

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 7/08
A61K 38/10

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94105038.6

[45]授权公告日 2000年5月3日

[11]授权公告号 CN 1052011C

[22]申请日 1994.5.12 [24]颁证日 2000.2.19

[21]申请号 94105038.6

[73]专利权人 北京医科大学

地址 100083 北京市海淀区学院路38号

[72]发明人 蔡孟深 毛峰 许家喜

易有云 程铁明

[56]参考文献

FR2603040 1988. 2. 26

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, V01 150,
NO,3 1993. 2. 1 Chuan - BO XU 等 Schistosoma
mansoni 28KDA Glutathione S - TRANSFERASE
AND I

审查员 周莉

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 血吸虫疫苗肽

[57]摘要

本发明属于有机化合物。

具有下列基本序列的多肽：

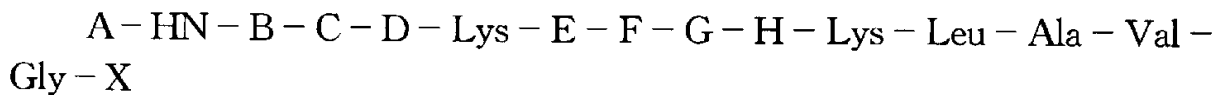
-X-Lys-Y-Lys-Leu-Ala-Val-Gly-OH

此式中 X, Y 均为氨基酸残基, 该肽对血吸虫病有保护性免疫作用, 可用于制备抗血吸虫病的疫苗类药物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种有机化合物—多肽,或其可药用盐,其特征在于化学结构如下式所示:



在上式中:

A 为氢,在这里:

B 为 $-Glu-$, $-Asp-$, $-Gln-$, $-Asn-$.

C 为 $-Ser-$, $-Thr-$.

D 为 $-Leu-$, $-Gln-$, $-Asn-$.

E 为 $-Gly-$, $-Pro-$.

F 为 $-Ser-$, $-Thr-$.

G 为 $-Thr-$, $-Ser-$.

H 为 $-Gly-$, $-Pro-$.

X 可以为下列形式:

i) $-COOH$

或 ii) $-CONHR_1$

在这里, R_1 为氢或 C_1-C_3 烷基。

2. 如权利要求 1 中所述的化合物,其特征在于

B 为 $Glu-$

C 为 $-Ser-$

D 为 $-Leu-$

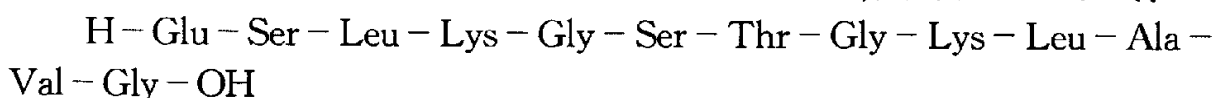
E 为 $-Gly-$

F 为 $-Ser-$

G 为 $-Thr$

H 为 $-Gly-$

3. 如权利要求 1 中所述的化合物或其可药用盐,其特征见于下式:



4. 如权利要求 1 中所述的化合物及盐,其特征在于

H - Asn - Ser - Leu - Lys - Gly - Ser - Thr - Gly - Lys - Leu - Ala -
Val - Gly - OH

H - Glu - Ser - Glu - Lys - Gly - Ser - Thr - Gly - Lys - Leu - Ala -
Val - Gly - OH

H - Glu - Ser - Leu - Lys - Pro - Ser - Thr - Gly - Lys - Leu - Ala -
Val - Gly - OH

H - Glu - Ser - Leu - Lys - Gly - Thr - Ser - Gly - Lys - Leu - Ala -
Val - Gly - OH

5. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求 1 的化合物与药物可接受的稀释剂和载体。

说明书

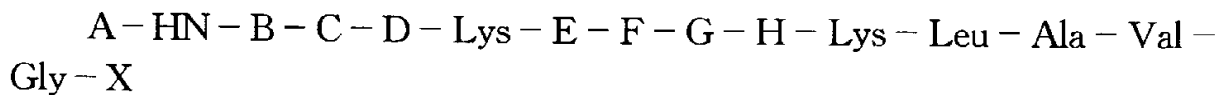
血吸虫疫苗肽

本发明属于有机化合物。

目前对血吸虫疫苗的研究主要集中在照射减弱活疫苗和可溶性抗原疫苗两方面。照射减弱活疫苗的研究历史较长,在制备和应用方面已积累了较成熟的经验,在实验室和动物实验上已取得了较好结果。但该种疫苗还存在以下有待解决的问题,(1)大量注射引起的局部炎症,(2)疫苗的安全性,如过敏反应,(3)疫苗的致病性,如灭活不完全造成的感染,(4)大规模制备疫苗时虫子的来源不足。为了避免上述缺点,人们正在积极从事合成的可溶性抗原疫苗的研究,此种疫苗的重要意义在于,可以采用人工大量合成。经人工合成的疫苗接种量小,可以减少异种蛋白的过敏反应,并可大量制备,且无灭活不完全造成的致病危险,有实际应用前景。

本发明的目的在于提供了一种可用于制备血吸虫疫苗的多肽,其优点在于用其制成的疫苗接种量小,可以减少异种蛋白的过敏反应,无灭活不完全造成的致病危险,并可以采用人工大量合成。

本发明所涉及的有机化合物—多肽,即是血吸虫可溶性抗原疫苗多肽,其特征在于化学结构如下所示:



在上式中:

A 为氢,在这里:

B 为 $-Glu-$, $-Asp-$, $-Gln-$, $-Asn-$.

C 为 $-Ser-$, $-Thr-$.

D 为 $-Leu-$, $-Gln-$, $-Asn-$.

E 为 $-Gly-$, $-Pro-$.

F 为 $-Ser-$, $-Thr-$.

G 为 $-Thr-$, $-Ser-$.

H 为 $-Gly-$, $-Pro-$.

X 可以为下列形式:

i) -COOH

或 ii) -CONHR₁

在这里, R₁ 为氢或 C₁ - C₃ 烷基。

本发明涉及的多肽可以以其自由形式存在,也可以以盐的形式或复合物的形式存在。例如可以和有机酸,高聚物酸和无机酸形成盐,这种形式的盐有盐酸盐,乙酸盐。

再如，可以和无机物，如无机盐或氢氧化物，形成象 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} 盐。也可以和高聚有机物形成复合物，以及和药物可以接受的稀释剂和载体形成的复合物。

本发明涉及的多肽可以用已知的多肽化学方法来合成及生产，如下述实施例，并且也可以用与本实施例明显等价的化学合成方法或固相合成法来合成及生产。

本发明涉及的多肽及其药物可以接受的盐和复合物在生物活性检测和动物实验中表明均有有价值的药物活性。特别是在抗血吸虫病方面，通过免疫兔子实验表明有很高的减虫率。本发明涉及的多肽在动物实验中的用量范围为0.001到100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。

实施例1

Boc-Val-Gly-OBzl

2.6g Boc-Val溶于THF中，加入少量DMF，加入1.62g HOBt搅拌溶解，冰水浴冷却，加入2.5g DCC 搅拌溶解10分钟，将2.11g Gly-OBzl·HCl溶于DMF中，加入1.14-1.18mL NMM调pH7.0-7.5，然后滴加到反应液中，搅拌过夜，过滤，除去溶剂，固体用乙酸乙酯溶解，然后用5% KHSO_4 ，5%NaCl，5% NaHCO_3 ，5%NaCl水溶液依次洗涤，有机相用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤，浓缩得固体3.96g，收率88.4%，在乙酸乙酯-石油醚(30-60)中重结晶，熔点59-61 $^\circ\text{C}$ ， $[\alpha]_D^{25} = -20^\circ$ (C=1.0, 甲醇)。

Val-Gly-OBzl·HCl

3.5g Boc-Val-Gly-OBzl溶于乙酸乙酯中，加入4N HCl/乙酸乙酯溶液，搅拌到脱保护完全，有黏稠状物析出，浓缩得油状物2.5g，收率87%。

Boc-Ala-Val-Gly-OBzl

1.6g Boc-Ala溶于THF中，加入少量DMF，加入1.2g HOBt搅拌溶解，冰水浴冷却，加入1.77g DCC搅拌溶解10分钟，将2.5g Val-Gly-OBzl·HCl溶于DMF中，加入NMM调

pH7.0-7.5, 然后滴加到反应液中, 搅拌过夜, 过滤, 除去溶剂, 固体用乙酸乙酯溶解, 然后用 5%KHSO₄, 5%NaCl, 5%NaHCO₃, 5%NaCl 水溶液依次洗涤, 有机相用无水 Na₂SO₄干燥, 过滤, 浓缩得白色固体 3g, 收率 83%, 熔点 139-141°C, $[\alpha]_D^{25} = -64^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Ala-Val-Gly-OBzl · HCl

