

1981.

[20] Benedetto, C.: *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, (ed. D. C. H. Mcbrine and T.

F. Slater.) 1982.

[本文于 1983 年 4 月 12 日收到]

带有不同官能团的聚苯乙烯树脂 在固相多肽合成中的应用概况

汪淑华 朱应麒

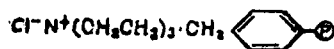
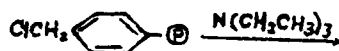
(中国科学院上海药物研究所)

多肽激素不论是在科学研究、医药、农牧业等的应用方面已日趋广泛。固相多肽合成法的问世又给多肽合成带来了方便。近十几年来这个方法已被广泛的研究和应用。通常所谓的 Merrifield 固相合成法就是在 2% 二乙烯基苯和苯乙烯的共聚树脂上引入氯甲基,而后进行多肽合成,无疑聚苯乙烯共聚树脂本身的物化性质是起着一定的作用。它必须具有足够的机械强度,能经受碰撞、胀、缩和酸碱等苛刻条件,而此种树脂往往不能满足这些要求。几年来有许多工作者探索了一系列其它类型的聚合体,象大孔网格树脂等,关于这方面的资料已有综述发表^[1]本文不再介绍。

实际上在固相多肽合成中连接肽链与树脂之间的化学键的作用是很重大的,它必须满足以下条件:①容易形成,②对于合成过程中各步骤重复使用的化学试剂要稳定,③多肽合成之后能在温和的条件下使它从树脂上脱离下来而不破坏肽键,多年来许多学者按照不同的目的设计了很多带有不同官能团的树脂,按照肽与树脂之间化学键的类型可分为以下几类:

1. 苄酯键

卤苄类树脂(1—6)* 苄酯键的形成最初是将树脂与保护氨基酸一起在三乙胺存在下,用乙酸乙酯或乙醇做溶剂,回流 24—65 小时。但反应时间长,在酯形成的同时部分氯甲基与三乙胺形成季铵盐,从而使树脂具有阴离子交换树脂的性质,并降低了所要合成的肽在树脂上的稳定性。



目前肽链与树脂之间的苄酯键的形成多采用碱金属盐法^[2],它的成酯率高、操作简便,副反应少。将 Boc-氨基酸与碳酸铯反应生成 Boc-氨基酸的铯盐,然后再和树脂一起在 DMF 中 50℃ 反应 16 小时,即可获得很高的酯化率。1975 年中国科学院上海生物化学研究所多肽应用组采用了钾盐法,也获得了满意的结果。

苄醇构型树脂(7.8)的苄酯键的形成最初用 N, N'-羰基二咪唑做为缩合剂,反应条件温和,反应时间短,但对 C-末端是 Asp 和 Glu 的肽不适用,因为在此情况下它们将自身脱水而成为腈类。DCCI 也曾作为缩合剂而被采用,但缩合率太低。目前用咪唑催化的活化酯法已广泛应用。

通过苄酯键与树脂相连接的肽,可根据具体情况选择适当的方法,使之从树脂上脱离下来。

(1) 酸解: 肽链与树脂之间的苄酯键可用各种无机的或有机的酸,在适当的条件下断开而得到 C-端是游离羧基的肽酸。比较常用的是 HBr 在 1:1 的 CH_2Cl_2 -TFA 中 25℃ 反应

* 本文树脂结构式均见附录。

10—100 分钟,或用无水 HF 在 0℃ 处理 30—60 分钟。用 HF 法可获得高产率,而且侧链保护基可同时去除。但当肽链中含有 Met、Cys、His、Tyr、Arg、Trp 等残基时就要遭破坏。酸解法要产生以下副反应: ① 含有 Asp-Gly; Asp-Ser; Asp-His 序列的肽链,酸解时会形成琥珀酰亚胺环。② 谷氨酸侧链上的酰基阳离子会形成吡咯烷酮或酰化的芳香族产物③靠近 Met 残基的局部肽链会断裂。④甲硫氨酸上的硫的烷化。⑤酪氨酸分子内的烷化。⑥精氨酸的胍基脱胺而变成鸟氨酸。为了减少副反应,通常根据具体情况选择适当的阳离子清除剂,如苯甲醚就是做为叔丁基、硝基、苄基、等阳离子的清除剂而在氟化氢酸解法中应用。

