, 得到TFA盐。

将NMM(0.35ml, 1.2当量)和*i*BuOCOC(0.35ml, 1.01当量)先后加到-20 °C下经过搅拌的(CBZ)<sub>3</sub>Arg(1.52g, 2.63mmol)的DMF溶液中, 生成的浆液搅拌30分钟, 先后加入NMM(0.35ml)和TFA盐。反应物加温至室温1小时, 将温和物倒入NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液中, 过滤生成的固体, 用水洗涤, 风干, 在热EtOH中研制, 得到被护四肽BOC-(CBZ)-Lys-(Bzl)-Asp-Val-苯胺酰胺2.55g, 78%。

将钯黑(0.95g)加到四肽(2.30g, 1.89mmol)的三氯乙醇(50ml)和

甲酸 (97%, 5ml) 搅拌浆液中, 剧烈搅拌反应物, 1小时后, 溶液经硅藻土过滤, 用水洗涤, 过滤物在减压下部分蒸发, 残留物风干后, 得到 0.89g 无色固体。

肽粗制品在SPC-25 Sephadex ( $2.6 \times 89\text{cm}$ 柱, 0.1-0.3M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH5, 梯度: 100ml/h流速, 15ml/部分, 206nm 检测器) 上纯化, 合并 253-285 部分, 冻干后得到680mg Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺。

氨基酸分析: Arg, 1.00; Lys, 0.98; Asp, 1.00; Val, 1.01, 肽含量100%。

薄板层析 (250  $\mu$ 硅胶G):

$$R_f(\text{I}) = 0.42 \quad (\text{EtOAc}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{Pyr}/5:1:3:5)$$

$$R_f(\text{II}) = 0.32 \quad (\text{n-BuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{EtOAc}/1:1:1:1)$$

$$R_f(\text{III}) = 0.54 \quad (\text{n-BuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{Pyr}/15:3:12:10)$$

实施例8: 生物活性: 环GMP 测定

此实施例是测定本发明肽与完整CEM 细胞的细胞膜受体的结合能力, 并且如人 thymopentin 一样, 有选择地刺激产生环GMP 的能力。

CEM 细胞系由美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, Md.) 得到。将CEM 细胞进行接种, 培养 3天后收集, 其方法如T. Audhya等所述 (Arch. Biochem. Biophys., 234: 167-177, 1984)。细胞在PBS 中洗涤 3 次, 再悬浮在浓度为  $1.0 \times 10^7$  细胞/毫升的RPMI 1640 中, 在  $37^\circ\text{C}$  下平衡30分钟, 加入试验肽 (25  $\mu\text{l}$ ) 和对照肽, 在震荡水浴中保温处理 4-5 分钟, 最后加1ml 冰冷却的TCA (10%)。

在TCA 中的细胞均匀后超声处理, 使环状核苷酸释放出来。在  $4^\circ\text{C}$  和  $3000\text{xg}$  下, 悬浮液离心20分钟, 将生成的沉淀物溶于0.1N NaOH 中, 测定蛋白质含量。上清液用5ml 水饱和  $\text{Et}_2\text{O}$  溶液提取 4次, 除去TCA。在最后一次提取后, 残留的少量醚通过在  $50^\circ\text{C}$  水浴中加热10分钟除去。

冻干后再将样品置于50mM乙酸盐缓冲液(pH6.2)中,用于环GMP的放射性免疫测定。

由1-1000微克肽/毫升的剂量响应曲线测定各个化合物。图1给出活性肽的典型剂量响应曲线(6个实验的综合)与CEM细胞中thymopentin和无活性肽的对比。所述活性肽系Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺, Arg-Lys-Asp-Val-苯胺酰胺, Arg-Lys-Asp-Val-环己基酰胺, Arg-Lys-Asp-Val-吡啶酰胺和Arg-Lys-Asp-Val-苯酰胺。所述无活性肽系Arg-Lys-Asp-Val-二甲酰胺和Arg-Lys-Asp-Val-2-萘酰胺。由此测定各试验肽的阈活性。这个测定限定了诱导环GMP细胞内的量大于对照2个标准离差为试验肽的最低浓度。对照的细胞内环GMP值低于0.9微微摩尔/毫升(平均±标准离差)。如果环GMP的量大于同样的负对照所测定的值2倍,则试验结果被认为是正结果。活性肽的活性阈值范围为1-10 μg/l。

