

甲酸铵催化转移氢化还原肽链中的芳香硝基

——对氨基苯丙氨酸的间接引入

高永清^{1,2}, 周 宁², 吕玉健², 史卫国², 程卯生¹, 刘克良²

(1. 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 研究了用甲酸铵催化转移氢化法(AF-CTH)对不同类型肽中的芳香硝基的还原行为, 这些肽类化合物包括促黑激素(MSH; 四肽)、促黄体素释放激素(LHRH; 十肽)和强啡肽(十七肽)的类似物. 用HPLC对还原过程进行了跟踪监测, 结果显示, 除含对氯苯丙氨酸残基的LHRH类似物因发生脱氯副反应不适合用AF-CTH还原外, 其余序列还原过程中均无明显副反应发生, 硝基几乎定量地转化成为相应的氨基, 实现了对氨基苯丙氨酸向肽链的间接引入. 另外发现, 硝基还原所需的时间与肽链长度有关, 肽链越长, 还原所需时间越长, 但与其在序列中的位置关系不明显.

关键词 促黑激素; 促黄体素释放激素; 强啡肽; 甲酸铵催化转移氢化; 硝基还原

中图分类号 O621

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)04-0718-05

将非天然氨基酸引入肽类化合物, 可以有效地改善其物理化学性质, 降低肽键被酶降解的几率, 提高其代谢稳定性^[1,2]. 因此, 用非天然氨基酸修饰改造多肽结构始终是多肽药物研究的重要内容之一. 对氨基苯丙氨酸[Phe(4-NH₂)-OH]是苯丙氨酸(Phe)的氨基化衍生物, 作为非天然芳香性氨基酸, 常用于生物活性多肽的结构修饰和改造, 例如, 促黄体素释放激素(LHRH)类似物Acyline和Degarelix等结构中都含有对氨基苯丙氨酸及其衍生物^[3-5].

参照文献[6]方法, 在肽链中引入对氨基苯丙氨酸残基, 采用图1路线1方法进行. 该路线包括: 对硝基苯丙氨酸 α -氨基的保护、苯环硝基的还原、苯环氨基(ω -氨基)的保护、氨基酸缩合和 ω -氨基保护基脱除等多步反应. 其中 ω -氨基和 α -氨基必须采用正交方式保护, 因此, 采用该路线时, 必须对选择的合成树脂和保护策略进行综合考虑, 因此比较繁琐. 例如, 使用Rink amide树脂合成肽链时, 对氨基苯丙氨酸的 α -氨基需要用芴甲氧羰基(Fmoc)保护, 而 ω -氨基则需要用对Fmoc脱除条件(25%哌啶的DMF溶液)稳定的基团保护.

以对硝基苯丙氨酸为原料, 在肽链上还原苯环硝基, 可采用图1路线2所示方法. 理论上, 在肽链中引入对氨基苯丙氨酸残基可以避免对 ω -氨基和 α -氨基的正交保护. 由于路线2中硝基的还原需要在肽链中进行, 所选的还原方法必须转化率高, 反应条件温和. 甲酸铵催化转移氢化(Ammonium

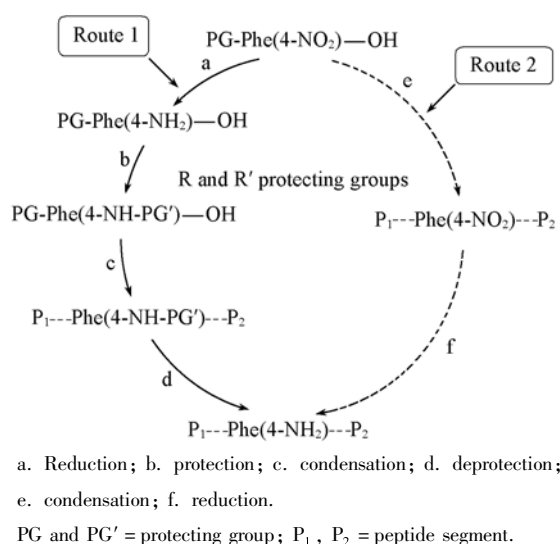


Fig. 1 Reaction routes for introducing Phe(4-NH₂)-OH into a peptide chain

收稿日期: 2009-05-18.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30500629)和国家重大新药创制科技重大专项基金(批准号: 2009ZX09301-002, 2009ZX09103-027)资助.

