

环状多肽的合成

多肽药物在治疗上的重要性,越来越引起广大药学工作者的重视。根据肽链的构成可将多肽分为同聚肽(Homomeric)和杂聚肽(Heteromeric)两大类,前者完全由氨基酸组成,后者是由氨基酸部分和非氨基酸部分组成的,如糖肽。根据肽键的结构又分为直链肽和环肽。其中直链肽的研究最为广泛和深入,尤其在直链肽的合成技术方面无论是液相法还是固相法都已成熟。虽然许多直链肽体外具有很好的生物活性和稳定性,但是进入体内后活性很快消失。因为体内环境复杂,存在各种各样的酶。直链肽在酶的作用下很快降解,导致活性丧失。另外,直链肽在液相里的构象柔性使得不大容易符合受体的构象要求。这些不利因素造成多肽药物仍有许多问题有待解决。为了得到生物活性优秀半衰期长,受体选择性高的多肽,文献报道过很多多肽改造的方法,其中包括将直链肽改造成环肽。这种大环分子具有明确的固定构象,能够与受体很好地契合,加上分子内不存在游离的氨端和羧端使得对氨肽酶和羧肽酶的敏感性大大降低。一般地说,环肽的代谢稳定性和生物利用度远远高于直链肽[13]。鉴于环肽的诸多优点,近年来对多肽研究的热点已转移到环肽的合成和生物评价上。

根据环肽的环合方式又分为首尾相连环肽(Head-to-tail)、侧链和侧链相连环肽(Sidechain-to-sidechain)、侧链和端基相连环肽(Sidechain-to-end)、含二硫键的环肽(Disulfide-bridge)、以及含有其他桥连结构(硫醚键等)的环肽。从合成方法上讲,首尾相连的环肽的合成难度最大。因为环肽的前体-直链肽的肽键具有很强的 ρ 键特征,分子更偏爱形成反式构象,呈舒展状态,造成属于反应中心的端基的羧基和氨基在空间上距离较远,不利于发生分子内缩合反应,有利于分子间缩合。

首尾相连的环肽通常是N端和C端游离的直链肽在稀溶液中(10^{-3} ~ 10^{-4} M)由羧基和氨基形成酰氨键来合成。直链前体中的氨基酸种类和数目对成环的难易程度和环肽的收率起着至关重要的作用。甘氨酸、脯氨酸或D-构型氨基酸具有诱导 β -转角(β -Turn)的作用,常被认为可增加成环的可能性和收率。

1. 合成首尾相连环肽的经典方法

合成首尾相连环肽的经典方法是在稀溶液(10^{-3} ~ 10^{-4} M)中,将保护的线性前体选择性地活化并环合。常用活泼酯法和迭氮法。

1.1 活泼酯法

活泼酯法中活化羧基和环合反应是分两步进行的。活泼酯相对很稳定,一般不需要纯化可直接用于环合反应。几乎所有可用于偶联反应的活泼酯都可用于合成环肽,主要有对硝基酚酯、N-羟基琥珀酰亚胺酯、五氟苯酯和2,4,5-三氯苯酚酯。线性多肽的C端羧基与对硝基酚、N-羟基琥珀酰亚胺、五氟苯酚或2,4,5-三氯苯酚,在DCC或其他缩合剂存在下,于低温反应,很容易得到相应的活泼酯。这种N端通常带有BOC或Z保护的活泼酯在酸性条件下脱去保护基,形成活泼酯的氢卤酸盐,在弱碱性稀溶液中,如在吡啶,DMF或二氧六环一类介电常数较大的溶剂中,保持pH 8~9,加热(60 ~ 100° C)或室温搅拌数小时至数日,最终可得到环肽。

1.1.1 对硝基酚酯法

对硝基酚酯法合成环肽的通式

Cyclo(β -Ala-Phe-Pro)的合成中应用了对硝基酚酯法。Boc- β -Ala-Phe-Pro-OH 在乙酸乙酯中与 1.5 摩尔量对硝基酚混合, DCC 为缩合剂, 得到 Boc- β -Ala-Phe-Pro-ONp, 经 TFA 脱去 Boc, 以 0.1M NaHCO₃ 和 0.1M Na₂CO₃ 为碱, 二氧六环为溶剂, 室温反应, 得到收率为 32% 的环三肽。对硝基酚酯法的优点在于对硝基酚价廉易得, 缺点是过量的对硝基酚不易完全除去, 产物不易纯化, 颜色发黄。

