

·研究简报·

以甘-谷二肽为构筑单元的扇形树状分子的合成与表征*

李武松 吉 岩 贾欣茹** 王冰冰

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

危 岩

(Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia, PA 19104, USA)

关键词 甘氨酸-谷氨酸, 树枝状分子, 多肽合成, MALDI-TOF

以天然氨基酸为结构单元的树枝状化合物已有不少报道.例如,Denkewalter等^[1]首次报道了以氨基酸(*L*-赖氨酸)为结构单元的1~10代树枝状高分子的合成.Chapman等^[2]采用发散法合成了核心为聚氧乙烯(PEO)长链的树枝状*t*-Boc-聚(α , ϵ -*L*赖氨酸).Kim等^[3]报道了两种具有光活性的由缬氨酸或亮氨酸组成的小肽树状分子.Tam等合成了一系列具有各种潜在生物学用途的肽链结构树枝状分子^[4,5].

以天然氨基酸为结构单元构筑的多肽树枝状高分子具有很多优点^[6].(1)具有类似蛋白质的结构与形状,可作为受体与天然配体相互作用;(2)具有多个外官能团,可与多个配体分子同时进行作用;(3)具有良好的生物相容性,细胞毒性小;(4)适当的结构赋予其较好的水溶性;(5)由于其支化结构的作用,减少了内部肽键受到蛋白质水解酶作用的机会,因而具有较强的抗水解能力;(6)具有较好的生物降解性能.这些优点使得以氨基酸为结构单元的树枝状高分子在生物学领域有广泛的应用前景.如可作为医学诊断上的造影剂,用在核磁共振成像、核磁共振血管造影术^[7]、荧光成像^[8]、血清诊断上;作为药物、DNA、多肽、蛋白质的运输载体^[7];用于抗细菌、病毒、寄生虫的疫苗设计,作为人造酶^[9-13]和抑制传染^[14,15]、炎症反应^[16]、自体免疫疾病及癌症转移的药物使用;用于构筑脂质体和生物相容的表面活性剂^[2]等等.我们曾合成了不同结构的扇形树枝状分子,如扇形PAMAM分子^[17],以甘氨酸(Gly)和天冬氨酸(Asp)为结构单元的1~3代扇形多

肽树状分子等^[18].研究了以Gly和Asp组成的第3代AB₃(含有8个末端)分子的自组装行为.结果表明,AB₃可以自组装形成有机凝胶,并且在苯甲醇中表现出溶致型液晶的行为.本文采用端基保护、脱保护、DCC缩合的方法合成了以甘氨酸和谷氨酸(简称甘-谷)为结构单元的1~3代扇形多肽树状分子.所得各代分子经分析表明其结构精确,分散度单一,基本不存在结构缺陷.相关的性能研究正在进行之中.相同结构树枝状分子的合成及相关性能的研究尚鲜见有报道.

1 试剂

L-谷氨酸(生化试剂,北京化学试剂公司)、对甲苯磺酸(分析纯,北京化学试剂公司)、苯甲醇(分析纯,天津化学试剂六厂分厂)、叔丁氧基羰基(*t*-Boc)保护的甘氨酸(*t*-Boc-glycine)(99%,Fluka试剂公司)、DCC(二环己基碳酰亚胺)(化学纯,国药集团化学试剂公司)、钨碳催化剂(北京化学试剂公司)、三氟乙酸(99%,ACROS ORGANICS试剂公司)、*N*-甲基吗啡啉(化学纯,中国医药集团上海化学试剂公司)等不需经过处理直接使用.四氢呋喃、无水乙醇等溶剂均需经过干燥、蒸馏等提纯后使用.

2 甘-谷扇形树状分子AB₃(*G*=1)的合成

将14.71 g (0.1 mol) *L*-谷氨酸和20.92 g (0.11 mol)对甲苯磺酸混合置于1000 mL烧瓶中,加入100 mL苯甲醇和600 mL苯,加热回流,5天后停止反应.加入300~400 mL石油醚,振荡混匀,置于冰箱中冷冻过夜,经抽滤得到浅黄色固体.重结晶后,得白色固体(1).