联系人简介: 刘克良, 男, 研究员, 博士生导师, 从事多肽药物和核酸化学研究. E-mail: keliangliu@yahoo.com

formate catalytic transfer hydrogenation, AF-CTH)是一个能够在室温下将芳香硝基化合物转化为相应的氨基化合物的有效方法^[7]. 它利用甲酸铵代替氢气作为供氢体, 无需使用特殊的氢化反应装置, 而且反应中过量的甲酸铵在 Pd-C 作用下可以迅速分解为氢气、二氧化碳和氨气, 因此具有操作安全, 后处理简单的优点^[8]. 文献[9]报道了利用 AF-CTH 还原二肽中的硝基, 更长肽链中的尝试还未见报道. 因此, 本文以含有对硝基苯丙氨酸残基的促黑激素(MSH)、促黄体素释放激素(LHRH)和强啡肽(Dynorphin: Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Leu⁵-Arg⁶-Arg⁷-Ile⁸-Arg⁹-Pro¹⁰-Lys¹¹-Leu¹²-Lys¹³-Trp¹⁴-Asp¹⁵-Asn¹⁶-Gln¹⁷-NH₂)类似物等几种不同结构、不同长度的多肽为模型, 对 AF-CTH 还原肽链中芳香硝基的可行性及肽链一级结构对还原反应的影响进行了研究. 通过优化反应条件, 顺利得到了含有相应氨基的目标肽, 同时对反应的规律进行了初步探讨.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 HPLC 分析仪: LC-10AT vp plus 泵, SPD-10A vp plus UV-Vis 检测器; Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm); 流动相 A: 0.1% TFA/H₂O, 流动相 B: 0.1% TFA/70% MeCN/H₂O. API3000 质谱仪(ESI-MS); Biotage 快速中压色谱仪.

10% Pd-C 购于 Acros 公司; 甲酸铵购于上海化学试剂公司; MBHA (Methylbenzhydrylamine) 树脂购自天津南开和成科技公司; Boc-D-Phe, Boc-Ser (Bzl), Boc-Leu, Boc-Arg (Tos), Boc-Pro, Boc-D-Ala, Fmoc-Arg (pbf), Fmoc-Asp, Fmoc-Asn, Fmoc-Gln, Fmoc-Gly, Fmoc-Ile, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys, Fmoc-Phe, Fmoc-Pro, Fmoc-Trp 和 Fmoc-Tyr 均购自吉尔生化(上海)公司; Ac-D-Nal 和 Boc-D-Cpa 购于 Bachem 公司; Boc-Aph (Fmoc), Boc-Phe(4-NO₂) 和 Boc-D-Phe(4-NO₂) 根据文献[6]方法自制.

1.2 MSH 类似物 M-1 的还原

由 MBHA 树脂和 Boc 保护策略, 按照标准的固相肽合成方法^[10]得到 M-1 (m/z : 731.7 [M + H]⁺, 分子量 730.8), HPLC 纯度 98.6%.

将 M-1 (50 mg, 0.068 mmol) 溶解在 10 mL 甲醇中, 加入 10% Pd-C (10 mg) 和甲酸铵 (86 mg, 3.4 mmol). 室温搅拌 0.5 h, 滤去 Pd-C, 减压蒸去滤液中的溶剂, 剩余物用少量水溶解, 快速中压纯化, 冷冻干燥, 得到 38.8 mg 目标肽 AM-1 (m/z : 701.9 [M + H]⁺; 分子量 700.8), HPLC 纯度 98.2%, 收率 80%.

