



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91111723.7

[51] Int.Cl⁵

C07K 9/00

[43] 公开日 1992 年 7 月 15 日

[22] 申请日 91.12.21

[30] 优先权

[32] 90.12.21 [33] YU [31] P2424/90

[71] 申请人 普利瓦药物、化学、食品和化妆品工业公司

地址 南斯拉夫克罗地亚

[72] 发明人 朱德吉卡·节法考维克 B·弗拉尼斯
J·托马塞为克 I·核萨克
B·拉德斯克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部
代理人 黄革生

A61K 37/02

说明书页数: 12 附图页数:

[54] 发明名称 叔丁氧羰基-L-酪氨酸-肽聚糖单体及其¹²⁵I-标记的衍生物,其制备方法和应用

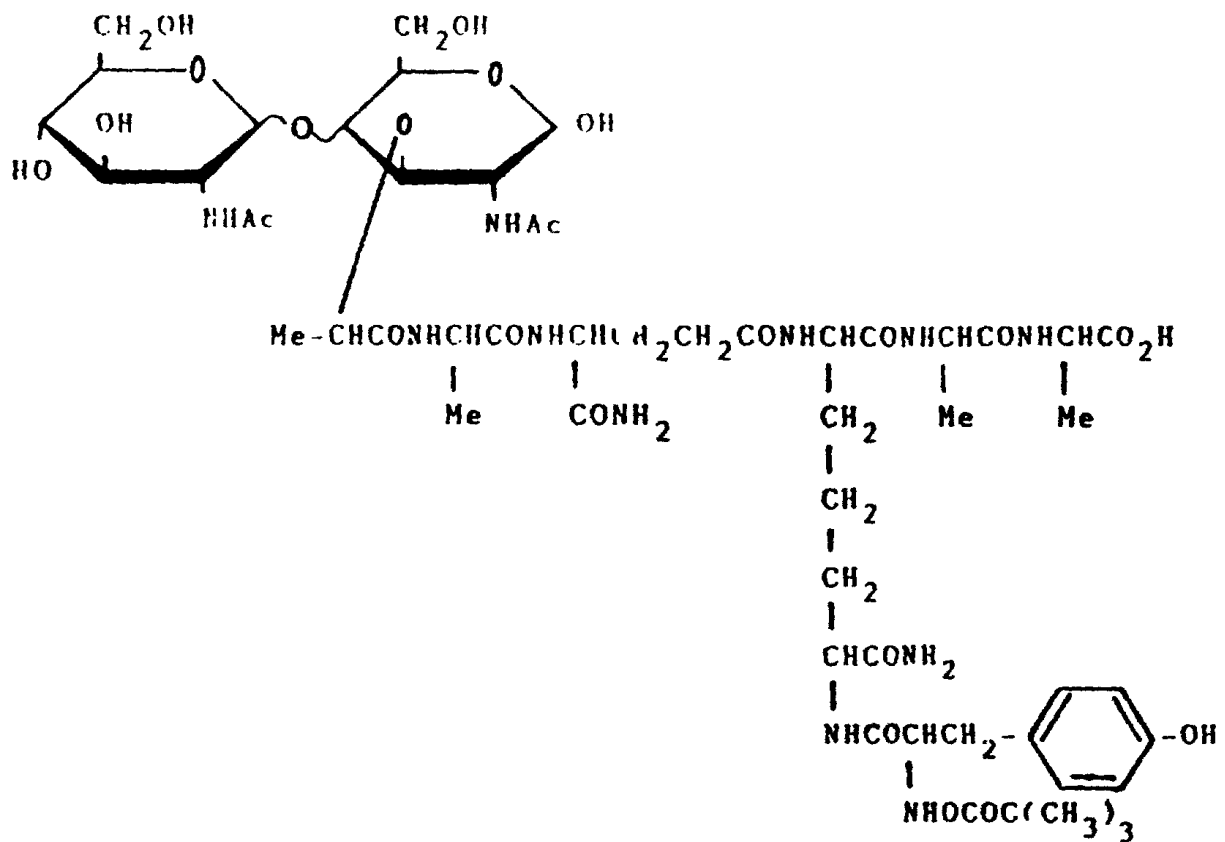
[57] 摘要

本发明涉及新的叔丁氧羰基-L-酪氨酸-肽聚糖单体及其¹²⁵I-标记的 Boc-Tyr-PGM 衍生物;还涉及其制备方法以及其作为具有免疫刺激作用和抗肿瘤活性的药物的应用。