* 2005-11-14 收稿,2006-02-15 修稿;国家自然科学基金(基金号 20374002;20574001)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: xjia@pku.edu.cn

将 10 g (0.02 mol) 固体(1)和 1.12 g (0.02 mol) KOH 分别溶于甲醇配成溶液 a 和 b, 在冰盐浴冷却下, 将 b 滴入 a 中, 反应 1 h 后, 过滤除掉不溶物, 滤液经旋转蒸发除去溶剂, 加入适量氯仿, 再次滤掉不溶物, 滤液经干燥后加入 3.5 g (0.02 mol) *t*-Boc-甘氨酸(Gly)(溶液 c), 置于冰盐浴中冷却, 将 4.54 g (0.022 mol) DCC-氯仿冷冻液缓慢滴加到溶液 c 中, 滴加完毕后置于冰箱中继续反应 48 h. 将反应体系升温到室温, 经过滤除掉白色固体, 滤液旋转蒸发除去氯仿后, 用四氢呋喃/二氯甲烷混合溶剂进行柱分离, 得到无色透明油状液体, 即为目标产物 AB₂(2), 产率 80%.

3 甘-谷扇形树状分子 AB₄(G=2)的合成

取 1 g (2.06 mmol) AB₂ 溶于重蒸的无水乙醇中, 加入 0.2 g 钨碳催化剂, 通入氢气, 室温搅拌反应 48 h. 将钨碳过滤掉后, 滤液旋转蒸发除去溶剂, 得到羧端脱保护的 AB₂(3).

取 2 g (4.13 mmol) AB₂ 溶于二氯甲烷中, 滴入三氟乙酸/二氯甲烷溶液, 室温下搅拌反应 1 ~ 2 h, 旋转蒸发除去二氯甲烷和部分三氟乙酸, 再用无水乙醚洗涤, 旋蒸后得到的油状液体为羧端脱 Boc 保护的 AB₂-三氟乙酸盐(4).

将 3.28 g (6.58 mmol) (4) 溶于氯仿, 冰盐浴冷却下滴入 2.2 mL (19.9 mmol) *N*-甲基吗啡啉, 搅拌反应 1 h 后, 加入含有 1 g (3.29 mmol) (3) 的氯仿溶液, 搅拌均匀后, 冰盐浴冷却下缓慢滴入含有 1.63 g DCC (7.9 mmol) 的氯仿溶液, 在冰盐浴中继续搅拌反应 1 h, 并置于冰箱中继续反应 48 ~ 60 h. 然后将反应体系逐渐升温到室温, 过滤、旋转蒸发后, 用丙酮/乙酸乙酯的混合溶剂进行柱分离, 得到无色透明的油状液体, 即为目标产物 AB₄(5), 产率 60%.

4 甘-谷扇形树状分子 AB₈(G=3)的合成

取 1 g (0.96 mmol) AB₄ 溶于氯仿, 将三氟乙酸/氯仿混合溶液滴入上述溶液, 室温搅拌反应 1 ~ 2 h, 旋转蒸发除去氯仿和三氟乙酸, 得到羧端脱 Boc 保护的 AB₄-三氟乙酸盐(6).

将 6.92 g (6.58 mmol) (6) 溶于氯仿, 冰盐浴冷却下滴入 6.6 mL (59.7 mmol) *N*-甲基吗啡啉, 搅拌反应 1 h 后, 依次加入含有 1 g (3.29 mmol) (3) 的氯仿溶液及含有 1.63 g DCC (7.9 mmol) 的氯仿溶液, 保持温度在 0 °C 继续反应 96 h. 过滤除掉反应液中的固体, 将滤液滴入到大量的无水乙

醚中, 沉淀物经洗涤后, 得到的白色固体即为纯净的目标产物 AB₈(7), 产率 50%.

5 测试与表征

Vario EL (德国 Elementar Analysensysteme GmbH) 元素分析仪进行元素分析测定. Magna-IR750 (Nicolet 公司) 型傅立叶变换红外光谱仪, 用 KBr 压片进行红外光谱测定. ARX400 MHz (Bruker 公司) 和 Mercury Plus 300 MHz (Varian 公司) 核磁共振波谱仪, 以四甲基硅(TMS)作为内标, CDCl₃ 和 *d*₆-DMSO 为溶剂在室温下进行核磁共振谱和碳谱的测定. ZAB.HS (Micromass 公司) 双聚焦高分辨有机质谱仪, 以 EI 离子源进行质谱测定. BrukerBIFLEX III time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) 进行 MALDI-TOF 测定.