1.3 LHRH 类似物 L-1 的还原

由 MBHA 树脂和 Boc 保护策略, 参考文献[11,12]方法合成 L-1 (m/z : 789.4 [M + 2H]²⁺, 1578.5 [M + H]⁺; 分子量 1577.2), HPLC 纯度 98.0%.

将 L-1 (50 mg, 0.032 mmol) 溶解在 10 mL 甲醇中, 加入 10% 的 Pd-C (10 mg) 和甲酸铵 (100 mg, 1.6 mmol), 室温搅拌. HPLC 监测, 原料消失后(约 2 h), 得到 32.6 mg 目标肽 AL-1 (m/z : 774.5 [M + 2H]²⁺, 1548.9 [M + H]⁺; 分子量 1547.2), HPLC 纯度 98.7%, 收率 65%.

1.4 LHRH 类似物 L-2 的还原

由 MBHA 树脂和 Boc 保护策略, 参考文献[11,12]方法合成 L-2 (m/z : 772.2 [M + 2H]²⁺, 1544.5 [M + H]⁺; 分子量 1542.7), HPLC 纯度 98.3%.

将 L-2 (50 mg, 0.032 mmol) 溶解在 10 mL 甲醇中, 加入 10% 的 Pd-C (10 mg) 和甲酸铵 (100 mg, 1.6 mmol), 室温搅拌. HPLC 监测, 原料消失后(约 2 h), 得到 39.9 mg 目标肽 AL-2 (m/z : 757.9 [M + 2H]²⁺, 1514.3 [M + H]⁺; 分子量 1512.8), HPLC 纯度 98.3%, 收率 81%.

1.5 强啡肽类似物 D-1 的还原

由 Rink amide resin 树脂和 Fmoc 合成策略, 按照固相方法^[13]合成得到 D-1 (m/z : 752.0 [M + H]³⁺, 1127.4 [M + 2H]²⁺, 分子量 2252.8), HPLC 纯度 98.6%.

将 D-1 (10 mg, 0.0045 mmol) 溶解在 5 mL 甲醇中, 加入 10% 的 Pd-C (2 mg) 和甲酸铵 (29 mg, 0.27 mmol), 室温搅拌. HPLC 监测, 原料消失后(约 2.5 h), 得到 8.7 mg 目标肽 AD-1 (m/z : 742.4 [M +

3H]³⁺, 1112.5[M+2H]²⁺; 分子量 2223), HPLC 纯度 98.5%, 收率 83%.

1.6 强脂肪类似物 D-2 的还原

由 Rink amide resin 树脂和 Fmoc 合成策略, 按照固相方法^[13] 合成得到 D-2 (*m/z*: 745.8 [M+H]³⁺, 1118.2 [M+2H]²⁺; 分子量 2234.4), HPLC 纯度 98.3%.

将 D-2 (10 mg, 0.0045 mmol) 溶解在 5 mL 甲醇中, 加入 10% 的 Pd-C (2 mg) 和甲酸铵 (15 mg, 0.27 mmol), 室温搅拌. HPLC 监测, 原料消失后 (约 2.5 h), 得到 8.1 mg 目标肽 AD-2 (*m/z*: 735.8 [M+3H]³⁺, 1103.7 [M+2H]²⁺; 分子量 2205.4), HPLC 纯度 98.3%, 收率 82%.

2 结果与讨论

本文共合成了 5 条含有硝基的肽序列用于 AF-CTH 还原研究, 得到了 5 个目标肽 (表 1, 对硝基苯丙氨酸和对氨基苯丙氨酸用黑体表示). 由于甲醇具有良好的质子传递能力, 常被用作 AF-CTH 溶剂, 且对大多数多肽都有很好的溶解性, 因此, 本文的还原反应均选择在甲醇中完成. 以 10% 的 Pd-C 作为催化剂, 其与原料的质量比为 1:5. 由于甲酸铵会同时发生自身分解, 为保证硝基能够完全反应, 甲酸铵需过量使用, 因此原料与甲酸铵摩尔比为 1:50.

