

博士丛书

多肽药物化学

彭师奇 著

科学出版社

R712.5
P88

博 士 丛 书

多肽药物化学

彭师奇 著

Y411.0112



科 学 出 版 社

1997



A0295036

内 容 简 介

本书从多肽合成的一般方法、多肽合成方法学评述、多肽纯化与均一性、多肽的立体化学、预测多肽立体化学的经验方法、生物活性多肽及多肽药物设计中的新思维等七个方面论述了多肽及相关药物在合成、构象(包括各种现代仪器及教学方法的应用)、活性、设计等方面的历史发展及前沿。

本书可供从事药学、医学、生物学及结构、化学和光谱仪器等学科的教学、科研人员及相应学科的本科生、硕士、博士研究生等阅读。

博 士 丛 书

多肽药物化学

彭师奇 著

责任编辑 杨淑兰

科学出版社出版

北京东黄城根北街 15 号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1993年12月第 一 版

开本: 850×1168 1/32

1997年6月第二次印刷

印张: 12 5/8

印数: 2 001--4 000

字数: 322 000

ISBN 7-03-003989-0/O·701

定 价 : 23.00 元

国家自然科学基金委员会资助

中国博士后科学基金会资助

序

环顾当今世界，国家的发达，民族的振兴，无一例外地离不开科学技术的推动作用。年轻博士们历来是科技队伍中最活跃、最富创造性的生力军。他们的科研成果是学科发展强有力的推动力量，是体现一个国家高层次教育水平和科研水平的窗口。为了系统地反映年轻博士们的科研成果，促使他们的快速成长，加强国际国内的学术交流，在老一辈科学家的热心支持下，科学出版社决定出版一套《博士丛书》。

我们指导思想是突出本丛书的学术性、创造性、新颖性、先进性和代表性，使之成为所有青年博士平等竞争的学术舞台和优秀科研成果的缩影。

这套丛书以专著为主，并适时组织编写介绍学科最新进展的综述性著作。它将覆盖自然科学各个领域，是一套充分体现我国青年学者科研成果和特色的丛书。

丛书编委会将在由著名科学家组成的专家委员会指导下开展编辑工作。本丛书得到了国家自然科学基金委员会和全国博士后管理协调委员会的特别资助。在此我们深表谢意。

《博士丛书》编委会
一九九三年十月

《博士丛书》专家委员会

王 元	王 仁	母国光	庄逢甘
庄 毅	刘西拉	沈克琦	汪培庄
李 未	肖纪美	谷超豪	张存浩
陈述彭	张光斗	郝柏林	赵忠贤
唐敖庆	郭慕孙	高景德	高为炳
谈德颜	阎隆飞	谢希德	路甬祥

《博士丛书》编委会

名誉主编	卢嘉锡	钱伟长		
副主编	白春礼	刘增良		
常务编委	王晋军 屠鹏飞	尤政	邬伦	林鹏
编委	王世光 冯恩波 刘增良 许文 杨国平 熊夏幸	王晋军 冯守华 安超 宋岩 林鹏	王颋安 白春礼 乔利杰 张新生 周文俊	尤政 白硕 邬伦 汪屹华 屠鹏飞

前 言

从 Curtius 人工合成第一个多肽到今天，已经过了整整一个世纪。现在，只要方法选择得当，几乎可以随心所欲地合成普通氨基酸组成的各种多肽。多肽氨基酸序列测定的自动化，可以在很短的时间内确定多肽的一级结构。各种保护基与脱保护基方法的配套，以及偶联方法的高度可靠性，使多肽合成实现了机械化。

由于过去 20 年间分离纯化技术的进展，以及检测手段的现代化，大大加快了发现新活性多肽的速度。内分泌器官概念的扩大，加上大量多肽调节因子在医学上的潜在重要性，使得合成多肽的数目急剧增加。有许多肽类药物在临床上显示了巨大的应用价值，其中优秀的代表有胰岛素和环孢菌素 A。作为药物化学的重要分支，多肽药物化学已经形成并迅速发展。在今后的十多年里，多肽药物会受到越来越多的重视。国际高新技术领域的竞争，势必包括多肽药物的研究与开发。

虽然生物工程可以在工业化水平上生产多肽药物，但至少在目前还有许多限制，只是在一定程度上使药物化学家有所解脱；借助于蛋白水解酶生成肽键虽然鼓舞人心，但尚未达到普遍应用的地步；用蛋白水解片段进行的半合成，离普遍应用也还有不小的差距。药物化学家在多肽合成中不得不担负重任。

包括固相合成在内，药物化学家可以选择各种技术，在适宜的规模合成相当大的多肽。肽键的长度适中，并需要商业规模时，液相合成仍是首选方法。液相法不仅可以提供结构确切的中间体，

还可以逐步纯化，使产品满足对纯度的苛刻要求。考虑到液相合成的特殊地位，本书着重介绍液相合成的方法学。为了使读者对于与合成方法学有关的技术有全面的了解，对各种不同的方法学有分析、比较和批判接受的能力，并能把握今后的发展，本书除全面介绍多肽合成的一般方法学外，专门用一章的篇幅，对方法学进行了全面的评述。

药物的作用与结构，尤其与立体化学有非常严格的依赖关系，在多肽药物中功能对结构的要求更加苛刻。文献中已把多肽、蛋白质及构象分析的模型系统化，并进行了广泛研究。这些工作为理解光谱中的结构内涵、构象转换、以及与构象势能计算相吻合的分子几何学提供了途径。在过去的十年里，光谱、CD、ORD 以及各种计算方法在我国的各实验室已经普及。本书力图全面介绍用来推演多肽构象的原则和各种方法学，并把这些方法学，主要指光谱方法和计算方法有机地组合为“多肽的立体化学”。期望介绍的方法学能够成为研究人员得心应手的工具，为解决新的结构问题制定策略。药物构象的理论处理往往能为构效关系提供有用的信息，可是许多专门的数学问题总是让药物化学家望而生畏。为了普及一般的理论处理，本书特地安排了一章简单的统计处理，使一些研究多肽立体化学的经验方法能被广泛接受。

生物活性多肽在内源性物质中占有非常重要的地位，除酶、受体、金属蛋白和病毒等生物大分子外，许多合成或分离的多肽对正常的生理过程或病理过程，对疾病的发生、发展或治疗过程有重要意义。为了使读者了解各种类型的多肽的氨基酸序列、生理功能、临床价值以及结构修饰的主要方面，本书专门用一章叙述生物活性多肽。因为生物活性多肽被发现，分离，并确定结构的速度太快，在有限的篇幅内试图覆盖所有素材，明显是徒劳的。

因此，这种介绍只能是例证性的。

与多肽发现有关的生物学研究进展，可以说是日新月异。由于传统观念的束缚，把药物化学单纯理解为合成化学的思维方式与研究模式仍然存在。实际上，药物化学从来都是与医学和生物学紧密相关的，也正是在这里划清了药物化学与化学的界限。根据生物学的研究进展，药物化学家可以非常巧妙地设计药物。为了使读者看到一些有说服力的例子，本书最后一章介绍作者的研究室根据与生物学有关的纤维蛋白降解产物与血小板表面受体的相互作用、血管内皮舒张因子、缓激肽、色氨酸在天然产物全合成中的手性诱导作用及抗肿瘤药物的设计等多方面展开的新思维，阐明药物化学研究与生物学相协同的效用。应当再次强调的是，其中给出的仅仅是一些例子，这些例子的局部目标是，给读者一些观念，那就是药物化学不应该与医学及生物学脱节，而应当有机地结合于一个整体之中；这些例子的整体目标是，勾画一种全新的研究模式，采用这种研究模式可以使研究工作获得更多的信息与结果，并体现药物化学学科发展的趋势。

参与任何一场竞争都需要广泛的准备，和我同时代的同仁，或更加年轻的学者们，都无法回避 21 世纪科技领域的国际竞争，象多肽药物化学这样的高新领域的竞争必然空前激烈，更需要超前准备。与我在大学时期(60 年代中)接受的药物化学相比，今天的药物化学发生了革命性的变化。与我攻读博士学位时期(80 年代初)接受的药物化学相比，今天的药物化学发生了重大变化。这些变化既包括内容方面的更新，也包括方法学的现代化。例如在内容方面过去的药物化学提及与内源性活性物质相关的药物及设计不多，在方法方面过去的药物化学与生物学及数学结合不够。在这本书里，我尽量反映有关的变化，用最新的进展或成就开拓学

生的思想也是我在教学中追求的重要目标，本书是这种服务心态的表达之一。我衷心希望为祖国的富强及科学事业的繁荣，不断探索。

本书成文后彭司勋教授在百忙中进行了全面审阅，提出了许多宝贵意见；本研究室的同事赵明及于亭老师担负了全部计算机文字处理及排版工作，在此，我表示深切的谢意。

作 者

1993 年 2 月 6 日

目 录

第一章 多肽合成方法学概述	(1)
一、活泼酯	(3)
1. 对硝基酚酯(ONP)	(3)
2. <i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺(HOSu)	(3)
3. 2,4,5-三氯酚酯(OCP)	(4)
4. 五氯酚酯(OPCP)	(4)
5. 五氟酚酯(OPFP)	(5)
6. 哌啶酯(OPiP)	(6)
7. 2-哌啶酯(OPY)	(6)
8. 2-哌啶硫酯(OSPy)	(6)
9. 8-羟基喹啉及儿茶酚酯	(7)
二、高聚活泼酯	(8)
三、 <i>N</i> -羧基内酸酐(NCA)	(11)
四、NCA 的硫类似物	(14)
五、反复过量的混合酸酐法(REMA)	(14)
六、片段组合	(16)
1. 叠氮法	(17)
2. DCC 法	(19)
3. 异恶唑盐	(25)
4. 混合酸酐法	(27)
5. 六甲基磷酰胺活泼衍生物法	(28)
6. 氧化-还原缩合法	(29)

7. 消除法	(31)
七、脱保护	(31)
1. 金属钠-液氮	(31)
2. 在液氮中催化氢解	(32)
3. 氟化氢(HF)	(32)
八、保护基	(33)
1. 氨基保护基	(33)
2. 羧基保护基	(35)
3. 侧链保护	(36)
九、固相合成	(38)
第二章 多肽合成方法学评价	(49)
一、肽键的形成	(49)
1. 羧端的活化形态	(50)
2. 偶联试剂	(58)
二、脱保护和侧链功基的保护	(62)
1. 脱保护	(63)
2. 侧链功能基的保护	(73)
三、战术和战略	(77)
四、重要的技术改进	(79)
五、多肽的纯化与纯度	(82)
1. 重结晶	(83)
2. 逆流分布	(84)
3. 电泳	(84)
4. 离子交换色谱	(85)
5. 分子筛	(86)
6. 亲和色谱	(87)

7. 纯度的评价	(88)
六、结论	(93)
第三章 多肽的立体化学	(103)
一、螺旋多肽	(103)
二、紫外吸收研究	(105)
三、旋光色散和圆二色散	(114)
四、核磁共振研究	(127)
五、红外研究	(132)
六、螺旋结构的一些特殊方面	(140)
1. 非氢键多肽	(141)
2. 芳香多肽	(146)
七、随机盘绕多肽	(150)
八、多肽的 β 结构	(150)
九、构象转换	(161)
1. 螺旋-盘绕和螺旋-螺旋转换	(161)
2. 转换动力学	(170)
3. 转换热力学	(172)
4. 聚-L-脯氨酸中的螺旋-螺旋转换	(176)
十、优势构象的计算	(178)
1. 构制空间地图	(180)
2. 势能函数	(183)
3. 均聚多肽的构象	(189)
十一、结论	(196)
第四章 预测多肽立体化学的经验方法	(214)
一、Lim 方法	(214)
1. 各种不同氨基酸残基的通用符号及表述	(214)

2. α 螺旋定域区域的计算	(218)
3. β 结构定域区域的计算	(224)
4. 解释和实例	(226)
二、Fasman 方法	(228)
1. 蛋白构象参数	(231)
2. 蛋白中的螺旋边界残基	(234)
3. 螺旋边界残基的 σ 估算	(237)
4. 蛋白中的 β 片层边界残基	(240)
5. 螺旋和 β 区域的 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 和 $\langle P_{\beta} \rangle$ 值比较	(242)
6. 从螺旋中心残基估算 σ	(244)
7. 蛋白构象的预测	(245)
• 8. 蛋白链折叠	(246)
9. S 值的溶剂规则	(247)
10. 有关的公式	(249)
11. 预测二级结构的实施规则	(250)
第五章 生物活性多肽	(264)
一、神经肽	(264)
1. P 物质(SP)	(264)
2. 神经激肽	(266)
3. 神经紧张素(NT)	(266)
4. 内啡肽、脑啡肽、Dynorphin 和 Dermorphin (鸦片肽)	(266)
5. 京都啡肽和新京都啡肽	(270)
6. Delta 催眠肽(DSIP)	(270)
二、下丘脑的释放激素和释放抑制激素	(271)
1. 促甲状腺素释放激素(TRH)	(271)
2. 黄体激素释放激素(LHRH) 或促性腺激素释放激素	(272)

3. Somatostatin (生长激素释放抑制激素)	(273)
4. CRH(或 CRF)、MRH、和 PRH	(274)
5. 生长激素释放激素 (GH-RH 或 GRF)或 Somatocrinin	(275)
6. 垂体蛋白激素	(276)
7. 生长激素	(276)
8. 促肾上腺皮质激素 (ACTH)	(276)
9. 催产素和后叶加压素	(277)
三、肌肽	(278)
四、无脊椎动物神经肽激素	(278)
五、DBI 肽 (苯并二氮杂卓结合抑制剂)	(279)
六、胃肠肽 (胃、肠和胰腺肽)	(279)
1. 肠促胰液肽、胰高血糖素、VIP、PHI、和 GIP	(279)
2. 促胃液素、缩胆囊素-促胰酶素(CCK-PZ)和 Galanin	(280)
3. 促胃液素释放肽 (GRP)、Bombesin 和蠕动素	(282)
七、胰岛素	(283)
八、具有免疫重要性的多肽	(284)
1. 胸腺肽	(284)
2. Thymopoietin 衍生物 (TP)	(285)
3. 胸腺素 α_1	(285)
4. 血清胸腺因子 (FTS 或 Thymulin)	(285)
5. Tuftsin	(285)
九、环孢菌素	(286)
十、胞壁酰肽 (糖肽)	(287)
十一、多肽疫苗	(290)
1. FK-156 和 FK-565	(291)
2. Chlamydocinns 和 Peptidylacivicins	(292)

3. Bestatin	(293)
十二、肾素-血管紧张素系统的多肽	(293)
1. 肾素-血管紧张素系统的蛋白水解连续效应	(293)
2. 血管紧张素Ⅱ拮抗剂和 ACE 抑制剂	(294)
3. 肾素抑制剂	(296)
十三、血浆激肽	(300)
1. 缓激肽和胰激肽	(300)
2. 速激肽	(300)
十四、心钠素 (ANP 或 ANF)	(301)
十五、甲状腺激素	(303)
十六、肽类抗菌素	(304)
1. Monamycins	(304)
2. 磷肽	(305)
3. 放线菌素	(305)
4. 白霉素	(306)
5. 乳酸链球菌肽	(306)
6. Nikkomycins(尼可霉素族)	(307)
7. Cecropin A	(308)
8. Alamethicins(丙甲菌素)	(308)
十七、Peptide Leukotrienes	(309)
十八、肽类杀虫剂和除草剂	(310)
十九、毒肽	(311)
二十、甜肽和苦肽	(313)
二十一、结束语	(314)
第六章 多肽及相关药物设计的新思维	(333)
一、引言	(333)

二、血管源性活性多肽与药物设计中的新思维	(337)
1. P6A 及相关多肽	(337)
2. NO 在细胞中的化学过程及前药设计	(350)
3. 纤维蛋白 α 及 γ 链相关多肽	(362)
三、甾体-多肽相互作用与药物设计中的新思维	(366)
四、L-色氨酸的构型诱导作用及药物设计中的新思维	(369)
英(缩写)中名词对照索引	(377)

第一章 多肽合成方法学概述

过去的 40 年里,化学方法的改进导致合成了大量的多肽。一般说来,虽然现在我们可以随心所欲地合成普通氨基酸组成的适当规模的多肽,但包含 20 个氨基酸的纯多肽的合成,即使在目前也仍然是一件不甚容易的事情,它需要耗费大量的时间和精力。常用的多肽合成或者在溶液中一步一步增长肽链,或者先合成小片段,然后组合。1953 年由 Vigneaud 及同事们完成的催产素的历史性的合成是多肽领域里划时代的成就。很快又涌现了一批非凡的合成工作,例如胰岛素、促肾上腺皮质激素、促胃液激素、胰高血糖素和一批有很大生物学价值的其它多肽的合成。这类合成工作既为这些珍贵的化合物提供了量,也促进了对它们的作用模式的研究,又加深了我们对这些化合物的构效关系的理解。有些合成工作被用来阐明天然多肽的氨基酸序列或证实假定的序列。合成多肽作为研究多肽的物理、化学和生物学性质的模型同样有很大的价值。虽然在多肽合成中常常由于中间体在偶联反应中的溶解度低而不易成功,产品纯化中的困难也给多肽合成造成了不少限制,而且肽链越长,这些问题就越严重,但是从根本上说,用经典的方法合成小分子蛋白质毕竟是指日可待的事情^[1-3]。

到 50 年代末,多肽领域的情形看起来虽然没有现在这样令人鼓舞,但有几种多肽合成的全新方法已经设计出来并在付诸实现或在实践中探索。多肽的固相合成就是这一努力的具体结果^[4,5]。Merrifield 固相合成法以快速简便的操作和高产率显示了无可比拟的优越性,为多肽研究开辟了广阔的天地,是多肽研究

领域又一划时代的事件，Merrifield 教授由于这一卓越贡献荣获了 1984 年诺贝尔化学奖。本章主要介绍多肽合成的一般方法。

多肽液相合成包括逐步合成和片段组合两种基本途径。催产素的合成^[6]为逐步合成提供了一个典范。在这个经典的合成工作中，各个氨基酸都是以苄氧羰基和对硝基酚酯相匹配的形式逐步加到甘氨酸乙酯上，然后保护的中间体用溴化氢的冰乙酸溶液脱保护。羧端的乙酯在保护的三肽阶段转变为酰胺。保护的中间体通过沉淀和用乙酸乙酯洗脱而得到纯化。半胱氨酸中的巯基通过苄基保护，用金属钠和液氨除去苄氧羰基和苄基以后，开链的九肽酰胺（催产素）用空气氧化环合，并经逆流分布纯制，于是得到高生物效能的催产素。虽然在合成过程中并未大范围展开中间体的纯制，但在环合过程中除去了杂质。而且目的物的纯化由于环状多肽的物理性质与直链中间体有很大的差别而大大简化。显然，这种机遇在更复杂的直链多肽的合成中是不会有有的。

已经完成的最不同凡响的逐步合成是肠激素，即肠促胰液肽的合成^[7, 8]，这是一个含有 27 个氨基酸的多肽。Bodanszky 等指出，用逐步合成法合成具有 27 个氨基酸的多肽具有肠促胰液肽所具有的各种生物活性和强度，说明这种研究途径可以用来实现更为雄心勃勃的设想。考虑到目的物纯制的困难，实际上逐步合成法对于合成 10—15 肽是极为优越的方法，对于更长链的合成则并不可取。

多肽逐步合成的最清楚明了的程序是反复把苄氧羰基氨基酸的活泼酯加到一个氨基酸的叔丁基酯上，然后通过氢化切除中间体的保护基。该法的一个例子是猪的促肾上腺皮质激素 (ACTH) 的错误序列的片段 25—39^[9-11]。Morley^[12]用了一个类似的方法合成人体胃液激素的大部分。该法简洁迅速，后来被用于各种生物

活性多肽片段的合成。

逐步合成法可以细分为活泼酯法、高聚活泼酯法、*N*-羧基内酸酐法 (NCA)、NCA 的含硫类似物法、反复过量的混合酸酐法等，其中首先应该提到的是活泼酯法。

一、活泼酯

1. 对硝基酚酯 (ONP)

对 70 年代以前的文献调研表明，酰基保护的氨基酸的对硝基酚酯^[13]和 *N*-羟基丁二酰亚胺酯^[14]已成为多肽化学宝库的重要组成部分。后来五氯酚酯和五氟酚酯开始引起人们的注意。咪唑增加对硝基酚酯和硫酚的氨解^[15, 16]。所谓的“双功能催化剂”，即 2-羟基吡啶或 1,2,4-三唑^[17, 18]，是更强有力的催化剂，遗憾的是这些催化剂似乎仅在非极性溶剂中有效。另外，咪唑还引起消旋化，不宜作为氨解反应的催化剂，1,2,4-三唑却不增加消旋速率。1-羟基苯并三唑 (HOBt) 在 *N,N*-二甲基甲酰胺中是强有力的催化剂，但在四氢呋喃 (THF) 中却不然。在 THF 中，三唑抑制反应，这种作用不能用酯交换解释。加入 HOBt 也不增加消旋化。

羧酸催化对硝基酚酯在无水二氧六环中的氨解，催化能力按下列次序递减：乙酸乙酯 > 乙酸 > 一氯乙酸^[19, 20]。强酸（例如氟乙酸和三氟乙酸）可以减缓氨解。

2. *N*-羟基琥珀酰亚胺 (HOSu)

立体化学单一的苄氧羰基或叔丁氧羰基保护的氨基酸的 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯的稳定的结晶，易与另一种氨基酸反应生成不消旋的多肽^[14]。*N*-羟基琥珀酰亚胺是水溶性的，因此在成肽反应

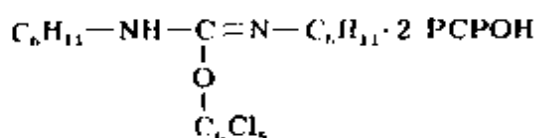
之后易除去。恰恰是因为这一优点，它比水不溶的 *N*-羟基邻苯二甲酰亚胺更为有用^[21]。

3. 2,4,5-三氯酚酯 (OCP)

2,4,5-三氯酚酯在逐步接肽反应中是研究 *N*-苄氧羰基 α -氨基酸的取代酚酯氨解速率的特别有价值的中间体^[13]。酰基保护基的性质对氨解速率无影响，但溶剂有重要影响。在氯仿中氨解最慢，氨解速度按下列次序递减：二氧六环 > *N*-乙基吗啉 > 二氧六环/水 (8:2) > 吡啶 > 乙酸乙酯 > DMF。DMF 在多肽合成中是很好的溶剂。酰基保护的氨基酸的 2,4,5-三氯酚酯通过 DCC 法容易由酰基保护的氨基酸和 2,4,5-三氯苯酚制得。它们之中大多数都是很好的结晶性化合物，并很稳定。Broadbent 等^[22]曾报道过制备这类酯的成熟方法，且产率很高。

4. 五氯酚酯 (OPCP)

苄氧羰基甘氨酸和亮氨酸的五氯酚酯由 Kupryszewski^[23]和 Pless 等^[13]首先制得。后来发现这类酯在多肽合成中具有应用前景^[24-27]。这类酯可通过一般的 DCC(二环己基碳二亚胺)法制备，也可以用 DCC 和五氯苯酚在乙酸乙酯中预先制备 (DCC)₂·(PCPOH)₂ 复合物，再与酰基保护的氨基酸反应制得。该复合物在 1680 cm⁻¹ 处显示一强红外吸收峰，结构被指定为：



五氯酚酯亦可由苄氧羰基氨基酸与五氯苯酚的三氯乙酸酯反

应制得^[28, 29], 或苄氧羰基氨基酸与五氯苯酚的二氯或三氯乙酸酯反应制得^[30]。苯甲酰亮氨酸与五氯苯酚的三氯乙酸酯反应, 得到完全消旋的产物。因此, 这种方法只能用于脲烷型保护的氨基酸及羧端是甘氨酸的多肽的制备。

立体化学单一的苄氧羰基甘氨酸苯丙氨酸的五氯酚酯(Z-Gly-Phe-OPCP)可以通过消除法(backing-off)制得^[31], 或 Z-Gly-Phe-OH 与 DCC-五氯苯酚复合物在乙酸乙酯溶液中反应制得。通常的 DCC 反应会引起酯或多或少的消旋, 消旋程度依赖于反应条件和溶剂。使用 DMF 时, 观察到消旋化程度明显高。Z-Gly-Phe-OPCP 在二氧六环及 DMF 中与甘氨酸乙酯盐在三乙胺存在下生成三肽时, 很少出现消旋问题。苯甲酰亮氨酸五氯酚酯与甘氨酸乙酯的反应速度很慢, 在一些条件下有明显的消旋化趋势, 在二氧六环及氯仿中消旋化微乎其微, 在 DMF 中较甚。

在三乙胺存在下, Z-Gly-Phe-OPCP 的消旋半衰期是 22 小时, 而苯甲酰基亮氨酸酯仅为 13 至 14 小时。氢解过程中五氯酚酯的稳定性为通过消除法合成肽的五氯酚酯奠定了基础^[32]。五氯酚酯也用于活化羧端甘氨酸, 以通过片段组合法合成复杂的多肽。

5. 五氟酚酯(OPFP)

苄氧羰基氨基酸的五氟酚酯是活性高的化合物。与五氯酚酯类似, 五氟苯酚与 DCC 形成一种复合物^[33], 它是用于制备光学纯的酰基保护多肽的五氟酚酯的有用试剂。相似的化合物亦可通过消除法制得。苄氧羰基氨基酸的五氟酚酯通过 DCC 法容易制备^[34]。这类化合物熔点低, 在有机溶剂中的溶解度甚大, 遇水水解。通常使用粗品酯即可得到高产率的光学活性多肽。为了得到这类酯的纯品, 合成和纯化不得不在无水条件下及惰性气体中进

行^[35]。Z-Gly-Phe-OPFP 在三乙胺存在下的消旋半衰期是 5 小时，这说明五氟酚酯消旋化的速度大约比对应的五氯酚酯快 5 倍。

6. 1-哌啶酯 (OPiP)

1-哌啶酯容易与位阻小、亲核性强的胺（例如苄胺）反应，但在乙酸存在下仅与 α -氨基酸缓慢缩合^[36-39]。有好几种方法可以用来制备立体化学单一的酰基保护的氨基酸或多肽的 1-哌啶酯^[40]。氨基酸酯与酰基保护的氨基酸的 1-哌啶酯之间的反应缓慢，尤其是亮氨酸和缬氨酸的对应活泼酯。例如 Z-Gly-OPiP 与 Val-OMe 在室温下 7 小时可以完成反应，而 Z-Val-OPiP 与 Val-OMe 在室温下反应数日也不完全。

7. 2-哌啶酯 (OPY)

叔丁氧羰基和苄氧羰基氨基酸在 DCC 存在下，在吡啶溶液中与 2-羟基吡啶反应，得到 2-哌啶酯。在其它溶剂中，加入两当量的吡啶，亦可制得这类酯。一系列苄氧羰基氨基酸的 2-哌啶酯，已经以不稳定的油状物的形式制得，但叔丁氧羰基衍生物常常是结晶性固体，与对应的硫酯相比，熔点较低，2-哌啶酯与醇或含醇的溶剂反应定量地生成环己酰胺，与环己胺反应时放热。

高活性的 2-哌啶酯局限于非极性溶剂，因此限制了它在多肽液相合成中的应用^[41]。试图在 Boc-S-(Bzl)Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ 阶段运用逐步合成法合成催产素的计划不得不放弃，就是由于该酰胺在非极性溶剂中的溶解度差。

8. 2-哌啶硫酯 (OSPy)

2-巯基吡啶与 N-酰基氨基酸在 DCC 存在下反应得到高度活

活泼的 *N*-酰基氨基酸 2-哌啶硫酯^[42, 43]。这类酯在室温下干燥放置是稳定的, 在乙酸或三氟乙酸溶液中不起变化, 但在潮湿的大气及水溶液中缓慢分解。*N*-酰化氨基酸的 2-哌啶硫酯即使与位阻大的氨基酸也可迅速缩合生成 *N*-酰化多肽。叔丁氧羰基缬氨酸的 2-哌啶硫酯与缬氨酸甲酯反应, 产物由气相色谱测定, 消旋比例不足 0.15%, 消旋化的程度并不因三乙胺的存在而加剧。因此, 这类酯不会引起明显的消旋化。

9. 8-羟基喹啉及儿茶酚酯

前面已经谈到 1-吡啶酯与氨基酸酯在乙酸存在下缩合反应进行得缓慢, 但它们与胺类反应则较迅速, 即使没有催化剂也是如此, Young 把这种行为归结于在形成加合物的过程中有氢键合到氮上形成的过渡态的稳定性^[44]。据推测, 质子转移到哌啶氮上, 促进了下图中的后几步反应。

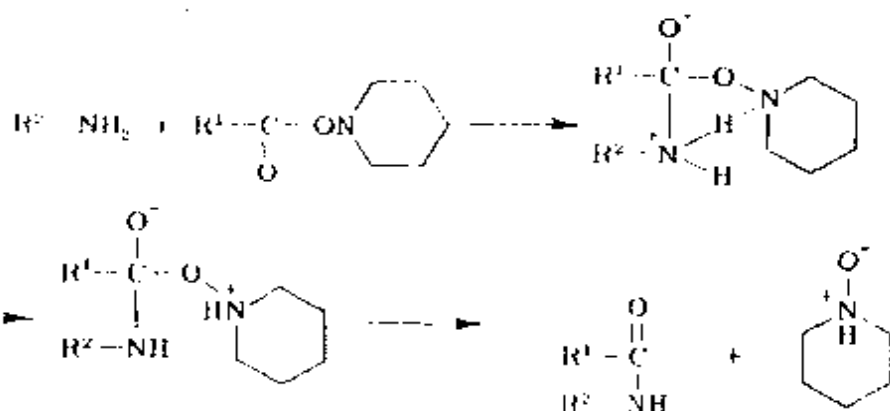
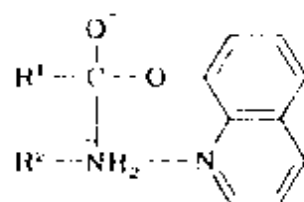


图 1.1 哌啶酯与氨基酸的反应机理

酰基氨基酸的 8-羟基喹啉酯的氨解速率与对应的 α -萘酚酯的氨解速率比较, 前者更为活泼。苯甲酰基亮氨酸 8-羟基喹啉酯在三乙胺存在下不消旋。而且无法理解恶唑酮的生成。为了解释

这些实验事实,提出了与 1-哌啶酯机制类似的假设:



3-和 6-羟基喹啉酯不如 8-羟基喹啉酯活泼与这种假设是一致的^[45, 46]。在邻羟基酚酯中也观察到了类似的结果或作用^[44]。如外消旋苯甲酰亮氨酸的邻羟基酚酯与甘氨酸盐酸盐在三乙胺存在下反应, 1.5 小时得到 89% 产率的酰基保护肽酯, 而邻苯二甲酰赖氨酸的酚酯反应 4 小时, 酰基保护二肽的产率也不足 1%。苯甲酰-L-亮氨酸的邻羟基酚酯与甘氨酸乙酯反应, 得到光学纯的苯甲酰-L-亮氨酸甘氨酸乙酯, 产率 96%。这类酯由于难合成且反应缓慢, 因此在制备复杂多肽中未显示出应用前景, 只是在合成顺序的多聚物中的应用已有报道^[46]。邻羟基酚酯在理论上有很大意义。

二、高聚活泼酯

Fridkin 等叙述过化学的高聚物在酰化反应中的应用。乙酸或苯甲酸的高分子量的活泼多聚物可以通过对应的氯化物在 DMF 中吡啶 (Pyr) 存在下与聚-4-羟基-3-硝基苯乙烯 (用 4% 二乙基苯基交联) 反应制得。该活泼高聚物呈粉末状, 室温下储藏不分解。它们与丙氨酸的对硝基苄酯在 DMF 中混悬, 易发生反应, 室温 4—5 小时后实际得到理论量的酰基丙氨酸的对硝基苄酯。酰基保护的氨基酸, 例如苄氧羰基苯丙氨酸、苄氧羰基异亮氨酸及其它

的酰基保护的氨基酸都能通过 DCC 法以 DMF 混悬液的方式连接到高聚物上。得到的高聚物的活泼酯显示的化学活性与它们的低分子量的类似物一样，并可以作为酰化剂使活泼酯的逐步接肽均相进行。对于保护多肽的合成来说，氨基酸组分在 DMF 中与高聚酯在室温反应 5—8 小时，然后不溶物或过滤除去，或离心除去。蒸去溶剂，得到纯度很高的目的物，且产率常常很好。Fridkin 等描述该法的优点时指出，把这里介绍的多肽合成方法与 Merrifield 方法加以比较可以看到，在固相合成中是将肽连接在不溶性的载体上，脱保护的氨基酸酯是以溶液的形式加入。这里介绍的方法则是游离肽酯的溶液加到不溶性的脱保护的氨基酸活泼酯中，而且由于多肽被游离在溶液中，因此在合成过程中多肽中间体容易纯化。另外，在 Merrifield 合成中，多肽的纯化只能在目的物从高聚载体上脱下来以后进行。最后一点应当注意的是，在这里介绍的技术中，人们能够在多肽酯和活泼氨基酸酯之间进行反应，在大过量的不溶性活泼酯存在下没有明显的消旋化，因为过量的不溶性活泼酯经过滤或离心容易除去。恰恰是过量的高聚的氨基酸活泼酯确保多肽合成中的高产率。在多肽合成中使用氨基酸高聚试剂要求反应的氨基酸或多肽酯在使用的溶剂中是溶解的。所以可以预测，这里提出的方法在多肽合成中将特别有用。脱保护的衍生物在合适的有机溶剂中容易溶解。舒缓激肽就是以逐步合成的方式通过高聚活泼酯制得的^[46]。所有成肽反应都在 DMF 中进行。带保护基的中间体在 DMF 中均易溶解。室温下生成肽键的反应时间为 8—12 小时。有意思的是，使用邻硝基苯亚磺酰脯氨酸的高聚活泼酯可以把 2 位和 3 位的脯氨酸一次引入到肽链中。这表明高聚的酰化肽活泼酯在此合成中，可以作为酰化组分。最终，十肽对硝基苄酯在无水液态氟化氢中脱侧链保护基。使用

钨/硫酸钨作催化剂进行氢化，以便脱去羧端的对硝基苄酯。经离子交换树脂 IRC-50 层析，目的物产率为 39%，报道的层析和电泳性质与标准品相符，并具有舒缓激肽的全部生物活性。

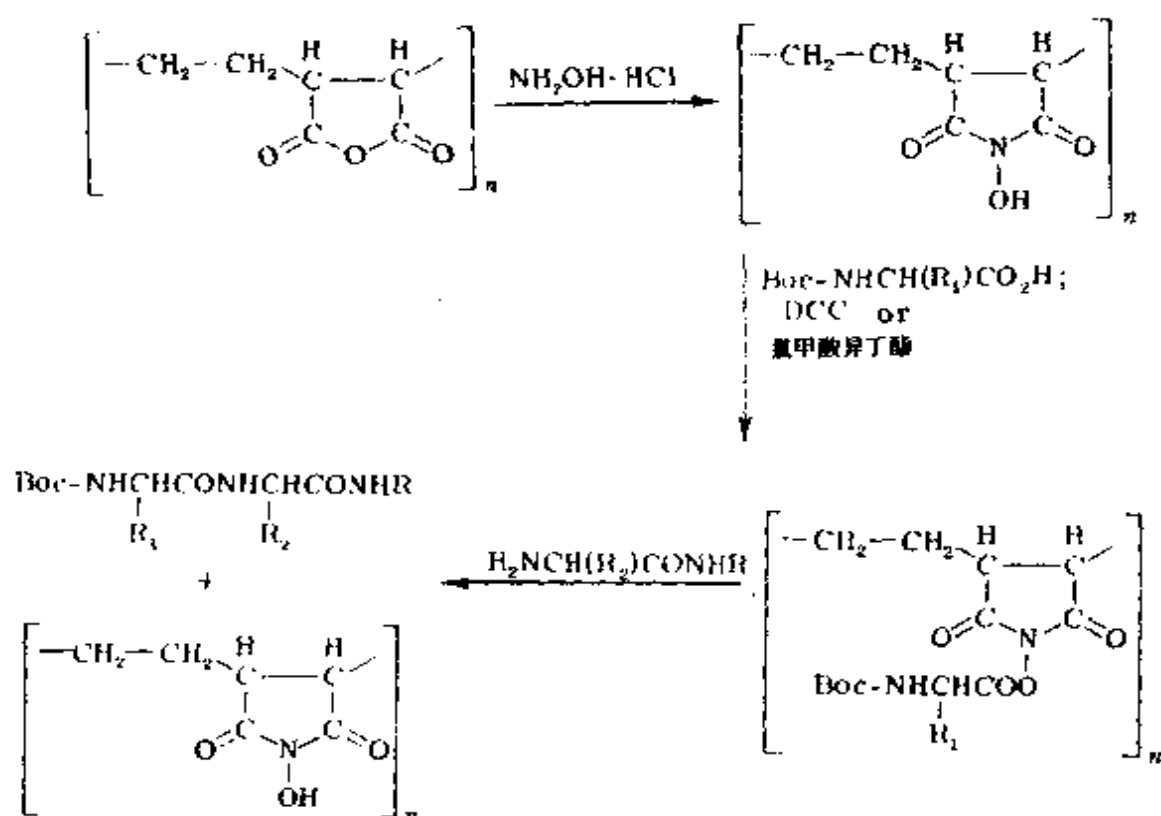


图 1.2 高聚活泼酯的接枝反应

Laufer 等报道了高聚 *N*-羟基琥珀酰亚胺活泼酯的合成及应用⁽⁴⁷⁾。聚乙烯-*N*-琥珀酸酐（蒙桑托 DX840）与羟胺在 DMF 中缩合，得到高聚的 *N*-羟基琥珀酰亚胺。后者在 DMF 及 DMSO 中溶解，但不溶于水、甲醇、乙醇、2-丙醇、乙二醇二甲醚和乙腈。各种叔丁氧羰基氨基酸的高聚活泼酯由对应的叔丁氧羰基氨基酸和高聚的 *N*-羟基琥珀酰亚胺在 DMF 中反应，或由混合酸酐法，或由

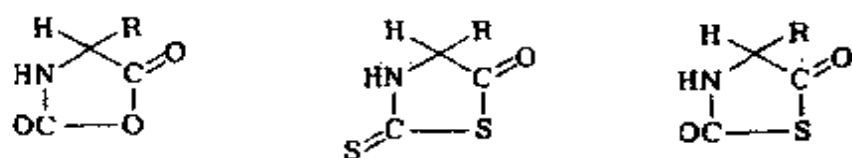
DCC 法制得，产率大约 70%。高聚活泼酯（1—2 当量）混悬在含氨基酸或多肽酯（1 当量）的无水乙二醇二甲醚或乙酸乙酯中，反应的混合物在室温下搅拌 1—5 小时，以增长肽链。除去不溶物，蒸除溶剂后即得到产率高、纯度好的产物。带保护基的中间体按已知的脱保护方法脱保护，即可得到游离的多肽。已按该法制得一系列 3—9 肽。

由交联的共聚乙烯-*N*-羟基琥珀酰羟胺和叔丁氧羰基氨基酸通过 DCC 法制得的高聚活泼酯用于合成七肽：Ser-Pro-Cys-Ser-Glu-Thr-Thr。该七肽对应于牛羧肽酶 A 的一级结构的 159—165 片段^[48]。在这个高产率的合成中，使用了下述侧链保护的氨基酸：酪氨酸-*O*-苄基醚、丝氨酸-*O*-苄基醚、谷氨酸- γ -苄酯及半胱氨酸-*S*-苄基醚。叔丁氧羰基用来保护氨基。与此平行，也以 DCC 法用高聚活泼酯进行合成。产率、熔点、旋光及各种中间体在四种系统中的薄层都进行了比较。虽然采用高聚活泼酯法的产率相对较高，但两种方法制得的保护肽的物理性质十分相符。保护的七肽用液态氟化氢脱保护基，目的物在交联葡萄糖 G-25 上纯制。

三、*N*-羧基内酸酐 (NCA)

从理论上讲，氨基保护基也活化羧基的氨基酸衍生物为组合肽链提供了理想的单体，特别是假如连接在氨基上的保护基能在温和的条件下除去更是如此。有三种类型的氨基酸衍生物：恶唑烷-2, 5-二酮，亦称为 *N*-羧基内酸酐 (NCA) 或 Leach 酸酐；2-硫羰-5-噻唑-5-酮和噻唑烷-2, 5-二酮。

采用 NCA 法合成多肽的基本反应包括：在碱性条件下，氨基酸阴离子进攻 NCA 形成较为稳定的氨基甲酸根离子，在酸化时，



该离子失去二氧化碳生成二肽。生成的二肽又可以进攻第二个 NCA。如此一直连续下去。NCA 有很大的进行不受约束的聚合倾向，在有机溶剂中尤其如此。这一点为合成多种多样的聚合物，

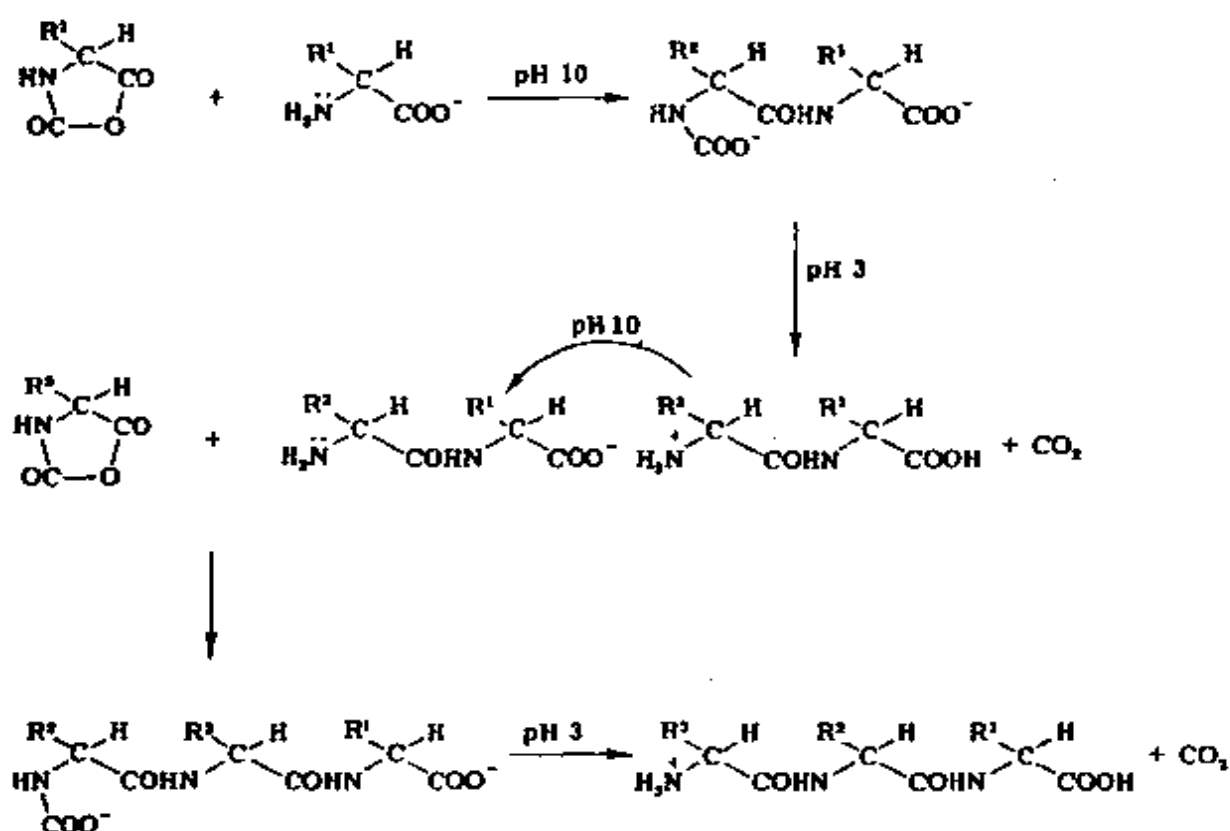


图 1.3 NCA 法合成多肽的路线

例如所谓的聚氨基酸开辟了道路^[49, 50]。上述过程可用图 1.3 描述。

一些 NCA 在水溶液体系中的行为动力学研究^[51, 52]表明 NCA 和水之间的反应一般是受碱催化而不受酸催化。而氨基酸阴离子中的氨基与 NCA 间的反应迅速到足以成功地与水竞争, 还进一步表明, 当氨基酸与 NCA 反应时, 存在两种竞争反应(这种竞争干扰了期望的二肽的生成), 一种是 NCA 与氢氧根离子的反应。另一种是二肽与另一 NCA 反应生成三肽。发现当 pH 为 10 时, 生成二肽的反应最有利, 但所期望的产物的产率达不到 90%。根据这些结果得出的结论是: 选择性地生成甘氨酸甘氨酸, 反应条件至关重要, 这种选择性使该法未能成为逐步合成多肽的一种有用的方法。

在停顿十年之后提出了用 NCA 合成短链多肽的方法^[53]。旋光纯的二肽的产率从 80% 到 99% 不等, 操作步骤是: 把结晶性的 NCA 加到某氨基酸的水溶液中, 在 0—2℃, pH 10.2 将反应物迅速混合^[54]。迅速混合有利于不溶性 NCA 的溶解并减少氨基酸甲酯交换的机会, 这种交换机会可以大大降低因 NCA 经由它的阴离子的低聚导致的过头反应。因为氨基酸甲酯的稳定性随 pH 的增加而增加。pH 值的控制至关重要, 当 pH 值超过 10.2 时, NCA 的水解变成主要的副反应, 而且 NCA 阴离子的生成也增加, 说明离子的生成可能是产生副反应的根源, 该法用于合成二肽似乎既迅速又有利。例如九肽: Pro-Ile-Glu-leu-Ala-Gly-Phe-Gly-ArgNCA 是逐步合成的^[51]。用噻唑烷-2,5-二酮和 NCA 制得五肽 Leu-Val-S-Cys(Bzl)-Gly-Glu, 未分离中间体, 最后重结晶得纯品。

采用 NCA 方法逐步合成长链多肽不是很成功的, 与此相联系的是, 在合成核糖核酸酶 AS-蛋白时, NCA 法仅用于合成小的

片段^[55]。

四、NCA 的硫类似物

光学活性的噻唑烷-2, 5-二酮用于多肽的逐步合成已进行了广泛的研究^[56]。反应条件与用于 NCA 的条件一样, 即把杂环加到氨基酸或多肽的水溶液中, 在 pH 9—9.5 时, 生成多肽的产率很高。可是, 反应中出现了不可忽视的消旋化。仅仅由甘氨酸和 L-丙氨酸衍生出来的两个噻唑烷-2, 5-二酮, 已被证明对于合成光学活性的肽是有用的。

氨基酸在碱性溶液中与二硫化碳反应时, 生成 2-硫羰-5-噻唑烷-5-酮。后者与氨基酸反应生成多肽^[57, 58]。Hofmann 等发现, L-亮氨酸、L-酪氨酸及 L-异天门冬氨酸与二硫化碳及碳酸钾或稀氢氧化钾反应, 得到对应的光学活性的 2-硫羰-5-噻唑烷-5-酮。但这些杂环中间体与苄氧羰肼反应, 生成对应的消旋的氨基酸苄氧羰肼。

五、反复过量的混合酸酐法(REMA)

反复过量的混合酸酐法, 包括由羧端采用 N-酰化的氨基酸的混合酸酐和碳酸酯作为酰化组分逐步合成多肽^[59—61]。使用过量的酰化剂保证了偶联反应产率高, 当酰化反应完全时, 未反应的混合酸酐用碳酸氢钠冰水溶液破坏。反应产物通过沉淀或萃取分离出来, 氨基脱保护。然后按上面叙述的方式再酰化, 直至得到希望的肽链。反应过程中中间体的质量能被监测, 如有必要, 能够在中间体纯化的任何阶段中止合成。这样, 该法似乎为迅速

合成高产率的中等大小的多肽提供了满意的工具，因为中间体可以纯制，因而比固相法有利。一次成肽的周期为 6—8 小时。

在适当的溶剂(如 DMF)中， -15°C 或更低的温度下用过量的酰化氨基酸和 *N*-甲基吗啉(NMM)与氯代甲酸异丁酯反应，生成混合酸酐。这些条件可以保证未反应的氯代甲酸异丁酯不存在于混合酸酐溶液中，因它能引起副反应。苄氧羰基和叔丁氧羰基都用于保护氨基。采用合适的侧链保护基对于生成单一的产物似乎是必要的，下面的例子表述了侧链保护基的性质。图 1.4 表明了使

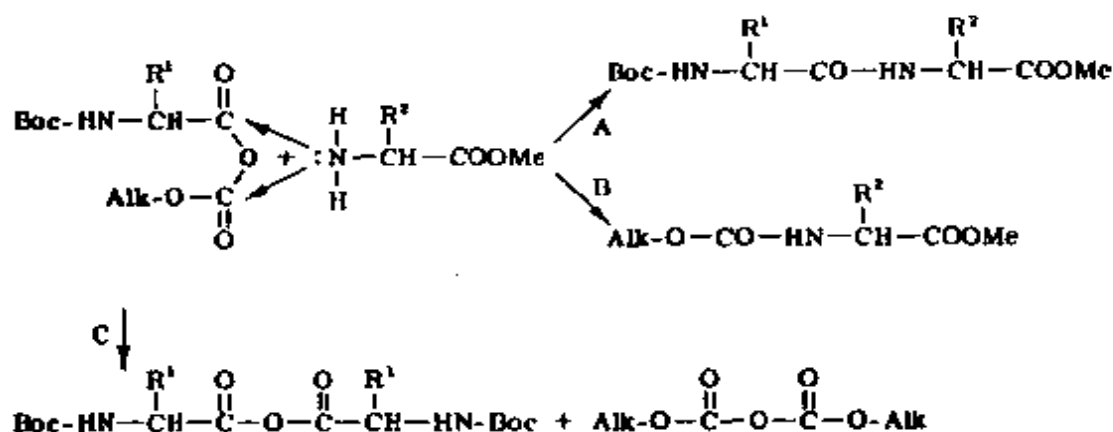


图 1.4 混合酸酐法

用混合酸酐法进行酰化反应可能会带来的困难。混合酸酐法中虽然氨基组分可能进攻氨基酸羰基，生成希望的保护的多肽酯(反应 A)，但在一些条件下，氨基组分将进攻混合酸酐羧基(碳酸)的羰基生成烷氧羰基多肽酯(反应 B)。后者能污染我们需要的多肽，而且在一些情况下可以生成为主要的反应产物。这就是用混合酸酐活化氨端含有脯氨酸的多肽的混合酸酐酰化时的情况。例如，叔丁氧羰基异亮氨酸的异丁氧羰混合酸酐与 H-Pro-

Leu-Ser(Bzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe 反应,生成反应物的 *N*-异丁氧羰基衍生物。叔丁氧羰基苯丙氨酸的异丁氧羰基混合酸酐与脯氨酸苄酯反应,*N*-异丁氧羰基脯氨酸的苄酯的产率为 20%。若往增长的肽链中以混合酸酐形式引入脯氨酸残基,则可以避免这类问题,所需的混合酸酐可以由具有羧端脯氨酸的 *N*-酰化的多肽衍生而成。脯氨酸不发生消旋化。在 *N*-Boc-Phe-Pro-Thr(Bzl)-Ile-Pro-Leu-Ser(Bzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe 的合成中,两种脯氨酸残基分别由 Boc-Ile-Pro 和 Boc-Phe-Pro 的混合酸酐组成。另一个副反应是图 1.4 中的反应 C,生成的化合物可以酰化氨基组分,生成 *N*-烷氧羰基氨基酸酯。当混合酸酐在低温(-15℃)下生成时,可以大大抑制副反应 C。采用反复过量的混合酸酐法合成的卓有成效的例子是 16 肽 Boc-Arg(NO₂)-Leu-Arg(NO₂)-Asp(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Arg(NO₂)-Leu-Gln-Arg(NO₂)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ 的合成。这个保护的 16 肽酰胺与肠促胰液肽的 12-27 片段对应,产率超过 31%,成肽反应的平均产率是 93%。*N*-苄氧羰基和 *N*-叔丁氧羰基氨基酸的混合酸酐都被用作酰化剂。大分子多肽的溶解度可能限制反复的混合酸酐法的应用范围。

六、片段组合

片段组合为合成含 100 个以上氨基酸的多肽提供了最有前途的路线,并已成功地合成了许多有生物活性的多肽。该法的第一个优点就是易于纯制,因为在大多数情况下,反应中带入的杂质的物理和化学性质与产物有很大差异,容易用常规方法分离。不论反应是在溶液中进行还是在固相载体上进行,这一优越性在逐步合成法中不复存在。因为反应混合物中的物质非常相似,使得

后来的分离很困难，即使是采用最有希望的纯制手段也往往不能达到目的。从反应混合物中分离一个有一定体积的多肽显然要比分离一簇很相似的多肽容易。片段组合法的缺点是产率低，特别是当要组合的片段较大时更是如此。该法的另一个困难是一些全部保护或部分保护的多肽的溶解度小。不过这一困难可以通过使用六甲基磷酰胺和 DMF 而得到克服。片段组合又可以再细分为七种方法。

1. 叠氮法

在有些条件下已经观察到酰化多肽的叠氮与氨基化合物反应会发生消旋。随着检测方法的日趋完善，认识到一些叠氮化合物偶合时并不能完全避免消旋问题。在苄氧羰基-*L*-苯丙氨酸叠氮化物与甘氨酸乙酯反应时，消旋问题是一个例证。叠氮化物的乙酸乙酯溶液制好后，分成相等的两份，其中一份中加入三乙胺，两份都在冰盐溶液中放置 12 分钟。甘氨酸乙酯分别加入到两份溶液中， -3°C 反应 12 小时后分离产物。预先加入三乙胺的反应液中含 1.6% 的消旋三肽^[62]。苄氧羰基甘氨酸-*L*-丙氨酸的叠氮物在乙酸乙酯溶液中与 *L*-亮氨酸苄酯的甲苯磺酸盐在三乙胺存在下反应，未测定到消旋物^[63]。Kisfaludy^[64]证实了这个结果，但在氯仿-乙醚中使用三乙胺、*N*-甲基吗啉或乙基二异丙基胺，消旋化程度可高达 15%。在该溶剂系统中若用 1-二乙氨基-2-丙醇作为碱，则不引起消旋化。可见溶剂和碱对于叠氮化物的偶合反应有重要影响。合成人体降血钙素时，也观察到了叠氮化物偶联时出现的消旋^[65]。在反应中使用改进的叠氮法进行偶联，以 DMF 为溶剂，三乙胺为碱^[66]。在上述条件下，组氨酸残基含高达 6 mol% 的 *D*-异构体。若使用理论量的乙基二异丙基胺，消旋化可降低到仅含

1.57 mol%的组氨酸的 *D*-异构体。不需要的非对映异构体被带入到后来的合成中并能通过逆流分布从目的物中除去。也观察到苯丙氨酸残基在侧链保护的 Z-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asn-Phe 中的消旋化,若采用理论量乙基二异丙胺,可以降低消旋化程度。采用 Z-Val-His 和 Z-Val-Tyr 叠氮化物的模型实验表明,前者在 Honzl-Rudinger 反应中发生消旋化,消旋化程度依赖于使用的碱的性质,后者不消旋^[67]。

制备叠氮化物时,重氮化后碳酸氢盐萃取对于消旋程度有影响^[68],即在使用碳酸氢盐萃取反应液的过程中也可以发生消旋化。已除去了微量酸的酰基叠氮似乎特别容易受到碱催化的消旋化。3℃放置 10 分钟后,含 0.03 mol 三乙胺的 Young 叠氮的乙醚溶液消旋化达到 2.5%;3℃放置 15 分钟后,含 0.2 mol 三乙胺的 Anderson 叠氮的 DMF 溶液消旋化达 50.3%。这意味着酰化多肽的叠氮置于强碱介质中均可发生广泛的消旋化。所以酰化多肽叠氮和过量的三乙胺相结合的反应条件应加以避免。看来,消旋化主要是经过吸取质子的机制^[69]。根据这种联系,必须指出:在实际操作中,即使是十分苛刻的条件也不能奏效,特别是使用改进的操作时更是如此^[66]。另外一种促进消旋化的处理,即叠氮溶液用碳酸氢钠溶液萃取也不应提倡^[70]。尽管在少数例子中观察到了消旋化,但叠氮法即使与唯一不发生消旋化的最好方法相比,也仍然是最好的方法之一,它的一个最大优点是,合成中可以使用含有未保护的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸。用含有色氨酸的多肽的酰肼制备叠氮时曾发生过色氨酸的亚硝化^[71, 72]。而 Z-Pro-Trp 酰肼转变为叠氮并与苯丙氨酸甲酯缩合时,却未发生色氨酸的亚硝化。奇怪的是,当乙酰化聚色氨酸被苯氧羰基衍生物取代时发生亚硝化。当 Z-S-Cys(Bzl)-Tyr-Trp 通

过叠氮法与 Gln-Asn-S-Cys(Bzl)-Pro-Ileu-Gly-NH₂ 偶联时不生成亚硝基化合物^(73, 74)。

2. DCC 法

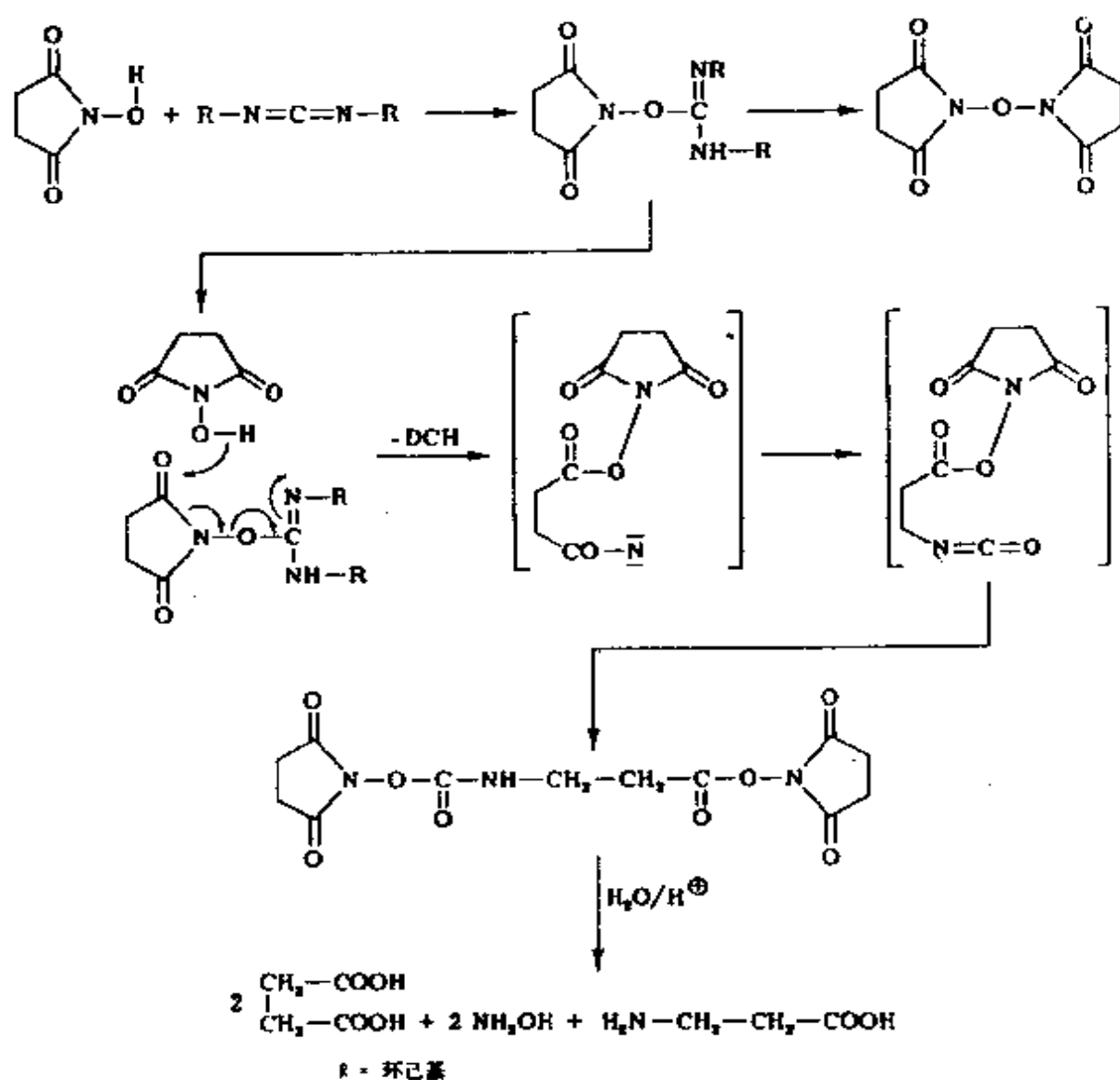
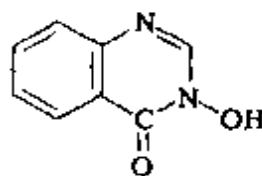
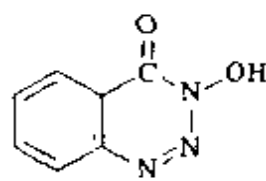
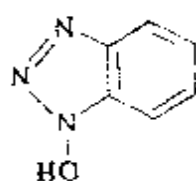


图 1.5 HOSu 在 DCC 法中引起的副反应

苄氧羰基(Z)、叔丁氧羰基(Boc)和别的保护基保护的 *L*-氨基酸能采用 DCC 法偶联成多肽, 且不发生消旋化(固相合成)。N-酰化的多肽, 若端基是 *L*-氨基酸时, 采用 DCC 法偶联可发生很大程度的消旋化^[75]。有代表性的另一个例子是 Z-*L*-His-*L*-Phe-*L*-Arg(NO₂)与 *L*-Trp-Gly 苄酯偶合。使用酶方法的结果表明, 产物 *L*-His-*L*-Phe-*L*-Arg-*L*-Trp-Gly 中大量地混杂着 *L*-His-*L*-Phe-*D*-Arg-*L*-Trp-Gly。*L*-四肽从该混合物中通过分步结晶得到^[76]。很清楚, 欲用羧端含有 *L*-氨基酸的酰化多肽和氨基酸, 采用 DCC 法的原始形式合成多肽时, 产物发生消旋化是不可避免的^[77]。

把 *N*-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)加到有羧端氨基酸的多肽的成肽反应中, 可以降低 DCC 法引起的消旋化, 从而为片段组合制备多肽首次提供了一个安全的方法^[77, 78]。胰高血糖素全合成的成功确实是以此为基础的^[79]。把 2 个当量的 HOSu 加到含有 1 当量酰化剂和氨基组分的反应混合物中, 然后在低温下加入 1 当量 DCC。该方法在德国实验室中被称为 Eintopf 方法。这个与降低消旋化有关的早期的乐观结果后来并未完全证实, 且有副反应。例如, HOSu 与 DCC 反应生成 *N*-hydroxysuccinimidooxycarbonyl- β -alaninate, 该活泼酯与胺反应生成 succinimidooxycarbonyl- β -Ala 酰胺



1-羟基苯并三唑 3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉 3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪

或脲衍生物⁽⁸⁰⁾。这个副反应可能产生问题，特别是假如由于位阻效应，活泼酯的生成很慢时尤其如此⁽⁸¹⁾。尔后大量的 *N*-羟基化合物的系统研究发现，加入 1-羟基苯并三唑(HOBt)、3-羟基-4-氧-3,4-二氢三嗪到 DCC 偶联反应中，在特定条件下，可以高度有效地抑制消旋⁽⁸²⁻⁸⁵⁾。有关结果列入表 1.1—1.7 中。

表 1.1 *N*-羟基化合物对 DCC 偶联反应消旋化的影响

反应: $\text{Boc-L-Leu-Lhe-OH} + \text{HCl} \cdot \text{H-L-Val-OBu}^t \rightarrow$

$\text{Boc-Leu-Phe-Val-OBu}^t$ (NMM)

反应时间为 0℃ 1 小时和室温 1 小时

当量数	羟基物	溶剂	% <i>L-D-L</i>
		THF	8.1
		DMF	14.3
	—	DMSO	14.9
	—	Pyr	19.2
2	五氯酚	THF	10.0
2	五氯酚	DMF	27.0
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	1.0
1	1-羟基苯并三唑	DMF	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢吡嗪	DMF	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	THF	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	CH ₂ Cl ₂	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMA	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMSO	1.15
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	Pyr	1.5

表 1.1 表示加入各种试剂对 Boc-*L*-Leu-*L*-Phe-OH 与 HCl·*L*-Val-OBu^t 在各种溶剂中，在 *N*-甲基吗啉存在下，采用 DCC 法成肽的影响。表 1.2 的研究目的与表 1.1 完全一样，只是反应物为

表 1.2 *N*-羟基化合物对 DCC 偶联反应消旋化的影响

反应: $\text{TFA} \cdot L\text{-Pro-L-Val-OH} + \text{HCl} \cdot L\text{-Pro-OBu}^t \rightarrow$

$\text{TFA} \cdot \text{Pro-Val-Pro-OBu}^t (\text{NMM})$

反应时间为 0℃ 1 小时和室温 1 小时

当量数	羟基物	溶剂	% <i>L-D-L</i>
—	—	DMF	38.0
1	1-羟基苯并三唑	DMF	3.4
1	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	17.1
	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	17.2
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢喹唑啉	DMF	5.1
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	< 1.0

表 1.3 *N*-羟基化合物对 DCC 偶联反应消旋化的影响

反应: $\text{TFA} \cdot L\text{Pro-L-Val-OH} + L\text{-Pro-OBu}^t \rightarrow$

$\text{TFA} \cdot \text{Pro-Val-Pro-OBu}^t$

反应时间为 0℃ 4 小时和室温 12 小时

当量数	羟基物	溶剂	% <i>L-D-L</i>
—	—	DMF	67.0
1	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	28.0
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	15.0
1	1-羟基苯并三唑	DMF	6.0
2	1-羟基苯并三唑	DMF	5.9
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢喹唑啉	DMF	4.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	1.0
2	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	1.0

$\text{TFA} \cdot L\text{-Val-OH}$ 与 $\text{HCl} \cdot L\text{-Val-OBu}^t$, 溶剂为 DMF。表 1.3 和表 1.2 的唯一差别就是 $\text{HCl} \cdot L\text{-Val-OBu}^t$ 换成了游离的 $L\text{-Val-OBu}^t$ 。表 1.4 和表 1.5 研究了用不同酰化剂时的相同影响。从这些结果

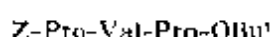
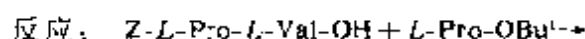
表 1.4 N-羟基化合物对 DCC 偶联反应消旋化的影响



反应时间为 0℃ 1 小时和室温 1 小时

当量数	羟基物	溶剂	% <i>L-D-L</i>
—	—	DMF	23.3
1	1-羟基苯并三唑	DMF	18.9
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉	DMF	8.4
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	1.3

表 1.5 N-羟基化合物对 DCC 偶联反应消旋化的影响



反应时间为 0℃ 4 小时和室温 12 小时

当量数	羟基物	溶剂	% <i>L-D-L</i>
—	—	DMF	48.0
2	N-羟基琥珀酰亚胺	DMF	46.0
1	1-羟基苯并三唑	DMF	9.0

中可找出最佳反应条件,以便尽量减少消旋化。反应介质的碱性对消旋化有明显影响,因此,反应采用较弱的碱性条件。加入强亲核试剂,该亲核试剂能够与恶唑酮的生成竞争,并有能力使已经生成但未消旋从而保持着原构型的恶唑酮开环以利于反应。表中的一些羟基化合物满足这些标准。预先活化的实验中生成的活泼酯与氨基化合物组分的反应非常迅速。如苄氧羰基-*L*-苯丙氨酸的 1-羟基苯并三唑酯与 $\text{HCl} \cdot L\text{-Val-OMe}$ 及 *N*-甲基吗啉在 0℃

表 1.6 羟基物和碱对 DCC 偶联反应消旋化的影响

反应: TFA · L-Pro-L-Val-OH, 用 DCC 和羟基化合物
0℃活化 1 小时, 室温活化 1 小时, 然后加 HCl ·
L-Pro-OBu^t 和碱, 反应混合物室温放置 1 小时

当量数	羟基物	碱	% L-D-L
1	N-羟基琥珀酰亚胺	NEM	30.4
2	N-羟基琥珀酰亚胺	NEM	19.4
2	N-羟基琥珀酰亚胺	NEM *	20.7
2	N-羟基琥珀酰亚胺	NMM *	17.6
2	N-羟基琥珀酰亚胺	EDA *	20.0
2	N-羟基琥珀酰亚胺	TEA *	13.5
1	1-羟基苯并三唑	NE ₃ M	13.2
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢唑啉	NEM	6.4
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	NEM	1.3

* 所述碱在 HCl · L-Pro-OBu^t 之后加入

反应 5 分钟, 产物二肽甲酯的产率在 90% 以上。在相同条件下, HOSu 的酯需要 1.5 至 2 小时才反应 90%。由于很难得到结晶, HOBt 的酯通常不分离出来。高度酸性的 HOBt 会切掉 NPS 基, 因此不能用于有 NPS 保护基的氨基酸或多肽的反应^[86]。在这个方法中加入羟基化合物后生成的活泼酯似乎是活泼中间体。

N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰胺(HONb)是能抑制 DCC 偶合反应消旋的另一种试剂。该化合物容易从戊二烯丙二酸酐, 降冰片烯-2,3-二甲酸酐和羟胺制得^[87]。酰化氨基酸或多肽的 HONb 酯通过 DCC 法得到^[88], 而且该酯在低温或室温下能顺利地与胺、氨基酸酯、多肽酯、氨基酸盐或多肽反应, 产率很好^[89]。该试剂室温下与 DCC 在二氧六环或四氢呋喃中搅拌 10 小时, 不生成二环己基尿和 β 丙氨酸类型的副产物。通过 Eintopf 方法可以完成多肽

的合成而不发生重大的消旋化。

表 1.7 羟基物和碱对 DCC 偶联反应消旋化的影响

反应: Boc-*L*-Leu-*L*-Phe-OH, 用 DCC 和羟基
化合物 0°C 活化 1 小时, 室温活化 1 小
时, 然后加 HCl · *L*-Val-OBu^t 和碱, 反
应混合物室温放置 1 小时

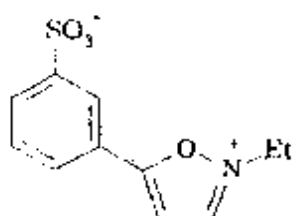
当量数	羟基物	溶剂	碱	% <i>L-D-L</i>
1	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	NEM	2.3
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	NEM	1.65
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	NEM *	1.0
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	NMM *	2.1
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	EDA *	1.2
2	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	DMF	TEA *	5.0
1	<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺	Pyr	NEM	6.1
1	1-羟基苯并三唑	DMF	NEM	4.4
1	1-羟基苯并三唑	DMF	NEM	9.3
1	1-羟基苯并三唑	DMF	NEM *	4.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉	DMF	NEM	4.0
2	3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉	DMF	NEM *	6.5
2	3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉	DMF	TEA *	6.8
2	3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉	DMF	EDA *	6.6
2	3-羟基-4-氧-3,4-二氢噻唑啉	DMF	NMM *	3.2
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	NEM	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	THF	NEM	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	CH ₂ Cl ₂	NEM	1.0
1	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	Pyr	NEM	1.65
2	3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-三嗪	DMF	NEM *	6.45

* 所述碱在 HCl · *L*-Pro-OBu^t 之后加入

3. 异恶唑盐法

N-乙基-5-苯基异恶唑-3'-磺酸酰化氨基酸或酰化多肽负离子反应生成烯醇酯, 该烯醇酯与氨基酸组分反应生成多肽^[40], 消

旋化程度很低。后来的研究表明,使用该法也可能发生消旋化^[90, 91],并提出了观察到的消旋化机制的假设^[92]。



N-乙基-5-苯基异恶唑-3'-磺酸

苯并异恶唑离子与酰化氨基酸或 *N'*-酰化多肽负离子反应生成活泼的酚酯,酚酯与氨基组分反应生成多肽^[93]。采用这条路线,合成了苄氧羰基甘氨酸-*L*-苯丙氨酸-甘氨酸乙酯,消旋率为 1%^[69](见图 1.6)。

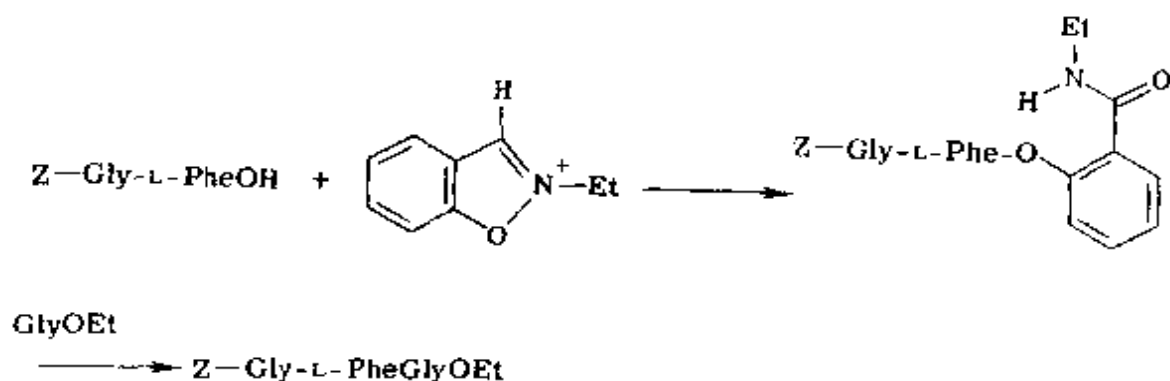
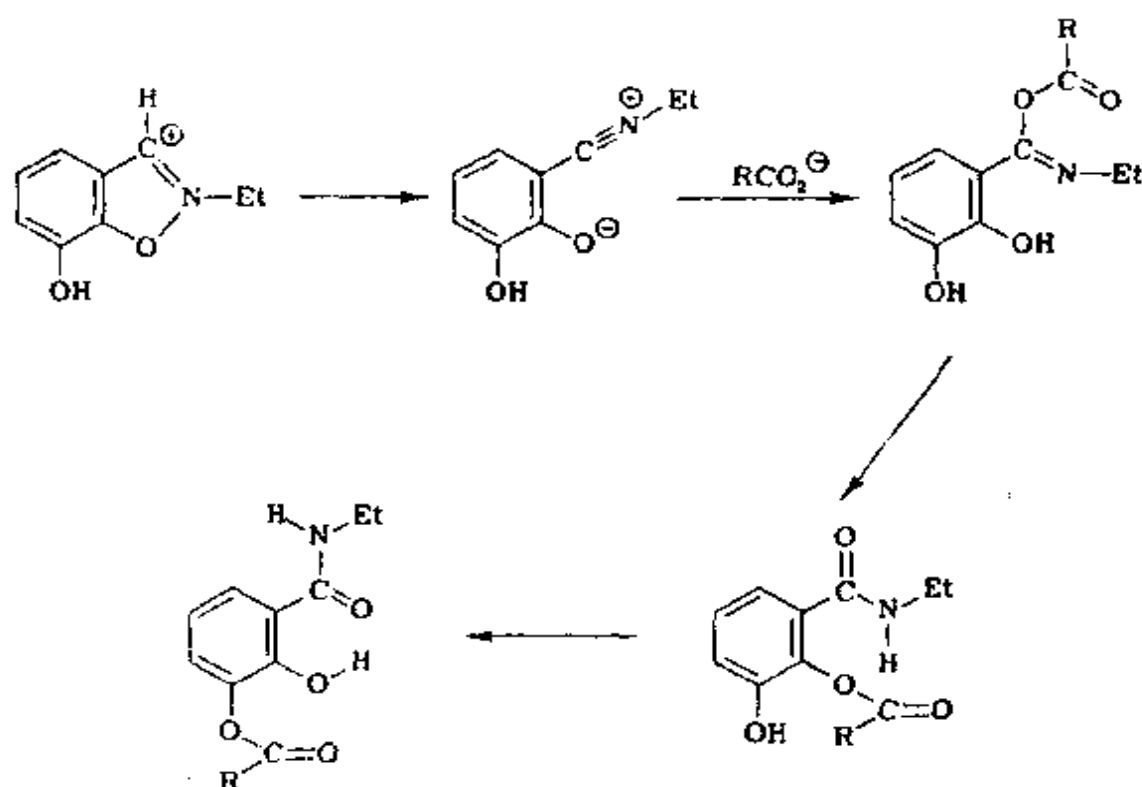


图 1.6 采用苯并异恶唑合成肽

已经提出了一个特别有用的试剂和一种结合了苯并异恶唑盐方法的广泛适用性和儿茶酚优点的酯,用于 *N*-酰化多肽的偶联且不发生消旋化^[94]。偶联试剂 2-乙基-7-羟基苯并异恶唑氟硼酸

噻盐与 *N*-酰化多肽的钠盐反应，生成对应的 3-酰氧基-2-羟基-*N*-乙基苯甲酰胺，它溶于有机溶剂。

3-酰氧基- α -羟基-*N*-乙基苯甲酰胺尽管看起来与简单酚酯一样，但前者明显地能阻扰三级胺引起的消旋化。在干燥的 *N,N*-二甲基甲酰胺/三乙胺中，*Z*-Gly-*L*-Phe 的活泼酯消旋化少于 1%，在相同条件下对应的 *N*-乙基水杨酰胺酯消旋化速率快 4000 倍以上。