6 讨论

目标产物 AB₂、AB₄、AB₈ 的合成路线如反应式 1 所示.

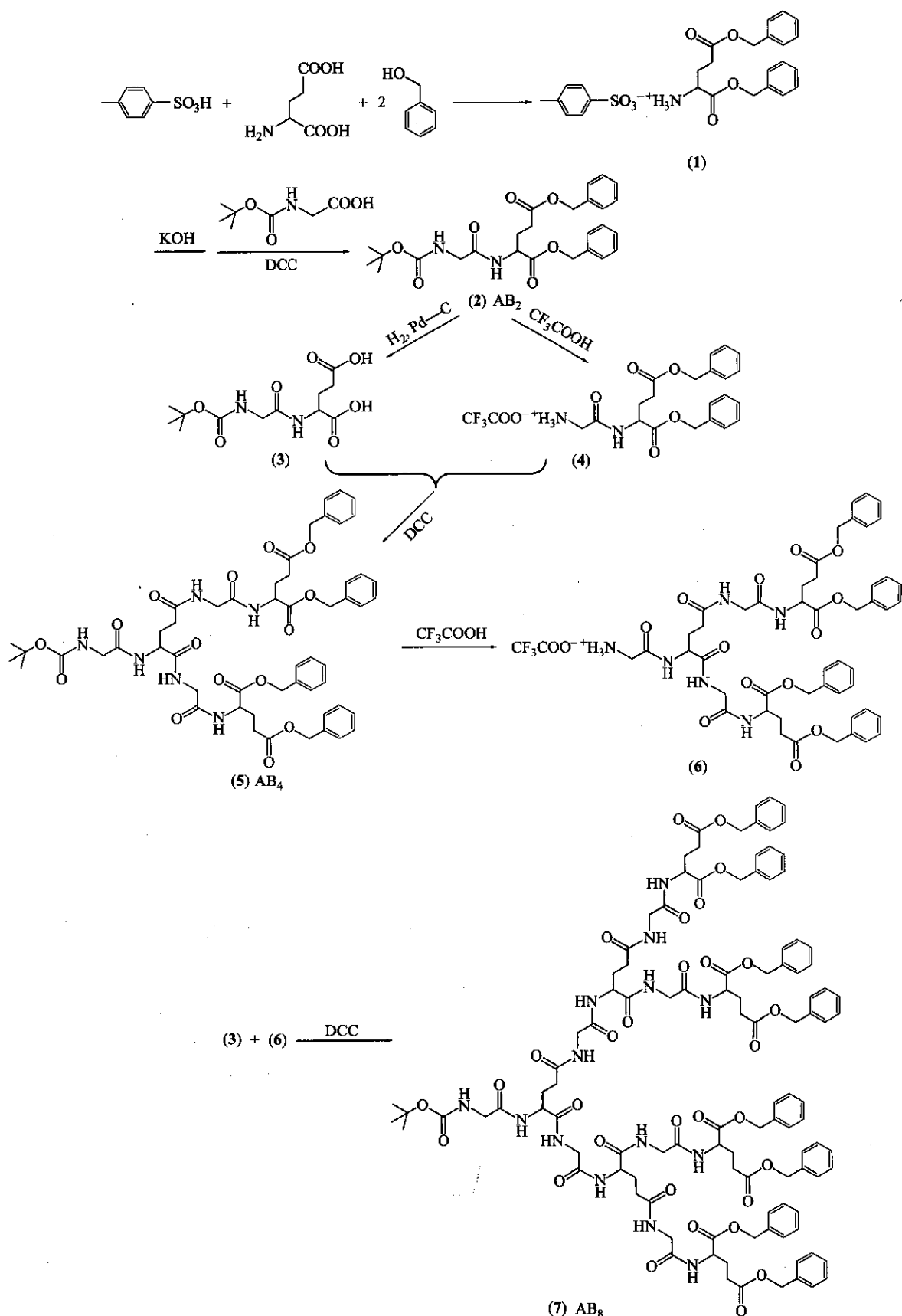
利用元素分析、¹H-NMR、¹³C-NMR、FTIR、EI-MS、MALDI-TOF MS 等手段对所合成的甘-谷结构树枝状分子进行了结构表征.