Table 1 Sequences of synthetic peptides

Peptide	Sequence*
M-1	Ac-His ¹ - Phe(4-NO₂)² -Arg ³ -Trp ⁴ -NH ₂ A
AM-1	Ac-His ¹ - Phe(4-NH₂)² -Arg ³ -Trp ⁴ -NH ₂
L-1	Ac-D-Nal ¹ -D-Cpa ² -D-Phe ³ -Ser ⁴ -Phe[4-NH-CO-N(CH ₂ CH ₂) ₂ O] ⁵ - D-Phe(4-NO₂)⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala ¹⁰ -NH ₂
AL-1	Ac-D-Nal ¹ -D-Cpa ² -D-Phe ³ -Ser ⁴ -Phe[4-NH-CO-N(CH ₂ CH ₂) ₂ O] ⁵ - D-Phe(4-NH₂)⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala ¹⁰ -NH ₂
L-2	Ac-D-Nal ¹ -D-Phe ² -D-Phe ³ -Ser ⁴ -Phe[4-NH-CO-N(CH ₂ CH ₂) ₂ O] ⁵ - D-Phe(4-NO₂)⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala ¹⁰ -NH ₂
AL-2	Ac-D-Nal ¹ -D-Phe ² -D-Phe ³ -Ser ⁴ -Phe[4-NH-CO-N(CH ₂ CH ₂) ₂ O] ⁵ - D-Phe(4-NH₂)⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala ¹⁰ -NH ₂
D-1	Ac-Tyr ¹ -Gly ² -Gly ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Arg ⁶ -Arg ⁷ -Ile ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ - D-Phe(4-NO₂)¹¹ -Leu ¹² -Lys ¹³ -Trp ¹⁴ -Asp ¹⁵ -Asn ¹⁶ -Gln ¹⁷ -NH ₂
AD-1	Ac-Tyr ¹ -Gly ² -Gly ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Arg ⁶ -Arg ⁷ -Ile ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ - D-Phe(4-NH₂)¹¹ -Leu ¹² -Lys ¹³ -Trp ¹⁴ -Asp ¹⁵ -Asn ¹⁶ -Gln ¹⁷ -NH ₂
D-2	Ac-Tyr ¹ -Gly ² -Gly ³ - D-Phe(4-NO₂)⁴ -Leu ⁵ -Arg ⁶ -Arg ⁷ -Ile ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ -Lys ¹¹ -Leu ¹² -Lys ¹³ -Trp ¹⁴ -Asp ¹⁵ -Asn ¹⁶ -Gln ¹⁷ -NH ₂
AD-2	Ac-Tyr ¹ -Gly ² -Gly ³ - D-Phe(4-NH₂)⁴ -Leu ⁵ -Arg ⁶ -Arg ⁷ -Ile ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ -Lys ¹¹ -Leu ¹² -Lys ¹³ -Trp ¹⁴ -Asp ¹⁵ -Asn ¹⁶ -Gln ¹⁷ -NH ₂

* Abbreviation: Cpa; 4-chlorophenylalanine; Nal; 3-(2-naphthyl) alanine.

2.1 四肽序列中硝基的还原

选择四肽 MSH 类似物 M-1 作为模型肽, 对 AF-CTH 的还原能力进行了探讨. 将 M-1 溶解在甲醇中, 加入 10% Pd-C 和过量的甲酸铵后, 利用 HPLC 对反应进行跟踪监测. 图 2 给出了 0, 15 和 30 min 3 个时间点的监测结果. 可以看出, 在 30 min 内, M-1 (峰 1, *m/z*: 731.7 [M+H]⁺) 已经完全转化为相应的氨基产物 AM-1 (峰 3, *m/z*: 701.9 [M+H]⁺), 还原过程经过了一个中间体 (峰 2) 的转变, 没有明显的副产物生成. 通过峰面积归一化法计算 AM-1 的含量大于 98%.