2.5g Boc-Ala-Val-Gly-OBzl溶于乙酸乙酯中, 加入 4N HCl/乙酸乙酯溶液, 室温下搅拌到脱保护完全, 有固体物析出, 过滤得固体物 1.91g, 收率 90%, 熔点 166-168°C $[\alpha]_D^{25} = -40^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl

0.74g Boc-Leu溶于THF中, 加入少量DMF, 加入 0.45g HOBt搅拌溶解, 冰水浴冷却, 加入 0.68g DCC搅拌溶解 10分钟, 将 1.1g Ala-Val-Gly-OBzl · HCl溶于DMF中, 加入 NMM调pH7.0-7.5, 然后滴加到反应液中, 搅拌过夜, 过滤, 除去溶剂, 固体用乙酸乙酯溶解, 然后用 5%KHSO₄, 5%NaCl, 5%NaHCO₃, 5%NaCl水溶液依次洗涤, 有机相用无水 Na₂SO₄干燥, 过滤, 浓缩得白色固体 1.37g, 收率 85%, 熔点 189-191°C, $[\alpha]_D^{25} = -50^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Leu-Ala-Val-Gly-OBzl · HCl

1.1g Boc-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl溶于乙酸乙酯中, 加入 4N HCl/乙酸乙酯溶液, 室温下搅拌到脱保护完全, 有固体物析出, 浓缩得固体物 0.89g, 收率 92%, 熔点 196-198°C, $[\alpha]_D^{25} = -52^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Lys (CBZ) -Leu-Ala-Val-Gly-OBzl

1.2g Boc-Lys (CBZ)溶于THF中, 加入少量DMF, 加入 0.45g HOBt搅拌溶解, 冰水

浴冷却,加入0.68g DCC搅拌溶解10分钟,将1.5g Leu-Val-Gly-OBzl·HCl溶于DMF中,加入NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,过滤除去DCU,浓缩,固体残渣用乙酸乙酯溶解,然后用稀酸,水,稀碱,水依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩得白色固体2.15g,收率86%,熔点115-117°C, [α]¹⁸_D = -52° (C=0.5, 甲醇)。

Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl·HCl

0.85g Boc-Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl溶于乙酸乙酯中,加入4N HCl/乙酸乙酯溶液,室温下搅拌到脱保护完全,浓缩,甲醇-乙醚重结晶,得松黏透明固体物,用4:1乙酸乙酯:石油醚(30-60)为洗脱剂经硅胶柱层析得固体0.7g,收率89.4%,熔点192-194°C, [α]¹⁸_D = -40° (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Thr(Bzl)-Gly-OMe

1.85g Boc-Thr(Bzl)溶于THF中,加入少量DMF,加入0.81g HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入1.24g DCC搅拌溶解10分钟,将0.625g Gly-OMe·HCl溶于DMF中,加入NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,除去溶剂,固体用乙酸乙酯溶解,然后用5%KHSO₄, 5%NaCl, 5%NaHCO₃, 5%NaCl水溶液依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,残渣用乙酸乙酯-石油醚(30-60)重结晶得白色固体1.2g,浓缩母液又得0.81g,收率88%,熔点60-62°C, [α]²⁰_D = +34° (C=1.0, 甲醇)。

Thr(Bzl)-Gly-OMe·HCl

2g Boc-Thr(Bzl)-Gly-OMe溶于乙酸乙酯中,加入4N HCl/乙酸乙酯溶液,室温下搅拌到脱保护完全,浓缩,残渣用石油醚(30-60)重结晶得白色固体1.6g,收率96%,熔点135-137°C, [α]¹⁸_D = -8° (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-OMe

1.1g Boc-Ser(Bzl)溶于THF中,加入少量DMF,加入0.486g HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入0.74g DCC搅拌溶解10分钟,将1.0g Thr(Bzl)-Gly-OMe·HCl溶于DMF中,加入NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,除去溶剂,固体用乙酸乙酯溶解,然后用稀酸,水,稀碱,水依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩得白色固体1.67g,收率95%,熔点81-84°C, $[\alpha]_D^{25} = +4^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-OH