6.1 目标分子的元素分析 各代产物的元素分析结果如下表 1 所示. 从表 1 可以看出, 所得各代树状分子的组成其实验测定值与理论值接近, 符合目标产物的结构.

Table 1 Elemental analysis of AB₂, AB₄ and AB₈

Compounds	Calculated (%)			Found (%)		
	C	H	N	C	H	N
AB ₂ (C ₂₆ H ₃₂ N ₂ O ₇)	64.45	6.66	5.78	63.68	6.73	5.73
AB ₄ (C ₅₄ H ₆₄ N ₆ O ₁₅)	62.54	6.22	8.10	61.74	6.51	8.05
AB ₈ (C ₁₁₀ H ₁₂₈ N ₁₄ O ₃₁)	61.67	6.02	9.15	60.96	6.12	9.29

6.2 目标分子的 FTIR 分析 对所得产物进行了 FTIR 测定. 图谱分析表明, 在 3326 cm⁻¹、3300 cm⁻¹、3303 cm⁻¹ 处出现的强吸收峰为 AB₂、AB₄、AB₈ 分子中酰胺键(N—H)的伸缩振动吸收; 1738 cm⁻¹ ~ 1736 cm⁻¹ 处出现的吸收峰为上述目标分子末端酯键羰基伸缩振动吸收; AB₂ 在 1682 cm⁻¹、1521 cm⁻¹ 处、AB₄ 在 1655 cm⁻¹、1536 cm⁻¹ 处、AB₈ 在 1655 cm⁻¹、1536 cm⁻¹ 处的吸收峰分别对应于所合成化合物中酰胺羰基的 I、II 吸收谱带. 由于 AB₄ 和 AB₈ 分子具有更强的氢键作用, 导致酰胺键(N—H)的伸缩振动吸收峰以及酰胺羰基谱带 I 的吸收峰, 其波数比较于 AB₂ 分子变小, 而酰胺

Scheme 1 Synthesis of amino acid-based dendrons AB_2 , AB_4 and AB_8

羰基 II 的吸收峰波数则相应地增大. 这些结果支持所合成目标产物的结构.

6.3 目标分子的 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 分析 图 1 给出了第 3 代产物 AB_8 分子的 ^1H -NMR 谱图. 其中各组氢质子的归属分别为 (d_6 -DMSO, δ): 1.36 (9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1.88 ~ 2.45 (28H, $14-\text{CH}_2-$), 3.69 ~ 3.78 (14H, $7-\text{CH}_2-$), 4.25 ~ 4.38 (7H, $7-\text{CH}$), 5.07 ~ 5.11 (16H, $8-\text{CH}_2-$), 6.93 ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 7.30 ~ 7.38 (40H, $8-\text{C}_6\text{H}_5$), 8.05 ~ 8.35 (13H, $13\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$). 对 AB_2 和 AB_4 分子也分别进行了 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 分析. AB_2 各组氢的化学位移分别为 (CDCl_3 , δ): 1.43 (9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 2.00 ~ 2.45 (4H, $2-\text{CH}_2-$), 3.78 (2H, $-\text{CH}_2-$), 4.65 ~ 4.70 (1H, $-\text{CH}$), 5.05 ~ 5.14 (4H, $2-\text{CH}_2-$), 5.27 (1H, $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 6.96 (1H, $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 7.29 ~ 7.36 (10H, $2-\text{C}_6\text{H}_5$). AB_4 各组氢的化学位移分别为 (CDCl_3 , δ): 1.41 (9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 2.00 ~ 2.44 (12H, $6-\text{CH}_2-$), 3.82 ~ 3.86 (6H, $3-\text{CH}_2-$), 4.62 ~ 4.65 (3H, $-\text{CH}$), 5.06 ~ 5.14 (8H, $4-\text{CH}_2-$), 5.45 (1H, $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 7.18 ~ 7.26 (2H, $2\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 7.31 ~ 7.36 (20H, $4-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.49 (1H, $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 7.63 (1H, $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$), 8.13 (1H, $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$). 这些分析结果与目标产物的结构相符合. 图 2 为第 3 代产物 AB_8 分子的 ^{13}C -NMR 谱图. 各组化学位移的归属分别为 (d_6 -DMSO, δ): 26.08 ($-\text{CH}_2-$), 27.89 ~ 28.13 ($\text{OC}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$), 29.71 ~ 31.55 ($-\text{CH}_2-$), 41.62 ~ 41.93 ($-\text{CH}_2-$), 51.21 ~ 52.29 ($-\text{CH}$), 65.53 ~ 66.03 ($-\text{CH}_2-$), 78.08 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 127.76 ~ 128.40 ($-\text{C}_6\text{H}_5$ 上不与 $-\text{CH}_2-$ 相连的碳), 135.84 ~ 136.08 ($-\text{C}_6\text{H}_5$ 上与 $-\text{CH}_2-$ 相连的碳), 155.80 (Boc 中的 $\text{O}=\text{C}$),