4. 混合酸酐法

苄氧羰基或叔丁氧羰基保护的氨基酸的混合酸酐能用于逐步增长肽链，而且没有消旋化的危险。对应的多肽的混合酸酐则可以发生消旋化。根据上面的结果，羧端含有甘氨酸或脯氨酸的多

肽的混合酸酐偶联已用于合成大分子多肽。小心控制反应条件有可能使消旋化的程度控制在小的程度^[85]。已经系统研究了叔胺对苄氧羰基甘氨酸-*L*-苯丙氨酸混合酸酐与甘氨酸乙酯偶联的影响（-15℃以下，混合酸酐生成的时间是12分钟）。从这些实验中得出的结论是，叔胺在混合酸酐生成时不只是氯化氢的受体，开始时叔胺与氯代甲酸酯生成季胺类化合物，后者与酰化多肽反应生成混合酸酐。乙基二异丙基胺的位阻效应使混合酸酐的产率很低这一事实表明，上述结论是有道理的。采用至少含一个甲基的叔胺可以得到最好的产率和发生最小的消旋化，使用类似 *N*-甲基吗啉一类的化合物可以得到最好的结果。甲胺虽然能促使快速反应，但消旋化程度也高。较弱的胺，比如 *N*-甲基吗啉促使迅速生成混合酸酐而又不引起明显的消旋，这就把消旋步骤和混酐的生成分开了。混合酸酐的消旋可通过恶唑酮的生成或直接夺取质子，或两种因素兼而有之。

对于低消旋的混酐偶合反应来说，短时间活化（1-2分钟）、氯甲酸异丁酯、*N*-甲基吗啉和低温（-15℃）是值得提倡的反应条件。当然在更复杂的情况下，这种条件可能不是最好的条件。

酰化多肽的对称混合酸酐在多肽合成中曾被用作酰化剂，可是该法并没有普遍的使用价值，因为两个酰化氨基酸中有一个未被利用^[96, 97]。不过由保护多肽和新戊酰氯生成的混合酸酐在三乙胺的存在下，却已用于羧端含甘氨酸的较大的多肽片段的偶联^[9, 12, 98, 99]。

5. 六甲基磷酰胺活泼衍生物法

Gawne 等人^[100]指出，用六甲基磷酰胺的活泼衍生物合成的多肽，有明显的消旋化。活化羧基组分中的天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋

氨酸、酪氨酸和色氨酸的侧链对反应无妨，但丝氨酸、苏氨酸、组氨酸的侧链需要保护。作者认为，在较大分子多肽合成中消旋化问题很严重时，该法有特殊用途。但大分子多肽的难溶性可能限制该法使用。与该法有关的反应可用反应式描述如下：

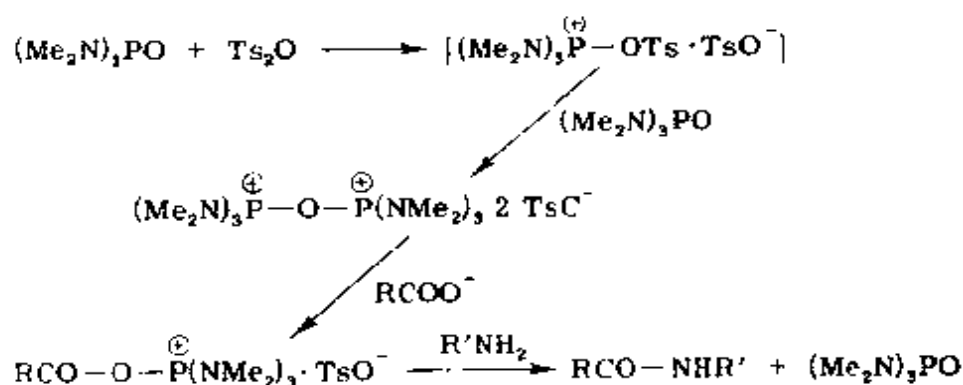


图 1.7 采用六甲基磷酸法合成多肽

6. 氧化-还原缩合法

肽键能通过氧化-还原反应生成^[101-106]。后来又对该法进行了一些改进。例如采用二价铜盐进行反应。另一个改进是氨基酸酯可由下述步骤被 N-保护的氨基酸酰化，该反应中的一个特别有用的修饰是不用金属。对上面的反应假定了图 1.11 可能的机制。

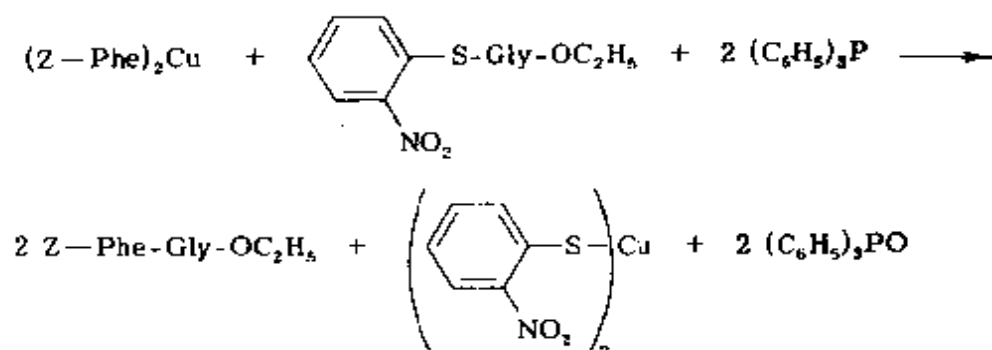


图 1.8 氧化-还原(二价铜盐)法接肽

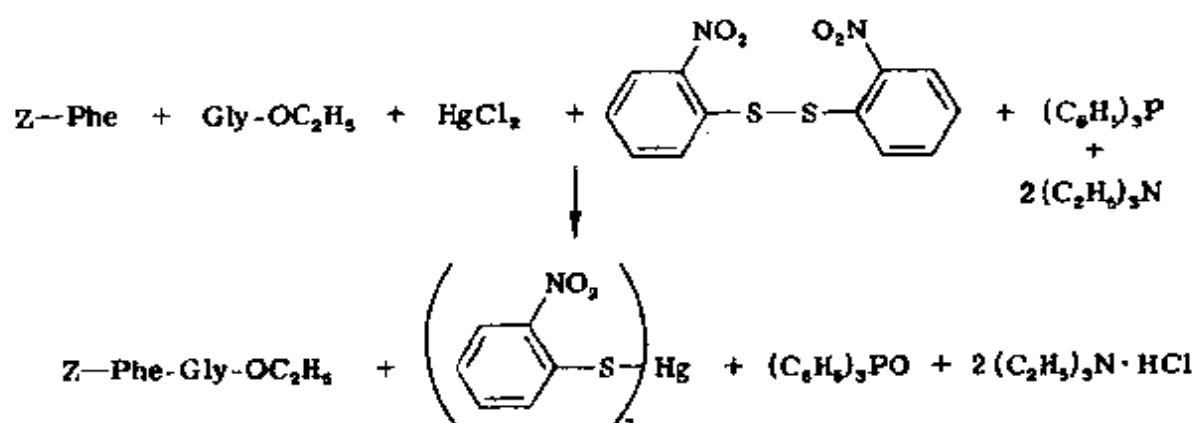


图 1.9 氧化-还原(二价汞盐)法接肽

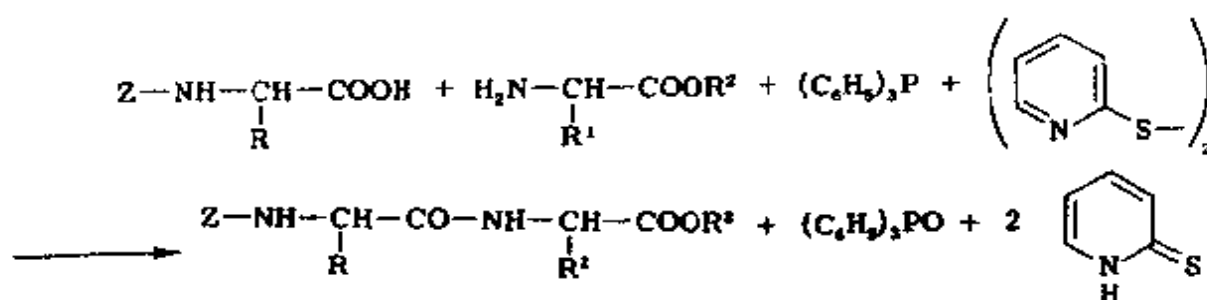


图 1.10 无金属参与的氧化-还原接肽

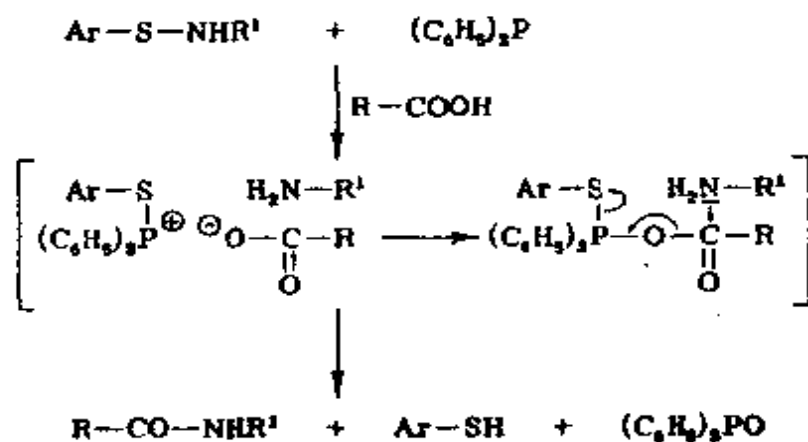


图 1.11 氧化-还原接肽的反应机制

第一步,硫进攻磷,接着与氨基酸反应生成活泼中间体。第二步,活泼中间体与氨基组分反应形成肽键。

氧化-还原反应已成功地用于制备活泼酯,反应能够在各种溶剂中进行,产率高,几乎不消旋。

7. 消除法

该法是为制备不消旋的二肽活泼酯而提出的^[31]。苄氧羰基氨基酸按常规方法转化为活泼酯,然后脱除苄氧羰基。随后,氨基酸活泼酯的盐与酰化氨基酸通过 DCC 反应,以混合酸酐法或活泼酯法偶联生成酰化二肽的活泼酯。氨基酸的对硝基酚酯也能被高活性的酰化氨基酸的五氟酚酯酰化^[35]。消除法的这一变化被用作制备光学纯中间体的路线,以便合成高分子量的多肽^[34]。实际上该法已经用于合成了一系列立体化学单一的三肽的对硝基酚酯^[107, 108]。

七、脱保护

1. 金属钠-液氨

金属钠-液氨能脱去 *S*-苄基半胱氨酸上的苄基、*N*-甲苯磺酰基和 *N*-苄氧羰基。后来发现谷氨酰胺, *N*-Tos-Lys 和 α -MSH 暴露在金属钠-液氨中造成肽链在 Lys-Pro 肽键处断裂^[109, 110]。而含有 Pro-Lys、Lys-Lys、Val-Lys、Tyr-Pro、Arg-Pro 或 Ser-Pro 单元的多肽则不发生肽链的断裂。若在严格的无水条件下金属钠-液氨进行还原脱保护,则 Lys-Pro 式的肽键断裂亦可被抑制。不过,由于上述实验观察,金属钠-液氨法一般被看作是一个高度可疑的脱保护方法。

2. 在液氨中催化氢解

在液氨溶液中用铂催化氢化很容易从含有 *S*-苄基半胱氨酸的多肽中除去 *N*-苄氧羰基^[111]，该条件下 *N*-叔丁氧、叔丁基酯或叔丁基醚基是稳定的。有些情况下脱 *Z* 保护基的速率很慢，加入三乙胺或乙酸胺可以使之加快。

3. 氟化氢(HF)

除乙氧甲酰基、苯甲酰基、甲酰基、邻苯二甲酰基、甲酯、乙酯、*N*-苄基、*N*-对甲氧苄基、*S*-甲基、*S*-乙基、*S*-异丙基和 *S*-乙酰胺甲基外，一般的保护基在氟化氢中 0—20℃ 反应 30—60 分钟即可被除去^[112]。加入茴香醚、巯基乙醇或巯二甘醇，可以大大抑制丝氨酸和酪氨酸的破坏及发生其它副反应。在茴香醚存在下，氟化氢也使硝基精氨酸生成精氨酸，而在硝酸钾存在下，精氨酸在氟化氢中 0℃ 下又可被硝化^[113]。

N-Tos-Phe-Phe-OC₂H₅ 在 20℃ 与氟化氢反应 1 小时，得到 *N*-Tos-Phe-Phe^[114]。而 *N*-Tos-His-Gly-OBzl，0℃ 与氟化氢反应 1 小时，得到 His-Gly，产率为 53%^[115]。*N*-对甲苯磺酰基亦容易从 *N*-对甲苯磺酰精氨酸上脱去^[116]。但采用无水氟化氢可发生副反应，长时间反应时更是如此。含有丝氨酸和苏氨酸的多肽，暴露在氟化氢中时，发生 N→O 迁移^[117]。产生的 *O*-酰化多肽当用碳酸氢盐处理时，又恢复成 *N*-酰化多肽。这些重排似乎定量进行且不发生消旋化。含蛋氨酸的多肽在氟化氢中暴露 48 小时会发生断链^[118]。

用强酸脱侧链保护基，例如用三氟甲磺酸或其硅烷衍生物脱保护，也有广泛的应用，这些脱保护试剂的特点是比 HF 安全。但

由于对某些保护基(如对甲苯磺酰基)的切除有时不能确定,需要反复进行,因而受到一定的限制。有关的知识可在一般的文献中找到,本章不作特别讨论。

八、保护基

1. 氨基的保护基

(1) 叔丁氧羰基 (Boc)

1957 年 Carpino 报道了可用 Boc 保护氨基^[116], 后来又有些改进^[120]。在 Boc 存在下肽链中不含 Cys 和 Met, Lys(Z)可以通过氢化选择性地除去。但反过来做就很困难。

简单的多肽, 例如 N^{ϵ} -Boc- N^t -Z-Lys-Thr-OBzl 不能很彻底地在有机溶剂中用三氟乙酸或氟化氢脱保护, 在这些情况下, 用 70%三氟乙酸会更有利, 醚化的三氟化硼的冰乙酸溶液似乎特别理想, 但 *S*-三苯甲基和 *S*-四氢吡喃基保护基对这种试剂是稳定的^[121, 122]。在 98%甲酸中暴露 1—3 小时是选择性脱去 Boc(不影响苄氧羰基)的另一种方法^[123]。 β -巯基乙基磺酸则更有效^[124]。让保护的多肽在 50%甲醇水溶液中通过离子交换树脂 Zeo-Corb 225 柱可选择性除去 Boc 而不影响叔丁酯^[125]。

(2) 叔戊氧羰基 (Aoc)

该保护基由日本学者首先使用^[126], Aoc 基对酸解的稳定性与叔丁氧羰基相似。

(3) 邻硝基苯基亚磺酸酰基 (NPS)

Zervas 等首先将它用于多肽合成^[127]。它可以在温和的条件下

脱去而不伤害侧链保护基,例如苄酯、叔丁酯、苄氧羰基等^[128]。经过系统研究后发现,HCN、H₂SO₃或硫代乙酰胺在有机溶剂中是脱NPS基的优良试剂,乙酸增加这些试剂的脱保护速度^[129]。

(4) 2-(对-联苯基)-异丙氧羰基(Bpoc)

Bpoc基对80%乙酸极为敏感。Bpoc和Boc基的断裂程度的差异取决于反应条件。范围从1800:1到9000:1。这样,当除掉了99.8—99.9%的Bpoc时,Boc只除去0.1—0.2%。

(5) 甲酰基(For)

用于保护Lys的 ϵ -氨基以及色氨酸的吡咯环^[127, 128]。脱保护时只要与甲酰基的受体化合物(如肼、羟胺和一系列肼的衍生物)在弱酸性条件下反应即可^[129—131]。甲酰基亦能被巯基乙酸脱去^[132]。

(6) 对甲氧基苄氧羰基(pMZ)

该保护基在0℃下用三氟乙酸或催化氢化脱去^[133—135]。已经报道了几条制备pMZ保护氨基酸的路线^[134, 136—140]。

(7) 各种其它的保护基

N-哌啶氧羰基^[141]在冷酸中稳定,但用催化氢化,电解还原法以及用锌粉或连二硫酸钠的乙酸水溶液可使之脱去。N-氰基-叔丁氧羰基在碱性条件下通过 β -消除可以脱去^[142]。康氧羰基用6.5%溴化氢的冰乙酸溶液、氯化氢的冰乙酸溶液或无水三氟乙酸可以脱去^[143]。异冰片基氧羰基室温下用三氟乙酸或20%溴化氢的冰乙酸溶液脱去,该催化剂不受催化氢化、肼解和皂化的影

响^[144, 145]。 β 、 β 、 β -三氯乙氧羰基用于保护 Lys 的 ϵ -氨基，可以被锌在乙酸或回流的甲醇中除去，但对氯化氢的二氧六环溶液或三氟乙酸稳定^[146]。丙二酸酐和柠康酸酐生成的酰化多肽或蛋白质在碱性条件下稳定，但可被酸脱去^[147, 148]。

氨基保护基的酸性裂解，是最通用的脱保护基方法，脲烷类型的保护基用该法脱掉。一般认为符合下述机制：

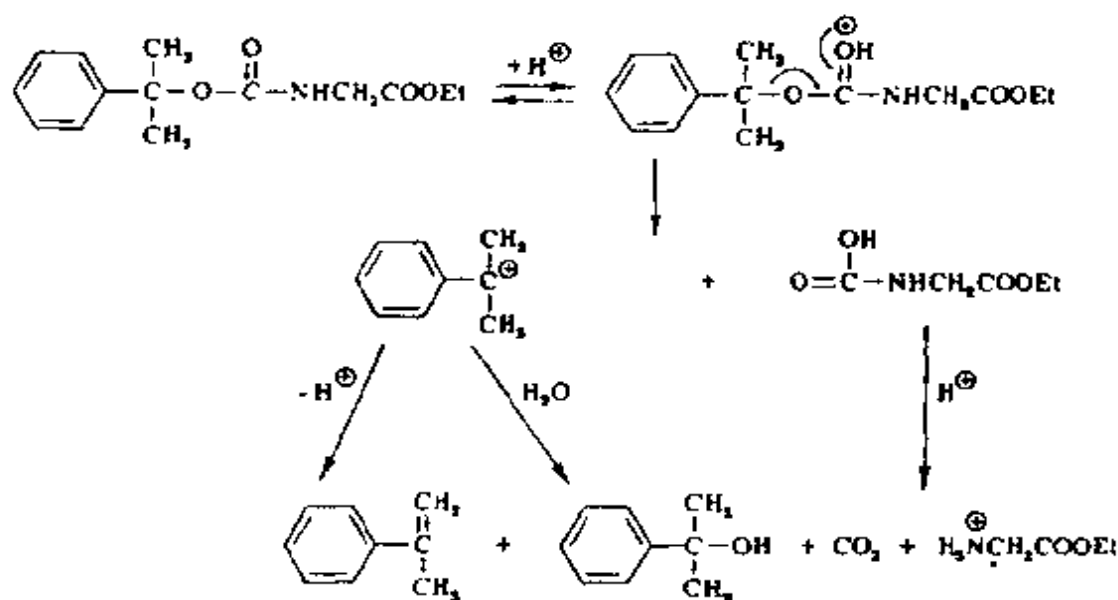


图 1.12 酸性脱氨基端保护基的机制

2. 羧基保护基

(1) 酯

甲酯和乙酯是逐步合成中保护羧基的常用方法，可通过皂化除去或转变为肼以便用于片段组合，叔丁酯在酸性条件下除去，苯酯用催化氢化除去，但在含有半胱氨酸和蛋氨酸的多肽中显然

不适用。对硝基苄酯用催化氢化法除去，但对 HBr/乙酸稳定。对甲氧基苄酯能用于含 NPS 基的肽链增长，因 NPS 能不影响酯的稳定性的酸性条件下脱去，酯则能在三氟乙酸/茴香醚下脱去。2,4,6-三甲基苄酯、胡椒基酰基酯、对溴苯甲酰甲基酯、二苯甲酯亦被用于保护羧基。一系列以硫醚形式存在的稳定的酯能在碱性中氧化成砜。这类砜酯也能通过氨解除去，因此可用于片段组合^[149, 150]。由于活化中包括氧化，所以该保护基的使用受到限制。

(2) 酰胺

生物活性多肽是酰胺时，可用酰胺保护羧基，肽酰胺在增长肽链的脱保护中足够稳定。

(3) 保护的酰肼

双重保护的酰肼是片段组合长链多肽的理想中间体^[151]。

3. 侧链保护

(1) 半胱氨酸

S-苄基难以从目的物中脱去，后来又引入了其它保护基。例如，乙酰基、苯酰基、苯甲酰基、苄氧羰基^[152]、对甲氧苄基^[153]、对硝基苄基^[154]、叔丁基^[155]、异丁氧甲基^[156]、芳烷基^[157]、二苯甲基^[158]、4,4'-二甲氧基二苯基甲基^[159]、四氢吡喃基^[160]以及二甲基-2,2-噻唑烷^[161]。三苯甲基作为 S-的保护基有很多的用途，用酸或银盐、汞盐可以脱去^[162, 158]。乙酰氨基甲基 (ACM) 是有潜在价值的 S-保护基^[163]，对酸、三氟乙酸、HBr/冰乙酸、HCl/甲醇、无水 HF (0℃) 都稳定且不受影响。ACM 易于用 2N 乙酸汞于 pH 4 下室温脱除。碘也可除去 ACM 基^[164]。乙酰氨基甲酰基 (EC) 为半胱

氨酸 S 的保护提供了另一途径^[165]。EC 基对三氟乙酸和 HBr/冰乙酸等强酸稳定,对碱不稳定 (pH 高于 8),用银和汞离子即可脱去^[166, 167]。S-磺酸酯在胰岛素的合成中是重要的中间体,由于它们的不稳定性,S-磺酸酯尚未在多肽合成中用作保护基。对称的二硫化物在牛胰岛素的合成中有所应用^[168, 170]。

(2) 蛋氨酸

苄氧羰基保护蛋氨酸并不很理想。蛋氨酸既易被过氧化氢氧化成砜,又易被巯基乙酸还原成蛋氨酸,为该化合物分子上的硫提供了一个合适的保护技术。

(3) 组氨酸

用苄基保护组氨酸咪唑环上的氮有许多缺点,而三苯甲基对酸又太不稳定,苄氧羰基则遇碱或氨解时即可脱去,为了克服这些问题,2,2,2-三氟-1-苄氧羰基和 2,2,2-三氟-1-叔丁氧羰基乙基被引入作为组氨酸咪唑环上的保护基,它们可通过催化氢化或冷的三氟乙酸脱去;哌啶羰基是另一种类型的保护基,对强酸和催化氢化都稳定,但可被肼脱去;甲苯磺酰基作为咪唑环保护基易于引入,可用无水 HF 除去;DNP 基在多肽合成的过程中都稳定,而且能通过硫醇脱去^[171]。

(4) 精氨酸和赖氨酸

金刚烷氧羰基 (Adoc) 是精氨酸保护基中性能最好的保护基^[172],性质与 Boc 类似。Adoc 可以增加含精氨酸的多肽在有机溶剂中的溶解度。

(5) 酪氨酸

酪氨酸上酸性氧的最普遍的保护基就是叔丁基和苄基，两者都对酸敏感，苄基还可以用氢化脱去。后来引入的甲氧羰基、乙氧羰基、异丙氧羰基或异丁氧羰基对酸或氢化是稳定的，但可被碱脱去^[173]。O-氮甲酰基亦有类似的性质^[174]。

(6) 丝氨酸和苏氨酸

2, 2, 2-三氟-1-苄氧羰基氨基乙基 (Z-TF) 对于保护丝氨酸和苏氨酸上的羟基有与保护组氨酸上咪唑环同样的功效。它对三氟乙酸稳定，但可通过氢化或 HBr/冰乙酸脱去^[175]。

(7) 天冬氨酸和谷氨酸

2, 4-二甲氧苄基和 4, 4'-dimethoxy-benzyhydryl 基均被用作天冬氨酸和谷氨酰胺上酰胺基的保护基。前者对氢化及三氟乙酸均较稳定，后者对催化氢化、碱及肼都稳定，但能被酸脱去。

九、固相合成

多肽的固相合成是多肽合技术发展的一个重要标志。与液相合成相比它有一些优点：

(1) 不溶性载体键合的聚合物只要简单地反复过滤和洗涤即可从可溶性的试剂和副产物中分离出来；

(2) 可溶性的试剂可以过量以使反应完全和获得高产率；逐步合成更为简化，因为所有的反应都可以在一个容器中进行，因而也避免了反应中间体转移的手续和损失；所有的操作包括聚合链的增长都可实现自动化。

当然也有一些缺点：所有的反应中间体都是被键合在载体上，不能按常规的方法分离纯化；虽然可溶性杂质易除去，但连接在载体上的副产物在合成的中间过程不能从需要的产物中分离出来，只能而且必须在合成的终了阶段除去；这样一来，目的物的高纯度只能依赖于脱保护和偶合反应充分有效以及无副反应。

在多肽和蛋白质的固相合成中，有六种一般策略可供选择：

① 把要合成的多肽的羧端氨基酸的羧基附着到固体载体上，然后从氨基端逐步增长肽链。这是最为常用的从 C 到 N 的组合。

② 把需要的氨基端残基的 α 氨基附着到固体载体上，然后往羧端逐步加羧端保护的氨基酸到羧端活化的肽链上。这就是由 N 到 C 的组合。

③ 把氨基酸的侧链基附着到固相载体上，然后既可以由 N 到 C 也可以由 C 到 N 进行合成。

④ 前三种策略都不允许纯制保护的多肽中间体，这一缺点可以加以克服，即在合成的中间过程就把中间体从载体上切下来与副产物分开。纯化后再接到固相载体上，继续合成目标。这种策略被称为纯制后再附着。

⑤ 使肽中间体纯化的另一策略是，固相合成出来的几个小片段纯制以后再在溶液中组合成需要的多肽，该策略称为液相片段组合。

⑥ 把一个个纯制过的保护多肽片段按次序接到固定在载体上的一个多肽片段上，从而得到需要的多肽，该策略称为在固相载体上进行片段组合。

多肽合成的化学方法是有机合成和药物合成中的一个非常特殊的分支，有关知识的深度和广度不可言喻。普通的实验操作不

是本书的主题,读者可以从一般的实验手册中查阅。在较高层次的水平上从事科学研究的人员必须对文献有充分的评价才能在新的起点进行开拓,为达此目的只有在对相关知识普遍了解的基础上,才能进行卓有成效的分析和综合,为此,本章简述了多肽合成方法学的各个侧面,从而构成了对它们进行评述的素材与基础。

参 考 文 献

- [1] Cutrie, M. G. , 1984, *Science*, **67**, 223.
- [2] Debold, A. J. , 1981, *Life Science*, **28**, 89.
- [3] Kangawa, K. , and Matsuo H. , 1984, *Biochem. Biophys. , Res. Commun.* , **118**, 131.
- [4] Merrifield, R. B. , 1962, *Fed. Proc. , Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* , **21**, 412.
- [5] Merrifield, R. B. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 2149.
- [6] Bodanszky, M. , and du Vigneaud, V. , 1959, *J. Amer. Chem. Soc.* , **81**, 5688.
- [7] Bodanszky, M. , and Williams, N. J. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 685.
- [8] Bodanszky, M. , Ondetti, M. A. , Levine, S. D. , and Williams, N. J. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 6753.
- [9] Schwyzerm, R. and Sieber, P. , 1966, *Helv. Chim. Acta*, **49**, 134.
- [10] Graf, L. , Bajusz, S. , Parthy, A. , Barat, E. , and Cseh, G. , 1971, *Acta Biochem. Biophys.* , **6**(4), 115.
- [11] Riniker, B. , Sieber, P. , Rittel, W. , and Zuber, H. , 1972, *Nature (London)*, **235**, 114.
- [12] Morley, J. S. , 1967, *J. Chem. Soc. , C*, 2410.
- [13] Pless, J. , and Biossonnas, R. A. , 1963, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1609.
- [14] Anderson, G. W. , Zimmerman, J. E. , and Callahan, F. , 1964, *J. Amer. Chem. Soc.* , **86**, 1839.
- [15] Mazur, R. H. , 1963, *J. Org. Chem.* , **28**, 2198.
- [16] Wieland, T. , Determann, H. , and Kahle, W. , 1963, *Angew. Chem.* , **75**, 209.
- [17] Beyerman, H. C. , and Massen, van den Brink, W. , 1963, *Proc. Chem. Soc.* ,

London, 266.

- [18] Beyerman, H. C. , Massen van den Brink, W. , Weygand, F. , Prox, A. , Konig, W. , Schmidhammer, L. , and Nintz, E. , 1965, *Rec. Trav. Chim. , Pays-Bas* **84**, 213.
- [19] Nakamizo, N. , 1969, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **42**, 1071.
- [20] Nakamizo, N. , 1969, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **42**, 1078.
- [21] Nefkens, G. H. L. , Tesser, G. I. , and Nivard, R. J. F. , 1962, *Rec. Trav. Chim. , Pays-Bas* , **81**, 683.
- [22] Broadbent, W. , Morley, J. S. , J. S. , and Stone, B. E. , 1967, *J. Chem. Soc. C* , 2632.
- [23] Kupryszewski, G. , 1961, *Rocz. Chem.* , **35**, 1533.
- [24] Kovacs, J. , Gianotti, R. , and Kapoor, A. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88**, 2282.
- [25] Kovacs, J. , Ceprini, N. Q. , Dupraz, C. A. , and Schmit, G. N. , 1967, *J. Org. Chem.* , **32**, 3696.
- [26] Kovacs, J. , Kisfaludy, L. , Ceprini, M. Q. , and Johnson, R. H. , 1969, *Tetrahedron* , **25**, 2555.
- [27] Kisfaludy, L. , Ceprini, M. Q. , Rakoczy, B. , and Kovacs, J. , 1967, *Peptides* , ed. Beyerman, H. C. van de Linde, A. A. , and van den Brink, W. M. , North-Holland Publ. , Amsterdam, p. 25.
- [28] Sakakibara, S. , and Inukai, N. , 1964, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **37**, 1231.
- [29] Sakakibara, S. , and Inukai, N. , 1965, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **38**, 1979.
- [30] Fujino, M. , and Hatanaka, C. , 1968, *Chem. Pharm. Bull.* , **16**, 929.
- [31] Goodman, M. , and Stueben, K. , 1959, *J. Amer. Chem. Soc.* , **81**, 3980.
- [32] Kapoor, A. , Gerencser, L. W. , and Koutnik, W. R. , 1969, *J. Pharm. Sci.* , **58**, 281.
- [33] Kovacs, J. , Kisfaludy, L. , and Ceprini, M. Q. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 183.
- [34] Kisfaludy, L. , Roberts, J. E. , Johnson, R. H. , Mayers, G. L. , and Kovacs, J. , 1970, *J. Org. Chem.* **35**, 3563.

- [35] Kovacs, J. , Mayers, G. L. , Johnson, R. H. , Cover, R. E. , and Ghatak, U. R. , 1970, *J. Org. Chem.* , **35**, 1810.
- [36] Handford, B. O. , Jones, J. H. , Young, G. T. , and Johnson, T. F. N. , 1965, *J. Chem. Soc.* , London , 6814.
- [37] Jones, J. H. , Liberek, B. , and Young, G. T. , 1967, *Peptides*, ed. Beyerman, H. C. , van de Linde, A. , and van den Brink, W. M. , North-Holland. , Publ. , Amsterdam, 15.
- [38] Jones, J. H. , Liberek, B. , and Young, G. T. , 1967, *J. Chem. Soc.* , C , 2371.
- [39] Jones, J. H. , and Young, G. T. , 1968, *J. Chem. Soc.* , C , 53.
- [40] Woodward, R. B. , Olofson, R. A. , and Mayer, H. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc.* , **83**, 1010.
- [41] Dutta, A. S. , and Morley, J. S. , 1971, *J. Chem. Soc.* , C , 2896.
- [42] Lloyd, K. , and Young, G. T. , 1968, *J. Chem. Commun.* , 1400.
- [43] Lloyd, K. , and Young, G. T. , 1971, *J. Chem. Soc.* , C , 2890.
- [44] Jones, J. H. , and Young, G. T. , 1968, *J. Chem. Soc.* , C , 436.
- [45] Jakubke, H. D. , and Voigt, A. , 1966, *Chem. Ber.* , **99**, 2419.
- [46] Jakubke, H. D. , Voigt, A. and Burkhardt, S. , 1967, *Chem. Ber.* , **100**, 2367.
- [47] Laufer, D. A. , Chapman, T. M. , Marlborough, D. I. , Vaiya, V. M. , and Blout, E. R. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc.* , **90**, 2696.
- [48] Fridkin, M. , Patchornik, A. , and Katchalski, E. , 1972, *Biochemistry* , **11**, 466.
- [49] Katchalski, E. , and Sela, M. , 1958, *Advan. Protein Chem.* , **13**, 243.
- [50] Sela, M. , and Katchalski, E. , 1959, *Advan. Protein Chem.* , **14**, 391.
- [51] Bartlett, P. D. , and Jones, R. H. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , **79**, 2153.
- [52] Bartlett, P. D. , and Dittmer, D. C. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , **79**, 2159.
- [53] Hirschmann, R. , Strachan, R. G. , Schwam, H. , Schoenewaldt, E. F. , Joshua, H. , Barkemeyer, H. , Veber, D. F. , Paleveda, W. J. , Jr. , Jacob, T. A. , Beesley, T. E. , and Denkwalter, R. G. , 1967, *J. Org. Chem.* , **32**, 3415.
- [54] Hirschmann, R. , Schwam, H. , Strachan, R. G. , Schoenewaldt, E. F. , Barkemeyer, H. , Miller, S. M. , Conn, J. B. , Garsky, V. , Veber, D. F. , and Denkwalter, R. G. , 1971, *J. Amer. Chem. Soc.* , **93**, 2746.

- [55] Denkwalter, R. G. , and Hirschmann, R. , 1969, *Amer. Sci.* , **57**, 389.
- [56] Dewey, R. S. , Schoenewaldt, E. F. , Joshua, H. , Paleveda, W. J. , Jr. , Schwam, H. , Barkemeyer, H. , Arison, B. H. , Veber, D. F. , Strachan, R. G. , Milkowski J. , Denkwalter, R. G. , Hirschmann, R. , 1971, *J. Org. Chem.* , **36**, 49.
- [57] Billimoria, J. D. , and Cook, A. H. , 1949, *J. Chem. Soc. London* , 2323.
- [58] Davis, A. C. , and Levy, A. L. , 1951, *J. Chem. Soc.* , London , 2419.
- [59] Tilak, M. A. , 1970, *Tetrahedron Lett.* , 849.
- [60] Beyerman, H. C. , de Leer, E. W. B. , and Floor, J. , 1973, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* , **92**, 481.
- [61] van Zon, A. , and Beyerman, H. C. , 1973, *Helv. Chim. Acta* , **56**, 1729.
- [62] Anderson, G. W. , Zimmerman, J. E. , and Callahan, F. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88**, 1338.
- [63] Izumiya, N. , and Muraoka, M. , 1969, *J. Amer. Chem. Soc.* , **91**, 2391.
- [64] Kisfaludy, L. , and Nyeki, O. , 1972, *Acta Chim. (Budapest)* , **72**, 75.
- [65] Sieber, P. , Riniker, B. , Brugger, M. Kamber, B. , and Rittel, W. , 1970, *Helv. Chim. Acta* , **53**, 2135.
- [66] Honzl, J. , and Rudinger, J. , 1961, *Collect. Czech. Chem. Commun.* , **26**, 2333.
- [67] Sieber, P. , Brugger, M. , and Rittel, W. , 1971, *Peptides 1969*, ed. Scoffone, E. , North-Holland Publ. , Amsterdam, 60.
- [68] Kemp, D. S. , Bernstein, Z. , and Rebek, J. Jr. , 1970, *J. Amer. Chem. Soc.* , **92**, 4756.
- [69] Kemp, D. S. , Wang, S. W. , Busby, G. , and Hugel, G. , 1970, *J. Amer. Chem. Soc.* , **92**, 1043.
- [70] Kemp, D. S. , and Rebek, J. Jr. , 1970, *J. Amer. Chem. Soc.* , **92**, 5792.
- [71] Agarwal, K. L. , Kenner, G. W. , and Sheppard, R. C. , 1969, *J. Chem. Soc.* , C , 954.
- [72] Zahn, H. , and Brandenburg, D. , 1966, *Justus Liebigs Ann. Chem.* , **692**, 220.
- [73] Guttman, S. , and Boissonnas, R. A. , 1960, *Helv. Chim. Acta* , **43**, 200.
- [74] Riniker, B. , Brugger, M. , Kamber, B. , Sieber, P. , and Rittel, W. , 1969, *Helv.*

Chim. Acta, **52**, 1058.

- [75] Anderson, G. W. , and Callahan, F. . 1958. *Amer. Chem. Soc.* , **80**, 2902.
- [76] Hofmann, K. , Woolner, M. E. , Spuhler, G. , and Schwartz, E. , 1958, *J. Amer. Chem. Soc.* , **80**, 1486.
- [77] Wunsch, E. , and Drees, F. , 1966, *Chem. Ber.* , **99**, 110.
- [78] Weygand, F. , Hoffmann, D. , and Wunsch, E. , 1966, *Z. Naturforsch.* , *B*, **21**, 426.
- [79] Wunsch, E. , and Wendberger, G. , 1968, *Chem. Ber.* , **101**, 3659.
- [80] Gross, H. , and Bilk, L. , 1968, *Tetrahedron*, **24**, 6935.
- [81] Weygand, F. , Steglich, W. , and Ceytul, N. , 1968, *Z. Naturforsch.* , *B*, **23**, 1391.
- [82] König, W. , and Geiger, R. , 1970, *Chem. Ber.* , **103**, 788.
- [83] König, W. , and Geiger, R. , 1970, *Chem. Ber.* , **103**, 2024.
- [84] König, W. , and Geiger, R. , 1970, *Chem. Ber.* , **103**, 2034.
- [85] Harrison, D. , and Smith, A. C. B. , 1960, *J. Chem. Soc.* , London , 2157.
- [86] König, W. , and Geiger, R. , 1972, *Proceedings of the Third American Peptide Symposium*, ed. Meienhofer, J. , Ann Arbor Science Publ. , Ann Arbor, Michigan, 343.
- [87] Bauer, L. , and Miarka, S. V. , 1959, *J. Org. Chem.* , **24**, 1293.
- [88] Elliot, D. F. , and Russell, D. W. , 1957, *Biochem. J.* , **66**, 49.
- [89] Fujino, M. , Kobayashi, S. , Obayashi, M. , Fukuda, T. , Shinagawa, S. , and Nishimura, O. , 1974, *Chem. Pharm. Bull.* , **22**, 1857.
- [90] Weygand, F. , Prox, A. , Schmidhammer, L. , and König, W. , 1963, *Angew. Chem.* , **75**, 282.
- [91] Williams, M. W. , and Young, G. T. , 1963, *J. Chem. Soc.* , London, 881.
- [92] Woodward, R. B. , and Woodman, D. J. , 1969, *J. Org. Chem.* , **34**, 2742.
- [93] Kemp, D. S. , and Woodward, R. B. , 1965, *Tetrahedron*, **21**, 3019.
- [94] Kemp, D. S. , and Chien, S. W. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 2743.
- [95] Anderson, G. W. , Zimmerman, J. E. , and Callahan, F. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 5012.
- [96] Weygand, F. , Huber, P. , and Weiss, K. , 1967, *Z. Naturforsch.* , *B*, **22**, 1084.

- [97] Weygand, F. , and DiBello, C. , 1969, *Z. Naturforsch. , B* , **24** , 314.
- [98] Zaoral, M. , 1962, *Collect. Czech. Chem. Commun. ,* **27** , 1273.
- [99] Beacham, J. , Bentley, P. H. , Kenner, G. W. , MacLeod, J. K. , Mendive, J. J. , and Sheppard, R. C. , 1967, *J. Chem. Soc. , C* , 2520.
- [100] Gawne, G. , Kenner, G. W. , and Sheppard, R. C. , 1969, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **91** , 5669.
- [101] Mukaiyama, T. , Ueki, M. , Maruyama, H. , and Matsueda, R. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **90** , 4490.
- [102] Mukayama, T. , Matsueda, R. , Maruyama, H. , and Ueki, M. , 1969, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **91** , 1554.
- [103] Mukaiyama, T. , Matsueda, R. , and Suzuki, M. , 1970, *Tetrahedron Lett. ,* 1907.
- [104] Mukaiyama, T. , Goto, K. , Matsueda, R. , and Ueki, M. 1970, *Tetrahedron Lett. ,* 5293.
- [105] Ueki, M. , Maruyama, H. , and Mukaiyama, T. , 1971, *Bull. Chem. Soc. Jap. ,* **44** , 1108.
- [106] Matsueda, R. , Maruyama, H. , Ueki, M. , and Mukaiyama, T. , 1971, *Bull. Chem. Soc. Jap. ,* **44** , 1373.
- [107] DeTar, D. F. , Rogers, F. F. , Jr. , and Bach, H. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **89** , 3039.
- [108] DeTar, D. F. , and Vajda, T. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **89** , 998.
- [109] Hofmann, K. , and Yajima, H. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **83** , 2289.
- [110] Guttmann, S. , 1963, *Peptides*, ed. Young, G. T. , Macmillan, New York , p. 41.
- [111] Kuromizu, K. , and Meienhofer, J. , 1974, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **96** , 4978.
- [112] Sakakibara, S. , Shimonishi, Y. , Okada, M. , and Kishida, Y. , 1967, *Peptides*, ed. Beyerman, H. C. , van de Linde, A. , and van de Brink, W. M. , North-Holland Publ. , Amsterdam , 44.
- [113] Lenard, J. , 1967, *J. Org. Chem. ,* **32** , 250.
- [114] Sakakibara, S. , Kishida, Y. , Nishizawa, R. , and Shimonidhi, Y. , 1968, *Bull. Chem. Soc. Jap. ,* **41** , 438.
- [115] Sakakibara, S. , and Fujii, T. , 1969, *Bull. Chem. Soc. Jap. ,* **43** , 1466.

- [116] Mazur, R. H. , and Plume, G. , 1968, *Experientia*, **24**, 661.
- [117] Lenard, J. , and Hess, G. P. , 1964, *J. Biol. Chem.* , **239**, 3275.
- [118] Lenard, J. , Schally, A. V. , and Hess, G. P. , 1964, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **14**, 498.
- [119] Carpino, L. A. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , **79**, 4427.
- [120] Yajima, H. , and Kawatani, H. , 1968, *Chem. Pharm. Bull.* , **16**, 182.
- [121] Schnabel, E. , Klostermeyer, H. , and Berndt, H. , 1971, *Justus Liebigs Ann. Chem.* , **749**, 90.
- [122] Hiskey, R. G. , Beacham, L. M. , Matl, V. G. , Smith, J. N. , Williams, E. B. Jr. , Thomas, A. M. , and Wolters, E. T. , 1971, *J. Org. Chem.* , **36**, 488.
- [123] Halpern, B. , and Nitecki, D. E. , 1967, *Tetrahedron Lett.* , **31**, 3031.
- [124] Loffet, A. , and Dremler, C. , 1971, *Experientia*, **27**, 1003.
- [125] Gray, C. J. , and Khoujah, A. M. , 1969, *Tetrahedron Lett.* , 2647.
- [126] Sakakibara, S. , Shin, M. , Fujino, M. , Shimonishi, Y. , Inoue, S. , and Inukai, N. , 1965, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **38**, 1522.
- [127] Hofmann, K. , Yajima, H. , Liu, T. —Y. , and Yanaihara, N. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 4475.
- [128] Hoffmann, K. , Yajima, H. , Liu, T. —Y. , Yanaihara, N. , Yanaihara, C. , and Humes, J. L. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 4481.
- [129] Yajima, H. , Okada, Y. , Kinomura, Y. , and Minami, H. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc.* , **90**, 527.
- [130] Geiger, R. , and Siedel, W. , 1968, *Chem. Ber.* , **101**, 3386.
- [131] Geiger, R. , König, W. , Jäger, G. , and Siedel, W. , 1968, *Peptides 1968*, ed. Bricas, E. , North—Holland Publ. , Amsterdam, 98.
- [132] Hofmann, K. , Visser, J. P. and Finn, F. M. , 1970, *J. Amer. Soc.* , **92**, 2900.
- [133] McKay, F. C. , and Albertson, N. F. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , **79**, 4686.
- [134] Weygand, F. , and Hunger, K. , 1962, *Chem. Ber.* , **95**, 1.
- [135] Weygand, F. , and Nintz, E. , 1965, *Z. Naturforsch. B.* **20**, 429.
- [136] Yajima, H. , and Kiso, Y. , 1969, *Chem. Pharm. Bull.* , **17**, 1962.
- [137] Sofuku, S. , Mizumura, M. , and Hagitani, A. , 1969, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **42**,

- [138] Sofuku, S. , Mizumura, M. , and Hagitani, A. , 1970, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **43**, 177.
- [139] Schnabel, E. , Herzog, H. , Hoffmann, P. , Klauke, E. , and Ugi, I. , 1968, *Justus Liebigs Ann. Chem.* , **71**, 175.
- [140] Klieger, E. , 1969, *Justus Liebigs Ann. Chem.* , **724**, 204.
- [141] Stevenson, D. , and Young, G. T. , 1969, *J. Chem. Soc.* , *C* , 2389.
- [142] Wunsch, E. , and Spangenberg, R. , 1971, *Chem. Ber.* , **104**, 2427.
- [143] Jeschkeit, H. , Losse, G. , and Neubert, K. , 1966, *Chem. Ber.* , **99**, 2803.
- [144] Fujino, M. , and Shinagawa, S. , 1972, *Chem. Pharm. Bull.* , **20**, 1021.
- [145] Fujino, M. , Shinagawa, S. , Nishimura, O. , and Fukuda, T. , 1972, *Chem. Pharm. Bull.* , **20**, 1017.
- [146] Yajima, H. , Watanabe, H. , and Okamoto, M. , 1971, *Chem. Pharm. Bull.* , **19**, 2185.
- [147] Butler, P. J. G. , Harris, J. I. , Hartley, B. S. , and Leberman, R. , 1969, *Biochem. J.* , **112**, 679.
- [148] Dixon, H. B. F. , and Perham, R. N. , 1968, *Biochem. J.* , **109**, 312.
- [149] Johnson, B. J. , and Jacobs, P. M. , 1968, *Chem. Commun.* , 73.
- [150] Johnson, B. J. , and Jacobs, P. M. , 1968, *J. Org. Chem.* , **33**, 4524.
- [151] Hofmann, K. , Lindenmann, A. , Magee, M. Z. , and Khan, N. H. , 1952, *J. Amer. Chem. Soc.* , **74**, 470.
- [152] Zervas, L. , Photaki, I. , and Ghelis, N. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 1337.
- [153] Sakakibara, S. , Nobuhara, Y. , Shimonishi, Y. , and Kiyoi, R. , 1965, *Bull. Chem. Soc. Jap.* , **38**, 120.
- [154] Berse, C. , Boucher, R. , and Piche, L. , 1957, *J. Org. Chem.* , **22**, 805.
- [155] Callahan, F. , Anderson, G. W. , Paul, R. , and Zimmerman, J. E. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 201.
- [156] Hiskey, R. G. , and Sparrow, J. T. , 1970, *J. Org. Chem.* , **35**, 215.
- [157] König, W. , Geiger, R. , and Siedel, W. , 1968, *Chem. Ber.* , **101**, 681.
- [158] Zervas, L. , and Photaki, I. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 3887.

- [159] Hanson, R. W. , and Law, H. D. , 1965, *J. Chem. Soc. , London* , 7285.
- [160] Hiskey, R. G. , and Tucker, W. P. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **84**, 4794.
- [161] Sheehan, J. C. , and Yang, D. D. H. , 1952, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **80**, 1158.
- [162] Zervas, L. , Photaki, I. , Cosmatos, A. , and Borovas, D. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **87**, 4992.
- [163] Veber, D. F. , Milkowski, J. D. , Varga, S. L. , Denkwalter, R. G. , and Hirschmann, R. , 1972, *J. Amer. Soc. ,* **94**, 5456.
- [164] Kamber, B. , 1971, *Helv. Chim. Acta* , **54**, 927.
- [165] Guttmann, S. , 1966, *Helv. Chim. Acta* , **49**, 83.
- [166] Hofmann, K. , 1971, *Peptides 1969*, ed. Scoffone, E. , North-Holland Publ. , Amsterdam, 130.
- [167] Storey, H. T. , Beacham, J. , Cernosek, S. F. , Finn, F. M. , Yanaihara, C. , and Hofmann, K. , 1972, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **94**, 6170.
- [168] Zahn, H. , and Schmidt, G. , 1967, *Tetrahedron Lett.* , 5059.
- [169] Zahn, H. , and Schmidt, G. , 1970, *Justus Liebigs Ann. Chem. ,* **731**, 91.
- [170] Zahn, H. , and Schmidt, G. , 1970, *Justus Liebigs Ann. Chem. ,* **731**, 101.
- [171] Shaltiel, S. , and Fridkin, M. , 1970, *Biochemistry* , **9**, 5122.
- [172] Haas, W. L. , Krumkalns, E. V. , and Gerzon, K. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc. ,* **88**, 1988.
- [173] Geiger, R. , Jager, G. , Volk, A. , and Siedel, W. , 1968, *Chem. Ber. ,* **101**, 2189.
- [174] Jager, G. , Geiger, R. , and Siedel, W. 1968, *Chem. Ber. ,* **101**, 2762.
- [175] Weygand, F. , Steglich, W. , Fraunberger, F. , Pietta, P. , and Schmid, J. , 1968, *Chem. Ber. ,* **101**, 923.

第二章 多肽合成方法学评价

一百多年前 Curtius 人工合成了第一个多肽^[1]。后来的 50 年明确确立了通过叠氮酸及酰氯生成肽键的方法^[2, 3], 但尚未提供合成多肽的通用途径。一个普遍适用的方法学, 必须选择容易脱去的保护基。1932 年 Bergmann 和 Zervas 提供的苄氧羰基^[4]虽然为多肽合成铺平了道路, 但由于测序方法学的落后, 直到 1953 年 Vigneaud 及同事才合成了催产素^[5]。无疑这是合成多肽领域里第一个辉煌成就。有意思的是, 50 年代初, 每隔几年就会有些进展, 混合酸酐法^[6-9]、活泼酯法^[10-12]和偶联试剂^[13, 14]接二连三取得成功。后 30 年, 方法学研究取得明显进展, 可以说是富有开拓与发展的时代。尽管没有尽善尽美的理想方法学作为万应良药, 但许多实验室的持续努力使得合成任何多肽所需要的程序都有广泛选择的余地。本章力图把有关的进展显示出来, 以便对多肽药物化学有兴趣的读者能从中获得启迪。

一、肽键的形成

羧酸和氨不会自发地生成酰胺, 生成肽键时羧基转化为活泼

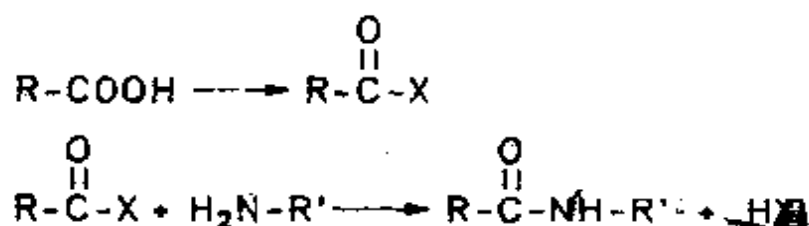


图 2.1 偶联反应

形态，氨基作为亲核试剂进攻活化了了的羧基，由此导致偶联反应的发生。

1. 羧端的活化形态

(1) 酸酐

活化基(上述方程式中的 X)是吸电子基，HX 是一种酸。至少从正统的观念看，绝大部分活化的羧酸衍生物是混合酸酐(对称酸酐应除外)。实际上，即使叠氮酸和酰氯，也能看成是混合酸酐。叠氮酸和氯化氢分别看作活化伙伴。随着重新考察肽键生成的第一个例子，开创了现代偶联方法纪元⁽¹⁵⁾。在制备马尿酸时，甘氨酸用苯甲酰氯进行苯甲酰化，产物与仍未耗尽的苯甲酰氯反应，生成一种混合酸酐，接着被甘氨酸进攻，生成意料之外的肽衍生物，Benzoyl-Gly-Gly-OH：

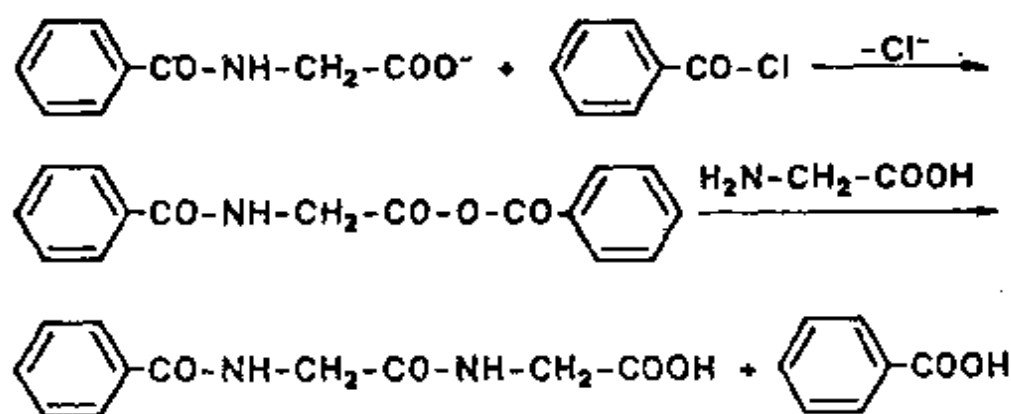


图 2.2 混合酸酐法接肽

这种两可的反应方式，也正是混合酸酐作酰化剂时的固有问题。在混合酸酐中两个羧基的活性虽然不同，但都是亲电中心。当然会发生第二种方式的氨解：

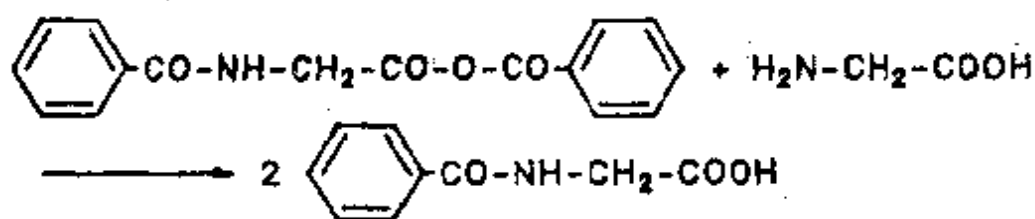


图 2.3 混合酸酐法中的副反应

于是有必要寻找一种不发生或极少发生第二种氨解的酸酐。Wieland 及助手们^[7]使用保护氨基酸与碳酸的单酯制得酸酐。氨基酸盐和氯代甲酸乙酯容易反应，生成碳酸乙酯的混合酸酐，并立即成为多肽合成的实用工具：

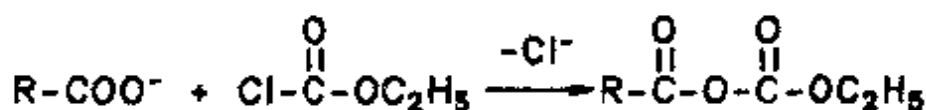


图 2.4 实用混合酸酐的制备

这类酸酐的特征电荷分布模式大大降低了碳酸羰基的亲电性质，导致氨基优先进攻另一个更活泼的羰基，这样，来自于第二种酰化的副产物氨基甲酸乙酯的生成量微乎其微（ $\text{C}_2\text{H}_5\text{O-CO-NH-R'}$ ，氨基甲酸乙酯，亦称脲烷）。

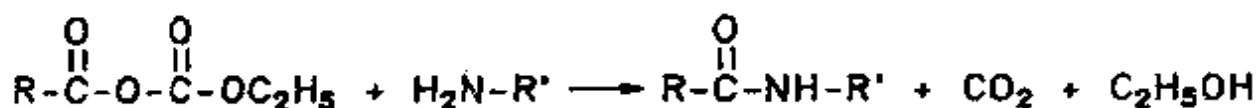


图 2.5 实用混合酸酐的反应选择性

烷基碳酸混合酸酐的另一个诱人的优点是，反应中的二氧化

碳和乙醇副产物很容易从反应混合物中除去。若用氯代甲酸异丁酯代替氯代甲酸乙酯，可以进一步抑制不期望的第二种酰化反应^[16]。歧链烷基的供电效应，加深了邻近羰基的钝化，从而限制了脲烷的生成。不过，若被活化的是缬氨酸或异亮氨酸残基时，

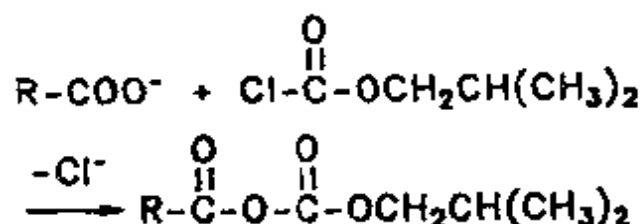


图 2.6 用氯代甲酸异丁酯制备混合酸酐

可以预料脲烷的生成量会增加。在这种情况下，碳酸羰基的活性降低被 β 碳原子的分支侧链造成的氨基酸中的羰基的活性降低所抵消。空间效应和电性效应的综合结果妨碍了需要的酰化反应，而通过活化碳酸羰基的酰化反应被允许达到较大程度。一个明显的补救措施是使用氯代甲酸第二丁酯^[9]，效果有待进一步评价：

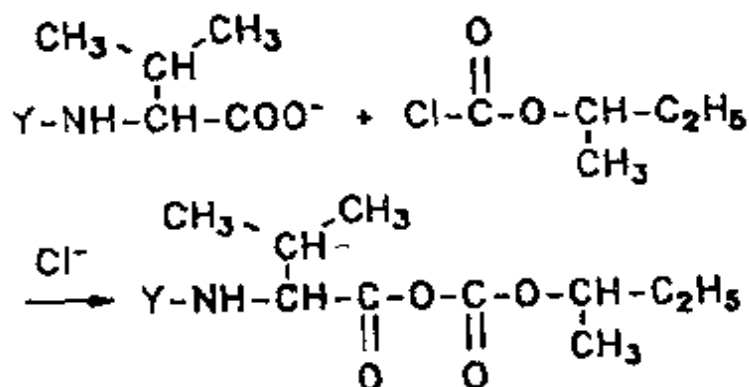
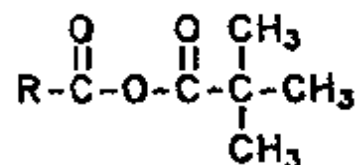


图 2.7 氯代甲酸第二丁酯的偶联反应

相同目标的尝试是把特戊酸引入到混合酸酐中^(17, 18)：



虽然特戊酸混合酸酐中的亲核性进攻可以十分单一，但影响氨基在特戊羰基反应的不同因素在制备混合酸酐中间体时，同样妨碍羧酸酯接近。未反应的特戊酰氯在以后的偶联反应中，将被氨基组分氨解，生成“错误的酰化产物”，这与氨基组分进攻混合酸酐的“错误一端”同出一辙⁽¹⁹⁾。尽管花了很多精力改进混合酸酐法，但只有约 40 年前发明的烷基碳酸酯法被广泛应用。特别是氯代甲酸异丁酯，目前用于制备混合酸酐。所以当强调混合酸酐法在多肽合成中的重要意义，指出它在多肽实验室一刻也未被冷落的同时，也不能不认识到它固有的局限性，这种局限性也许在很多实验室长年的实验中都无法超越。



图 2.8 特戊酰氯的偶联反应

混合酸酐存在两种不同途径的酰化，这一主要弊端在对称的酸酐⁽²⁰⁾中肯定没有。另外，对称酸酐中的两个氨基酸残基，一个参与肽键的增长，另一个作为保护氨基酸回收：



图 2.9 对称酸酐的酰化反应

这样，该方法显得有点浪费。仔细考察报道的使用对称酸酐的一系列合成，揭示出对称酸酐是用两摩尔和一摩尔碳化二亚胺一均烩制备的。在这种情况下，设计“对称酸酐”就有点牵强，因为除酸酐外，还有吡内酯和 *O*-酰异脲存在于含 *N*-酰脲的混合物中。毕竟较早报道了结晶性的稳定的苄氧羰基保护⁽²¹⁾的和叔丁氧羰基保护⁽²²⁾的对称酸酐，后来又报道了 9-苄甲氧羰基保护的氨基酸的对称酸酐⁽²³⁾。

(2) 活泼酯

用于形成肽键的反应的必要条件，就是活化剂必须不起酰化剂的作用。酰氯和叠氮酸可以满足这些要求，但这类活泼中间体有发生副反应的倾向。例如，在酰氯中消旋化，在叠氮酸中发生 Curtius 重排⁽²⁴⁾。这些副反应和其它由于过于活泼而引起的副反应⁽²⁵⁾，可以采用适度活泼的中间体加以避免。于是，研究得很透彻的酯的氨解⁽²⁶⁾明显地可以代替混合酸酐进行酰化反应，因酯中的醇组分不起酰化剂的作用。烷基酯(例如苄酯)的氨解经常用于制备多肽酰胺：

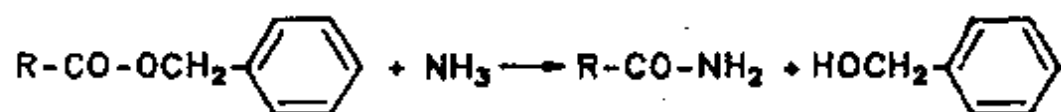


图 2.10 苄酯的氨解反应

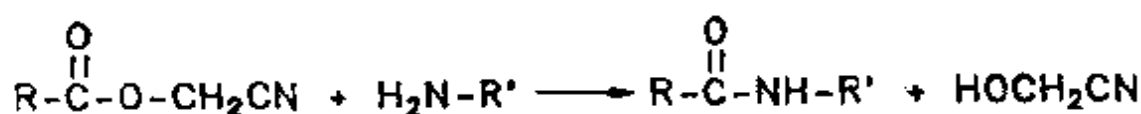


图 2.11 氰基酯的氨解反应

甲酯、乙酯或苄酯的有限的活性，虽然可以通过使用大过量的氨基组分而得到补偿，但对于形成多肽中的肽键，氨基组分不可能大过量地使用，因而增强酯基对亲核试剂的反应活性势在必行。这一目标可以通过修饰酯中的醇组分而达到，一般是引入吸电子基^[25]。Schwyzer^[14]的先驱性研究，是把氰基接到酰化氨基酸甲酯的甲基上。对于小分子肽来说，由于偶联反应可以在反应物浓度很高的条件下进行，故氰甲基酯的氨解速率还算充分。可是，相同的酯在要求较高的条件下，亦即在稀溶液中酰化大肽就不适用。由 Wieland 及同事^[10]设计的苯硫酯作为活泼硫羟酸的稳定衍生物，具有相同的局限性。

1954 年开始认识到，硫苯酯的适度的活性很大程度上并非由于酯基中的硫原子，而是由于它们是芳香酯这一事实^[12, 26]。合乎逻辑的做法是，在芳环上引入一个或多个吸电子取代基。硝基是显而易见的选择对象。从各种简单的硝基酚酯看，间位取代化

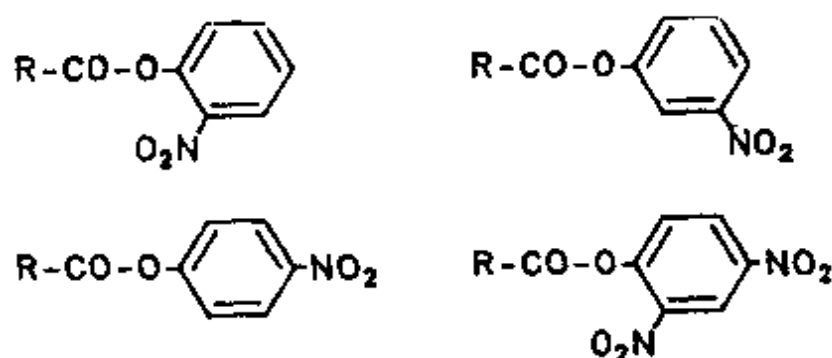


图 2.12 硝基酚酯衍生物

合物的活性比邻位和对位取代化合物的活性差，而 2,4-二硝基酚酯的活性又似乎过大，它们容易被水解。由于几种保护氨基酸的对硝基酚酯容易结晶，在邻位和对位酚酯之间进行选择时偏爱于选择后者。更晚一些，重新考察反应时，发现邻硝基酚酯在许多方

面比对位衍生物来得优越^[27]。保护氨基酸的对硝基酚酯被证明是合成明显复杂多肽^[28]的实用工具，而且在 Vigreud 实验室合成催产素^[29]和赖氨酸后叶加压素时被排它性地用作酰化剂，同时也迅速为别的实验室所接受^[30,31]。猪胰液素的结构被阐明后^[32]，紧接着就合成了这个由 27 个氨基酸组成的肽类激素^[33]，这件事说明，九肽不是用活泼酯法形成肽键的上限。

制备保护氨基酸活泼芳基酯时需要活化羧基，并与适宜的酚偶联。为此，提出了大量的活化方法，但只有 DCC 广为接受^[34-36]。

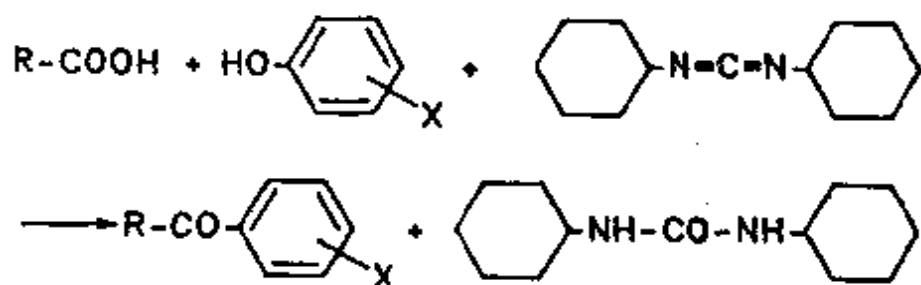


图 2.13 DCC-活化的偶联

当同样的试剂能够直接用于期望的偶联反应时，为什么要用 DCC 一类的试剂制备活泼中间体，然后再用该中间体去形成肽键^[13]呢？这个问题应当提出来，也曾经不止一次地被提了出来。要回答这一问题，有必要提及羧酸和 DCC 反应时生成的、定义不恰当但肯定不稳定且不可捉摸的 *O*-乙酰脲中间体，以及使用 DCC 偶合时碰到的一系列副反应^[37]。相反，对硝基酚酯定义明确，绝大部分结晶性化合物能被纯化，并能分析其化学和手性纯度。这些化合物稳定到足以作为商品出售。另外，活泼酯能大量制备，保存数年，并用于多种合成目标。研究人员通过熔点和薄层分析即可以肯定活泼酯的质量，若发现有杂质，单纯的重结晶法即可以达到纯化的目的。由于这些明显的优点，很多实验室努力开发改

进的活泼酯。在一篇详尽的综述里^[38]，曾透彻说明了这类广泛的实验，及所做的努力和有限的成功。目前已开发了不少高度活泼的活泼酯，例如对硝基硫酚酯和五氟酚酯^[38, 40]，但这些化合物迅速酰化的优点，由于对水解敏感性的增加和由离去基生成的化合物（对硝基硫酚、五氟酚）的令人讨厌的性质而被抵消。五氯酚酯固有的高氨解速率^[41]在实际操作中的偶合步骤有时是无效的，在该操作中，空间阻碍的氨基酸残基被沉淀。活泼的五氯酚基的庞大体积重叠于已经存在的拥挤的基团之上，导致令人失望的低偶联速率，这正是多肽固相合成中的情景^[42]。在这里，亲电性羰基的可接近性被高聚载体的铸模进一步降低。空间阻碍一般受不溶性高聚物中的技术影响，因而促使重新考察对硝基酚酯。与早期的观察相反，活泼酯对树脂束缚的亲核试剂肯定有效^[43]。可是，在有妨碍的情形下，酰化速率对那些欲在短时间内组装一个长链多肽的研究者仍不算很高。该势态说明，为什么仅仅是天冬氨酸和谷氨酸的酯在固相多肽合成中被普遍应用^[44]。这些氨基酸的羧端酰胺经由活泼酯参与反应时，并不生成脒，这一点正好补偿了它们的反应速率低的不足，而明显地被接受^[45]。重新考察一系列活泼酯在固相合成中的用途时，发现邻硝基酚酯比对应的对位衍生物更活泼，而且对位阻效应和溶剂效应均不甚敏感^[27]。详细的研究结果表明，可能由于偶极-偶极相互作用，邻硝基酚酯的分子间力稳定了单向螺旋构象^[46]。硝基和保护基的 脲烷残基的分子内交联，阻碍了它与溶剂的相互作用，而溶剂层比较小的分子更有能力侵入拥挤的环境。邻硝基酚酯对亲核试剂的较高活泼性容易解释：硝基的电性效应向羰基转移这一过程不单单像对位衍生物那样通过共振效应实现，而且直接通过 σ 键来实施。随着 König 和 Geiger^[47]发现用 HOBt 催化的活泼酯反应，邻位和对位取代硝

基酚酯间的这些差异变得无足轻重。HOBt 对氨解速率（在 DMF 中及碱存在下）的促进非常强烈，以至两种硝基酚酯在用途上实际变为等同。HOBt 也用于促进 2,4,5-三氯酚酯的酰化^[48]。这种高效催化剂的引入使早期设想的乙酸^[49]、咪唑^[50]、吡唑和三唑^[51]等催化剂过时，并增加了将来有更好催化剂问世的希望。已发现四唑在这方面的效用^[52]。催化使活泼酯酰化方法有新的重要性。

有趣的是在众多活泼酯中，只有少数活泼酯在多肽合成中得到应用，除已经提到的 2,4,5-三氯酚酯^[45]外，羟胺的 *O*-乙酰化衍生物，特别是 *N*-羟基琥珀酰亚胺^[53]，作为普遍被接受的工具，用于长链肽的合成，而早期提出的 1-羟基邻苯二甲酰亚胺酯，似乎已不再为研究人员注意。

2. 偶联试剂

把一种试剂加到羧基组分和氨基组分的混合物中，以便通过肽键把它们彼此联接起来的想法鼓舞人心。为此目的，1955 年提出了乙氧基乙炔^[34]和 DCC^[33]两种试剂。羧基加成到乙炔衍生物的三键或 DCC 的 $N=C$ 双键上，生成一种活泼中间体，接着进行氨解，完成偶联反应。对这种活泼中间体考察之后，揭示它们分别是乙酸乙酯烯醇酯和脲烷衍生物的烯醇酯两种活泼酯。

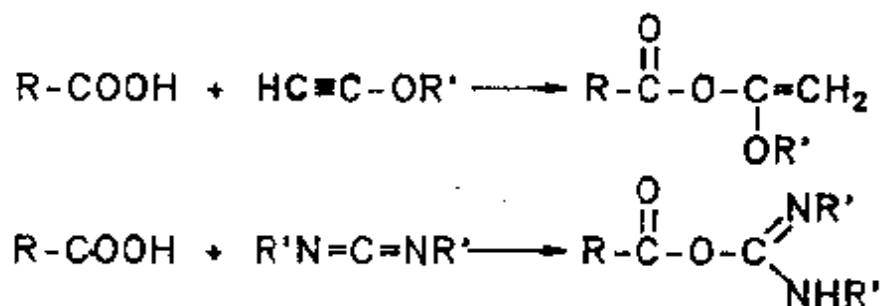


图 2.14 乙氧基乙炔进行的偶联反应

在 1955 年发现的两种偶联试剂中，只有 DCC 经受住了时间的考验。由烷氧基提供的活化不太强，除非大过量地使用试剂，或者提高由两个接连发生的双分子反应组成的偶联反应温度，否则，肽键形成的速度就不能满足实际需要。相反，由 DCC 达到的活化程度很高。不过，在 DCC 程序中观察到了多种副反应，其中包括消旋化和过度活化的不利后果⁽²⁴⁾。正确的重要步骤就是引入像 *N*-羟基琥珀酰亚胺⁽⁵⁵⁾ 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt)⁽⁵⁶⁾ 这样的辅助性亲核试剂，这些化合物容易与过分活泼的中间体 (*O*-乙酰异脲) 反应，生成害处小、活泼性充分的酰化剂：

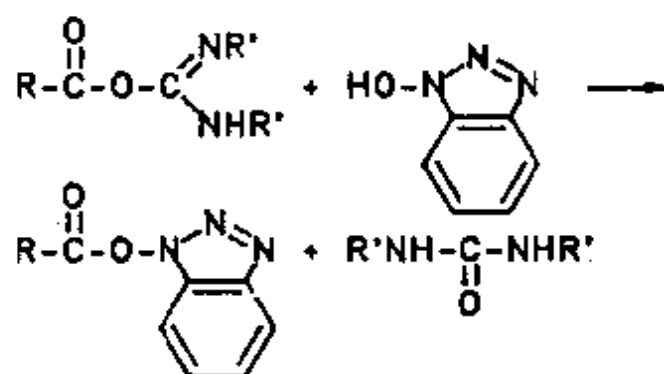


图 2.15 HOBt 辅助偶联反应

由于“加合物”在偶联反应中继续生成，所以它们的浓度几乎保持不变。这样，辅助的亲核剂成功地与分子内反应竞争，例如与生成 *N*-乙酰脲衍生物的反应竞争。虽然 3-羟基-4-氧-3,4-二氢-1,2,3-苯并三嗪⁽⁵⁶⁾ 和 2-羟亚氨基-苯乙腈⁽⁵⁷⁾ 对于防止消旋化可能有优越性，但在多肽片段的组合中，DCC-HOBt 模式⁽⁵⁸⁾ 是最适宜的方法。

偶联剂所具有的魔力激发了相当多的研究人员致力于发展这类试剂。在一篇关于多肽合成的专论里⁽¹⁹⁾ 列了一个很长的偶联剂

表，即使是这么长的表也未能完全包括所有的偶联剂，这足以说明多肽化学家在该研究方向所作的努力。虽然一勺烩的模式对于制备有显而易见的优点，但对于目的不仅仅在于得到产品，还想获得化学过程的严密知识的研究者，不能给出清晰的结论。这样，就有必要进行类似于羧基组分的活泼衍生物中间体的分离操作。另外，若有必要，在使用通常贵重的氨基组分进行偶联之前，需要对分离出的活泼中间体进行纯化及对结构进行推敲。可是为了图省事一般习惯采用一勺烩，而把这些可能性都扼杀了。所以，虽然在多肽的片段组合中选择 DCC-HOBt 模式^[56]，但在逐步接肽法中，活泼酯有杰出的优点^[58]。

从引入 DCC 到目前为止这么长的时间内，还没有能取代 DCC

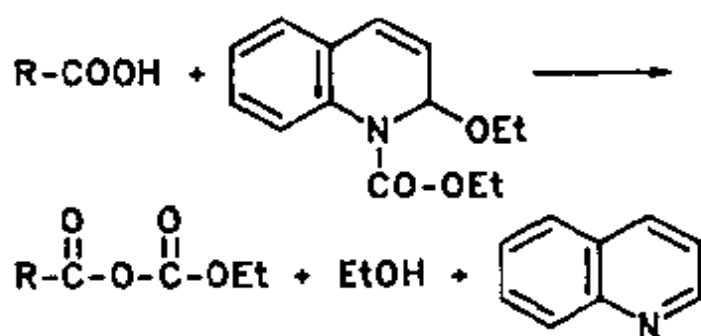


图 2.16 EEDQ 参与的偶联反应

的偶联试剂问世。这一事实可以用下面的理由加以解释：那就是，一个优秀的竞争者，必须满足一些规定的标准。试剂应当容易与羧基反应，却根本不与氨基反应。DCC 实际上满足该要求，DCC 虽然与氨基反应生成胍衍生物^[59, 60]，但这一反应的速率与羧基加到 DCC 上的反应速率及尔后发生的氨基组分在 O-酰化异脲衍生物上的亲核性进攻速率相比可以忽略不计。后面反应的速率，在本

应十分有效的试剂，(如 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉，EEDQ)⁽⁶¹⁾的情况下不够有利，它与羧基组分生成混合酸酐。不幸的是，EEDQ 与氨反应的速率不可忽视⁽⁶²⁾，而且可以生成与混合酸酐法中第二种酰化方式生成的同样的尿烷。使用 1-异丁氧羰基-2-异丁氧基-1,2-二氢喹啉 (IIDQ) 时⁽⁶³⁾，发生这种副反应的程度