(2) 亲核断裂 肽与树脂之间的苄酯键能用碱、醇、氨、肼或其它胺切断,分别生成 C-末端是羧基、酯、酰胺,酰肼或其它酰胺的肽^[3-6]。

由于所合成的多肽中有些氨基酸的侧链上的保护基与亲核试剂不起作用,因此亲核断裂对制备带有侧链保护基的肽碎片是有价值的。在实际应用中往往避免采用一些强的或中等程度的亲核试剂,因为在这种条件下会产生下列

些副反应: ① C-端氨基酸的消旋。② Asp 和 Glu 发生 $\alpha \rightarrow \omega$ 重排。③当 C-端是 Asp 或 Glu 时,易形成琥珀酰亚胺环或戊二酰亚胺环。④肽中的 Ser、Thr、Cys、发生 β -消除反应,而产生相应的脱氢氨基酸残基。⑤二硫键的断裂。

三级胺催化下的醇解^[6]可制得碳末端是酯的多肽,酯基又可进一步水解成羧基。Halpern 用阴离子交换树脂对苄酯键进行醇解也获得成功。

转酯法是应用醇解的一个巧妙方式。将合成的肽-树脂放在 1:1 的二甲胺基乙醇(DMAE)-DMF 中,室温反应 72 小时后,再用一定比例的 DMF-H₂O 进行水解,即可得到碳末端是羧基的带侧链保护基的多肽。此法对于从 Merrifield 树脂上切下各种带保护基的肽很有效。但当碳末端是 Pro 或 Val 时,转酯速率极慢,在这种情况下可使用二甲胺基乙氧基砷。溶剂对转化率也有影响。实验证明用 1:1 的二甲胺基乙

醇-DMF 做溶剂时,转化率可高达 95%。

(3) 催化氢化 Mazur^[7] 用催化氢化法使肽从含苄酯键的树脂上脱离下来。将合成的肽-树脂与醋酸钨一起在 DMF 中 40℃ 60 磅压力下氢化,得到了带有 Boc-保护基、碳末端是羧基的肽。Khan^[8] 以环己烯为还原剂,应用催化转氢技术以 10% 的产率获得了 α -氨基保护的血管舒缓激肽。由于 Boc-基在氢化的条件下是稳定的,所以催化氢化法对制备 α -氨基保护的肽碎片是适合的;但当合成的肽中含有 Cys 或 Met 时,不能采用此法

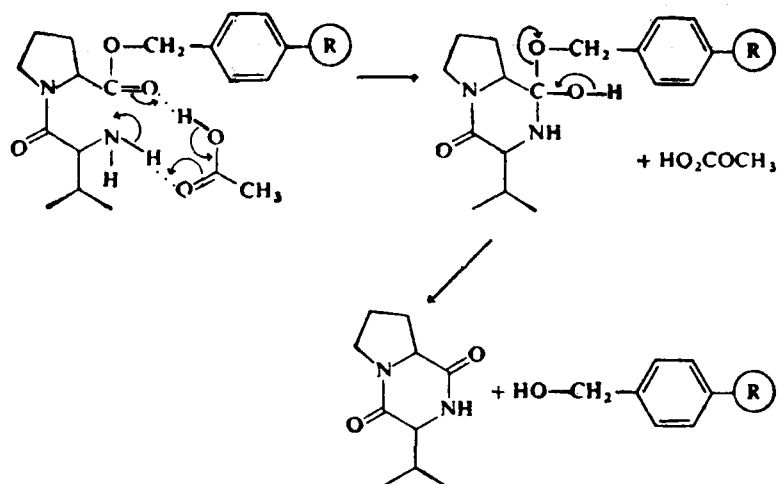
(4) 光解法 Rich 用光照射邻硝基苄酯键肽-树脂(3)得到了带有保护基的肽,但由于树脂本身的膨胀性差而影响了产率。为此又另设计一树脂(4)。将合成后的肽-树脂悬浮在无水甲醇中,用 3500 Å 波长的光在 25℃ 照射 24 小时,得到了很好的效果。Wang^[9] 用他自己合成的树脂(5)进行光解,也得到了满意的结果。

在光照的条件下一些基本的侧链保护基,象叔丁氧羰酰基、苄醚基、苄酯基、对甲苯磺酰基等,都是稳定的,所以用光解法来制备带侧链保护的肽片段也是一个较理想的方法。

在苄酯键类型的树脂中使用最多的是氯甲基树脂(1)。在实际应用中发现,当接到二肽时要发生分子内氨基的环化,生成二酮哌嗪,造成断裂。这个副反应发生的程度与二肽的结构有关。图 1 是酸催化下 Phe-Pro-Val 二肽树脂环化的机理。由于羟甲基树脂的形成,将与后加的 Boc-氨基酸缩合生成新肽(副产物),造成后来分离上的困难。为了避免环化可采取如下一些有效的措施: ①二肽的中和时间相应缩短。②接三肽时先加入缩合剂 DCCl。③预先合成三肽,然后用三肽直接上树脂。树脂(6)对酸的稳定性要比树脂(1)大 100 倍,它为大肽的合成提供了有利条件。