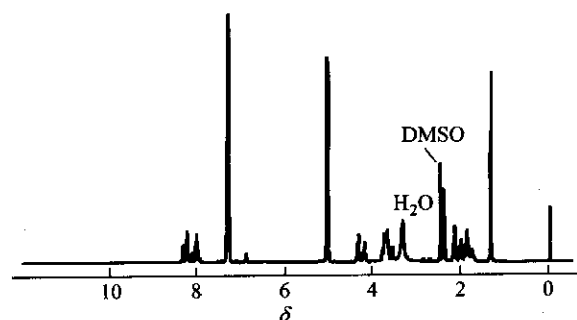


Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of AB_8



Fig. 2 ^{13}C -NMR spectrum of AB_8

168.83 ~ 171.97 ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$ 和 $\text{O}-\text{C}=\text{O}$). 对 AB_2 和 AB_4 分子进行 ^{13}C -NMR 分析, 其谱图同样显示出与预期结构相对应的各组碳的化学位移. 以上 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 的分析数据证实所合成产物与预期目标分子结构一致.

6.4 目标分子的 MS、MALDI-TOF 分析 目标产物 AB_2 的质谱图显示其分子离子峰为 484, 这与理论计算分子量 484.54 吻合.

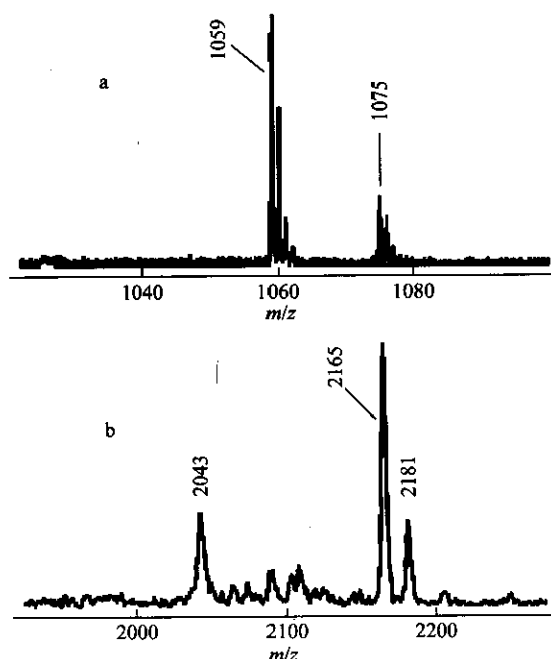


Fig. 3 MALDI-TOF spectra of AB_4 (a) and AB_8 (b)

图 3 (a) 为 AB_4 (理论分子量为 1036) 的 MALDI-TOF 谱图. 图谱显示在 m/z , 1059、1075 处有信号出现. 这些信号经分析分别为 $1075 = \text{K}^+ + (\text{AB}_4 \text{ 的分子量})$; $1059 = \text{Na}^+ + (\text{AB}_4 \text{ 的分子量})$.

图 3 (b) 为 AB_8 (理论分子量为 2142) 的 MALDI-TOF 质谱图. 图谱显示在 m/z , 2043、2165、2181 处有信号出现. 这些信号经分析分别为 $2181 = \text{K}^+ + (\text{AB}_8 \text{ 的分子量})$; $2165 = \text{Na}^+ + (\text{AB}_8 \text{ 的分子量})$; $2043 = (\text{AB}_8 \text{ 的分子量}) - (t\text{-Boc})$.