2.2 十肽序列中硝基的还原

文献[14]报道 AF-CTH 会使不稳定的卤素原子氢解脱除, 在多肽药物研究中, 也常会遇到结构中含有氟和氯等卤素原子的序列, 例如, 许多 LHRH 拮抗剂的 2 位采用对氯苯丙氨酸等修饰. 因此有必要考察 AF-CTH 对肽链中卤素原子的影响. 为此合成了 2 个 2 位分别为对氯苯丙氨酸和苯丙氨酸修饰的 LHRH 十肽类似物 L-1 和 L-2, 并以其为模型进行对照还原. 反应过程通过 HPLC 跟踪监测, 如图 3(A) 所示. 在峰 1 (原料) 变小的过程中, 峰 2 (还原中间体) 和峰 3 逐渐变大, 1 h 后, HPLC 监测结果中出现峰 4, 并且逐渐变大. 2 h 后, 峰 1 和峰 2 均已消失, 只剩下了峰 3 和峰 4, 经过质谱分析,

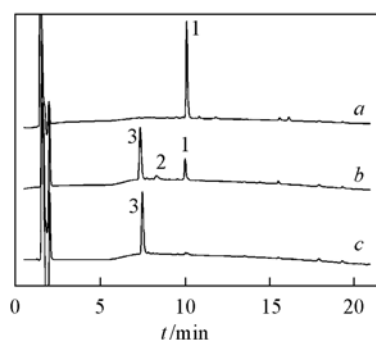


Fig. 2 Analysis of reduction of M-1 by HPLC

t/min: a. 0; b. 15; c. 30. Peak 1: M-1; peak 2: intermediate; peak 3: AM-1. HPLC gradient: 0—15 min, 20%—100% B; 15—16 min, 100% B; 16—17 min, 100%—20% B; 17—22 min, 20% B with 1 mL/min at 210 nm.

它们的 $[M + H]^+$ 值分别为 m/z 1548.9 和 1514.5, 前者对应目标产物 AL-1, 后者的 m/z 比前者少了 34.4, 为氯原子和氢原子的原子量之差, 基本可以断定它为脱氯副产物。

为研究催化脱氯反应, 将产物 L-2 在相同条件下进行还原, 反应过程的 HPLC 监测如图 3(B) 所示。质谱分析发现, 还原过程中除了原料(峰 1')、还原中间体(峰 2') 和目标产物 AL-2(峰 3', m/z : 1514.3 $[M + H]^+$)外, 并没有其它产物峰出现, 这说明 AF-CTH 同样可以高效地将十肽 L-2 中的硝基还原为相应的氨基。另外, 目标产物 AL-2 的质谱分析结果和色谱行为与上述的副产物一致, 也证实了在 L-1 的 AF-CTH 还原中, 确实发生了氯原子脱落副反应, 表明含芳香硝基的肽链若同时含有氯等卤素原子时, 则不能使用 AF-CTH 还原。