<20>

权 利 要 求 书

1. 下式的叔丁氧羰基—L—酪氨酰—肽聚糖单体及其
¹²⁵I—标记的衍生物(¹²⁵I—Boc—Tyr—PGM)



2. 一种制备权利要求 1 的式(I)叔丁氧羰基-L-酪氨酰-肽聚糖单体的方法,其特征在於将叔丁氧羰基-L-酪氨酰-N-羟基琥珀酰亚胺基酯在三乙胺存在下与未保护的肽聚糖单体缩合,然后将所得的叔丁氧羰基-L-酪氨酰-肽聚糖单体(Boc-Tyr-PGM)先在 *Sephadex G-25* 上通过凝胶层析、接着在硅胶柱上通过柱层析以及在 *Biogel p-2* 上通过层析分离。

3. 根据权利要求 2 的方法,其特征在於通过加入 $\text{Na}[\text{}^{125}\text{I}]$ 和 氰胺 *T* 用 ^{125}I 标记 Boc-Tyr-PGM,并在加入亚硫酸钠终止反应后,在 *Sephadex G-25* 柱上分离产物(用磷酸盐缓冲液洗脱)。

4. 叔丁氧羰基-L-酪氨酰-肽聚糖单体作为药物的应用。

5. 叔丁氧羰基-L-酪氨酰-肽聚糖单体作为具有免疫刺激作用的药物的应用。

6. 叔丁氧羰基-L-酪氨酰-肽聚糖单体作为具有抗肿瘤活性的药物的应用。

说 明 书

叔丁氧羰基—L—酪氨酰—肽聚糖单体及其

^{125}I —标记的衍生物,其制备方法和应用

本发明涉及叔丁氧羰基—L—酪氨酰—肽聚糖单体及其 ^{125}I —标记的衍生物,还涉及其制备方法以及本发明新化合物在药理学上的应用。已证明叔丁氧羰基—L—酪氨酰—肽聚糖单体在药理学上尤其具有免疫调节和抗肿瘤的作用,而新的 ^{125}I —标记的衍生物显示出抗 PGM 抗体结合作用。

已发现,作为叉开短杆菌细胞壁肽聚糖最小重复单元的肽聚糖单体(PGM, $\text{GlcNAc}-\beta-(1-4)-\text{MurNAc}-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{iGln}[(\text{L})-\text{meso}-\text{Azpm}-(\text{D})-\text{amide}-(\text{L})-\text{D}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}])$)具有免疫刺激、抗肿瘤和抗转移作用(Tomasic, J. and Hrsak, I. (1988), *peptidoglycan monomer originating from Breviacterium divarccatum—its metafalism amd fyvological actiivities in the host*, in: *Surface Structuie of Microorganisms and Their Interaction with the Mammalian Host* (Schuinner, E, Richhmond, M. H., Seibert, G and Schwartz, U., Eds.), p113—121, VCH Verlagsge-

sellschabt, Weinheim)。

也已知道,在氨基酸满足下列条件的情况下可形成肽键:

a)首先通过加入所谓的保护基将其转化为 *N*-保护的氨基酸,

b)在羧基上被活化,

c)与 *C*-末端被保护的氨基酸、二、三或多肽发生反应,及

d)通过特定的反应小心地除去所得的二、三或多肽上的保护基

(*Houben—Weyl, Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, herausgegeben Von Egon Muller, Synthese Von Peptidon I und II, Bd 1511 und 1512, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974*)。