由此可以得出结论, 合成得到的产物与所设

计的 AB_2 、 AB_4 、 AB_8 的结构相符。

综合以上元素分析、FTIR、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 、质谱和 MALDI-TOF 分析结果说明,所合成的以甘氨酸和谷氨酸为结构单元的扇形树状分子结构精确、分散度单一、基本不存在结构缺陷。由

于多肽树状分子的诸多优点,此种由天然氨基酸组成的扇形树状分子有望在生物医学领域,如生物医学诊断试剂、蛋白质模拟、靶向药物运载、基因传递等诸多方面获得应用^[19]。

REFERENCES

- 1 Denkwalter R G, Kole J, Lukasavage W J. US patent, 4289872. 1981-09-15
- 2 Chapman T M, Hillyer G L, Mahan E J, Shaffer K A. J Am Chem Soc, 1994, 116: 11195 ~ 11196
- 3 Kim Y, Zeng F, Zimmerman S C. Chem Eur J, 1999, 5: 2133 ~ 2138
- 4 Zhang L, Tam J P. J Am Chem Soc, 1997, 119: 2363 ~ 2370
- 5 Tam J P, Lu Y A, Yang J L. Eur J Biochem, 2002, 269: 923 ~ 932
- 6 Crespo L, Sanclimens G, Pons M, Giralt E, Royo M, Albericio F. Chem Rev, 2005, 105: 1663 ~ 1681
- 7 Stiriba S E, Frey H, Haag R. Angew Chem Int Ed, 2002, 41: 1329 ~ 1334
- 8 McIntyre J O, Fingleton B, Wells K S, Piston D W, Lynch C C, Gautam S, Matrisian L M. Biochem J, 2004, 377: 617 ~ 628
- 9 Esposito A, Delort E, Lagnoux D, Djojo F, Reymond J L. Angew Chem Int Ed, 2003, 42: 1381 ~ 1383
- 10 Lagnoux D, Delort E, Douat-Casassus C, Esposito A, Reymond J L. Chem Eur J, 2004, 10: 1215 ~ 1226
- 11 Clouet A, Darbre T, Reymond J L. Angew Chem Int Ed, 2004, 43: 4612 ~ 4615
- 12 Douat-Casassus C, Darbre T, Reymond J L. J Am Chem Soc, 2004, 126: 7817 ~ 7826
- 13 Clouet A, Darbre T, Reymond J L. Adv Synth Catal, 2004, 346: 1195 ~ 1204
- 14 Bernstein D I, Stanberry L R, Sacks S, Ayisi N K, Gong Y H, Ireland J, Mumper R J, Holan G, Matthews B, McCarthy T, Bournel N. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 3784 ~ 3788
- 15 Kensinger R D, Catalone B J, Krebs F C, Wigdahl B, Schengrund C L. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 1614 ~ 1623
- 16 Shaanak S, Thomas S, Gianasi E, Godwin A, Jones E, Teo I, Mireskandari K, Luthert P, Duncan R, Patterson S, Khaw P, Brocchini S. Nat Biotechnol, 2004, 22: 977 ~ 984
- 17 Wang Bingbing(王冰冰), Luo Yufei(罗宇飞), Jia Xinru(贾欣茹), Gong Yongmei(龚泳梅), Ji Yan(吉岩), Yang Ling(杨岭), Wei Yen(危岩). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2004, (2): 304 ~ 308
- 18 Ji Y, Luo Y F, Jia X R, Chen E Q, Huang Y, Ye C, Wang B B, Zhou Q F, Wei Y. Angew Chem Int Ed, 2005, 44: 6025 ~ 6029
- 19 Sadler K, Tam J P. Mol Biotechnol, 2002, 90: 195 ~ 229

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE DENDRONS WITH GLY-GLU AS BUILDING BLOCKS

LI Wusong, JI Yan, JIA Xinru, WANG Bingbing

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

WEI Yen

(Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia, PA 19104, USA)

Abstract The synthesis and characterization of a series of peptide dendrons with glycine (Gly) and glutamate (Glu) as building blocks were described. The dendrons were prepared with convergent method by protection, deprotection and DCC coupling reactions. With the characterization of elemental analysis, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR, EI-MS and MALDI-TOF MS, the designed molecular structure was proved. It could be predicted that the obtained compounds will exhibit unique properties and potential applications in the fields of biology, medicine and so on. Further studies on the properties of these compounds are in progress.

Key words Gly-Glu, Peptide dendrons, Peptide synthesis, MALDI-TOF