环GMP测定的结果示于图1,其中给出所述本发明的肽与thymopentin和对照肽的对比关系。这些结果证明本发明肽在刺激CEM细胞中T细胞抑制基因活性方面所具有的生物活性。

#### 实施例9: 酶的稳定性

为了说明本发明肽对肠道酶和血清酶降解的稳定性,可将典型的肽Arg-Pro-Asp-Val-异丙酰胺在37°C下置于老鼠肠液和血清中培养到120分钟。类似对比处理所用的肽,例如有Arg-Lys-Asp-Val-二甲酰胺和thymopentin。HPLC期望证明Arg-Lys-Asp-Val-二甲酰胺仅在几秒钟后就被完全消化,在这种条件下,thymopentin大约20秒钟降解50%。本发明的肽期望在血清和肠液中基本上保持不降解,显然thymopentin或对照肽排除在外。

#### 实施例10: Arg-Lys-Asp-Val-甲酰胺的合成

A. N<sub>α</sub>-叔丁氧羰基-(N-苄氧羰基)-精氨酸基-(β-苄基)天冬氨酸

### 基- 缬氨酸甲酰胺

将3.21g N - 叔丁氧羰基-(N-苄氧羰基)(赖氨酸基-( $\beta$ -苄基)天冬氨酸基-缬氨酸苯乙酮酯溶于50ml 50%乙酸中，加入锌粉5.2g，混合物剧烈搅拌1小时，过滤反应混合物，用水稀释过滤物，再用乙酸乙酯提取3次，合并有机相，用水和氯化钠饱和溶液提取，然后用无水硫酸镁干燥。除去溶剂，残留油中先后加醚和己烷，产生胶质沉淀物，用己烷研制至呈白色干固体，得到产物1.75g；再将其溶于14ml乙酸乙酯和1ml二甲基甲酰胺中。

在将溶液骤冷至 $-20^{\circ}\text{C}$ 后，加入0.30ml N-甲基吗啉，然后再滴入0.36g 氯甲酸异丁酯。反应混合物在 $-15^{\circ}\text{C}$ 下比较20分钟后，加入0.29ml N-甲基吗啉和0.18g 盐酸甲胺的乙醇(10ml, 95%)冷冻溶液，生成稠密的沉淀物，加入5ml DMF，以便于搅拌，该混合物在 $0^{\circ}\text{C}$ 下搅拌90分钟后，再在室温下搅拌30分钟。将反应混合物加到75ml水中。

在搅拌混合物时，有机相呈珠形蜡状固体。固体过滤后用乙酸乙酯提取过滤物。将有机相蒸发后得到残留物与固体产物合并，经乙酸乙酯-异丙醚结晶，得到产物1.53g，m.p.183.5-184.5 $^{\circ}\text{C}$ 。元素分析：C:61.57(61.96)，H:7.21(7.37)，N:9.81(10.04)。

### B.三苄氧羰基-精氨酸基-(N-苄氧羰基)精氨酸基-( $\beta$ -苄基)天冬氨酸基-缬氨酸甲酰胺

将50ml 50%三氟乙酸的二氯甲烷溶液加到1.46g 上述A部分的产物中，搅拌25分钟后，蒸去溶剂，再把醚加到残留物中，生成白色固体，过滤后用醚洗涤。

将1.33g 三苄氧羰基-精氨酸溶于10ml DMF中，溶液冷冻至 $-20^{\circ}\text{C}$ ，再先后加入0.25ml N-甲基吗啉和0.31g 氯甲酸异丁酯的DMF(2ml)溶液。混合物在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下搅拌20分钟，再加0.26ml N-甲基吗啉和三肽三氟乙酸盐的DMF(10ml)冷冻溶液，在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $-10^{\circ}\text{C}$ 下搅拌混合物30分钟，

再在室温下搅拌过夜。16小时后，将混合物加到125ml 水中。过滤收集沉淀物，用温甲醇和乙酸乙酯洗涤，得到1.74g 产物，m.p.118-120 °C。氨基酸分析：Asp, 0.99; Val, 1.03; Tyr, 0.99; Lys, 0.98; Arg, 1.00; 肽含量67.7%。