1.1.2 N-羟基琥珀酰亚胺酯法:

该方法原理与对硝基酚法一致, 唯一不同点在于线性多肽的 C 端羧基在缩合剂 EDC 的存在下与 N-羟基琥珀酰亚胺(HONSu)缩合, 形成直链多肽的 N-羟基琥珀酰亚胺酯。应用这种方法 Toshihisa 等在吡啶溶液中合成了 cyclo(Pro-Val-Pro-Val) 和 cyclo(Pro-D-Val-Pro-D-Val), 收率分别为 15% 和 12%。二者为非对映异构体, 前者具有植物生长抑制作用, 后者却表现为植物生长促进作用。

1.1.3 五氟苯酚酯法:

这类活泼酯用于环肽的合成是近年才发展起来的。Joullie 在合成天然环肽生物碱 Sanjoinine G1 和其 C11 位对映异构体时在环合步骤中就应用了五氟苯酚酯法。首先以 D-丝氨酸为原料, 经多步反应得到环合前体, 用五氟苯酚活化羧基, N 端苄氧羰基经氢解脱掉后, 以 4-吡咯烷吡啶为催化剂, 在二氧六环中回流, 最终得到两个互为异构体的混合物, 收率分别为 27% 和 22% [29-30]。

另外, 海洋生物环肽 Patellamine B 以及对纤维蛋白酶和丝氨酸蛋白酶有强烈抑制作用的环肽 Cyclotheonamide A 的环合步骤也是应用了五氟苯酯法, 收率分别是 20% 和 53%。

1.2 迭氮法

在多肽合成中迭氮法是另一种比较经典的方法, 这种方法的优点在于很少引起消旋反应, 最早用于直链肽的合成, 现在常常被用于环肽的合成 [32-34]。具体方法是, 把直链肽的甲酯, 乙酯, 苄酯, 取代苄酯或其它更活泼的酯通过肼解的方式生成酰肼, 溶于醋酸或盐酸-醋酸混合溶液, 在 -5° C 左右的温度下加入 1M 的亚硝酸钠溶液, 产生的亚硝酸则与酰肼反应生成迭氮物。N 端游离的直链肽迭氮物于 4° C 搅拌一天再升温至室温, 可得环肽。
Scheme 4. Peptide Cyclization via the acyl azide (X=Z or Boc, R=Me, Et, Bzl)

Bodansky 最早应用迭氮法合成了 cyclo(D-Ala-D-Ala-Val-D-Leu-Ile), 虽然上述环肽不具有其母体化合物 malformin 的生物活性, 但合成它为应用迭氮法合成环肽开辟了前景 [35]。

应用迭氮法合成环肽的另一个成功的例子是内皮素拮抗剂的合成。Endothelin (ET) 是一

种高效的血管收缩剂，由 21 个氨基酸残基组成，其受体拮抗剂之一 cyclo(D-Trp-D-Asp(OtBu)Fmoc-Ser-D-Val-Leu)。

DPPA 系二苯基磷酰基迭氮化物，是一种稳定的液体，沸点 157° C，用二苯基磷酰氯和 NaN₃ 在丙酮中室温反应很方便地得到，可以直接用作多肽偶联的缩合剂，近年来多用于环肽的合成。

Arg-Gly-Asp (RGD) 是多种细胞外蛋白与整合素相互作用时被整合素识别的关键序列，对含有该序列环肽的合成报道很多。Kessler 等用固相合成仪 SP650 合成了 13 个含 RGD 序列的线性六肽和七个含 RGD 序列的线性五肽，N 端和 C 端均游离的直链肽在稀溶液中以 DPPA 为缩合剂，保持 pH 8.5~9，反应 4 天，得到相应的环六肽和环五肽，收率在 15%~50% 之间。生物活性实验表明所有的环六肽对细胞粘附的抑制作用均明显低于线性肽 GRGDS。环五肽中也只有 Cyclo(RGDdFV) 和 Cyclo(RGDFd-V) 对 Laminin P1 的细胞粘附具有明显的抑制作用 [46-48]。