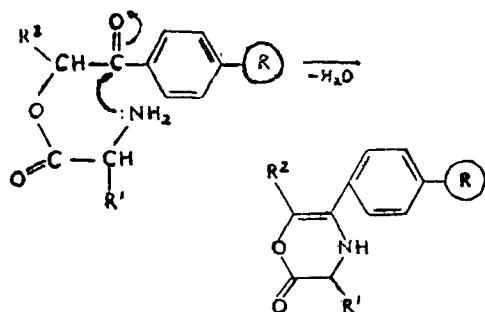
2. 苯甲酰酯键

2-溴丙酰基树脂(9)与保护氨基酸形成苯甲酰酯键,它与单纯的苄酯键相比较对酸是稳定的^[9],然而它对亲核试剂却要比单纯的苄酯



键敏感得多。该树脂可通过铯盐法、钾盐法或三乙胺法很快的将第一个 Boc-氨基酸连接上去。在这类树脂上合成的多肽,最初曾采用催化氢化法使之脱离树脂,但因有副反应而未能得到广泛的应用。如前所述的光解法对苯甲酸酯键的开裂也是有效的,而且树脂(9)的光解速度快于树脂(5)。一些亲核试剂也被应用到苯甲酸酯键的裂开上^[10,11,12]。

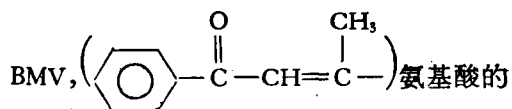
当接在苯甲酸树脂(9)上的第一个氨基酸的氨基呈游离状态时,按下式环化^[11];当接到二肽时也要发生分子内氨基的环化,生成二酮哌嗪^[11]。这些环化反应都将引起一系列副反应,生成所谓的“截尾肽”、“空心肽”,致使产品的分离发生困难。这也是该树脂得不到广泛应用的原因之一。我们曾对 2-溴丙酰基树脂(9)稍加改进;实验证明,改进后树脂上一肽的环化明显减少。



$R^1 = H$, 其他侧链 $R^2 = H \cdot CH_3$

3. 二苯甲酯键

用二苯甲酯类型树脂 10 合成的肽,可在较温和的条件下使肽从树脂上脱离下来,而不破坏某些氨基酸的侧链^[13]。

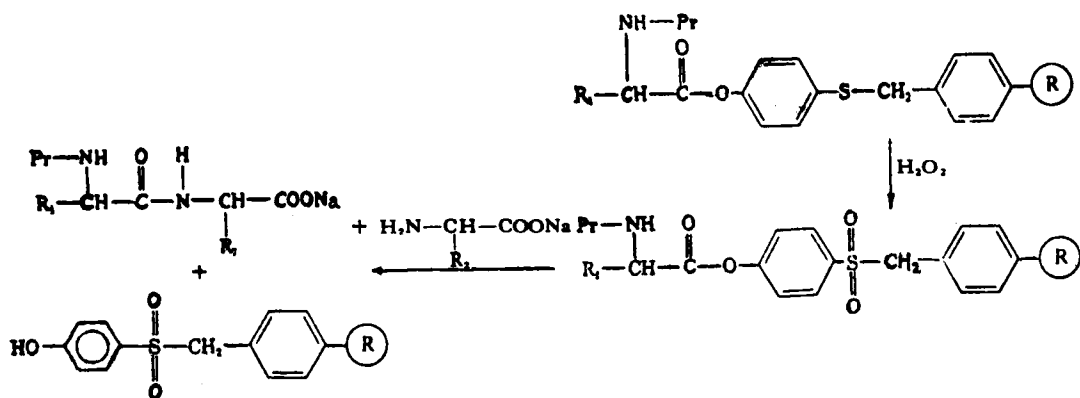


二环己基胺盐与树脂(10)一起,在三氯甲烷中回流 15 小时后,第一个氨基酸即可接到树脂上去。BMV 基可用 0.4N HCl-THF 处理 30 分钟后去除。而在树脂上合成的肽则要用 50% 三氟醋酸-三氯甲烷处理,才能使肽从树脂上脱离下来。它对合成羧端是大体积的 Val 的肽也可得到满意的结果。苯环上有取代基的树脂,是为了使第一个氨基酸更容易接到树脂上去而设计的。