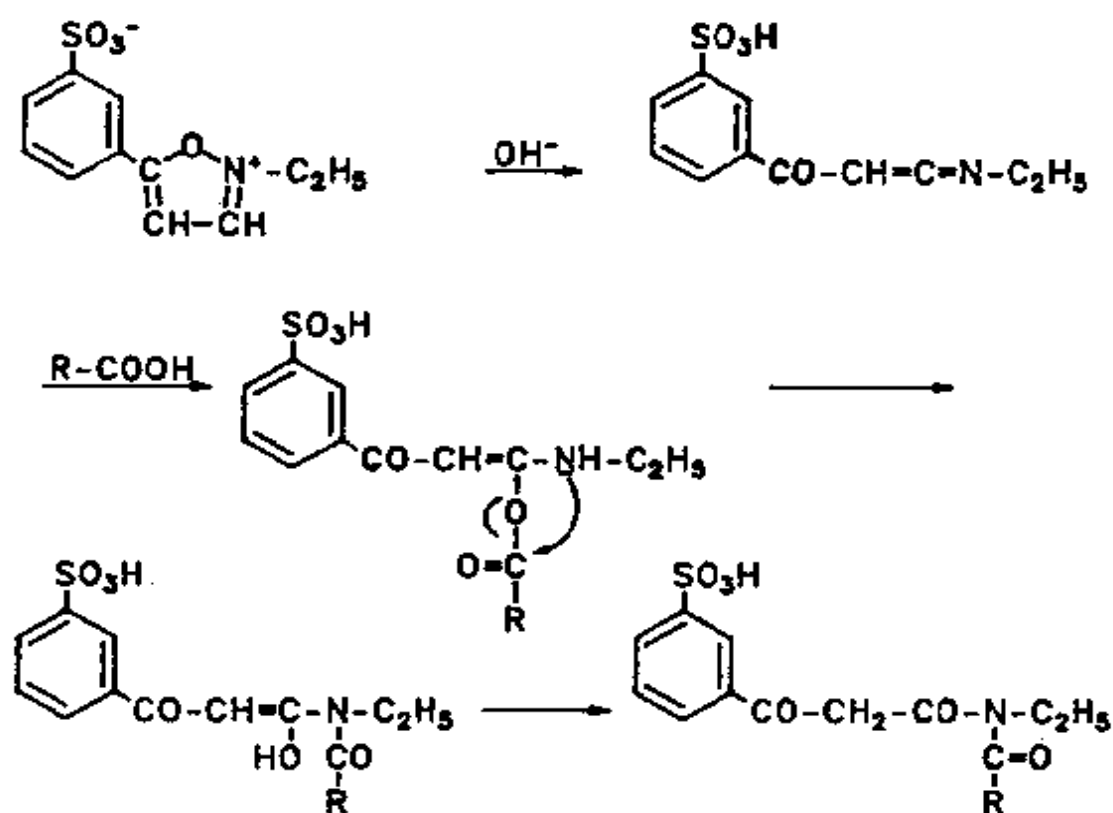


图 2.17 Woodward 试剂 K 参与的亲核反应

低。在使用偶联剂形成肽键时，一个相似的不利反应是来自 DCC 酰化的 $O \rightarrow N$ 的酰基迁移。一般说来，凡是能够生成包含亲核中心的活泼中间体的试剂，首先就具有这种可能性。例如，Woodward 试剂 K⁽⁶⁴⁾在生成该中间体的步骤中就已经包含了与 DCC 酰化中 $O \rightarrow N$ 酰基迁移的十分相似的⁽⁶⁵⁾ $O \rightarrow N$ 迁移。

另外，活泼中间体上存在的碱性中心可能引起消旋化，这是简单地从手性中心经分子内吸取质子而实现的，在使用偶联试剂时不常发生：

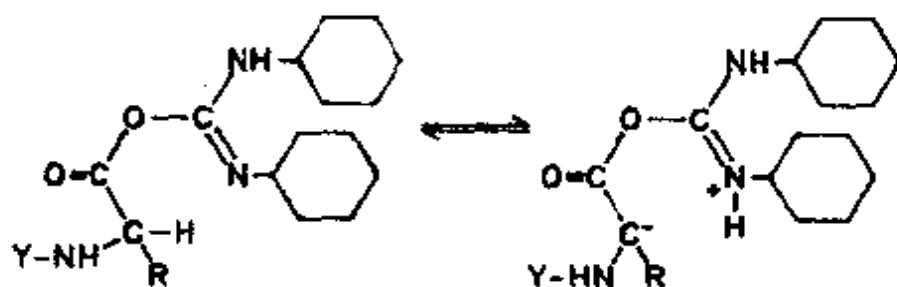


图 2.18 消旋化机制

选择合适的活化剂时的这些限制，使得许多研究人员热情推荐的大量偶联试剂的绝大部分都被淘汰，只有 DCC 幸免于难，这显然是与 HOBt 结合的结果。

二、脱保护和侧链保护

在大多数化学家心目中，多肽合成的成功与否更多地是取决于选择性脱保护策略的可利用度，而不是取决于活化和偶联方法。作为一种战术，醇性和酚性羟基、巯基、甚至羧基，都可以不加保护，但只限于使用中度活泼的酰化剂，例如活泼酯。然而，假如大过量地使用酰化剂，或者当使用活泼中间体更理想时，那么“最小保护”就不能满足。在规定的条件下，例如在稀溶液中偶联，或在固相载体上增长肽链，需要使用酸酐或 DCC-HOBt，结果也就需要更大的保护，在极端情形下就是“最大保护”。在中等保护

或最大保护的战术中，脱保护时的选择性至关重要。 α -氨基的保护基在酰化前必须脱去，而脱保护过程中，侧链功能基的保护基又不应受到影响。所以，除了暂时性的保护基外，也需要半永久性的保护基，以防止侧链对酰化剂的亲核进攻。最终除去合成的肽链上的一切保护基是极为关键的操作，应当赋予极大的注意和特殊的努力，以便保证组合起来的肽链不受伤害。很明显，在引入和切除保护基的两个过程中，手性纯度是另一个十分重要的要求。

1. 脱保护

(1) 氢解

在多肽合成中由于苄氧羰基的引入而达到的突破主要归功于该法在苄基碳原子和氧原子间的裂解断键方法的高度专属性。因为催化还原几乎没有例外都能保留已经组合的氨基酸残基侧链完整无缺，所以该法是脱保护的优秀方法。有些限制，例如蛋氨酸中的硫醚造成的催化剂中毒也能够克服^[66, 67]，而另外两种脱保护基的方法，即用金属钠和液氨还原^[68]以及用溴化氢在冰乙酸中酸解^[69]，仍被研究人员广泛应用。后一方法是由 Ben Ishai 和 Berger

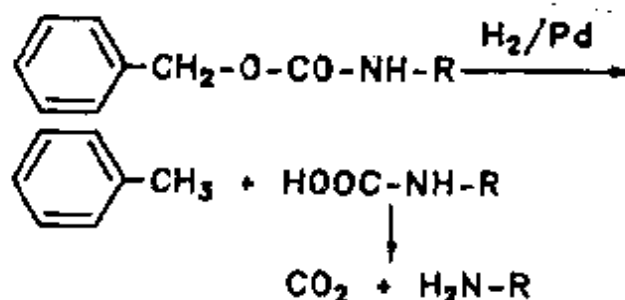


图 2.19 氢解脱苄的专属性反应

提出来的, 已成为对酸不稳定的保护基发展的主要方法。研究发展对碱不稳定的 Fmoc 保护基时^[70], 开始想象该保护基能抗催化氢化, 后来发现能通过氢解完全除去^[71]。观察到的碳-氧键的断裂中的碳原子并不属于苄基碳, 这表明, 进一步研究可能发现别的能通过催化氢解脱去的保护基。

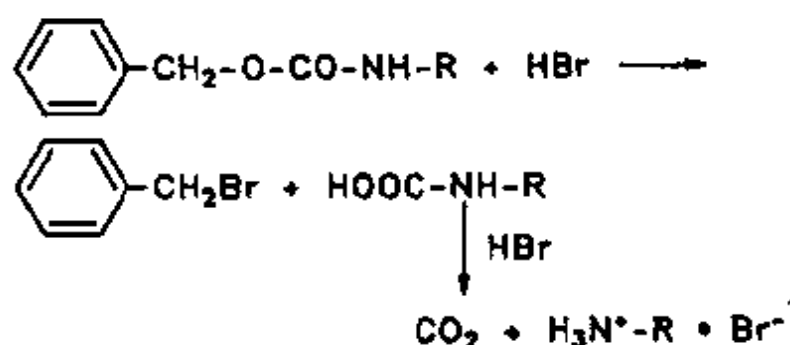


图 2.20 HBr/冰乙酸脱苄

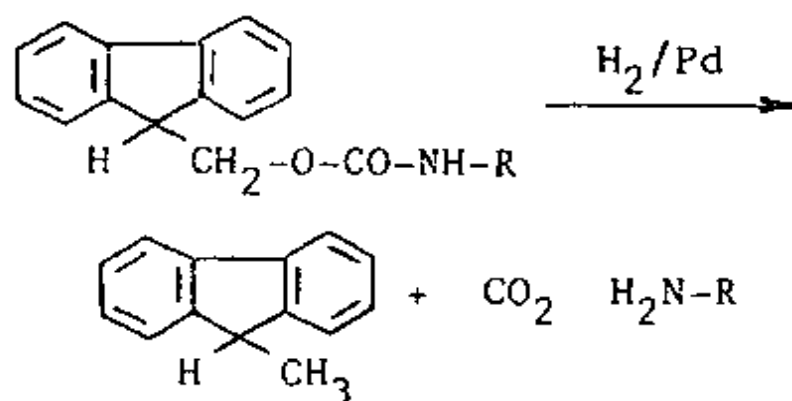


图 2.21 催化氢化脱 Fmoc 保护基

(2) 酸解

认识到由 HBr/冰乙酸脱去 Z 和 O-苄基是以苄基正离子的稳

定性为基础的这一事实之后,激发了对那些对酸更稳定和不够稳定的保护基的研究兴趣。在苄基上引入吸电子基容易获得更高的稳定性。意义更深远的工作应属于开发对酸更敏感的保护基。实际上,根据叔丁基正离子的形成而引入的保护基^[72]帮助克服了多肽合成中的许多困难。C 端羧基和侧链功能基以叔丁酯和叔丁醚的形式引入的半永久性保护基,与 α -氨基的瞬间保护基相结合,并在每步偶联反应之后催化氢解,而最终使组合的肽链酸解,特别是用三氟乙酸酸解^[73, 74]脱去保护基,三氟乙酸也是较大的肽的特别好的溶剂。Schwyzer 和 Sieber 用这种组合成功地合成了 39 肽(促皮质激素^[75])。另一种做法是, α -氨基暂时用叔丁氧羰基(Boc)保护,而侧链用对酸相对稳定并可用催化氢解脱去的基团保护。这种策略被用来合成与猪胰液素对应的保护 27 肽^[32]:

Z-His-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-
Leu-Ser(Bzl)-Arg(NO₂)-Leu-Arg(NO₂)-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Ala-
Arg(NO₂)-Leu-Gln-Arg(NO₂)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

猪胰液素的一级结构

上面提到的两个例子中,两套保护基通过两种不同的途径脱去,例如一类通过酸解,另一类通过氢解,这种策略反映了早期对正交保护原则的理解^[76]。

Z 保护基和 Boc 保护基对酸稳定性的差异并不完全令人满意。当含 N 端用 Boc 保护,侧链用 Z 保护的赖氨酸残基的多肽用三氟乙酸处理时,既脱掉 Boc,也脱掉少量的 Z。为了避免随后肽链增长时出现分支,探索了对两条路线的改进。许多研究者使用修饰过的 Z 和苄基,它们由于连有吸电子取代基,而对酸显示充

分的惰性,在切除 Boc 的过程中保持完好。这种方案的不理想之处是,在最终脱保护的步骤中需要很强的酸。应用最广的酸试剂是液态氟化氢^[77],它能脱去绝大部分保护基,但这种操作对于多肽样品和操作人员二者都有风险。因为氟化氢脱保护中的这些困难和催化氢解有时效果不肯定,常常采取取代正交结合的研究方式,在这种研究方式里,暂时的和半永久的保护基都通过酸解除去,但使用的酸强度不同。

已经认识到与强酸(例如液态氟化氢)有关的一系列反应^[37]。这里只想指出 N→O 酰基迁移和侧链羧基对芳环实施的酰基化(F-C)反应。所以,用对酸高度敏感的瞬间保护基保护氨基,用对酸不甚敏感的半永久性保护基保护 C 端羧基和各种侧链功能基似乎更有吸引力。Sieber 和 Iselin^[78]成功地使这一想法变成了现实。他们发现,二苯基异丙氧羰基(Bpoc),最适合于这一目标。Bpoc、Boc 和三苯甲基组合完美地合成了人胰岛素^[79],这种组合当然也应适用于其它复杂而又敏感多肽的合成。但 Boc 基的耐酸性并不能保证完全选择性地脱去 Bpoc 基,虽然使用 HOBt 脱保护不会干扰到 Boc^[80],但即使在小心控制反应条件下,即在 pH 为 2 的 90% 三氟乙醇水溶液中^[78],Boc 被脱去的量也不可忽视。

Fmoc 基的发现在意料之中^[70]。这种对碱敏感的基团与叔丁基(包括 Boc 基)结合,后者作为半永久性保护基,这样又回到了正交组合原则。Fmoc-叔丁基组合在固相多肽合成中证明是高产的^[81],也能用于液相合成^[82, 83]。每步偶联之后,用哌啶或二乙胺的 DMF 溶液脱保护,肽键形成之后用三氟乙酸脱保护。由于结晶性的活泼酯和 Fmoc-氨基酸的对称酸酐^[28, 84]可以得到,所以该研究方法切实可行。然而当更长的肽链不得不按此途径在液相组合时,就可以明显看到一些限制。若保护中间体在 DMF 中的溶解

度差,就使得二级胺不能完全除去 Fmoc 基。因为三氟乙酸有溶剂和酸性试剂两种功能,瞬间保护基的酸解继续受到重视。

在苄基存在下,由于试剂三氟乙酸用水稀释^[85]而戏剧性地改进了脱 Boc 基的选择性。用二氯甲烷稀释不产生类似的有利影响^[86]。为了减少水解的危险,特别是减小羰酰胺基水解的危险,有人用乙酸而不用水稀释^[87]。采用苯酚,例如用苯酚和对甲苯酚的混合物^[88],稀释三氟乙酸更加有利,因为它在改进选择性的同时还防止了不希望的烷基化反应。介质中存在大过量的苯酚,使三氟乙酸叔丁酯对酪氨酸芳核的叔丁基化无关紧要^[89],对其它容易烷基化的侧链情形也可能相同,甚至使用苯酚-三氟乙酸也会发生 3-叔丁基酪氨酸残基去烷基化的缓慢的逆反应^[90]。

通过酸解脱保护很少引起注意的一个重要方面是脱保护基后的氨基是以质子化的形式存在,例如生成氢溴酸盐和三氟乙酸盐等,而随后进行的酰化反应需要游离的氨基进行偶联。因此常加入三乙胺、*N*-甲基吗啉、*N*-甲基哌啶或二异丙基乙胺等^[91, 92]一类三级胺到反应混合物中,以便释放出游离氨基。按照下面的反应式,实际上只有一部分氨基组分是以去质子化的形式存在:

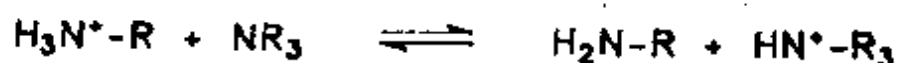


图 2.22 氨基组分的去质子化

在固相合成中,由于反复用三乙胺溶液洗涤除去复分解反应所生成的盐,平衡完全移向右边。可是在液相合成中,偶联混合物中存在的三级胺对多肽合成肯定有害。通过加碱夺取质子,不单单局限于非保护的氨基,可以扩展到侧链功能基,甚至还能扩展到活泼残基的手性碳上。实际上,多肽合成中的消旋化,最普

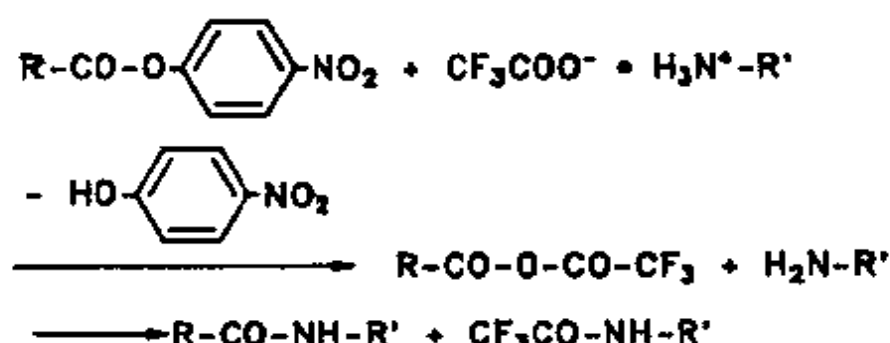


图 2.23 使用三氟乙酸盐进行的偶联反应

遍地是起因于质子的被夺取，为了保持手性纯度，常可以简单地使用游离氨基，而不用质子化的氨基和三级胺的混合物，何况三氟乙酸盐或其它羧酸盐的存在^[93-95]可以过早地终止肽链增长。解决这些问题的一个较好的方法是，把氨基组分在酰化之前以非质子化的形式分离出来，但这样做有技术上的困难，特别是许多部分保护的中间体在普通溶剂中溶解度小而造成的困难。所以，新的目标是发展偶联模式，在该模式中，既不用叔胺，氨基组分在酰化之前也不需要去质子化。有些实验^[80]使用弱酸切除了一些对酸高度敏感的保护基。利用二苯基异丙氧羰基对 HOBt 的不稳定性^[36]，使用过量的 HOBt，在合适的时间里可以达到完全脱保护。为了顺利地脱保护，似乎需要可以作为离去基受体的介质。三氟乙醇是许多保护中间体的良好溶剂，能极好地合乎这种目标。由生成的 HOBt 盐造成的质子化没有坚固到足以妨碍酰化的地步，甚至使用活泼性适中的酰化剂（如对硝基酚酯）也能完成偶联反应，HOBt 的催化效应似乎仍然生效^[47]，并促进偶联。使用 HOBt/三氟乙醇脱三苯甲基保护基时^[96]得到了类似的结果，但试图把该法推广到邻硝基苯硫基(Nps)^[97]时，却不十分成功。虽然 Nps 基容

易被 HOBt/三氟乙醇切除，但除非加入三级胺，否则这样生成的质子化的氨基组分难以被活泼酯酰化。从反应混合物中分离出苯并三唑表明，切除 Nps 时，伴随着试剂的还原，因此也可能伴随着邻硝基苯亚磺酸被氧化成邻硝基苯磺酸。后者造成的未保护氨基质子化太强烈，以至于无三级胺存在就不能被酰化。

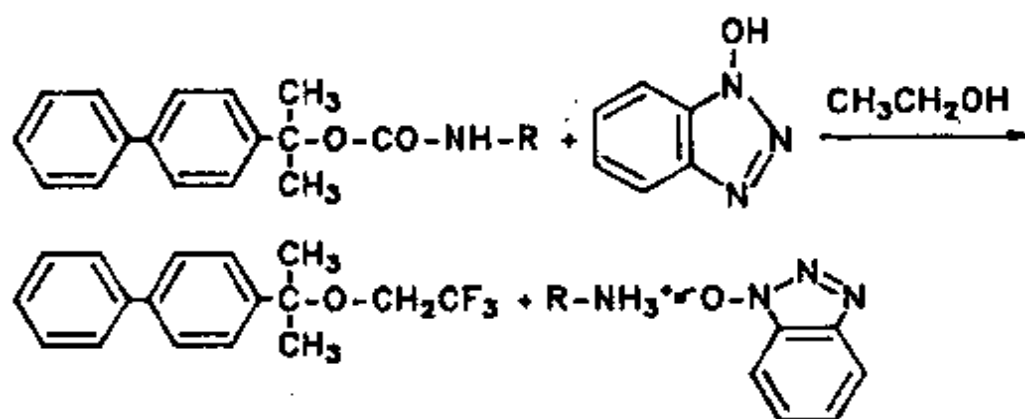


图 2.24 三氟乙醇作为离去基受体参与反应

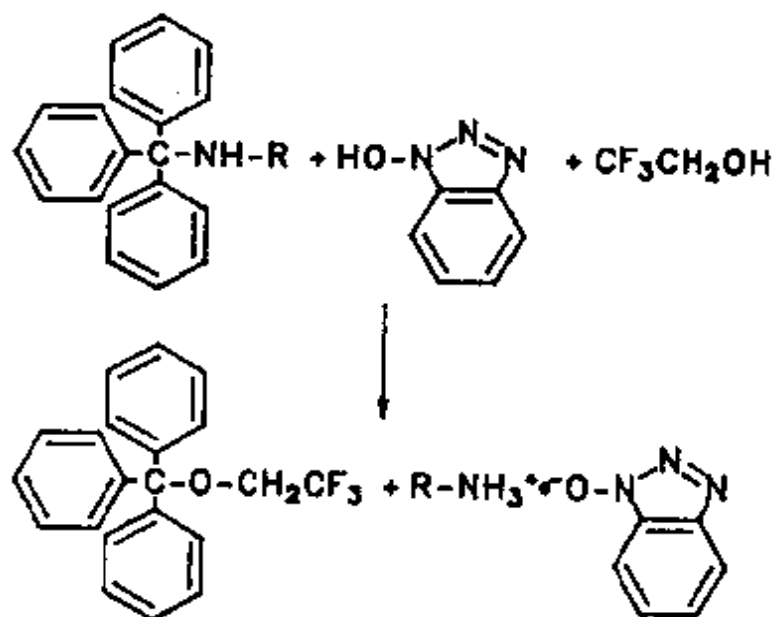


图 2.25 HOBt/三氟乙醇脱保护

在一系列实验中，曾试图把相同的途径用于重要的 Boc 基保护多肽。正如预料的那样，甲酸比三氟乙酸更容易从盐中取代出来，因而采用甲酸来脱保护。一些探索性实验还表明，即使是很弱的酸，例如对硝基苯酚，在 DMF 中也能从甲酸铵中取代小部分甲酸，反应进一步朝着生成新的 HOBt 盐的方向移动。把活泼酯加到甲酸盐和 HOBt 之中^[99]生成期望的酰胺，但反应中仍伴随生成少量的甲酰衍生物。在酰化之前减压蒸去溶剂，可以较好地但仍然不完全地抑制甲酰化，这样做可以除去绝大多数(但非全部)平衡过程中释放出来的甲酸。为了完全限制甲酰化，考察过一系列酸性化合物取代甲酸的能力，发现四唑(1-H-四唑)特别适用于这一目的^[52]。把过量的四唑加到甲酸盐的 DMF 溶液中，减压除去溶剂，用三氟乙醇再蒸发，留下一种结晶性残渣，该残渣用乙醚研磨，生成容易处理的四唑盐，后者可被活泼酯顺利酰化。偶联反应迅速完成表明，四唑对于活泼酯的氨解可能有类似于 HOBt^[47]、乙酸^[100]或一些含氮杂环化合物(如咪唑^[53]、吡唑和 1,2,4-三唑等^[51])的效应。注意到这一点很有意思，在既没有叔胺，也没有附加剂时，甲酸盐直接酰化也进行得十分迅速，但反应中伴随着可观的甲酰化^[94]。在这些实验过程中，观察到在甲酸盐酰化前，已存在氨基酸组分的甲酰衍生物。这样看来，在用甲酸脱 Boc

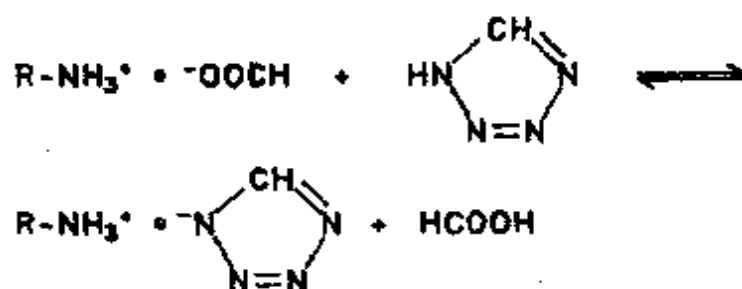


图 2.26 1-H-四唑抑制甲酸的甲酰化

的过程中,必定已发生了氨基的甲酰化⁽¹⁰¹⁾。已经确定,往反应混合物中加入四唑,可以防止用甲酸酸解过程中发生的甲酰化。

虽然已经有关于酸解的有价值的综述⁽¹⁰²⁾,但考虑到质子化作为氨基保护的一种方法,使用叔胺脱这种保护基,以及直接酰化质子化氮的可能性,这些都需要进一步注意,有必要详细评论。

(3) 用亲核试剂脱保护

用碱脱保护而不是用酸脱保护具有明显的优点,即裸露的氨基不以盐的形式存在。对于这一明确的结果来说,往体系中加入可以和脱下来的产物反应的介质可能有利。例如,为了防止邻硝基硫酚基向氨基转移,提倡使用能起受体作用的亲核试剂。使用2-巯基吡啶⁽¹⁰³⁾脱保护就是该方法的一个例子。

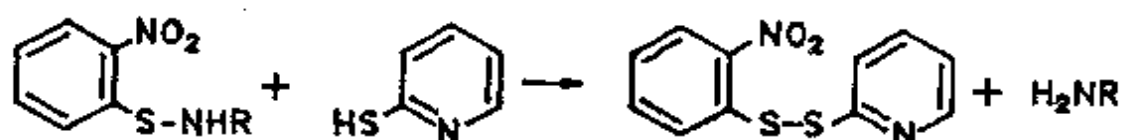


图 2.27 使用 2-巯基吡啶脱保护

Rydon^(104, 105)按照这种基本想法发展碱不稳定的保护基,在实验中使用 β -碳原子上含吸电子基的乙酯。用碱从该碳原子上夺取酸性氢,通过消除乙烯基衍生物使生成的碳负离子稳定化,并生成裸露的羧基(见图 2.28)。

与脲烷原理相结合,在温和条件下用碱脱甲磺甲氧羰基(Msoc)⁽¹⁰⁶⁾时产生了同样的想法。这一发展由于发现 Fmoc 而达到了顶点⁽⁷⁰⁾,Fmoc 中乙酯 β -碳原子是茆基系统中的组成部分(图 2.29)。Fmoc 已经对多肽合成产生了强大的冲击,并可能具有持

久的重要性。把同样的原理用于羧基^[107]和巯基^[108]的保护似乎同等可能。

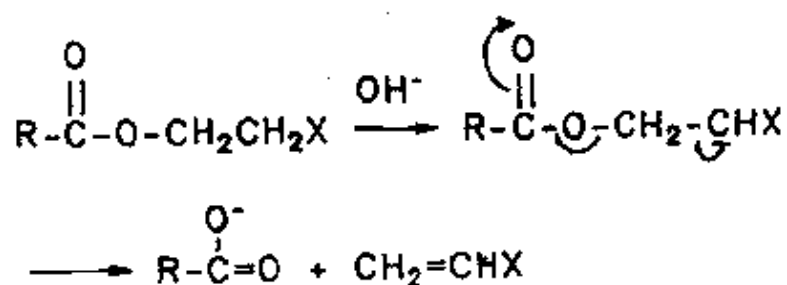


图 2.28 对碱不稳定的保护基

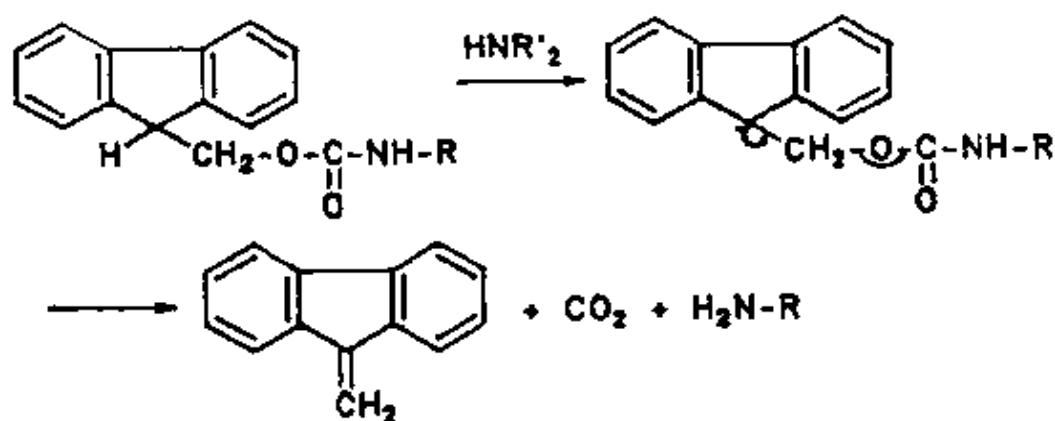


图 2.29 对碱不稳定的 Fmoc 基

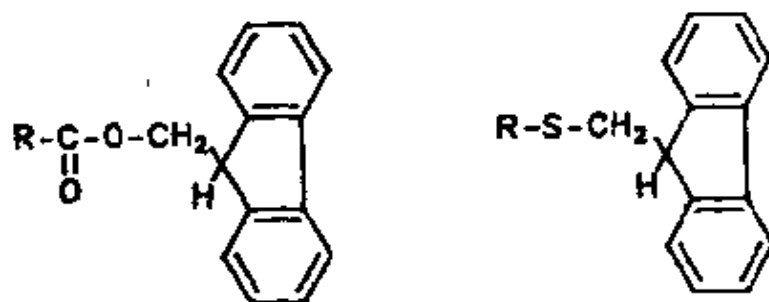


图 2.30 Fmoc 用于保护羧基和巯基

2. 侧链功能基的保护

在过去的数十年里，对半胱氨酸 (Cys) 巯基保护进行了许多有用的革新。最新的发展是以甲醛为基础的。该原理的一个较早的例子是把半胱氨酸侧链活泼巯基包括到甲醛硫乙酰结构的苄硫甲基^[109]中。然后甲醛硫乙酰分解。若有必要，应借助于二氯化汞的帮助^[110]。对甲醛衍生物系列的较晚的补充是 *S*-乙酰胺甲基^[111]，该保护基在甲醇中碘解很容易脱去，伴随着生成二硫桥。

这一适宜的方法并不总是比经典的途径，即用苄基化保护巯基及用金属钠/液氨还原脱保护来得好^[68]。例如在 Palindrome-peptide 5-valine-enathiomalformin^[112]的合成中，老方法所得的结果比后来^[113]使用 *S*-乙酰胺甲基保护要好。

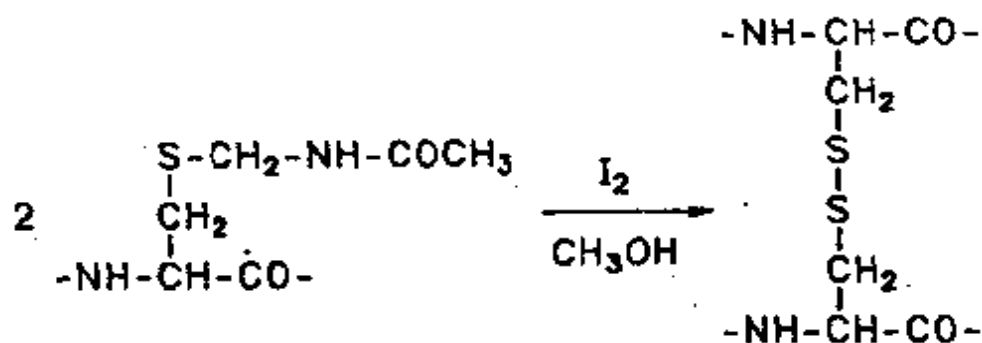


图 2.31 甲醛衍生物的碘解

以叔丁基硫醚^[114]的形式对巯基进行保护，明显地解决了该问题^[115]。用邻硝基氯代硫酚处理后，叔丁基被取代，*S*-Nps 基用巯基乙醇切除。

虽然组氨酸侧链咪唑氮的保护常常省略，但肽链中“无保护”咪唑的存在能引起一系列问题。例如，虽然它的碱性弱，但三氟

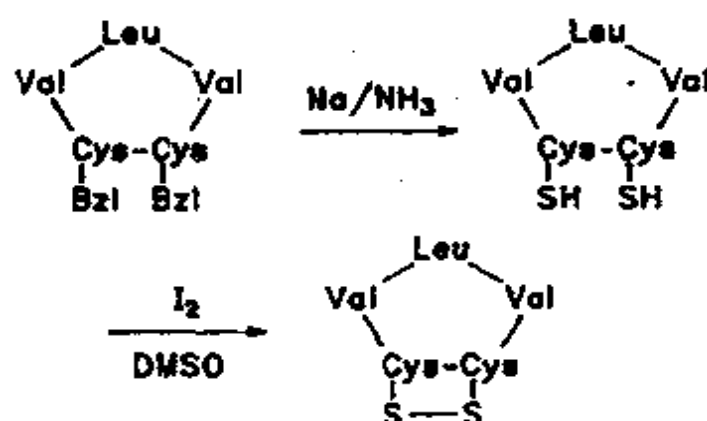


图 2.32 钠/液氮脱保护

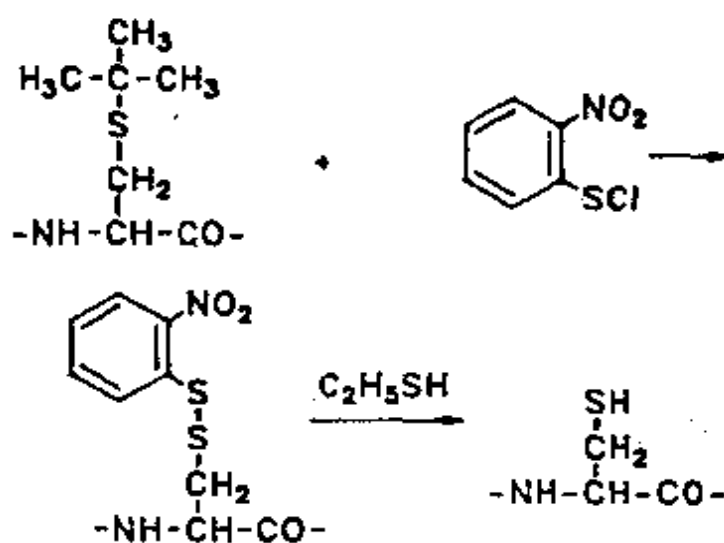


图 2.33 用巯基乙醇脱保护

乙酸分子仍能对它实施进攻^[116]；另外，咪唑残基对反应有明确的催化作用，并且在偶联过程中增强未保护羟基的酰化。此外，通过酰化保护咪唑同样存在问题。酰化咪唑是优良的酰化剂，所以研究酰基向氨基的转换并不出人意料，从组氨酸侧链咪唑环上除去

苯磺酰基^[117]可以看作是对酰基无保留地用于这种目的警告。烷基化的风险明显要小些，在组氨酸侧链保护研究中，环上的两个氮原子间的差异特别应该受到重视。于是，通过苄氧甲基^[118]选择性地保护 π -氮原子提供的保护，既防止了不希望的取代，又防止了组氨酸的消旋化。

自从引入叔丁基保护羟基以来^[114, 119]，羟基的保护并未取得明显进展。经典的苄基仍然是仅有的现实的变换方法。虽然后来提出的吡啶氮原子用苄氧羰基保护^[122]还有待评价，但色氨酸中的吡啶环容易烷基化^[120]，使用甲酰基可以进行保护^[121]。在酸解中用苯酚作溶剂^[88]可以防止色氨酸的烷基化。若在苯酚-对甲苯酚混合物中用酸脱保护，酪氨酸 C₃ 烷基化的类似干扰可以被有效地抑制。

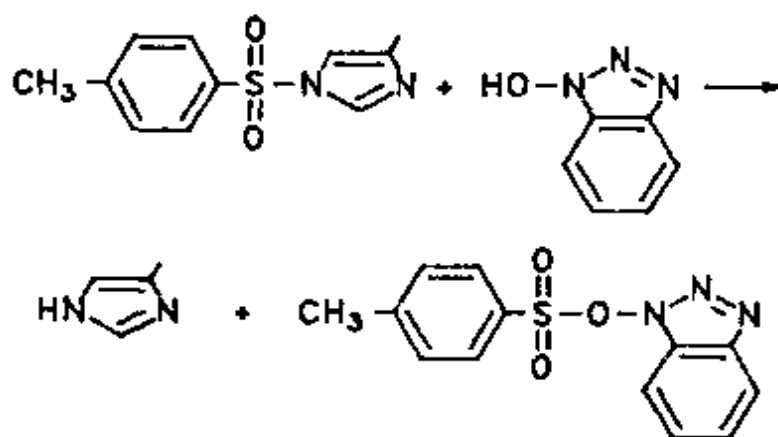


图 2.34 HOBt 导致组氨酸的侧链脱保护

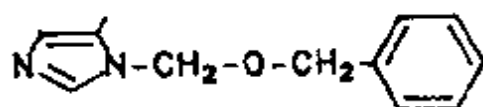


图 2.35 用苄氧甲基保护组氨酸的侧链

尽管拟定了大量保护羧基的方法^[123]，但完全满意的保护基仍有待发现。应用越来越广的保护基，例如对甲氧苯磺酰基^[124]及 1,3,5-三甲基苯磺酰基^[125]既有改进的需要，又有改进的可能^[126]。用于保护赖氨酸侧链氨基的解决办法很多，但通常使用的保护基中，有几种对中间体在常用溶剂（如 DMF）中的溶解度有不利的影 响。能被水性哌啶^[128]脱去的三氟乙酰基可能是这方面的一个例外。在经典组合中，ε-氨基用 Z 保护，Boc 用作 α-氨基的瞬

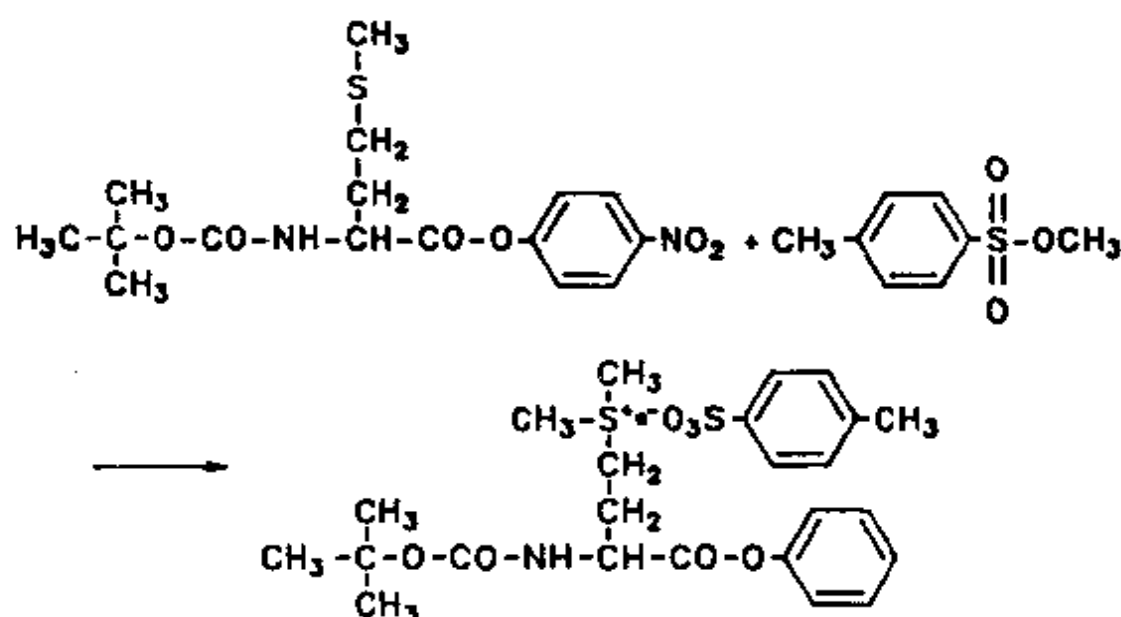


图 2.36 用甲基化防止蛋氨酸上的烷基化副反应

间保护基。在这种情况下，已经讨论过的脱 Boc 的选择性成为至关重要的问题。

可以肯定，并非所有的功能基都需要保护，所以，尽管设计了一系列保护基用来保护谷氨酰胺和天冬酰胺中的酰胺基，但绝大多数研究人员在遇到这些残基时，并未给予特别的注意。蛋氨酸中的硫醚的情形也大致相同，但在这里，似乎在硫原子上会发生氧化和烷基化一类的副反应。虽然多年前 Iselin 就已发现硫原

子易氧化成亚砷^[129]，但后来才把这种氧化反应作为保护蛋氨酸侧链的一种方法；用对甲苯磺酸甲酯使 *N*-保护的蛋氨酸的活泼酯的硫原子甲基化，是防止第二种副反应(烷基化)的措施^[130]，把三级磺酸盐接入到肽链之中，最后用硫解可以使硫醚再生。

三、战术和战略

各种保护基和偶联方法的组合定义为多肽合成的战术^[131]。对酸的敏感度有明显差异的保护基的选择性切除^[78]，在过去的几十年里作为主要的革新，几乎是后无来者。在使用 Fmoc 作为 α -氨基的瞬间保护基与作为 C 端羧基和一系列侧链功能基的半永久保护基叔丁基（包括 Boc 基）配套构成了正交保护。揭示出使用 Boc 作瞬间保护基，9 芴甲基(Fm) 作为侧链保护基^[107,108,132]的作用，这种可能性仍有意义，也值得进一步研究。

多肽合成的战略^[131]涉及用片段组合成较长的肽链，有两种原则途径的片段组合较为明显，较为经典。这种途径明确有利的地方是，采用协作的方式用简单的方法制备一系列长度适中的肽段的可能性。不过，这类中间体的组合还存在一些问题。部分保护的较长链多肽在可用的溶剂中常常溶解度差，这个普遍的困难往往是主要的障碍，合成核糖核酸酶就遇到这种困难^[133]。第二个问题，即羧基组分的活泼残基的消旋化，由于前面提到的附加剂的发现，在一定程度上得到解决。不过，在实际实施片段组合时，通常会碰到更多的不利条件：反应物的浓度可能更低，被偶联的残基的位阻可能更大。所以可以理解，当实际合成危及活泼残基的手性纯度时，不得不开发大量以不消旋为特征的偶联方法。例如，五氯酚酯在这方面十分有前途^[134]，但使用保护二肽五氯酚酯^[47]

于肽的制备引起 40% 消旋化。能使片段联结到一块、又完全保留手性纯度的方法，在改进多肽合成的研究中是值得花时间的课题。当然，评价新程序时需要相当地注意：如果偶联反应在其它方面都明确，而只是消旋化成问题，那么使用简单而又大众化的 Anderson-Callahan 模式^{〔135〕}是唯一正确的选择。难溶的消旋化物不从溶液中析出的事实，只有当不存在能够干扰结晶的副产物时，才能作为可靠的证据。一般说来，依赖于相反的证据作结论是不可靠的。使用模型体系似乎比较安全，在该模型体系中，如果发生消旋化的话，就会生成期望的二肽的非对映异构体。很明显，由于后处理时该非对映异构体可能丢失，所以最好使用不需要分离产品的测试方法。酰化异亮氨酸与某种氨基组分进行偶联时^{〔136〕}，因消旋化产生的别异亮氨酸可以直接从反应混合物中取样，用水解法进行氨基酸分析测定。

进一步的困难来自于活泼羧基组分的分子内副反应，例如当丝氨酸或苏氨酸被活化时生成内酯，当天冬酰胺或谷氨酰胺是 C 端残基时，可生成腈或环状烯胺。最大保护可能跨越这些障碍，但在蛋白选择性酶解中，将得到的片段进行部分合成或半合成时，却必须采取最小保护，因此导致严格的限制。

把保护氨基酸而不是保护多肽作为活泼组分的逐步接肽克服了消旋化问题，同时也允许过量原则^{〔137〕}。酰化试剂可在各种浓度下使用，期望在使用的浓度下酰化反应（即羧基和氨基组分间的双分子反应）以适宜的速率发生，从而使副反应的贡献保持在可以接受的水平上。大部分副反应是分子内反应，因此与浓度无关。

逐步合成不如片段组合适宜于协作，但由于操作的重复性易于机械化和自动化，所以适用于固相多肽合成。然而在液相合成中，由于一些保护中间体的溶解度差，逐步合成会被引向终止。

曾运用过量原则合成核糖核酸酶 A(一个 124 肽)^[138], 这件事很有意义。把接入的小肽作为活泼羧基组分过量, 过量的量随着链长的增长逐渐增加, 结果表明这种策略是十分成功的。

目前仍存在着几个特殊的战略问题, 例如通过二硫桥的链组合可以把蛋白片段组合到一起或环化。而环化问题更值得重视, 因为目前对生物活性开链多肽的环状类似物的兴趣在不断增加。在分开活化和环合步骤中使用用于环化的偶联试剂的问题也开始引起注意^[139]。

四、重要的技术改进

接入每一个氨基酸残基所需要的保护、活化、偶联和脱保护要花费大量时间和精力。为避免合成长链多肽中单调乏味的工作作了大量的尝试。不容置疑, 在这方面, 固相多肽合成最成功^[142]。把保护的氨基酸(常常是 C 端残基)固定到不溶的高聚载体上, 在不溶端的多肽高聚载体上进行增长肽链的反应, 使中间体和原料及副产物的分离变得容易, 只要用合适的溶剂洗涤就能达到纯化目的。该程序有助于机械化和自动化, 因而也能迅速合成相当长的肽链。固相多肽合成的一个特色是, 激发了改进基本操作的新思想。由此而导致的主要发展虽然不能在本文扼要说明, 但可以参考 Barany 和 Merrifield 有关的详细综述^[140]。这里只想指出该综述中强调得不够的地方, 即通过酸解脱保护容易导致的氨基组分的去质子化。用叔胺溶液简单地洗涤多肽高聚物, 铵盐即转化为游离氨。前面已经讨论过在偶联混合物中不加叔胺的好处。

由于原始的氯甲基树脂存在一些问题^[142], 促成了对高聚载体进行大量修饰。把氯甲基高聚物转化为羟甲基高聚物^[141], 可以防

止蛋氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸的敏感侧链的烷基化。

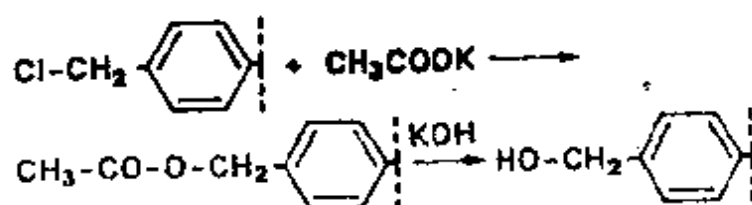


图 2.37 氯甲基高聚物转化为羟甲基高聚物

在非极性溶液(最好是甲苯)中,用保护氨基酸的活泼酯^[142,143]在咪唑催化^[144]下,进行酯交换反应,容易把第一个氨基酸残基固定到树脂上,且不损失手性纯度。苄醇残基是当代载体之一,比如 Wang 载体^[142],提供了对酸不稳定的载体。在一些聚酰胺型载体树脂中发现了苄醇残基^[145]。这就启发人们思考固相合成中的至关重要的一点:当把整个肽链从树脂上切除时,往往同时也切除半永久性保护基。常常用强而无害的试剂来达到该目的,用这类对酸不稳定的载体进行合成时,液态氟化氢能被较为缓和

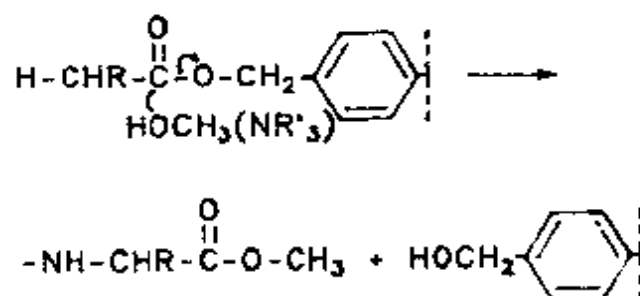


图 2.38 碱催化的酯交换

的三氟乙酸代替^[77]。在硫代苯甲醚或 4-甲基硫酚存在下^[146,147],

用三氟乙酸切除 Z 基说明, 在相对温和的条件下, 通过经典的苯醚可能把肽从其连接的高聚体上切下来。

另一种裂解方法能够切断多肽和高聚体之间的键而不危及保护基, 因此这样得到的多肽衍生物能作为继续合成的中间体。氨解和肼解^[143]明显地分别提供有用的酰胺和肼。碱催化的酯交换可能是一种有价值的替代^[141]。这已被发展成为一种方法^[148], 在该法中使用二甲氨基乙醇进行酯交换, 并通过水解完成操作, 提供 C 端羧基的肽:

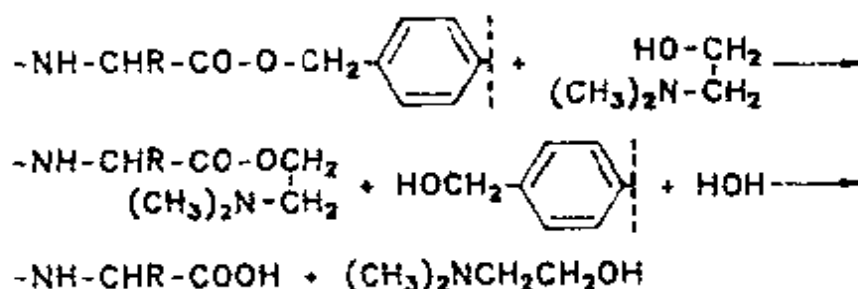


图 2.39 二甲氨基乙醇进行的酯交换

在固相多肽合成中发展起来的各种方法里, 至少应提到两种有意义的途径: 使用高聚物键连的不溶性酰化剂^[149, 150]以及合成连接到可溶性高聚物上的肽^[151, 152]。可是, 由于保护多肽中间体的溶解度大, 使这些有吸引力的方法的改进受到了限制。不可置信的是, 不溶性活泼酯颗粒能从产物(即保护多肽)中分离出来。在“液相合成中”^[152], 增长的肽链是接到可溶性的载体(例如聚乙二醇)上, 并使用乙醚一类的非极性溶剂稀释, 以便分离出中间体。随着高聚物上的肽链逐渐增长, 多肽高聚物的溶解度性质应接近肽的性质, 而且以聚乙二醇的物理性质为基础的分方法可能不再有效。

有意义的是，有些保护中间体既不溶于一般的有机溶剂，也不溶于 DMF，这时只要用乙醚、乙酸乙酯或乙醇稀释，无需借助于高聚物化学的任何帮助，中间体即可从溶液中分离出来。用于沉淀保护中间体的这些溶剂，能溶解副产物，例如活泼芳香酯情形中的取代苯酚，以及溶液中的过量酰化剂。这样一来，只要简单地用合适的溶剂彻底洗涤沉淀，就可以得到纯的保护中间体。这种简单的技术^[29, 32]已经被用于合成相当大的分子，例如生长激素释放抑制因子^[153]，合成规模也相当大。也已经用于合成较大的生物活性分子，例如催产素^[154]。在改良的离心管中完成必须的操作可以达到进一步简化的目的。在该一匀烩的合成中^[155]，中间体被分离，因此若需要的话，可以进行分析 and 纯化。按照这种方法，合成工作不必盲目进行。通过分析、色谱等手段，可以及时发现问题，而且通过结晶、色谱或逆流分布等方法使之纯化。固相和液相合成都需要大量的溶剂“稀释”肽或溶胀高聚物。当保护中间体的不溶性由于改进操作而被利用时，则不再需要耗费大量溶剂。

五、多肽的纯化与纯度

目前还没有一种方法，可用于各种精制目的。特定多肽的理化性质，支配着可供应用的纯化技术。并不是只有序列决定多肽本身的特性，用来合成多肽的方法在很大程度上决定了中间体的行为和杂质的性质。下面考虑一个含所有天然氨基酸的 55 肽，该 55 肽用逐步接肽法制得。在完成每一步酰化反应时，反应混合物中可以包含所需要的保护多肽。为了确保反应完全而加入的过量的未反应的酰化组分，除非反应定量进行，否则会含未反应的氨基酸组分。Bass 等计算过由这样一类合成导致的、可以预料到的各

种长度的多肽的统计学分布,前提是,假定它们没有在预先的纯化中除去。如果平均偶联产率是 99%(1%或少于 1% 的未反应氨基酸,难以检测),那么所得混合物中,只有 58.1% 是期望的产物。其余的 41.9% 是含 54,53,52,51…… 个氨基酸的各种可能的序列组成的混合物,而 54 个氨基酸的链是主要杂质。这样一来,未酰化链分布在每一步合成中,相对量虽小,但对于目的物的均一性及纯化方法的选择,却是主要的影响因素。

每步偶联反应之后,为了进一步循环,末端氨基必须脱保护。氨基保护基除去不完全或侧链保护基的丢失,均可造成非均一性。这种合成程序的特性需要把生长着的肽链暴露于每步循环反应之中,例如前面已经讨论过的 N^t -苄氧羰基对脱叔丁氧羰基所需条件的不稳定性,可以丢失侧链保护基。上述假定多肽的羧端存在的 N^t -苄氧羰基赖氨酸将经历 55 次脱保护循环。由于侧链保护基的丢失,使得在这些位置也发生酰基化,从而生成歧链序列。

很明显,在设计纯化多肽的操作时,必须认识可能存在杂质的这种广泛可变性,而且这些杂质中许多成员显示与产物类似的性质。每步循环之后的纯化,显然太费时间和精力,可是,常见的均一性评价,特别是对中间体纯度的要求,又必须要这么做。即使采用最尖端的技术,也有不能分离而获得多肽混合物的可能性随着肽链的增长而变大。而且,阐明非均一性可能存在许多困难。虽然如此,但下述手段仍然可以作为多肽纯制的普遍方法加以介绍。

1. 重结晶

作为一种纯制方法,重结晶通常只能用于小肽、保护中间体

和蛋白。明显的例外是去氨基催产素、胰高血糖素和胰岛素。由于合成方法的进展和制备更长的序列，作为纯化目的物的手段，重结晶可能重新具有重要性。蛋白的重结晶不是纯度的可靠准绳，不过，无能重结晶一个合成的蛋白，可以作为非均一性的指征。

2. 逆流分布

在不混溶的两种溶剂间的分配，仍可看作是具有不同溶解度性质的多肽混合物分离的优秀方法。这种技术被广泛地用于纯化猪降钙素的合成中间体。降钙素的前体在甲醇/乙酸铵缓冲液/氯仿/四氯化碳(10 : 3 : 6 : 5)的体系中经 430 次分配，而且该法被用作分析手段，以测定目的物的纯度。

把含蛋氨酸或巯基保护的半胱氨酸的多肽暴露在大体积溶剂中，可以被氧化为对应的亚砷衍生物。由于在分配程序中发生氧化反应，又由于氧化态和还原态分配系数可以不同，故可以形成重叠的宽峰。

肠促胰液肽的粗品在丁醇/吡啶/乙酸/水系统中逆流分布时，生物活性有明显的损失。肠促胰液肽在该特殊的溶剂系统中不稳定是造成活性损失的原因，但机理不详。

3. 电泳

电泳方法利用电荷差异，以及分子大小和形状的差异来达到分离目的。淀粉、纤维素、Sephadex、聚丙烯酰胺和纸用作支持介质，利用它们的高聚物性质的优点，抑制微粒间的扩散相互作用，以便电荷分布相同的两种分子在正当的条件下，能使用该法分离。

电泳作为有意义的分析工具，曾用于监测合成的人促胃酸激

素。由于对天然产物缺少序列的研究，所以妨碍了结构的彻底研究。根据其中一种降解产物的氨基酸分析，五个谷氨酸残基是否存在于序列位置 6—10，或是否仅有 7—10 为被谷氨酸占据并不清楚。但通过合成两种与变性物对应的多肽，并通过纸上电泳与天然产物进行比较，明确答复了存在五个谷氨酸。

不使用支持介质(自由流动电泳)的制备电泳，可用来分离克级水平的样品。该技术特别适用于含未保护侧链的精氨酸的多肽，因为这种类型的序列极像水溶性的。聚焦电泳最初用于从天然产物中分离蛋白，也可用于制备。新近开发的毛细管电泳似乎可以作为强有力的分析手段。

4. 离子交换色谱

阴离子和阳离子交换纤维素，最初是用来分离蛋白质的色谱方法，在多肽化学中也发现有广泛的用途。在 α -黑素细胞增长激素和促肾上腺皮质激素的合成中，得到的含高度碱性的赖氨酸和精氨酸多肽，已用羧甲基纤维素进行分离。逐渐增加离子强度、pH 或二者同时逐渐增加，可以获得很好的洗脱。树脂对用高离子强度的溶液进行洗脱的高敏感度，的确必须使用非常稀的多肽混合物的溶液。在 Sephadex G-25 和氨乙基纤维素上，使用碳酸氢铵梯度系统，成功地使含六个羧基侧链的十二肽(去保护的，人体促胃酸激素 6—17 片段)从其偶联组分(有五个过量的负电荷的八肽和一个净负电荷的四肽)中分离出来。

虽然各种纤维素都常常发生不可逆的吸附，但粒状纤维素使这种状况有些改变。由于粒状树脂使用较小的柱子，常常可以达到较好的洗脱。由于在水性介质中的溶解度不是先决条件，合成树脂在分离片段组合产物时特别有用。合成离子交换树脂柱可以

用一系列水/有机溶剂混合体系，有效地进行操作。含正丁醇/甲醇/水(1:1:1)的体系已经以梯度形式与阴离子交换剂 Dowex 1-X₂(AG 1-X₂)联用，后者通过用乙酸代替水增加正常度。

简单的一次性操作常常适合于脱盐或浓缩极稀的溶液。盐或肽由于吸附到树脂上而从溶液中除去。在用钠/液氨脱保护中，加入 Dowex 50(氨循环)，可以除去过量的钠。

对应于核糖核酸酶 A 的 S-肽的 1—14 位的部分保护的十四肽，在片段组合之后将反应混合物与 Dowex 50 W-X₂的悬浮液搅拌，而从过量的酰化组分中游离出来。通过游离的 δ 胍基，产品定量地吸附到磺酸型树脂上。树脂彻底洗涤，产品用 2-丙醇/甲醇/2%氨水洗脱。

5. 分子筛

分子筛能识别不同分子量的高聚物，为多肽纯化提供了另一途径。已开发了适于分离分子量不同的化合物的葡聚糖和聚丙烯酰胺分子筛。这些树脂在脱盐操作及逐步接肽和片段组合反应的分离中特别有用。阳离子和阴离子交换剂允许按分子量和电荷分布，造成多肽之间的差别。羟丙醇化葡聚糖(Sephadex LH-20)的引入，使分子筛的适应性扩大到了水不溶性保护多肽中间体的色谱。该树脂能在绝大多数用于多肽合成的有机溶剂，即甲醇、氯仿、二氧六环、乙酸乙酯和二甲基甲酰胺中溶胀，改变级别。

常规分子筛和 LH-20 二者都能用于分配色谱，溶胀树脂时用两相体系中的水部分，展开柱子时用两相体系中的有机相。在这些条件下，分子筛色谱可能区别分子大小和溶解度两种性能。

高聚物和芳香氨基酸残基，特别是与色氨酸之间的相互作用，能够阻滞多肽在柱中移动。这种现象就是造成用来制备促肾

上腺皮质激素的片段 ACTH_{1-23} 酰胺的多肽序列的不寻常的色谱行为的原因。来自于与该酰胺的 1—10 位和 11—23 位对应的片段偶联的混合物，虽然分子量差别超过两倍，但产物在 11—23 酰胺之后从 Sephadex G-25 柱流出。氮端十肽受阻滞最甚。在该序列中，9 位是色氨酸。

6. 亲和色谱

到目前为止，设计用来纯化多肽的最尖端的色谱方法是，依赖一些分子显示的高度特征的相互吸引。酶被阻滞在柱子中，该柱含有结合在高聚物晶格上的酶的底物抑制剂或效应物。通过对应的高聚物键合的抗原，抗体被选择性地吸附，固相甾体激素被用于分离对应的血清结合的蛋白。虽然推荐了一系列其它载体，但纤维素和葡聚糖（具有不同的交联度）仍是最通用的载体。

这种通过互补而生效的技术，被用于分离核糖核酸酶 A 的 S-肽 1—20。合成的多肽粗品与天然 S-蛋白混合，结合物在 Amberlite CG-50 上层析。核糖核酸酶 S' 被分离 S-蛋白用三氯乙酸沉淀除去，并得到均一的 S-肽。

虽然亲和色谱有许多明显的优点，但它不是多肽化学的万应良药。1969 年，Kato 和 Anfinsen 试图纯化含 S-肽 1—15 的该固相合成成品，把合成的肽结合到与 Sepharose 4B 共价结合的 S-蛋白上。用酵母核苷酸作底物，测定多肽与再生全部活性所需蛋白的摩尔比，评价了这种纯化方案的成功。

一种制品与另一种制品之间所达到的纯度差异是很大的。每摩尔 S-蛋白需要 5 至 10 摩尔肽，以便再生全部活性。以肽与蛋白 1:1 的摩尔比，S-肽 1—15 完全活化 S-蛋白。如果事先没有确立等摩尔 S-肽 1—15 和 S-蛋白混合物的全部活性，上面的结

论已经能够从使用该不纯物考虑 16—20 位氨基酸作用的实验中推出来，那么思考一下这个结论就很有意思。

7. 纯度的评价

多肽的均一性只能用相反结果来证实，也就是说无论采用什么分析技术都发现不了杂质。对多肽纯度所下结论的力度与评价中使用的独立技术的数量成正比。

随着高分子量结构(蛋白范围)的合成方法的进展，多肽化学在合成分子中有自身的特定地位，但在纯化与定性方面则显得无能为力。例如合成的化合物往往在理化性质方面与天然品相同但生物活性却往往不及天然物，就反映了这方面的问题。例如，人生长因子的错误序列对应的十五肽(人生长因子的 77—91 片段，被错误地指定为 17—31 片段)，报道的生物活性只有天然激素生长促进强度的 10%。

多肽合成的目标是，在依赖分离天然物不能解决需求的情况下，为生物学提供足够的样品并确认合成方法的可靠性，即使用一切可用的分析方法证明合成品与天然品不存在差别。如果产品不能满足要求，那么该方法就不能用来合成活性未知的用于构效关系研究的类似物。只要认识到用粗品得到的答案可能含混不清，而且只要仅把生物活性的粗差异看成重要，那么认为粗品就是能够满足测试的样品的看法就是危险的。多肽只要有细微的结构变化，就能对它的性质造成惊人的影响。例如猪的促肾上腺皮质激素中的硫原子被氧化，事实上就破坏了它的生物活性，而且以 *d*-砒取代硫肽 1—20 中的蛋氨酸，硫蛋白中的肽的结合强度要降低 10 倍。

在生物学中，很少有问題能够用毫不含糊的“是”或“否”来回

答，特别是在多肽激素的结构功能研究领域如此。氨基酸残基的缺少或取代可以造成失活，如果对污染物的同一性及污染物对测试的影响都无法进行评价，就不能保证某氨基酸对功能必须这一结论的正确性，甚至指明生物活性未被破坏的结论也可以导致谬误，因为常常很难确定怎样的活泼制品必须认作“活泼”。

从前面的讨论应当看到，生物活性是评价合成多肽纯度的唯一可靠的标准，但是如果承认用来测定活性的许多生物测试也只是相对敏感并能发生大的变异，那么这个观点显然过于乐观。另外，自然对多肽的同系物十分宽容。天然存在的血红蛋白和细胞色素 C 的十余种类似物具有全部的生物活性。在相对小肽激素降钙素中发现的明显变种是天然同系物的另一个例子。按照这种考虑，声称合成序列构成假定结构的证据不再合理。

不存在单一的没有错误的纯度准则，由此也不存在如何证明合成化合物均一性的问题的解决方案。虽然经过一系列以不同的物理原则为基础的分析技术之后，也不能证实多肽中存在杂质，但实际上毕竟提供了有利于均一性的证据。

天然的猪降钙素的分离为在相同的问题中能够应用不同的制备和分析技术获得的信息种类，提供了有意义的比较。至少两种具有降钙素活性的物质由逆流分布和柱色谱方法认为一致，但只有一种被圆盘凝胶电泳证实。色谱可分离的两种组分的混合物也不能用聚丙烯酰胺的电泳分离。当澄清了这两种物质是降钙素和它的矾衍生物之后，这种差异的理由就变得清楚了。大多数制备方法能够直接或修饰后用于分析目的，这已详细谈到。后面主要涉及不能或尚未用于分离问题的方法。很明显，如果某一特殊技术已用于纯化多肽，再把它作为分析方法使用，就增加不了新信息。

天然产物的合成为通过与标准品的性质比较评价纯度提供了机会。不幸的是常常忽略测定标准品的质量的必要性。合成多肽具有它的天然物 100% 的活性的结论，仅意味着二者只有预期潜力的 10%。采用绝对单位，以及与标准条件无关值表示的生物活性报告，对纯度评价更有意义。样品中实际多肽含量的测定以及参考标准的测定，也具有关键的重要性，因为潮解和盐的含量，给定重量中的多肽的量可能比估计的低 30%。

把标准品暴露到从合成多肽脱保护所必须的条件中，能够提供与特别的脱保护程序的理想度有关的有用信息。不过应当记住，经受了这样的条件的物质，不能再作为可靠的标准品用来比较。

碳、氢、氮和氧的分析，被认为是测定组成的传统的无可争辩的证据，但随着多肽分子量的增加，意义就不那么重要了。复杂多肽的元素分析耗费有价值的样品，只能提供不大有用的信息，特别是当考虑由于溶剂化和多肽的相反离子的贡献时如此。随着肽链的增长，熔点变为分解点，因而大肽通常不测定熔点。对于简单的保护氨基酸或它们的活泼酯，或者当采用另一路线合成相同序列时为了比较，旋光方法是有帮助的。大肽的立体化学均一性只能用酶学方法测定。

对于小肽来说，氨基酸分析用来定性是极为重要的。在最佳条件下，酸水解或酶解的氨基酸能够定量测定，精度为 $\pm 3\%$ 。特别重要的是测定从多肽水解物中氨基酸的平均回收率。该数据为用于标准活性测定或其它分析测定的样品中实际多肽含量提供了依据。另外，比较酸水解和氨肽酶解的氨基酸平均回收率，提供了样品的立体化学均一性的评价方法。不过氨基酸分析的值作为纯度的准绳，由于残基在序列中出现的几率而受到限制。更有甚者，在高分子量多肽分步合成中可以预期到的各种肽的混合物

(假定不包括经常的纯化步骤),即使产品被粗粗地污染,也可以想象会给出理想的分析结果。

测定通过两个均一片段组合而得到的多肽中的一些“诊断”氨基酸之间的比例,为偶合产品的纯度提供了评价标准。

作为分析技术,薄层色谱(TLC)大大地取代了费时更多的纸色谱。作为监测偶联反应过程和评价柱色谱分离中得到的各个组分纯度的方法,该法敏感而又迅速。

毫不夸张,已经有数百种溶剂系统和一系列载体用于多肽和氨基酸。它们与一般的及特殊的颜色反应相结合,为检测大多数物质中的杂质提供了方法。TLC的通用性多少受到多肽的大小和溶解度的限制。蛋白质在许多溶剂系统中都不能展开,而一些难溶的多肽严重地使溶剂的选择范围变窄。

除非已有相对比移数据,否则说某多肽在TLC上是色谱纯就毫无价值。因为已经知道绝大多数保护多肽在正丁醇/乙酸/水混合物中,移至溶剂前沿(R_f 0.9以上),所以在该体系中证实多肽的纯度毫无意义。TLC有形成长的不对称点倾向的化合物(拖尾),通常表明不纯。大多数纯肽,即使在eicosa和triconia范围,在TLC上也显示极好的色点。

假如溶剂除不净就可能造成TLC的假象。若反应溶剂中有低挥发度的溶剂,例如DMF或DMSO就特别令人讨厌。这些溶剂在TLC上移动并引起溶质在溶剂和流动相中分配。

彻底水解仅仅是测定多肽结构的第一步,真正的挑战是阐明氨基酸序列。测序时常常首先测定N端氨基酸,Edmann降解是最通用的途径。

肽与苯基异氰酸酯反应时,N端氨基对试剂实施亲核性进攻,生成肽的苯基氨酰衍生物。该衍生物用酸处理,分子内的键

断裂，生成 N 端氨基酸的苯基海硫因衍生物，多肽的其余部分完整保留。该衍生物经色谱分析，即确定了 N 端基。Edmann 降解的绝妙之处就是在测定 N 端氨基酸结构的同时，保证肽键的其余部分不受损失。以此循环下去，可以不断地确定新的 N 端基，直至所有的氨基酸都被测定。蛋白序列仪，即是以这种原理为基础设计的。

在测定 N 端氨基酸的其它方法中，最负盛名的就是 Sanger 试剂(2, 4-二硝基氟苯)。Sanger 于 1945 年发明了这种试剂，并用来测定蛋白的结构，1955 年报道了关于胰岛素的¹结构测定，由于这些贡献，他荣获 1958 年诺贝尔化学奖。在 Sanger 方法中，N 端氨基酸取代试剂上的氟原子，生成 2, 4-二硝基衍生物。另一个有效的方法是使用丹磺酰氯(1-二甲氨基萘-5-磺酰氯)酰化多肽的 N 端氨基。水解这类肽衍生物中的酰胺键，可以不伤害 N 端氨基与试剂生成的键，用色谱分析即可确定 N 端的氨基酸。这两种方法的不利之处就是为了测定一个端基，必须破坏整个肽键。

C 端氨基酸分析，常常通过羧肽酶完成。将羧肽酶催化 C 端基选择性水解，然后可以进行鉴别。该法的不利之处是，酶会不停地催化水解，直到肽键完全水解为组分氨基酸。与 Edmann 降解不同，虽然该法常常可以完成小肽的分析，但每步不易控制。

有两种化学方法，通常用来标记 C 端基。一是用硼氢化锂还原羧酸为醇，水解肽链，测定 α -氨基醇。一是胼与肽反应使所有的肽键都发生胼解，而切断分子内的每根酰胺键，并生成氨基酸酰胼，只有 C 端氨基酸仍保留有游离羧基，才可作为游离氨基酸被分离出来。

肽键的 C 端和 N 端被鉴定之后，还必须确定其余的氨基酸序列。对于小肽链，端基法用来一次断裂一个基团；大肽链则是先

断裂成小片段，再分析各小片段的序列。酸水解是把大肽断裂成小肽的方法之一。肽键间对酸敏感性的差异使得水解速度各不相同，以致于有些片段的肽键不受伤害，并可以分离出来。一个很有意义的特殊断裂是使用溴化氰，该试剂仅仅断裂由蛋氨酸的羧基形成的肽链。历程中，包括硫原子作为亲核试剂，然后以铈盐的形式作为离去基。

六、结论

从前面的叙述可以看到，可用的偶联程序适合大部分合成目标。主要的进展来自于片段组合时不发生消旋的方法。引入新的保护方法在过去一直影响着该领域。应当记住，当代合成的领域是随着苄氧羰基的发现而开始的。叔丁基和叔丁氧羰基使多肽合成发生了革命，高度酸敏感的联苯异丙氧羰基进一步扩大了酸解脱保护的范 围。Fmoc 基的引入，使碱敏感的保护基的发展到达了顶峰，由于它容易用二级胺切除，从而为在不溶性高聚物上组合多肽开辟了新的前景，并提高了质量。

固相方法的发明，使多肽化学的实践发生了重大变化。这种想法现在也被用于合成多核苷酸和制备其它复杂分子。

可以看到，新生物活性多肽的发现速度日益增加。现在内分泌器官的概念扩大了。大量多肽结构的调节因子，加上它们在医学上的潜在重要性，必然导致合成多肽数目的增加，但也加深了发现新合成方法的意义。生物工程的降临使药物化学家有所解脱。借助蛋白水解酶生成肽键是一条鼓舞人心的途径，但它的发展尚未达到普遍应用的地步，用蛋白水解片段进行的半合成也处于同样的境地，所以药物化学家在多肽合成中仍发挥主要作用。化学

家可以选择各种技术,包括固相合成方法,以便合成相当大的多肽,并达到适当的规模。当肽链长度中等并需要商业规模时,仍需要选择液相合成。因为医学对产品纯度的高要求,需要结构确切的中间体,因此可以预见液相法仍然是今后有价值的方法。由于小分子多肽在医学发展中的前景,以及液相法相对地节约昂贵的氨基酸,因此,在我们国家,它将仍然是首选的技术。

参 考 文 献

- [1] Curtius. T. , 1981, *J. Pract. Chem.* , **24** , 239.
- [2] Curtius. T. , 1902, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* , **35** , 3226.
- [3] Fischer. E. , 1903, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* , **36** , 2094; Fischer. E. , and Otto. E. 1903, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* , **36** , 2106.
- [4] Bergamann, M. , and Zervas, L. , 1932, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* , **65** , 1192.
- [5] Du Vigneaud. V. , Ressler, C. , Swan, J. M. , Roberts. C. W. , Katsoyannis, P. G. , and Gordon, S. , 1953, *J. Amer. Chem. Soc.* , **75** , 4879.
- [6] Chantrenne, H. , 1974, *Nature* , **180** , 603; Chantrenne, H. , 1948, *Biochim. Biophys. Acta* , **2** , 286; Chantrenne, H. , 1949, *Nature* , **164** , 576; Chantrenne, H. , 1950, *Biochim. Biophys. Acta* , **4** , 484.
- [7] Wieland. T. , and Bernhard, H. , 1951, *Liebigs Ann. Chem.* , **572** , 190.
- [8] Boissonnas, R. A. , 1951, *Helv. Chim. Acta.* , **34** , 874.
- [9] Vaughan, J. R. , Jr. , 1951, *J. Amer. Soc.* , **73** , 3547; Vaughan, J. R. , Jr. and Osato, R. L. , 1952, *J. Amer. Chem. Soc.* , **74** , 676.
- [10] Wieland, T. Schafer, W. , and Bokelmann, E. , 1951, *Liebigs Ann. Chem.* , **573** , 99.
- [11] Schwyzer, R. , Feuter, M. , and Iselin, B. , 1955, *Helv. Chim. Acta* , **38** , 67.
- [12] Bodanszky, M. , 1955, *Nature* , **175** , 685.
- [13] Sheehan, J. C. , and Hess, G. P. , 1955, *J. Amer. Chem. Soc.* , **77** , 1067.
- [14] Arens J. F. , 1955, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* , **74** , 769.

- [15] Wieland, T. , Kern, W. . and Sehring, R. , 1950, *Liebigs Ann. Chem.* , **569**, 117;
Wieland, T. , and Sehring, R. , 1950, *Liebigs Ann. Chem.* , **569**, 122.
- [16] Bodanszky, M. . and Tolle, J. C. , 1977, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **10**, 380.
- [17] Leplawy, M. T. , Jones, D. S. , Kenner G. W. . and Sheppard, R. C. , 1960, *Tetrahedron* , **11**, 39.
- [18] Zaoral, M. , 1959, *Angew. Chem.* , **71**, 743. ; Zaoral, M. , 1959, *Coll. Czech. Chem. Commun.* , **27**, 1273.
- [19] Bodanszky, M. , 1984, *Principles of Peptide Synthesis*. Springer Verlag, Berlin.
- [20] Weygand, F. . Huber, P. , and Weiss, K. , 1967, *Z. Naturforsch.* , **22b**, 1084;
Weygand, F. , and di Bello, C. , 1969, *Z. Naturforsch.* , **24b**, 314.
- [21] Schussler, H. , and Zahn, H. , 1962, *Chem. Ber.* , **95**, 1076.
- [22] Chen, F. M. F. , Kuroda, K. . and Benoiton, N. L. , 1978, *Synthesis*, 928.
- [23] Heimer, E. P. , Chang, C. D. , Lambros, T. , and Meienhofer, J. , 1981, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **18**, 237.
- [24] Brenner, M. , 1967, *In Peptides, Proceedings of the Eighth European Peptide Symposium*,
ed. Beyerman, H. C. , Van de Lind, A. , and Massen van den Brink, W. , North-
Holland, Amsterdam, 1.
- [25] Gordon, M. , Miller, J. G. , and Day, A. R. , 1948, *J. Amer. Chem. Soc.* , **70**,
1946; Gordon, M. , Miller, J. G. , and Day, A. R. , 1949, *J. Amer. Soc.* , **71**,
1245.
- [26] Ressler, C. . and du Vigneaud, V. , 1954, *J. Amer. Chem. Soc.* , **76**, 3107.
- [27] Bodanszky, M. , and Bath, R. J. , 1969, *Chem. Commun.* , 1259.
- [28] Bodanszky, M. , Scelke, M. , Tomorkeny, E. , and Weisz, E. , 1959, *Chem. Ind.* ,
1517; Bodanszky, M. , Scelke, M. , Tomorkeny, E. , and Weisz, E. , 1957, *Acta Chm. Acad. Sci. Hung.* , **10**, 335.
- [29] Bodanszky, M. . and du Vigneaud, V. , 1959, *Nature* , **183**, 1324; Bodanszky,
M. , and du Vigneaud, V. , 1959, *J. Amer. Chim. Soc.* , **81**, 5688.
- [30] Bodanszky, M. , Meienhofer, J. and du Vigneaud, V. , 1960, *J. Amer. Chem.
Soc.* , **82**, 3195.
- [31] Nicolaides, E. D. , and De Wald, H. A. , 1961, *J. Org. Chem.* , **26**, 3872.