对于某些在碱性条件下易分解的目的物，反应过程当中应用惰性气体进行保护，例如，线性多肽 H-Asp(Fmoc)-D-Ser-Phe-D-Phe-Arg-Gly-OH 在无水 DMF 中，加入 5 倍量 NaHCO₃ 和 10 倍量 DPPA，反应 66 小时，得到收率仅为 3% 的纤维蛋白原受体拮抗剂 Cyclo(Asp-D-Ser-Phe-D-Phe-Arg-Gly)；若改变 NaHCO₃ 和 DPPA 用量，并且反应过程中用氩气保护，反应三天，可得到产率高达 39% 的上述环肽。两种条件下所得收率有如此大的差别，主要原因是目的物在碱性条件下易分解。

以 DPPA 为缩合剂合成环肽时，除了用 NaHCO₃、Na₂CO₃ 为无机碱外，也常使用 KH₂PO₄。例如能够与鸦片受体结合的环肽 Try-C[D-A₂bu-Phe-Phe-(L or D)-Leu] 的合成中，就使用了 KH₂PO₄ 这样的弱碱催化，收率高达 75%。用同样的方法合成 Somatostatin 的类似物 Cyclo(Lys-Phe-D-Trp-Lys-Thy-Phe)，收率也达到了 42%。

以 DPPA 为缩合剂合成环肽时，有机碱常用三乙胺 (Et₃N)、N-甲基吗啉 (NMM) 和二异丙基乙胺 (DIEA)，这三种弱碱能够与有机溶剂混溶，用量远远少于 NaHCO₃ 和 KH₂PO₄，而且 NMM 和 DIEA 不易引起消旋。

2. 环肽合成中新型缩合剂

2.1 1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (HOAt) 衍生物

近年来，HOAt 类多肽合成缩合剂发展迅速，这类缩合剂包括 TAPipU[O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-penta-methyl enuronium tetrafluoroborate]、HAPyU[O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetra methylene) uronium hexafluoro phosphate]、PyAOP(7-azabenzotriazol-1-yl)oxyl-trispyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate) 和 HATU [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluoro-phosphate] 等。使用这些缩合剂不仅反

应速度快，而且手性不受损害。

Ehrlich 等考察了不同缩合剂对 GnRH 衍生物十肽 H-Nal-d-Cpa-d-Pal-Glu-Tyr-d-Arg-Leu-Arg-Pro-Lys(Ac)-OH 环合反应的影响，发现 HAPyU 和 TAPipU 是环肽合成中非常有效的缩合剂，直链肽浓度在 1.5mmol/L 时，30 分钟内环合反应即完成。反应中，缩合剂一般需要过量 10% 以保证反应完全。若增加溶液中线性多肽的浓度可以促使环合反应更快地发生。例如，线性十肽浓度在 0.1M 时，加入上述两种缩合剂，两分钟内即发生环合；此外，令人惊奇的是，即使线性多肽浓度高达 0.2M 时，也未发生分子间缩合反应，这表明在首尾和侧链环合反应中，稀溶液也许是不必要的。比较 HAPyU 和 TAPipU 在合成过程中对环肽消旋的影响，发现 HAPyU 更少引起消旋化反应，以 TAPipU 为缩合剂合成环六肽 Cyclo[Val-Arg-Lys(Ac)-Ala-Val-Tyr] 时，收率为 25%，引起末端酪氨酸的消旋化达 8%，若以 HAPyU 为缩合剂时，30 分钟内可得到 55% 收率的环六肽，D-构型酪氨酸-异构体不足 0.5%。

为了进一步验证 HoAt 类缩合剂在合成环肽中的优势，Ehrlich 选择了使用一般缩合剂难于得到的 thymopentin 类似物作为研究对象，对 HAPyU、PyAOP 和 HATU 就环合的产率及环合过程中发生的二聚和 C 端酪氨酸残基构型的改变进行了系统的比较。结果表明，在线性多肽浓度为 0.1mmol/L，DIEA 三倍过量，HAPyU 为缩合剂时，单体环肽的收率最高，达到 82%，未检测到 D-Tyr-异构体和二聚体，说明这一条件是合成 thymopentin 类似物的最适条件，其他缩合剂在环合时，一则收率偏低，甚至不反应，二则造成酪氨酸消旋化。虽然延长时间可以增加收率，但随之而来的是酪氨酸消旋化的增加。