4. 苯酯键

由酚羟基树脂(11)所形成的苯酯键对酸稳定,又易形成^[14]。Boc-氨基酸用 DCCI 做缩合剂就会很容易的与树脂连接起来,而且无副反应。肽与树脂之间所形成的苯酯键用过氧化物处理 10—30 分钟就能裂开,而且不产生消旋,但它不适于制备碳末端是 Met 的多肽。在这种情况下最好是采用转酯法, Derek 等就是用此法合成了 Met-脑啡肽。

甲基硫酚树脂(12)可用混合酸酐法或 DCCI 缩合法,使 Boc-氨基酸接到树脂上去^[15]。合成的肽按下式从树脂上脱离,所得的肽不仅保留了 Boc-基和某些侧链保护基,而且还可以

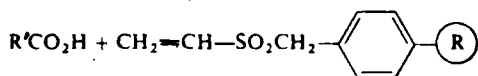
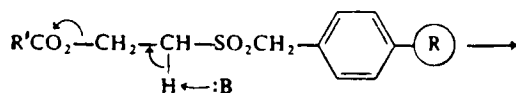


Pr = 保护基

使肽从羧端伸长一个氨基酸。肽键($-\text{CO}-\text{NH}$)对双氧水是稳定的,对 Trp、Cys、Met 等残基却是不利的,但可作为酰化剂而被引入在肽的 C-末端,所以该树脂对合成羧端是 Trp、Cys、Met 的肽是适合的。

5. 烷酯键

烷酯键对酸稳定,因此联结在烷酯构型树脂上的肽常在碱性条件下脱离树脂。在 2-羟乙基硫甲基树脂(13)上合成的肽实际上是应用了 β -消除反应使肽与树脂脱离^[16]实验条件:

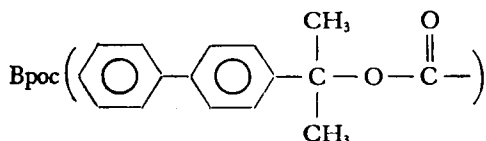


① 0.2N NaOH-二氧六环 (1:1) 室温处理 10 分钟, ② 二氧六环: 甲醇: 4N NaOH = 30:9:1 室温处理 3 分钟后加醋酸促使多肽与树脂脱离的完全而无副反应。用该树脂可制得 N-端带保护基的肽。

在叔烷酯构型树脂(14)上合成的肽,用三氟醋酸-二氯甲烷 (1:1) 室温处理 2 小时,即可从树脂上脱离下来;然而第一个氨基酸通过酯化连接上去却比较困难,使该树脂的应用受到了限制。烷链醇树脂 (15,16) 就是为了减少第一个氨基酸接上去的空间位阻而设计。如要使用这二个树脂, α -氨基必须用 CBZ 保护。

6. 酰肼键

树脂(17, 18)^[17]是为了制备带侧链保护基的肽酰肼而设计。将



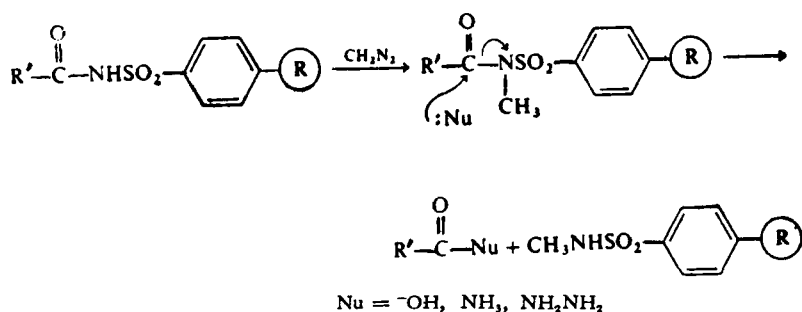
氨基酸与树脂一起用 DCCI 缩合,就可使第一个氨基酸接到树脂上去。氨基上的 Bpoc 基在 5% 的三氟醋酸-二氯甲烷中,室温 10 分钟可去除,而合成的肽要在 50% 的三氟醋酸-二氯甲烷中,室温 30 分钟才能从树脂上脱离下来。在这些条件下侧链上某些保护基不受影响,而且得到的肽酰肼易结晶,纯化方便,是为片段缩合提供原料的好途径。