而且,在具有很复杂结构的多官能团分子,如由二糖戊肽(糖和肽残基)组成的肽聚糖单体中,还必须

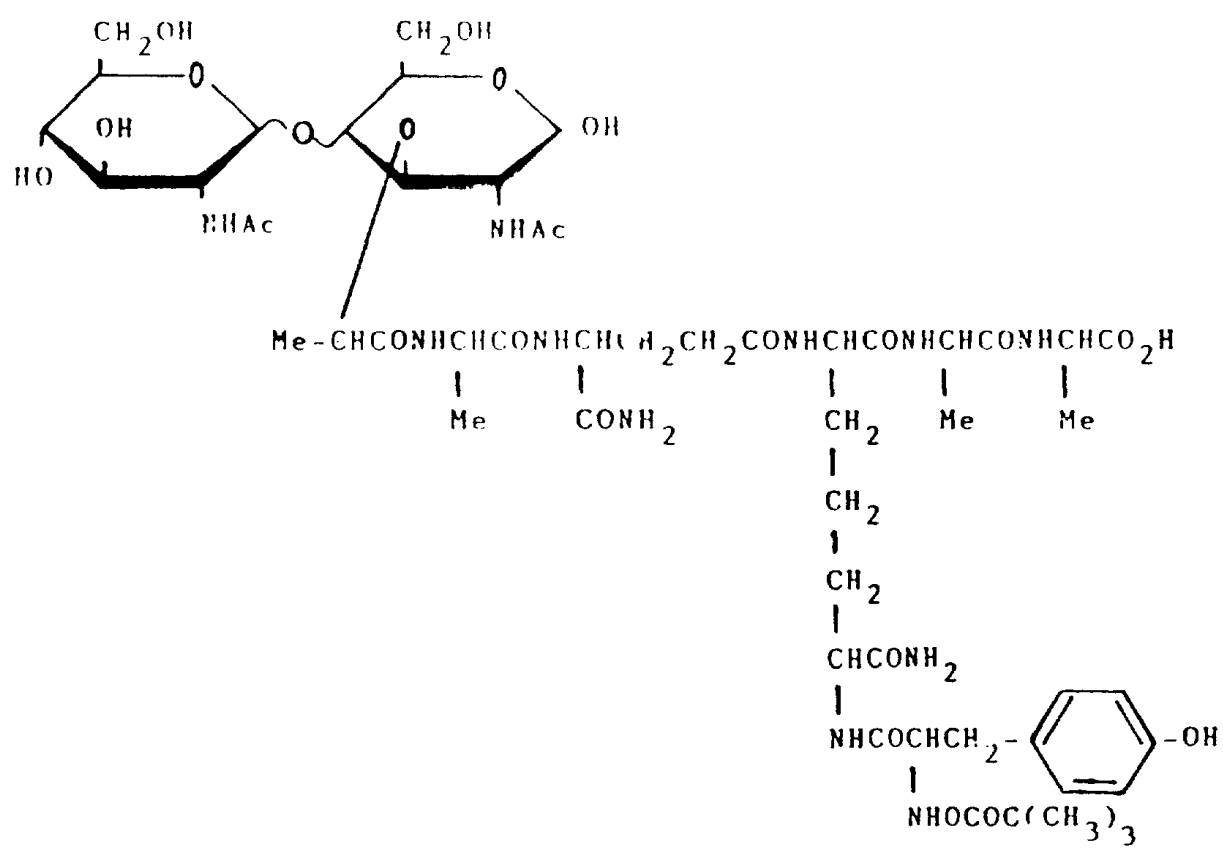
a)保护 *GlcNAC* 和 *MurNAC*(分子的糖部分)上的羟基,及

b)在形成肽键的反应完成之后脱去糖基上的保护基。

并且还知道,将酪氨酸插入肽或蛋白质的常规方法是“活性酯法”,其中 *Boc-L-Tyr-ONSu* 是酰化成分(*Assoian, R. R. (1980) Anal. Biochem, 103, 70*)。