- [32] Bodanszky, M. , and Williams, N. J. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 685; Bodanszky, M. , Ondetti, M. A. , Levine, S. D. , and Williams, N. J. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 6753.
- [33] Mutt, V. , Jorpes, J. E. , and Magnusson, S. , 1970, *European J. Biochem.* , **15**, 513.
- [34] Elliott, D. F. , and Russel, D. W. , 1957, *Biochem. J.* **66**, 49P.
- [35] Rothe, M. , and Kunitz, F. W. , 1957, *Leibigs Ann. Chem.* , **609**, 88.
- [36] Bodanszky, M. , and du Vigneaud, V. , 1962, *Biochem. Preparations* , **9**, 110.
- [37] Bodanszky, M. , and Martinez, J. , 1983, *The Peptides*, ed. Gross, E. , and Meienhofer, J. , Academic Press, New York, Vol. **5**, 111.
- [38] Bodanszky, M. , 1979, *The Peptides*, ed. Griss, E. , and Meienhofer, J. , Academic Press, New York, Vol. **1**, 105.
- [39] Farrington, J. A. , Kenner, G. W. , and Turner, J. M. , 1955, *Chem. Ind.* , 501.
- [40] Kovacs, J. , Kisfaludy, L. , and Ceprini, M. Q. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 183.
- [41] Kupryszewski, G. , 1961, *Rocz. Chem.* , **35**, 595; Kupryszewski, G. , *Chem. Abstr.* , **55**, 27121.
- [42] Merrifield, R. B. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 2149.
- [43] Bodanszky, M. , and Sheehan, J. T. , 1964, *Chem. In.* , 1423; Bodanszky, M. , and Funk, K. W. , 1973, *J. Org. Chem.* , **38**, 1296.
- [44] Bodanszky, M. , Denning, F. S. , Jr. , and du Vigneaud, V. , 1963, *Biochem. Preparations* **10**, 122.
- [45] Gish, D. T. , Katsoyannis, P. G. , Hess, G. P. , and Stedman, R. J. , 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* , **78**, 5954; Ressler, C. , 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* , **78**, 5956.
- [46] Bodanszky, M. , Fink, M. L. , Funk, K. W. , Kondo, M. , Lin, C. Y. , and Bodanszky, A. 1974, *J. Amer. Chem. Soc.* , **96**, 2234.
- [47] König, W. , and Geiger, R. , 1973, *Chem. Ber.* , **106**, 36.
- [48] Pless, J. , and Boissonnas, R. A. , 1963, *Helv. Chim. Acta* , **46**, 1609.
- [49] Schwyzler, R. , Feurer, M. , Iselin, B. , and Kagi, H. , 1955, *Helv. Chim. Acta* ,

- 38, 80; Iselin, B. , Feurer , M. , and Schwyzer, R. , 1955, *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1508.
- [50] Mazur, R. H. , 1963, *J. Org. Chem.* , **28**, 2498; Wieland, T. , and Vogeler, K. , 1964, *Liebigs Ann. Chem.* , **680**, 125.
- [51] Beyerman, H. C. , and Massen, van den Brink, W. , 1963, *Proc. Chem. Soc.* , London, 266; Beyerman, H. C. , Massen, van den Brink, W. , Weygand, F. , Prox, A. , Konig, W. , Schmeidhammer, L. , and Nintz, E. , 1965, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **84**, 213.
- [52] Bodanszky, M. , and Bodanszky, A. , 1984, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **24**, 563.
- [53] Anderson, G. W. , Zimmermann, J. E. , and Callahan, F. M. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 3069. ; Anderson, G. W. , Zimmermann, J. E. , and Callahan, F. M. , 1964, *J. Amer. Chem. Soc.* , **86**, 1839.
- [54] Netkens, G. H. L. , and Tesser, G. I. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc.* , **83**, 1263.
- [55] Weygand, F. , Hoffmann, D. , and Wunsch, E. , 1966, *Z. Naturforsch.* 21b, 426; Wunsch, E. , and Drees, F. , 1966, *Chem. Ber.* , **99**, 110.
- [56] Konig, W. , and Geiger, R. , 1970, *Chem. Ber.* , **103**, 788; Konig, W. , and Geiger, R. , 1970, *Chem. Ber.* , **103**, 2024; Konig, W. , and Geiger, R. , 1970, *Chem. Ber.* , **103**, 2034.
- [57] Iton, M. , 1973, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* , **46**, 2219.
- [58] Bodanszky, M. , 1960, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88**, 655.
- [59] Muramatsu, I. , Hirabayashi, T. , and Hagitani, A. , 1963, *Nippon Kagaku Zasshi*, **84**, 855; Muramatsu, I. , Hirabayashi, T. , and Hagitani, A. , *Chem. Abstr.* **60** , 12100c.
- [60] Rink, H. , and Riniker, B. , 1974, *Helv. Chim. Acta.* , **57**, 831.
- [61] Belleau, B. , and Malek, G. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc.* , **90**, 1651.
- [62] Bodanszky, M. , Tolle, J. C. , Gardner, J. D. , Walker, M. D. , and Murt, V. , 1980, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **16**, 402.
- [63] Kiso, Y. , Kai, Y. , and Yajima, H. , 1973, *Chem. Pharm. Bull.* , **21**, 2507.
- [64] Woodward, R. B. , and Olofson, R. A. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc.* , **83**, 1007; Woodward, R. B. , Olofson, R. A. , and Mayer, H. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc.* ,

83, 1010.

- [65] Stevens, C. L., and Munk, M. E., 1958, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 4065;
Stevens, C. L., and Munk, M. E., 1958, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 4069.
- [66] Medzihradszky—Schweiger, H., and Medzihradszky, K., 1966, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **50**, 339.
- [67] Kuromizu, K., and Meienhofer, J., 1974, *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 4978; Felix, A. M., Jimenez, M. H., Mowles, T., and Meienhofer, J., 1980, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **11**, 329.
- [68] Sifferd, R. H., and du Vigneaud, V., 1935, *J. Biol. Chem.*, **108**, 753.
- [69] Ben Isahai, D., and Berger, A., 1952, *J. Org. Chem.*, **17**, 1564.
- [70] Carpino, L. A., and Han, G. Y., 1970, *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 5748;
Carpino, L. A., and Han, G. Y., 1972, *J. Org. Chem.*, **37**, 3404.
- [71] Atherton, E., Bury, C., Sheppard, R. C., and Williams, B. J., 1979, *Tetrahedron Lett.*, 3041; Martinez, J., Tolle, J. C., and Bodanszky, M., 1979, *J. Org. Chem.*, **44**, 3596.
- [72] Carpino, L. A., 1957, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 98; Carpino, L. A., 1957, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 4427; McKay, F. C. and Albertson, N. F., 1957, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 4686; Anderson, G. W., and McGregor, A. C., 1957, *J. Amer. Soc.*, **79**, 6180.
- [73] Kappeler, H., and Schwyzler, R., 1961, *Helv. Chem. Acta*, **44**, 1136.
- [74] Schwyzler, R., and Kappeler, H., 1963, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1550.
- [75] Schwyzler, R., and Sieber, P., 1963, *Nature*, **199**, 172.
- [76] Barany, G., and Merrifield, R. B., 1977, *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 7353.
- [77] Sakakibara, S., and Shimonishi, Y., 1965, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **38**, 1412.
- [78] Sieber, P., and Iselin, B., 1968, *Helv. Chim. Acta*, **51**, 614; Sieber, P., and Iselin, B., 1968, *Helv. Chim. Acta*, **51**, 622.
- [79] Riniker, B., Kamber, B., and Sieber, P., 1975, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1086.
- [80] Bodanszky, M., Bednarek, M. A., and Bodanszky, A., 1982, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **20**, 387.
- [81] Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., and Sheppard, R. C., 1978, *J. Chem. Soc.*

- Chem. Commun.* , 539; Chang, C. D. , and Meienhofer, J. , 1975, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **11**, 246; Chang, C. D. , Felix, A. M. , Jimenez, M. , and Meienhofer, J. , 1980, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **15**, 485.
- [82] Bodanszky, M. , Tolle, J. C. , Gardner, J. D. , Walker, M. D. , and Mutt, V. , 1980, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **16**, 402.
- [83] Bodanszky, M. , Tolle, J. C. , Bednarek, M. A. , and Schiller, P. W. , 1981, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **17**, 444.
- [84] Bodanszky, A. , Bodanszky, M. , Chandramouli, N. , Kwei, J. Z. , Martinez, J. , and Tille, J. C. , 1980, *J. Org. Chem.* , **45**, 72.
- [85] Schnabel, E. , Klostermeyer, H. and Berndt, H. , 1971, *Liebigs Ann. Chem.* , **749**, 90.
- [86] Ragnarsson, U. , Kalsson, S. , and Lindeberg, G. , 1970, *Acta Chem. Scand.* , **24**, 2821.
- [87] Klausner, Y. S. , and Bodanszky, M. , 1973, *Biorg. Chem.* , **2**, 354.
- [88] Bodanszky, M. , and Bodanszky, A. , 1981, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **23**, 565.
- [89] Lundt, B. F. , Johansen, N. L. , Volund, A. , and Markussen, J. , 1978, *Int. Peptide Protein Res.* , **12**, 258.
- [90] Bodanszky, M. , and Bodanszky, A. , 1985, *Proc. 18th European Peptide Symp.* , ed. Ragnarsson, U. , Almqvist and Wiksell, Stockholm, 101.
- [91] Bodanszky, M. , and Bodanszky, A. , 1967, *Chem. Commun.* , 591.
- [92] Bodanszky, M. , and Bath, R. J. , 1968, *Chem. Commun.* , 766.
- [93] Weygand, F. , and Steglich, W. , 1959, *Z. Naturforsch.* , **14b**, 472.
- [94] Bodanszky, M. , 1969, *Peptides 1968*, ed. Bricas, E. , North-Holland, Amsterdam, 150.
- [95] Meienhofer, J. , Cotton, R. , and Atherton, E. , 1973, *Peptides 1971*, ed. Nesvadba, H. , North-Holland, Amsterdam, 60.
- [96] Helferich, B. , and Grunert, M. H. , 1940, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* , **73**, 1131.
- [97] Goerdeler, J. , and Holst, A. , 1959, *Angew. Chem.* , **71**, 775.
- [98] Halpern, B. , and Nitecki, D. E. , 1967, *Tetrahedron Lett.* , 3031.
- [99] Fletcher, G. A. , Low, M. , and Young, G. T. , 1973, *J. Chem. Soc. Perkin I*,

- [100] Taschner, E. , Blotny, G. , Bator, B. , and Wasieleski, C. , 1964, *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chem.* , **12**, 755.
- [101] Fisher, E. , and Warburg, O. , 1905, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* , **38**, 3997.
- [102] Yajima, H. , and Fujii, N. , 1983, *The Peptides*, ed. Gross, E. and Meienhofer, J. . Academic Press, New York, Vol. **5**, 65.
- [103] Tun—Kyi, A. , 1978, *Helv. Chim. Acta*, **61**, 1086.
- [104] Crane, C. W. , and Rydon, H. N. , 1947, *J. Chem. Soc.* , 766.
- [105] Mamalis, P. , and Rydon, H. N. , 1955, *J. Chem. Soc.* , 1049.
- [106] Tesser, G. I. , and Balvert-Greers, I. C. , 1975, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **7**, 295.
- [107] Bednarek, M. A. , and Bodanszky, M. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **21**, 198.
- [108] Bodanszky, M. , and Bednarek, M. A. , 1982, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **20**, 434.
- [109] Pimlott, P. J. E. , and Young, G. T. , 1958, *Proc. Chem. Soc.* , 257.
- [110] Brownlee, P. J. E. , Cox, M. E. , Handford, B. O. , Marsden, J. C. , and Young, G. T. , 1964, *J. Chem. Soc. C*, 3832.
- [111] Veber, D. F. , Milkowski, J. D. , Varga, S. L. , Denkwalter, R. G. , and Hirschmann, R. , 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* , **94**, 5456.
- [112] Bodanszky, M. , Stahl, G. L. , and Curtis, R. W. , 1975, *J. Amer. Chem. Soc.* , **97**, 2857.
- [113] Kurath, P. , 1976, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1127.
- [114] Callahan, F. M. , Anderson, G. W. , Paul, R. , and Zimmerman, J. E. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 201.
- [115] Pastuszak, J. J. , 1977, *Roczniki Chem.* , **51**, 1567.
- [116] Klausner, Y. S. , Mutt, V. , and Bodanszky, M. , 1972, *Biorg. Chem.* , **2**, 78.
- [117] Fujii, T. , and Sakakibara, S. , 1974, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* , **47**, 3146.
- [118] Brown, T. , and Jones, J. H. , 1981, *Chem. Soc. Chem. Commun.* , 648.
- [119] Schroder, E. , 1964, *Liebigs Ann. Chem.* , **670**, 127.

- [120] Kisfaludy, L. , 1979, *Peptides 1978*, ed. Siemion, I. Z. , and Kupryszewski, G. , Wroclaw University Press, Wroclaw, 25.
- [121] Low, M. , and Kisfaludy, L. , 1979, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* , **360**, 13.
- [122] Chorev, M. , and Klausner, Y. S. , 1976, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 596.
- [123] Roeske, R. W. , 1981, *The Peptides*, ed. Gross, E. , and Meienhofer, J. , Academic Press, New York, Vol. 3, 102.
- [124] Nishimura, O. , and Fujino, M. , 1976, *Chem. Pharm. Bull.* , **24**, 1568.
- [125] Yajima, H. , Takeyama, M. , Kanaki, J. , and Mitani, K. , 1978, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 482.
- [126] Bodanszky, M. , Ondetti, M. A. , Birkhimer, C. A. , and Thomas, P. L. , 1964, *J. Amer. Chem. Soc.* , **86**, 4452.
- [127] Weygand, F. , and Csendes, E. , 1952, *Angew. Chem.* , **64**, 136.
- [128] Goldberger, R. F. , and Anfinsen, C. B. , 1962, *Biochemistry* , **1**, 401.
- [129] Iselin, B. , 1961, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 61.
- [130] Bodanszky, M. , Bednarek, M. A. , 1982, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **20**, 408.
- [131] Bodanszky, M. , and Ondetti, M. A. , 1966, *Peptide Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, 161.
- [132] Bodanszky, M. , Bednarek, M. A. , Bodanszky, A. , and Tolle, J. C. , 1981, *Peptides 1980*, ed. Brunfeldt, K. , Scriptor, Copenhagen, 93.
- [133] Romovacek, H. , Dowd, S. R. , Kawaski, K. , Nishi, N. , and Hofmann, K. , 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* , **101**, 6081.
- [134] Kovacs, J. , Ceprini, M. Q. , Dupraz, C. A. , and Schmidt, G. N. , 1967, *J. Org. Chem.* , **32**, 3696.
- [135] Anderson, G. W. , and Callahan, F. M. , 1958, *J. Amer. Chem. Soc.* , **80**, 2902.
- [136] Bodanszky, M. , and Conklin, L. E. , 1967, *Chem. Commun.* ,
- [137] Bodanszky, M. , 1971, *Prebiotic and Biochemical Evolution*, ed. Wimbball, A. P. and Oro, J. , North-Holland, Amsterdam, 217.
- [138] Yajima, H. , and Fujii, N. , 1980, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 115.
- [139] Ji, A. X. , and Bodanszky, M. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **22**, 590.
- [140] Barany, G. , and Merrifield, R. B. , 1980, *The Peptide*, ed. Gross, E. and Meien-

- hofer, J. , Academic Press, New York, Vol. 2, 1.
- [111] Bodanszky, M. , and Sheehan, J. T. , 1966, *Chem. Rev.* , 1597.
- [112] Wang, S. S. , 1973, *J. Amer. Chem. Soc.* , **95** , 1328.
- [113] Bodanszky, M. , and Fagan, D. T. , 1977, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **10** , 375.
- [114] Stewart, F. H. C. , 1968, *Australian J. Chem.* , **21** , 1639.
- [115] Sheppard, R. C. , and Williams, B. J. , 1982, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 587.
- [116] Kiso, Y. , Ukawa, K. , and Akita, T. , 1980, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 103.
- [117] Bodanszky, M. , and Bodanszky, A. , 1984, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **23** , 287.
- [118] Barton, M. A. , Lemieux, R. U. , and Savoie, J. Y. , 1973, *J. Amer. Chem. Soc.* , **95** , 4501.
- [119] Fridkin, M. , Patchornik, A. , and Katchalski, E. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc.* , **87** , 4646; Fridkin, M. , 1980, *The Peptides*, ed. Gross, E. and Meienhofer, J. , Academic Press, New York, Vol. 2, 333.
- [120] Shemyakin, M. M. , Ovchinnikov, Y. A. , Kiryushkin, A. A. , and Kozhevnikova, I. V. , 1965, *Tetrahedron Lett.* , 2323.
- [121] Mutter, M. , and Bayer, E. , 1972, *Nature* , **237** , 512.
- [122] Mutter, M. , and Bayer, E. , 1980, *The Peptides*, ed. Gross, E. and Meienhofer, J. , Academic Press, New York, Vol. 2, 285.
- [123] Diaz, J. , Guegan, R. , Beaumont, M. , Benoit, J. , Clement, J. , Fauchard, C. , Galtier, D. , Millan, J. , Muneaux, C. , Muneaux, Y. , Vedel, M. , and Schwyzer, R. , 1979, *Biorg. Chem.* , **8** , 429.
- [124] Bodanszky, M. , Kondo, M. , Yang, L. C. , and Sigler, G. F. , 1974, *J. Org. Chem.* , **39** , 444.
- [125] Bodanszky, M. , Funk, K. W. , and Fink, M. L. , 1973, *J. Org. Chem.* , **38** , 3565.
- [126] Bodanszky, M. , 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **25** , 449.

第三章 多肽立体化学

蛋白质化学家在澄清蛋白质三维结构中不断获得成功,已经深入到这些天然体系的螺旋、 β -折叠及其它非螺旋序列的共存状态,例如鲸鱼肌红蛋白 70% 以上的区域为 α -螺旋。在研究过的绝大多数其它蛋白中,螺旋结构的百分数则小得多。1969 年发现了固态胰岛素的复杂的立体结构,该分子是由两个锌原子连接的三个折叠的一级胰岛素结构的二聚链组成。

采用模型系统进行研究,可以得到对蛋白质的立体化学有贡献的实质性理解。合成多肽为确定与蛋白质的结构和功能有关的构象及相互作用,提供了颇具吸引力的途径。

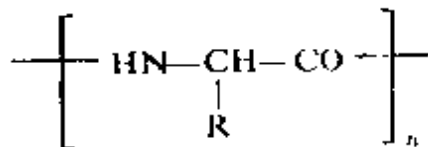
尖端仪器的开发,使有能力解答难以捉摸的立体化学问题。例如,能够考虑螺旋多肽在肽键的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁中缺色性的根源。开始理解到,当多肽是有规立构时,酰胺的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁加强。立体化学家能通过核磁共振观察质子的非常详细的环境差异,通过核磁共振,能够小心地研究螺旋-盘绕转变及解析构象性质。

本章主要论述动态和静态观念上的结构、结构测定方法和以预测最可能的构象为目标的计算。

一、螺旋多肽

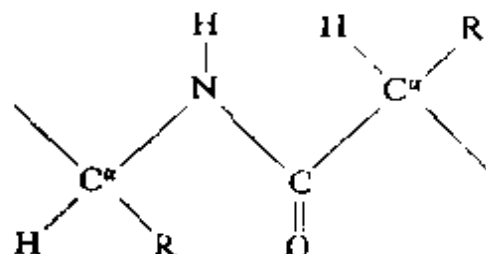
螺旋结构是蛋白质、核酸、多糖及许多合成多肽的共同结构特征。研究模型多肽在固态和溶液中的螺旋结构,对明确解释在纤维蛋白和球蛋白的构象研究中得出的结论具有重要意义。

多肽是由 α -氨基酸按下面的通式组成的聚酰胺，其中 R 是 α -氨基酸中的侧链：



根据下面的基本假定，Pauling 和 Corey^[1, 2] 设想 α -螺旋是折叠多肽比较稳定的二级结构之一：

① 多肽残基是反式共平面构象；



② 键中的残基都是立体化学等价的；

③ 各个肽的 C=O 和 N-H 基形成氢键，N-H...O 原子接近线性排布；

④ N-H...O 键长大约为 2.75 Å，羰基和氨基的线性排布与螺旋轴构成 12 度角。

于是， α -螺旋的每一圈有 3.7 个氨基酸残基，键内的 NH 和 CO 基团间形成氢键，四个残基相隔形成 13 元环。残基沿轴平移（每个残基的最高值）1.5 Å，螺距为 5.4 Å。

这种 α -螺旋亦称作 3.7₁₃ 螺旋，既可以是左手螺旋，也可以是右手螺旋。当由光学活性的残基构成时，这两种螺旋则是产生不同的 X 射线衍射参数的不同结构。

早年通过 X 射线衍射研究合成聚谷氨酸- γ -苄酯、聚谷氨酸- γ -甲酯^[3-5]以及聚-L-丙氨酸^[6-10]，证实了 α -螺旋的存在。这些高

聚物的 X 射线照片显示了一个很强的, 具有 1.5 \AA 间隔的子午(正切)反射, 这恰好对应于 α -螺旋中的残基平移。所谓残基平移是从任一个残基向后一个残基延伸过程中, 螺旋上升的高度。后来研究聚-L-丙氨酸及几种其它多肽的 X 射线衍射, 确证了 α -螺旋结构^[11-16]。一般地说, 当观察到对应于 5.4 \AA 的层线和 $1.47-1.50 \text{ \AA}$ 的子午(正切)纹理时, 就可以合理地假定 α -螺旋的存在。

多肽最普遍的二级结构(α -螺旋)并非实验中发现的唯一螺旋构象。在热处理过的聚天冬氨酸- β -苄酯的纤维中^[16], 在聚- δ -苄基-L-半胱氨酸^[17]的定向膜中, 和在聚天冬氨酸- β -苄酯/间甲基酚液晶溶液^[18]中, 观察到一种不同类型的螺旋, 即所谓的 ω -螺旋, 每圈含四个氨基酸残基, 轴向平移为 1.325 \AA , 螺距为 5.3 \AA 。由于空间效应造成的多肽单元偏离平面的角度约 5° , 这与后来发现的不允许有平面肽单元的 ω 型相符。实质上, ω -螺旋是扭曲的 α -螺旋。在这种扭曲的 α -螺旋中, 只有通过放宽氢键线型度的要求和肽单元平面度的要求, 才能获得稳定的结构, 这种结构显然不如 α -螺旋稳定。

原则上, 刚性结构(如螺旋)及其在溶液中的构象变化常采用紫外吸收(UV)、旋光色散(ORD)和圆二色散(CD)进行研究。

二、紫外吸收研究

多肽由处于不对称环境中的酰胺发色团构成。在紫外光谱区, 酰胺显示数种电子跃迁^[21-30]。根据后来对酰胺图谱的解释, 在 $150-220\text{nm}$ 波长范围内发现有四个峰, 该区域的电子吸收谱和计算的酰胺发色团的单一轨道的能量水平, 描绘在图 3.1 以及图 3.2^[31-33]中。由于多肽的紫外光谱研究未扩展到低于 185nm , 故

有意义的酰胺跃迁是：

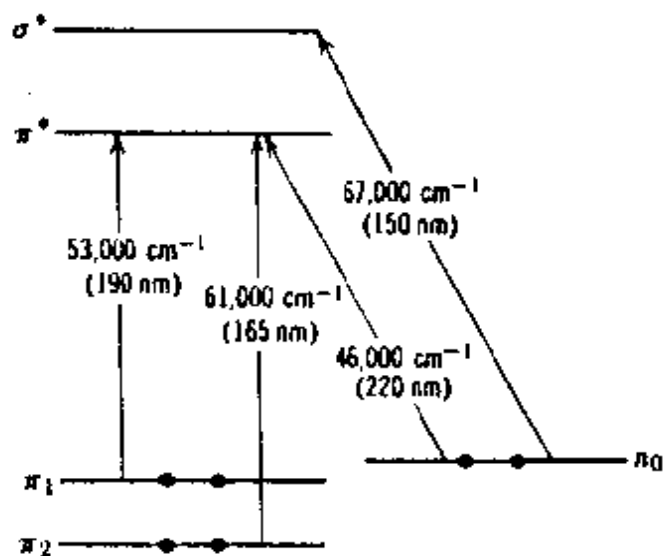


图 3.1 以简单酰胺跃迁为基础的酰胺发色团的电子跃迁性质

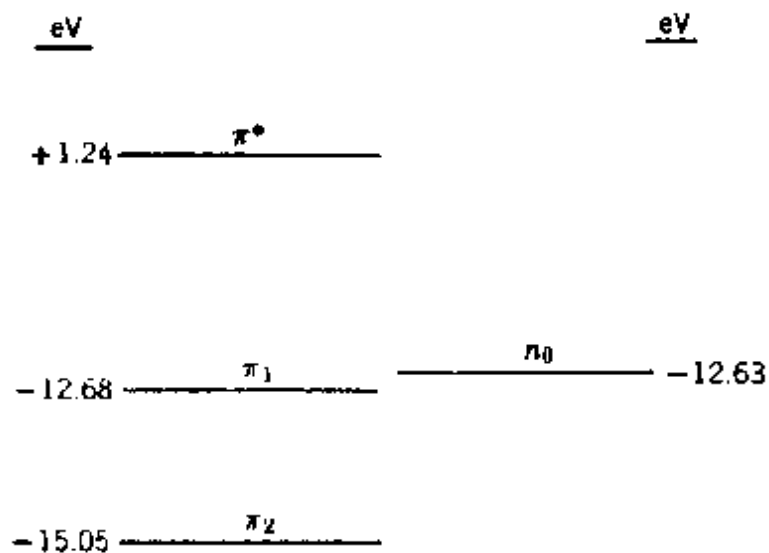


图 3.2 酰胺发色团的单…轨道

① 在大约 220nm 处弱的 $n_0 \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁，这包括来自酰胺氧的 $2p_y$ 孤对电子轨道的激发；

(2) $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 该跃迁与大约 190nm 处的强峰相联系。

图 3.3 说明了酰胺基的分子轨道, 表示了包括酰胺的一些最简单的原子轨道的线性组合(LCAO)波函数的对称关系。

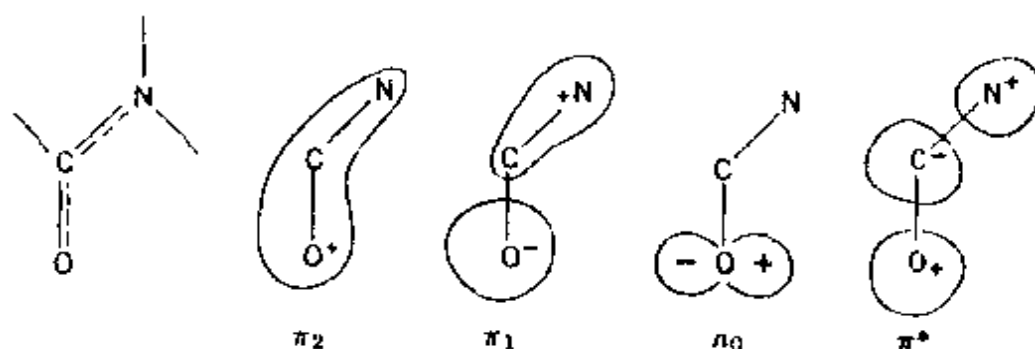


图 3.3 酰胺基的分子轨道 π 轨道只显示了上半叶

根据峰的低强度, 根据它的频率从非极性脂肪溶剂到极性羟基溶剂发生迁移, 根据它的旋光色散和圆二色散谱, 220nm 处的峰被指定为 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁^[33, 34, 40]。

根据把 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁置于 170—190nm 区域的理论, 190nm 处的最高能量峰指定为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 它的极化方向非常接近测到的十四酰胺的极化方向。 $\pi \rightarrow \pi^*$ 峰的确切位置取决于酰胺氮上的烷基取代基数目, 并按酰胺、肽、N, N-二取代酰胺的顺序向高波长移动^[28, 29]。在简单的 N 取代酰胺的紫外光谱中, 观察到了位于 220nm 和 170—195nm 峰中央的中等强度的峰^[28, 29, 41]。该峰普遍出现于酰胺之中, 频率恰好低于 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁峰, 被指定为 $\pi \rightarrow \text{CHO}^*$ 跃迁。根据甲酰胺的计算, Basch 和同事们的结论是, 酰胺中的这个接近 220nm 的新峰包括一个 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁^[28] (注: $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁中激发的 σ^* 轨道在总体上几乎都是由 C, N 和 O 上的 Rydberg 轨道, 即由高量子数的原子轨道组成的分子轨道所组成)。由于多肽的波函数和激发态来自它的酰胺组分发色团的波函数和激发

态，所以在解释远紫外长波区域的光谱时必须给予注意。对于溶液中肽链的各片段恒定运动的随机盘绕的多肽来说，预计它的紫外光谱特征应与简单 N 取代酰胺相同。在呈 α -螺旋构象的长链多肽中，紫外光谱显示的特征明显与简单 N 取代酰胺不同，也不同于随机盘绕多肽和 β 构象多肽的紫外特征。图 3.4 是聚-L-赖氨酸的盐酸盐在水溶液中的螺旋构象(helix)、随机盘绕(random coil)和 β 构象的紫外光谱^[42]。三种结构的存在取决于水溶液的 pH 和温度。可供识别螺旋多肽的紫外光谱特征包括：

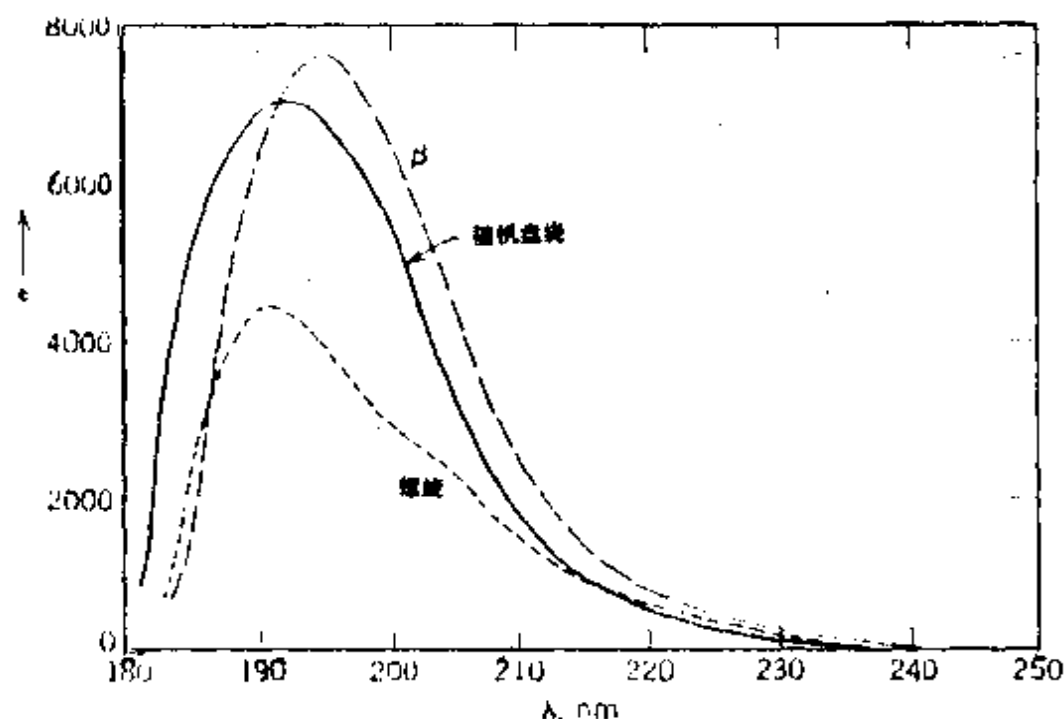


图 3.4 聚-L-赖氨酸的 UV 谱

25 C: 随机盘绕 pH 6.00; 螺旋构象 pH 10.8; β -构象 pH 10.8

① 在接近 190nm 处有一最大的强吸收，接着是在接近 206nm 处有一个确定的肩峰。

② 与随机盘绕和 β 构象的对应峰相比较，接近 190nm 处的

峰有一明显的缺色性。

190nm 处的最大吸收和 206nm 处的肩峰与螺旋排列中肽发色团的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁的激发子裂分相联系⁽³¹⁾。由于它在讨论中的重要性，有必要简单介绍螺旋结构中肽发色团的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁瞬间的激子共振偶合现象。

现在考虑一个“bimer”(这里使用 bimer 而不是 dimer, 是希望引起对两发色团相互作用的注意)的电子状态。这是由两个相同发色团组成的简单分子, 两发色团 A 和 B 很近似。各孤立的发色团(单体)有两种状态, 一为基态 Φ^0 , 一为激发态 Φ^* 。bimer 的基态为 $\Psi^0 = \Phi_A^0 \Phi_B^0$, 两种激发态为: $\Psi_+ = \Phi_A^0 \Phi_B^* + \Phi_A^* \Phi_B^0$ 和 $\Psi_- = \Phi_A^0 \Phi_B^* - \Phi_A^* \Phi_B^0$ 。这两种激发的 bimer 状态有不同的能量。

在单体中, 只有一个对应于 $\Phi^0 \rightarrow \Phi^*$ 跃迁的吸收峰, bimer 中则出现两个峰, 它们分别对应于 $\Psi^0 \rightarrow \Psi_+$ 和 $\Psi^0 \rightarrow \Psi_-$ 跃迁。

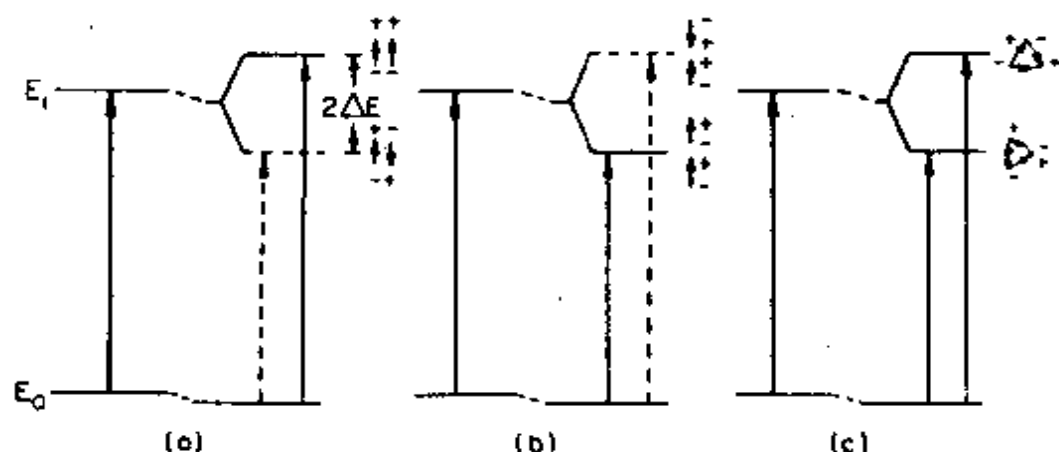


图 3.5 生色二聚体激发裂分的能量水平

(a), (b), (c) 分别对应于螺旋核的边对边, 头对尾和尾对尾的排列; 允许的跃迁以实线表示, 禁阻跃迁以虚线表示

峰裂分的根源可以从图 3.5 的能量水平看出。激发态 Ψ_{\pm}^* 的能量高于单体激发态，因这种激发态的偶极排列是排斥能占优势，而在 Ψ^* 态，偶极排列，能量低于单体激发态。

图中标为 $2\Delta E$ 的峰分裂取决于激发态单体间的静电相互作用强度。从而峰裂分取决于偶极的相对方向和大小。一个“trimer”一般有三种激发的能量水平。而“ n -mer”则有 n 种激发的能量水平，以至于当 n 大时可以形成各种水平的连续峰。

在一个无限长的刚性螺旋中，只允许向偶极距的矢量和不等于零的能量水平发生跃迁。图 3.6 表明了螺旋结构中的偶极取向。在第一种情形里，许多主要是头对尾取向的各偶极的总和是单一沿螺旋轴的偶极。从基态向这种状态的跃迁是沿着螺旋轴极化，并比对应的随机盘绕结构的跃迁处于较长的波长。

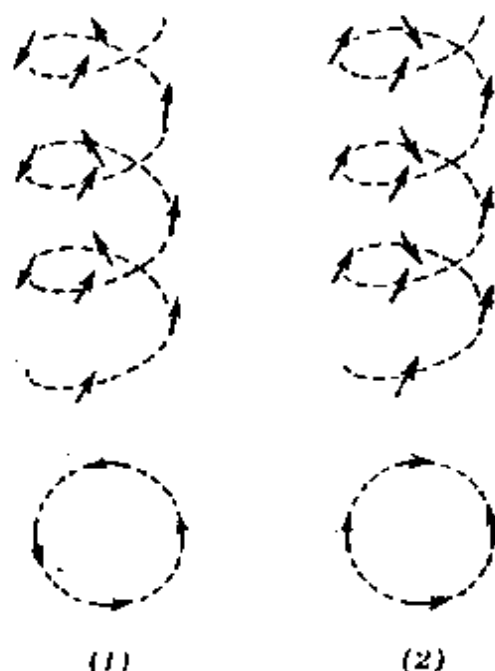


图 3.6 螺旋排列中的偶极取向

在第二种情形里，各偶极(头对头取向)的总和是一个与螺旋

轴垂直的偶极。从基态向这种状态的跃迁是垂直于分子轴极化, 并比对应的随机盘绕结构的跃迁处于较短的波长。这些理论上的预测已被大量实验证实^[24, 43-46]。图 3.7 表示 α -螺旋型的聚-L-谷氨酸- γ -甲酯定向膜的极化的紫外吸收。190nm($\pi \rightarrow \pi^*$)的峰裂分为关于螺旋轴相反极化的两个峰, 低能量处(206nm)的峰平行于螺旋轴极化, 高能量处(190nm)的峰垂直于螺旋轴极化。

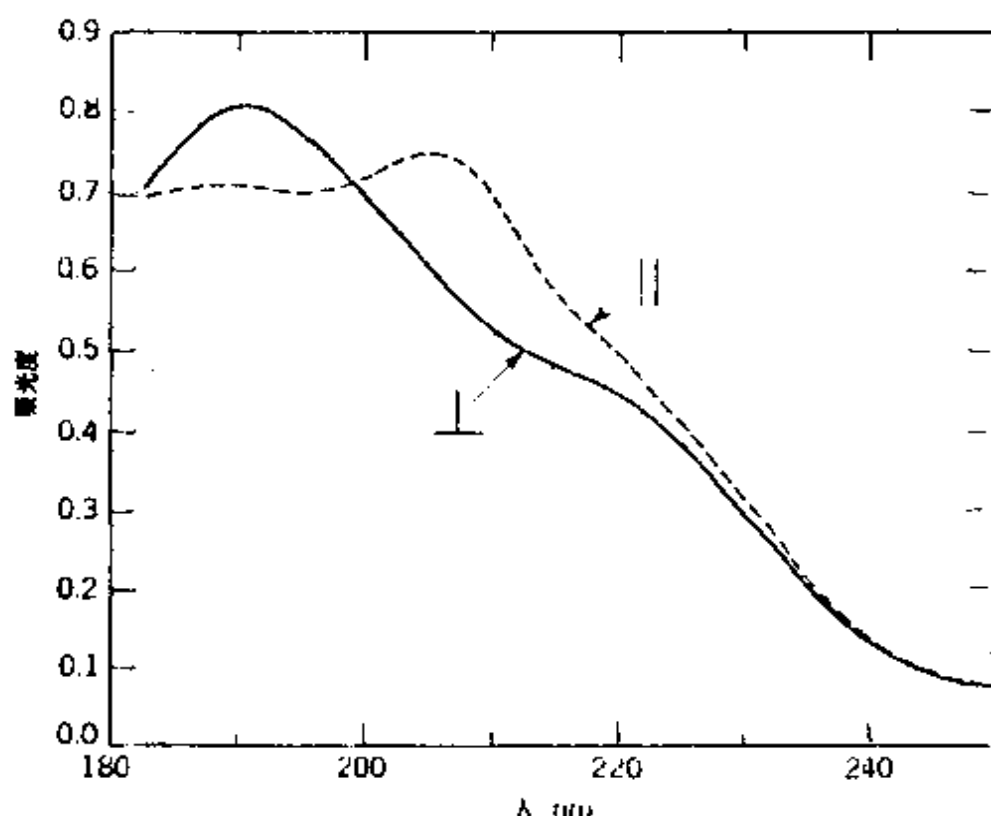


图 3.7 聚-L-谷氨酸- γ -甲酯的 UV 谱

在远紫外区, 定向螺旋多肽的极化的吸收谱不仅显示预测到的极化和强度成比例的峰, 还给出了在大约 222nm 处一个弱的垂直极化峰的证据。该峰被指定为酰胺的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。还从理论上预测到了螺旋多肽紫外吸收光谱中的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁峰的缺色性效

应⁽²⁴⁾。表 3.1 总结了一些螺旋多肽和随机盘绕多肽的克分子残基吸收度。缺色性定义为一群发色团的吸收峰的积分强度小于它的组成部分的总和⁽³¹⁾。它牵涉到螺旋构象中肽发色团的平行配置。缺色性(图 3.8)来自于—残基中最低能量吸收峰的跃迁距与邻接的残基中较高能量跃迁距之间的相互作用。

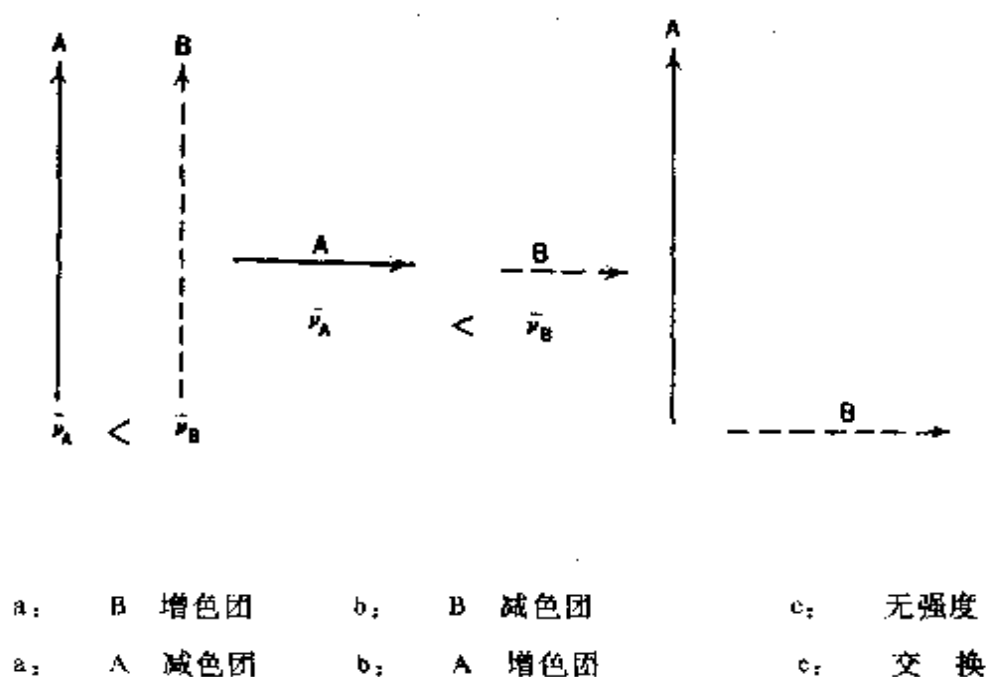


图 3.8 有序结构吸收谱中的强度交换

两相邻发色团的相互作用按照跃迁偶极距的安排表述

a. 并列; b. 头接尾; c. 相互垂直; ν_A 和 ν_B 代表两个激子的频率

在外消旋聚-L-谷氨酸-γ-甲酯的紫外光谱研究中也观察到了缺色性。该化合物中螺旋构象的含量估计为 90%，这不是高分子多肽的特别现象，也出现在小肽中。小肽的缺色度大小与大肽接近，这一发现意味着把测定 190nm 处的吸收作为评价蛋白质螺旋含量方法的效用。在评价的蛋白质中，一般只有多肽链的短片段保持螺旋结构。

表 3.1 α -螺旋和随机盘绕水溶性多肽的摩尔残基吸收

	摩 尔 吸 收 度				偏振强度
	最大	190nm	197nm	205nm	
C					
1	7100	7000	6550	3500	0.115
2	7100	6900		3300	0.106
平均值		6950		3400	0.1104
3	6350	6350			
α 螺旋					
1	4200	4200	3300	2150	0.0778
2	4400	4400	3500	2300	0.0720
平均值		4300	3400	2200	0.0749

C:随机盘绕; 1:聚-L-谷氨酸; 2:聚-L-赖氨酸(水);

3:聚-L-天冬氨酸

多肽齐聚物的紫外光谱研究提供了开始折叠成螺旋构象必须的氨基酸残基临界数目的重要信息^[47-49]。图 3.9 显示了使用 L-谷氨酸- γ -甲酯和 L-天冬氨酸- β -甲酯齐聚物所得的结果。在 L-谷氨酸- γ -甲酯肽的例子中,集中在 189—190nm 处的吸收峰的缺色性是从九聚体开始的,而且当序列中氨基酸数目多时缺色性的量增大。在 L-天冬氨酸- β -甲酯的例子中,从大约十二聚体开始看到缺色性。由于聚-L-天冬氨酸- β -甲酯左手螺旋对热和螺旋破坏溶剂的稳定性均不如聚-L-谷氨酸- γ -甲酯的螺旋,所以天冬氨酸的齐聚物要形成螺旋构象需要更长的肽链。

在多肽链中,肽发色团离邻接氨基酸残基的手性中心的近度以及它们的相互作用,产生了对构象的不对称依赖及不同于决定游离氨基酸旋转性质的差异。多肽发色团属于一类天生对称的发色团,它需要来源于对它们的环境的不对称干扰的光学活性。分子结构和光学活性间的关系非常棘手,因为微小的结构变化常导

致发色团不对称环境的重大变化。

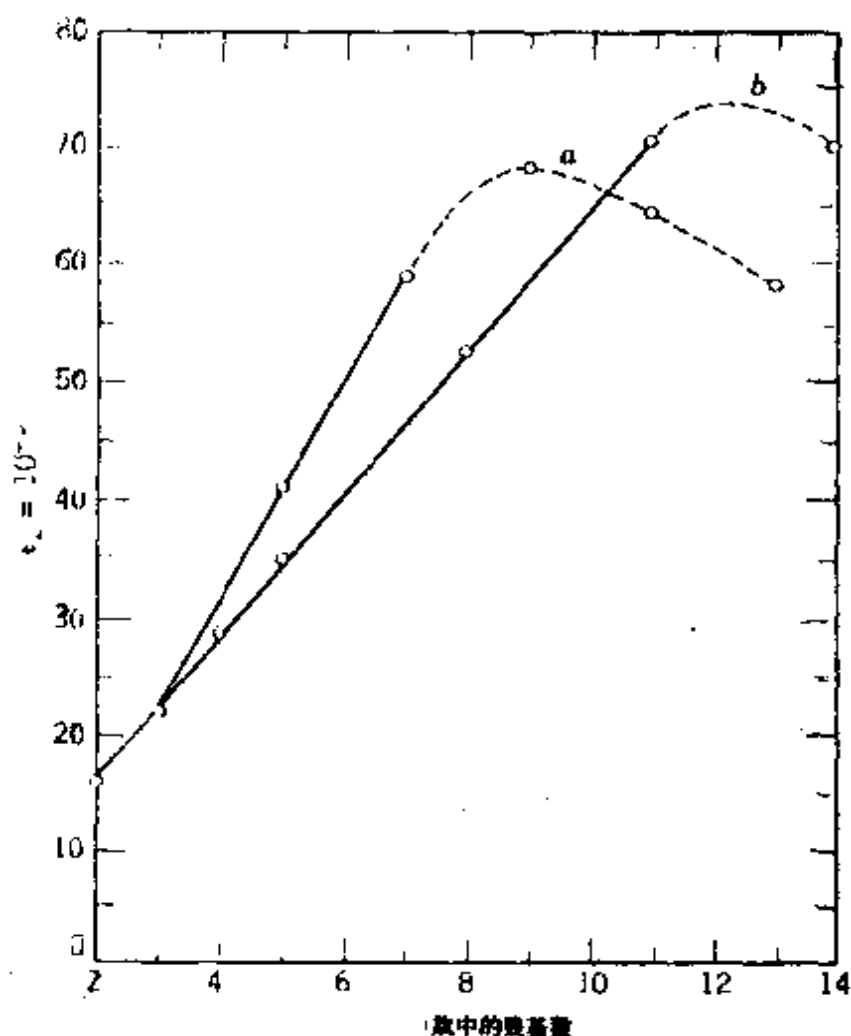


图 3.9 低聚体的总摩尔吸收度是链长的函数

a. 低聚 L-谷氨酸-γ-甲酯 b. 低聚 L-天冬氨酸-β-甲酯

三、旋光色散和圆二色散

在适用于测定远紫外的旋光色散(ORD)和圆二色散(CD)的仪器问世之前,必须用衍生化的旋光色散常数。许多研究人员设

计了光学活性和波长关系的方程^[59-59]，其中最成功的是 Drude 和 Maffitt-Yang 处理。

在远离光学活性电子跃迁(300—600 nm)的谱区，随机盘绕多肽的旋光色散曲线能用一次项 Drude 方程描述：

$$[\alpha]_D = A/(\lambda^2 - \lambda_c^2)$$

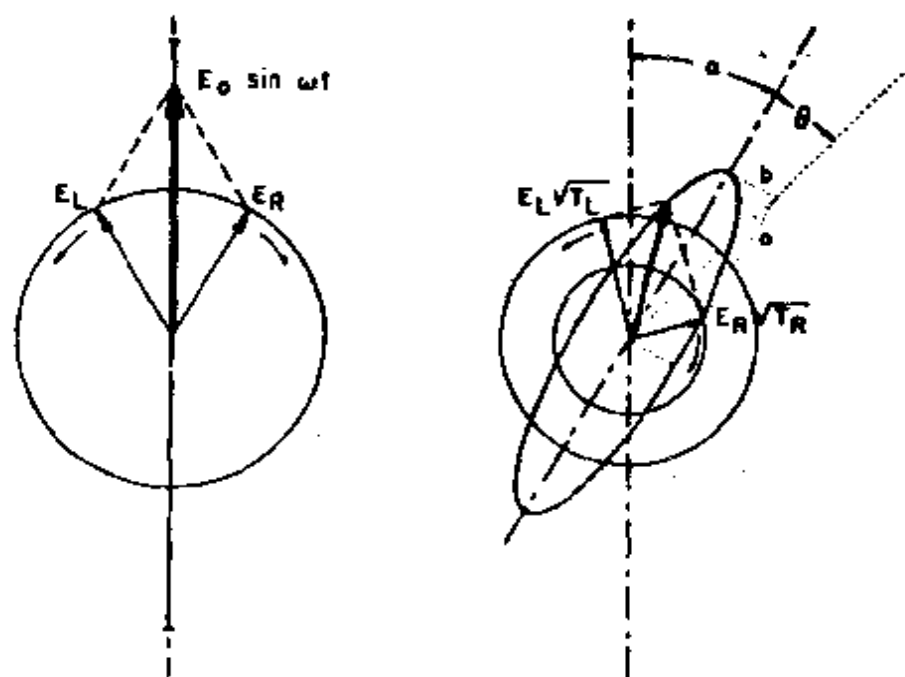
其中 λ 为入射光的波长， λ_c 为光学活性电子跃迁的特征波长， A 为与跃迁的旋光强度有关的常数。这些常数可以根据 $[\alpha]_D \cdot \lambda^2$ 对 $[\alpha]_D$ 的线性作图加以估算。随机盘绕构象下的多肽的 $[\alpha]_D$ 的大小随波长的减小单调增大，且非常符合 Drude 方程。对于螺旋多肽，该方程与观察到的复合色散不符，因为在刚性螺旋排列中，相同发色团的相互作用产生的光学活性电子跃迁对旋光有贡献。正如 Maffitt 假定的，这种相互作用引起个别的发色团的任一跃迁作为一个整体，都被裂分为显示螺旋特征的两个跃迁^[59-61]。

螺旋多肽的复合色散数据符合 Maffitt 和 Yang 假设的两项现象学方程^[60]：

$$[m'] = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

其中 $[m']$ 为每个残基的约简平均旋光度， λ_0 为恒定波长，通常取 212nm， a_0 是由构象和环境效应决定的参数， b_0 仅取决于构象本身。根据 $[m'](\lambda^2 - \lambda_0^2)/\lambda_0^2$ 对 $\lambda_0^2/(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ 作图，由直线斜率得 b_0 ，由直线截距得 a_0 。从前曾广泛采用 b_0 作参数估算多肽和蛋白质的螺旋含量，右手螺旋的 b_0 值为 -630 至 -700，随机盘绕多肽的 b_0 值接近于零。螺旋性的 b_0 值准则不适合于含发色侧链的多肽，如聚-L-酪氨酸、聚-L-苯丙氨酸、聚-L-色氨酸和聚-L-组氨酸。在这些例子中，由于来自侧链的贡献，Maffitt-Yang 参数假定“不规则值”。正如在各种不同的溶剂系统中，对聚-L-谷氨酸-γ-苄酯进行

详尽的研究所证实的, b_0 值也作为溶剂折射率的函数而变化。Maf-fitt 参数的符号能够与螺旋的方向关联, 而且由聚-L-天冬氨酸- β -苄酯在一些溶剂中显示的 +630 左右的正值, 已经与左手螺旋结构关联^(63, 64)。



入射光(线式偏振) 透射光(椭圆偏振)

图 3.10 入射的线式偏振光转化为椭圆偏振光

入射线由电性矢量 $E_0 \cdot \sin \omega t$ 表示, 并分解为相等的右圆偏振光 E_R 和左圆偏振光 E_L 两个组分。 T_R 和 T_L 表示这两个组分的透射比。 $E_R T_R$ 和 $E_L T_L$ 分别表示来自各个圆偏振根据组分的透射电性矢量。

单纯 b_0 的符号不是螺旋方向的安全指标⁽⁶⁵⁾。为了肯定螺旋的方向, 必须制备两种“随机”的共聚物, 一种共聚物有一种氨基酸残基, 它组成的均聚多肽的螺旋方向是已知的, 而另一种含该种氨基酸残基的均聚多肽的螺旋是未知的。 b_0 随共聚物组成的线性

变化,已经得到了两种多肽的螺旋方向相同的证据,而非线性变化则可以与所考虑的两均聚多肽具有相反的螺旋方向相联系^[66-70]。

现在已经有了直接观察多肽和蛋白质紫外 Cotton 效应的仪器,不必再使用象 Maffitt-Yang 方程一类的推理处理。根据 Cotton 效应的观察直接估计螺旋的含量,而不依赖 Drude 和 Maffitt-Yang 常数,因此有许多有利之处,并能更准确地指定结构。在远紫外区记录的 ORD 谱是与电子跃迁相联系的,并可分别确定螺旋构象、伸展构象和无序构象各自的贡献。而且,在 Cotton 效应区看到的非常大的旋光度,增加了测定的灵敏度。

然而 Maffitt 和 Yang 的衍化常数仍然有用,即当远紫外被溶剂吸收搞得含混不清时,方程仍然有效。在完全特征化的体系中,例如来自肌肉的 α -螺旋蛋白,该方程是监测样品的简单而又迅速的方法^[71-73]。

采用 ORD 和 CD 技术,能够合适地鉴别和研究刚性螺旋结构,在这方面已有优秀综述^[74-77]。这里只能涉及两种方法的最基本原理,并说明螺旋构象多肽的 ORD 和 CD 谱。在光学活性化合物的吸收峰中,ORD 和 CD 谱都具有它们的根源,因此,两种现象是密切相关的。

图 3.10 表示光学活性样品对平面偏振光的影响。入射光用电性矢量 $E_0 \cdot \sin \omega t$ 表示,可以分解为左和右圆偏振光两个相等的组分 E_L 和 E_R 。该两组分以不等的速度通过样品,在它们之间产生了被观察为旋光的相位移(图中记作 α)。按照 Fresnel 模型,旋光是由右(n_R)和左(n_L)圆偏振光的折射率的差异造成的:

$$[\Phi]_r = (18M/\rho\lambda)(n_L - n_R)$$

其中 $[\Phi]$ 为克分子旋光(度), M 为分子量, ρ 为密度或浓度(g/

ml), λ 为真空中的波长(cm)。

旋光色散是旋光随波长的变化^[52]。由于样品对这两种组分显示不同的透射比 T_L 和 T_R , 两个圆偏振光组分也经历不同的衰减,

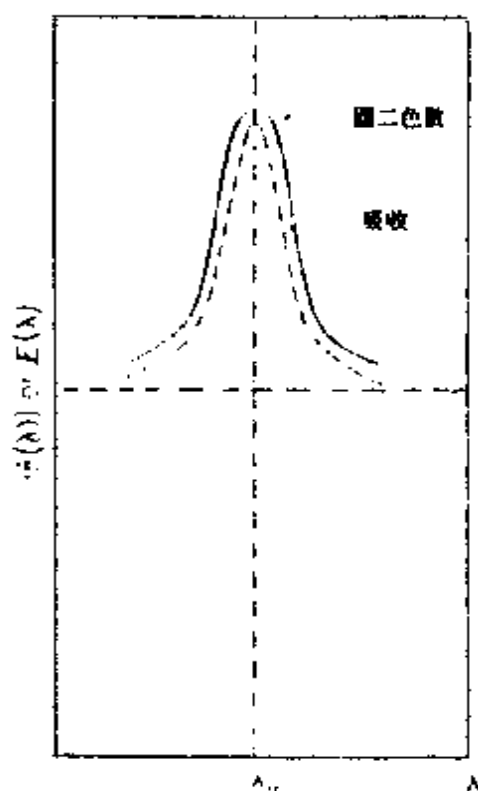


图 3.11 理想化的吸收峰与正圆二色散峰的关系

不等的衰减使光束发生急剧的椭圆极化(图 3.10)。圆二色散可表示为圆偏振组分的吸收差, 与通常的吸收形成对照的是, 圆二色散可以是正, 也可以是负^[78-81]。

复杂分子在溶液中的圆二色散谱一般是由宽峰组成的, 这种宽峰仅仅出现在通常发生吸收的那些波长区域^[82](图 3.11)。旋光随着孤立吸收峰附近的波长按图 3.12 表示的方式变化。

ORD 曲线显示特征峰和每个峰上形成的波谷(结果也显示每个 CD 峰上形成波谷)。这种 CD 现象和它的相联系的色散曲线, 用

术语 Cotton 效应描述。图 3.13 表示典型的正负 Cotton 效应以及 CD 与每个极性的 ORD 之间的关系。该曲线表示在波长 λ_0 的单一孤立光学活性吸收峰，正的或负的 Cotton 效应分别定义为在长波一端是波峰还是波谷。

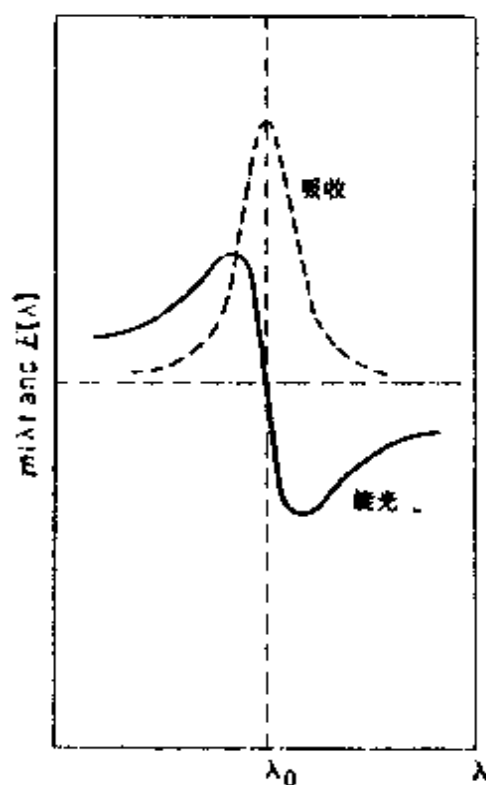


图 3.12 理想化的吸收峰与负旋光色散之间的关系

在 ORD 中，旋光在远离 Cotton 效应的峰和谷的波长下持续。当一个光学活性物质出现几个正的和负的 Cotton 效应时，每个峰都叠加在由其它的尾提供的本底上，这时要精确地确定 ORD 图谱中峰的形状、位置和幅度非常困难，结果只能是结构信息难以澄清。

在 CD 谱中,椭圆峰一般不建立在来自同一分子的同发色团或其它原子的更远吸收峰的本底旋光之上。即使当一系列峰相互挨得很近时,计算机分析常常可以解析峰,可以毫不含糊地指定它们的位置、符号和幅度。

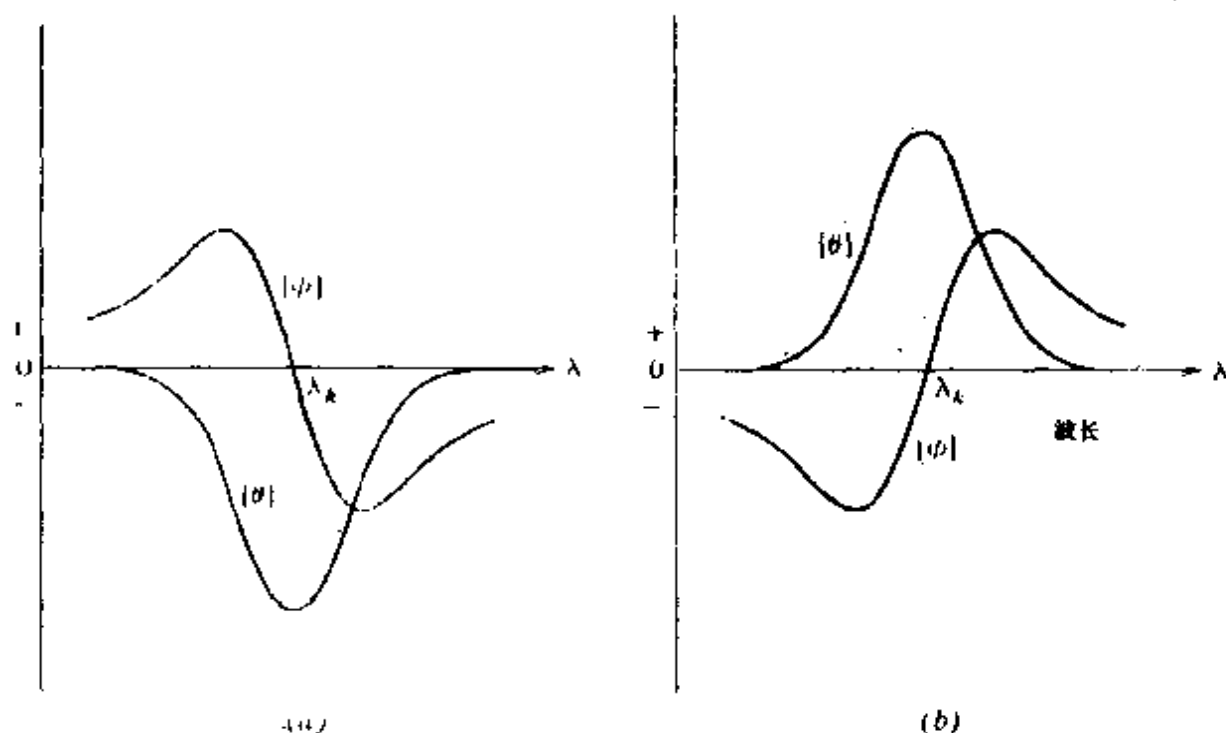


图 3.13 理想化的孤立吸收峰的另一效应

ORD 和 CD 现象之间的密切的对应性可用存在的数学变换 (Kronig-Kramer 色散关系) 加以说明。根据这种关系, 不需要假设峰就可以从 ORD 曲线计算 CD 谱, 反过来也一样。现在考虑螺旋构象多肽的 Cotton 效应^[83]。远紫外区的 ORD 结果表明在 233nm 处, α -螺旋多肽特征地显示一个旋光谷, 在大约 225nm 处显示一个(零旋光)重合点, 在接近 215nm 处有一个肩峰以及 198nm 处一个峰^[52, 71]。谷底处的值, $[m']_{233} = -1500$ 度 $\text{cm}^2/\text{decimole}$, 该值是右手 α -螺旋特有的, 常用作多肽和蛋白质中螺旋含量的量度(图 3.14)^[84-86]。

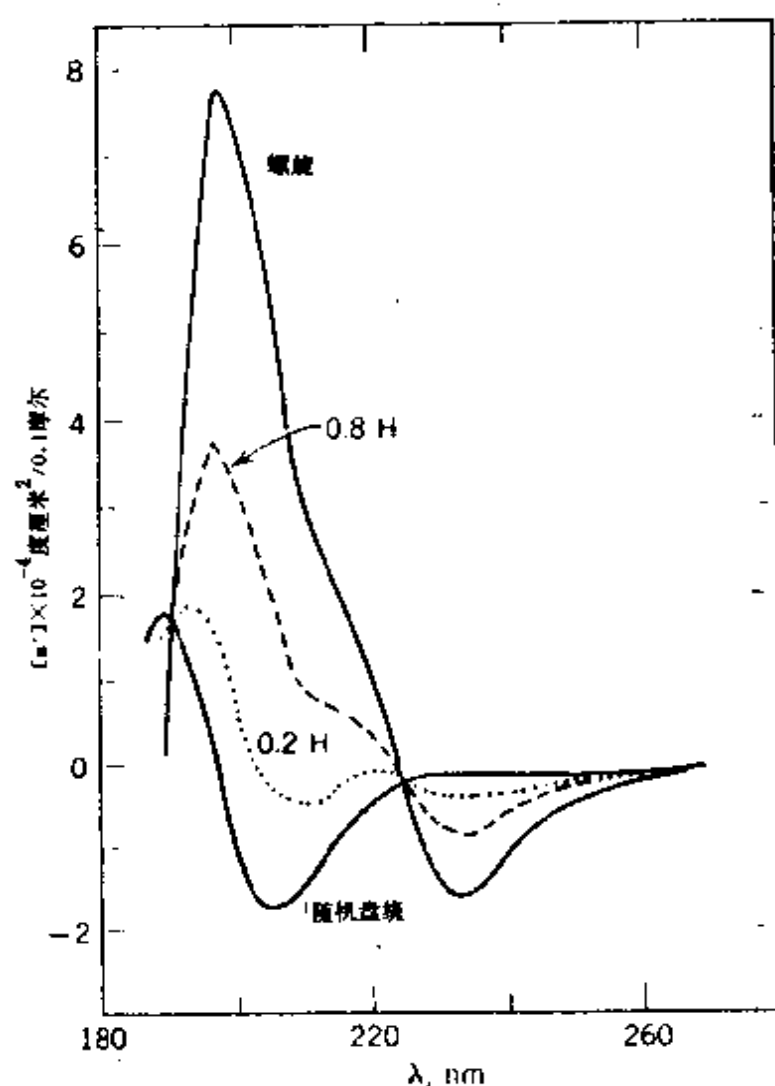


图 3.14 聚-L-谷氨酸的 ORD 谱

pH7.3; 螺旋, 二氧六环: 水 = 50:50(v/v); 随机盘绕, 水;

虚线表示螺旋组分 0.2 和 0.8 的计算曲线

右手螺旋多肽的 CD 谱在 222nm 处显示一个负 $\pi \rightarrow \pi^*$ 峰, 在 206—207nm 处显示一个平行于螺旋轴极化的负峰, 在 190nm 处显示一个垂直于螺旋轴极化的正峰^[78-83]。图 3.15 是聚-L-谷氨酸

取 α -螺旋构象时的特征谱, 图 3.16 是聚-L-赖氨酸取 α -螺旋构象时的特征谱。

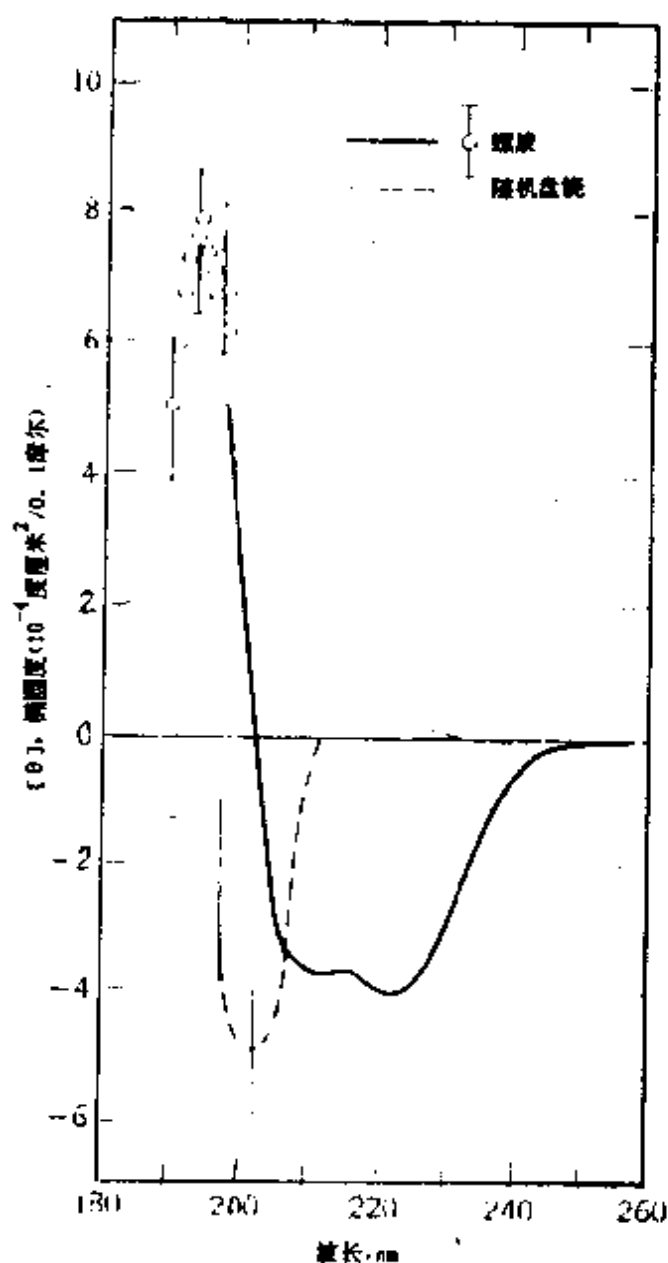


图 3.15 聚-L-谷氨酸在 0.1 mol/l NaF 中的 CD 谱
pH 4.3 (螺旋), pH 7.6 (非螺旋)

在大约 206nm 和 190nm 处负的和正的 Cotton 效应，起源于肽发色团 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁裂分的两种组分。 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁(在电性上是禁阻的)需要大旋光强度，因为来自于电荷的非对称性贡献的扰动，

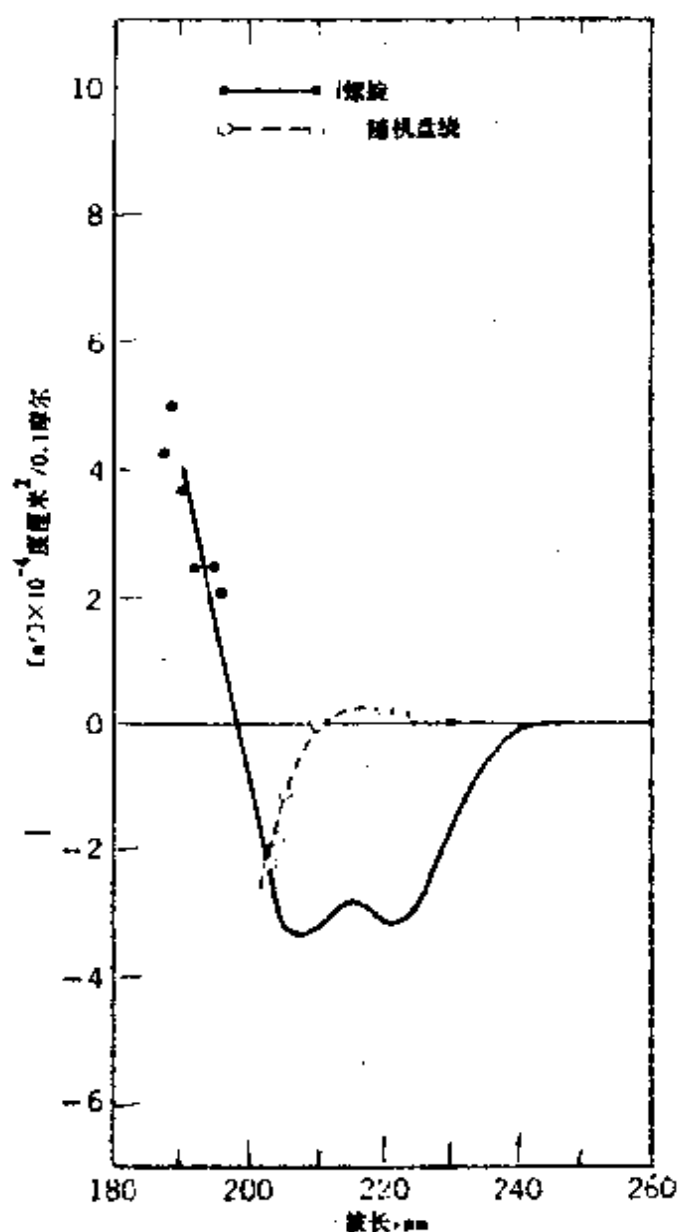


图 3.16 聚 *L*-脯氨酸在 0.1mol/l NaF 中的 CD 谱
pH 10.6-10.8 (螺旋), pH 6.7 (非螺旋)^[78]

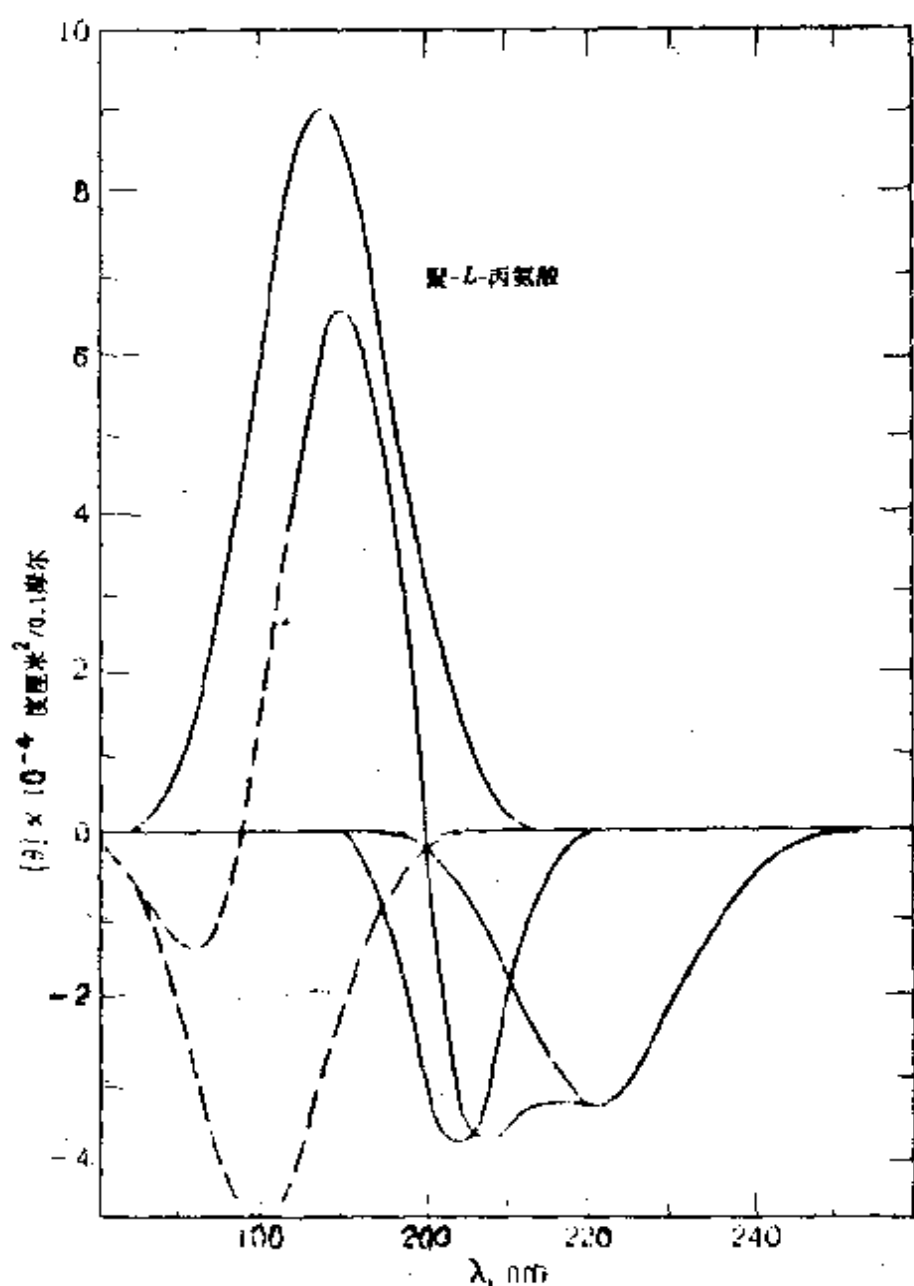


图 3.17 聚-L-丙氨酸的实验 CD 谱(实线)

TFE-TFA(98.5 : 1.5, v/v)