7. N-磺酰胺键

将 Boc 或 CBZ 保护好的氨基酸的 2, 4, 6-三氯苯酚酯与三乙胺一起在 DMF 中反应,使第一个氨基酸连接到树脂(19)上去^[18]。所形成的 N-磺酰胺键对酸是完全稳定的。当接肽工作完成以后,用重氮甲烷在乙醚-丙酮溶液中进行 N-甲基化,这样就可以温和的条件使肽从树脂上脱离下来,生成羧端是羧基、酰氨基、酰肼的肽。

8. 酰肼键

肽与树脂之间以酰肼键相连接的树脂(20, 21, 22)^[19],为制备羧端是酰肼基的活性肽提供了方便。第一个氨基酸可以用 DCCI 法或活化酯法与树脂相连接。肽与树脂之间所形成的键



抗酸性强,因而只能采用 HF 酸解法使肽与树脂脱离。这样极易发生副反应。脱氢丙氨酸树脂 (22) 克服这一缺点只须用 1N HCl-醋酸在 50℃ 处理 30 分钟,就可使肽从树脂上脱离下来。它适合于制备带 Boc-保护基的肽酰胺。

9. 二硝基苯基键

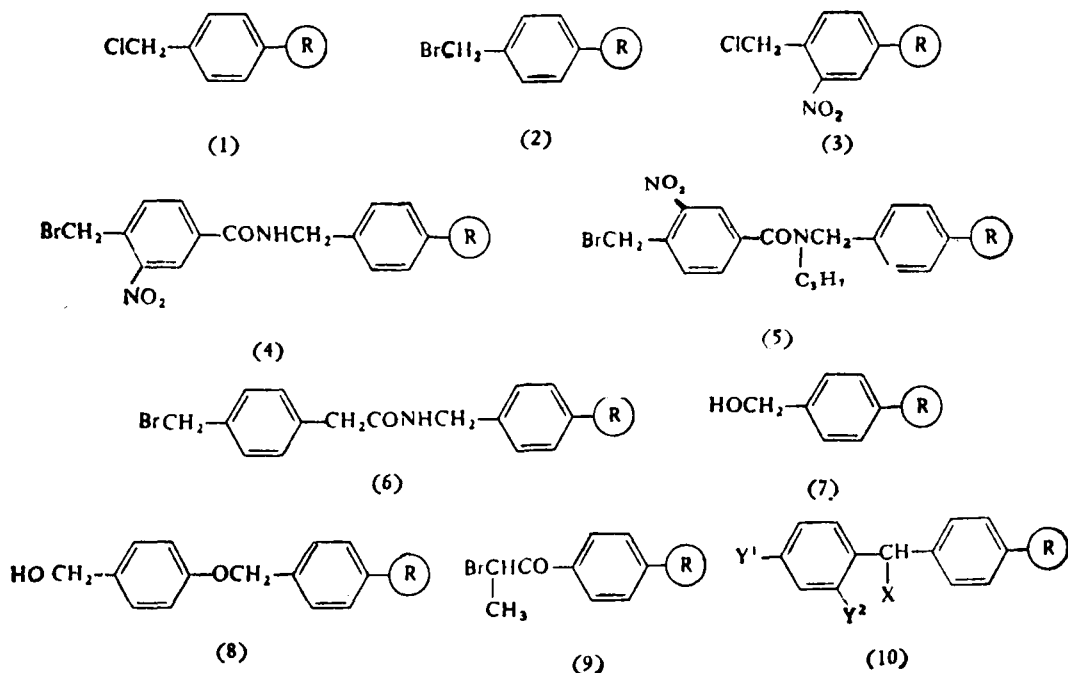
带有 2, 4-二硝基氟苯基团的树脂 (23)^[20] 是为了使用某些氨基酸的侧链接到树脂上去而设计的,象 Cys、Try、His 等氨基酸,用三乙胺做催化剂在 DMF 中室温反应 24 小时,它们的侧链就能接到树脂上去,随后即可从 N-端或 C-端二个方向进行接肽;为了避免副反应,接肽过程中“中和”一步只能用缓冲的 DMF (1N 的甲基吗啉和 0.5N 的醋酸溶液在 DMF 中)。接肽也只能用活化酯法或混合酸酐法,合成的