Phakellistatin 5 是一种从海绵中提取得到的环七肽，Pettit 等采用固相法得到直链前体后，以 PyAOP 为缩合剂，得到收率为 28% 的 R-Asn-Phakellistatin 5。

Mink 等人以 N 端 Boc 保护的天冬氨酸和丝氨酸苄酯为原料，采用液相法经多步反应得到具有多个噁唑结构的直链前体，N 端和 C 端经氢解和酸脱保护后以 HATU 为缩合剂，得到了平面结构的 Dolastatin E 类似物。这种具有多种功能团的化合物可用于超分子化学和组合化学。

此外，具有辅助放射性同位素 (^{111}In 和 ^{125}I) 进入血小板的载体功能的 Dolastatin D 类似物 Cyclo[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(or Tyr)][63]，以及对血小板生长因子具有拮抗作用的血小板生长因子 B 链序列类似物 Cyclo(Arg-Lys-Iles-Gla-Ile-Val-Arg-Lys-Lys-Cys) 也是采用 HATU 为缩合剂进行环合反应得到的。

从以上给出的例子可以看出，环肽合成的缩合剂不象 DCC 那样具有普遍的适用性。不同的环肽合成要求不同的缩合剂。

2.2 TBTU 和 HBTU

TBTU 和 HBTU 最早是用于合成线性二肽和三肽的苯骈三氮唑类缩合剂。使用过程中，发现这两种化合物在某些环肽的合成中表现出快速、高效的优点。Knorr 等以 TBTU/HoBt 为缩合剂在 DMF 中得到了 Cyclo(Tyr-Asp-Phe-Phe-Ser/Phr-Ala)，Zimmer 等人应用 HPLC 技术比

较了 TBTU/HOBt 和 DPPA/NaHCO₃ 复合缩合剂在这种环六肽合成中的应用, 结果表明前者反应速度非常快是后者的 5~70 倍。

从海洋生物海绵中提取分离得到的 phakellistation2, 具有抑制鼠 P388 淋巴细胞和人癌细胞增殖的作用。由于人工从海绵中提取这种环肽比较困难, Pettit 等对这种化合物进行了全合成, 以便深入研究其生物活性。其中关键的环合步骤分别采用 TBTU, BOP-Cl, PyBrOP 和 TBTU/HOBt 为缩合剂, 经数日(4~14 天), 得到收率不等的产物。其中 TBTU 为缩合剂时收率最高, 达到 55%。这种人工合成的环肽虽然在化学结构上与天然肽结构一致, 但二者的生物活性却差异甚大, 合成的环肽对 P388 白血病淋巴细胞的抑制作用远远低于天然环肽, 原因可能是二者的构象不同[67]。

在对生长激素释放抑制因子(SRIH)具有高效亲和能力的环六肽 MK-678:Cyclo[Phe-(N-Me)Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val]的合成中 HBTU 充分发挥了其高效的特点。另一种环六肽 Cyclo[hCys-(N-Me)Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val]的合成也是应用 HBTU 为缩合剂。

2.3 Bop 法

McMurray 等以 Cyclo(Asp-Asn-Glu-Tyr-Ala-Ala-Arg-Gln-D-Phe-Pro) (Tyr I+1) 为研究对象, 以便确定 Tyr I+1 的哪些位置对蛋白酪氨酸激酶的亲和性是必不可少的, 以及哪些氨基酸对活性贡献最大, 以 Bop/HOBt 为复合缩合剂, 在 1mmol/L 浓度下, 合成了一系列 Tyr I+1 类似物, 并经磷酸化和亲和力实验, 发现 6 位, 7 位是芳香类氨基酸的 Cyclo(Asp-Asn-Gln-Tyr-Ala-Phe-Phe-Gln-D-Phe-Pro) 的活性最强。