### C. 精氨酰基-赖氨酰基-天冬氨酰基-缬氨酸甲酰胺

通过2ml 甲酸和1g 钨黑的三氟乙醇(40ml)溶液的还原作用，对上述1.72g B 部份产物进行去保护。混合物在具塞烧瓶中快速搅拌1.5 小时，用硅藻土滤去钨，通过旋转式汽化除去过滤物中的大部分三氟乙醇。残留物用5%乙酸稀释，冻干后得到676mg 产物。

肽通过在SP-Sephadex 的  $2.6 \times 85\text{cm}$  柱上进行层析纯化，洗脱用梯度为0.20-0.50N的 $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH5.5, 3升，进行部份收集，每份10ml，在206nm 上检测，主峰值出现在185-220 部分上，取3 段即：185-190, 191-205和206-220, 冻干后分别得到21mg, 497mg 和235mg。第一段含有杂质，其他两段的纯度超过99.5%。

HPLC, u-Bondapak  $\text{C}_{18}$ : rt=8.5 分钟，用0.01M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH5, 2.0ml/min。

氨基酸分析：Asp, 1.01; Val, 0.95; Lys, 1.01, Arg, 1.02; 肽含量56%。

薄板层析 (硅胶60):

$$R_f = 0.19 \text{ (n-BuOH:HOAc:H}_2\text{O:吡啶/15:3:12:10)}$$

$$R_f = 0.15 \text{ (EtOAc:pyr:H}_2\text{O/5:5:1:3)}$$

$$R_f = 0.45 \text{ (TFA:NH}_4\text{OH/2:1)}$$

### 实施例11: Arg-Lys-Asp-Val-丙酰胺的合成

#### A. $\alpha$ -BOC- $\epsilon$ -(CBZ)-Lys-( $\beta$ -Bzl)Asp-Val

将酸腐蚀过的锌粉(12.4g) 加到室温下经快速搅拌过的  $\alpha$ -BOC-

$\epsilon$ -(CBZ)-Lys-( $\beta$ -Bzl)Asp-Val 苯乙酮肟(8.02g, 10.0mmol) 的85% HOAc(100ml) 溶液中, 1 小时后, 过滤反应物, 真空蒸发过滤物, 生成的油状残留物在Et<sub>2</sub>O中研制, 收集生成的固体, 用Et<sub>2</sub>O和水洗涤, 在40℃下真空干燥, 得到产物4.95g, 72%。

B.  $\alpha$ -BOC-  $\epsilon$ -(CBZ)Lys- ( $\beta$ -Bzl)-Asp-Val-NHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

将NMM (170  $\mu$ l, 1.06 当量) 和iBuOCOC(195  $\mu$ l), 1.03当量) 加到在 -15℃ 经过搅拌的BOC 三肽(1.00g, 1.46mmol) 的THF (5ml) 溶液中, 生成的暗油溶液搅拌15分钟后, 再加入2-丙胺(150  $\mu$ l, 1.1当量)。将反应物加温至-5℃, 生成胶凝状固体后, 再加至室温。16小时后, 在30℃下真空蒸发反应物。固体残留物用10% 柠檬酸、水、NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液和水洗涤, 风干后得到无色BOC 三肽酰胺2.58g, 55%。

C. (CBZ)<sub>3</sub> Arg-  $\epsilon$ -(CBZ)Lys-( $\beta$ -Bzl)Asp-Val-NHCH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

将BOC 三肽酰胺(0.55g, 0.76mmol) 溶于4.4M HCl 二噁烷(5ml), 搅拌45分钟, 真空蒸发溶液, 固体在Et<sub>2</sub>O中研制, 过滤得到无色HCl 三肽酰胺0.51g, 100%。

将NMM(92  $\mu$ l, 1.1当量) 加到室温下经过搅拌的HCl 三肽酰胺、(CBZ)<sub>3</sub> Arg-对硝基苯酯(0.53g, 1.0 当量) 和HOBt (0.12g, 1.0当量) 的DMF(5ml) 溶液中, 在16小时内缓慢生成沉淀物。加NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液搅拌胶凝状反应混合物, 过滤后固体残留物用水、10% 柠檬酸、水和Et<sub>2</sub>O洗涤, 生成的被护四肽酰胺经1 HOAc/EtOAc重结晶, 得到无色固体743 mg, 83%。