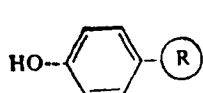
肽可用下述二试剂处理,使之从树脂上脱离:
① β-巯基乙醇-缓冲的 DMF (1:9) 室温 48 小时。
② 0.67M 的 β-巯基乙醇和 17 毫克分子的三乙胺在 DMF 中反应 9 小时。

结 束 语

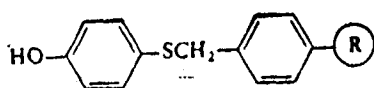
由于固相多肽合成法应用日益广泛,带有各种不同官能团的新型树脂也不断出现,文献报道的已达六十多种。本文仅就其中常见的或具有某种特色的作一简单介绍。目前合成中,小肽多采用氯甲基树脂;随着所要合成的肽的增大,要求有抗酸性更强的树脂。可以预期,随着各种新型树脂的不断出现,多肽合成技术水平将会有很大的提高。

附录 带有不同官能团树脂的结构式

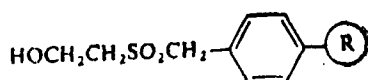




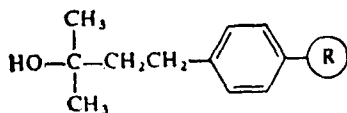
(11)



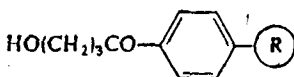
(12)



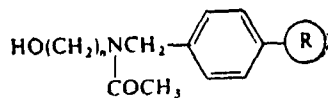
(13)



(14)

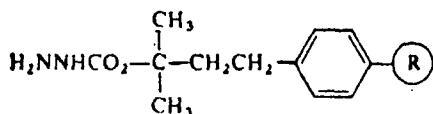


(15)

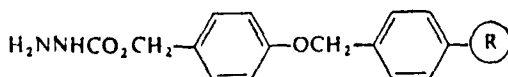


(n = 2, 6)

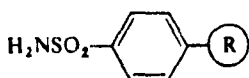
(16)



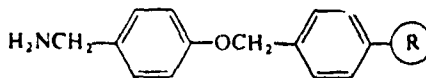
(17)



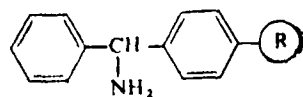
(18)



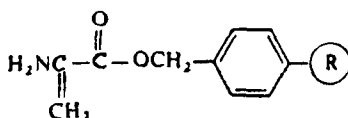
(19)



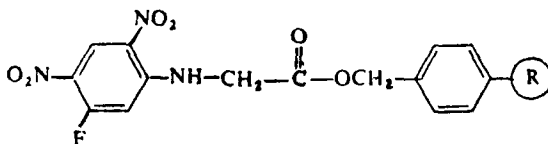
(20)



(21)



(22)



(23)

参 考 文 献

- [1] 杜雨苍:《化学通报》, 6, 37, 1975.
- [2] Gisin, B. F. et al.: *Helv. Chim. Acta.*, **56**, 1476, 1973.
- [3] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149, 1963.
- [4] Bodansky, M. et al.: *Chem. Ind.*, 1597, 1966.
- [5] Chang, J. K. et al.: *J. Org. Chem.*, **41**, 3255, 1976.
- [6] Beyerman, H. C. et al.: *Chem. Commun.*, 1688, 1968.
- [7] Schlatter, J. M.: *Tetrahedron. Lett.*, 2851, 1977.
- [8] Khan, S. A.: *Synthesis*, 750, 1978.
- [9] Wang, S. S.: *J. Org. Chem.*, **41**, 3258, 1976.
- [10] Mizoguchi, T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 1465, 1970.
- [11] Birr, C. et al.: *In Peptide Proceedings of The Fifth American Pept. Symposium.*, B510, Wiley New York.
- [12] Tam, J. P. et al.: *Tetrahedron Lett.*, **46**, 4001, 1977.
- [13] Southard, G. L.: *Tetrahedron Lett.*, 3505, 1969.
- [14] Derek, H. et al.: *Int. J. Pept. and Protein. Res.*, **14**, 177, 1979.
- [15] Davio, L.: *J. Org. Chem.*, **35**, 867, 1970.
- [16] Trsner, G. I. et al.: *Tetrahedron.*, **32**, 1069, 1976.
- [17] Wang, S. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1329, 1973.
- [18] Kenner, G. W. et al.: *Chem. Commun.*, 636, 1971.
- [19] Pietta P. G. et al.: *J. Org. Chem.*, **40**, 2995, 1975.
- [20] Glass, J. D. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 6209, 1972.

[本文于 1983 年 3 月 7 日收到]