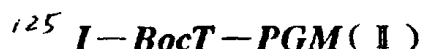
对潜在的具有免疫刺激作用和抗肿瘤活性的新物质的不断增长的需求导致了本发明的构思。它涉及的是式 *I* 的叔丁氧羰基-*L*-酪氨酰-肽聚糖单体 (*Boc-Tyr-PGM*) 新物质及其 ¹²⁵ *I*

一标记的衍生物。



I

新的肽聚糖单体(I)有可能提供一种亲脂性得到提高的化合物,它使得该物质易于透过细胞壁并延长其在生物体内的残留时间。这一效果是通过向 PGM 分子中加进一个天然芳香族氨基酸酪氨酸而获得的。在加入酪氨酸之后,由二糖戊肽得到了二糖己肽(Boc—Tyr—PGM),再用放射性 ^{125}I 标记后就得到了其衍生物



在制备新的肽聚糖单体衍生物的方法方面,所使用的是肽化学领域的已知方法;但在合成过程中,首次使用了完全未被保护的具有非常复杂结构的分子。

制备本发明新的 PGM 衍生物的方法可用下面的反应路线表示:



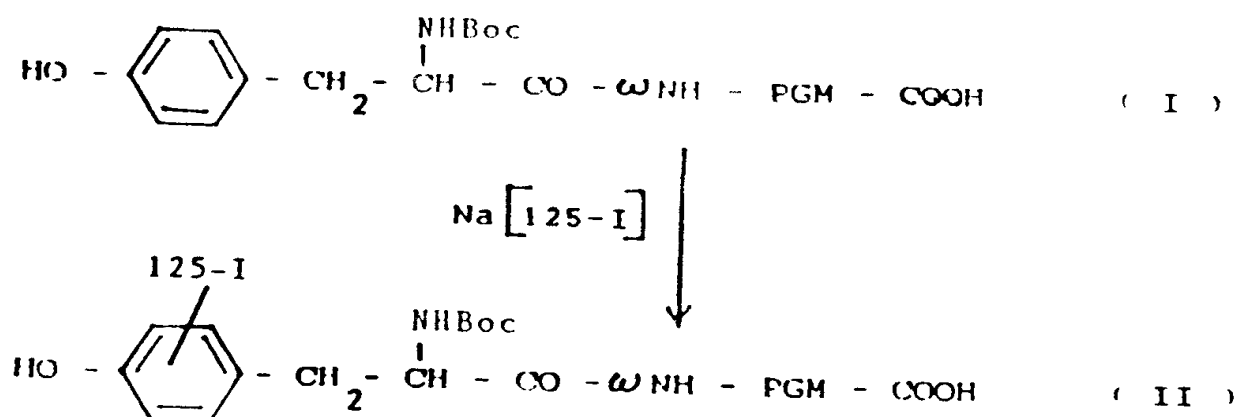
按照本发明,是在三乙胺存在下将 Boc—Tyr—ONSu 与 PGM 分子中内消旋二氨基庚二酸上的 ω -氨基进行区域选择性反应,产生新的二糖—己肽衍生物,然后首先在 Sephadex G—25 柱、接着在硅胶柱上通过凝胶层析分离,最后通过在 Biogel p—2 上进行凝胶层析完全纯化并用于生物研究。

Boc—Tyr—PGM 的放射性碘标记可用标准的 T 氯胺法

(Bolton , AA . E . (1985) ,in: *Radioiodination Techniques* , Second Edition , p109 , Amersham Int. plc. england)完成。

通过在酪氨酸羟基的邻位上进行苯酚环的亲电子取代反应,可获得具有高比活性和足够的放射化学稳定性的 ^{125}I —标记的分子。

以下反应路线代表了制备方法,



按照本发明,放射性碘标记的 *Boc-Tyr-PGM* 的合成是通过标准的 *T* 氯胺法利用 $\text{Na} [^{125}\text{I}]$ 来完成,得到碘化的产物 II,然后通过 *Sephadex G25* 柱上的凝胶层析分离,并用于抗原—抗体