以往具有 RGD 序列的多肽的研究多集中在抗血小板聚集方面, 随着对这一类化合物生物活性的深入研究, 兴奋点逐渐转移到含 RGD 序列多肽抗粘附、抗血管增生和骨质疏松等方面, 两种含 RGD 的 Cyclo(RGDRGD) 和 Cyclo(RGD RGd) (d=D-Asp) 以及线性肽 RGDRGD 选择性地与 aVb3-玻璃体粘连蛋白结合, 在骨再生实验中均显示出中等强度的活性, 其中两个环肽的合成是以 Bop/HOBt 为复合缩合剂, 6.2 倍过量的 DIEA 存在下进行的, 收率高达 80%。

3. 固相法合成环肽

固相法能够有效地避免环合过程中二聚、多聚等副反应的发生。早在 60 年代, Fridkin 等就应用高分子载体来合成环肽。线性多肽的 C 端羧基与树脂形成酯键而将线性肽挂在树脂上, 脱去 N 端保护基后, 以三乙胺中和, 室温 12 小时后得到 60%~80%收率的环肽。

近年来发展起来的通过氨基酸侧链与树脂连接合成环肽的策略在环肽合成中应用广泛。对具有天冬氨酸或谷氨酸残基的线性多肽, 可选择这两个酸性氨基酸残基的侧链羧基为 C 端, 与 PAC(烷氧基苄醇)或 PAL(烷氧基苄胺)或其他类型树脂缩合, 将线性多肽挂在树脂上。主链羧基用烯丙基保护。逐步接肽完成之后脱去 N 端和 C 端保护基, 加入缩合剂得到连在树脂上的环合产物。最后用三氟醋酸: 茴香硫醚: b-巯基乙醇: 苯甲醚混合试剂从树脂上切下环肽, 同时脱去其它侧链保护基。采用这种策略完成了 Cyclo(Ala-Ala-Arg-D-Phe-Pro-Glu-asp-Asn-Tyr-glu) 的合成, 收率为 71%。这种方法的局

限性在于线性多肽前体中必需包含天冬氨酸或天冬酰胺，谷氨酸或谷氨酰胺。

对-硝基苯基甲酮脲聚合物最早被 DeGrado 和 Kaiser 作为固相载体用于多肽的固相合成 [83]。肽基脲酯在酸性条件下稳定，但在氨解的条件下很不稳定。利用脲酯能够氨解的特点，Ospay 等在合成环十肽 Tyrocidine A (TA) [84] 时应用此法在脲树脂上合成直链的十肽，N 端经 TFA 脱去 Boc 基后用 DIEA 中和，使氨基游离，室温搅拌 24 小时后，得到侧链保护的环肽，脱去保护基，纯化，得到收率高达 55% 的 TA。

4. 酶法合成环肽

在缓冲液中利用蛋白酶合成环肽也是正在发展的方法之一。Jackson 等报道了以线性多肽酯的衍生物为底物，通过酶催化成环的方法合成了几个包含 12~25 个氨基酸残基头尾相接的环肽，环化用的酶 Subtiligase 是枯草杆菌蛋白酶突变的产物，催化反应体系为 pH=8 的缓冲溶液。用 HPLC 检测，收率在 30%~80% 之间。环化效率与肽的序列和长度有关。利用 Subtiligase 合成环肽所需的线性肽的最小长度是 12 个氨基酸残基，低于此数将得到水解产物或线性肽二聚产物。可能是因为低于 12 个残基的肽底物形成的头尾相接的空间构象不能与酶的活性中心匹配。

5. 合成环肽的其它方法

下面介绍几种比较特殊的环肽合成方法：

Meuterman [86-87] 等人巧妙地将光敏感辅助剂融合在环肽合成过程中，这种与常规合成方法不同的策略，不仅丰富了环肽合成方法学的内容，也为其他合成工作者提供了想象空间。直链五肽 H-Ala-Phe-Leu-Pro-Ala-OH 和 H-Ala-Phe-Leu-Pro-D-Ala-OH 溶于 DMF，使成为 10^{-3} ~ 10^{-4} M 溶液，加入 3 倍量 Bop 为缩合剂，5 倍量 DIEA 作为碱和催化剂，未得到单体环合化合物，只得到了环二聚体和环三聚体。采用光敏辅助剂的方法，将 5-硝基-2-羟基苄基和 6-硝基-2-羟基苄基以及巯基乙基等光敏结构引入线性肽 N 端，这些结构中的羟基或巯基与 C 端羧基成酯后，使得 N 端与 C 端在空间位置上更为接近，经酰基转移使环缩小而得到 N 端连有光敏辅助剂的环肽，最后经光解反应脱去光敏辅助剂，得到首尾相连的环五肽，收率为 20%。