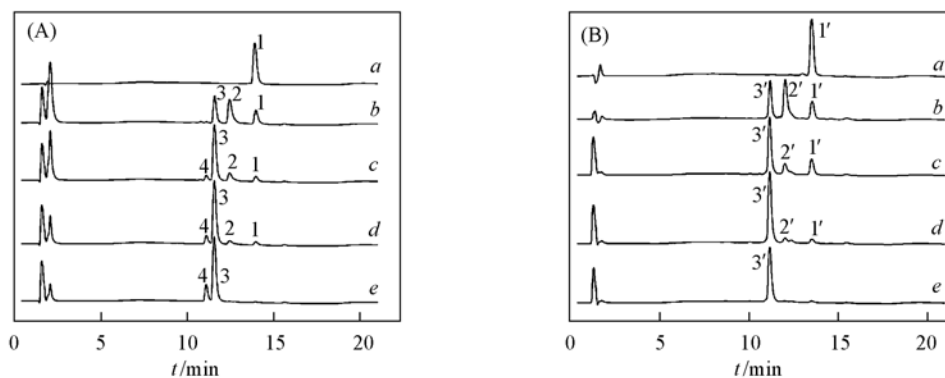


Fig. 3 Analysis of reduction of L-1(A) and L-2(B) by HPLC

Reaction time/h: a. 0; b. 0.25; c. 0.5; d. 1; e. 2. (A) Peak 1: L-1; peak 2: intermediate; peak 3: AL-1; peak 4: byproduct; (B) peak 1': L-2; peak 2': intermediate; peak 3': AL-2. HPLC gradient: 0—10 min, 30%—100% B; 10—13 min, 100% B; 13—17 min, 100%—30% B; 17—23 min, 30% B with 1 mL/min at 210 nm.

2.3 十七肽序列中硝基的还原

为研究此还原反应对不同肽链的普适性, 我们又设计了 D-1 和 D-2 两个强啡肽类似物的还原反应。强啡肽是一个被广泛研究的生物活性肽, 由 17 个氨基酸残基构成, D-1 和 D-2 是由 *D*-Phe(4-NO₂) 分别替换其 11 位和 4 位残基得到的。HPLC 监测结果(图 4)显示, 在 2.5 h 内, 原料(峰 1 和 1') 和还原中间体(峰 2 和 2') 完全消失, 且反应过程中没有明显的副产物生成。虽然 *D*-Phe(4-NO₂) 在 2 条肽链中的位置不同, 但它们完全转化为 *D*-Phe(4-NH₂) 所用的时间没有显著差异。

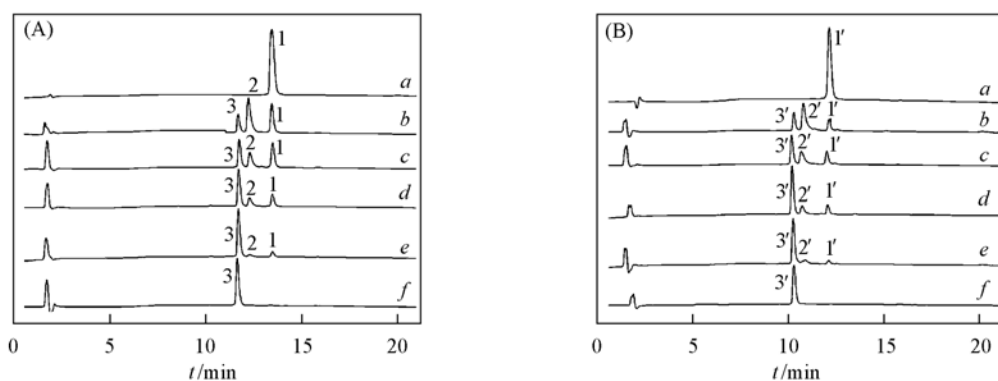


Fig. 4 Analysis of reduction of D-1(A) and D-2(B) by HPLC

Reaction time/h: a. 0; b. 0.25; c. 0.5; d. 1; e. 2; f. 2.5. (A) Peak 1: D-1; peak 2: intermediate; peak 3: AD-1; (B) peak 1': D-2; peak 2': intermediate; peak 3': AD-2. HPLC gradient: 0—10 min, 30%—100% B; 10—13 min, 100% B; 13—17 min, 100%—30% B; 17—23 min, 30% B with 1 mL/min at 210 nm.