也就是 α -螺旋中基团的静电场的非对称性贡献的扰动，在磁跃迁矩方向产生了一个电子跃迁矩组分。于是，它们的矢量产物变固定。当不存在 α -螺旋时，发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁，结果也能产生非常相似

的 Cotton 效应, 即使小分子, 例如, 环二肽、*L*-丙氨酰甘氨酰胺酐、*L*-3-氨基-吡咯烷-2-酮内酰胺和含一个或两个酰胺基的类似环状分子, 也能产生非常相似的 Cotton 效应^[30-40, 87, 88]。应当强调的是, 仅仅 Cotton 效应本身, 不能被看作判定 α -螺旋存在的标准。

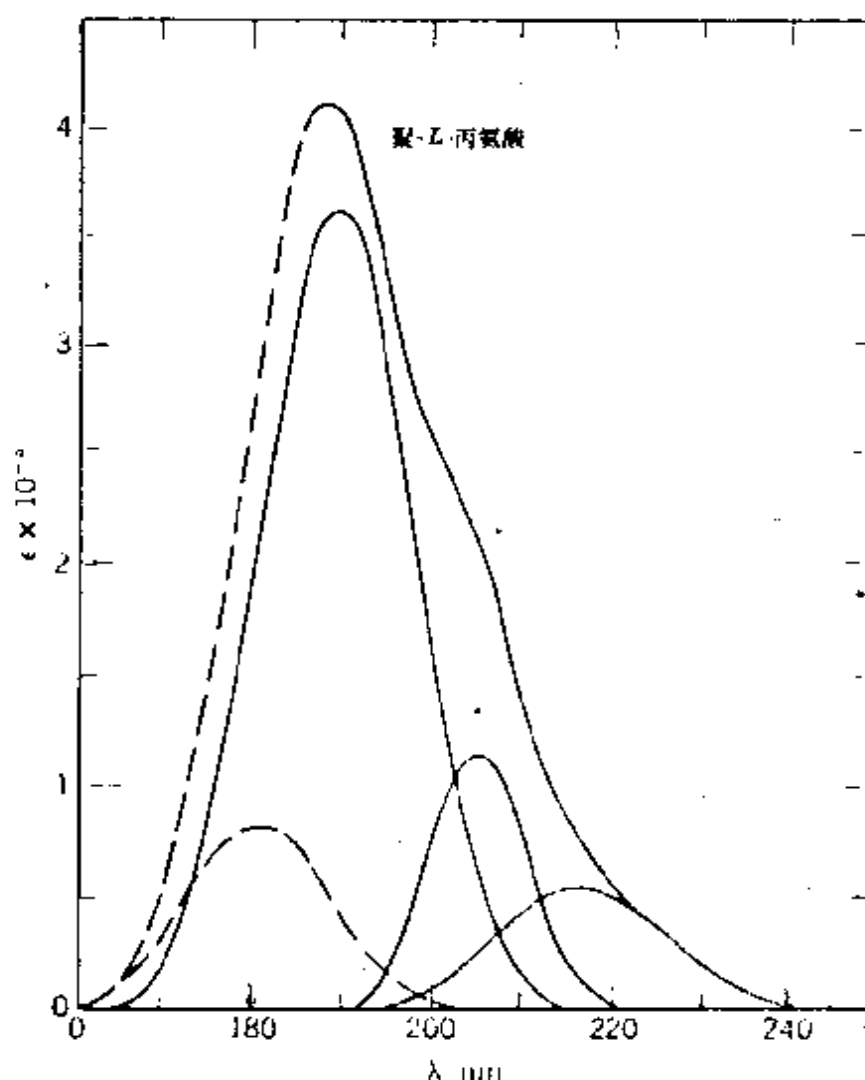


图 3.18 聚-*L*-丙氨酸的实验 UV 谱(实线)

TFE-TFA(98.5 : 1.5, v/v)

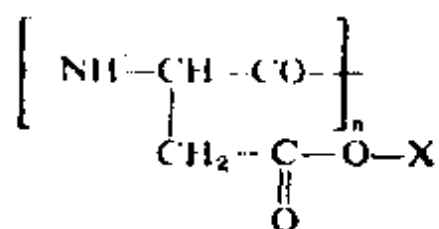


表 3.2 聚-L-天冬氨酸的螺旋形象

X	螺旋形象	溶剂
- H	右手	水 pH4.3
-CH ₃	左手	氯仿
-CH ₂ -CH ₃	右手	氯仿
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	右手	氯仿
-CH(CH ₃)CH ₃	右手	氯仿
-CH ₂ CH(CH ₃)C ₂ H ₅	右手	二氧六环
-CH ₂ -Ph	左手	氯仿 氯仿
-CH ₂ -Ph-NO ₂	右手	二氯甲烷 氯仿
-CH ₂ -Ph-CN	右手	氯仿 DMF
-CH ₂ -Ph-Cl	右手	氯仿 DMF
-CH ₂ -Ph-CH ₃	右手	氯仿 DMF
-Ph-OCH ₃	右手	三水合六氟丙酮
-CH ₂ -CH ₂ -Ph	右手	氯仿

在 ORD、CD 和 UV 谱均已报道的螺旋多肽之中，聚-L-丙氨酸特别重要，因这种多肽不含侧链，不存在侧链发色团的吸收与肽发色团吸收重叠的问题^(89, 90)。毫无疑问，正是肽发色团吸收峰的 CD 谱解析的峰，被指定为特殊的电子跃迁、偶极强度、旋光强

度和各向异性的特征化。这些结果表示在图 3.17 和 3.18 中。ORD 和 CD 研究已经导致了如下的结论：许多 *L*-多肽具有右手螺旋旋转方向的初级螺旋，但聚-*L*-天冬氨酸- β -苄酯及聚-*L*-天冬氨酸- β -甲酯不服从一般规律，在螺旋支持溶剂（例如氯仿和二氯甲烷）中以左手初级螺旋存在^[63, 64, 66-70]，这些多肽的特殊行为已经引起了相当的注意。许多研究人员研究过聚-*L*-天冬氨酸及其酯的 α -螺旋的螺旋方向和稳定性问题^[91-108]。聚-*L*-天冬氨酸- β -甲酯的 CD 曲线显示的 Cotton 效应的符号相反，且大大地不同于右手螺旋的 Cotton 效应^[109]。在 206nm 处的 Cotton 效应大都消失。正如前面指出的，*L*-氨基酸的左手螺旋不是 *L*-氨基酸右手螺旋的镜影。因此，不可能有一个符号相反，大小相等的椭圆峰。差别发生在侧链酯基中，该侧链酯基的电子跃迁与肽的跃迁在有意义的波长范围内偶合。聚-*L*-天冬氨酸的构象研究结果总结在表 3.2 中。

除聚-*L*-天冬氨酸- β -乙酯外，上述结果与 Scheraga 及同事对这些酯的螺旋结构的最小势能分析吻合得很好^[110, 111]。聚-*L*-天冬氨酸- β -乙酯在氯仿中似乎以右手螺旋构象存在，而由理论提供的最低能量的 α -螺旋构象又是左手螺旋构象。*L*-天冬氨酸苄酯和甲酯与 *L*-天冬氨酸硝基苄酯的共聚物的构象研究表明，温度、溶剂等因素在决定这些多肽链在溶液中的构象时起了重要作用^[100]。

四、核磁共振研究

曾使用核磁共振(NMR)测定并研究了螺旋结构及螺旋-折叠构象转换^[112-117]。聚-*L*-谷氨酸- γ -苄酯在螺旋破坏溶剂(TFA)中的 NMR 是正常的，所有不同类型的质子(酰胺 NH、苯基、 α 位 CH、谷氨酸 β 和 γ 位 CH₂、苄基 CH₂) 在不同的磁场下均可解析。可是这

种多肽溶解在螺旋支持溶剂(如氯仿或 TFE)中, NMR 没有特色, 峰极端地变宽, 如果加入适量的 TFA, 则可使图谱有所改善(图

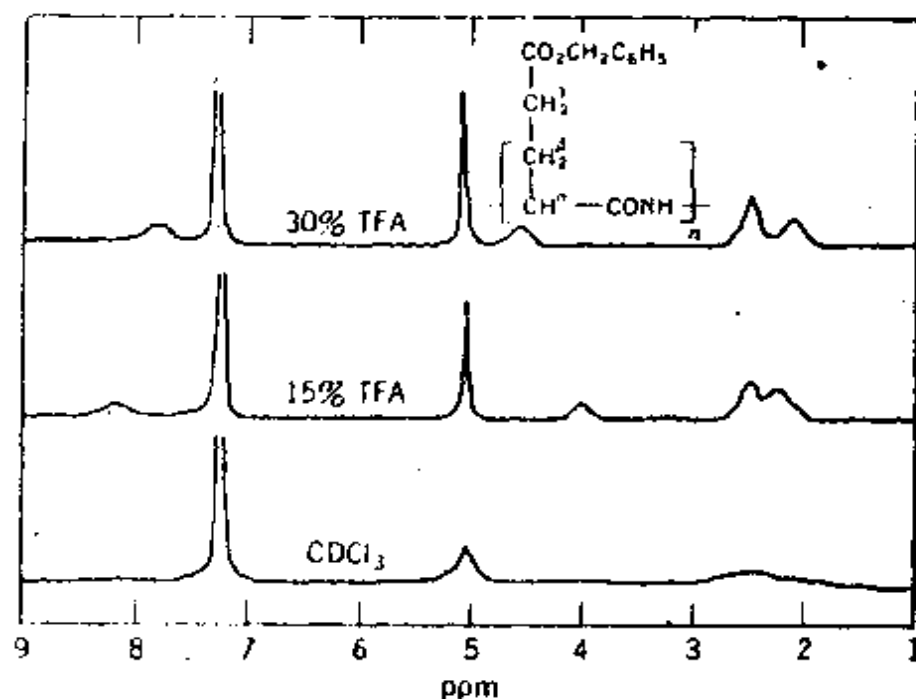


图 3.19 聚-L-谷氨酸- γ -苄酯的 NMR 谱

CDCl_3 、 CDCl_3 -TFA(85:15 和 70:30), 100MHz, 样品浓度均为 10%

3.19)。共振峰的形状取决于两种弛豫时间 T_1 和 T_2 , T_1 为自旋-晶格弛豫时间, 度量能量从激发态向周围环境传递的速度, T_2 为自旋-自旋弛豫时间, 度量自旋体中质子重新分布的速率。弛豫时间反过来又依赖于相关时间, 相关时间是体系中分子内和分子间运动速率的量度。高粘度、低温度、增加分子体积和刚度, 都减少体系的运动, 因而相关时间增加, 弛豫时间变短, 并发生谱线加宽。

以 α -螺旋构象存在的多肽在螺旋支持溶剂(如 CDCl_3 , CCl_4 , TFA)中核磁共振谱变宽是普遍现象, 并归结于形成延伸于整个分子中的诸原子的刚性骨架部分的多肽的质子环境与给出极端宽

峰的固态的环境相似。已经提出核磁共振谱峰的变宽可能是由于产生非常短的自旋-自旋弛豫时间的质子间非常充分的能量交换。随着螺旋破坏溶剂的加入,这种刚性骨架破裂,使能量交换变得很不充分,导致自旋-自旋弛豫时间增加,而且峰变尖锐。

随着螺旋破坏溶剂浓度增加,侧链质子在核磁共振谱中的信号强度逐渐发展,然后才是骨架质子的信号强度发展。螺旋破坏溶剂定义为通过使多肽侧链溶剂化而破坏二级结构的溶剂。例如二氯乙酸(DCA)或TFA,通过光谱和(或)流体力学研究已经获得了这种溶剂效应的证据。因此,聚-L-谷氨酸- γ -苄酯^[118]的各种类型质子的尖锐峰是按下面的次序由外及内逐步出现的:苄基、苄基CH₂、 β 位CH₂和 γ 位CH₂最后是 α 位CH和NH。通过核磁共振研究,不仅可能得到关于螺旋-折叠转变机制的信息,还可能得到关于侧链螺旋度、侧链-侧链相互作用和侧链-主链相互作用的信息。

已经观察了大量 α -螺旋构象多肽的螺旋-折叠转换,例如聚-L-亮氨酸、聚-L-苯丙氨酸、聚-L-谷氨酸- γ -烷基酯(烷基为甲基、叔丁基或苄基)、聚-L-天冬氨酸- γ -烷基酯(烷基为甲基或苄基)、聚-L-蛋氨酸, L-谷氨酸- γ -甲酯和 L-蛋氨酸的共聚物,以及其它级别的结构^[118-122]。聚-L-天冬氨酸- γ -苄酯和由 L-和 D- γ -叔丁基-谷氨酸残基、L-和 D- γ -苄基-谷氨酸残基、D- γ -苄基谷氨酸残基和 L-亮氨酸残基组成的序列多肽,亦已显示了构象转变^[122]。

由于骨架 α 位CH和肽NH质子的共振都显示了在螺旋和随机盘绕环境中质子的可以分辨的峰,所以100MHz和200MHz核磁共振为各种多肽的螺旋含量提供了灵敏的测量^[123, 124]。由于 α 位CH和肽的NH质子对多肽骨架的构象变化最为敏感,所以这些质子的共振峰具有首要的重要性。图3.20是聚-L-蛋氨酸在不

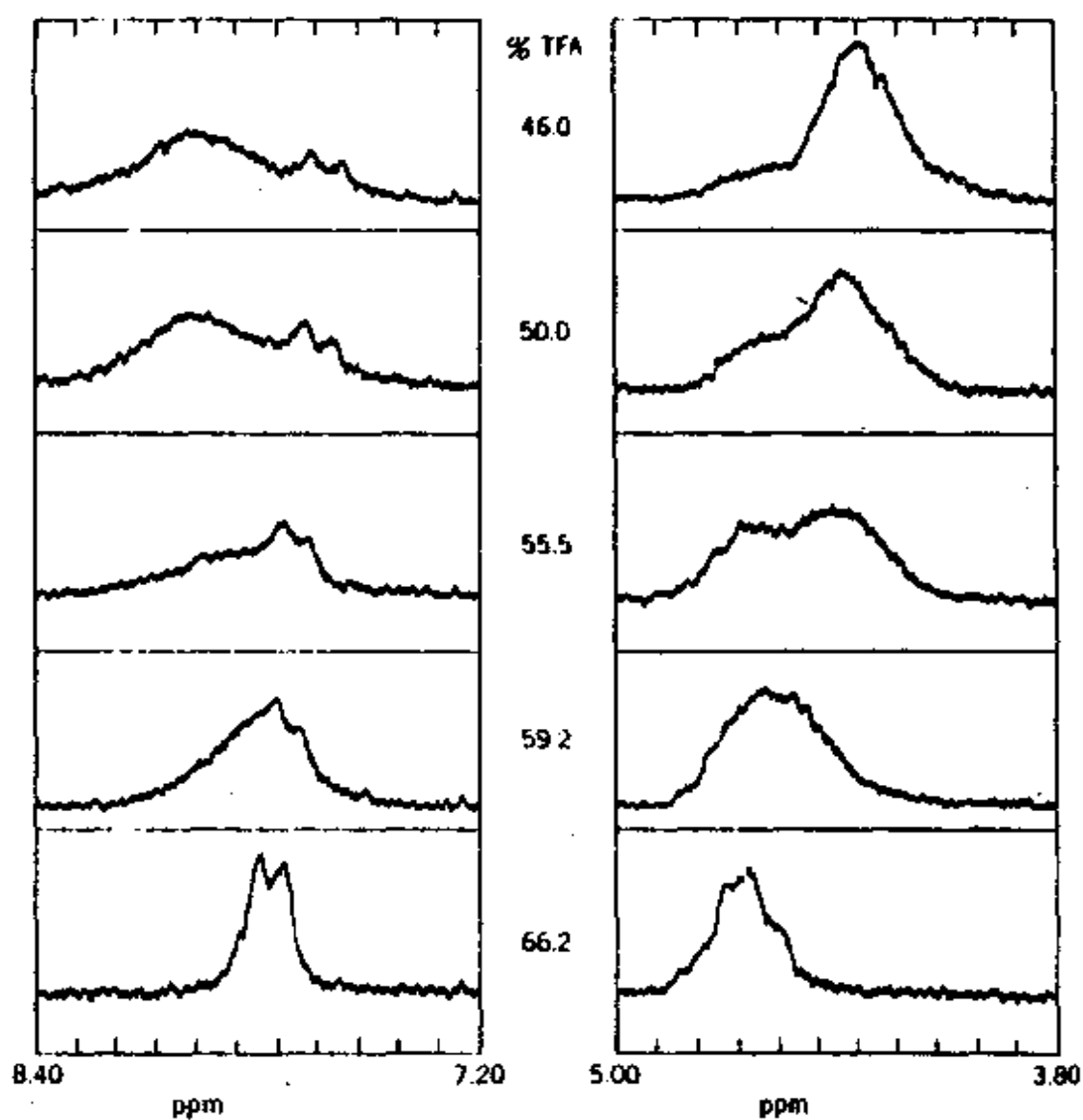


图 3.20 聚-L-蛋氨酸 NMR 谱

TFA- CDCl_3 混合溶剂系统, 图中只显示多肽 α 位 CH 和 NH
两类质子信号, 100MHz, TMS 为内标

同 TFA/ CDCl_3 混合体系中, 在螺旋-折叠转变范围内的 α 位 CH 和

肽 NH 质子的 100MHz 核磁共振谱。

图谱表明, α 位 CH 和肽 NH 分离峰面积的比例作为 TFA 浓度的函数而变化。TFA 浓度增加, α 位 CH 质子在较低场的峰增大, 而在较高场的峰减小, 肽 NH 质子的情形则正好反过来。由于 TFA 有利于“随机盘绕构象”, 所以合理的结论是, 较低场的 α 位 CH 峰和较高场的 NH 峰对应于随机盘绕构象, 而较高场的 α 位 CH 和较低场的 NH 峰对应于螺旋构象。

α 位 CH 和肽 NH 骨架质子共振的分离的螺旋和折叠峰的出现, 看起来是不依赖于诸如多肽侧链的体积和性质、多肽的分子量、使用的溶剂系统的性质等因素的普遍现象。通过测定峰面积对分离的螺旋和折叠进行的共振测定, 使得有可能确定肽的螺旋构象和折叠构象的含量。

观察分离的螺旋和随机盘绕峰, 也允许测定两种环境中质子的寿命 T 的极小值, 因为 $T \geq \frac{1}{\omega_a - \omega_b}$, 其中 $\omega_a - \omega_b$ 为螺旋和随机盘绕构象中对应质子的化学位移差, 单位为赫兹。聚-L-丙氨酸的螺旋和随机盘绕质子的寿命有大约 10^{-2} s 的较低的极限^[124]。上面的核磁共振结果意味着螺旋向盘绕转变的半衰期比 10^{-2} s 长。另一方面, 以快速反应动力学为基础的研究表明, 转变的半衰期比 10^{-5} s 短。

在聚-L-丙氨酸中, 用螺旋的百分含量(来自肽 NH 质子共振)作为 TFA 浓度的函数作图, 表明在 100% 的 TFA 中, 螺旋含量超过 50%^[123]。用 Moffitt-Yang 参数 b_0 估算的螺旋含量与作图所得含量间的差异, 目前尚无法作清楚的解释。

曾分析过螺旋峰的化学位移, 以便对由 TFA 引起的螺旋-盘绕转变所包含的力的性质有深入的认识^[124]。正如 Klotz 和同事^[125-129]及 Bradburg 和 Fenn^[130, 131]得出的结论: 螺旋多肽的 NH

峰的化学位移不是 TFA 浓度的函数, 它的谱线宽度变化也不是 TFA 浓度的函数, 而盘绕多肽 NH 峰确实显示明显的溶剂依赖性。这些事实可能是螺旋-盘绕转变与质子化无关的强有力的证据。Stewart 及同事们提出^[132, 133], TFA 不强烈地与螺旋多肽的 $N-H\cdots O=C$ 氢键相互作用。Ferretti 和 Paolillo 提出, 溶剂-肽氢键和肽-肽氢键竞争, 加上 TFA 的溶剂化, 使得螺旋去稳定化, 是引起螺旋-随机盘绕转变的原因^[124]。这些结果与一系列多肽模型化合物的 NMR, CD 和 ORD 研究吻合。这些小肽及模型化合物在强酸溶剂中不显示多肽肽键的电荷^[112, 118, 134, 135]。在这些相关的研究中, Steigman 及同事们对模型酰胺和多肽在硫酸和甲磺酸/水混合物中, 以及在 DCA/有机溶剂混合物中的行为进行了很有意义的研究^[136, 137]。他们的结论是, 多肽, 例如聚-L-谷氨酸- γ -乙酯, 以盘绕构象存在是由于强烈的溶剂化作用, 而不是质子化作用。而且, 影响盘绕-螺旋转变中, DCA 助溶剂效力的降低次序为: 三乙胺 > 乙酸 \approx 甲醇 > 水 \approx 硝基苯 > 硝基乙烷 > 甲酸 > 一氯乙酸 \approx 氰乙酸 \approx 1,2-二氯乙烷 > 四氯化碳, 该次序已经被解释为各种受体与 DCA 形成氢键, 破坏溶剂网络的能力。

五、红外研究

多肽和蛋白质的红外光谱(IR)显示几个相对强的吸收, 这些吸收与所有这些分子的共同结构单位 CONH 基相联系。这些峰的位置和强度随多肽构象变化而变化。由于 Ambrose 和 Elliot 指定了确切的频率-构象相关^[138], 因此, 这种变化被用于判定多肽的构象。在列出红外光谱研究多肽构象所得的结果之前, 考虑到仲酰胺与多肽链结构重复单位相似性, 先简单描述这类小型化合物的

特征吸收峰。

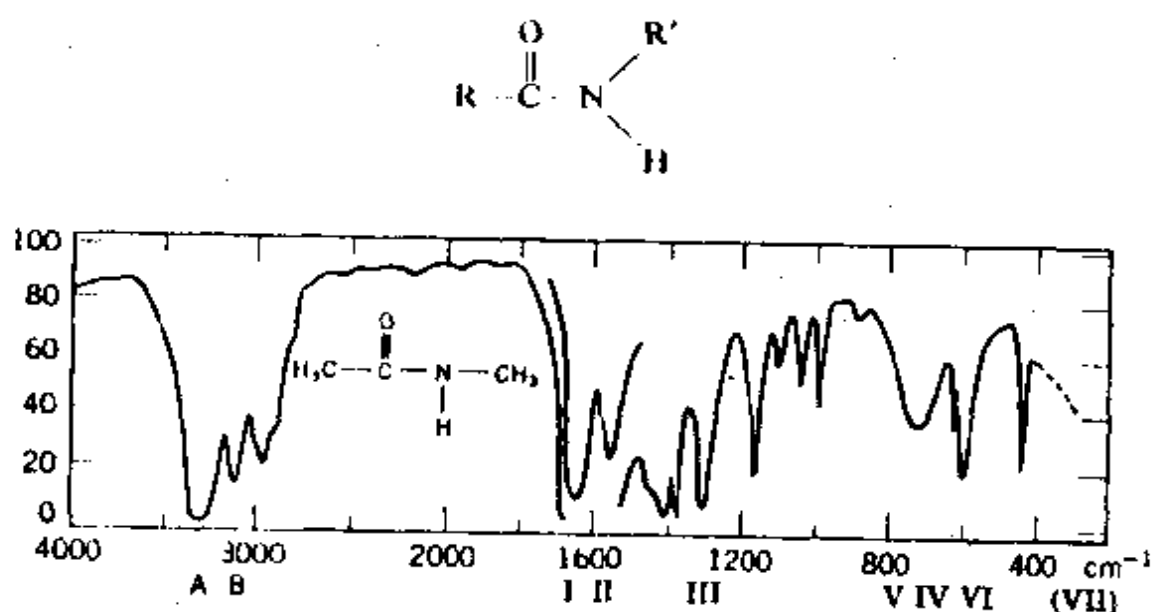


图 3.21 *N*-甲基乙酰胺的 IR 谱

酰胺 VI 峰未显示

图 3.21 为 *N*-甲基乙酰胺的红外光谱,并指出了酰胺特征峰的位置。表 3.3 总结了与肽链相关的峰的频率及粗略描述。处于 3300cm^{-1} 和大约 3100cm^{-1} 处的吸收峰指定为酰胺 A 和酰胺 B 峰。当 N 氘代时,这些峰消失,说明这两个峰与 NH 基上氢的伸缩振动相联系。酰胺 A 和酰胺 B 峰对链的构象不甚敏感,不过,这样的二色性对于区别 α -螺旋构象和伸展型构象有应用价值,在聚-*L*-丙氨酸的 α -螺旋中,酰胺 A 峰出现在 3293cm^{-1} ,显示平行的二色性,伸展构象的酰胺 A 峰显示垂直的二色性。与 C=O 键的伸缩振动相联系的酰胺 I 峰出现在所有二级酰胺、多肽和蛋白质中。酰胺 I 峰主要包括 C—N 伸缩和 N—H 弯曲。酰胺 I 峰和 II 峰已被大量用于研究多肽和蛋白质的构象。

表 3.3 与肽键相关的特征峰

对称	归属	近似频率	描述
面内	A	3300	NH, 2× 酰胺 I (Fermi 共振)
	B	3100	
	I	1650	C=O(80%), C-N(10%), N-H(10%)
	II	1560	C-N(40)%, N-H(60%)
	III	1300	C=O(10%), C-N(30%), N-H(30%), O=C-N(10%), 其它(20%)
	IV	625	O=C-N(40%), 其它(60%)
面外	V	725	N-H
	VI	600	C=O
	VII	200	C-N(扭曲)

Miyazawa 和 Blout 在定域振动处理的基础上分析了酰胺 I 和 II 峰与肽链构象之间的相关^[139]。 α -螺旋构象的聚-L-谷氨酸- γ -苄酯分别在 1650 和 1652 cm^{-1} 处, 观察到平行于螺旋轴和垂直于螺旋轴的两种酰胺 I 峰(见图 3.22)。对于 α -螺旋, 平行于螺旋轴的酰胺 I 峰的频率与垂直于螺旋轴的酰胺 I 峰相差不多^[140], 以至于观察到的 α -螺旋的酰胺 I 峰的二色性不太强。

分别在 1516 cm^{-1} 和 1546 cm^{-1} 处观察到了聚-L-谷氨酸- γ -苄酯的弱的平行的酰胺 II 峰和强的垂直的酰胺 II 峰(见图 3.22)。 α -螺旋的垂直的酰胺 II 峰出现在大约 1550 cm^{-1} 处是由于它的跃迁矩恰好垂直于螺旋轴, 且不为平行的峰所重叠。该峰的明显的二色性可被用作在定向的样品中, 螺旋轴方向的有用的量度。

在 1200—1300 cm^{-1} 区域的峰归属于酰胺 III 振动, 来自 C=O, C-N 及 N-H。前二者是伸缩振动, 后者是弯曲振动。聚-L-丙氨酸的 α -螺旋构象的弱的平行峰和强的垂直峰, 分别出现在大约

1270 cm^{-1} 和 1274 cm^{-1} 处。这些峰在 N 氘化时消失。聚-L-谷氨酸- γ -苄酯、聚-L-天冬氨酸- β -苄酯及它们的氘代类似物的酰胺 III 峰振动区域(1150—1350 cm^{-1})的红外光谱见于图 3. 23。观察定向样品的酰胺 I 峰和酰胺 II 峰，可以区别多肽的螺旋构象、平行的 β -伸

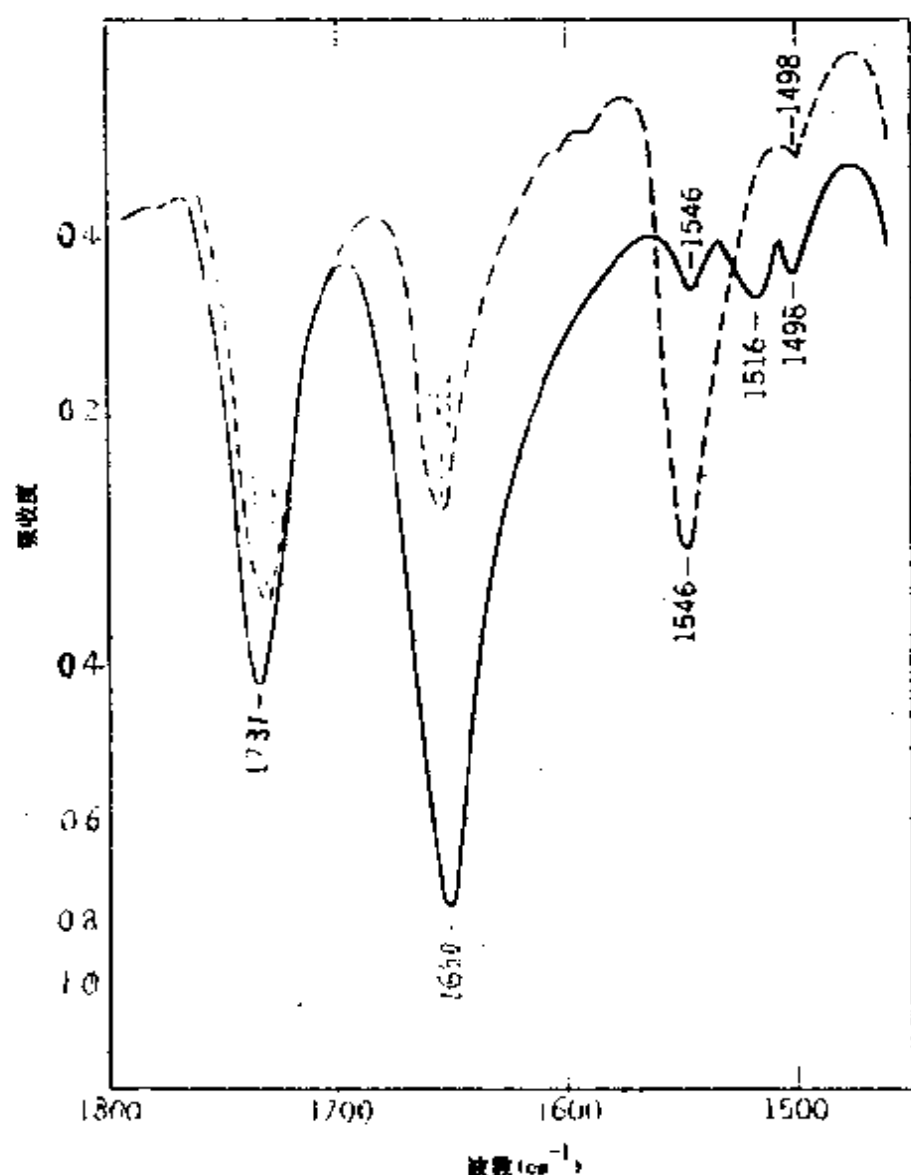


图 3. 22 聚-L-谷氨酸- γ -苄酯的 IR 谱
实线表示平行极化，虚线表示垂直极化

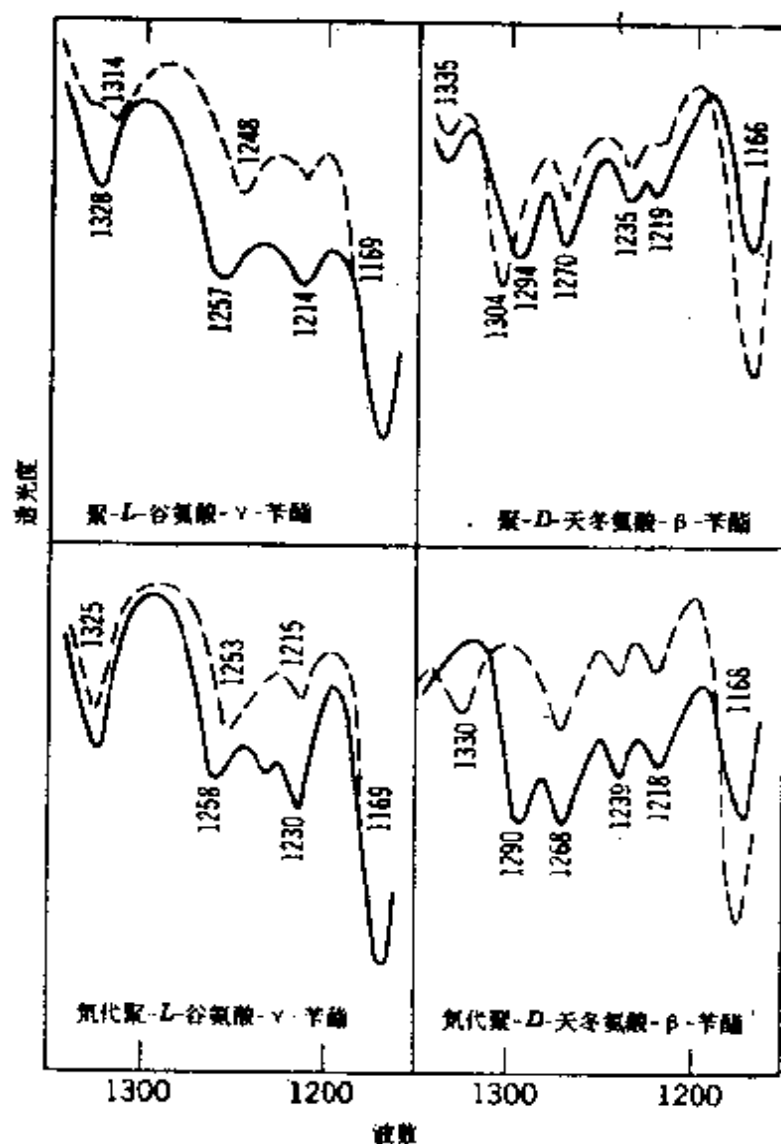


图 3.23 聚合物的 IR 谱

实线表示平行极化, 虚线表示垂直极化

展、反平行的 β -伸展和无规则构象。这些构象的多肽的酰胺 I 峰和酰胺 II 峰的 IR 总结在表 3.4 中。但在非定向的样品中, 各种构象共存时, 并不是仅仅测定酰胺 I 峰和 II 峰的强度就可以确定各种

构象的分数，因为 α -螺旋构象的峰不能与不规则构象的峰分离。

表 3.4 不同构象中酰胺 I 和酰胺 II 峰

构象	归属	酰胺 I	酰胺 II
随机盘绕(聚丝氨酸)	—	1655(s)	1535(s)
α -螺旋	$\nu(0)$	1650(s)	1516(w)
聚-L-谷氨酸- γ -苄酯	$\nu(8)$	1652(m)	1546(s)
β -平行链	$\nu(0,0)$	1645(w)	1530(s)
(α -角蛋白)	$\nu(\pi, 0)$	1630(s)	1550(m)
β -反平行链	$\nu(0, \pi)$	1685(w)	1530(s)
(聚甘氨酸 I)	$\nu(\pi, 0)$	1632(s)	1540*
	$\nu(\pi, \pi)$	1668*	1550(w)

* 计算值

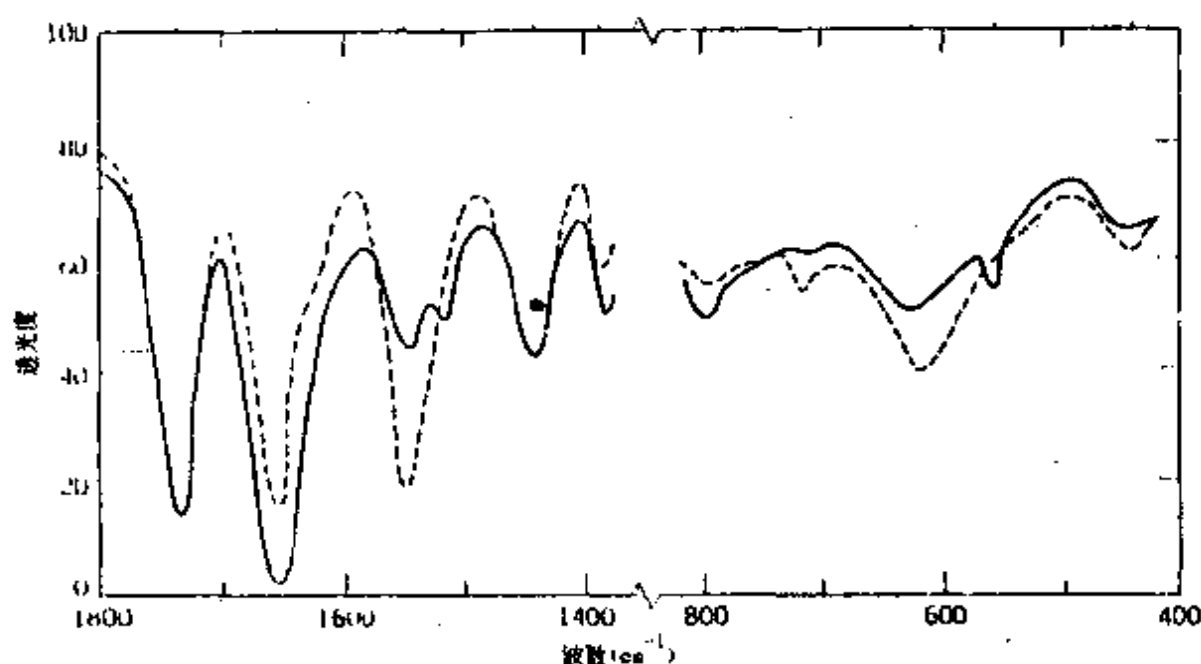


图 3.24 聚-L-谷氨酸- γ -甲酯的 IR 谱(A/I=200)

实线表示取向平行,虚线表示取向垂直

虽然预料出现在低频区的特征的酰胺 IV, V, VI 峰对构象变化都敏感,但实际上,酰胺 IV 和 VI 峰对这类变化并不敏感。而在 $400-800\text{cm}^{-1}$ 区域的酰胺 V 峰,对判定多肽的构象特别有用^[141]。

图 3.24 描述了 $400-800\text{cm}^{-1}$ 和 $1350\text{cm}^{-1}-1800\text{cm}^{-1}$ 区域的高分子量聚-L-谷氨酸甲酯的极化的红外光谱。在低频区域, 615cm^{-1} 处观察到一个强的垂直峰,当 N 氘代时,该峰移向 462cm^{-1} (见图 3.25)。这些峰大都来自 N-H 和 N-D 的面外弯曲振动。

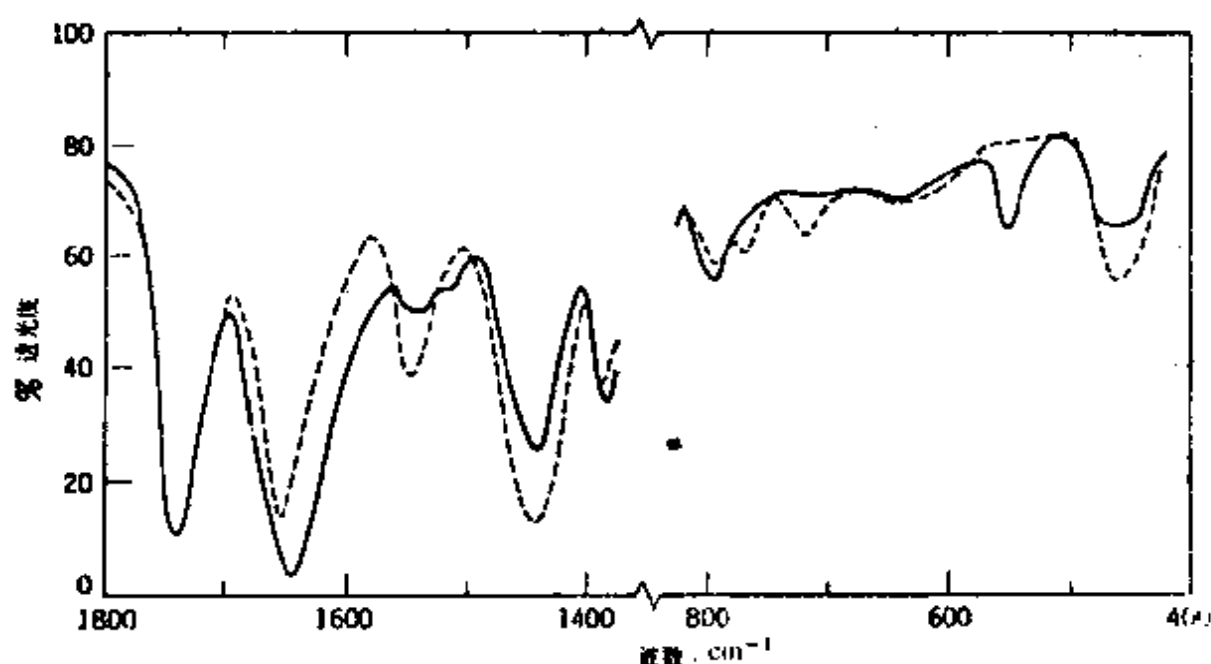


图 3.25 氘代聚-L-谷氨酸- γ -甲酯的 IR 谱 ($A/I=200$)

实线表示与取向平行,虚线表示与取向垂直

为了比较 α -螺旋多肽,聚-L-谷氨酸- γ -甲酯、聚-L-谷氨酸- γ -乙酯、聚-L-谷氨酸- γ -异戊酯、聚-L-谷氨酸- γ -苄酯和聚-L-丙氨酸

的酰胺 I, II 和 V 峰的频率及 N-取代衍生物 V' 的频率列在表 3.5 中。 α -螺旋构象的垂直酰胺 V 峰的频率在 $610-620\text{cm}^{-1}$ 的狭区中, 而垂直酰胺 V' 峰频率在 $455-465\text{cm}^{-1}$ 区。在 615cm^{-1} 处也观察到聚-L- α -氨基正丁酸、聚-L-正亮氨酸及聚-L-亮氨酸的酰胺峰。

测定过两种结晶型聚甘氨酸在 $400-190\text{cm}^{-1}$ 区域的红外光谱。聚甘氨酸 I 在 217cm^{-1} 处的峰和聚甘氨酸 II 在 365cm^{-1} 处的峰被尝试性地指定为酰胺 VI 振动^[151]。

在低频区发现了多肽的 α -螺旋的构象少数其它的特征酰胺峰。 α -螺旋构象的聚-L-丙氨酸的远红外谱中, 375cm^{-1} 处有一强峰。聚-L-谷氨酸酯在 410cm^{-1} 处也显示一个峰, 这些峰被尝试性地指定为 E 振动峰。若这些多肽取 β -伸展构象, 这些峰即不复存在。

表 3.5 α -螺旋多肽的特征酰胺频率

	I ()	I (\perp)	V (\perp)	V' (\perp)
聚-L-谷氨酸- γ -甲酯	1658	1550	620	462
聚-L-谷氨酸- γ -乙酯	1658	1550	620	465
聚-L-谷氨酸- γ -异戊酯	1656	1550	615	461
聚-L-谷氨酸- γ -苄酯	1653	1550	615	458
聚-L-丙氨酸	1658	1548	610	456

表中列出了未取代酰胺 I, II, V 及 N-取代 V' 峰

酰胺 V 峰被用来研究外消旋和内消旋多肽链的构象以及外消旋共聚肽的聚合方案^[152-154]。-DL-代表外消旋体, -D, L-代表内消旋体。图 3.26 表示外消旋聚谷氨酸- γ -甲酯的红外光谱。 1655cm^{-1} 处的强酰胺 I 峰, 1540cm^{-1} 处的酰胺 II 峰, 以及 635cm^{-1} 处的强酰胺 V 峰, 表明这种高聚物的优势构象是 α -螺旋。这些结果与内消旋共聚-谷氨酸- γ -甲酯类似, 它在 630cm^{-1} 处显示强的酰

胺 V 峰。

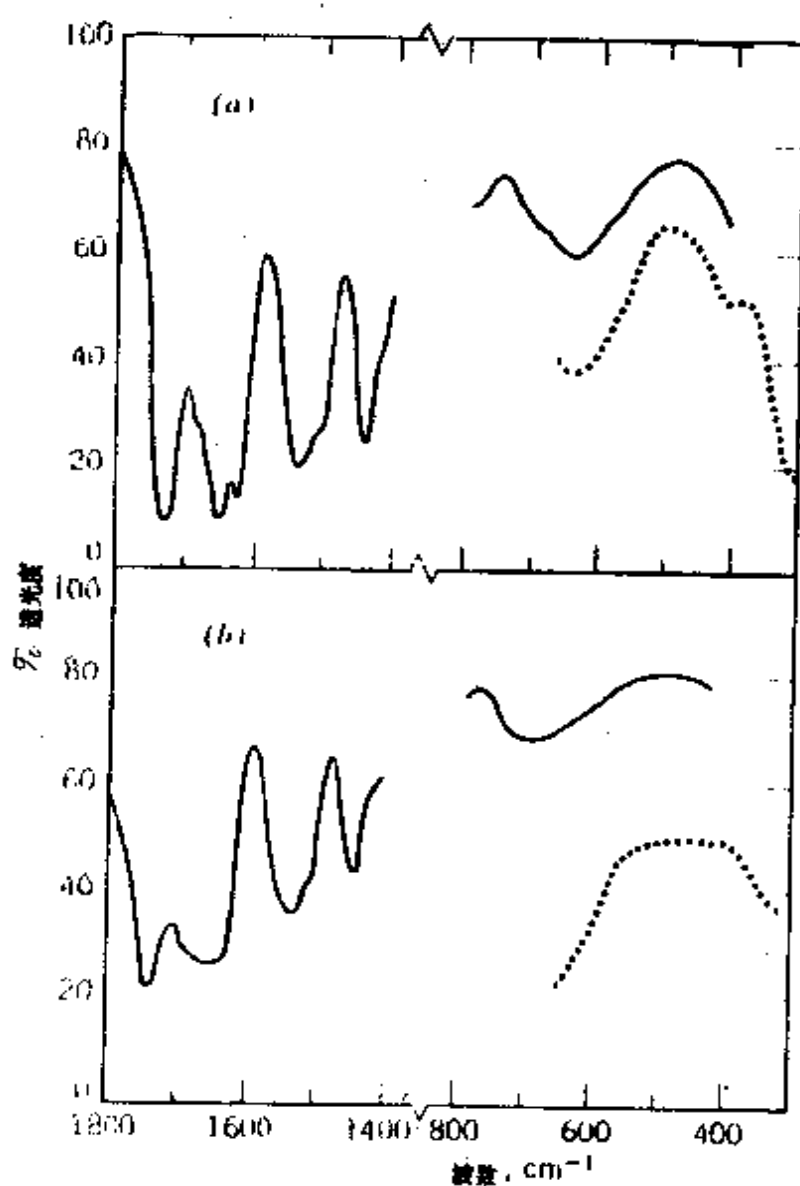


图 3.26 外消旋聚谷氨酸- γ -甲酯的 IR 谱
(a) $A/I=100$, (b) $A/I=4$ 实线为 Hitachi 225 红外谱仪测得, 虚线为 EPI-L 红外谱仪测得

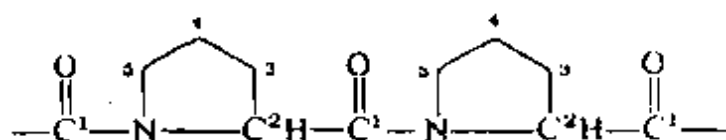
六、螺旋结构的一些特殊方面

除前面讨论的主链构象的特殊问题外, 还考虑了改变主链螺

旋方向对侧链引起的扰动。在比较聚-L-谷氨酸酯与聚-L-天冬氨酸时，根据这种考虑，提出蛋白的两种普遍结构特征：第一种牵涉到含有亚氨基酸 L-脯氨酸作为链的取代组分的影响。后面将讨论在均聚物聚-L-脯氨酸中的影响。很明显，与其它典型聚- α -氨基酸的最引人注目的差别的根源是由于没有氢键。考虑的第二个特殊方面是以芳香侧链为基础的。在起源于芳基和酰胺基的电子跃迁中存在很多重叠，这使得以上述谱图测定为基础的构象复杂化。

1. 非氢键多肽

已经观察到了聚-L-脯氨酸化学上可以区分的两种形态^[155]，发现每种形态都具有一种特征的构型模式，这种构型模式反映在它的流动性和旋光性之中，因为在聚-L-脯氨酸链中，不可能生成氢键，所以任何稳定的构型必定是由于沿聚-L-脯氨酸链的键旋转受阻造成的。由于四氢吡咯环的原因，沿 N-C₂ 键旋转是不可能的。由于酰亚胺键的部分双键性质，沿 N-C₁ 键旋转受阻。该键的两种可能的构型是顺式(cis)和反式(trans)。对于酰亚胺键的两种构型中的每一种构型，C₁-C₂ 键可以假定两种位置。这些构象已知为 cis' 和 trans'。酰亚胺和 C₁-C₂ 键有四种可能的构型组合。这四种可能的异构体，实质上仅仅观察到两种。



聚-L-脯氨酸 I 为每圈含 3.125 个残基的右手螺旋，单位移动距离为 1.85 Å。其中酰亚胺键是 cis，而 C₁-C₂ 键是 trans' (Traub 螺旋)^[156, 157]。聚-L-脯氨酸 II 为每圈含 3 个残基的左手螺旋，单

位移动距离为 3.12 \AA [158, 159]。酰亚胺键是 trans, 而 C_1-C_2 键为 trans' (Cowan-McGavin 螺旋)。

后一种结构与仅以一种形态存在的聚-L-羟基脯氨酸很类似^[160]。在固态中, 每根链通过 $O-H \cdots O=C$ 氢键与其它六个相邻的链连接。由于聚-L-脯氨酸 I 与胶原质具有类似的构象特征, 所以对聚-L-脯氨酸 I 的旋光性的研究, 是解释胶原质旋光性的合乎逻辑的第一步^[161]。

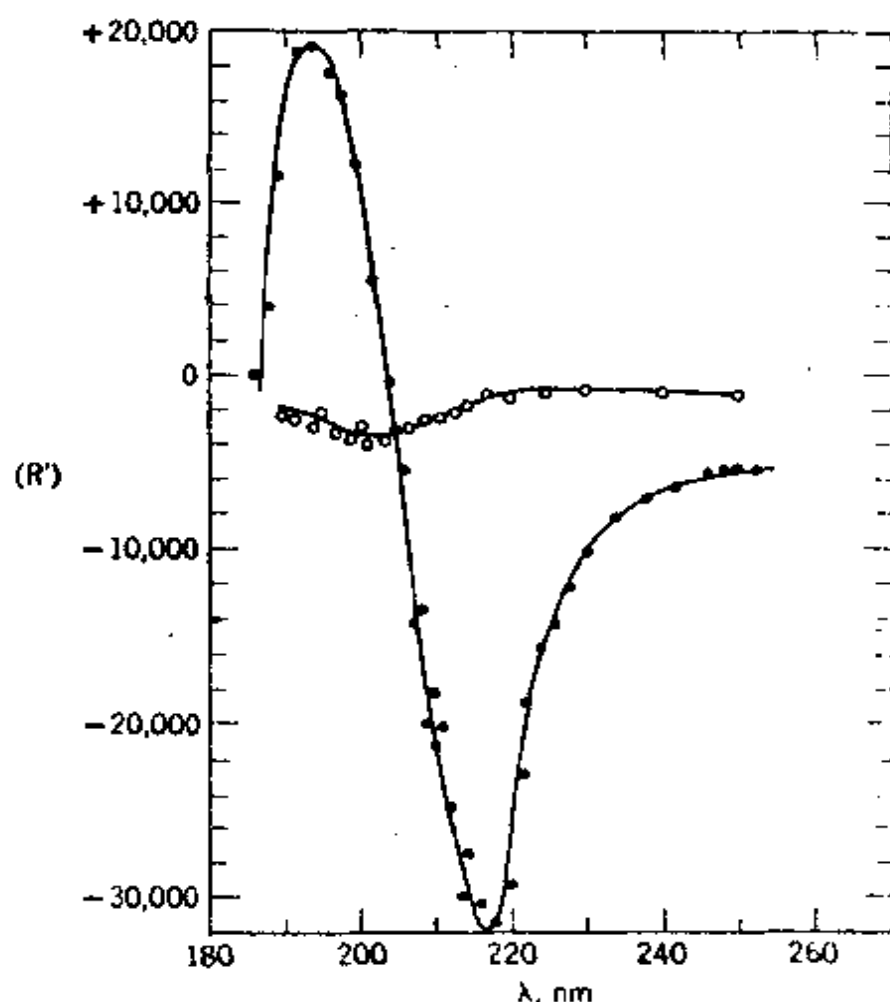


图 3.27 聚-L-脯氨酸 I (点) 和 L-脯氨酸(圈)的 ORD 谱

预期左手螺旋和右手螺旋含 L-脯氨酸固有旋光贡献, 但符

号相反,观测结果正是如此。聚-L-脯氨酸 I 的 $[\alpha]_D^{25} = +50^\circ$,而聚-L-脯氨酸 II 的 $[\alpha]_D^{25} = -540^\circ$ 。它们的流动性不同,因为 II 比 I 能被延伸得多^[162a, 165]。

在特定条件下,两种形态的聚-L-脯氨酸可以相互转化,例如在水、乙酸、苯醇和氯乙醇等溶剂中,聚-L-脯氨酸 I 变旋为聚-L-脯氨酸 II。在 90% 的正丙醇与 10% 乙醇的混合溶剂中,这两种变

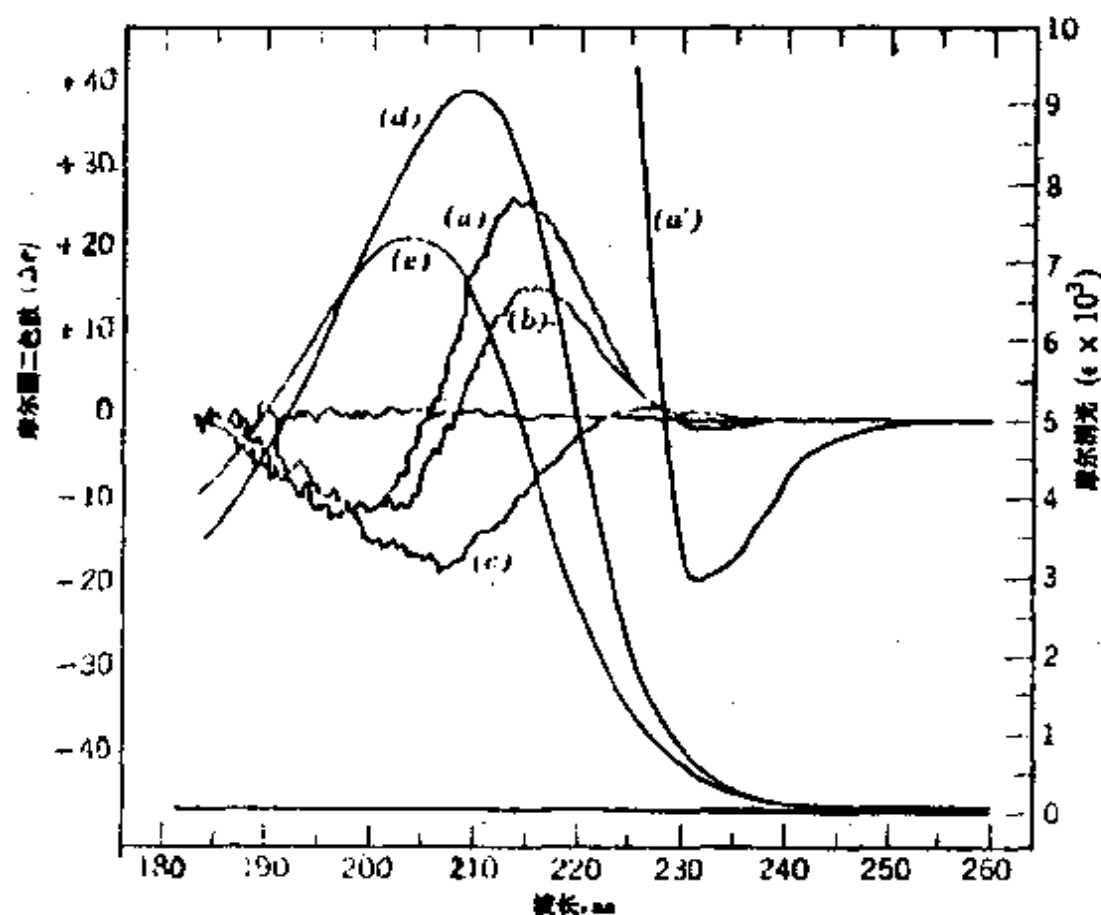


图 3.28. 聚-L-脯氨酸的 CD 和 UV 谱

记录时间从溶解在 TFE 中算起至观察到峰或谷为止: (a) 13min, 18min; (b) 56min, 60min; (c) 19h; (d) 15min; (e) 19h
(a') 10min(使用 10 倍光程的池)

化可以颠倒回来^[165]。已经彻底研究了反应： $I \rightarrow I$ 和 $I \rightarrow I$ 的反应动力学，并发现在聚合物浓度不同时呈平行的结果^[162, 165, 166]。这种转变比聚- α -氨基酸中的螺旋-盘绕转变慢得多。

通过 ORD 和 CD 研究清楚地表明，聚-*L*-脯氨酸 I 和 II 在溶液中具有明显不同于 α -螺旋的构象^[165, 175]。I 在水中的远紫外 ORD 曲线显示单一的集中在 205nm 处的大的负 Cotton 效应(图 3. 27)。由于稳定 I 型的丙酸溶液在远紫外区不透光，故 I 型的旋光性研究受到妨碍。

Bovey 和 Hood 报道了在 TFE 中对高分子量聚-*L*-脯氨酸的 ORD 测定，溶解之后，立即观察到对应于聚-*L*-脯氨酸 I 的构象。ORD 谱显示出在大约 233nm 处一个大的正极值，残基旋光为 $[R]_{233} \sim +47500^\circ \text{ cm}^2/\text{de}$ 和在大约 208nm 处的负极值；残基旋光为 $[R]_{208} \sim -90000^\circ \text{ cm}^2/\text{de}$ ^[174]。

聚-*L*-脯氨酸 I 型溶解于 TFE 后，立即得到一个 CD 谱，该谱在 232nm (指定为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁)处显示一个弱的负峰，在 215nm 处显示一个正峰，以及在 199nm 处显示一个弱的负峰，这些值与理论计算相符。这些峰来自于 Traub 右手螺旋的聚-*L*-脯氨酸 I 的 $\pi \rightarrow \pi$ 跃迁的激发裂分。

在与 $I \rightarrow I$ 的异构化过程对应的变化中正峰变弱，初始的负峰被大约 206nm 处的更强的负峰所代替。平衡之后，聚-*L*-脯氨酸的谱在 226nm 处显示一个弱的正峰，加上 206nm 处的负峰，这些峰已被解释为 II 型肽的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁(Cowan 和 McGavin 左手螺旋)出现的激发裂分组分(图 3. 28)。表 3. 6 总结了详细研究聚-*L*-脯氨酸和很相近的多肽以及聚-*L*-乙酰氧脯氨酸在 TFE 中的构象异构化所得到的 CD 结果^[176]。

含四氢吡咯环的多肽的红外光谱一般不象先前讨论过的 α, β

及随机盘绕构象的红外谱那么易于理解。四氢吡咯环的氮原子上无氢原子，故没有通常意义上的酰胺 I 和 II 峰。Isemura 及同事仔细研究了聚-L-脯氨酸 I 和 II 的谱^[177]。即使不使用上述相关关系和计算，也可能鉴别两种形态。如同上面提到的，除溶解在 LiBr 中之外，聚-L-羟脯氨酸不显示聚-L-脯氨酸的变旋性质。该差异被归结为，在溶液中聚-L-羟脯氨酸是以相互盘绕的三重键存在，该结论得到 X 射线衍射的证实。X 射线衍射说明，这种以所谓的 A 型存在的多肽的有序结构，是通过链间的 O—H…O 把三条相互盘绕的螺旋链结合在一起的。

表 3.6 聚-L-脯氨酸和聚-L-乙酰氧脯氨酸的 CD 数据

聚合物 ^a	吸收	CD 峰 1	CD 峰 2	CD 峰 3
	$\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)$	$\lambda_{\text{ext}}(\Delta\epsilon)$	$\lambda_{\text{ext}}(\Delta\epsilon)$	$\lambda_{\text{ext}}(\Delta\epsilon)$
聚-L-脯氨酸 I	210	232	215	190
	(9000)	(-1.8)	(+30.0)	(-10.5)
聚-L-脯氨酸 II	202		226	206
	(7200)		(约+2)	(-18.0)
聚-L-乙酰	208	229	212	约 190
氧脯氨酸 I	((9300)	(-5.0)	(+25.0)	(b)
聚-L-乙酰	200		226	206
氧脯氨酸 II	(7600)		+1.35)	(-9.2)

a. 来自 I 型的数据外推至 0 时间；来自 II 型的数据取自不再观察到变化(24 小时以上)，所有数据都是 TFE 溶液的数据，波长为毫微米；

b. 难以测定，但比峰 2 弱很多或对应于聚-L-脯氨酸 II 峰

由于脯氨酸、羟脯氨酸及甘氨酸在骨胶原中的百分含量高，为了得到蛋白质分子结构的有用信息，对含这些氨基酸残基的合成多肽，进行了广泛的构象研究^[178-183]。

脯氨酸、甘氨酸和羟脯氨酸的 N-羟基酸酐的混合物的“随机”

共聚，通常生成复杂的物质，该物质的性质不能被很好地解释。后来，兴趣转向了序列聚三肽。它们的所有第三个残基是根据骨胶原的组成特征，或者是脯氨酸，或者是羟脯氨酸，或者是甘氨酸，这些氨基酸在确定骨胶原的结构时起了重要作用^[184-187]。

有证据说明，几种聚三肽确实有骨胶原似的构象，而且后来已完成了对聚合物(Gly-Pro-Pro)_n的详尽的X光衍射分析。这种聚三肽和其它聚六肽是具有(Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro)_n，(Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Pro)_n，(Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Pro)_n和(Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Ala)_n序列的骨胶原的模型，它们具有相同三重螺旋构象，这种螺旋的每个三肽有一个N-H...O链间氢键。根据这些结果，提出骨胶原本身就可能具有这种结构^[178]。

2. 芳香多肽

多肽(和蛋白)中的发色团在易受影响的各向异性吸收区域，显示 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 两种电性跃迁，并产生可以与二级结构相关的特征Cotton效应。当多肽的侧链在肽发色基团的长波范围也有吸收时，要确定构象十分困难。在聚-L-苯丙氨酸、聚-L-色氨酸和聚-L-酪氨酸中，它们的芳香侧链也产生叠加在所有其它Cotton效应的尾端产生的背景旋转之上的Cotton效应。该背景旋转可以大到足以使小的Cotton效应模糊不清。具有芳香侧链的多肽构象部分是通过侧链发色基团与多肽主链的光学活性中心之间的电性和空间相互作用而导致的。

由于不对称吸收对CD效应的单独贡献，所以用这种技术研究这类多肽的构象有独到之处。聚-L-酪氨酸在0.1N NaClO₄(pH=10.8)中的CD谱(图3.29)，在275 nm和247 nm处显示两个正二色性峰，在229 nm处显示一个与酪氨酸的侧链对应的负峰^[188]。

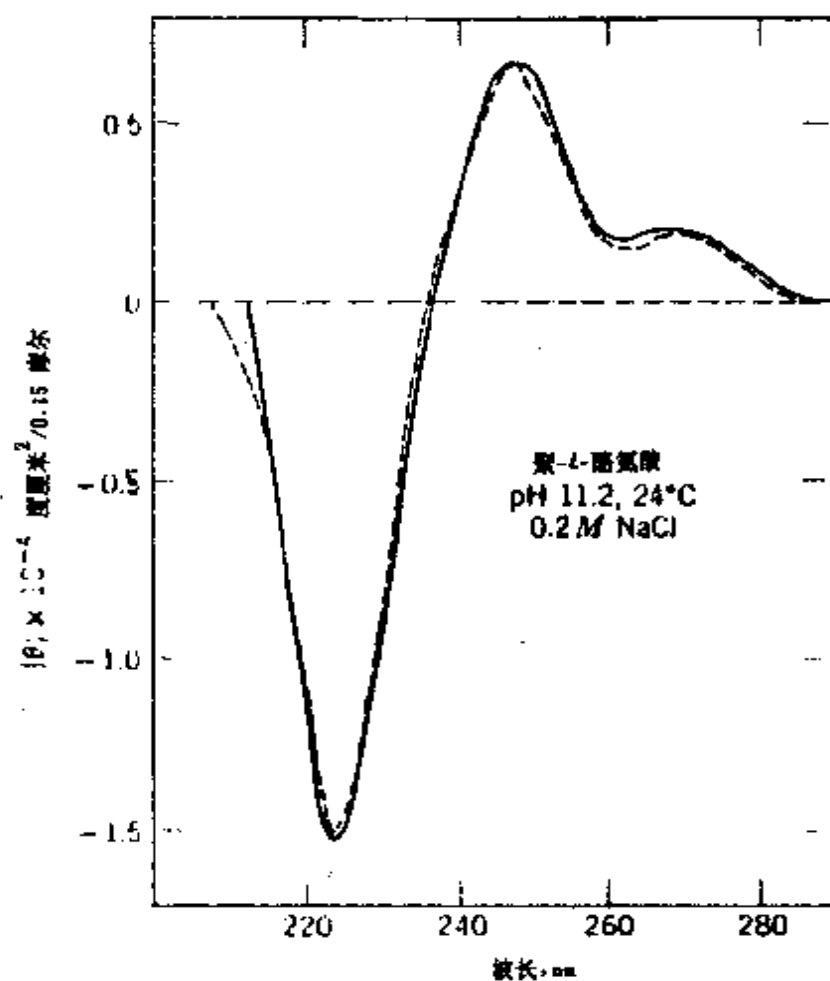
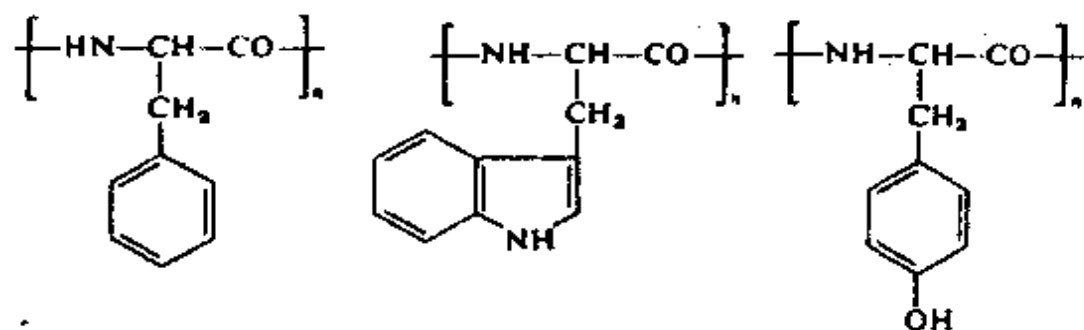


图 3.29 螺旋型聚-L-酪氨酸的 CD 谱

实线表示实测谱，虚线表示计算谱

而且在 215nm 处显示一个正肩峰和在 200nm 处显示一个强正峰。

由于脯氨酸侧链的电性跃迁与肽的跃迁强烈地重叠,这种 CD 行为明显地是对右手 α -螺旋的扭曲。

聚-L-酪氨酸螺旋的螺旋方向仍未弄清,能量计算说明右手 α -螺旋的能量低于左手 α -螺旋的能量^[189]。该结果与 UV, ORD 及 CD 研究相符^[190],但与聚-L-酪氨酸在喹啉中的偶极矩及旋转弛豫时间研究相矛盾。这些研究表明,该多肽以左手 α -螺旋存在^[191]。于是提出聚-L-酪氨酸在适合条件下,可以是左手 α -螺旋,也可以是右手 α -螺旋,而且溶剂与聚合物之间的相互作用可以使多肽从一种构型转变为另一种构型^[190]。

对 L-苯丙氨酸的单元共聚物和随机共聚物的 CD 和 ORD 研究,指出了它的 α -螺旋构象^[192-195]。在苯基发色基团显示一系列强的最大吸收的波长区(300—225nm),已经检测到弱的 Cotton 效应,并被归属存在于不对称环境中的芳香侧链发色基团。聚-L-色氨酸在乙二醇单甲醚中的 CD 研究表明了 260—300nm 有较为复杂的谱线和低于 250nm 处有两个正峰及一个负峰。260—300nm 之间的峰位置差不多与吲哚发色团的吸收峰位置相同,这样就指出了它们的起因(图 3.30)。虽然该多肽的 X 射线衍射研究说明,在固态时构象为 α -螺旋,但依赖 α -螺旋构象不能解释 250nm 以下区域的谱线。对 L-色氨酸与 L-谷氨酸- γ -甲酯的各种随机共聚物的 CD 测定清楚地表明,降低 L-色氨酸的含量时,典型的右手 α -螺旋变得越来越明显^[196, 197]。

聚-L-酪氨酸的氨基酸类似物聚-L-对氨基-苯丙氨酸也显示了强烈的芳香侧链构象效应^[198]。pH 1.08—2.56 时,这种多肽以随机盘绕存在,在 pH>2.78 时以 α -螺旋存在。

在衍生自 L-(苯偶氮基)苯丙氨酰-谷氨酸- γ -苄酯、L-对-

(对'-羟苯偶氮基)苯丙氨酸和 *N*-(3-羟丙基)-*L*-谷氨酰胺⁽¹⁹⁹⁻²⁰¹⁾ 的偶氮多肽中, 已经观察到了 Cotton 效应。这些 Cotton 效应含有可以归因为偶氮芳香发色团的二色峰。在二氧六环中, 聚-*L*-对-(苯偶氮基)苯丙氨酸及其共聚物以右手 α -螺旋存在, 在三氟乙酸

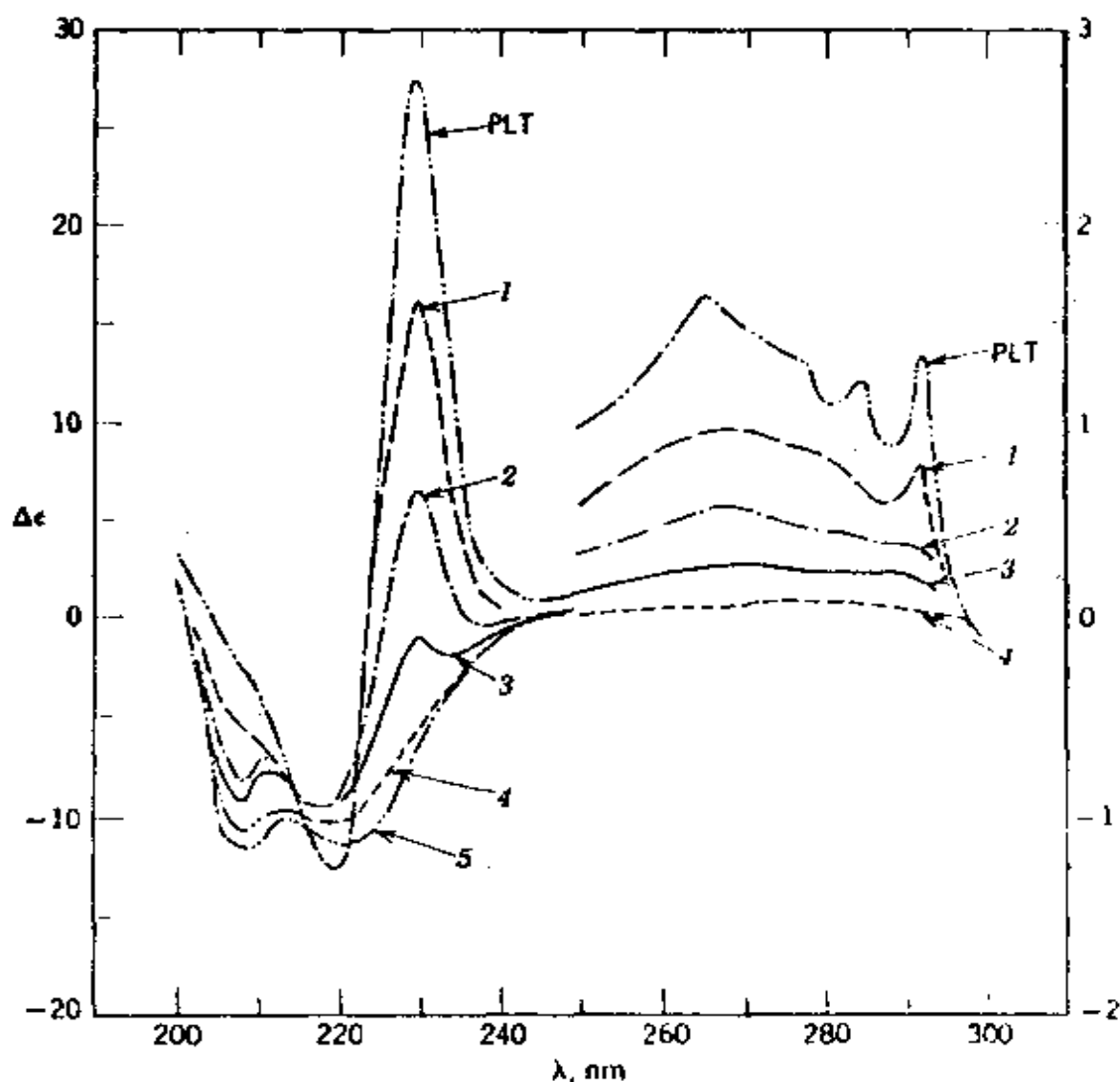


图 3.30 *L*-色氨酸和 *L*-谷氨酸- γ -乙酯共聚体的 CD 谱
250-330nm 区域是放大的图, PLT 表示聚-*L*-色氨酸, 曲线
1-5 为共聚物, 其中 *L*-色氨酸的摩尔分数分别为 0.84, 0.
68, 0.50, 0.32 和 0.16

/二氧六环混合溶剂中，以随机盘绕构象存在，而在接近纯的三氟乙酸中，以伸展的右序的聚合电解质存在。在后面的条件下，该多肽是由高度质子化的偶氮芳香基组成。这些离子性基团相互排斥，形成完全伸展的链。

在磷酸三甲酯中，聚-L-对-(对'-羟苯偶氮基)苯丙氨酸及其共聚物以右手 α -螺旋存在，在水溶液中(pH 为 10 和 11.9)，该均聚物亦以右手 α -螺旋存在。

七、随机盘绕多肽

在讨论聚 α -氨基酸的构象转化和蛋白质变性的有关现象中，“随机”或“无序”多肽的概念颇为重要^[204]。随机盘绕构象的多肽链的统计描述就是完全自由地绕单键旋转的链。按照这种模型，每个键角 Φ 和 Ψ 的任何值都具有相等的几率。理论计算表明“随机”盘绕构象多肽统计学意义上不是非常随机的，仅仅在有限的范围内绕聚合物骨架旋转的角度在能量上是有利的。对随机性的严格限制主要有：

- ① 沿共价键旋转的固有限制；
- ② 存在于骨架内或连接到骨架上的非键合原子间的 Van der Waals 相互作用；
- ③ 链骨架中极性基团的电性相互作用；
- ④ 两不同氨基酸单元上侧链间的相互作用；
- ⑤ 一氨基酸侧链与聚合物骨架之间的相互作用；
- ⑥ 聚合物和骨架间的相互作用。

根据上面的考虑，必然会想到随机盘绕多肽的光学活性和光谱性质，一般不可能象在统计模型的有限例子那样，预计是孤立

的肽发色团的光学活性和光谱性质。由于链构象中的限制，从平均意义上讲，骨架的肽发色团将处在不对称环境中，介质的微扰会不可忽略地改变发色团的排列，继而改变它的旋光。

在含不同的盘绕形成的介质的实际例子中，按照整体的观念是，随机盘绕多肽可以具有不同程度的局部次序，继而具有不同的光谱性质。必然结果是，随机链不显示单一结构，但包含结构可能性范围^[205, 206]。

随机构象多肽 UV 谱在大约 192nm 处显示一个宽带^[31]。这种谱本质上与 N 取代酰胺的谱相似，但明显不同于 α -螺旋构象多肽。根据简单酰胺化合物的计算和实验证据，192nm 处的谱带指定为 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。该结果与根据随机盘绕以氨基酸残基中缺乏规则的几何次序为特征而做出的预测相符(图 3.4)。

预计简单酰胺的紫外光谱在 210—230nm 波长范围内出现弱吸收峰，并对应于低强度 $n \rightarrow \pi^*$ 电性跃迁，与高能量的出现在 192nm 的强峰重叠，因而在 UV 谱中看不到。另外，随机盘绕多肽的紫外吸收与 α -螺旋构象多肽相比较是增色的。

随机盘绕构象多肽的 ORD 谱的特征是：分别在 205nm 和 190nm 处有一个谷和一个峰，在 197nm 处有一拐点，显示负 Cotton 效应；另外，在 232—235nm 处亦有一个小得多的 Cotton 效应。这种构象的每个残基的旋光大约是 $-1800^\circ \cdot \text{cm}^{-1}/\text{decimole}$ (见图 3.14)^[52]。该 CD 谱在大约 218nm 处显示一个弱而宽的正峰，大约 200nm 处跟一个负单峰。带电荷多肽在大约 238nm 处出现第三个二色极小吸收^[78, 207—209] (见图 3.15 和 3.16)。

当水溶液中的多肽，诸如聚-L-赖氨酸与聚-L-谷氨酸的螺旋构象转变为随机盘绕构象时，CD 谱中负的 $n \rightarrow \pi^*$ 峰转变为在 218nm 处的弱而宽的正峰，而且 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的激发裂分峰被 200nm 处