在传统的环肽合成方法中，不仅线性肽前体的氨基酸侧链一般都需要保护，而且要求反应物在溶液中呈高度稀释状态，非保护的氨基酸的环合无论是在概念上还是在机理上都不同于传统环合方法，主要特征是 (1) 酰胺键在没有活化剂存在下，通过分子内酰基转移而形成；(2) 两个反应端基在缓冲液中的可逆反应造成环-链的结构互变，调节和控制环的形成。这种非保护环肽的合成方法避免了烦琐的保护和脱保护步骤以及反应液高度稀释的要求，终产物可直接用于生物活性实验。

Jame P. Tam 等建立了分子内转移硫内酯化和 Ag⁺ 离子辅助环合来制备非保护环肽的方法。对于 N 端为半胱氨酸，C 端为硫酯的线性多肽，在 pH=7 的磷酸缓冲液中，巯基与硫酯基生成共价的硫内酯，这种硫内酯自发地经过 S 原子到 N 原子酰基迁移而形成环肽。

作者应用上述方法合成了一系列 N 端为半胱氨酸的 Cyclo(Cys-Tyr-Gly-Xaa-Yaa-Leu)，为了防止二硫桥的形成和加速环合反应的进行，反应过程中加入 TCEP(三羧基乙基膦)，反应时间约为 4 小时，收率在 78%~92%之间，HPLC 检测未发现副反应和低聚物。

对于不含半胱氨酸的线性多肽的环合，采用亲硫的 Ag⁺离子辅助配位柔性的线性多肽的 N 端氨基与 C 端硫酯形成一个环状的中间体，通过熵活化促进分子内环合。与硫内酯环合方法原理相似，Ag⁺离子通过一种非经典环-链结构互变而促使分子内环合的发生。

应用上述方法合成环肽的具体实例是 Cyclo(Ala-Lys-Try-Gly-Gly-Phe-Leu)的合成。在 pH5.7 的醋酸缓冲溶液中加入 10%的 DMSO 作为助溶剂，反应 5 小时后得到收率为 67%的目的物。

6. 环二肽的合成

环二肽(2,5-吡嗪二酮)是最小的环肽，许多天然环二肽化合物都具有明确的生物活性，例如作为抗生素，苦味剂，植物生长抑制剂以及激素释放抑制剂等。环二肽结构的特殊性使得这类化合物的合成自成体系，通常由 N 端游离的直链肽酯在极性溶剂中回流，便可以很容易地得到目的物。Fischer 虽然在甲醇氨中氨解线性二肽甲酯而得到环二肽，但同时发现这种方法易引起消旋。Nitecki 提出将 N 端游离的线性二肽甲酯在丁醇和甲苯的混合溶剂中回流合成环二肽不会造成消旋。Ueda 使用甲醇为溶剂进行回流，也得到了很好收率的环二肽；Cook 等人应用 1,2-乙二醇作为反应溶剂，得到了两种非对映异构体环二肽，总收率达 64.5%。最近汪有初等报道了参照 Ueda 和 Cook 的方法合成了一系列环二肽，收率在 55%~99%之间，并且通过生物活性实验发现 Cyclo(Phe-Pro)，Cyclo(Ile-Ile)和 Cyclo(Met-Met)具有轻微的钙拮抗效应，Cyclo(Ala-Ala)和 Cyclo(Pro-Pro)则显示了增强钾所致的收缩效应。

以上介绍了迄今为止合成首尾相连环肽的方法。由于环肽的前体-直链肽所包含的氨基酸的数目和种类的千差万别，造成了环肽合成方法的多样化。对某种直链肽表现出高效，快速缩合作用的试剂和方法对另外一种肽链就可能变得低效或无效。因此，根据目标环肽的序列寻找对应的环肽合成方法必须通过认真的探索和艰辛的努力。

免责声明：文章内容来自网络整理，目的是为了共享知识。如若侵权，请联系小编删除。