D. Arg-Lys-Asp-Val-NHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

将被护四肽(0.70g, 0.59mmol) 与90% HOAc(50ml)混合, 混合物用N<sub>2</sub>冲洗, 装载10% Pd/C(0.4g)。在帕尔震荡装置(250ml容器, P. -52.0 psi)中氢化64小时, 用0.45  $\mu$ 尼龙滤器过滤, 部份蒸发和冻干后, 得到四肽粗制品385g。

肽粗制品在CM Sephadex (2.6×93cm柱, 1.7升, 0.2M, 再用0.3M NH<sub>4</sub>OAc, 非缓冲; 100ml/h 流速, 10ml/部分, 225nm 检测器) 上纯化, 合并335-370 部分, 冻干后得到产物231mg。

氨基酸分析: Arg, 1.00; Lys, 1.02; Asp, 0.98; Val, 1.00; 含肽量80.3。

薄板层析(250 μ, 硅胶G):

$$R_f = 0.24 \text{ (n-BuOH:HOAc:H}_2\text{O:EtOAc/1:1:1:1)}$$

$$R_f = 0.52 \text{ (n-BuOH:HOAc:H}_2\text{O:吡啶/15:3:12:10)}$$

$$R_f = 0.61 \text{ (EtOAc:HOAc:H}_2\text{O:吡啶/5:1:3:5)}$$

实施例12: N-乙酰基-Arg-Pro-Asp-Val-N-甲酰胺的合成

将4.5M HCl二噁烷(10ml)加到Aoc (Tos)Arg-Pro-(β-Bzl)Asp-Val NH<sub>3</sub> (1.50g, 1.75mmol)中, 反应物经蒸发后用水稀释, 冻干后得到无色粉末固体HCl 四肽1.38g, 99%。

将固体溶于DMF (10ml), 加入DIEA (1.4ml, 4当量)、DMAP(0.11g)和Ac<sub>2</sub>O(1.0ml), 1小时后反应混合物用10% 柠檬酸处理, 生成的固体过滤后用水洗涤, 风干, 在热EtOAc 中研制, 得到被护乙酰基四肽1.42g, 100%。

该固体在 0℃下用HF/ 苯甲醚(30ml/8ml)经60分钟裂开, 残留物与EtOAc 混合成浆状, 用10% HOAc(50ml)提取2次, 水提取物冻干后得到Ac-Arg-Pro-Asp-Val NHCH<sub>3</sub>。

肽粗制品在DEAE Sephadex (2.6×90cm柱, 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 非缓冲; 100ml/h 流速, 10ml/部分, 206nm 检测器) 上纯化, 合并32-40 部分, 冻干后得到345mg, 32%。

氨基酸分析: Arg, 0.98; Pro, 0.97; Asp, 1.00; Val, 1.05; 含肽量87.0。

薄板层析(250  $\mu$ 硅胶G):

$$R_f = 0.39 \text{ (n-BuOH:HOAc:H}_2\text{O:EtOAc/1:1:1:1)}$$

$$R_f = 0.56 \text{ (n-BuOH:HOAc:H}_2\text{O:吡啶/15:3:12:10)}$$

$$R_f = 0.76 \text{ (EtOAc:HOAc:H}_2\text{O:吡啶/5:1:3:5)}$$

上述实施例仅是为了说明,并非限制在权利要求书中提出的本发明的范围。

TP-5 标准曲线

图 1

- |                           |       |
|---------------------------|-------|
| <i>Arg-Pro-Asp-Val-</i>   | 异丙酰胺  |
| <i>Arg-Lys-Asp-Val-2-</i> | 萘酰胺   |
| <i>Arg-Lys-Asp-Val-</i>   | 苯胺酰胺  |
| <i>Arg-Lys-Asp-Val-</i>   | 二甲基酰胺 |
| <i>Arg-Lys-Asp-Val-</i>   | 苯酰胺   |
| <i>Arg-Lys-Asp-Val-</i>   | 哌啶酰胺  |
| <i>Arg-Lys-Asp-Val-</i>   | 环己基酰胺 |