的单一负峰所取代。对随机盘绕构象多肽的 CD 谱的解释仍然模棱两可,出现在 218nm 和 200nm 处的峰被归结为出现了特殊的局部结构(一种聚-L-脯氨酸 I 型螺旋),而不是随机盘绕^[202]。已经提出,随机盘绕多肽链的 CD 谱是以在接近 200nm 处的单一负峰为特征的。正如从前面的讨论可以推论的那样,随机盘绕构象的光学特征仍有待确定^[79, 206]。

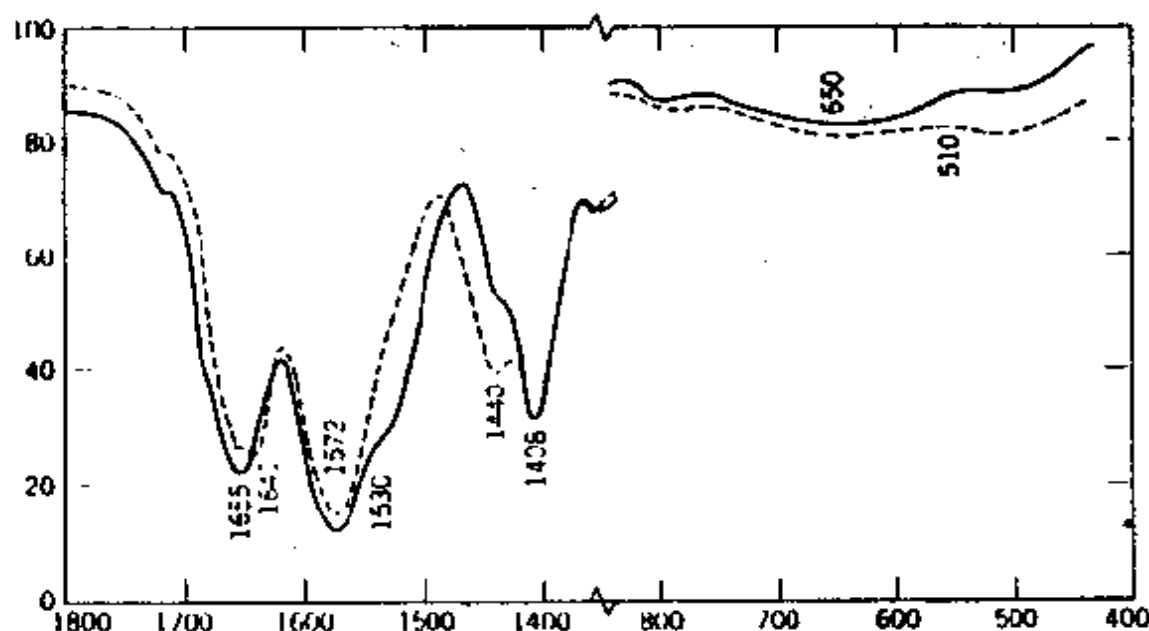


图 3.31 聚-L-谷氨酸钠(实线)及 N-酰代物(虚线)的 IR 谱

测定随机盘绕构象的聚-L-谷氨酸钠盐、聚-L-丝氨酸和聚-L-赖氨酸盐酸盐的固膜 IR 谱发现,在大约 1655cm^{-1} 处显示一宽的酰胺 I 峰,在大约 1535cm^{-1} 处显示一宽的酰胺 I 峰。不规则型的聚-L-谷氨酸钠盐的 IR 谱见于图 3.31。酰胺 I 峰与羧基重叠。前面曾讨论过,必须强调随机盘绕构象的酰胺 I 频率与 α -螺旋构象的酰胺 I 频率差别不大。但考察酰胺 V 吸收区域有可能区别这两

种构象。

正如在随机盘绕构象多肽中可以看到，在大约 650cm^{-1} 处观察到酰胺 V，当 N 氘代时，它移向 510cm^{-1} 。外消旋聚丙烯氨酸亦以随机盘绕存在，它的酰胺 V 出现在 665cm^{-1} 处。一般说来，随机盘绕构象多肽的酰胺 V 的位置在大约 650cm^{-1} 处，但很宽。这样一来，很容易与在大约 600cm^{-1} 处出现的十分尖锐的 α -螺旋的酰胺 V 相区别^[192]。

八、多肽的 β 结构

许多纤维状结构的蛋白，角朊、丝、豪猪毛，已经由 X 光衍射和 IR 谱研究表明为 β 构象^[210-212]。这些结构以 α -螺旋存在于溶菌酶和其它蛋白中^[213]。几种合成的含缬氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、异亮氨酸及苏氨酸的多肽是以 β 伸展构象存在^[73]。在一系列条件下，通过延伸、加热、或用适宜的溶剂处理，已经可以使合成多肽从 α -螺旋向 β 伸展转型。后面将解释所有 β 伸展结构的蛋白质和多肽的共同结构特征，并给出 β 伸展构象多肽的光学活性。

两种 β 结构(平行和反平行)是由伸展的和接近伸展的链组成，伴随着一个链上的 N—H 基与相邻链上的 C=O 基之间的广泛氢键。这些氢键稳定了结构，并形成能容纳侧链基的片层^[214]。

氢键方向的链间距为大约 4.8 \AA ，平行体的模式重复长度(轴向平移)为 6.5 \AA ，反平行体的模式重复长度为 7.0 \AA 。

由链间距造成的反射可以随侧链残基的大小而变化，强反射在 1.15 \AA (归结于两个氨基酸残基的肽骨架模型重复的 $1/6$) 处出现，因为组成两个残基的 6 个原子近于等空间排布。聚-L-丙氨酸的高度定向的样品显示强的与 1.147 \AA 的空间对应的子午线反

射^[215]。该结果以及与柞蚕丝及 β 角朮模型(Meyer 和 Mark 假定 β 角朮为伸展的多肽链构象^[2,6])相似,是与合成多肽出现了反平行 β 片层结构相关的。在片层中,酰胺基的原子共平面。通过绕骨架单键适当旋转,完全伸展型的链发生收缩。在相邻链间的同一平面内形成氢键。

还观察到了第三种 β 结构,即所谓的交联 β 结构,它具有与平行及反平行 β 结构相似的参数。它不同于反平行 β 结构,反平行 β 结构是由单一伸展的链往回折叠回到本身。这种交联的 β 结构的氢键与伸展方向平行,而在其它 β 结构中,氢键与伸展方向垂直^[217]。通过适当处理聚-L-谷氨酸- γ -苄酯和聚-L-天冬氨酸- β -苄酯,以及聚-O-乙酰基-L-丝氨酸^[218, 219]和聚-O-苄基-L-丝氨酸^[220, 221],聚-O-乙酰基-L-苏氨酸以及聚-O-乙酰基-别苏氨酸^[222],聚-S-苄基-L-半胱氨酸和聚-S-苯氧羰基-L-半胱氨酸^[223, 224]、聚-L-天冬氨酸- β -正丙酯^[218, 225],以及由丙氨酸和甘氨酸残基组成的序列多肽^[226, 227]的样品,已经获得了交联 β 结构的证据。

虽然对激发对于旋光强度贡献的相对重要性还有些矛盾未得到解释,但对 β 伸展构象的光学活性已有定性的解释^[228, 229]。

聚-L-赖氨酸的反平行体在溶液中的 ORD 谱显示,在 229—230nm 处(一个残基旋光 = $-6300^\circ \cdot \text{cm}^2/\text{decimole}$)一个谷,205nm 处一个峰,在接近 190nm 处另一个谷(图 3.32)^[230, 231]。

反平行 β 结构的 ORD 谱在 210—230nm 处有一个谷,随机盘绕构象多肽的旋光色散谱在 225—235nm 处也有一个弱的谷,这些事实意味着使用 233nm 处的谷作为判定 α -螺旋构象存在与否不适宜。于是,提出以较低波长处的正峰作为判别准绳,因为该峰在 α -螺旋、反平行 β 伸展和随机盘绕构象中的位置(分别为

199nm, 206nm 和接近 180nm) 有足够的差别。

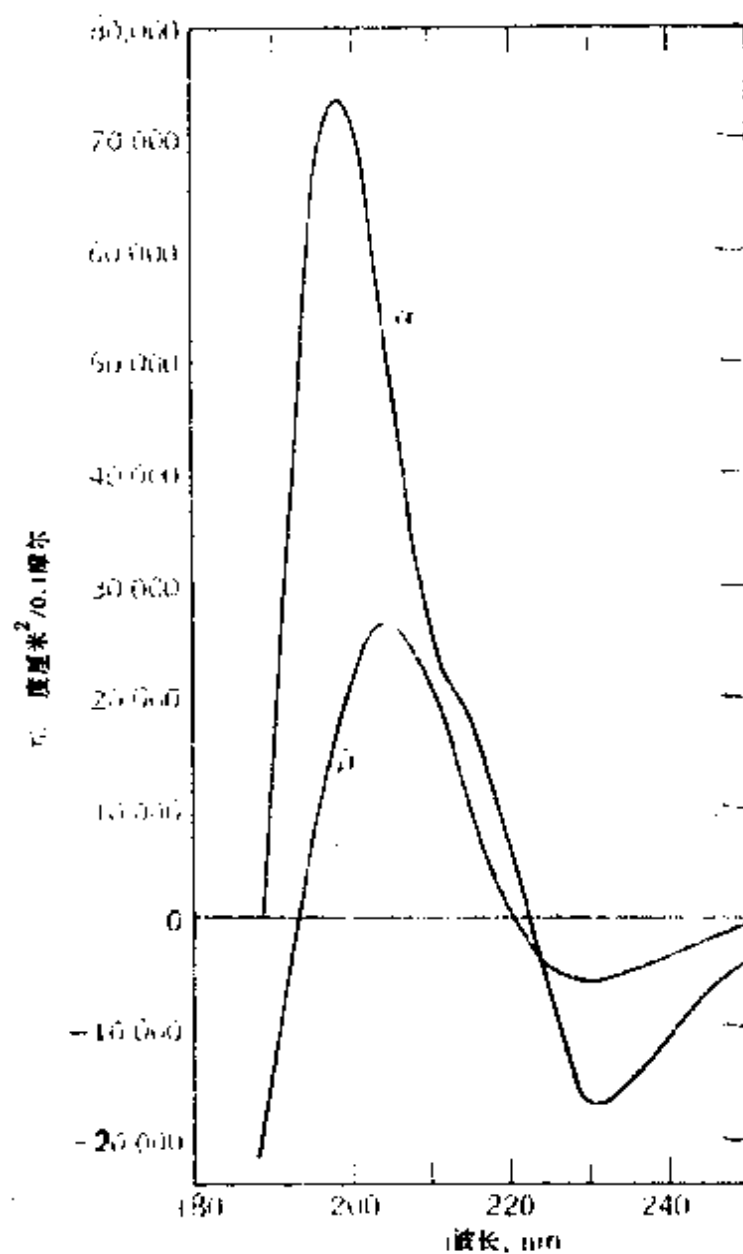


图 3.32 聚-L-赖氨酸的 ORD 谱

pH11.5 α 曲线的测定温度为 22.5°C, β 曲线是在 22.5°C 测定后溶液于 51°C 加热 15 分钟测定直至旋光不再减小为止

通过红外二色性, 已知在固态下处于反平行 β 结构的多肽膜, 给出非同一性的 ORD 谱。这些多肽被划分为 β -I 和 β -II 两大类^[233]。 β -I 型聚合物的 ORD 谱在 229–230nm 处显示一个谷, 在 205nm 处显示一个峰。与 β 伸展的聚-L-赖氨酸在溶液中的 CD 谱极为类似, β -I 型的 ORD 谱由接近 240nm 处一个谷, 210 和 215nm 间一个峰组成。

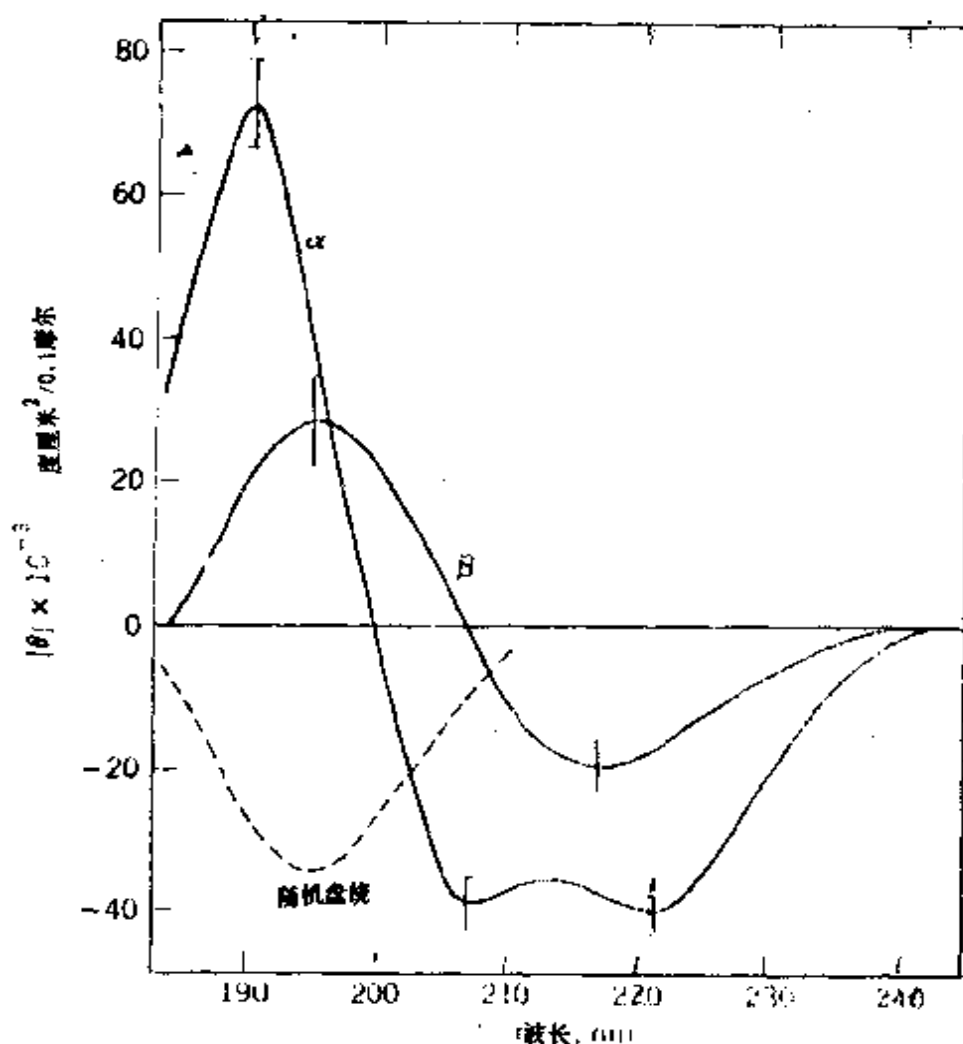


图 3.33 聚-L-赖氨酸的水溶液的 CD 谱

除聚-L-赖氨酸外, 聚-O-乙酰基-L-丝氨酸、聚-O-叔丁基-

L-丝氨酸、聚-*O*-苄基-*L*-丝氨酸和聚-*L*-缬氨酸归于 β -I 族。聚-*S*-苄基-*L*-半胱氨酸、聚-*S*-甲基-*L*-半胱氨酸、聚-*S*-苄氧羰基-*L*-半胱氨酸、聚-*S*-羧甲基-*L*-半胱氨酸及聚-*L*-丝氨酸归于 β -II 族。

β 构象的聚-*L*-赖氨酸的水溶液的 CD 谱(图 3.33)显示, 在 217—218nm 处有一负峰, 在 195—198nm 处一个强的正峰^[234,235], 后者来自 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的激发共振相互作用, 前者与 $n \rightarrow \pi^*$ 电性跃迁有关。 β 构象的多肽的紫外光谱性质的理论分析, 与聚-*L*-赖氨酸的 CD 模式到底是平行链 β 构象模式, 还是反平行链 β 构象模式尚无结论。 β 构象的低分子量聚-*L*-丝氨酸在溶液中的

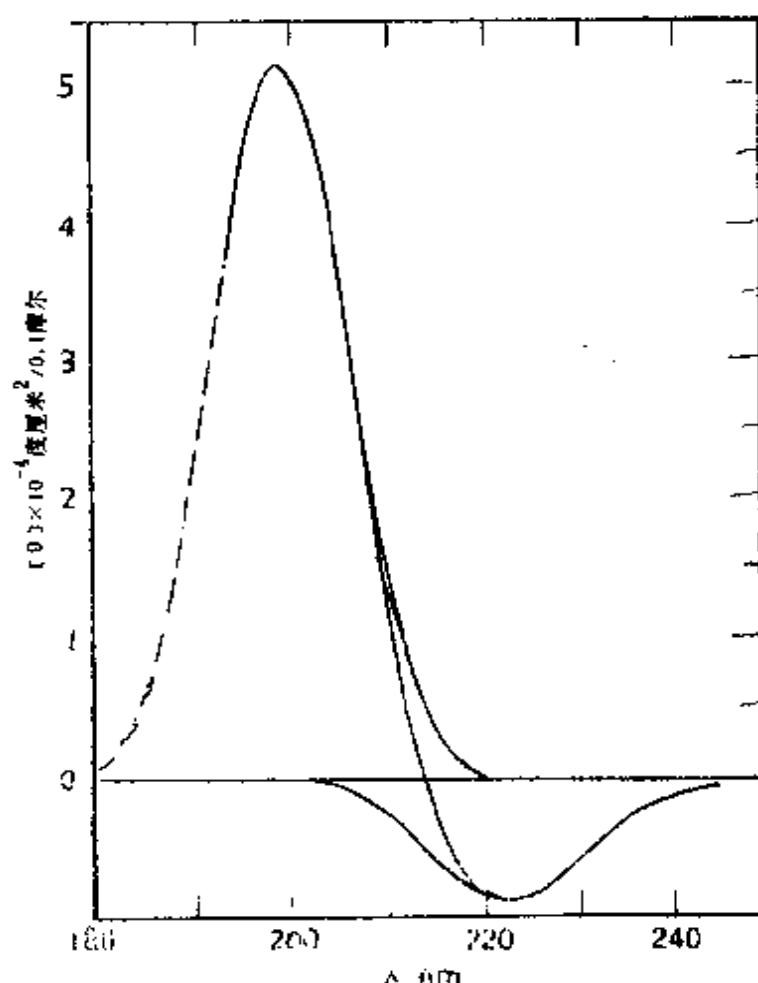


图 3.34 聚-*L*-丝氨酸在 80% TFE 水溶液中的 CD 谱

CD 谱, 在 222 和 197nm 显示速率极值⁽²³⁶⁾。由于该聚合物在研究的整个波长范围(260—190nm)缺乏侧链吸收, CD 谱中的峰可以用旋光强度和振动强度项来表征。这些数据可以作为 β 构象的参考状态加以总结。

图 3.34 和 3.35 分别表示聚-L-丝氨酸在 80% TFE 中的 CD 谱和 UV 曲线。222nm 处的峰为 $\pi \rightarrow \pi^*$, 198nm 处的正峰与由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁间的激发共振相互作用引起的跃迁有关。

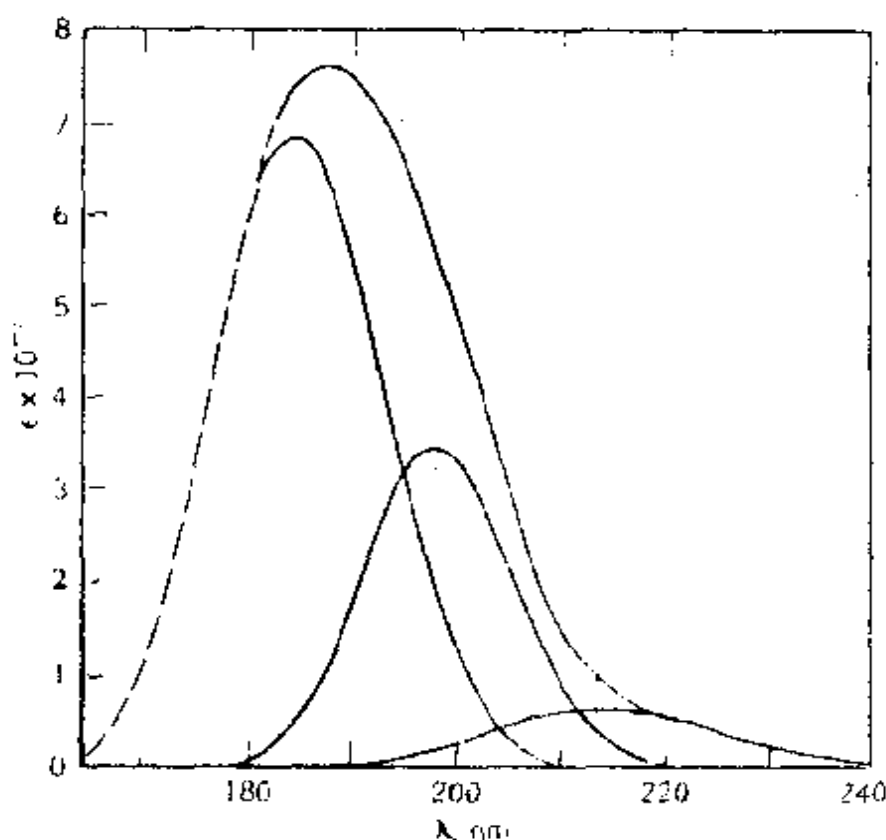


图 3.35 聚-L-丝氨酸在 80% TFE 水溶液中的 UV 曲线

多肽薄膜(通过蒸发 TFA 溶液涂膜)的 CD 谱分为两类。在第一类(B-1)中, CD 谱在 216 与 220nm 间显示一正峰, 这与溶液中 β 结构的聚-L-赖氨酸的 CD 谱相似⁽²³⁷⁾。在第二类(B-I)中, CD 谱

显示一个非常强烈的在高波长处的负峰的位移,该峰出现在大约 228nm。正二色峰出现在 198nm 处,这与聚-*S*-羧甲基-*L*-半胱氨酸在溶液中的 CD 谱中的位置相似^[238]。从 β 结构的多肽得到的 CD 谱的结果列入表 3.7。

表 3.7 β -结构多肽的 CD 峰

多肽	峰位, nm
聚- <i>L</i> -赖氨酸	
β -构型	219(-); 207(c-o); + 低于 207
α -螺旋	221(-); 209(-); 201(c-o); 191.5(+)
随机	202(-); 220-230(-)
2	216(+); 203(c-o); 196(+)
3	220(-); 212(c-o); 200(+)
聚缬氨酸	217(-); 203(c-o); 198(+)
4	28(-); 217(c-o); 203(+)
5	227(-); 213(c-o); 198(+)

c-o 代表横跨点 1: 聚-*L*-赖氨酸; 2: 聚-*O*-乙酰基-*L*-丝氨酸;
 3: 聚-*O*-叔丁基-*L*-丝氨酸; 4: 聚-*S*-苄氧羰基-*L*-半胱氨酸;
 5: 聚-*S*-羧甲基-*L*-半胱氨酸(溶液 pH 4.42)

从这些结果可以看到, β 结构多肽的 CD 谱受到起稳定化作用的侧链的作用, 以及由于侧链的位阻而产生的空间效应的强烈影响。侧链的位阻只使 β 结构骨架链的跃迁矩的方向发生小的变化。

处于反平行链 β 构象的多肽的 IR 谱的特征是, 在 1685cm^{-1} 和 1632cm^{-1} 处两个酰胺 I 峰, 这在聚甘氨酸 I 中被注意到, 以及 1530cm^{-1} 处的酰胺 II 峰^[239, 240]。以反平行链 β 构象存在的低分子量的聚-*L*-谷氨酸- γ -甲酯的 IR 谱见于图 3.36。其中酰胺 I 峰位于 1695cm^{-1} 和 1629cm^{-1} 处, 酰胺 I 峰大约在 1531cm^{-1} 处。在低频区

域, N -氘化时, 700cm^{-1} 处的强峰移向 531cm^{-1} 处的中强峰。根据频率比, $700 : 531 = 1.31$, 这些峰被指定为 β 型的酰胺 V 和 V' 峰⁽¹⁴²⁾。

表 3.8 比较了反平行 β 构象的聚- L -谷氨酸- γ -甲酯、聚- L -谷氨酸- γ -苄酯和聚- L -丙氨酸的酰胺 I, II 和 V 频率, 以及氘代衍生物的酰胺频率 V' 。在 700 至 705cm^{-1} 的狭小区域观察到反平行 β 型的酰胺 V 频率, 而在 $515-530\text{cm}^{-1}$ 区域观察到酰胺 V' 峰。

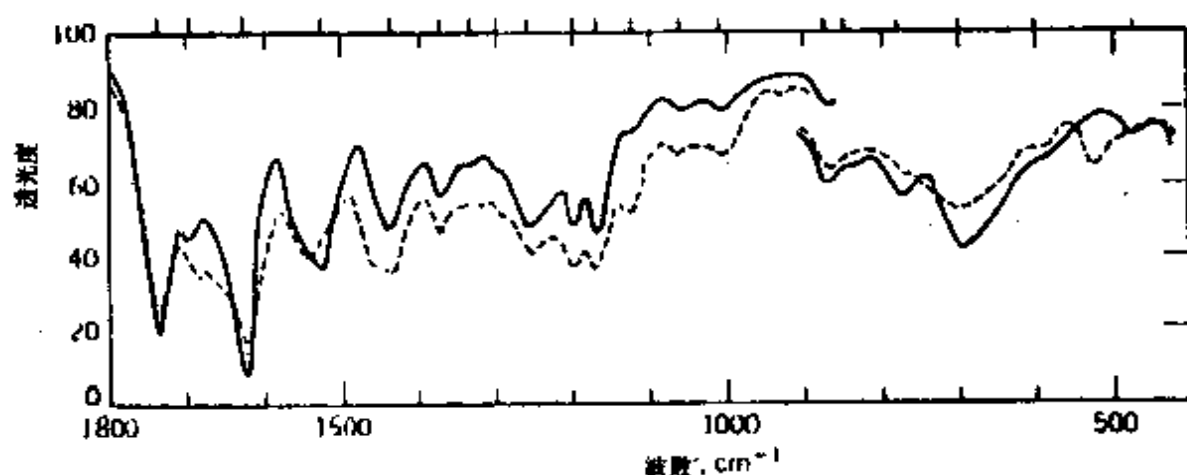


图 3.36 聚- L -谷氨酸- γ -甲酯的 IR 谱
虚线为氘代物; ($A/I=4$)

表 3.8 β -反平行多肽的特征酰胺频率(cm^{-1})

	I	II	V	V'
聚- L -谷氨酸- γ -甲酯	1629	1531	700	531
聚- L -谷氨酸- γ -苄酯	1629	1524	a	518
聚- L -丙氨酸	1632	1548	703	520

a 与苄基重叠

反平行链和平行链的 β 型二者都在 1630cm^{-1} 处显示正交的酰胺 I 峰,该峰是伸展构象的特征。不过,有可能区别这两种结构,因为平行 β 型的酰胺 I 峰出现在大约 1645cm^{-1} ,反平行链 β 型的酰胺 I 峰出现在大约 1695cm^{-1} 。 β 角朮是处于反平行 β 构象的多肽链的唯一例子^[140]。

九、构象转换

1. 螺旋-盘绕和螺旋-螺旋转换

论述了在溶液中螺旋和盘绕构象存在的证据。Doty, Blout 及同事们解释了在溶液中这两种构象可以相互可逆性地转换^[241],还确定了在蛋白质变性中这种相互转变的重要性。

螺旋构象与随机盘绕构象之间存在明显的转换,提示这种转换的协同性质类似于相变而不是简单的化学变化。如同在最低势能计算部分讨论的,转换的这种协同性质直接归因于相邻单位肽键的构象的相互依赖性。螺旋序列中第一个氢键的断裂,不改变立体化学。为了增加熵,至少需要断裂内部结构中的三个连续氢键。据此,一种构象将比另一种构象普遍有利。而且有关构象体的稳定性取决于确定多肽链的热力学可变性及环境。

已设计理论模型解释螺旋-盘绕转换的实验观察^[242-253]。方法上的主要差别似乎是选择参考状态。如 Gibbs 和 Marzio 选择螺旋构象作为参考状态,而 Zimm 和 Bragg 则选择盘绕构象作为参考状态。另外, Lifson 和 Roig 以伸展的盘绕构象为基础作为参考状态。由于这些原因,各研究组研究螺旋-盘绕转换对使用的标志的意义不一样。各种方法应根据所采用的符号的观点,独立加以思考。这里主要讨论 Zimm-Bragg^[254]和 Lifson-Roig^[255]处理。

(1) Zimm-Bragg 模型

该模型把多肽看作由螺旋和盘绕片段联合组成的链^[254]。多肽的任何状态都采用螺旋和盘绕单元的序列加以考虑。一个由 N 个单元构成的多肽，存在 2^N 种可能的状态。对每一碎片指定如下的统计权重因子，则可估计每种状态的相对贡献： $a = 1$ (unity)，用于任何盘绕单元； $b = s$ ，用于接在一螺旋单元后的螺旋单元； $c = \sigma s$ 用于接在盘绕单元后的螺旋单元； s 代表盘绕碎片转换为螺旋尾端的螺旋碎片的平衡常数。 σ 为螺旋碎片序列形成间歇时的平衡常数。应当强调，间歇之间的螺旋碎片数目必须保持常数。 s 因子取决于外部参数，例如温度、pH、溶剂组成和压力。 σ 可以被看作反映系统特征的成核参数，表征成核的难度。在这方面，螺旋-盘绕

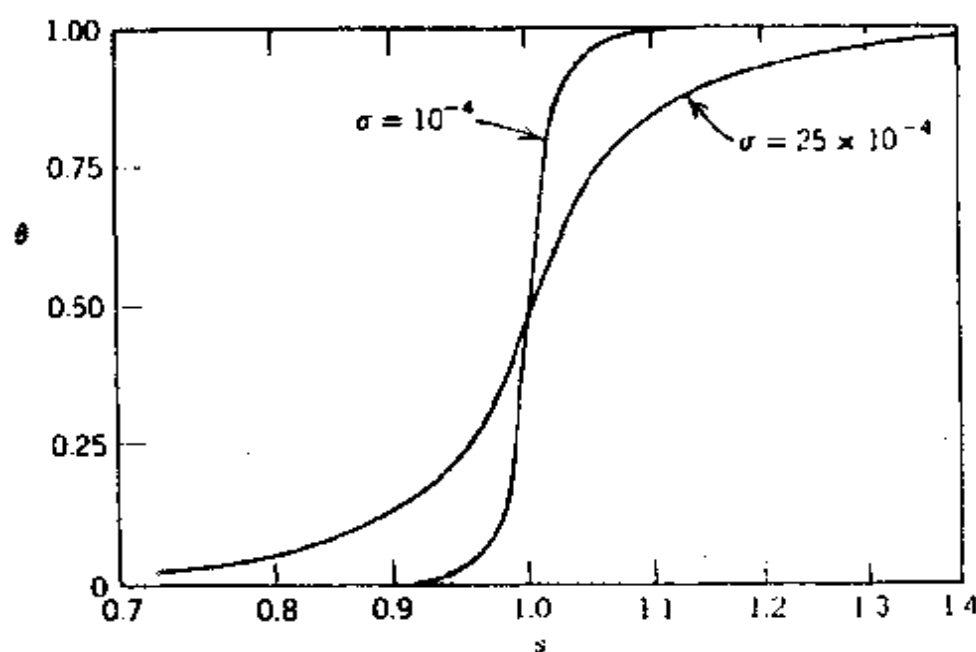


图 3.37 各种成核参数 σ

θ 是氢键分数， s 是平衡常数

转换与晶体及液体间的平衡相类似。对螺旋-盘绕转换而言, σ 永远小于 1, 常常是 10^{-1} 数量级。一旦引入了 s 和 σ 两个主要参数, 从上述假定便可得出含 n 个碎片链的分布函数。该模型的分布函数采用两种可选择的方法处理, 或作为适用于短键的求和, 或作为特征矩阵的本征值和本征向量:

$$\rho = J^* M J \quad (1)$$

其中 J 和 J^* 分别为列向量和行向量, 这种处理对于长链更加适宜。 M 矩阵是一个 $\rho \times \rho$ 级矩阵, 其中 $\rho = 2^N$ 。因此矩阵方法能适

$$A = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ \sigma s & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & s & 0 & 0 & 0 & s & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & s & 0 & 0 & 0 & s \end{vmatrix} \quad (2)$$

应远距离及最近的邻居间的相互作用。在包含远距离相互作用(本模型中 $N=3$)的情形中, 得矩阵(2)。若只考虑最近邻相互作用($N=1$), 统计权重矩阵 M 为:

$$M = \begin{vmatrix} 1 & \sigma s \\ 1 & s \end{vmatrix} \quad (3)$$

特征方程(3)的解为(4)及(5):

$$(1-\lambda)(s-\lambda) = \sigma s \quad (4)$$

$$\lambda = \frac{1}{2} \{ (1+s) \pm [(1-s)^2 + 4\sigma s]^{1/2} \} \quad (5)$$

式中 λ 表示统计权重矩阵 M 的本征值。把 M 矩阵对角化, 并代入方程(1), 得到(6):

$$\rho = \frac{\lambda_0^{-2}(\lambda_0 + s) + \lambda_1^{-2}(s - \lambda_1)}{\lambda_0 - \lambda_1} \quad (6)$$

其中 λ_0 和 λ_1 为 λ 的极大值和极小值, 并有以下的表达式:

$$\lambda_0 = \frac{1}{2} \{ (1 + s) + [(1 - s)^2 + 4\sigma s]^{1/2} \}$$

$$\lambda_1 = \frac{1}{2} \{ (1 + s) - [(1 - s)^2 + 4\sigma s]^{1/2} \}$$

对于充分长的肽链有:

$$\rho \approx \lambda_0^2 \quad (7)$$

螺旋状态中单元的平均分数由(8)式求得:

$$\bar{\theta}_h = \frac{1}{n} \frac{\partial \ln \rho}{\partial \ln s} \quad (8)$$

按照方程式(8), 通过方程式(6)的微分, 可以得到适用于任意长度肽链的一般结果。当肽链充分长时, 结果可以简化, 并由(9)式求出:

$$\bar{\theta}_h = \frac{\partial \ln \lambda_0}{\partial \ln s} = \frac{(\lambda_0 - 1)}{(\lambda_0 - \lambda_1)} \quad (9)$$

螺旋构象中单元的平均分数 $\bar{\theta}_h$ 见于图 3.37, 它是按照方程(9)作为 s 的函数计算出来的。采用 $\sigma = 0.25 \times 10^{-2}$ 和 $\sigma = 10^{-4}$ 。从这些结果可以看出, 随着 σ 减小, 螺旋-盘绕转换变得急剧。

(2) Lifson-Roig 模型^[255]

与 Zimm 和 Bragg 处理一样, Lifson 和 Roig 也使用配分函数的矩阵表示, 但矩阵元素的选择不同, 结果使得条件概率矩阵的

级数得到简化。从 Zimm-Bragg 理论中的 8 简化至 Lifson-Roig 处理中的 3。这种矩阵处理的简化，使得他们不仅能在高分子量区域得到螺旋-盘绕转换问题的解，也能在低分子量和中分子量区域求解。在 Lifson-Roig 模型中，通过指定每个肽单元为螺旋或盘绕构象状态来定义多肽链。这样一种状态对配分函数的贡献能够表示为 n 个因子的积，每个因子都是一统计学因子， u 、 v 、或 w ，它们的定义如下：

① u ，盘绕构象多肽单元的统计学因子；

② v ，螺旋构象不间歇序列的首或尾端多肽单元的统计学因子；

③ w ，螺旋构象不间歇序列(大于 2)内部肽单元的统计学因子，作为一个例子， $n=15$ 的序列可描述为 θ hhhhhcccchhcheccc，而且这种状态对配分函数的贡献可视为 θ vwwwvvuuuvvvuuuu，因子 u 、 v 和 w 表示它们所对应的事件发生的条件概率。这里的 w 与 Zimm-Bragg 模型中的 s 相对应， v 则对应于 $\sigma^{1/2}$ 。Zimm 和 Bragg 把 σ 指定为螺旋序列的始端，而 Lifson 和 Roig 把 v 指定为螺旋序列的始末两端。

把多肽单元状态的所有值加和，一旦得到了合适的配分函数，应用下面描述的三种主要途径之一，便可以对它们进行估算：

① 组合法：理论上讲，这是最直接的方法。它简单地包括计算，期望能够归纳一些这类计算。作为一种结果，最终的表示能描述一些求和。实际上，该方法最令人讨厌。

② 序列生成函数法：该法导出配分函数的精确解，而且要求的数学知识不比使用几何级数多。唯一的弊端是，结果仅适用于非常长的链。

③ 矩阵法：该法利用的事实是，矩阵的积为生成各项的和。

这样，问题被简化为找到合适的矩阵，并求积。该法导出适用于任意长度肽链的配分函数的准确表示。

在详尽讨论矩阵处理的结果之前，简要介绍序列归纳函数方法^[236]。

对 i 个螺旋状态的序列，可以写出下述表示组，这些表示是以 Lifson-Roig 给出的统计权重指定为基础的^[235]。

i	p_i
1	v
2	v^2
3	$v^2 w$
\vdots	\vdots
i	$v^2 w^{i-2}$

指定 $v=1$ ，以便表示旋转的一个位置，所以，

$$w = \exp(-\varepsilon/RT) \quad (10)$$

其中 ε 是氢键形成的能量。

于是 α -螺旋序列-归纳函数 $V(x)$ 表示为：

$$V(x) = \sum_{i=1}^{\infty} p_i x^{-i} = \frac{v}{x} + \left(\frac{v}{w}\right)^2 \sum_{i=2}^{\infty} \left(\frac{w}{x}\right)^i = \frac{v}{x} + \frac{v^2}{x(x-w)} \quad (11)$$

类似地，随机盘绕的序列-归纳函数可以表示为：

$$u(x) = u/(x-u) \quad (12)$$

当 $x=x_c$ 时，亦可表示为：

$$V(x)U(x) = 0 \quad (13)$$

把方程(11)和(12)代入(13)，得到(14)：

$$\left[\frac{1}{x} + \frac{v^2}{x(x-w)}\right] \left[\frac{u}{x-u}\right] - 1 = 0 \quad (14)$$

(14)可展开为:

$$x^3 - x^2(u + w) + x(wu - uv) + uvw - v^2u = 0 \quad (15)$$

而且螺旋状态的分數由下式给出:

$$\theta_v = \frac{\partial \ln x_1}{\partial \ln w} = \frac{w \partial x_1}{x_1 \partial w} \quad (16)$$

这与 Zimm 和 Bragg 的结果相同(见方程 7 和图 3.37)。

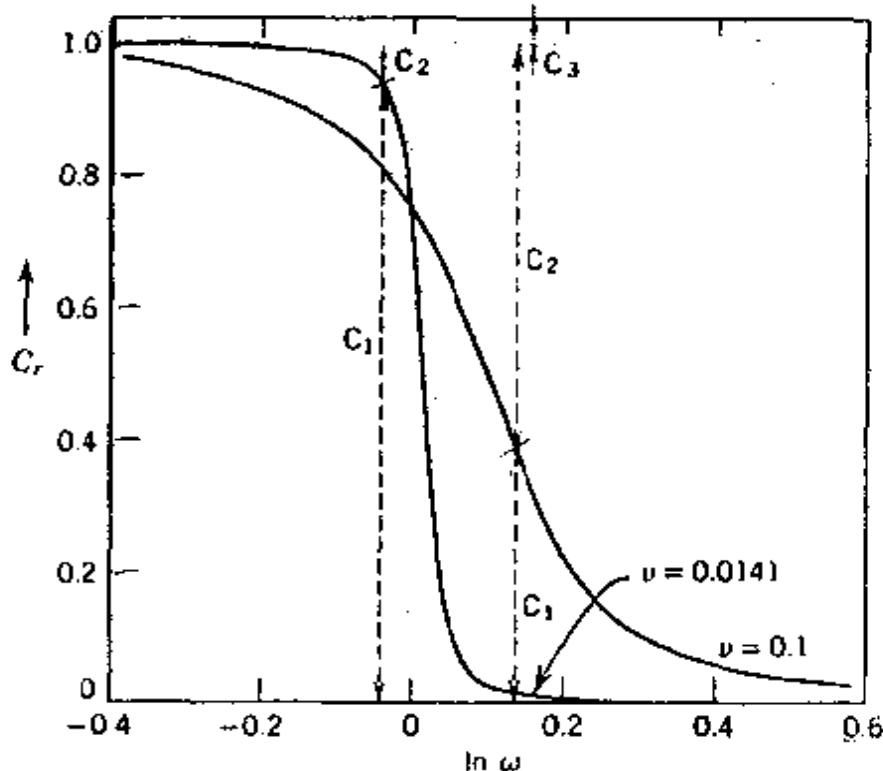


图 3.38 尾端效应对 $\ln w$ 的依赖性

回到矩阵方法。体系构型的分配函数 Q , 可由方程(17)给出:

$$Q = \int_{\phi_1=0}^{2\pi} \cdots \int_{\psi_n=0}^{2\pi} \exp[-\beta v^{(n)}] d\phi_1, \cdots, d\psi_n \quad (17)$$

式中 $\beta = 1/KT$, $v^{(n)}$ 为构型能, Φ ' S 和 Ψ ' S 分别为 N-C $^{\alpha}$ 及 C $^{\alpha}$ -C 的内旋转角。根据构型分配方程(17)的公式, 接下来的数学运算得出的最终解是长度, 这里不再重复。它可被看作决定多肽链的

肽单元状态的可变状态的变换级数。配分函数的最终表示是：

$$q = \sum_{r=1}^3 q_r \quad (18)$$

其中，

$$q_r = \lambda_r C_r \quad (19)$$

式(19)中的 q_r 为第 r 种状态的配分函数， λ_r 's 为长期项方程的解。按这种描述，整个体系能够以 $r=1, 2, 3$ 三种状态之一建立起来，每种的概率为 q_r/q 。表示式 $q_r = \lambda_r n C_r$ 指出每一单元对 q 的贡献为 λ_r ， C_r 因子表示尾端效应对配分函数 q 的贡献。这些尾端效应对 $\ln W$ 的依赖性见于图 3.38。

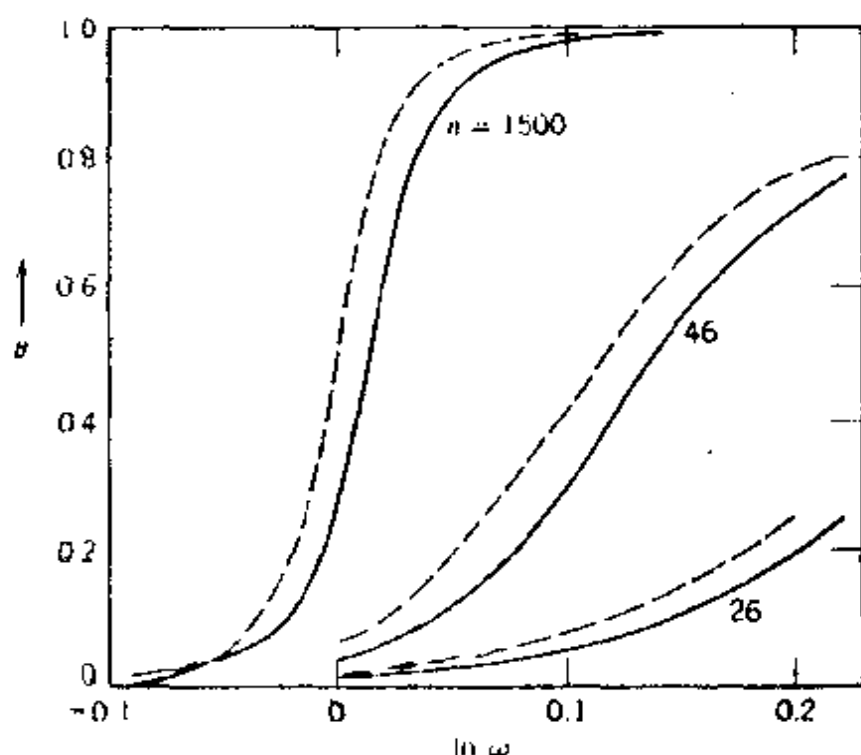


图 3.39 分子内氢键 θ 作为 $\ln W$ 的函数

$v=0.0141$, $n=26, 46$ 和 1500 ,

Lifson-Roig 模型(实线), Zimm-Bragg 模型(虚线)

氢键的相对数目或程度 $\theta = \bar{n}_{\text{bond}}/n$, 根据统计机理可以表示为:

$$\theta = \frac{1}{n} \frac{\partial \ln \varrho}{\partial \ln w} \quad (20)$$

其中 \bar{n}_{bond} 表示分子内氢键的平均数。根据方程(18)的结果, 方程(20)可以改写为:

$$\theta = \sum_{r=1}^3 \frac{\theta_r \varrho_r}{\varrho} \quad (21)$$

式中的 θ_r 由(22)式给出:

$$\theta_r = n^{-1} \frac{\partial \ln \varrho_r}{\partial \ln w} \quad (22)$$

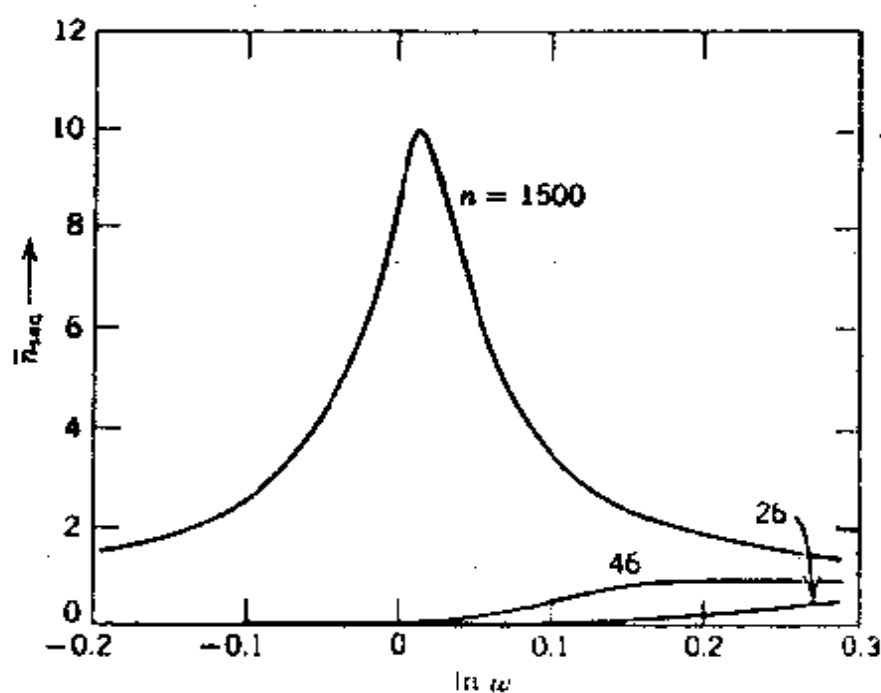


图 3.40 螺旋序列 n_{hel} 的平均数对 $\ln w$ 的依赖性

$v=0.0141$, $n=26, 46$ 和 1500

另一方面，一螺旋序列的算术平均长度 \bar{l}_s 由下式求出：

$$\bar{l}_s = (n_{\text{bond}} + 2\bar{n}_{\text{seq}})/(n)_{\text{seq}} = \theta/\eta + 2 \quad (23)$$

其中 \bar{n}_{seq} 表示在一序列中至少具有两种螺旋状态的螺旋序列的平均数，而且 $\eta = \bar{n}_{\text{seq}}/n$ 。 $2\bar{n}_{\text{seq}}$ 项表示螺旋状态中起始和终止每一序列的两个非键合单元。根据导出方程(20)，(21)和(22)的相同理由，

$$\eta = \sum_{r=1}^3 \frac{n_r \rho_r}{\rho} \quad (24)$$

其中，

$$n_r = n_r^0 (1 + n^{-1} \eta / r) \quad (25)$$

而且， n_r 表示第 r 种状态下，螺旋序列的相对数目。

作为概括，将 θ 和 $\ln w$ 的关系及 \bar{n}_{seq} 与 $\ln w$ 的关系分别表示在图 3.39 和 3.40 中。

2. 转换动力学

由于转换中所包含的步骤很多，速度很快，动力学过程的详细分析颇为困难。由于快速反应技术的应用，例如，吸声和温度突变方法，使有可能获得该过程的动力学数据。

现在从生长过程的一般化状况开始讨论⁽²⁵⁷⁾。 $cch \xrightleftharpoons[k_B]{k_F} chh$ 其中 k_F 表示一残基从盘绕状态转换成螺旋状态的速率常数， k_B 为逆过程的速率常数，且 $k_F/k_B = s$ 。在转换的中点， $s=1$ ，所以 $k_F = k_B$ 。有螺旋核化和盘绕核化两种可能的核化过程：(螺旋核化， $ccc \rightarrow chc$ ；盘绕核化， $hhh \rightarrow hch$)。与 σ 有关的平均弛豫时间 T^* 可由下式给出：

$$\frac{1}{T^*} = k_F [(s-1)^2 + 4\sigma] \quad (26)$$

弛豫时间被定义为实际值和被减小为其原始值的 $1/e$ 的平衡

值间的差异所需要的时间。在转换中点, $s=1$, T^* 处于极大值^[258]。

$$T_{max}^* = \left(\frac{1}{k_F}\right)4\sigma \quad (27)$$

正如图 3.37 所示,随着 σ 值减小,转换的陡度增大。在转换中点,假定 $k_F=10^{10}\sim 10^{11}\text{s}^{-1}$, 并采用 $\sigma=10^{-4}$, 发现 $T_{max}^*\approx 10^{-7}\text{s}$ 。定量的 k_F 和 σ 不容易通过实验确定。而 T^* 值通过跟踪螺旋度 θ 与时间的分数变化,可以实验求得^[258]。

$$\frac{1}{T^*} = \frac{1}{\Delta\theta} \left(\frac{\partial\theta}{\partial t} \right)_{t=0} \quad (28)$$

其中 $\Delta\theta=\theta_\infty-\theta_0$, $(\partial\theta/\partial t)_{t=0}$ 为 θ 在 $t=0$ 时的瞬时变化。由于光学活性对构象变化比较敏感,故测定光学活性的变化可以跟踪 θ 的变化。

前面提到,研究螺旋-盘绕转换需要特殊技术。弛豫方法可用于反应时间短至 $5\times 10^{-5}\text{s}$ 的场合^[259]。在这些技术中,通过突然变化其外部的可变状态(温度、压力、pH、电场等等)来干扰体系的平衡。若外部可变状态的变化速度快到可以与被研究的反应速度相比拟,则体系将处于非平衡状态,达到新的平衡所需要的时间,从而可被测出。

弛豫方法中使用的技术可分为单纯取代和周期性干扰^[260]。以这些技术为基础的结构阐述,不包括以分子量分布为基础的效应。低分子量碎片显示明显不同于高分子量碎片的响应是可能的。

单纯取代技术的例子包括温度突变法和 pH 突变法。温度突变法,通过高压电容器放电,在几微秒之内,温度升高 $5\sim 10^\circ\text{C}$ ^[260]。该法用来研究过聚-L-谷氨酸的螺旋-盘绕转换^[261]。pH

突变法是利用 pH 的影响。通过升高温度降低 pH, 降低 pH 所产生的影响比升高温度来得大。该法用来研究过聚-L-酪氨酸的侧链对螺旋-盘绕的转换速率的影响^[262]。

使用周期性干扰法, 得到令人鼓舞的结果。超声波吸收法, 就是这样的方法。由于化学弛豫效应影响体系的绝热压缩系数, 结果对音速产生复杂的贡献, 故可以观察到来自于超声波吸收的化学弛豫效应。与上述效应相联系的速度分散和声音吸收, 能用于测定化学弛豫时间^[263]。曾使用该法测定聚-L-赖氨酸的弛豫时间^[264, 265]。虽然由于实验数据准确度的限制, 难以按照动力学的基本步骤详细考察弛豫时间, 但计算 k_f (上述方程中氢键形成的速度常数) 仍然可能^[263]。温度从 20°C 至 36°C, 得到的 k_f 值为 2.0 至 $3.0 \times 10^{10} \text{s}^{-1}$ (取 $\sigma = 2 \times 10^{-4}$)。对于由扩散控制的氢键形成, 这些是合理值。

研究螺旋-盘绕转换的另一周期性技术是介电弛豫^[257, 263]。Schwarz 和 Seelig 研究了一个外加电场对聚-L-谷氨酸- γ -苄酯螺旋-盘绕转换的影响^[257]。结果表明, T_{max}^* 为 $5 \times 10^{-7} \text{s}$, 与理论符合得较好。取 $\sigma = 0.4 \times 10^{-4}$, 得到的 k_f 值为 $1.3 \times 10^{10} \text{s}^{-1}$ ^[263]。该结果对于螺旋成长反应是受扩散控制这样一种想法给予了支持。Schwarz 还计算了电场对转换的影响, 并发现 200kV/cm 的电场引起的 θ 从 0.2 变到 0.8。这是一个大的影响, 并是转换的强烈合作性指征。

3. 转换的热力学

下面考察螺旋盘绕构象转换的热力学方面。参数 S 表示为 (29) 式:

$$s = \exp(\Delta F_{h \rightarrow c}^{\circ}/RT) \quad (29)$$

式中 $\Delta F_{h \rightarrow c}$ 表示从螺旋向盘绕转换的每个残基的自由能变化, 残基均处于标准状态。同时, s 应是温度的函数。在 T_c (转换温度) 附近的狭小温度范围内, s 可视为与温度呈线性关系。在 T_c 这一点上, $s=1$ ⁽²⁶⁶⁾。

$$s - 1 = - (\Delta H_c^0 / RT^2) (T - T_c) \quad (30)$$

或

$$\Delta T = T - T_c = - (RT^2 / \Delta H_c^0) (s - 1) \quad (31)$$

其中标准转换焓 ($\Delta H_c^0 = \Delta H_{h \rightarrow c}^0$), 是与螺旋“熔化”过程有关的焓。通过 ΔH_m^0 (量热转换焓的标准值) 的量热测定, 原则上将提供包括在转换中的参数的直接评估。

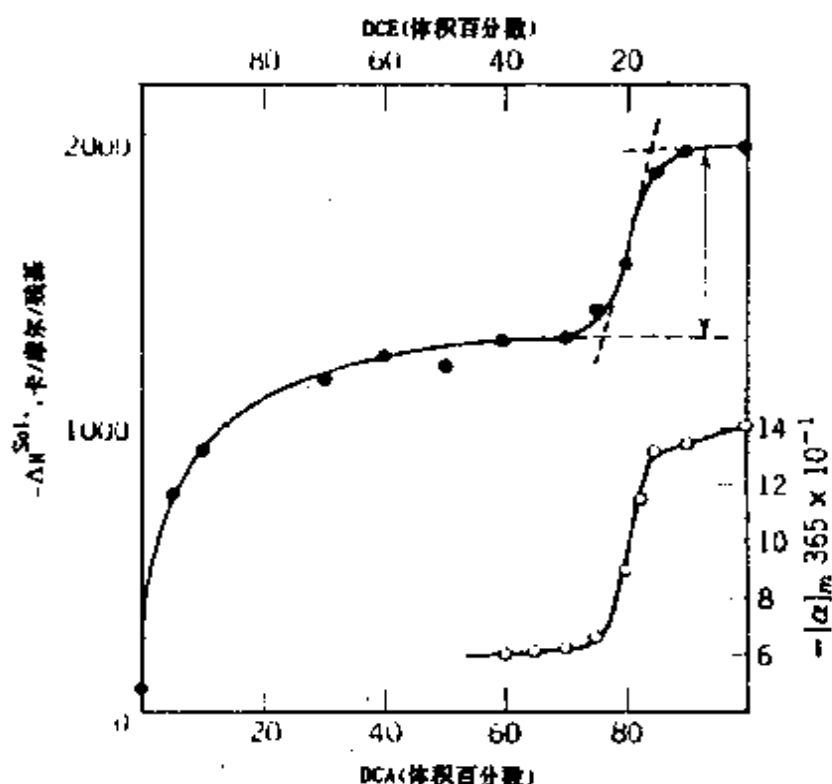


图 3.41 聚-L-谷氨酸- γ -苄酯的溶解热(点)和旋光值(圈)

二氯乙醇(DCE)-二氯乙酸(DCA)混合溶液

转换热容的极大值 C_{max} 定义为⁽²⁶⁷⁾

$$C_{max} = \Delta H_m \left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T_c} \quad (32)$$

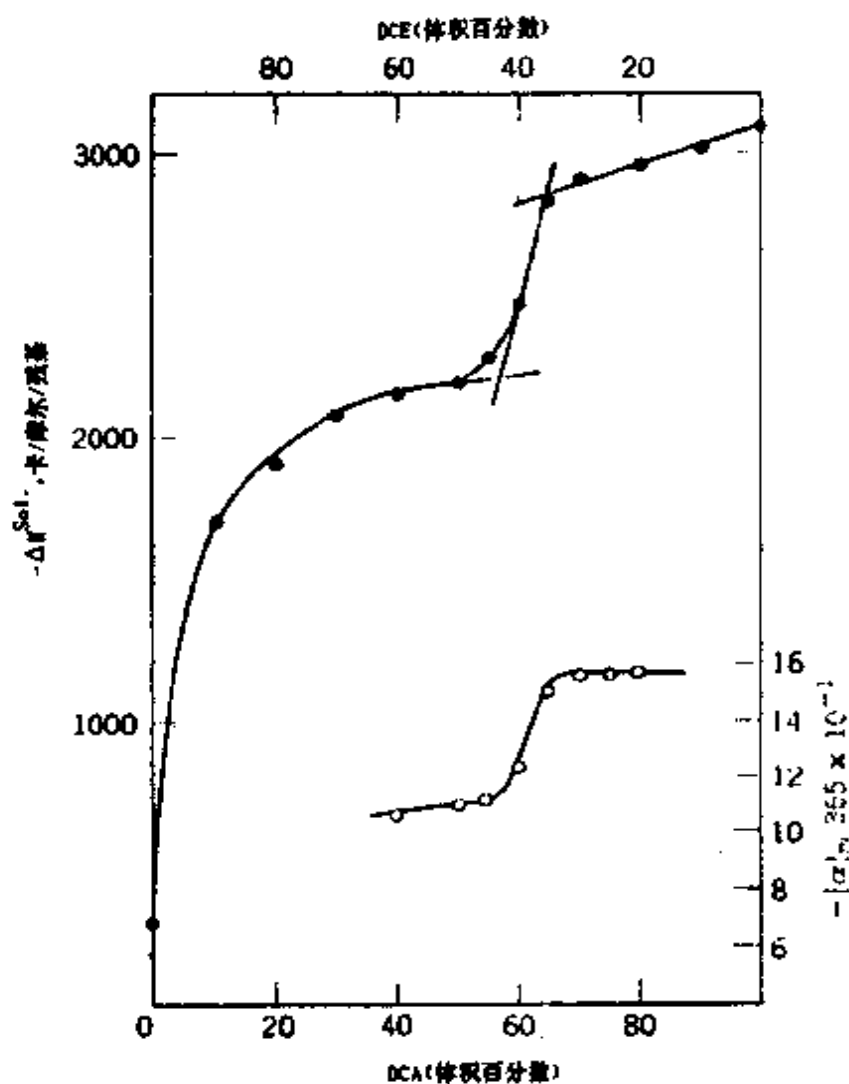


图 3.42 聚-L-谷氨酸-γ-乙酯的溶解热(点)和旋光值(圈)
DCEDCA 混合溶液

与前面一样, θ 为多肽的螺旋分数。在 T_c 点上的 θ 的温度依

赖性可以根据 Zimm-Bragg 和 Applequist^[268] 的统计处理表示。如同 Applequist 讨论过的, 根据 θ 和 T 之间的近似关系有:

$$C_{max} = (\Delta H_m)^2 / 4RT_c^2 \sigma^{1/2} \quad (33)$$

或

$$\sigma^{1/2} = [(\Delta H_m)^2 / 4RT_c^2] C_{max} \quad (34)$$

其中 R 为气体常数, T_c 为转换温度 ($^{\circ}\text{K}$)。从方程(32)和(33)容易导出在 T_c 时 θ 随温度的变化率为:

$$\left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T_c} = \frac{\Delta H_m}{4RT_c^2 \sigma^{1/2}} \quad (35)$$

所谓的 van't Hoff 热转换 (ΔH_v) 与量热转换焓 (ΔH_m) 有下述相关关系^[269]:

$$\sigma^{1/2} = \Delta H_v / \Delta H_m \quad (36)$$

因为在转换温度 T_c , $S=1$, 故 Van't Hoff 关系为:

$$\ln s = \frac{\Delta S_m}{R} - \frac{\Delta H_m}{RT}$$

简化为

$$T_c = \Delta H_m / \Delta S_m \quad (37)$$

其中 ΔS_m 是与 S 有关的构象熵变。热力学处理的最明显的贡献之一是从实验数据确定 σ 值。然而, 螺旋-盘绕转换的热力学数据甚至比动力学数据更缺乏。这是与焓微小变化的精确测定相联系的难度造成的。Calvet 微分微量热计克服了这些困难^[270]。微分微量热计被用来测定作为溶剂组成的函数的聚-L-谷氨酸酯类溶解热。结果见于图 3.41 和图 3.42。在螺旋盘绕转换的溶剂组成下(如同用旋光数据证实的), 溶解热突然增加, 使得可能估计转换的焓变。测得的转换热的值的符号及数量级的大小, 都与原先根据 Zimm, Doty 及 Iso 模型提出的理论估计相符^[271]。

涉及该研究领域的例子还很多, 例如 Karasz, O' Reilly 以及 Ackermann 对聚-*L*-谷氨酸- γ -苄酯^[267, 272-274]及其它多肽^[269]进行了一系列量热测定。他们解释了 T_c 对溶剂组成的依赖性, 并解释了与热力学发现有关的 σ 值的临界分析。

4. 聚-*L*-脯氨酸中的螺旋-螺旋转换

前面已经提到, 聚-*L*-脯氨酸 I 型和 II 型可以相互转化。Engel 应用 Zimm-Bragg 理论对聚-*L*-脯氨酸 I - 聚-*L*-脯氨酸 II 体系作了简要的理论分析^[275]。在该应用中, 繁殖步骤被取作螺旋 I 单元加到已经存在的螺旋 I 序列上去。核化步骤包括在螺旋 II 的片段之

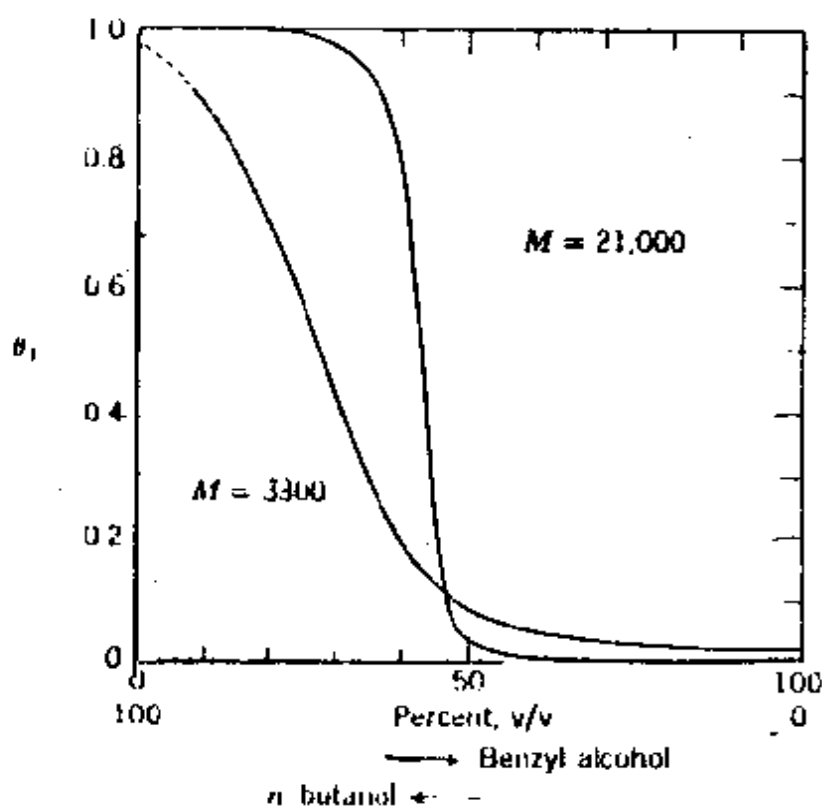


图 3.43 聚-*L*-脯氨酸 II 型变旋为 I 型为溶剂正丁醇、苄醇的函数, 表示两种不同分子量样品的跃迁

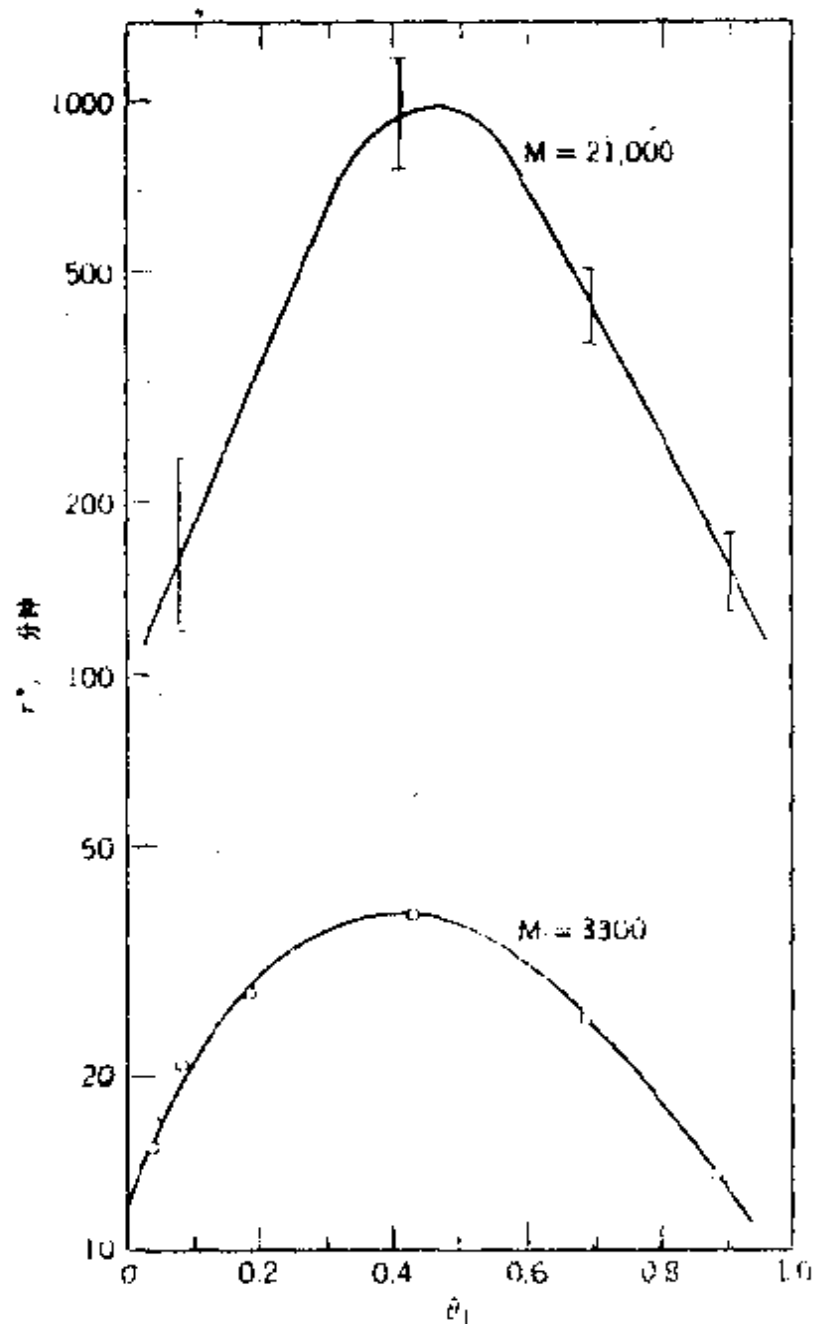


图 3.14 亮 - L- 脯氨酸 T^* 对 θ 的依赖性
73°C 改变溶剂并建立新平衡

间形成螺旋 I 单元。因核化部位的空间张力大，故核化困难。Engel 估计 σ 大约为 10^{-5} 。根据简单的弛豫实验能获得该反应的动力学

信息, 由于聚-L-脯氨酸弛豫时间长, 无须使用螺旋-盘绕转换中的技术。加入移动平衡的试剂, 处于平衡的聚-L-脯氨酸溶液会受到干扰(图 3. 43)。于是从方程(28)可得 T^* 。紧接 θ_1 变化而来的就是旋光的改变。得到 T_{max} 为 1000min。取 $\sigma=10^{-5}$, k_F 为 $10^{-1}s^{-1}$ 。可以看出, 该反应比螺旋-盘绕转换慢好几个数量级(图 3. 44)。转换曲线的分子量依赖性(图 3. 43)及平均弛豫时间对转换程度及分子量的依赖性, 表明了高度的协作性。

十、优势构象的计算

现在涉及的是多肽构象的静态方面, 即通过理论和仪器两种方法, 考虑单一的多肽单元。在发展了 α -螺旋概念后的许多年里, 研究工作都集中在通过实验解析结构。后来开始认识到这些实验技术实用性的局限性, 并一般地按照主宰分子结构的力的观点, 重新考察 Pauling 的 α -螺旋概念和多肽构象的基础方面。

这里简要介绍应用于多肽构象的能量计算的理论方法。在这样做的过程中, 将力图通过优先计算, 重复与构象平衡有关的实验数据。这样做的目的是, 既为了理解包含在构象中的因素, 又为了更好地理解进一步的讨论。必须强调, 这是根本正确的方法。尽管与实验相符得不很明显, 但它足以令人鼓舞地发展更好的实验方法。

下面通过描述肽链的一部分的简化了的图及定义这样一种模型的参数, 开始讨论多肽构象的理论考虑。给出象图 3. 44 中所示的“二肽模型”的空间描述, 可以指定多肽链骨架的构象^[276](为了比较各种旋转, 亦见表 3. 12)。 ϕ 表示绕 N-C α 键旋转、 ψ 表示绕 C α -C' 键旋转、 ω 表示绕键 C'-N 旋转。每个多肽单元的键长和键角

保持固定，因为部分双键性质，酰胺基被固定在共平面的反式构象中（绕 C^1-N 键的旋转角 ω 固定在 0° ）。所以，描述完全伸展多肽链的平面反式体的构象，是以转角 $\phi_1 = \psi_1 = \omega_1 = 0^\circ$ 为特征的。这样就明显简化了多肽构象的理论处理。

因为每个多肽单元都有两个内转角 ϕ_i 和 ψ_i ，故任何多肽的构象都可以指定 $2n-2$ 套转角来表征。原则上，若分子的内能可以表示为坐标 $E(\phi, \psi)$ 的函数， $(\phi_{i-1}, \psi_{i-1}, \phi_i, \psi_i, \phi_{i+1}, \psi_{i+1})$ 则可以计算具有特定的构象的分子的可能性。实际上，只是对于几种简单体系，即简单的随机盘绕或螺旋，这种计算才是满意的。在这些简单体系中，主要的相互作用常常只限于最近邻之间或相互挨得很近的原子之间。这样，相连接的键的相互取向，可以按照最近邻之间或链中的残基之间的相互作用描述。

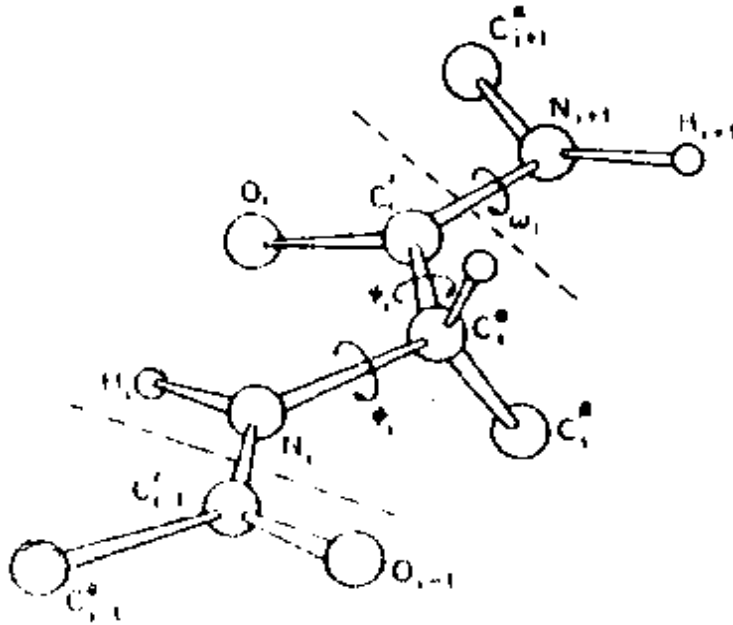


图 3.45 两个多肽残基的投影图

多肽键单元用虚线表示，指出了骨架原子的转换和内旋转

一旦根据前面的描述,设计了合适的模型,则必须详细说明对描述这样一种体系的势能函数的可能贡献。若体系是不受干扰的随机盘绕的肽链,那么对势能函数的可能贡献可以描述如下:

① 固有的扭曲势能对共价键有贡献;

② 骨架内或直接连接到骨架上的非键合原子间的范得华相互作用;

③ 链骨架上极性基团的静电相互作用;

④ 两不同氨基酸单元上的各自的侧链间的相互作用;

⑤ 一个氨基酸侧链与聚合骨架间的相互作用;有时也考虑键角变形的影响。但对于不受干扰的随机盘绕,只有前三种因素对势能有主要贡献。另一方面,对于螺旋多肽,额外的因素,例如来自氢键、溶剂-聚合物相互作用(包含疏水相互作用)以及侧链与聚合物骨架之间的偶极-偶极相互作用的贡献亦应包括进来^[189, 278]。在确定多肽构象的最重要因素之中,包括空间因素。

在文献^[220, 266, 279-284]中能找到对上述势能函数有贡献的因素的详细理论处理。应再次强调,为了估计最低势能,必须同时考虑空间限制和转动势能函数。

完成了对这些合适的势能函数描述的步骤之后,通过编制程序、计算机计算、和顺次的使能量最低化,就可以估算极小势能。能量计算的结果,通常以能量等高线图的形式表示,下面给出一些典型例子。

1. 构制空间图

前面已经指出,在估计势能函数前,必须首先考虑空间效应。原因是,只有立体化学标准,如此严格地限制了多肽链自由度的程度以至于能够有效地忽略空间图的大部分,被忽略的部分

与不允许存在的构象相对应。这不仅领悟多肽的一些构象问题，并使最小势能的计算省去了许多步骤。

Pauling 和 Corey^[282]指出，由于简单的空间效应，对于有规律重复的结构(螺旋或伸展)，虽理论上可能有 36 种稳定构象，但只有 15 种是允许的。出于同样的理由，Mizushima 和 Shimanouchi^[287]又排除了另外四种构象。Ramachandran 及同事从不同的角度继续深入探讨了这个问题^[282, 283]。他们不考虑最小势能，而估算 ϕ 和 ψ

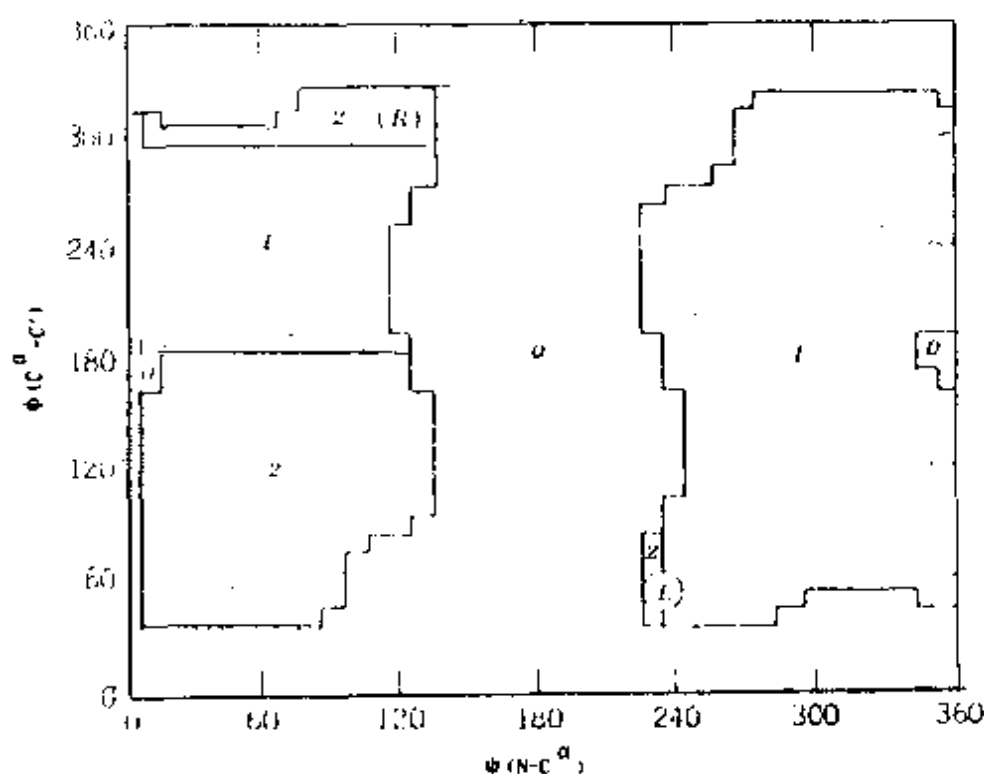


图 3.46 允许构象的能量地图

区域 1 和 2: Gly-Gly; 区域 2: Gly-Ala; 0 区域是骨架原子重叠的区域，二肽不取这种构象; R 和 L 分别表示右手螺旋和左手螺旋; 圈的大小是实验测得的螺旋内旋转角的近似范围