结合反应的检查。

新的 PGM 衍生物二糖己肽可用在具有免疫调节和抗肿瘤活性的药物中,而新的 ^{125}I -标记的衍生物可用在具有抗 PGM 抗体结合作用的药物中。

下面通过实施例说明本发明:

实施例 1

叔丁氧羰基-L-酪氨酸-肽聚糖单体(I)

在加入三乙胺(30 μl)的情况下,将肽聚糖单体(PGM, 100mg, 0.1mmol)溶于无水二甲基甲酰胺(DMF, 2.6ml)。然后在搅拌下,将固体 Boc-Tyr-ONSu(56mg, 0.12mmol)分批加至(冰-水)冷却的溶液中。于室温反应 16 小时,然后利用机械泵产生的真空蒸发 DMF。将粘稠的浆状蒸发残渣溶于水,用固体柠檬酸酸化至 pH3,并用乙酸乙酯(3 $\times$ 10ml)萃取。将水溶性部分浓缩至 2ml,并装入水中的 Sephadex G-25 柱(90 $\times$ 2.5cm)上。通过 230nm 处的吸收分析各级分(3ml),并合并和蒸发对应于高分子量化合物的级分。将所得玻璃状残渣(110mg)溶于正丁醇、乙醇、NH₃(25%)和水(5:3:2:2)的混合物中,并利用相同的洗脱液在硅胶柱上层析,用 HOAc 中和并蒸发后得到产物,最后通过 Biogel P-2 柱(70 $\times$ 2.5cm)上的凝胶层析纯化(用水洗脱)。合并流动性最强的组分,浓缩并冻干。得到 58mg(46%)纯的 Boc-Tyr-PGM(I)。

氨基酸分析:GlcNH₂ 0.82;MurNH₂ 0.57;Ala, 3;

Glu, 1; *A₂pm* 0.98; *Tyr*, 0.80。

***H*-NMR 谱(*D₂O*):**

1.29 (s, Me₃C), 1.34-1.70 (m, partial overlapping with Me₃C, 21 H, 3 × Me-Ala + lactoyl-Me), 1.89 and 1.98 (2s, 6 H, 2 × NAc), 6.77 and 7.07 (2d, 2 H each, I_{H,H} 8.55 Hz, -C₆H₅-)

薄层层析: 正丁醇-乙醇-NH₃(25%) - 水(5:3:2:2), 用碘蒸气和肽反应物检测,

R_f = 0.5。

实施例 I

叔丁氧羰基-[¹²⁵I]-L-酪氨酰-肽聚糖单体(II)

向 *Boc-Tyr-PGM* (5μg) 的磷酸盐缓冲液 (25μ, 0.5M, pH7.5) 溶液中加入 Na[¹²⁵I] (10μl, 3.7 × 10⁶ Bq, 1mCi) 和氯胺 T (50μg) 的磷酸盐缓冲液 (25μl, 0.25M, pH7.5)。45 秒钟后, 加入焦亚硫酸钠 (50μg) 的 25μl 水溶液以终止反应。然后将反应混合物装入预先用人白蛋白溶液洗过并用 0.025M 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) (它也用于洗脱) 平衡过的 *Sephadex G-25* 柱 (30 × 1.5cm) 上。取 2ml 各级分样品测试放射性, 并合并对应于 *Boc*-[¹²⁵I]-L-Tyr-PGM 的级分。所得衍生物 II 的比活性约 3.12MBq/