以上实验证实了 AF-CTH 可以对四肽、十肽和十七肽 3 种序列中的芳香硝基高效还原。以甲醇为溶剂时, 肽链中硝基还原所需的时间随着肽链长度的增加而增加。当结构中只含有一个对硝基苯丙氨酸残基时, 文献[9]报道二肽还原 0.5 h 可以完成, 收率达到 97%, 本文的四肽还原也可以在 0.5 h 内完成, 但十肽和十七肽则需要更长的时间, 收率略有下降, 但从 HPLC 分析结果中可以看出, 四肽、十

肽和十七肽中硝基的还原转化都近乎完全;从2条十七肽的还原反应中可知,硝基在序列中的位置不同,对还原反应速度影响不明显.此外,对于含有对氯苯丙氨酸的肽类化合物,由于催化反应会引起氯原子的脱除,因此,不适合用本文所述反应及条件进行还原.

参 考 文 献

- [1] Sewald N., Takubke H. D. . Translated by LIU Ke-Liang(刘克良), HE Jun-Lin(何军林). Peptides: Chemistry and Biology(肽:化学与生物学)[M], Beijing: Science Press, 2005: 268—296
- [2] ZHOU Ning(周宁), FU Hui-Jun(付慧君), RONG Di(荣嫡), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(4): 668—671
- [3] Jiang G. C., Stalewski J., Galyean R., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2001, **44**: 453—467
- [4] Samant M. P., Jozsef G., Hong D. J., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2005, **48**(15): 4851—4860
- [5] Samant M. P., Hong D. J., Croston G., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2006, **49**(12): 3536—3543
- [6] Theobald P., Porter J., Rivier C., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 1991, **34**: 2395—2402
- [7] Ram S., Ehrenkauffer R. E.. Tetra. Lett. [J], 1984, **25**(32): 3415—3418
- [8] Rajagopal S., Spatola A. F.. J. Org. Chem. [J], 1995, **60**(5): 1347—1355
- [9] Dean Y., Maeda F. B., Thomas F. M., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2000, **43**(26): 5044—5049
- [10] Jerry R. H., Rayna M. B., Xiang Z. M., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2002, **45**: 2801—2810
- [11] ZHOU Ning(周宁), FU Hui-Jun(付慧君), CHENG Jun-Ping(程军平), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(6): 1141—1144
- [12] Gao Y. Q., Zhou N., Lü Y. J., *et al.*. Chin. Chem. Lett. [J], 2009, **20**: 668—671
- [13] Avram G., Walter F., Louise I. L., *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1981, **78**(11): 7219—7223
- [14] Mohmed K. A., Douglas S. B., Gordon R. J., *et al.*. J. Org. Chem. [J], 1989, **54**(6): 1284—1289

Reduction of the Aromatic Nitro Group in Peptide by Ammonium Formate Catalytic Transfer Hydrogenation

—— An Indirect Introduction of *p*-Aminophenylalanine into Peptide Chain

GAO Yong-Qing^{1,2}, ZHOU Ning², LÜ Yu-Jian², SHI Wei-Guo², CHENG Mao-Sheng¹, LIU Ke-Liang^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract The *p*-aminophenylalanine was a useful functional amino acid in the design of peptide drugs, and it was usually prepared by the reduction of *p*-nitrophenylalanine. Ammonium formate catalytic transfer hydrogenation(AF-CTH) was confirmed feasible in transforming the aromatic nitro group into the amino group in a dipeptide, and the orthogonal protection for *p*-aminophenylalanine in traditional route could be avoided in this method. Therefore, we wondered if this method could be widely used for the reduction of *p*-nitrophenylalanine residue in various peptides, such as the MSH(tetrapeptide), LHRH(decapeptide) and dynorphin(heptadecapeptide) analogues. The reduction processes were monitored by HPLC and the results showed that all sequences could be smoothly transformed into the desired products, except the LHRH analogue containing *p*-chlorophenylalanine due to the dechlorination. It suggested that AF-CTH was an effective method for the reduction of the nitro group in a peptide. In addition, it was found that the reduction rate of the nitro group was slower in longer peptide and not obviously correlative to its site in peptide.

Keywords Melanocyte-stimulating hormones (MSH); Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH); Dynorphin; Ammonium formate catalytic transfer hydrogenation; Nitro group reduction

(Ed.: H, J, Z)