的范围。对于 ϕ 和 ψ 来说，两个连续的肽的残基不会挨得比范德华接触距离更近。他们选择了两套这样的接触距离，与“正常”及“超出限制”的值对应。这些值是通过图形方法确定的^[282]。有意思的是，由 Pauling 和 Corey 选出的 36 种构象，只有 5 种处于 Ramachandran 等计算的完全允许（正常）区域，12 种处在超出限制区域^[282]。

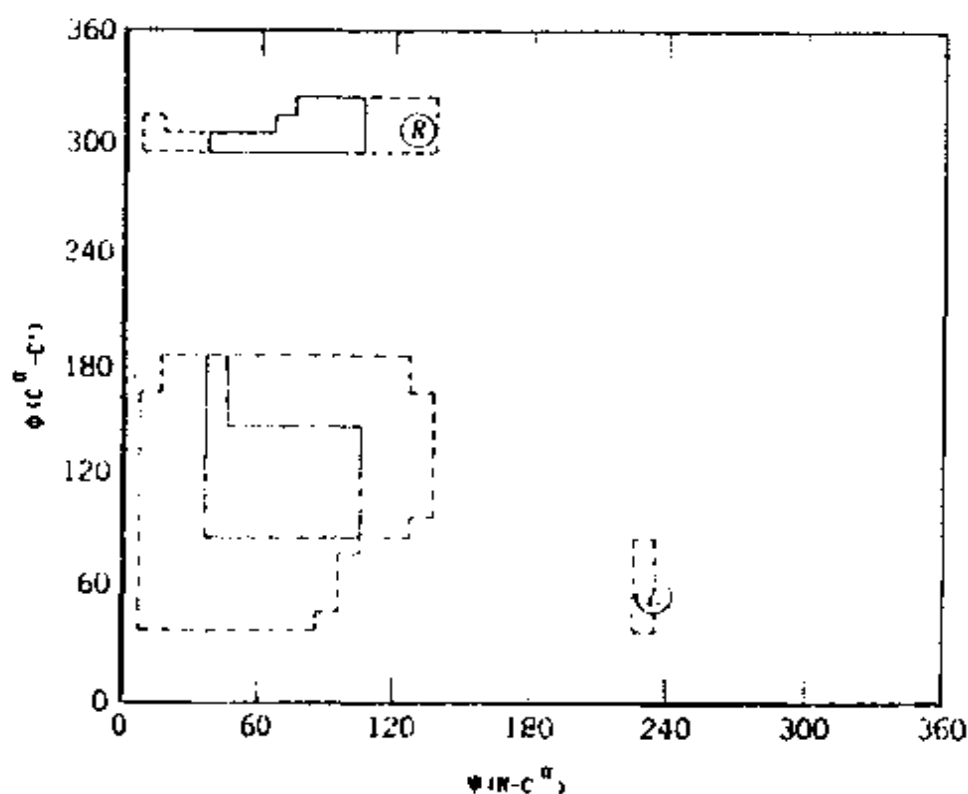


图 3.47 Gly-Val 和 Gly-Ile 的允许构象

虚线区域是 Gly-Ala 的允许构象

Scheraga 及同事把 Ramachandran 法推广到各种二肽和三肽^[279, 280]。一些典型的空图见于图 3.46—3.49。他们对侧链基的大小和形状的变化影响，讨论得极细致。值得注意的是，单

单来自于骨架原子的空间限制，允许邻接于甘氨酸残基的多肽基团取大约所有可信构象的 50%。丙氨酸侧链把它限制到 16%，缬氨酸和异亮氨酸侧链进一步把它们减少到可能构象的 6%。脯氨酸酰胺中的刚性环结构提供的空间限制如此强烈，以致于反式聚脯氨酸键只能以实验中观察到的骨胶原 I 类型的左手螺旋存在。

2. 势能函数

要计算势能函数，应同时考虑空间限制和旋转势能函数。前面已经引入了绕肽链旋转时，对势能函数的贡献，下面简单讨论这些贡献。

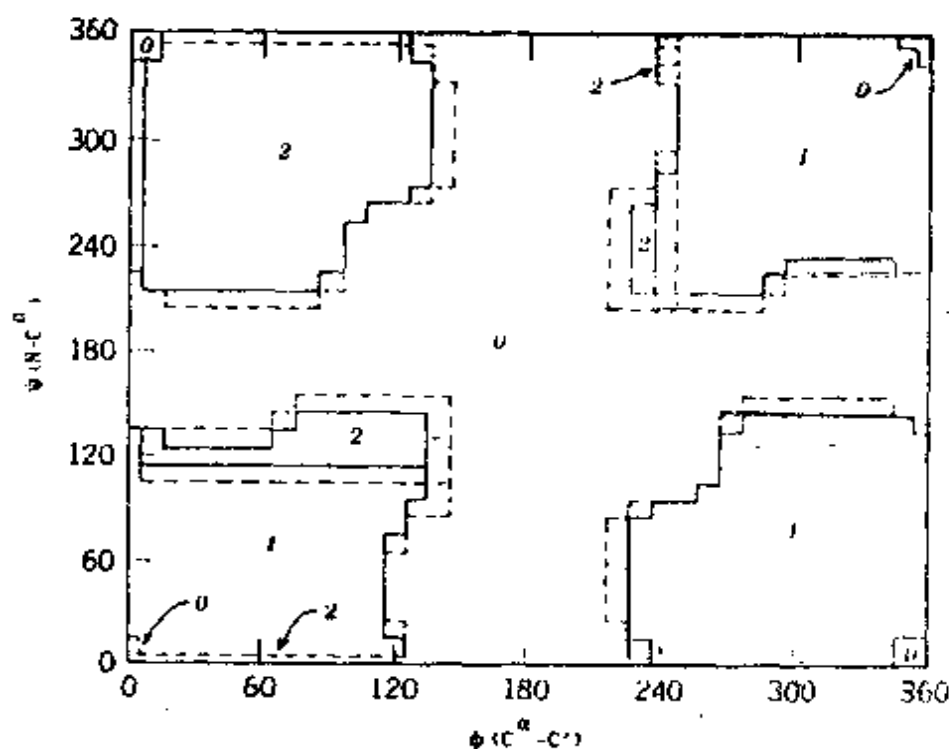


图 3.48 根据标准转换的空间图

实线部分内旋转键角 $N-C^{\alpha}-C' = 109.5^{\circ}$ ；虚线部分

键角 $N-C^{\alpha}-C' = 112^{\circ}$

极大值^[288]。以这些数据为基础, 绕 $C^\alpha-C$ 键旋转的能垒被假定为三重。极小值在 $\Psi = 0^\circ, 120^\circ$ 和 240° 。能垒高度从 0.5 至 1.3 千卡/克分子。而 Scott 和 Scheraga^[289] 估计的平均值为 1.1 Kcal/mol。Brant 和 Flory^[277] 使用的能垒则为 1.0 Kcal/mol。 $C^\alpha-C^1$ 键的扭转势能函数表示为:

$$V(\Psi) = \frac{1}{2}v_\Psi^0(1 - \cos 3\Psi)$$

式中, v_Ψ^0 为扭转能垒高度 (0.05 Kcal/mol)。

由于缺乏适宜的类似小分子的实验数据, 使得估计 $C^\alpha-N$ 键的扭转能垒更加困难^[277, 278]。根据可以利用的一些小分子的微波数据及肽键 50% 双键性能的假定, Flory 和 Scheraga 两人都估计绕 $C^\alpha-N$ 键的扭转势能贡献为三重, 能垒高度 V^0 在 1.0 与 2.0 Kcal/mol 之间。 $C^\alpha-N$ 键的三重扭转势能函数的优势形式由下式给出:

$$V(\Phi) = \frac{1}{2}v_\Phi^0(1 + \cos 3\Phi)$$

虽然还缺乏关于扭转势能的知识, 但扭转能对总转动势能的贡献不大或至少不是决定性的, 这一点看起来比较肯定。例如 De-Santis 及同事的绝大多数计算工作都完全忽略 $C^\alpha-N$ 扭转势能^[290]。

(2) 范德华相互作用

根据在确定多肽构象时, 空间因素十分重要这样一种观念, 该领域中的研究人员已经小心地注意了所有可以得到的势能函数。然而, 由于定义所包含的参数所固有的模棱两可和可用于已有的势能函数的实验数据难以获得, 所以严格处理这一论题是困难的。

Scheraga 和 Flory 两个研究组都试图运用两种不同的势能函数①：6-指数函数（或所谓的 Buckig-ham 势能）；②：6—12 势能函数（或 Lennard-Jones 势能）。修改的 6-指数函数^[289-291]由下式给出：

$$V_{ij} = A_{ij} \exp(-b_{ij}r_{ij}) - (C_{ij}/r_{ij}^6)$$

其中 r_{ij} 表示原子 i 和 j 中心间的距离。根据 Pitzer 提出的原子极化度和最外电子层的有效电荷数 N_{eff} 使用 Slater-Kirkwood 方程估计了参数 C_{ij} 的值^[292]。大部分原子对都得不到可信的 b_{ij} 值。根据 Amdur 及同事的分子束散射研究^[293, 294]得到的有限信息，Brant 和 Flory 取 $b_{ij} = 4.60$ ^[277]。令 V_{ij} 在距离 r_{ij}^0 等于相互作用空间的范德华半径的总和时为极小，求得参数 a_{ij} 。另外，Lennard-Jones 6—12 势能函数由下式给出：

$$V_{ij} = d_{ij}/r_{ij}^{12} - e_{ij}/r_{ij}^6$$

式中 d_{ij} 和 e_{ij} 分别对应于 6-指数函数中的 a_{ij} 和 c_{ij} 。两个方程中第一项都表示在短距离中空间重叠造成的排斥力，第二项表示在长距离中两原子间的吸引力，并有时称 Londo 色散力。Flory 及同事考察了这些方程在多肽构象分析中的正确性，并指出没有真正正当的理由能适用于 Lennard-Jones 6—12 势能函数。但包括 Flory 及同事^[295]与 Scheraga 及同事^[189, 278]在内的越来越多的人一直在使用 Lennard-Jones 势能函数。正如 Scheraga 指出的，该势能函数被优先使用，首先是由于编写计算程序时它有明显优点，而不是在表示范德华相互作用的任何固有优越性。

Liquori 及同事^[290]使用两种方程。在决定到底使用何种方程时,根据所包含的成对出现的相互作用类型而定。例如,对于 C-C 相互作用,他们优先使用 Lennard-Jones 势能函数,而对于非键原子间的其它成对出现的相互作用,他们优先使用 6-指数函数。

(3) 静电相互作用

骨架链上极性酰胺基间的偶极-偶极相互作用的贡献,一直被忽略。Brant 和 Flory^[277]检验了该影响在构象能计算中的内涵,并通过比较特征无因次比 r^2_0 / nl_p^2 的计算值与所得的实验值,说明了它的重要性^[296]。这里的 r^2_0 表示头尾距离的平方的平均值, n 为聚合化程度, l_p 为键中反式肽重复单元的 α 碳之间的固定距离,取 3.8 Å。早些时候的计算中,他们使用偶极-偶极型的势能函数(基团偶极)^[277, 287]。后来,他们使用由 Bradly 及同事们首先引入的所谓单极近似法^[298, 299](亦见于和核苷酸的势能计算有关的该论题的开创性工作^[300, 301])。通过使用部分电荷、偶极-偶极相互作用能够采用被距离 r_{ij} 隔开的部分电荷 q_i 和 q_j 之间的 Coulomb 规则型的势能函数进行计算:

$$V_{e,ij} = 332.0 \sum \frac{q_i q_j}{Dr_{ij}}$$

其中 D 为有效介电常数。Scheraga 及同事^[189, 278]采纳 Flory 的方法,并将其扩大到诸如天冬氨酸酯和谷氨酸酯一类的含侧链偶极的多肽。

(4) 氢键

Scheraga 及同事^[189, 278, 302]使用 Lippincott 和 Schroeder 修正的势能函数来描述骨架上 NH 和 CO 基之间的氢键^[303, 304]。他们指

出，在最优条件下的氢键强度的合理描述能采用 Lippincott 和 Schroeder 方程表示，但不大适用于边界条件，例如氢键极少或根本没有氢键的情形。

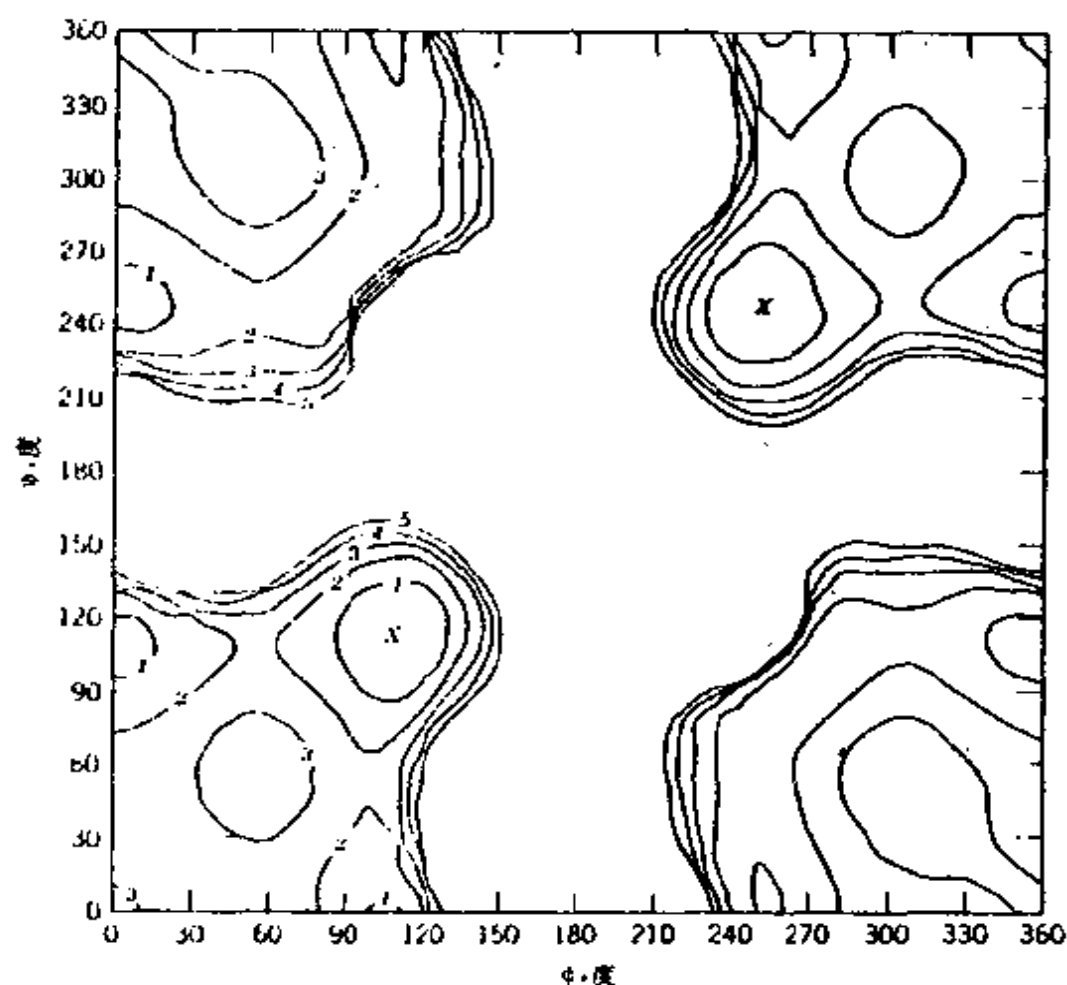


图3.50 聚甘氨酸的等高线图

最稳定构象对应于 X 表示的内旋转角，忽略电性项

(5) 其它相互作用

Flory 及同事考虑了静电相互作用能对介电常数相对高的油促溶剂的依赖性^[277, 295]。Scheraga 及助手考虑过与对 V_{et} 的影响有关的溶剂效应。在一系列论文中, Scheraga 及 Poland 讨论了相互作用的各个方面。例如水中溶质的氢键、水对多肽的键合⁽³⁰⁵⁾、随机盘绕中的疏水性键合⁽³⁰⁶⁾, 以及其它的相互作用^[307--309]。在多肽构象计算中, 这些结果已有实际使用, 在这些实际应用中, 对聚丙烯酰胺在水中的构象进行了预测及实验观察^[309]。

3. 均聚多肽的构象

下面讨论对几种孤立的单股搓绕均聚多肽采用这种理论处理所得的结果。

(1) 聚甘氨酸

已经绘出了这种多肽的作为二面角 ϕ 、 ψ 的函数的能量等高线图^[278, 290, 295]。前面曾提到的这种多肽的空间图 (见图 3. 46)。图 3. 50 为 Flory 及同事绘制的聚甘氨酸的能量等高线图⁽²⁹⁵⁾。表 3. 9 给出了二面角数据及从文献中收集到的螺旋参数。

表 3. 9 聚甘氨酸的螺旋参数和旋转角

指派	T	ϕ	ψ	n	h
α -螺旋	109.5	125	130	3.63	1.51
α -螺旋	109.5	125	130		
聚甘氨酸 I	109.5	328	120	3.07	2.70
(三重螺旋)					
伸展的反平行链	109.5	30	0	2.31	3.60

$T; NC^{\alpha}$ $\phi; C^{\alpha}N-C^{\alpha}$ $\psi; C^{\alpha}-C'$

虽然在 Scheraga, Flory 及 Liquori 等的等高线图之间很少有相似点, 但从这些图中得到的对应于右手及左手螺旋区域的二面角相互符合得极好 (Flory 数据除外)。这些数据也与表 3.10 中的结晶学及其它的实验数据符合得很好。这些图的明显特征之一是图中有完全的中心对称。

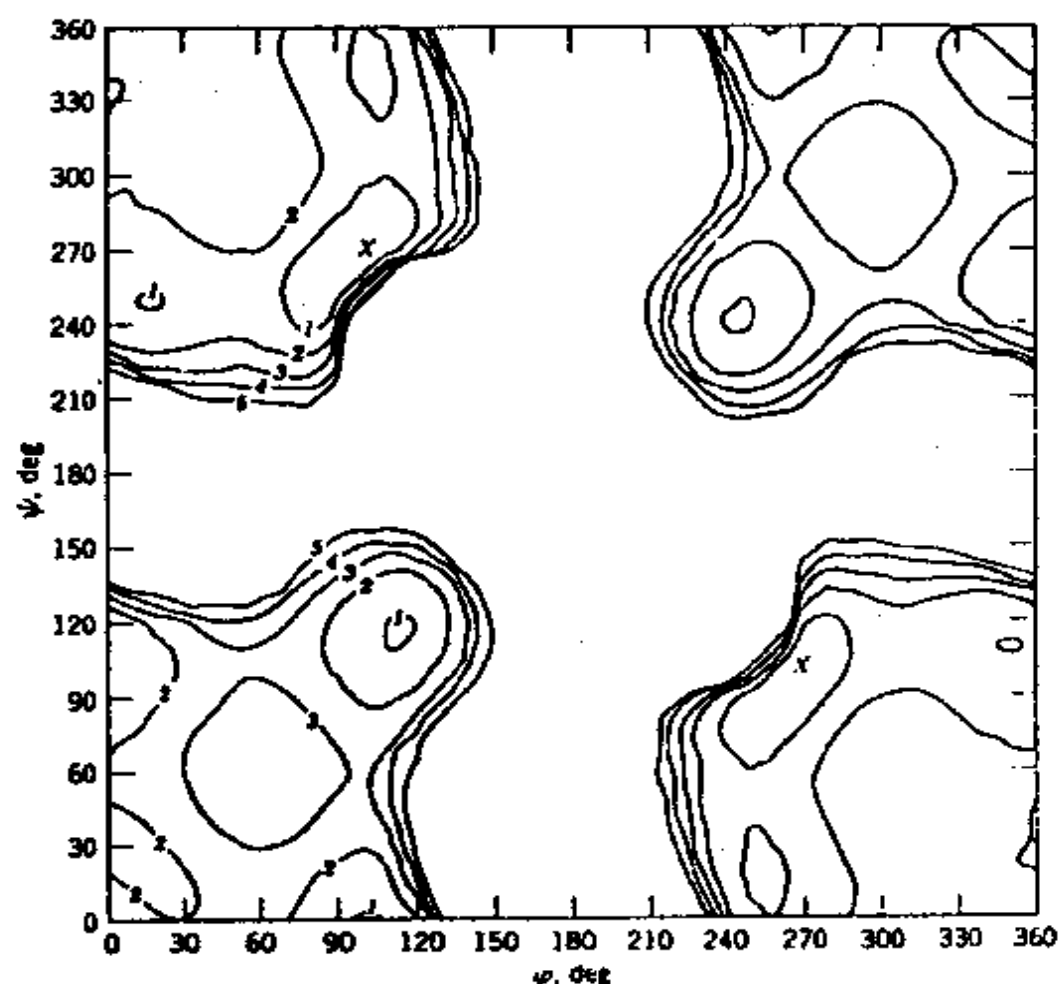


图 3.51 续图 3.50, 包括电性项

在解释与聚甘氨酸的螺旋构象的稳定性有关的上述结果时,出现过两种相反的观点。采纳 Schellman 的观点^[245], Scheraga 及同事对结果的解释是^[280, 314], 当无侧链存在时, 例如在聚甘氨酸中, 左手和右手螺旋(基于空间的理由)具有相等的可能性。于是在图

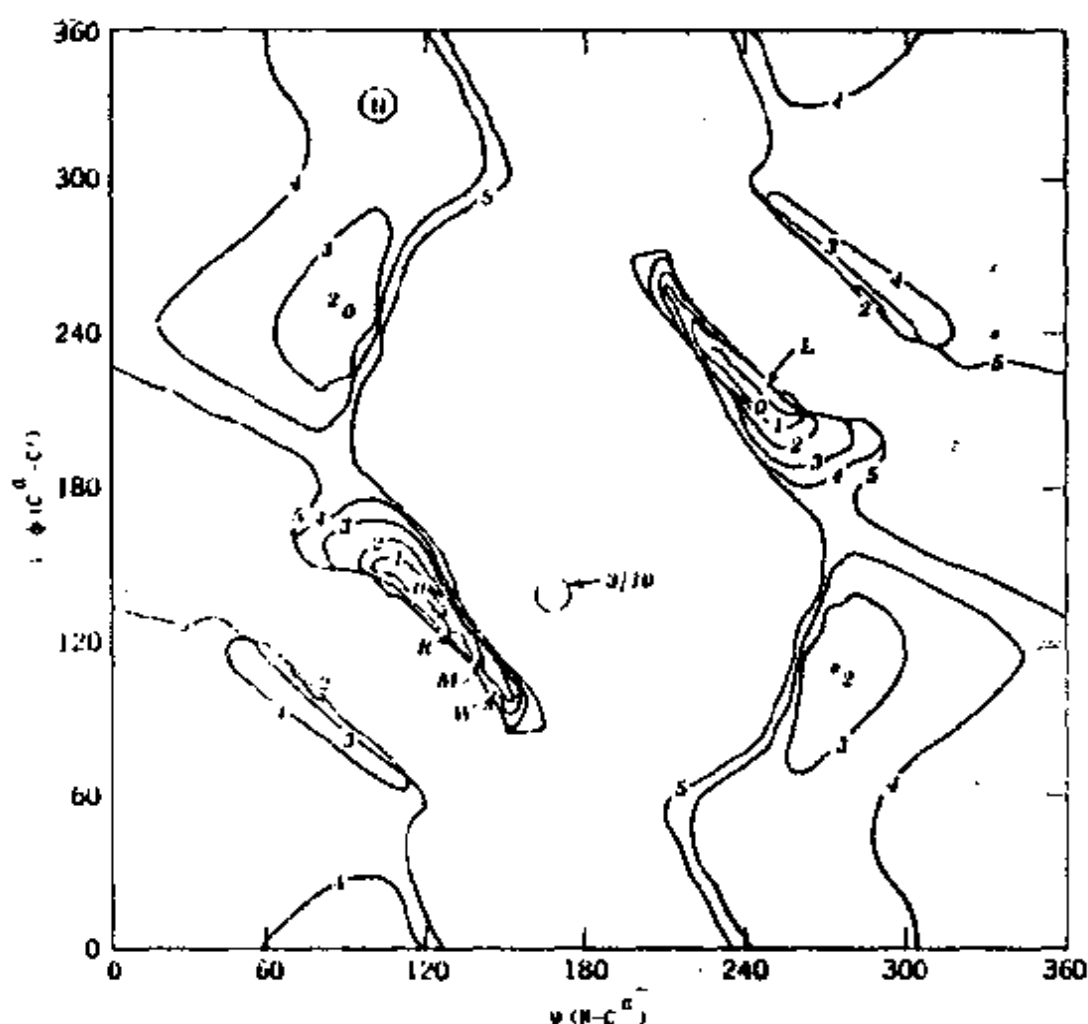


图3.52 续图3.50

图中包括指定右手和左手 α -螺旋、肌红蛋白螺旋、 ω -螺旋、 $3/10$ 螺旋和聚甘氨酸 I 结构的内旋转角

3. 52(亦在图3. 50和3. 51)中允许 Gly-Gly(或聚甘氨酸)的两个大区域中是关于平面构象的中心对称。由于每一残基具有处在左手或右手螺旋构象的相等的固有的可能性, 这就构成了一种螺旋构象的去稳定化因素。Flory 及同事从另一个角度研究了这一问题^[255]。他们计算了聚甘氨酸的 r^2_0/nl^2_0 比值, 并把它与聚-L-丙氨酸的 r^2_0/nl^2_0 的比值进行了比较。聚甘氨酸的这个比值等于2, 而含-CH₂R 侧链的聚-L-氨基酸的这个比值大约等于9。他们发现, 聚甘氨酸的这个比值对静电项的变化不大敏感。他们还发现, 计算的聚甘氨酸和聚-L-丙氨酸二者的 ΔS_{conf} (构型熵)却差不多相等。所以他们得出结论: 聚甘氨酸链的不大伸展的性质是由于链的对称性, 而不是可以达到的链的构象数目较大造成的。

表3. 10 多肽和蛋白的实测与假设的构象

多肽或蛋白	T	Φ	Ψ	n	h
α -螺旋(3. 6 ₁₃)	109. 5	133. 0	122. 8	3. 615	1. 50
γ -螺旋(5. 1 ₁₇)	110. 1	-96. 3	258. 0	5. 143	0. 98
2 ₇ α -螺旋	111. 3	105. 1	249. 5	2. 000	2. 80
2. 2 ₇ -螺旋	111. 6	10. 2	239. 2	2. 169	2. 75
3. 0 ₁₉ -螺旋	111. 6	130. 7	154. 3	3. 000	2. 00
4. 3 ₁₄ -螺旋	100. 5	-91. 9	271. 7	4. 337	1. 20
π -螺旋4. 4 ₁₆	114. 9	122. 9	110. 3	4. 400	1. 15
聚甘氨酸 I	109. 1	102. 0	325. 8	-3. 00	3. 10
聚-L-脯氨酸 I	110. 0	102. 8	325. 9	-3. 00	3. 12
聚-L-脯氨酸 II	108. 8	103. 7	325. 1	-3. 00	3. 12
聚-L-羟脯氨酸 A	105. 5	103. 1	327. 6	-3. 00	3. 05
ω -聚-L-天冬氨酸-B-苯酯	109. 9	115. 6	235. 4	-4. 0	1. 33
胶原型螺旋	110. 0	116. 0	325. 0	-3. 28	2. 95
丝	110. 0	40. 0	315. 0	2. 000	3. 45
折叠链	110. 0	57. 0	298. 0	2. 000	3. 30

T : NC_αC'; Φ : N-C_α; Ψ : C_α-C' 单位均为度

(2) 聚-*L*-丙氨酸

当甘氨酸的 α 碳上引入一个甲基侧链时，聚甘氨酸等高线图的对称性则完全丧失，该结果见于图 3.53。在不同的研究中，发现一般等高线图的形状很少有相似之处。然而 Sheraga 及同事^[189]与 Liguori 及同事^[290]之间的二面角差别很小。表 3.11 中给出了他们的

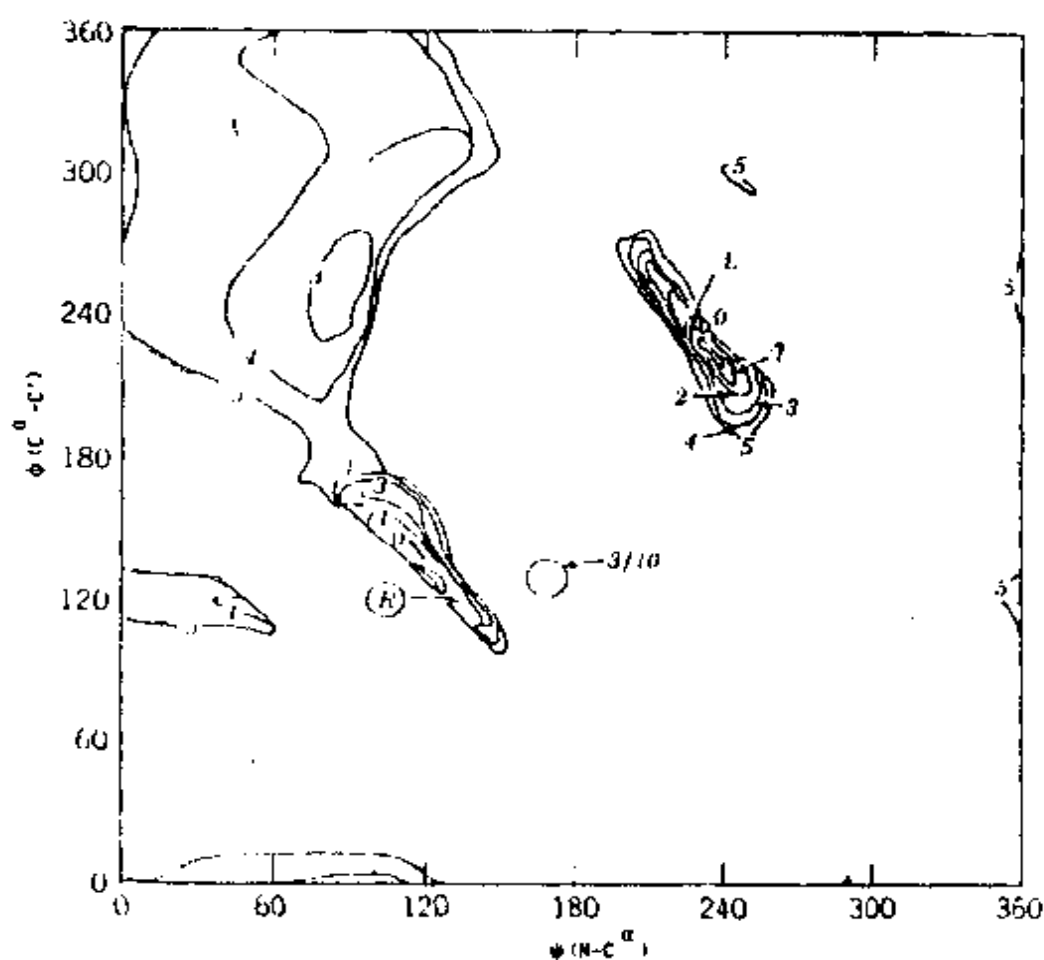


图 3.53 聚-*L*-丙氨酸的能量等高线图

二面角数据。能量等高线图表明，聚-*L*-丙氨酸的最稳定的螺旋

构象出现在右手螺旋和左手螺旋附近。Scheraga 及同事们的研究进一步表明, 右手 α -螺旋的每个残基与左手 α -螺旋相比还要稳定 0.4K cal/mol。

表 3.11 聚-*L*-丙氨酸的螺旋参数和旋转角

指定	T	ϕ	ψ	n	h
α -螺旋(R)	109.5	120	132	3.70	1.46
α -螺旋(L)	109.5	232	228	3.45	1.58
α -螺旋(R)	109.5	132	123	—	—
α -螺旋(L)	109.5	228	237	—	—

T : $\text{NC}_\alpha\text{C}'$; ϕ : N-C_α ; ψ : $\text{C}_\alpha\text{-C}'$

(3) 聚-*L*-缬氨酸

计算该聚合物的完整势能函数具额外的复杂性, 这主要是由于连接在 α -螺旋的异丙基侧链的体积大以及该侧链基的外加的旋转自由度。Scheraga 及同事们认为聚-*L*-缬氨酸的右手 α -螺旋构象是最稳定的结构⁽¹⁸⁹⁾。他们指出, 假如聚-*L*-缬氨酸的侧链从扭转势能的极小值的位置再旋转10—15°, 那么聚-*L*-缬氨酸的右手 α -螺旋骨架构象就能够调节其侧链。于是他们提出在增加扭转势能的前提下, 能够解除由于缬氨酸侧链的体积大而引起的空间张力。他们发现, 由于这样旋转而增加的扭转能小于非键相互作用降低的能量, 因而这种补偿是有利的。作为他们预言的证据, 他们还提出了 $(DL\text{-Lys})_x\text{-(}L\text{-Val)}_x\text{-(}DL\text{-Lys)}_x$ 大型共聚物的实验数据, 这里 x 大约等于40⁽³¹⁵⁾。该螺旋构象的 ORD 表明, Cotton 效应出现在233nm 和198nm。Cotton 效应的谷和峰的大小 $m'_{273} = -13500 \pm 500^\circ$ 和 $m'_{198} = +57000 \pm 6000^\circ$ 与 α -螺旋结构一致。但由于其它可以得到的实验数据表明聚-*L*-缬氨酸不可能以 α -螺旋

型存在, 故该结论仍有争论^[316, 317]。

(4) 聚-L-天冬氨酸- β -甲酯和聚-L-谷氨酸- γ -甲酯

由于这些肽的侧链的旋转自由度, 即使在 α -螺旋区域限制主链的 ϕ 和 ψ 为固定值, 也还有许多个势能极小值, 所以 Scheraga 及同事^[189]的计算限制在右手和左手 α -螺旋区域, 以便观察是否能够预测具有不同旋转方向的螺旋的稳定性。不论用于计算这些多肽构象的势能函数的正确性如何, 他们所得到的结果与已经知道的这些多肽的实验数据毕竟符合得很好。发现聚-L-天冬氨酸- β -甲酯的左手 α -螺旋比右手 α -螺旋稳定0.1Kcal/残基, 而聚-L-谷氨酸- γ -甲酯的右手 α -螺旋比左手 α -螺旋稳定0.4Kcal/残基。

Goodman 及同事^[318, 319]广泛研究了这种聚合的旋转方向的差别。他们指出, 侧链的多重相互作用能够是在能量差别甚微的两种骨架构象间进行选择的决定因素^[69]。Scheraga 研究中的一个有意思的现象是, 旋转方向的根源在于侧链酯基偶极与主链肽基偶极之间的相互作用^[189, 305]。该观点支持 Wada^[320]与 Hashimoto 等^[107]的偶极矩研究。

(5) 其它多肽

采用势能计算方法还研究了聚-L-酪氨酸^[189, 302], 聚-L-脯氨酸^[280-283, 290]和聚-L-丙氨酸^[321, 322]。

正如前面讨论过的, 聚-L-酪氨酸由于存在光学活性侧链跃迁, 它的 ORD 曲线复杂化。光学活性侧链跃迁是观察到 b_0 正值的原因, 这应当表明存在左手 α -螺旋。仔细研究由三个椭圆形峰组成的 CD 谱后, Fasman 及同事^[67]解析了这种复杂的 ORD 谱。但 Appleguist 和 Mahr^[191]提出了异议。通过介电常数的测定, Ap-

pleguist 和 Mahr 研究了聚-*L*-酪氨酸在喹啉中的构象。他们研究了酪氨酸残基3位(巯基邻位)溴取代的偶极矩效应,并观察了每个残基的偶极矩下降 $1.0 \pm 0.1\text{D}$,他们把这个归结于左手螺旋构象,这种指定与 Fasman 及同事的认定正好相反。因为注意到了这种复杂性, Scheraga 及同事^[189]计算了这种多肽的右手和左手 α -螺旋区域周围的极小势能,结果表明聚-*L*-酪氨酸的右手 α -螺旋比左手 α -螺旋稳定 1.7 Kcal/mol 。

在聚-*L*-脯氨酸中,刚性环状结构提供的空间限制极为严重,以至于反式聚-*L*-脯氨酸链只能存在于左手螺旋中^[280, 283]。Liquori 及同事^[290]计算了聚-*L*-脯氨酸的顺反两种构象的极小势能,并能指定对应于聚-*L*-脯氨酸 I 和聚-*L*-脯氨酸 II 的参数。

其它有理论意义的多肽是那些 *N*-取代的聚-*L*-氨基酸,由于这类取代发生在 *N* 上,使得肽链不能形成氢键。Mark 和 Goodman^[321, 322]以及 Liquori 和 Desantis^[322]分别计算了聚-*N*-甲基-*L*-丙氨酸的构象能。他们得出了本质上相同的结论,即在极小势能处找到了右手三重螺旋和稍稍扭转的左手 α -螺旋两种构象,然而, Liquori 和 Desantis 提出右手三重螺旋可能是优势构象。

十一、结论

多肽已作为蛋白质构象分析的模型地系统进行了研究,为理解光谱中的结构内涵、构象转换以及与构象势能计算相吻合的分子几何学提供了途径,期望这类结果与合成的模型能用于解决蛋白质的化学问题。

前面力图对该领域进行广泛的回顾,讨论了用来推演的已经被确立的构象的原则和特定多肽的方法学的用途。螺旋度的标准

是多样的。作为一种结果,希望提出一个图解,说明许多推演立体规则的技术是如何相互配合的。讨论不规则体是更困难的工作。多肽构象领域的论著已经把非螺旋形定义为“随机盘绕”。已知像聚-L-氨基酸一类极性物质是不能真正随机的。每种特定的不规则多肽体系都看作由优势构象的不同混合物组成。正是这个原因,人们无法得到随机盘绕构象体的结构与光谱性质之间的直接关系。

似乎许多球蛋白都是真正的不规则构象,但每种仍然有一种特定的立体化学。该立体化学本质上是与其功能相关联的。或许该研究领域的进一步成功将来源于不规则多肽的立体化学研究。借助于更精细的构象势能计算和特制的合成多肽体系,有可能澄清导致形成构象的作用力。应当指出,多肽几何与蛋白质结构研究中的主要空白,仍然是溶剂-溶质的相互作用。

表3.12 各种旋转的比较

N—C ^α	C ^α —C ^β	旋转方向 *
ϕ	ψ	顺时针
ϕ	ϕ'	顺时针
ψ	ϕ	反时针
ψ	ψ'	反时针
ϕ'	ϕ'	顺时针
ψ'	ψ'	顺时针

* 由 N 向 C_α 投影或由 C_α 向 C^β 投影

立体化学的基本原理完全适用于聚合物。大分子是由链组成的,链是唯一的结构特征,在这些特征上,它们不同于低分子量化合物。认识到合成高聚物、生物大分子及低分子量化合物的立体化学是由相同的规律支配的,这一点很重要。本章重点强调了立

体化学研究方法的协调性。

参 考 文 献

- [1] Pauling, L., and Corey, R. B., 1951, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **7**, 729.
- [2] Pauling, L., and Corey, R. B., 1951, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **37**, 235.
- [3] Perutz, M. F., 1951, *Nature*, **167**, 1053.
- [4] Bamford, C. H., Brown, L., Elliott, A., Hanby, W. E., and Trotter, I. F., 1952, *Nature*, **169**, 357.
- [5] Cochran, W., Crick, F. H. C., and Vand, V., 1952, *Acta Cryst.*, **5**, 581.
- [6] Dickerson, R. E., 1964, *The proteins*, ed. Neurath, H., Academic Press, New York, Vol. 2, 603.
- [7] Brown, L., and Trotter, I. F., 1956, *Trans Faraday Soc.*, **52**, 537.
- [8] Elliott, A., and Malcolm, B. R., 1959, *Proc. Roy. Soc. London*, **A249**, 30.
- [9] Arnott, S., and Wonacott, A. J., 1966, *J. Mol. Biol.*, **21**, 371.
- [10] Arnott, S., and Dover, S. D., 1967, *J. Mol. Biol.*, **30**, 209.
- [11] Yakel, H. L., 1953, *Acta Cryst.*, **8**, 724.
- [12] Traub, W., 1963, *Acta Cryst.*, **16**, 842.
- [13] Elliott, A., 1967, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G. D., Dekker, New York, I.
- [14] Johnson, C. K., 1959, Ph. D. Thesis, *Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge.
- [15] Bamford, C. H., Elliott, A., and Hanby, W. E., 1956, *Synthetic Polypeptides*, Academic Press, New York.
- [16] Bradbury, E. M., Brown, L., Downie, A. R., Elliott, A., Fraser, R. D. B., and Hanby, W. E., 1962, *J. Mol. Biol.*, **5**, 230.
- [17] Fraser, R. D. B., MacRae, T. P., and Stapleton, I. W., 1962, *Nature*, **193**, 573.
- [18] Saludjian, P., deLoze, C., and Luzzati, V., 1963, *Compt. Rend.*, **256**, 4297.
- [19] Ramachandran, G. N., Venkatachalam, C. M. and Krimm, S., 1966, *Biophys.*

J. , 8, 849.

- [20] Ramakrishnan, C. , and Ramachandran, G. N. , 1965, *Biophys. J.* , 5, 909.
- [21] Ham, J. S. , and Platt, J. R. , 1952, *J. Chem. Phys.* , 20, 335.
- [22] Hunt, H. D. , and Simpson, W. T. , 1953, *J. Amer. Chem. Soc.* , 75, 4540.
- [23] Nagakura, S. , 1960, *Mol. Phys.* , 3, 105.
- [24] Tinoco, I. Jr. , Halpern, A. , and Simpson, W. T. , 1962, *Polyamino Acids, Polypeptides, and Proteins*, ed. Stahman, University of Wisconsin Press, Madison, 147.
- [25] Barnes, E. E. , and Simpson, W. T. , 1963, *J. Chem. Phys.* , 39, 670.
- [26] Peterson, D. I. , and Simpson, W. T. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , 79, 2375.
- [27] Yomosa, S. , 1964, *Biopolymers Symp.* , 1, 1.
- [28] Basch, H. , Robin, M. B. , and Kuebler, N. A. , 1967, *J. Chem. Phys.* , 47, 1201.
- [29] Barnes, D. G. , and Rhodes, W. , 1968, *J. Chem. Phys.* , 48, 817.
- [30] Liman, B. J. , and Schellman, J. A. , 1965, *J. Phys. Chem.* , 69, 978.
- [31] Gratzer, W. B. , 1967, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G.D. , Dekker, New York, 177.
- [32] Suard, M. , Berthier, G. , and Pullman, B. , 1961, *Biochem. Biophys. Acta* , 52, 254.
- [33] Suard-Sender, M. , 1965, *J. Chim. Phys.* , 62, 79.
- [34] Nielsen, E. B. , and Schellman, J. A. , 1967, *J. Phys. Chem.* , 71, 2297.
- [35] Schellman, J. A. , and Nielson, E. B. , 1967, *Conformation of Biopolymers*, ed. Ramachandran, G. N. , Academic Press, New York, Vol. 1, 109.
- [36] Wolf, H. , 1965, *Tetrahedron Lett.* , 1075.
- [37] Urry, D. W. , 1968, *J. Phys. Chem.* , 72, 3035.
- [38] Femleib, S. , Bovey, F. A. , and Longworth, J. W. , 1968, *Chem. Commun.* , 238.
- [39] Balasubramanian, D. , and Wetlaufer, D. B. , 1967, *Conformation of Biopolymers*, ed. Ramachandran, G. N. , Academic Press, New York, Vol. 1, 147.
- [40] Goodman, M. , Toniolo, C. , and Falcetta, J. , 1969, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 1816.

- [41] Rhodes, W. , and Barnes, D. G. , 1968, *J. Chim. Phys.* , **65**, 78.
- [42] . Rosenheck, K. , and Doty, P. , 1961, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* , **47**, 1775.
- [43] Imahort, K. , and Tanaka, J. , 1959, *J. Mol. Biol.* , **1**, 359.
- [44] McDiamid, R. , 1965, *Ph. D. Thesis*, Harvard University, Cambridge, Mass.
- [45] McDiamid, R. , and Doty, P. 1966, *J. Phys. Chem.* , **70**, 2620.
- [46] Gratzer, W. B. , Holzwarth, G. , and Doty, P. , 1961, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* , **47**, 1785.
- [47] Goodman, M. , Listowsky, I. , Masuda, Y. , and Boardman, F. , 1963, *Biopolymers* , **1**, 33.
- [48] Goodman, M. , and Listowsky, I. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 3770.
- [49] Goodman, M. , and Rosen, I. , 1964, *Biopolymers* , **2**, 537.
- [50] Urnes, P. , and Doty, P. , 1961, *Advan. Protein Chem.* , **16**, 401.
- [51] Blout, E. , 1960, *Optical Rotatory Dispersion*, ed. Djerassi, C. , McGraw-Hill, New York, 238.
- [52] Yang, J. T. , 1967, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G. D. , Dekker, New York, 239.
- [53] Yamaoka, K. , 1964, *Biopolymers* , **2**, 219.
- [54] Schechter, E. , and Blout, E. R. , 1964, *Proc. Natl. Sci. U. S.* , **51**, 695.
- [55] Yang, J. T. , 1964, *Newer Methods of Polymer Characterization*, ed. Ke, B. , Wiley, New York, 103.
- [56] Yang, J. T. , 1967, *Conformation of Biopolymers*, ed. Ramachandran, G. N. , Academic Press, New York, Vol. 1, 157.
- [57] Carver, J. P. , Schechter, E. , and Blout, E. R. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88**, 2550.
- [58] Yang, J. T. , 1965, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* , **53**, 438.
- [59] Moffitt, W. , 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* , **42**, 736.
- [60] Moffitt, W. , and Yang, J. T. , 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* , **42**, 596.
- [61] Moffitt, W. , and Moscovitz, A. , 1959, *J. Chem. Phys.* , **30**, 648.
- [62] Cassim, J. Y. , and Taylor, E. W. , 1965, *Biophys. J.* , **5**, 553.
- [63] Blout, E. R. , and Karlson, R. H. , 1958, *J. Amer. Chem. Soc.* , **80**, 1259.

- [64] Karlson, R. H. , Norland, K. S. , Fasman, G. D. , and Blout, E. R. , 1960, *J. Amer. Chem. Soc.* , **82**, 2268.
- [65] Fasman, G. D. , 1962, *Nature* , **193**, 681.
- [66] Fasman, G. D. , Landsberg, M. , and Buchwald, M. , 1965, *Can. J. Chem.* , **43**, 1588.
- [67] Fasman, G. D. , Bodenheimer, E. , and Lindblow, C. , 1964, *Biochemistry* , **3**, 1665.
- [68] Goodman, M. , Deber, C. M. , and Felix, A. M. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 3773.
- [69] Goodman, M. , Felix, A. M. , Deber, C. M. , Brause, A. R. , and Schwartz, G. , 1963, *Biopolymers* , **1**, 371.
- [70] Goodman, M. , Felix, A. M. , Deber, C. M. , and Brause, A. R. , 1964, *Biopolymers Symp.* , **1**, 409.
- [71] Gratzer, W. B. , and Cowburn, D. A. , 1969, *Nature* , **222**, 426.
- [72] Chignell, D. A. , and Gratzer, W. B. , 1966, *Nature* , **210**, 262.
- [73] Fasman, G. D. , 1967, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G. D. , Dekker, New York, 499.
- [74] Moscovitz, A. , 1962, *Advan. Chem. Phys.* , **4**, 67.
- [75] Moscovitz, A. , 1960, *Optical Rotatory Dispersion*, ed. Djerassi, C. McGraw-Hill, New York, 150.
- [76] Tinoco, I. Jr. , 1962, *Advan. Chem. Phys.* , **4**, 113.
- [77] Schellman, J. A. , 1968, *Accounts Chem. Res.* , **1**, 144.
- [78] Holzwarth, G. , and Doty, P. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc.* , **87**, 218.
- [79] Beychok, S. , 1967, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G. D. , Dekker, New York, 293.
- [80] Velluz, L. , Legrand, M. , and Grosjean, M. , 1965, *Optical Circular Dichroism*, Academic Press, New York.
- [81] Crabbe, P. , 1965, *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, Holden-Day, San Francisco.
- [82] Velluz, L. , and Legrand, M. , 1965, *Angew. Chem.* , **77**, 842; Velluz, L. , and

- Legrand, M. , 1965, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* , 4, 838.
- [83] Gratzner, W. B. , 1967, *Proc. Roy. Soc. London*, A297, 163.
- [84] Schellman, J. A. , and Schellman, C. , 1964, *The Protein*, ed. Neurath, H. , Academic Press, New York, Vol. I , 1.
- [85] Harrington, W. F. , Josephs, R. , and Segal, D. M. , 1966, *Ann. Rev. Biochem.* , 35, 599.
- [86] Morita, K. , Simons, E. R. , and Blout, E. R. , 1967, *Biopolymers*, 5, 529.
- [87] Greenfield, N. J. , and Fasman, G. D. , 1969, *Biopolymers*, 7, 595.
- [88] Balasubramanian, D. , and Wetlaufer, D. B. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , 88, 3449.
- [89] Quadrifoglio, F. , and Urry, D. W. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc.* , 90, 2755.
- [90] Ingwall, R. T. , Scheraga, H. A. , Lotan, N. , Berger, A. , and Katchalski, E. , 1968, *Biopolymers*, 6, 331.
- [91] Brahm, J. , and Spach, G. , 1963, *Nature*, 200, 72.
- [92] Bradburg, E. M. , Downie, A. R. , Elliott, A. , and Hanby, W. E. , 1960, *Proc. Roy. Soc. London*, A259, 110.
- [93] Bradburg, E. M. , Brown, L. , Downie, A. R. , Elliott, A. , Hanby, W. E. , and McDonald, T. R. R. , 1959, *Nature*, 183, 1736.
- [94] Bradburg, E. M. , Downie, A. R. , Elliott, A. , and Hanby, W. E. , 1960, *Nature*, 187, 321.
- [95] Ballard, D. G. , Bamford, C. H. , and Elliott, A. , 1960, *Makromol. Chem.* , 35, 222.
- [96] Goodman, M. , Felix, A. M. , and Schwartz, G. , 1964, *Electronic Aspects of Biochemistry*, ed. Pullman, B. , Academic Press, New York, 365.
- [97] Blout, E. R. , 1964, *Biopolymers Symp.* , 1, 397.
- [98] Bradley, D. F. , Goodman, M. , Felix, A. , and Records, R. , 1966, *Biopolymers*, 4, 607.
- [99] Goodman, M. , Boardman, F. , and Listowski, I. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , 85, 2483.
- [100] Toniolo, C. , Falxa, M. , and Goodman, M. , 1968, *Biopolymers*, 6, 1579.

- [101] Ackermann, Th. , and Neumann, 1967, *Biopolymers*, **5**, 649.
- [102] Edsall, J. T. , Flory, P. J. , Kendrew, J. C. , Loquori, A. M. , Nemethy, G. , Ramachandran, G. N. , and Scheraga, H. A. , 1966, *J. Biol. Chem.* , **241**, 1004.
- [103] Bradburg, E. M. , Carpenter, B. G. , and Goldman, H. , 1968, *Biopolymers*, **6**, 837.
- [104] Bradburg, E. M. , Carpenter, B. G. , and Stephens, R. M. , 1968, *Biopolymers*, **6**, 905.
- [105] Hashimoto, M. , and Aritomi, J. , 1966, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 2707.
- [106] Hashimoto, M. , 1966, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 2713.
- [107] Hashimoto, M. , Arakawa, S. , and Nakamura, 1966, *International Symposium on Macromolecular Chemistry*, Tokyo-Kyoto, Preprints, **9**, 12.
- [108] Hashimoto, M. , and Arakawa, S. ; 1967, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 1698.
- [109] Urry, D. W. , 1968, *Ann. Rev. Phys. Chem.* , **19**, 477.
- [110] Yan, J. F. , Vanderkooi, G. , and Scheraga, H. A. , 1968, *J. Chem. Phys.* , **48**, 2713.
- [111] Vournakis, J. N. , Yan, J. F. , and Scheraga, H. A. , 1968, *Biopolymers*, **6**, 1531.
- [112] Bovey, F. A. , 1968, *Pure Appl. Chem.* , **16**, 417.
- [113] Bovey, F. A. , Tiers, G. V. D. , and Filipovich, G. , 1959, *J. Polymer Sci.* **38**, 73.
- [114] Goodman, M. , and Masuda, Y. , 1964, *Biopolymers*, **2**, 107.
- [115] Liu, K. J. , Lignowski, J. S. , and Ullman, R. , 1967, *Biopolymers*, **5**, 375.
- [116] Marlborough, D. I. , Orrell, K. G. , and Rydon, H. N. , 1965, *Chem. Commun.* , 518.
- [117] Marlborough, D. I. , and Rydon, H. N. , 1967, *Some Newer Physical Methods in Structural Chemistry*, ed. Bonnett, R. , and Davis, J. G. , United Mechanical Press, London, 211.
- [118] Bradbury, L. M. , Crane-Robinson, C. , Goldman, H. , and Rattle, W. E. , 1968, *Nature*, **217**, 812.
- [119] Ferretti, J. A. , 1967, *Chem. Commun.* , 1030.
- [120] Conti, F. , and Liquri, A. M. , 1968, *J. Mol. Biol.* , **33**, 953.

- [121] Haylock, J. C. , and Rydon, H. N. , 1968, *Peptides*, ed. Briccs, E. , North-Holland Publ. Co. , Amsterdam, 19.
- [122] Rydon, H. N. , 1969, *ACS Polymer Preprints*, **10**, 25.
- [123] Ferretti, J. A. , 1969, *ACS Polymer Preprints*, **10**, 33.
- [124] Ferretti, J. A. , and Paolillo, L. , 1969, *Biopolymers*, **7**, 155.
- [125] Hanlon, S. , Russo, S. F. , and Klotz, I. M. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 2024.
- [126] Hanlon, S. , and Klotz, I. M. , 1965, *Biochemistry*, **4**, 37.
- [127] Hanlon, S. , 1966, *Biochemistry*, **5**, 2049.
- [128] Klotz, I. M. , Russo, S. F. , Hanlon, S. , and Stake, M. A. , 1964, *J. Amer. Chem. Soc.* , **86**, 4774.
- [129] Stake, M. S. , and Klotz, M. , 1966, *Biochemistry*, **5**, 1726.
- [130] Bradburg, J. H. , and Fenn, M. D. , 1967, *Symp. Fibrous Proteins* , Australia, 69;
Bradburg, J. H. , and Fenn, M. D. , 1969, *Australian J. Chem.* , **22**, 357.
- [131] Bradburg, J. H. , and Fenn, M. D. , 1968, *J. Mol. Biol.* , **34**, 231.
- [132] Stewart, W. E. , Mandelkern, L. , and Glick, R. E. , 1967, *Biochemistry*, **6**, 143.
- [133] Stewart, W. E. , Mandelkern, L. , and Glick, R. E. , 1967, *Biochemistry*, **6**, 150.
- [134] Quadrifoglio, F. , and Urry, D. W. , 1967, *J. Phys. Chem.* , **71**, 2364.
- [135] Balasubramanian, D. , 1967, *Biochem. Biophys. Res.* , **29**, 538.
- [136] Steigman, J. , Peggion, E. and Cosani, A. , 1969, *J. Amer. Chem. Soc.* , **91**, 1822.
- [137] Steigman, J. , Verdini, A. S. , Montagner, C. , and Strasorier, L. , 1969, *J. Amer. Chem. Soc.* , **91**, 1829.
- [138] Ambrose, E. J. , and Elliott, A. , 1951, *Proc. Roy. Soc. London*, **A205**, 47.
- [139] Miyazawa, T. , and Blout, E. R. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc.* , **83**, 712.
- [140] Tsuboi, M. , 1962, *J. Polymer Sci.* , **59**, 139.
- [141] Miyazawa, T. , Masuda, Y. , and Fukushima, K. , 1962, *J. Polymer Sci.* , **62**, S62.
- [142] Masuda, Y. , Fukushima, K. , Fujii, T. , and Miyazawa, T. , 1969, *Biopolymers*, **8**, 91.
- [143] Itoh, K. , Nakahara, T. , Shimanouchi, T. , and Oya, M. , 1967, *Symposium on Pro-*

tein Structure, Nagoya.

- [144] Masuda, Y., and Miyazawa, T., 1967, *Makromol. Chem.*, **103**, 261.
- [145] Miyazawa, T., Fukushima, K., Sugano, S., and Masuda, Y., 1967, *Conformation of Biopolymers*, ed. Ramachandran, G. N., Academic Press, New York, 557.
- [146] Miyazawa, T., 1962, *Polyamino Acids, Polypeptides and Protein*, ed. Stachman, M. A., University of Wisconsin Press, Madison, 201.
- [147] Miyazawa, T., 1962, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G. D., Dekker, New York, 69.
- [148] Miyazawa, T., 1963, *Aspects of Protein Structure*, ed. Ramachandran, G. N., Academic Press, London, 257.
- [149] Susi, H., 1969, *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, ed. Timasheff, S. T., and Fasman, G. D., Dekker, New York, 575.
- [150] Itoh, K., Nakahara, T., Shimanouchi, T., Oya, M., Uno, K., and Iwakura, Y., 1968, *Biopolymers*, **6**, 1759.
- [151] Miyazawa, T., 1961, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **34**, 691.
- [152] Tsuboi, M., Mitsui, Y., Wada, A., Miyazawa, T., and Nagashima, N., 1963, *Biopolymers*, **1**, 297.
- [153] Masuda, Y., and Miyazawa, T., 1969, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **42**, 570.
- [154] Masuda, Y., Miyazawa, T., and Goodman, M., *Biopolymers*, **8**, 515.
- [155] Berger, A., Kurtz, J., and Katchalski, E., 1954, *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 5552.
- [156] Traub, W., and Schmueller, V., 1963, *Aspects of Protein Structure*, ed. Ramachandran, G. N., Academic Press, New York, 81.
- [157] Traub, W., and Schmueller, V., 1963, *Nature*, **198**, 1165.
- [158] Cowan, P. M., and McGavin, S., 1955, *Nature*, **176**, 501.
- [159] Sasisekharan, V., 1959, *Acta Cryst.*, **12**, 897.
- [160] Sasisekharan, V., 1959, *Acta Cryst.*, **12**, 903.
- [161] Carver, J. P., and Blout, E. R., 1967, *Treatise on Collagen*, ed. Ramachandran, G. N., Academic Press, London, Vol. 1, 441.
- [162] Harrington, W. F., and Sela, M., 1958, *Biochem. Biophys. Acta*, **27**, 24.
- [163] Harrington, W. F., and von Hippel, P., 1961, *Advan. Protein Chem.*, **16**, 1.

- [164] Blout, E. R. , and Schechter, E. , 1963, *Biopolymers*, **1**, 565.
- [165] Steinberg, I. Z. , Harrington, W. F. , Berger, A. , Sela, M. , and Katcha — Iski, E. , 1960, *J. Amer. Chem. Soc.* , **82**, 5263.
- [166] Downie, A. R. , and Randall, A. , 1959, *Trans. Faraday Soc.* , **55**, 2132.
- [167] Blout, E. R. , Carver, J. P. , and Gross, J. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 644.
- [168] Kurtz, J. , Berger, A. , and Katchalski, E. , 1958, *Recent Advances in Gelatin and Glue research*, ed. Stainsby, G. , Pergamon Press, New York, 131.
- [169] Gratzer, W. B. , Rhodes, W. , and Fasman, G. D. , 1963, *Biopolymers*, **1**, 319.
- [170] Fasman, G. D. , and Blout, E. R. , 1963, *Biopolymers*, **1**, 3.
- [171] Gornick, F. , Mandelken, I. , Diorio, A. F. , and Roberts, D. E. , 1964, *J. Amer. Chem. Soc.* , **86**, 2549.
- [172] Blout, E. R. , and Fasman, G. D. , 1957, *Recent Advances in Gelation and Glue Research*, **1**, 122.
- [173] Harrington, W. F. , and Kurtz, J. , 1964, *Abstracts*, 147th Meeting, American Chemical Society, **10 H**.
- [174] Bovey, F. A. , and Hood, F. P. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88**, 2326.
- [175] Bovey, F. A. , and Hood, F. P. , 1967, *Biopolymers*, **5**, 325.
- [176] Bovey, F. A. , and Hood, F. P. , 1967, *Biopolymers*, **5**, 915.
- [177] Isemura, T. , Okabayashi, H. , and Sakakibara, S. , 1968, *Biopolymers*, **6**, 307.
- [178] Traub, W. , Yonath, A. , and Segal, D. M. , 1969, *Nature*, **221**, 914.
- [179] Ramachandran, G. N. , and Kartha, G. , 1955, *Nature*, **176**, 593.
- [180] Ramachandran, G. N. , and Sasisekhara, V. , 1965, *Biochem. Biophys. Acta*, **109**, 314.
- [181] Ramachandran, G. N. , and Chandrasekharan, R. , 1968, *Biopolymers*, **6**, 1649.
- [182] Rich, A. , and Crick, F. H. , C. , 1961, *J. Mol. Biol.* , **3**, 483.
- [183] Cowan, P. M. , McGavin, S. , and North, A. C. T. , 1955, *Nature*, **176**, 1062.
- [184] Andreeva, N. S. , Esinova, N. G. , Millionova, M. I. , Rogulenkova, V. N. , and Shibnev, V. A. , 1967, *Conformation of Biopolymers*, ed. Ramachandran, G. N. , Academic Press, London, Vol. **2** , 469.

- [185] Traub, W. , and Yonath, A. , 1966, *J. Mol. Biol.* , **16** , 404.
- [186] Traub, W. and Yonath, A. , 1967, *J. Mol. Biol.* , **25** , 351.
- [187] Scatturin, A. , Del Pra, A. , Tamburro, A. M. , and Scoffone, E. , 1967, *Chem. Ind. London*, **49** , 970.
- [188] Beychok, S. , and Fasman, G. D. , 1964, *Biochemistry* , **3** , 1675.
- [189] Ooi, T. , Scott, R. A. , Vanderkooi, G. , and Seheraga, H. A. , 1967, *J. Chem. Phys.* , **46** , 4410.
- [190] Goodman, M. , Davis, G. W. , and Benedetti, E. , 1968, *Acc. Chem. Res.* , **1** , 1275.
- [191] Applequist, J. , and Mahr, T. G. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88** , 5419.
- [192] Peggion, E. , Verdini, A. S. , Cosani, A. , and Scoffone, E. , 1969, *Macromolecules* , **2** , 170.
- [193] Sage, H. J. , and Fasman, G. D. , 1966, *Biochemistry* , **5** , 286.
- [194] Auer, H. E. , and Doty, P. , 1966, *Biochemistry* , **5** , 1708.
- [195] Auer, H. E. , and Doty, P. , 1966, *Biochemistry* , **5** , 1716.
- [196] Peggion, E. , Cosani, A. , Verdini, A. S. , Del Pra, A. , and Mammi, M. , 1968, *Biopolymers* , **8** , 1477.
- [197] Cosani, A. , Peggion, E. , Verdini, A. S. , and Terbojevich, M. , 1968, *Biopolymers* , **6** , 963.
- [198] Goodman, M. , and Peggion, E. , 1967, *Biochemistry* , **6** , 1533.
- [199] Goodman, M. , and Kossoy, A. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88** , 5010.
- [200] Goodman, M. , and Benedetti, E. , 1968, *Biochemistry* , **7** , 4226.
- [201] Benedetti, E. , Kossoy, A. , Falxa, M. L. , and Goodman, M. , 1968, *Biochemistry* , **7** , 4234.
- [202] Tiffany, M. L. , and Krimm, S. , 1968, *Biopolymers* , **8** , 1379.
- [203] Tiffany, M. L. , and Krimm, S. , 1968, *Biopolymers* , **8** , 1767.
- [204] Tiffany, M. L. , and Krimm, S. , 1968, *IUPAC International Symposium on Macromolecular Chemistry* , Toronto, **B2** , 5.
- [205] Krimm, S. , and Mark, J. E. , 1968, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **60** , 1122.
- [206] Blout, E. R. , Carver, J. P. , and Schechter, E. , 1967, *Optical Rotatory Dispersion and*

Circular Dichroism in Organic Chemistry, ed. Snatzke, G., Sadtler Research Labs., Philadelphia.

- [207] Myer, Y. P., 1969, *ACS Polymer Preprints*, 10, 307.
- [208] Legrand, M., and Viennet, R., 1964, *Compt. Rend.*, 259, 4277.
- [209] Adler, A. J., Hoving, R., Potter, J., Wells, M., and Fasman, G. D., 1968, *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 4736.
- [210] Meyer, K. H., 1950, *Natural and Synthetic High Polymers*, Interscience, New York.
- [211] Astbury W. T., and Street, A., 1931, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, A230, 75.
- [212] Astbury W. T., and Woods, H. J., 1933, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, A232, 333.
- [213] Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., and Sarma, V. R., 1965, *Nature*, 206, 757.
- [214] Pauling, L., and Corey, R. B., 1953, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 39, 253.
- [215] Bamford, C. H., Brown, L., Elliott, A., Hanby, W. E., and Trooter, I. F., 1954, *Nature*, 173, 27.
- [216] Meyer, K. H., and Mark, H., 1928, *Ber.*, 61, 1932.
- [217] Astbury, W. T., Dickinson, S., and Bayley, K., 1935, *Biochem. J.*, 29, 2351.
- [218] Bradbury, E. M., Brown, L., Downie, A. R., Elliott, A., Fraser, R. D. B., Hanby, W. E., and McDonald, T. R. R., 1960, *J. Mol. Biol.*, 2, 276.
- [219] Yahara, I., Imahori, K., Iitaka, Y., and Tsuboi, M., 1963, *Polymer*, 1, 47.
- [220] Bradbury, E. M., Elliott, A., and Hanby, W. E., 1962, *J. Mol. Biol.*, 5, 487.
- [221] Bohak, Z., and Katchalski, E., 1963, *Biochemistry*, 2, 228.
- [222] Kubota, S., Sugai, S., and Noguchi, J., 1968, *Biopolymers*, 6, 1311.
- [223] Elliott, A., Fraser, R. D. B., MacRae, T. P., Stapleton, I. W., and Suzuki, E., 1964, *J. Mol. Biol.*, 9, 10.
- [224] Fraser, R. D. B., Harrap, B. S., MacRae, T. P., Stewart, F. H. C., and Suzuki, E., 1965, *J. Mol. Biol.*, 14, 423.
- [225] Elliott, A., Bradbury, E. M., Downie, A. R., and Hanby, W. E., 1962, *Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins*, ed. Stahmann, M. A., University of Wisconsin Press, Madison, 255.

- [226]Fraser, R. D. B. , MacRae, T. P. , Stewart, F. H. C. , and Suzuki, E. , 1965, *J. Mol. Biol.* , **11**, 706.
- [227]Go, Y. , Noguchi, J. , Asai, M. , and Hayakawa, T. , 1956, *J. Polymer Sci.* , **21**, 147.
- [228]Rosenheck, K. , and Sommer, B. , 1967, *J. Chem. Phys.* , **46**, 532.
- [229]Pysh, E. , 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **55**, 825.
- [230]Iizuka, E. , and Yang, J. T. , 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **55**, 1175.
- [231]Davidson, B. , Tooney, N. , and Fasman, G. D. , 1966, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **23**, 156.
- [232]Timashell, S. N. , and Gorbunoff, M. J. , 1967, *Ann. Rev. Biochem.* , **36**, 13.
- [233]Fasman, G. D. , and Potter, J. , 1967, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **27**, 209.
- [234]Sarkar, P. K. , and Doty, P. , 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **55**, 981.
- [235]Townend, R. , Kucosinski, T. F. , Timasheff, S. N. , Fasman, G. D. , and Davidson, B. , 1966, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **23**, 163.
- [236]Quadrifoglio, F. , and Urry, D. W. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc.* , **90**, 2760.
- [237]Stevens, L. , Townend, R. , Timasheff, S. N. , Fasman, G. D. , and Potter, J. , 1968, *Biochemistry* , **7**, 3717.
- [238]Ikeda, S. , and Fasman, G. D. , 1967, *J. Mol. Biol.* , **30**, 491.
- [239]Blout, E. R. , and Linsley, S. G. , 1952, *J. Amer. Chem. Soc.* , **74**, 1946.
- [240]Elliott, A. , and Malcolm, B. R. , 1956, *Trans. Faraday Soc.* , **52**, 528.
- [241]Doty, P. , Holtzer, A. M. , Bradbury, J. H. , and Blout, E. R. , 1954, *J. Amer. Chem. Soc.* , **76**, 4493.
- [242]Doty, P. , and Yang, J. T. , 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* , **78**, 498.
- [243]Blout, E. R. , and Asadourian, A. , 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* , **78**, 955.
- [244]Doty, P. , and Lundberg, R. D. , 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* , **78**, 4810.
- [245]Schellman, J. A. , 1955, *Compt. Rend. Trav. Lab. , Carlsberg, Ser. Chim.* , **29**, 230.
- [246]Schellman, J. A. , 1958, *J. Phys. Chem.* , **62**, 1485.
- [247]Peller, E. , 1959, *J. Phys. Chem.* , **63**, 1194.
- [248]Rice, S. A. , Wada, A. , and Geiduschek, E. P. , 1958, *Discussions Faraday Soc.* , **25**, 130.

- [249]Gibbs, J. H. , and DiMarzio, E. A. , 1958, *J. Chem. Phys.* , **28**, 1247.
- [250]Gibbs, J. H. , and DiMarzio, E. A. , 1959, *J. Chem. Phys.* , **30**, 271.
- [251]Rice, S. A. , and Wada, A. , 1958, *Chem. Phys.* , **29**, 233.
- [252]Hill, T. L. , 1959, *J. Chem. Phys.* , **30**, 383.
- [253]Nagai, K. , 1960, *J. Phys. Soc.* , Japan, **15**, 407.
- [254]Zimm, B. , and Bragg, J. , 1959, *J. Chem. Phys.* , **31**, 526.
- [255]Lifson, S. , and Roig, A. , 1961, *J. Chem. Phys.* , **34**, 1963.
- [256]Lifson, S. , 1964, *J. Chem. Phys.* , **40**, 3705.
- [257]Schwarz, G. , and Seelig, J. , 1968, *Biopolymers* , **6**, 1263.
- [258]Schwarz, G. , 1965, *J. Mol. Biol.* , **11**, 64.
- [259]Eigen, M. , 1963, *Techniques in Organic Chemistry*, ed. Weissberger, A. , Interscience, New York, Vol. **8**, Part II, 2nd ed. , 895.
- [260]Caldin, E. F. , 1964, *Fast Reactions in Solutions*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 59.
- [261]Lumry, R. , Legate, R. , and Miller, W. , 1964, *Biopolymers* , **2**, 489.
- [262]Hamori, E. , and Scheraga, H. A. , 1966, *J. Phys. Chem.* , **70**, 3018.
- [263]Schwarz, G. , 1966, *Chem. Soc. Publ.* , **20**, 191.
- [264]Parker, R. C. , Applegate, K. , and Slutsky, L. J. , 1966, *J. Phys. Chem.* , **70**, 3018.
- [265]Parker, R. C. , Slutsky, L. J. , and Applegate, K. , 1968, *J. Phys. Chem.* , **72**, 3177.
- [266]Flory, P. J. , 1969, *Statistical Mechanics*, Interscience, New York, 294.
- [267]Ackermann, Th. , and Ruterjans, H. , 1964, *Ber. Bunsenges.* , *Physik. Chem.* , **68**, 850.
- [268]Appelquist, J. , 1963, *J. Chem. Phys.* , **38**, 934.
- [269]Karasz, F. E. , O'Reilly, J. M. , and Bair, H. E. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 241.
- [270]Giacometti, G. , Turolla, A. , and Boni, R. , 1968, *Biopolymers* , **6**, 441.
- [271]Zimm, B. H. , Doty, P. , and Iso, K. , 1959, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **45**, 1601.
- [272]Karasz, F. E. , and O'Reilly, J. M. , 1966, *Biopolymers* , **4**, 1015.

- [273] Karasz, F. E. , and O'Reilly, J. M. , 1967, *Biopolymers*, **5**, 27.
- [274] Karasz, F. E. , O'Reilly, J. M. , and Bair, H. E. , 1964, *Nature*, **202**, 693.
- [275] Engel, J. , 1966, *Biopolymers*, **4**, 945.
- [276] Edsall, J. T. , Flory, P. J. , Kendrew, J. C. , Liquori, A. M. , Nemethy, G. , Ramachandran, G. N. , and Scheraga, H. A. , 1966, *Biopolymers*, **4**, 121; Edsall, J. T. , Flory, P. J. , Kendrew, J. C. , Liquori, A. M. , Nemethy, G. , Ramachandran, G. N. , and Scheraga, H. A. , 1966, *J. Mol. Biol.*, **15**, 399.
- [277] Brant, D. A. , and Flory, P. J. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2791.
- [278] Scott, R. A. , and Scheraga, H. A. , 1966, *J. Chem. Phys.*, **45**, 2091.
- [279] Nemethy, G. , and Scheraga, H. A. , 1965, *Biopolymers*, **3**, 155.
- [280] Leach, S. J. , Nemethy, G. , and Scheraga, H. A. , 1966, *Biopolymers*, **4**, 369.
- [281] Ramachandran, G. N. , Ramakrishnan, C. , and Sasisekharan, V. , 1963, *Aspects of Protein Structure*, ed. Ramachandran, G. N. , Academic Press, New York, 121.
- [282] Ramachandran, G. N. , Ramakrishnan, C. , and Sasisekharan, V. , 1963, *J. Mol. Biol.*, **7**, 95.
- [283] Ramakrishnan, C. , and Ramachandran, G. N. , 1964, *Proc. Indian Acad. Sci.*, **A59**, 329.
- [284] Liquori, A. M. , 1966, *J. Polymer Sci.*, **C12**, 209.
- [285] Wada, A. , 1967, *Kobunshi*, Japan, **18**, 614.
- [286] Goodman, M. , and Choi, N. S. , 1968, *Peptides*, ed. Bricas, E. , North-Holland Publ. Co. , Amsterdam, 1.
- [287] Mizushima, S. I. , and Shimanouchi, T. , 1961, *Advances in Enzymology*, ed. Nord, F. F. , Interscience, New York.
- [288] Herschbach, D. R. , 1962, *Bibliography for Hindered Rotation and Microwave Spectroscopy*, Lawrence Radiation Laboratory, University of California, Berkeley, Calif.
- [289] Scott, R. A. , and Scheraga, H. A. , 1965, *J. Chem. Phys.*, **42**, 2209.
- [290] DeSantis, P. , Giglio, E. , Liquori, A. M. , and Ripamonti, A. , 1965, *Nature*, **206**, 456.
- [291] Hendrickson, J. B. , 1961, *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 4537.
- [292] Pitzer, K. S. , *Advances in Chemical Physics*, ed. Prigogine, I. , Interscience, New

York, Vol. 2, 59.

- [293]Amdur, I. , and Harkness, A. L. , 1954, *J. Chem. Phys.* , **2**, 664.
- [294]Amdur, I. , and Mason, E. A. , 1955, *J. Chem. Phys.* , **23**, 415.
- [295]Brant, D. A. , Miller, W. G. , and Flory, P. J. , 1967, *J. Mol. Biol.* , **23**, 47.
- [296]Brant, D. A. , and Flory, P. J. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc.* , **87**, 2788. Brant, D. A. , and Flory, P. J. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc.* , **87**, 2791.
- [297]Brant, D. A. , and Flory, P. J. , 1965, *J. Amer. Chem. Soc.* , **87**, 663.
- [298]Bradley, D. F. , Tinoco, I. , Jr. , and Woody, R. W. , 1963, *Biopolymer* , **1**, 239.
- [299]Bradley, D. F. , Lifson, S. , and Honig, B. , 1964, *Electronic Aspects of Biopolymers* , ed. Pullman, B. , Academic Press, New York, 77.
- [300]Nash, H. A. , and Bradley, D. F. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 261.
- [301]Nash, H. A. , and Bradley, D. F. , 1966, *J. Chem. Phys.* , **45**, 1380.
- [302]Ooi, T. , Scott, R. A. , Vanderkooi, G. , Eppand, R. F. , and Scheraga, H. A. , 1966, *J. Amer. Chem. Soc.* , **88**, 5680.
- [303]Lippincott, E. R. , and Schroeder, R. , 1955, *J. Chem. Phys.* , **23**, 1099.
- [304]Schroeder, R. , and Lippincott, E. R. , 1957, *J. Chem. Phys.* , **61**, 921.
- [305]Poland, D. C. , and Scheraga, H. A. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 275.
- [306]Poland, D. C. , and Scheraga, H. A. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 283.
- [307]Poland, D. C. , and Scheraga, H. A. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 305.
- [308]Poland, D. C. , and Scheraga, H. A. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 315.
- [309]Poland, D. C. , and Scheraga, H. A. , 1965, *Biopolymers* , **3**, 335; Ingwall, R. T. , Scheraga, H. A. , Lotan, N. , Berger, A. , and Katchalsky, E. , 1968, *Biopolymers* , **6**, 331.
- [310]Donohue, J. , 1953, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **39**, 205.
- [311]Low, B. W. , and Grenville-Wells, H. J. , 1953, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , **39**, 785.
- [312]Crick, F. H. C. , and Rich, A. , 1955, *Nature* , **176**, 780.
- [313]March, R. E. , Corey, R. H. , and Pauling, L. , 1955, *Acta Cryst.* , **8**, 710.
- [314]Scheraga, H. A. , Leach, S. J. , and Scott, R. A. , 1965, *Discussion Faraday Soc.* , **40**, 268.