$\mu\text{g}(0.087\text{mCi}/\mu\text{g})$ 。

实施例 II

叔丁氧羰基-L-酪氨酸-肽聚糖单体 (*Boc-Tyr-PGM*) 的
免疫刺激活性

在绵羊红细胞(绵羊红血细胞, *SRBC*)免疫过的小鼠中测试
Boc-Tyr-PGM 的免疫刺激活性。

通过腹膜注射,用绵羊红细胞 ($1 \times 10^8 \text{SRBC}$) 的 *Hank* 氏溶液
免疫每组 5 只的小鼠(*CBA* 或 *AKR*)。第二天(+1 天),通过静脉注
射仅给对照小鼠服用 *Hank* 氏溶液,而试验小鼠则通过静脉注射
服用 $200\mu\text{g}$ *Boc-Tyr-PGM* 的 *Hank* 氏溶液;用作阳性对照的一
组小鼠则通过静脉注射服用 $200\mu\text{g}$ 肽聚糖单体(*PGM*)的 *Hank* 氏
溶液。四天后(+4 天),利用 *Gerne* 的技术(*Jerne, N. K. Nordin*,
A. A., and *Henry, C.* (1963), *The agar plaquel techniquel por*
recognizcing antibody producing cells ; in: "Cell Bound
Antibodies", p109, *Wistar Institute Press, Philadalphia*),测定脾中
抗体形成细胞(噬斑形成细胞, *PFC*)的数目。

试验结果列于表 1

表 I

鼠系	处 理	PFC		
		个体值范围	X	%
C B A	Hanks'	95,200 - 238,000	188,906	100
	Boc-Tyr-PGM	257,600 - 304,266	295,866	157
	PGM	198,800 - 449,866	313,413	166
A K R	Hanks'	20,000 - 55,200	37,388	100
	Boc-Tyr-PGM	31,730 - 68,670	55,974	150
	PGM	27,200 - 61,070	48,668	130

Boc-Tyr-PGM 证实了两个鼠系 中的免疫刺激(辅助)活性,测得的 *PFC* 数与对照组相比提高约 50%。两个试验中 *Boc-Tyr-PGM* 的效力均可与阳性对照 (即肽聚糖单体)的效力相比。

实施例 IV

叔丁氧羰基-L-酪氨酰-肽聚糖单体 (*Boc-Tyr-PGM*) 的抗肿瘤(抗转移)活性

对 *Boc-Tyr-PGM* 的抗肿瘤活性的研究是在接种了黑素瘤 *B-16* 的小鼠中进行。

在 0 天,给每组 5 只的每只小鼠(*C57BL/6*, 雄性, 4 月龄)静脉注射 1×10^5 个黑素瘤细胞。

选择其中一组作为对照,不经任何其它处理。

按照以下方案对实验组的每只小鼠静脉注射 *1mg Boc-Tyr-PGM*:

第 1 组——第 3 天

第 2 组——第 7 天

第 3 组——第 3 天和第 7 天(共 *2mg Boc-Tyr-PGM*)

而选择对照的三组小鼠则按同样方案静脉内接受 *PGM (PLIVA)*。

于第 23 天处死小鼠后对肉眼可测的肺转移瘤进行计数,所得结果列于表 II。

表 2

处 理	天 数	X 数	转 移 瘤 %	抑 制 %
Hanks'		12.4 ± 6.1	100	
Boc-Tyr-PGM	3	7.6 ± 1.9	61.3	38.7
	7	7.2 ± 4.0	58.1	41.9
	3 + 7	7.0 ± 2.7	56.4	43.6
PGM (PLIVA)	3	6.2 ± 4.4	50.0	50.0
	7	5.4 ± 1.7	43.5	66.5
	3 + 7	5.3 ± 1.7	42.7	67.3

用 *Boc-Tyr-PGM* 进行处理引起抗转移作用,导致所有处理小鼠组中转移瘤数目的减少(抑制率为 37.8%—43.6%)。在不同时间(第 3 天或第 7 天)用不同总剂量(第 3 天和第 7 天各接受 1mg 或第 3 天和第 7 天共接受 2mg)处理的小鼠中未观察到明显的抑制差别。

Boc-Tyr-PGM 的效果可与用作阳性对照的 *PGM(PLIVA)* 的效果相比。