1.5g Boc-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-OMe溶于适量甲醇中,加入2mL 2N的KOH溶液,室温下搅拌4小时,用10%KHSO₄中和到pH=3,过滤除去残渣,浓缩得白色固体1.36g,收率93%,熔点53-55°C, $[\alpha]_D^{25} = +28^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl

230mg Boc-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-OH溶于THF中,加入少量DMF,加入70mg HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入92mg DCC搅拌溶解10分钟,将300mg Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl·HCl溶于DMF中,加入NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,浓缩除去溶剂,固体用乙酸乙酯溶解,然后用稀酸,水,稀碱,水依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩得白色固体420mg,收率85%,熔点208-212°C, $[\alpha]_D^{25} = -10^\circ$ (C=0.2, 甲醇)。

Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl·HCl

300mg Boc-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl溶于乙酸乙酯中,加入4N HCl/乙酸乙酯溶液,室温下搅拌到脱保护完全,浓缩得油状物,加入甲醇溶解,过滤,浓缩,加入乙酸乙酯得白色固体250mg,收率90%,熔点192-194°C, $[\alpha]_D^{25} = -40^\circ$ (C=0.2, 甲醇)。

Boc-Lys (CBZ)-Gly-OMe

4.5g Boc-Lys (CBZ) 溶于THF中,加入少量DMF,加入1.62g HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入2.5g DCC搅拌溶解10分钟,将1.25g Gly-OMe·HCl溶于DMF中,滴加NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,除去溶剂,固体用乙酸乙酯溶解,然后用5%KHSO₄, 5%NaCl, 5%NaHCO₃, 5%NaCl水溶液依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,残渣用乙酸乙酯-石油醚(30-60)重结晶得白色固体4.1g,收率91%,熔点76-78°C, $[\alpha]_D^{25} = -6^\circ$ (C=1.0, 甲醇)。

Lys (CBZ)-Gly-OMe·HCl

2.1g Boc-Lys (CBZ)-Gly-OMe 溶于乙酸乙酯中,加入4N HCl/乙酸乙酯溶液,室温下搅拌到脱保护完全,过滤得固体,用甲醇-乙酸乙酯重结晶得白色固体1.65g,收率92%,熔点157-159°C, $[\alpha]_D^{25} = 30^\circ$ (C=1.0, 甲醇)。

Boc-Leu-Lys (CBZ)-Gly-OMe

0.81g Boc-Leu 溶于THF中,加入少量DMF,加入0.473g HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入0.742g DCC搅拌溶解10分钟,将1.16g Lys (CBZ)-Gly-OMe·HCl溶于THF和DMF中,滴加NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,除去溶剂,固体用乙酸乙酯溶解,然后用稀酸,水,稀碱,水依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩得白色固体1.6g,收率95%,熔点78-80°C, $[\alpha]_D^{25} = -38^\circ$ (C=1.0, 甲醇)。

Leu-Lys (CBZ)-Gly-OMe·HCl

1.6g Boc-Leu-Lys (CBZ)-Gly-OMe 溶于乙酸乙酯中,加入4N HCl/乙酸乙酯溶液,室温下搅拌到脱保护完全,过滤得黏稠固体,干燥后重1.32g,收率93%,熔点77-80°C $[\alpha]_D^{25} = -10^\circ$ (C=0.6, 甲醇)。

Boc-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OMe

0.89g Boc-Ser(Bzl) 溶于THF中,加入少量DMF,加入0.41g HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入0.64g DCC搅拌溶解10分钟,将1.1g Leu-Lys(CBZ)-Gly-OMe·HCl溶于DMF中,滴加NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,除去溶剂,固体用乙酸乙酯溶解,然后用稀酸,水,稀碱,水依次洗涤,有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩得白色固体1.3g,收率80%,熔点93-95°C, $[\alpha]_D^{25} = -24^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH

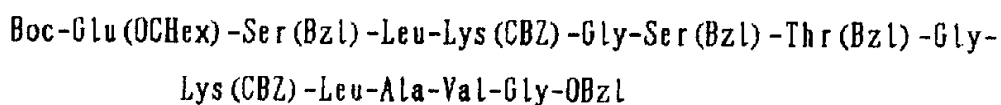
1.2g Boc-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OMe溶于适量甲醇中,加入2mL 2N的KOH溶液,室温下搅拌4小时,用10%KHSO₄中和到pH=3,过滤除去残渣,浓缩得白色固体1.12g,收率95%,熔点84-86°C, $[\alpha]_D^{25} = -36^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH·HCl

1.0g Boc-Ser-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH溶于乙酸乙酯中,加入4N HCl/乙酸乙酯溶液,室温下搅拌到脱保护完全,过滤,浓缩,残渣用乙酸乙酯--石油醚(30-60)重结晶得白色固体0.84g,收率92%,熔点123-125°C, $[\alpha]_D^{25} = -36^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。

Boc-Glu(OCHex)-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH

0.52g Boc-Glu(OCHex)溶于THF中,加入少量DMF,加入0.22g HOBt搅拌溶解,冰水浴冷却,加入0.33g DCC搅拌溶解10分钟,将0.8g Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH·HCl溶于DMF中,滴加NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,浓缩,柱层析分离得白色固体0.945g,收率84%,熔点79-80°C, $[\alpha]_D^{25} = -24^\circ$ (C=0.5, 甲醇)。



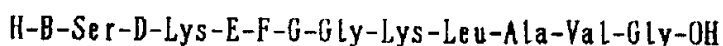
66mg Boc-Glu(OCHex)-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH溶于DMF中,加入15mg HOBT搅拌溶解,冰水浴冷却,加入16mg DCC搅拌溶解10分钟,将70mg Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl·HCl溶于DMF中,滴加NMM调pH7.0-7.5,然后滴加到反应液中,搅拌过夜,滤掉DCU,浓缩,以20:1:0.4的氯仿:甲醇:冰乙酸为展开剂硅胶柱层析分离,浓缩后再以甲醇-水重结晶得白色固体110mg,收率89%,熔点212-215°C, $[\alpha]_D^{25} = +5^\circ$ (C=0.4, 甲醇)。



在聚四氟乙烯肽脱保护装置中进行脱保护,向反应器中加入100mg Boc-Glu(OCHex)-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Gly-Lys(CBZ)-Leu-Ala-Val-Gly-OBzl, 1mL苯甲醚, 1mL苯甲硫醚,在冰水浴冷却下放入5-8mL经无水三氟化钴干燥过的氟化氢,搅拌反应45分钟,减压抽干,用冷无水乙醚洗涤,得树脂及黏稠物,10%乙酸溶液溶解,过滤去掉残渣,浓缩至2mL左右,以5%乙酸为洗脱剂在Sephadex G-15柱上纯化,纯化两次,冷冻干燥得固体45mg,收率75%, $[\alpha]_D^{25} = +30^\circ$ (C=0.1, 10%乙酸溶液)。

此肽还可以把原料Boc-Glu(OCHex)换成Boc-Glu(OBzl),不用把Boc-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OMe先皂化,而是先脱去Boc保护,然后合成Boc-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OMe,再皂化成Boc-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-Leu-Lys(CBZ)-Gly-OH继续接成十三肽。

下列多肽也可以用实施例1中给出的相似方法来合成和生产,



实施例编号	B	D	E	F	G	$[\alpha]_D^{25}$
2	Asn	Leu	Gly	Ser	Thr	-66
3	Glu	Gln	Gly	Ser	Thr	-87
4	Glu	Leu	Pro	Ser	Thr	-82
5	Glu	Leu	Gly	Thr	Ser	-72

缩写词语表

Ala	丙氨酸
Asn	天冬酰胺
Boc	叔丁氧羰基
Bzl	苄基
CBZ	苄氧羰基
CHex	环己基
DCC	N,N'-二环己基碳二亚胺
DCU	N,N'-二环己基脲
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
Gln	谷氨酰胺
Glu	谷氨酸
Gly	甘氨酸
HOBt	1-羟基苯并三氮唑
Leu	亮氨酸
Lys	赖氨酸
Me	甲基

NMM	N-甲基吗啡林
Pro	脯氨酸
Ser	丝氨酸
THF	四氢呋喃
Thr	苏氨酸
Val	缬氨酸