- [315] Lotan, N. , Berger, A. , Katchalski, E. , Ingwall, R. T. , and Scheraga, H. A. , 1966, *Biopolymers*, **4**, 239.
- [316] Blout, E. R. , 1962, *Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins*, ed. Stahmann, M. , University of Wisconsin Press, Madison, 275.
- [317] Bloom, S. M. , Fasman, G. D. , de Loze, D. , and Blout, E. R. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 458.
- [318] Goodman, M. , Boardman, F. , and Listowsky, I. , 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* , **85**, 2491.
- [319] Goodman, M. , Schmitt, E. E. , and Yphantis, D. A. , 1962, *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 1288.
- [320] Wada, A. , 1967, *Poly- α -aminoacids*, ed. Fasman, G. D. , Dekker, New York, 369.
- [321] Mark, J. E. , and Goodman, M. , 1967, *Biopolymers*, **5**, 809.
- [322] Liquori, A. M. , and DeSantis, P. , 1967, *Biopolymers*, **5**, 815.
- [323] Mark, J. E. , and Goodman, M. , 1967, *J. Amer. Chem. Soc.* , **89**, 1267.

第四章 预测多肽立体化学的经验方法

前面系统论述过指定多肽立体化学所采用的仪器及理论方法,这些方法往往是实验药物化学家的障碍,因而难以普及。作为一种补充,本章介绍一些无需进行令人厌烦的测试与数学运算的经验方法。这些方法不仅曾被广泛应用,而且在预测多肽的立体化学有相当的准确度。借助于计算机的帮助,它们具有广阔的发展前景。

一、Lim 方法^[1]

1. 各种不同氨基酸残基的通用符号及表述

疏水性的氨基酸残基用 H 表示,强疏水性氨基酸用 H_L 表示,弱疏水性氨基酸用 H_S 表示,亲水性氨基酸用 G 表示,强亲水性氨基酸用 G_L 表示,弱亲水性氨基酸用 G_S 表示。于是有,

H_L , Cys, $\overbrace{\text{Cys Cys}}$, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp;
 H_S , Ala, Pro
 G_L , Lys, Arg, Glu, Gln, His;
 G_S , Ser, Thr, Asp, Asn

用 S 表示 Gly 和 Ser; 用 M 表示 G, H_S 和 Gly(即除 H_L 以外的所有氨基酸残基)。

用上述符号表达氨基酸序列:

$(H_L)_m(S)_n(GH)_pM$, 等

$(A)_0, (S)_0, (M)_0, (H_L)_0$ 等意味着不存在这种类型的残基。

从 N 端开始标号, 占据 $(i, i+1), (i, i+2), (i, i+3), (i, i+4)$ 的链中的两个残基称为 $(1-2), (1-3), (1-4), (1-5)$ 双体; 而占据链中 $(i, i+1, i+4), (i, i+3, i+4)$ 的三个残基, 称为 $(1-2-5), (1-4-5)$ 三联体。如果双体和三体的位置由 H_L 类残基占据, 则称为疏水性双体和三体。如果这些双体由一个 H_L 残基和一个 G_L 残基组成, 则称为疏水-亲水双体。位置 $p-1$ 和 $q+1 (p < q)$ 称为由 p 和 q 位组成的双体的外位。位置 $p+1, p+2, \dots, q-1$, 称为片段 (p, q) 的内位。当 $k-i = 0, 1, 2, 3$ 时, 一双体占据位置 i 和 $k (i < k)$ 及其它位置 L 和 $m (L < m, k < m)$, 则把这些双体考虑为本身是由 1, 2, 3, 4 个残基连接起来的; 若 $k-i < 0$, 则为非连接的 (见图 4.1)。

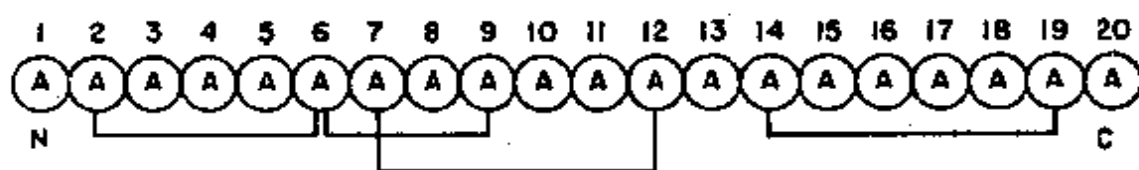


图 4.1 连接和非连接双体

双体 (A_6-A_9) 通过一个残基与双体 (A_2-A_6) 连接; 通过三个残基与 (A_7-A_{12}) 双体连接。 (A_7-A_{12}) 与 $(A_{14}-A_{19})$ 为非连接双体, A 代表氨基酸残基

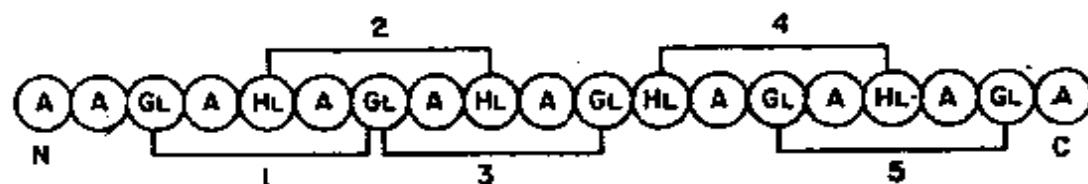


图 4.2 静电双体 (1-5)

标为 1, 3, 5 的 $(1-5)$ 双体为静电双体, 它们是通过三个残基与标为 2 和 4 的疏水性双体相连接的

由 G_L 型残基形成的双体 $(1-5)$ 若通过三个残基即使与仅仅

一个疏水双体(1-5)连接,也称为静电双体(见图4.2)。

由不能安排得当地装入 α -螺旋状态的残基构成的疏水双体和三体,称作反螺旋,其它疏水双体或三体称 α -螺旋(见表4.1)。

由位置 i 和 $i+4$ 形成的疏水双体(1-5)称退化疏水双体(1-5),若位置 $i+1$ 和 $i+3$ 被 H_L 类型的残基占据,且疏水双体(1-4)是由位置 $(i, i+3)$ 和 $(i+1, i+4)$ 组成,则为 α -螺旋。由位置 $(i, i+3)$ 和 $(i+1, i+4)$ 构成的 α -螺旋疏水双体(1-4)称为二元疏水双体(1-4)。

表4.1 反螺旋疏水双体和三体

1-2		二聚体		1-3		1-3-4		三聚体		1-4-5	
X ₁	Phet	Tyr	Pha	X	X	Tyr	X	X	X	Tyr	
X	Tyr	Tyr	Tyr	X	Tyr	X	X	Tyr	X	X	
Tyr	X	Tyr	He	Tyr	X	X	Tyr	X	X	X	
		Tyr	Cys Cys	Trp	X	Val	Trp	X	Val	Val	
	Peave	Trp	Tyr	Trp	X	He	Trp	X	He	He	
		Trp	Val	Trp	X	Cys Cys	Trp	X	Cys Cys	Cys Cys	
Tyr	Tyr	Trp	He	Cys Cys	X	Trp	Trp	Cys Cys	X	X	
Tyr	Trp	Trp	Cys Cys	Cys Cys	X	Val	Cys Cys	X	Trp	Trp	
Val	Tyr	Cys Cys	Trp	Cys Cys	Cys Cys	X	Cys Cys	X	Val	Val	
He	Tyr	Cys Cys	Val	Pha	Cys Cys	X	X	X	Pha	Pha	
				X ₁	Phet	X ₁	X	Pha	He	He	
				X	Cys Cys	Trp	X	Pha	Val	Val	
							X	Cys Cys	Trp	Trp	
							X	Cys Cys	Cys Cys	Cys Cys	

表中的X为计数的任意残基;若 H_S 与 H_L 型残基等同,那么表4.1中含 H_S 残基的双体和三体为反螺旋; 见3部分的解释和螺旋形成规则3

如果S邻近 α -螺旋链内的 H_L ,那么邻近S型侧位基团的空间被标为到达疏水核的通道。若S沿链处于两个 H_L 型残基之间,那么S残基形成两条到达 α -螺旋边界内疏水核的通路(见图4.3)。

假设一种由五个残基构成的含一个疏水双体(1—5)的链状片段,或一种片段(s, t),它的所有疏水性双体(1—5)沿肽链分布时通过1—4个残基至少与后面一个疏水双体(1—5)连接,即不存在非连接的疏水双体(1—5)。这种片段称为X-片段。

如果 H_L 型残基位于X片段之外,但在最接近X片段链的N端或C端形成疏水双体(1—4)[该双体(1—4)的1个或2个外位必须有 G_L 型残基],该(1—4)双体通过1个或2个残基与X片段的对应的极端疏水双体(1—5)连接,那么该X片段即可扩展为包括这种残基(若这类 H_L 处于X片段的左方或右方,那就扩展到两种 H_L)。扩展得到的片段称为Y片段,被扩展的疏水双体(1—4)称为端位疏水双体(1—4)(图4.3)。

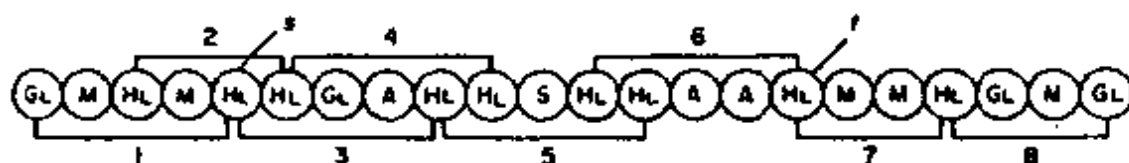


图4.3 X,Y和Z片段

3,4,5,6疏水双体(1—5)形成X片段(s, t); X片段(s, t)与标号为2和7的端位疏水双体(1—4)一起形成Y片段(s—2, t+3); Y片段(s—2, t+3)与标号为1和8的疏水-亲水性双体一起形成Z片段(s—4, t+6); S残基形成到达疏水核的两条通路

如果 G_L 类型的残基形成疏水-亲水双体(1—2), (1—4)或(1—5)或静电双体(1—5), 其 H_L 和 G_L 残基属于X或Y片段, 那么可以把X和Y片段从N和/或C端扩展到包括的 G_L 型残基。与X或Y片段连接的区域必须没有 H_L 型残基。这类扩展的片段称为Z片段(见图4.3)。

2. α -螺旋定域区域的计算

符合 α -螺旋形成规则(见后)的 X, Y, Z 及任何其它片段, 称 α -螺旋。寻找 α -螺旋区域的适宜做法是, 从分离满足规则1, 3的 X, Y 和 Z 片段开始。在一级蛋白结构上画与图4.3类似的图, 很容易开始这种寻找。然后, 若它们满足规则2, 即可以找到 α -螺旋区域。可以外推出所得的 α -螺旋区域相交, 即它们可以具有共同的链区。在这种情况下, 应采用规则4。最后使用规则5和6。

应当提到, 如果由 $i, \dots, (i+k)$ 位形成的 X, Y 或 Z 片段不满足 α -螺旋形成规则, 并不意味着在 $i, \dots, (i+k)$ 位的残基都不能成为螺旋。可能的情形是, X, Y, Z 类型的 $[i, \dots, (i+k)]$ 片段的一部分也是 X, Y, Z 型片段, 但满足 α -螺旋形成规则。所以应进一步考虑满足 α -螺旋形成规则的任何 X, Y, Z 片段。

在寻找分离的 X 片段或包括在 Y 或 Z 片段中的 X 片段时, 应把一些 H_s 与 H_L 残基等同。这将使一些 (p, q) 片段成为满足 α -螺旋形成规则的 X 片段。使 (p, q) 片段的内位 $i (p < i < q)$ 中的 H_s 残基满足下述四个条件:

① $i \pm 1$ 两个位置中至少有一个位置被 H_L 或 G_L 型残基占据, 或者 H_s 包括在五个或更多残基的链片段中, 在这些残基中没有 G 型残基;

② 在 (p, q) 片段限度内, H_s 至少形成一个有 H_L 型残基的 (H_s-H_L) 或 (H_L-H_s) 的 $(1-5)$ 双体。

如果下述两个条件至少有一个被满足, 那就应当把这类 H_s 残基与 H_L 残基等同, 并把 (H_s-H_L) (H_L-H_s) 型的 $(1-5)$ 双体与 (H_L-H_L) 型疏水型双体等同起来, 从不把 (H_s-H_s) 型 $(1-5)$ 双体看作疏水的:

③ (p, q) 片段是由不满足 α -螺旋形成规则的 (H_L-H_L) 型的通常的疏水双体 (1-5) 形成的 X 片段, 但是如果它的一个或几个满足条件①和②的 H_S 残基与 H_L 等同, 那么这种 X 片段将满足这些 α -螺旋形成规则。

④ 片段 (p, q) 只有在考虑 (H_S-H_L) 和/或 (H_L-H_S) 类型的 (1-5) 疏水双体的情况下, 才可能是满足 α -螺旋形成规则的 X 片段, 若只考虑 (H_L-H_L) 型的通常疏水性 (1-5) 双体, 它就将不是 X 片段。(H_S-H_L) 和 (H_L-H_S) 型 (1-5) 双体中的 H_S 残基, 必须满足上述条件①和②。

在所有其它条件下, 当这些条件得不到满足时, H_S 残基不再与 H_L 等同, (H_S-H_L) 和 (H_L-H_S) 型的 (1-5) 双体不再被看作是疏水性的。

与 H_L 等同的 H_S 残基能够参与 Y 和 Z 片段中端位疏水双体 (1-4) 和退化疏水双体 (1-5) 情形中的 α -螺旋疏水性双体 (1-4) 的形成, 而且将与沿链的 H_S 近邻的 S 型残基形成到疏水核的通路, 即 $H_S \equiv H_L$ 。下述规则可用来预测 α -螺旋的形成:

规则1: 若不含有下述情况, X, Y, Z 片段被看作 α -螺旋:

1.1 不含反螺旋疏水双体 (1-5) [允许的退化的疏水双体 (1-5) 除外]、反螺旋端位疏水双体 (1-4);

1.2 不含不形成任何一种 α -螺旋疏水双体 (1-5)、二元疏水双体 (1-4)、 α -螺旋端位疏水双体 (1-4) 或 α -螺旋疏水三体 (1-2-5) 或 (1-4-5) 的 H_L 型残基 (包括与 H_L 等同的 H_S)。如果位置 $i, i+4$ 中的残基形成 α -螺旋疏水双体 (1-5) 而且 $i+3$ 位置不含 G 型残基, 那么能位于 $i+2$ 位置的 α -螺旋区域中的 Trp 就成为例外。

1.3 除疏水性三体中有两个或三个 Phe 的情形外, 不含有

Phe, Tyr, Trp, Cys—Cys 的疏水性 (1—2—5) 或 (1—4—5) 三体。

1.4 不含片段 $H_L \bar{G} H_L \bar{G} H_L$, $G_s(A)_2(H_L)_3$, $(H_L)_3(A)_2 G_s$, $H_L \text{Trp} H_L$, $H_L(A)_3 \text{Trp}(A)_3 H_L$, $H_L(A)_3 \text{Trp} H_L$, $H_L \text{Trp}(A)_3 H_L$, 其中 Pro 处在 4, 5, 6 等位置, 也不含片段 (Apro), 这里的 \bar{A} 为除 Gly 在外的 A(氨基酸), \bar{G} 为所有的 G 和 Gly。

1.5 加上对 α -螺旋 X, Y, Z 片段的要求 (1.1), (1.2), (1.3), (1.4) 的要求, 按惯例引入下述要求: 通往疏水核 (Θ) 的通路数必须小于静电双体 (1—5)、疏水双体 (1—5) 和端位疏水双体 (1—4) 的总数 (Σ), 即必须观察到不等式 $\Sigma - \Theta = \Omega > 0$ 。

1.6 在寻找 α -螺旋 X, Y, Z 片段时, 也应考虑规则 3。

规则 2: α -螺旋也将是 $G_L(\bar{M})_l(\bar{H}_L)_p(\bar{M})_m G_L$ 型片段, 其中 l, p, m 取下面的值:

(2a) $p = 1$; $l = 0, 1, 2, 3$; $m = 3$;

(2b) $p = 1$; $l = 3$, $m = 0, 1, 2, 3$;

(2c) $p = 2$; $l = 0, 1, 2, 3$; $m = 2, 3$;

(2d) $p = 2$; $l = 2, 3$; $m = 0, 1, 2, 3$ 。

其中 \bar{H}_L 为除 Trp 和 Tyr 外的一切 H_L ; \bar{M} 为除 Pro 外的一切 M。

$p = 1$ 时, 若 \bar{H}_L 处在 i 位, 那么 $i - 1$ 和 $i + 1$ 位必须由 G_L 型残基占据。

$p = 2$ 时, 若 \bar{H}_L 处在 i 和 $i + 1$ 位, 那么 $i - 1$ 和 $i + 2$ 位必须不含 S 型残基。处在 i 和 $i + 1$ 位的两个 \bar{H}_L 残基必须不形成反螺旋疏水双体 (1—2)。对于这两个 \bar{H}_L , 必须满足规则 3。

$p = 1$ 或 2 时, \bar{H}_L 必须不形成具有 \bar{H}_L 位于沿链的 $G_L(\bar{M})_l(\bar{H}_L)_p(\bar{M})_m G_L$ 区域外侧的疏水双体 (1—3), (1—4) 和 (1—5)。

规则 3: 令疏水双体 (1—2) 或疏水三体 (1—2—5) 分别由位置 ($i, i + 1$) 和 ($i, i + 1, i + 4$) 形成, 而且 $i + 1$ 位含 Phe。如果位

于 $i+1$ 位的 Phe 在得到的 α -螺旋内形成一具有位于 $i-3$ 位的 G_L 的疏水-亲水双体(1-5), 那么这种疏水双体(1-2)或疏水三体(1-2-5)(表4.1中标有*号)将是 α -螺旋。

规则4: 满足规则1, 3或2, 3的 X, Y, Z 和 $G_L(\overline{M})_i(\overline{H}_L)$, $(\overline{M})_n G_L$ 片段标为 $(K_j \cdots T_j)$, 其中 K_j 和 T_j 是第 j 个片段的 N 端和 C 端位置的号码。

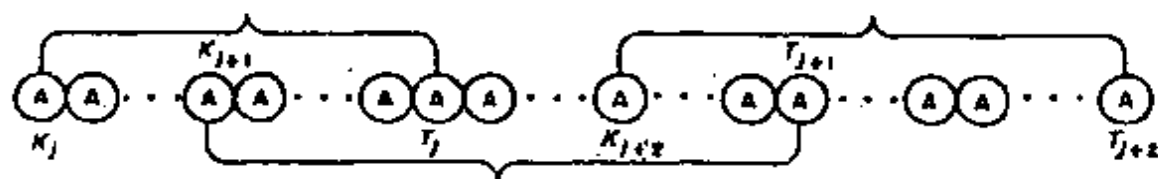


图4.4 寻找 α -螺旋区域

$(K_j \cdots T_{j+2})$ 区域不满足规则1, 3或2, 3, 但含有相交的片段 $(K_j \cdots T_j)$, $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 和 $(K_{j+2} \cdots T_{j+2})$, 它们满足这些规则, $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 和 $(K_{j+2} \cdots T_{j+1})$ 是共同的片段

寻找 α -螺旋区域时, 可能发现 $(K_j \cdots T_{j+n-1})$ 链的分的区域, 该链本身不满足规则1, 3或2, 3, 但它由 n 个区域 $(K_j \cdots T_j)$, $(K_{j+1} \cdots T_{j+1}) \cdots (K_{j+n-1} \cdots T_{j+n-1})$ 组成, 它们分别满足规则1, 3或2, 3, 并相交形成 $n-1$ 个共同的片段 $(K_{j+1} \cdots T_j)$, $(K_{j+2} \cdots T_{j+1}) \cdots (K_{j+n-1} \cdots T_{j+n-2})$, 其中 $K_{j+t} < K_{j+t+1} \leq T_{j+t} < T_{j+t+1}$, 而且 $t = 0, 1, 2, \dots$ (见图4.4)。在这种情景下, 出现的问题是: 如何把 $(K_j \cdots T_{j+n-1})$ 区域分成1个或多个分开的 α -螺旋区。为了回答这个问题只要详细说明正式的规则就够了。按照这些规则, 两相交区域 $(K_j \cdots T_j)$ 和 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 的每个共同片段 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 将归结于或不归结于这些区域之一。在把这种规则公式化之前, 先考察在相交区域 $(K_j \cdots T_j)$ 和 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 能发现何种类型的片段。

共同的片段 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 仅可以是两种类型, 类型“a”, 共同片

段为 X, Y 或 Z 片段; 类型“b”, 共同片段为任意片段, 但不是类型“a”和 $G_L(\overline{M})_L(\overline{H}_L), (\overline{M})_n G_L$ 片段。

4.1 应当注意到, 在链中的一些区域中可以同时有满足规则 1 和 3 的 X, Y, Z 三个片段相交。这种现象只有当 $(K_j \cdots T_j)$ 和 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$, 两个区域形成“a”型片段, 而第三个区域 $(K_{j-1} \cdots T_{j-1})$, 或 $(K_{j+2} \cdots T_{j+2})$ 形成具有前两个区域之一的共同片段 (该共同片段永远只能是“b”型) 时才能观察到。这种共同的“b”型片段和前两个区域的“a”型共同片段相交。结果是前两个区域的共同片段的一部分同时又是第三个区域的共同片段。考虑三体相交将使计算大大复杂化。为了回避三体相交, 若区域 $(K_{j-1} \cdots T_{j-1})$ 或 $(K_{j+2} \cdots T_{j+2})$ 与区域 $(K_j \cdots T_j)$ 及 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 的“a”型共同片段相交则不考察它。虽然事实上它满足规则 1, 3, 但仍正常地把它看作不能形成 α -螺旋。这不意味着整个 $(K_{j-1} \cdots T_{j-1})$ 或 $(K_{j+2} \cdots T_{j+2})$ 区域将不形成螺旋。如果这种区域的一部分是满足规则 1, 3 的 X, Y, Z 型片段, 并且不与“a”型共同片段 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 相交, 然后这种 X, Y, Z 片段将与其它的 $(K_j \cdots T_j)$ 一起考虑。

现在把规则公式化。按照这些规则, 含两个或多个相交的 $(K_j \cdots T_j)$ 区域的链的分离的区域将成分离的 α -螺旋区。本着这种目的, 将从每个共同片段的 K_{j+1} , T_j 位形成 α -螺旋的 N 端和 C 端, 并按照下面的规则从 $(K_{j+1}-1)$ 和 (T_{j+1}) 相邻位形成 N 端和 C 端。

4.2 — α -螺旋的 C 端位置和链中另一相邻 α -螺旋的 N 端位置应当是分别为 T_j 和 (T_{j+1}) , 若 $T_j - K_j > T_{j+1} - K_{j+1}$, 或若 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$ 和 $\Omega_j > \Omega_{j+1}$; 分别为 $(K_{j+1}-1)$ 和 K_{j+1} , 若 $T_j - K_j < T_{j+1} - K_{j+1}$ 或若 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$ 和 $\Omega_j < \Omega_{j+1}$ 。按照规则 1.5 定义: $G_L(\overline{M})_L(\overline{H}_L), (\overline{M})_n G_L$ 型 α -螺旋的 Ω 将视为零。

4.3 若 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 为“b”型共同片段且 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$,

$\Omega_j = \Omega_{j+1}$, 则一个 α -螺旋的 C 端位和另一相邻 α -螺旋的 N 端位置应分别为 $(K_{j+1}-1)$ 和 (T_j+1) , $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 区域亦不是螺旋。

4.4 若 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 为“a”型共同片段, 且 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$, $\Omega_j = \Omega_{j+1}$, 则 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 区域将是一分开的螺旋, 并且位置 $(K_{j+1}-1)$ 和 (T_{j+1}) 将对应于和 α -螺旋 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 相邻的两个螺旋的 C 端和 N 端。

下面考虑应用规则4的例子:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Arg	Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Ala	Gln	Ile	Asp
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ala	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Asp	Val

这里 $\text{Arg}^1 - \text{Lys}^{15}$ 和 $\text{Gln}^8 - \text{Val}^{20}$ 为 Z 片段。因为 Ser^4 和 Ser^{13} , Z 片段 $\text{Arg}^1 - \text{Lys}^{16}$ 不满足规则1, 但从中可以分离出 $\text{Arg}^1 - \text{Leu}^{12}$ 和 $\text{Met}^5 - \text{Lys}^{15}$ 满足规则1和3的两个 Z 片段, 并形成共同的“a”型 $\text{Met}^5 - \text{Leu}^{12}$ 片段。 $\text{Gln}^8 - \text{Val}^{20}$ Z 片段与该共同的“a”型片段相交, 按照规则(4.1)不应考虑 Z 片段 $\text{Gln}^8 - \text{Val}^{20}$, 但它包含 Z 片段 $\text{Lys}^{15} - \text{Val}^{20}$, 该片段不与“a”型共同片段 $\text{Met}^5 - \text{Leu}^{12}$ 相交并满足规则1和3。这样一来, 得到三个 $(K \cdots T_j)$ 片段, 是 $\text{Arg}^1 - \text{Leu}^{12}$, $\text{Met}^5 - \text{Lys}^{15}$ 和 $\text{Lys}^{15} - \text{Val}^{20}$, 它们的 $T_i - K_i$ 分别为11, 10和5。这三个片段形成了“a”型共同片段 $\text{Met}^5 - \text{Leu}^{12}$ 和“b”型的一个共同残基 Lys^{15} 。按照规则(4.2), 因为 $T_1 - K_1 = 11 > T_2 - K_2 = 10$ 和 $T_2 - K_2 = 10 > T_3 - K_3 = 5$, 所以 Leu^{12} 和 Lys^{15} 应为 α -螺旋的 C 端, Ser^{13} 和 Leu^{16} 应为 α -螺旋的 N 端。运用规则4之后, 在 $\text{Arg}^1 - \text{Val}^{20}$ 片段上, 应得到 $\text{Arg}^1 - \text{Leu}^{12}$ 、 $\text{Ser}^{13} - \text{Lys}^{15}$ 和 $\text{Leu}^{16} - \text{Val}^{20}$ 三个 α -螺旋区域。

规则5: 随着规则4中(4.1)–(4.4)的实现, 仍能保持短 $(K \cdots$

T_j)区域, 这些短区域不包含 $X, Y, Z, G_L(\bar{M})_i(\bar{H}_L), (\bar{M})_n G_L$ 型序列 (也可以有不含 H_L 残基的 α -螺旋, 并且这类 α -螺旋不被考虑), 也就是说 α -螺旋不以 G_L 和/或 H_L 型残基为起点或端点; 这类 α -螺旋另外也必须缩短其氨基酸序列以便属于 X, Y, Z 和 $G_L(\bar{M})_i(\bar{H}_L), (\bar{M})_n G_L$ 类型。这些缩短的 α -螺旋也必须满足规则1, 3或2, 3。

规则6: 根据规则1—5得到的所有 α -螺旋区域, 这些区域仅由六个以上残基组成, 应固定地看作 α -螺旋。

6.1 如果它们具有 $G_L(\bar{M})_i(\bar{H}_L), (\bar{M})_n G_L$ 型序列;

6.2 如果它们具有两个疏水双体(1—5), 而且所含的 H_L 型残基不多于四个。

3. β 结构定域区域的计算

规则1: 寻找 β 结构区域只要确定链的碎片不属于 α -螺旋区域。通常把角度 Φ 和 Ψ 接近 β 结构经典角度的所有区域标为 β 结构区域, 不管事实上这些区域是否形成交叉的氢键。球蛋白中分离的 β 结构区域可表示为表面的、半表面的和内部的三种类型。寻找 β 结构时, 和定域 α -螺旋中的情形一样, 虽然链的分离的区域本身并不满足规则2—5, 但它是由于数个 $(K_j \cdots T_j)$ 区域组成的, 每个区域分别满足规则2, 5; 3, 5或4, 5, 并相交形成共同的片段 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 。在这些情况下, 应使用规则6, 7和8, 把这样一种区域成分离的 β 结构区域。

规则2: 表面 β 结构的区域是 $H_L G(\bar{H}_L G)_k H_L$, 其中 $k = 1, 2, 3, \dots, n$; \bar{H}_L 为一切 H_L 和 Ala 。 $H_L G(\bar{H}_L G)_k H_L$ 区域必须不含 $AlaGAla$ 型片段。

规则3: 半表面 β 结构的区域是: $(\bar{H}_S)_r (G_S)_q (\bar{H}_S)_s (G_S)_q (\bar{H}_S)_r'$, 其中 \bar{H}_S 为 Ala, Gly 。区域 $(\bar{H}_S)_r (G_S)_q (\bar{H}_S)_s (G_S)_q' (\bar{H}_S)_r'$ 只

能具有下述序列:

$$3.1 \quad n > 3; p, q, p', q' = 0, 1;$$

$$3.2 \quad n = 3; p = 1; q = 1; p', q' = 0, 1;$$

$$3.3 \quad n = 3, p' = 1; q' = 1; p, q = 0, 1$$

在所有这些区域, $(\bar{H}_S)_r, (G_S)_q, (\bar{H}_S)_s, (G_S)_{q'}, (\bar{H}_S)_{r'}$ 至少必须含一个 $(Gly)_m$ 片段, 其中 $m > 1$ 。

规则 4: 内部 β 结构的区域是 $(A)_n, (H_L)_n, (A)_q$ 其中 $n > 1; p, q, = 0, 1, 2$;

$$(A)_{n=1} = Ala, G_L; (A)_{q=1} = Ala, G_L;$$

$$(A)_{n=2} = H_L \bar{M}, G_L M, Ala Ala$$

$$(A)_{q=2} = \bar{M} H_L, M G_L, Ala Ala$$

这里的 \bar{M} 为除甘氨酸在外的一切 M 。

规则 5: 脯氨酸和先于它的链中的残基不包括在 β 结构区域。在 β 区域的界限内必须没有 $H_L A Trp A H_L$ 型片段。色氨酸和酪氨酸必须总是形成 H_L 或丙氨酸处于 β 结构区域界限内的 $(1-3)$ 双体。

规则 6: 满足规则 2, 5; 3, 5; 或 4, 5 的片段及其共同的片段将按相同的方法标为定域在 α -螺旋区, 它们分别为 $(K_j \cdots T_j)$ 和 $(K_{j+1} \cdots T_j)$ 。

6.1 如果存在三重相交区域 $(K_j \cdots T_j)$, $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 和 $(K_{j+2} \cdots T_{j+2})$, 那么所有这三个区域的共同片段永远为片段 $(K_{j+2} \cdots T_j)$ 。在 $(K_j \cdots T_{j+2})$ 区域中三重相交的情况下, 将不考虑 $(K_j \cdots T_j)$ 、 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 和 $(K_{j+2} \cdots T_{j+2})$ 区域形成三重共同片段 $(K_{j+2} \cdots T_j)$, 但应仅仅考虑满足规则 2, 5; 3, 5; 4, 5m 的片段和不含 $(K_{j+2}), (K_{j+2}+1), \cdots T_j$ 位置, 这将避免三重相交。

6.2 β 结构区域的 C 端位置和链中其它邻近区域的 N 端位置应为: 如果 $T_j - K_j > T_{j+1} - K_{j+1}$ 或如果 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$, 而

且 $(K_j \cdots T_j)$ 区域的 H_L 和丙氨酸的累计数大于 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 中的累计数, 则位置分别为 T_j 和 $(T_j + 1)$ 。如果 $T_j - K_j < T_{j+1} - K_{j+1}$ 或如果 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$, 而且 $(K_j \cdots T_j)$ 区域中 H_L 和丙氨酸残基的总数小于 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 区域中的总数, 则位置分别为 $(K_{j+1} - 1)$ 和 (K_{j+1}) 。

6.3 如果 $T_j - K_j = T_{j+1} - K_{j+1}$, 而且 $(K_j \cdots T_j)$ 和 $(K_{j+1} \cdots T_{j+1})$ 区域中的 H_L 和丙氨酸残基的总数相等, 当 $T_j = K_{j+1}$ 时, 一个 β 结构区域的 C 端位置和另一个 β 结构区域的 N 端位置分别为 $(T_j - 1)$ 和 $(K_{j+1} + 1)$, 当 $T_j - K_{j+1} > 0$ 时, 则分别为 K_{j+1} 和 T_j 。

规则 7: 实现规则 6 中 (6.1), (6.2), (6.3) 的结果是, 能够形成短的 β 结构区域, 它们的序列不包括到 $H_L G (\overline{H}_L G)_k H_L, (\overline{H}_S)_r, (G_S)_q (\overline{H}_S)_s (G_S)_q (\overline{H}_S)_r$, 或 $(A)_t (H_L)_s (A)_q$ 类型中。这类 β 结构必须额外缩短, 使它的氨基酸序列属于 $H_L G (\overline{H}_L G)_k H_L, (\overline{H}_S)_r (G_S)_q (\overline{H}_S)_s (G_S)_q (\overline{H}_S)_r$, 或 $(A)_t (H_L)_s (A)_q$ 类型。这些缩短的 β 结构也必须满足规则 2—5。

规则 8: 在根据规则 1—7 得到的 β 结构区域中, 不考虑有 2 个或 3 个残基的区域 (若它们没有三个 H_L)。不考虑 2—4 个残基的半表面 β 结构区域 (若它们没有 4 个 \overline{H}_S)。

4. 解释和实例

从 N 端到 C 端连续考察它的一级结构, 揭示了下述 X 和 Z 片段: Tyr²⁵-Arg³³, Lys³⁷-Gln⁵⁵, His⁴⁸-Lys⁶¹, Gln⁶⁹-Tyr⁷⁶, Lys¹⁰⁴-Glu¹¹¹, Val¹¹⁶-Val¹²⁴。Z 片段 Tyr²⁵-Arg³³ 满足规则 1, 3, 6, 所以应考虑为 α -螺旋。因为 Pro¹² (见规则 1.4) 及包括在反螺旋三体 (1-4-5, Val-Phe-Val) 中的 Phe⁴⁶, Z 片段 Lys³⁷-Gln⁵⁵ 不满足 α -螺旋形成规则, 并且不包括在任何反螺旋疏水双体 (1-5)、端位疏水双体 (1-4)

或疏水三体之中（条件b）。因 Ser⁵⁰和 Ser⁵⁹ ($\Omega < 0$ ，见规则1.5)，故 Z 片段 His⁴⁸-Lys⁶¹不满足 α -螺旋形成规则。Z 片段 Glu⁶⁹-Tyr⁷⁶同时还违背规则(1)中的(1.2)，(1.3)，(1.5)。因为 Val¹⁰⁸、Val¹¹⁸ (规则1.1)、Pro¹¹⁷ (规则1.4)和 Ser¹²³ (规则1.5)，Z 片段 Lys¹⁰⁴-Glu¹¹¹、Val¹¹⁶-Val¹²⁴也不满足 α -螺旋形成规则。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg
10	Gln	His	Met	Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Ala	Ala
20	Ser	Ser	Ser	Asn	Tyr	Cys *	Asn	Gln	Met	Met
30	Lys	Ser	Arg	Asn	Leu	Thr	Lys	Asp	Arg	Cys *
40	Lys	Pro	Val	Asn	Thr	Phe	Val	His	Glu	Ser
50	Leu	Ala	Asp	Val	Gln	Ala	Val	Cys *	Ser	Gln
60	Lys	Asn	Val	Ala	Cys *	Lys	Asn	Gly	Gln	Thr
70	Asn	Cys *	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Met	Ser
80	Ile	Thr	Asp	Cys *	Arg	Glu	Thr	Gly	Ser	Ser
90	Lys	Tyr	Pro	Asn	Cys *	Ala	Tyr	Lys	Thr	Thr
100	Gln	Ala	Asn	Lys	His	Ile	Ile	Val	Ala	Cys *
110	Glu	Gly	Asn	Pro	Tyr	Val	Pro	Val	His	Phe
120	Asp	Ala	Ser	Val						

牛核糖核酸酶的二级结构

* Cys 形成 S-S 桥

上面考虑的 Z 片段中，只有某些部分满足 α -螺旋形成规则。它们是 Z 片段 Val⁴⁷-Gln⁵⁵，His⁴⁸-Cys⁵⁸，Leu⁵¹-Lys⁶¹。Z 片段 His⁴⁸-Cys⁵⁸和 Leu⁵¹-Lys⁶¹形成共同的“a”型片段 Leu⁵¹-Cys⁵⁸。因为 Val⁴⁷-Gln⁵⁵与共同片段(“a”型)Leu⁵¹-Cys⁵⁸相交，所以不考虑该 Z 片段 Val⁴⁷-Gln⁵⁵(见规则4.1)。同时从不与共同片段 Leu⁵¹-Cys⁵⁸相交的

Z 片段 Val⁴⁷-Gln⁵³，不可能形成 X、Y 或 Z 片段。结果是相交的 Z 片段 His⁴⁸-Cys⁵⁸和 Leu⁵¹-Lys⁶¹（还有 Z 片段 Tyr²⁵-Arg³³）为仅保留下来的片段。按照规则（4.4），5，6，应得到第二个 α -螺旋区域 Leu⁵¹-Cys⁵⁸。Lys⁷-His¹²满足规则2，3，6，为第三个 α -螺旋区域。于是，获得了（7—12），（25—33）和（51—58）三个 α -螺旋区。实验结果也给出了（3—13），（24—34）和（50—57）三个 α -螺旋区。

在不包括于 α -螺旋区域的片段中，只有三个具有 β 结构的氨基酸序列（46—49），（104—110）以及（118—124），它们满足 β 结构的规则。

用该法估算了用 X 衍射法测定过的25种蛋白，精确度为，预测的 α -螺旋区为约80%， β 结构区为约85%。

二、Fasman 方法^[2]

Zimm 和 Bragg 模型把参数 σ 定义为螺旋起始协同参数， S 定义为盘绕残基向处于长螺旋端点的螺旋状态转化的平衡常数。25°C时用电位滴定法测得聚-L-谷氨酸和聚-L-赖氨酸的 S 值分别为 1.25 和 1.15。因为 S 为 1 时对应着长链大体上转化为螺旋形态的临界值，所以这两个高聚体的 S 大于单位 S 值，这意味着它们是稳定的螺旋，并已为旋光研究所证实。对块状和无规则共聚肽在水溶液中的构象稳定性进行温度研究，提供了另外的 S 值， S_{Gly} 为 0.57、 S_{Ser} 为 0.78、 S_{Leu} 为 1.30。甘氨酸和丝氨酸的较低的 S 值早就被定性研究证实，这些研究表明，往具有 L-谷氨酸- γ -乙酯的共聚体中掺入甘氨酸，导致螺旋去稳定化；低分子量的聚丝氨酸在水中被假定为无规则链构象，而高分子量的样品和块状共聚物假定为无规则或 β 结构。似乎丙氨酸和亮氨酸的 $S > 1$ 值反

映了这两种残基有很强的螺旋形成能力，这表现在95℃下聚丙烯氨酸在水中的极端稳定性以及随着亮氨酸掺入量增加，谷氨酸和亮氨酸的共聚物螺旋稳定性增加。

含羟脯氨酰谷氨酸的亮氨酸的无规则共聚体的 CD 研究表明，在共聚物中增加亮氨酸的掺入，导致较大的螺旋稳定度。热力学计算还表明（根据 CD 研究结果），当温度从0℃升至70℃时， S_{Leu} 从1.20增至1.28。在这些温度下，可比较的 S_{Ala} 值为1.08和1.00。亮氨酸的 S 值大于丙氨酸，可能是前者的较大的非极性侧链，促进了螺旋的疏水稳定性。亮氨酸螺旋中的疏水性相互作用的重要性，也反映在较高的温度下 S_{Leu} 值较大这样的事实中，这些结果与理论研究极其吻合。赖氨酸、亮氨酸无规则共聚物的电位滴定得到聚赖氨酸的 S 值为1.13，外推得25℃下聚赖氨酸的 S 值为1.92。较早对以内消旋聚赖氨酸为尾端块的亮氨酸块状高聚物研究，在25℃下，给出的 S_{Leu} 为1.30。在三种不同的共聚物的环境下，平均 S 值 $\langle S_{Leu}^{25} \rangle$ 为1.47，因为现存的其它氨基酸的所有 S 值都比该值低，亮氨酸可能是最强的螺旋形成残基。这种结果导致对已知构象的15种蛋白的不同区域进行研究，结果表明，尽管在螺旋区域最常发现谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸，但在蛋白的内螺旋核中亮氨酸明显地是最强的螺旋形成残基。

下面的方法是把15种蛋白中所有20种氨基酸在各种构象状态下出现的几率与实验的 Zimm 和 Bragg σ 及 S 参数进行比较；分析螺旋和 β 片层的边界残基，理出这些构象区域终止的线索。综述这15种蛋白的氨基酸序列和构象由 X 光衍射确定，它们是羧肽酶 A、 α -胰凝乳蛋白酶、细胞色素 bs、胰肽酶 E、高铁细胞色素 C、 α 和 β 血红蛋白、胰岛素、溶菌酶、肌蛋白、肌红蛋白、木瓜蛋白酶、核糖核酸酶 S、葡萄球菌核酸酶和枯草杆菌蛋白酶 BPN'。这些蛋白的螺

表 4.2 15种蛋白的螺旋、内螺旋、 β 和盘绕区的氨基酸残基

氨基酸	残基 数目	螺旋中 残基数目	内螺旋中 残基数目	β 区 残基数目	盘绕区 残基数目
Ala	228	119	62	38	71
Arg	78	22	9	12	44
Asn	133	35	12	15	83
Asp	111	39	10	15	57
Cys	54	15	3	12	27
Gln	95	40	16	20	35
Glu	113	62	28	5	46
Gly	232	45	22	32	155
His	74	33	11	9	32
Ile	106	38	22	29	39
Leu	196	94	64	41	61
Lys	175	67	34	22	86
Met	28	12	6	8	8
Phe	82	33	16	18	31
Pro	85	18	0	9	58
Ser	202	57	24	25	120
Thr	156	47	21	32	77
Trp	44	18	10	9	17
Tyr	100	22	10	22	56
Val	181	74	44	51	56
总数	2473	890	424	424	1159

* 忽略了螺旋区域的 N 和 C 端上的三种螺旋端点的残基

旋、 β 片层、无规则区域的氨基酸残基列入表 4.2。应当注意到，由于后来更详细的 X 射线衍射数据， β 片层残基的数据稍有差别。在原始论文中 β 区域没有清晰地专一化，如同在胰凝乳蛋白酶、胰肽酶 E 和核糖核酸酶 S 的情形中一样，简图表明这些蛋白中的氢键通常表明 β 片层区域。X 射线衍射研究过的所有标为螺旋 ($\alpha_1, \alpha_2, 3_{10}$ 、变形螺旋) 的区域已经包括到表 4.2 的螺旋残基之中。虽然在螺旋区域有些变化，但分析并未使计算结果发生大的

变动, 所以表 4.2 中的螺旋残基与早先报道的螺旋残基一致。由于以前综述的螺旋和非螺旋残基仅以少数蛋白为基础, 所以这里用 15 种蛋白含 2473 个残基的分析应比以前报道的数据更有统计学可信性。此外, 这里对 β 片层区域及螺旋和 β 片层的边界区域进行了更详细的分析。最后使用了一种新的归一化程序求取可预测蛋白构象的螺旋、 β 和盘绕构象参数。

1. 蛋白构象参数

用每种氨基酸残基出现在每种构象中的次数除以它出现在螺旋、内螺旋、 β 片层和无规则区域的总次数, 即得所有 20 种氨基酸在各构象状态中出现的频率。15 种蛋白得到的结果列入表 4.3。该结果表明, 谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸、和组氨酸在螺旋区域出现的几率最大, 亮氨酸、丙氨酸、谷氨酸和缬氨酸最常出现在蛋白的内螺旋核。蛋氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸似乎是形成 β 片层最强的残基, 脯氨酸、甘氨酸、天冬酰胺和丝氨酸最常出现在蛋白的无规则残基中。15 种蛋白中螺旋、 β 和无规则区域中残基的百分比分别为 36%, 17% 和 47%。表 4.3 中用平均分数表示为 $\langle f_\alpha \rangle = 0.360$ 、 $\langle f_\beta \rangle = 0.171$ 和 $\langle f_c \rangle = 0.469$ 。内螺旋核中发现的残基平均分数与 β 区域相等, $\langle f_w \rangle = 0.171$ 。

若 20 种氨基酸在螺旋、内螺旋、 β 和无规则区域的残基频率分别被各区域中的残基的平均频率除, 可得蛋白构象参数: $P_\alpha = f_\alpha / \langle f_\alpha \rangle$, $P_w = f_w / \langle f_w \rangle$, $P_\beta = f_\beta / \langle f_\beta \rangle$, $P_c = f_c / \langle f_c \rangle$ (见表 4.3)。由这种正规化程序给出的 P_α 和 P_w 值与 Zimm-Bragg 螺旋生长参数 S 类似。由均聚物和共聚物数据得到的 7 种氨基酸的平均实验 S 值 $\langle S \rangle$, 与由蛋白中螺旋残基的频率计算出的螺旋构象参数 P_α , 在表 4.4 中进行比较。聚(α -氨基酸)的实验 S 值与蛋白的

表4.3 15种蛋白残基的频率及 P_{α} , $P_{\alpha\beta}$, P_{β} 和 P_e .

AA	f_{α}	P_{α}	$f_{\alpha\beta}$	$P_{\alpha\beta}$	f_{β}	P_{β}	f_e	P_e
Ala	0.522	1.45	0.272	1.59	0.167	0.97	0.311	0.66
Arg	0.282	0.79	0.115	0.67	0.154	0.90	0.564	1.20
Asn	0.263	0.73	0.090	0.53	0.113	0.65	0.624	1.33
Asp	0.351	0.98	0.090	0.53	0.137	0.80	0.514	1.09
Cys	0.278	0.77	0.056	0.33	0.222	1.30	0.500	1.07
Gln	0.421	1.17	0.168	0.98	0.211	1.23	0.368	0.79
Glu	0.549	1.53	0.248	1.45	0.044	0.26	0.407	0.87
Gly	0.190	0.53	0.091	0.53	0.138	0.81	0.668	1.42
His	0.446	1.24	0.149	0.87	0.122	0.71	0.432	0.92
Ile	0.358	1.00	0.208	1.22	0.274	1.60	0.368	0.78
Leu	0.480	1.34	0.327	1.91	0.209	1.22	0.311	0.66
Lys	0.383	1.07	0.194	1.13	0.126	0.74	0.491	1.05
Met	0.429	1.20	0.214	1.25	0.286	1.67	0.286	0.61
Phe	0.402	1.12	0.195	1.14	0.219	1.28	0.378	0.81
Pro	0.212	0.59	0	0	0.106	0.62	0.682	1.45
Ser	0.282	0.79	0.119	0.70	0.124	0.72	0.594	1.27
Thr	0.295	0.82	0.128	0.75	0.205	1.20	0.494	1.05
Trp	0.409	1.14	0.227	1.33	0.203	1.19	0.386	0.82
Tyr	0.220	0.61	0.100	0.58	0.220	1.29	0.560	1.19
Val	0.409	1.14	0.243	1.42	0.282	1.65	0.309	0.66

$$\langle f_{\alpha} \rangle^e = 0.359; \langle P_{\alpha} \rangle^e = 1.00; \langle f_{\alpha\beta} \rangle^e = 0.171;$$

$$\langle P_{\alpha\beta} \rangle^e = 1.00; \langle f_{\beta} \rangle^e = 0.171; \langle f_{\beta} \rangle^e = 1.00;$$

$$\langle f_e \rangle^e = 0.469; \langle P_e \rangle^e = 1.00$$

a. 旋区的 N 和 C 端两端的三种螺旋端点残基略去;

b. f_{α} , $f_{\alpha\beta}$, f_{β} 和 f_e 分别表示螺旋、内螺旋、 β 和无规则区域中残基出现的频率;

c. P_{α} , $P_{\alpha\beta}$, P_{β} 和 P_e 分别表示螺旋的构象参数 ($f_{\alpha}/\langle f_{\alpha} \rangle$)、内螺旋的构象参数 ($f_{\alpha\beta}/\langle f_{\alpha\beta} \rangle$)、 β 区域的构象参数 ($f_{\beta}/\langle f_{\beta} \rangle$) 和无规则区域的构象参数 ($f_e/\langle f_e \rangle$)。

表 4.4 S , $\langle S \rangle$ 及 P_a 值*

氨基酸	$\langle S \rangle$	P_a
Glu	1.26b-h	1.53
Ala	1.11h-k	1.45
Leu	1.40l-o	1.34
His	1.36p	1.24
Lys	1.15d,e,n,q,	1.07
Ser	0.78r	0.79
Gly	0.57s	0.53

*, 溶剂条件为: a, 0.2mol/L NaCl; b, 0.2mol/L NaCl;
c, 0.1mol/L KCl; d, 0.1mol/L KCl; e, 0.2mol/L NaCl;
f, 0.1mol/L NaCl; g, 0.1mol/L NaCl; h, H₂O;
i, 0.06mol/L NaBr; j, H₂O; k, H₂O; l, H₂O;
m, 0.05mol/L KF; n, H₂O; o, 0.02mol/L KCl;
p, 0.02mol/L NaCl; q, H₂O; r, H₂O

计算 P_a 值之间符合得很好。所以 P_a 应与 S 一样, 是测定残基螺旋构象倾向的参数。尽管 $P_a > 1$ 对应的情形是一残基的分数螺旋度大于蛋白的平均分数螺旋度(在被分析的 15 种蛋白中为 36%), 但 $\langle S \rangle > 1$ 意味着在无限长的多肽链中 50% 以上的残基是螺旋。不过应当注意到, 在有限的聚合链(这是蛋白的更适合的模型)中, 在 $S = 1$ 时, 分数螺旋度变成小于 50%。那就是, 在转换温度下(无限长的高聚链, 其中 $f_\infty = 0.5$, $S = 1$), 发现较小的分数螺旋度值 f_N 出现在链长(N)减小时, 亦即较长的多肽链在较高的温度下熔融。

取 $\sigma = 2 \times 10^{-4}$ 作为螺旋起始的协同因子, 对不同链长($N = 150-250$)高聚体的 S 作 f_N 的理论曲线, 所得结果表明, $S = 1$ 时, $f_{150} = 0.26$, $f_{200} = 0.32$, $f_{250} = 0.36$ 。用 $\sigma = 1 \times 10^{-3}$ 进一步计算, $S = 1$ 时, $f_{100} = 0.34$, $f_{150} = 0.39$, $f_{200} = 0.42$, $f_{250} = 0.43$ 。

如果用中间值 $\sigma = 5 \times 10^{-3}$ 计算, $S = 1$ 时可以得到下述分数螺旋度: $f_{100} = 0.27$, $f_{150} = 0.35$, $f_{200} = 0.39$, $f_{250} = 0.41$ 。研究的链长区域(胰岛素除外)都处于100—300之间,它们的平均分数螺旋度 $\langle f_{\alpha} \rangle = 0.36$ (用于定义 $P_{\alpha} = 1$) 与 $S = 1$ 时类似链长的高聚体的分数螺旋度定量地相似。根据 $\langle f_{\alpha} \rangle$ 的定义,所有氨基酸残基的各自特性是在高聚链中的所有残基上取平均值,这样 $\langle f_{\alpha} \rangle$ 恰好与均聚物的螺旋分数相同。 P_{α} 的另一公式是使 P_{α} 与 $P_{j,\alpha} / P_j$ 等同,其中 $P_{j,\alpha}$ 是在 α 构象中发现第 j 个残基的概率、 P_j 是在蛋白中发现第 j 个残基的概率。类似地,表 4.3 中的 P_{β} 和 P_{α} 参数可以表示为概率比。

2. 蛋白中的螺旋边界残基

虽然表 4.3 中的构象参数 P_{α} 、 P_{β} 揭示了蛋白中螺旋和 β 片层残基的强度等级,但这些参数并不表明何种残基是螺旋和 β 片层的主要起始和终止残基。如果分析蛋白中的构象边界残基,那就可以得到后一种信息。表 4.5 中列出了包括螺旋区域两端 (f_{hN} , N 端和 f_{hC} , C 端) 的三种螺旋残基以及与螺旋端邻接的三种非螺旋残基 (f_{nhN} 和 f_{nhC})。脚注 hN 代表与蛋白的 N 端接近的螺旋区域起始处的三种残基, hC 代表接近蛋白 C 端螺旋区域终点处的三种残基。

早期已注意到负电荷残基(天冬氨酸和谷氨酸)有利于出现在 N 端螺旋端,正电荷残基有利于出现在 C 端螺旋端(例如组氨酸、赖氨酸和精氨酸)。另外发现这些荷电残基也倾向于聚集在与螺旋端相邻的无规则区域之中,特别是靠近 C 端螺旋。C 端螺旋和非螺旋区域的 N 和 C 端中组氨酸的大频率,可能与它对酶的活性部位的较大参与相关联。

表 4.5 15种蛋白中的螺旋边界和中心残基^a

残基	f_{HN}	f_{HC}	f_{hNN}	f_{hNC}	f_{hI}
Pro(-)	0.212	0	0.141	0.094	0
Asp(-)	0.207	0.054	0.081	0.135	0.099
Glu(-)	0.195	0.124	0.080	0.053	0.177
Ala	0.140	0.118	0.044	0.044	0.184
Trp	0.136	0.045	0.068	0.023	0.114
Thr	0.122	0.045	0.064	0.090	0.083
Gln	0.116	0.158	0.084	0.042	0.158
Phe	0.098	0.110	0.085	0.073	0.183
Asn	0.090	0.090	0.098	0.120	0.075
Ser	0.079	0.084	0.104	0.040	0.084
Cys	0.074	0.148	0.056	0.093	0.093
Met	0.071	0.143	0.071	0.071	0.143
Tyr	0.070	0.050	0.080	0.090	0.050
Ile	0.066	0.075	0.085	0.094	0.075
Val	0.061	0.116	0.072	0.022	0.166
Gly	0.060	0.039	0.103	0.112	0.034
Lys(+)	0.057	0.160	0.074	0.120	0.126
Leu	0.056	0.102	0.082	0.061	0.179
His(+)	0.054	0.216	0.162	0.149	0.068
Arg(+)	0.038	0.154	0.038	0.115	0.090
$\langle f \rangle^g$	0.097	0.097	0.082	0.080	0.112

a. 螺旋边界残基包括螺旋区域两端的三种残基及与之邻接的三种非螺旋残基,总数是螺旋的每端六种残基。螺旋中心残基包括螺旋中央的三种螺旋残基。 b. f_{HN} , N端螺旋区域中的残基频率。 c. f_{HC} , C端螺旋区域残基频率。 d. f_{hNN} , N端非螺旋区域的残基频率。 e. f_{hNC} , C端非螺旋区域的残基频率。 f. f_{hI} ,螺旋区域中心的残基频率,仅由三种残基组成。 g. $\langle f \rangle$,每栏上面定义的区域中残基的平均频率。

曾使用11种蛋白的数据对20种氨基酸在它们的螺旋形成转换的方向效应中得出了相关信息。发现的规律一般与表 4.5中的数据相符,不过有4个主要差别。(1)虽然赖氨酸被发现显著的

方向效应,但组氨酸以及精氨酸在螺旋端具有边缘效应,而在表 4.5 中精氨酸、组氨酸和赖氨酸在 N 端螺旋出现的机会最少,在 C 端螺旋和非螺旋区出现的机会最多。(2) 在方向度上,甘氨酸以及丝氨酸的行为和谷氨酸相似,表 4.5 给出的 $(f_{hN})_{Glu}=0.195$, $(f_{hC})_{Glu}=0.124$, 比 $(f_{hN})_{Ser}=0.079$, $(f_{hN})_{Gly}=0.060$, $(f_{hC})_{Ser}=0.084$ 和 $(f_{hC})_{Gly}=0.039$ 要大得多。(3) 苏氨酸的特性与赖氨酸相似,表 4.5 表明了这两种残基具有明显相反的特性, $(f_{hN})_{Lys}=0.057$, $(f_{hC})_{Lys}=0.16$, $(f_{hN})_{Thr}=0.122$ 和 $(f_{hC})_{Thr}=0.045$ 。(4) 虽然色氨酸具有不偏不倚的方向度,但表 4.5 中 $(f_{hN})_{Trp}=0.136$ 和 $(f_{hC})_{Trp}=0.045$, 即色氨酸更倾向于占据 N 端螺旋端。

研究 10 种已知 X 光衍射的蛋白时发现,1836 种残基的 58 种残基被确定为活性部位或底物结合残基, Asp(11), His(10), Tyr(6), Arg(5), Glu(4), Lys(4), Trp(4), 出现的频率最大。有意思的是,贡献了半数以上活性部位残基 (32/58) 的天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸和精氨酸的内螺旋构象参数 P_{α} 均小于单位值 (表 4.3)。后来又发现 α -螺旋的中心核比尾端部分具有较大的稳定性,导致了这样的结论:在螺旋和无规则交界区域存在迅速的起伏,该区域当接近内螺旋核时急剧减小,或许可以推测,极性残基 Asp, His, Tyr, Arg 进入酶的螺旋和无规则区域的倾向是由于这些区域比刚性的内螺旋核更有柔性这样一个事实,于是促进了底物的结合和酶的催化。在这些边界区域发现的活性部位残基包括核糖核酸酶中的 Arg¹⁰, His¹² (C 端螺旋 3—13), His⁴⁸ (N 端螺旋 50—59); 溶菌酶中的 Glu³³ (C 端螺旋 25—35) 和 Trp¹⁰⁸ (N 端螺旋 108—115); 枯草杆菌蛋白酶 BPN' 中的 His⁶⁴ (N 端螺旋 64—73) 和 Ser²²¹ (N 端螺旋 223—238); 羧肽酶 A 中的 His⁶⁹, Arg⁷¹ 和 Glu⁷² (N 端螺旋 72—88), Tyr²⁶⁵ (C 端螺旋 254—262) 以及肌蛋白中的 Asp⁹⁰, Asp⁹² 和

Asp⁹⁴ (C 端螺旋78—99)。把构象邻近部位发现的这些极性残基作为蛋白折叠信号是十分可能的，从而把完善它们的酶功能的必须的远处的残基带入邻接部位。

3. 螺旋边界残基的 σ 估算

Zimm-Bragg 的 σ 参数是螺旋起始的熵因子，并表示与无规则区域交界的螺旋序列的第一个螺旋残基的统计学权重。在螺旋-无规则转换的 Lifson-Roig 理论中，起始因子 v (对应于 $\sigma^{1/2}$) 用作螺旋序列的起始和终了两端的统计学权重。Zimm 和 Bragg 认为 σ 的合理值为 10^{-2} 或更小，并把这个归因于形成第一个螺旋转折的难度。Poland 和 Scheraga 把小于单位 σ 值解释为从统计学权重看是因为螺旋序列的端点出现的几率小。所以可以把蛋白中螺旋的 C 端和 N 端螺旋残基的频率与各氨基酸残基的 σ 值进行比较，前者的概率也低 ($\langle f \rangle < 0.1$)。

虽然均高聚物中心 σ 与相邻残基无关，但蛋白中的情形并不一样。若与螺旋残基相邻的是螺旋破坏残基，那么该螺旋残基具有较小的螺旋起始因子 σ 。类似地，一无规则残基若被高螺旋潜能的残基包围，那么它的 σ 值较高。把丙氨酸在蛋白中的分数螺旋 (52%，见表 4.3) 与块状共聚物中的聚丙氨酸中它的高螺旋度 ($>90\%$) 比较，就能观察到这点。相类似的现象是，虽然聚甘氨酸未观察到形成 α -螺旋，但在蛋白的螺旋区域有 19% 的甘氨酸残基。这些例子清楚地说明，特别是在蛋白中，不同的相邻基团能够如何影响氨基酸残基的螺旋-无规则平衡。

N 端螺旋残基频率 (f_{nH}) 和 C 端螺旋残基频率 (f_{cH}) 是以螺旋区域残基两端的三种螺旋残基为基础的。由于 $v = \sigma^{1/2}$ 仅仅被指定为螺旋序列的第一个和最后一个残基，所以它们的统计学权重

可以分别用 $v_N = \sigma^{1/2} \propto f_{hN}/3$ 和 $v_C = \sigma^{1/2} \propto f_{hC}/3$ 关联。可以预料, v_N 和 v_C 应与频率成正比, i 氨基酸正是以此频率出现在各自的氨基(f_{hN})和羧基(f_{hC})螺旋端。所以, 当处在任一螺旋端的特定氨基酸的统计学权重是第二个氨基酸统计学权重的两倍时, 就应当估计到出现在那一端的第一个氨基酸的机会常常是第二个氨基酸的两倍。故可假定一螺旋边界参数 $P_{hNC} = (f_{hN}/3) \cdot (f_{hC}/3)$, 以便 $\sigma = v_N v_C \propto P_{hNC}$, 因 f_{hN} 和 f_{hC} 是出现在螺旋端的氨基酸的频率或概率。对于每种氨基酸来说, 只要把表 4.5 中各自的 f_{hN} 和 f_{hC} 值相乘, 再被 9 除, 就可以得到 P_{hNC} 值。为了验证三种螺旋残基用于螺旋各端是合适的数目, 用每端四种氨基酸 $f_{hN}/4$ 和 $f_{hC}/4$ 进行了计算。由 $P_{hNC} = (f_{hN}/4)(f_{hC}/4)$ 得到的结果与由 $P_{hNC} = (f_{hN}/3) \cdot (f_{hC}/3)$ 得到的结果相同, 只是 $(P_{hNC})_{Leu}$ 例外, 它的值比两倍值还大。因为 Leu 残基在内螺旋区域中出现的频率是其它氨基酸残基的两倍, 即 $\langle f_{hN} \rangle = 0.171$, $\langle f_{hN} \rangle_{Leu} = 0.327$, 所以这种例外在意料之中。由于这些残基与第四个最近的残基只有一个氢键, 所以选择三种螺旋残基计算 P_{hNC} 不是人为的。内螺旋残基含两个氢键, 而无规则残基不含氢键。因为在三种螺旋端残基中氢键图式相同, 所以对螺旋起始来说, 决定了 $P_{hNC} = (f_{hN}/3)(f_{hC}/3)$ 产生的与 σ 的相关性更好。由于来自 X 光衍射的螺旋-无规则界线不是十分清晰, 从而使得指定螺旋端残基变得困难, 取两螺旋端上的每个含三种残基的螺旋区域的第一个和最后一个转折并被 3 除, 可能更准确。来自聚 α -氨基酸的七种氨基酸的实验 σ 平均值 $\langle \sigma \rangle$, 与来自表 4.6 蛋白的计算的螺旋边界参数 P_{hNC} 进行了比较。很有意思, 蛋白中最强的螺旋促进残基 Glu 和 Ala, P 值最大(表 4.3), P_{hNC} 也最大, 最弱的螺旋形成残基 Gly 和 Pro, P 值较小, P_{hNC} 值也较小。该倾向也和实验 $\langle \sigma \rangle$ 值相平行。

表 4.6 $\langle \sigma \rangle$, P_{onNC} 和 P_{onI} 值

氨基酸	$\langle \sigma \rangle$	P_{onNC}	P_{onI}
Ala	4.5×10^{-3}	1.8×10^{-3}	3.8×10^{-3}
Leu	3.6×10^{-3}	6.3×10^{-4}	3.6×10^{-3}
Glu	3.4×10^{-3}	2.7×10^{-3}	3.5×10^{-3}
Lys	2.1×10^{-3}	1.0×10^{-3}	1.8×10^{-3}
Ser	0.9×10^{-4}	7.3×10^{-4}	7.8×10^{-4}
Gly	0.5×10^{-4}	2.6×10^{-4}	1.3×10^{-4}
Pro	5.0×10^{-6}	0	0

a. $P_{\text{onNC}} = (f_{\text{onN}}/3)(f_{\text{onC}}/3)$, 其中 f_{onN} 和 f_{onC} 在表 4.5 中定义并列出;

b. $P_{\text{onI}} = (f_{\text{onI}}/3)^2$, 其中 f_{onI} 在表 4.5 中定义; 其它 13 种 σ 's 值未知的氨基酸的 P_{onI} 值为: Phe, 3.7×10^{-3} ; Val, 3.1×10^{-3} ; Gln, 2.8×10^{-3} ; Met, 2.3×10^{-3} ; Trp, 1.4×10^{-3} ; Asp, 1.1×10^{-3} ; Cys, 9.6×10^{-4} ; Arg, 9.0×10^{-4} ; Thr, 7.7×10^{-4} ; Asn, 6.3×10^{-4} ; Ile, 6.3×10^{-4} ; His, 5.1×10^{-4} ; Tyr, 2.8×10^{-4}

虽然实验 σ 常常可以变 10 这样大的因子, 除在 $\langle \sigma \rangle$ 和 P_{onNC} 值的大小上整个符合得很好以外, 还有些倾向应当指出来。虽然 Leu 的 P_{onNC} 值是 $\langle \sigma_{\text{Leu}} \rangle$ 值的 1/5, 它仍然小于 14 个氨基酸的 P_{onNC} 值。考虑到在多肽和蛋白二者中, Leu 都是强的螺旋残基, 这可能是惊人的。不过由于在蛋白内螺旋核中发现了绝大多数 Leu 残基, 所以它出现在螺旋端的概率小, 结果是计算值 P_{onNC} 小。目前文献中尚未对第一个和最后一个螺旋残基的统计学权重, 即 u_N 和 u_C (或 $\sigma_N^{1/2}$ 和 $\sigma_C^{1/2}$) 给出区别。虽然从表 4.5 可以看到, 在与特殊氨基酸相符方面不必有这些值, 但这里还是用 f_{onN} 和 f_{onC} 值估算了 P_{onNC} 。事实上, 最常出现在 C 端螺旋的正电荷残基 His, Lys 和 Arg, 很少出现在 N 端螺旋中。对于 Pro 残基来说, 反过来也是真的, 它是 N 端螺旋的最强起始残基, 在 C 端螺旋中则是最弱的。因为螺旋端的不对称性, 定义 $P_{\text{onN}} = f_{\text{onN}} \propto u_N = \sigma_N^{1/2}$, 以及 $P_{\text{onC}} = f_{\text{onC}} / 3 \propto u_C$

$=\sigma C^{1/2}$ ，而不用 P_{unc} 的单一值于起始的两螺旋端，可能更准确。有人用过 P_{un} 和 P_{sc} 于 Lifson-Roig 理论并显示了它在预测蛋白构象中的用途。后来又假设了共聚体中的螺旋-无规则转换的模型，该共聚物中的螺旋序列两端的三种螺旋残基，被指定统计学权重为 $\sigma^{1/2}$ ，但螺旋端的 σ_{N} 和 σ_{C} 没有差别。

4. 蛋白中的 β 片层边界残基

β 片层边界残基的频率见于表 4.7，这些边界残基包括 β 区域两端的三种 β 片残基 (N 端的 f_{BN} 和 C 端的 f_{BC}) 和与 β 端残基连接的三种非 β 残基。由于荷电的残基常常在蛋白的螺旋边界中出现 (表 4.5)，故它们明显地不在 β 片层边界区域出现。表 4.7 的 f_{BN} 和 f_{BC} 值表明荷电的残基极少出现在 N 端 β 区，并在 C 端区域的平均值之下 (Arg 的值除外，它的 $f_{\text{BC}}=0.09$ 大于 $\langle f_{\text{BC}} \rangle=0.074$)。另外，荷电的残基因为在中心 β 区的频率 f_{BM} 小于该区域的平均频率 $\langle f_{\text{BM}} \rangle$ ，它不利于出现在中心 β 区域 (由 β 区域中间的三种残基组成)。虽然螺旋接洽处的荷电残基的螺旋端的极性和不对称分布在蛋白折叠中可用于一些定向目的，但 β 边界区域荷电残基分布中的可认识的功能并不明显。不过，可以看出 Trp 和 Gln 在 N 端比在 C 端有利，而 Arg 和 Cys 则正好相反，在蛋白 β 区域的 C 端比 N 端有利。另外，Cys 残基趋于更多地出现在中心 β 区域，而不是边界之上。具有高 P_{B} 值的 β 残基出现在 N 端、C 端及中心 β 片层区域的机会均等。与此相反，强螺旋残基 Leu 很少出现在 N 端，适当地出现在 C 端，压倒优势地出现在内螺旋区。若与螺旋区域比较，在一 β 区域的不同残基中存在更多的残基分布，这可能是由于这些构象中的基本差异。 β 片层中的氢键图式主要是分子间氢键，而在螺旋中主要是分子内氢键，所以大范围的相互作用在

表4.7 15种蛋白中的 β 片层边界和中心残基的频率

残基	$f_{\beta N}$	$f_{\beta C}$	$f_{\beta NW}$	$f_{\beta NC}$	$f_{\beta I}$
Val	0.160	0.127	0.039	0.081	0.166
Trp	0.159	0.023	0.023	0.136	0.091
Met	0.143	0.107	0.071	0	0.107
Gln	0.137	0.042	0.074	0.063	0.042
Tyr	0.130	0.110	0.090	0.080	0.090
Ile	0.123	0.113	0.047	0.057	0.142
Phe	0.110	0.085	0.024	0.024	0.134
Ala	0.079	0.075	0.026	0.035	0.066
Thr	0.071	0.058	0.090	0.103	0.090
Asp(=)	0.063	0.063	0.072	0.045	0.063
Leu	0.061	0.117	0.031	0.056	0.112
Pro	0.059	0.035	0.165	0.094	0.024
Ser	0.054	0.054	0.094	0.114	0.040
Asn	0.053	0.060	0.150	0.068	0.045
Gly	0.047	0.052	0.086	0.116	0.078
Lys(+)	0.046	0.069	0.074	0.034	0.063
Cys	0.037	0.093	0.093	0.019	0.167
His(+)	0.014	0.041	0.027	0.081	0.027
Arg(+)	0.013	0.090	0.090	0.090	0.051
Glu(-)	0.001	0.035	0.071	0.044	0.001
$\langle f \rangle^a$	0.074	0.074	0.071	0.070	0.079

a: β 片层边界残基包括 β 区域两端的三种 β 残基及与 β 片层端基残基连接的三种非 β 残基,即 β 区域各端的总残基数为6, β 片中心残基包括 β 区域中间三种 β 残基; b: $f_{\beta N}$, N端 β 区域的残基频率; c: $f_{\beta C}$, C端 β 区域的残基频率; d: $f_{\beta NW}$, N端非 β 区域的残基频率; e: $f_{\beta NC}$, C端非 β 区域的残基频率; f: $f_{\beta I}$, β 区域中心的残基频率,该 β 区域只由三种残基组成; g: $\langle f \rangle$ 表中各栏定义的区域中残基的平均频率

β 区域中,应起到更重要的作用。螺旋形成主要依赖于它的最近邻,而且是一种快速协同现象,而 β 片层的形成由于远距离的残基带入并列位置具有慢的动力学。Conio 等表明无规则向 β 的转换

对于水中的聚酪氨酸来说，要慢于无规则向螺旋的转换。

5. 螺旋和 β 区域的 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 和 $\langle P_{\beta} \rangle$ 值比较

在分析的15种蛋白中有2473种残基，其中890种残基存在于80种螺旋片段中，424种残基存在于64种 β 片层的片段中。通过这些数据可以计算下面的平均值：氨基酸/蛋白=165、螺旋残基/蛋白=59.2、螺旋片段/蛋白=5.33、残基/螺旋片段=11.1、 β 残基/蛋白=28.3、 β 片段/蛋白=4.3、残基/ β 片段=6.6。由于只研究了相对少的蛋白，所以这些平均数的重要性受到限制。螺旋比 β 区域长是可能的，因为一旦螺旋的第一个折曲形成了，那么螺旋的其余部分就容易通过拉锁样的机制迅速蔓延开来。有意思的是，在研究的15种蛋白中，每个螺旋片段的平均残基数都是11.1，这对应于每圈含3.6个残基的 α -螺旋的三圈。若在15种蛋白的80种螺旋和64种 β 区域中估算 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 和 $\langle P_{\beta} \rangle$ 的平均值 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 和 $\langle P_{\beta} \rangle$ 时，可以看到， β 片段的 $\langle P_{\beta} \rangle = 1.11$ ，所有螺旋片段的 $\langle P_{\alpha} \rangle = 1.08$ 。这些数据表明，在蛋白中 β 区域可能比螺旋区域更稳定。在聚 α -氨基酸中已经表明， β 片层的构象稳定性比 α -螺旋高。蛋白，例如丝，以 β 构象形成热力学极其稳定的结构也是众所周知的事实。

由于表4.3中的 P_{α} 和 P_{β} 值为每种氨基酸残基形成螺旋和 β 的潜能，提供了相对量度，所以计算螺旋和 β 片段二者的N端、C端，和内部区域的平均 P_{α} 和 P_{β} 值是有意义的。直觉地讲，可以说清最强的螺旋形成残基（具有最高的 P_{α} 值），到底是出现在N端螺旋， $\langle P_{\alpha} \rangle_N$ （在这里它们协助螺旋启动）、或C端螺旋， $\langle P_{\alpha} \rangle_C$ （在这里它们协助防止螺旋转变为无规则状态）、或内螺旋， $\langle P_{\alpha} \rangle_I$ （在这里它们协助稳定内螺旋核）。关于 β 区域可以作类似的说明。

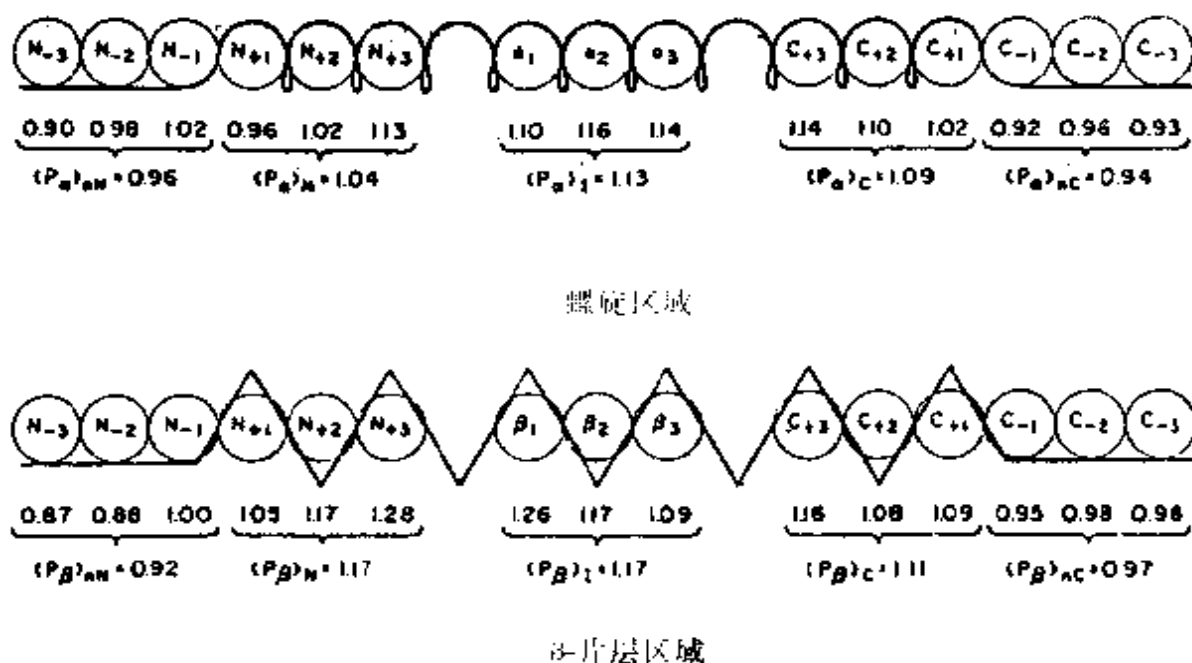


图4.5 15种蛋白中螺旋区 $\langle P_\alpha \rangle$ 值与β片层区 $\langle P_\beta \rangle$ 值的比较

$\langle P_\alpha \rangle_{nN}$, $\langle P_\alpha \rangle_N$, $\langle P_\alpha \rangle_1$ 和 $\langle P_\alpha \rangle_C$, $\langle P_\alpha \rangle_{nC}$ 分别代表 N 端非螺旋, N 端螺旋, 中心螺旋, C 端螺旋, C 端非螺旋区域的平均 P_α 值; 每个区域均由三种残基组成。 $\langle P_\beta \rangle_{nN}$, $\langle P_\beta \rangle_N$, $\langle P_\beta \rangle_1$, $\langle P_\beta \rangle_C$ 和 $\langle P_\beta \rangle_{nC}$ 分别为 N 端非β, N 端β, 中心β, C 端β 和 C 端非β区域的平均 P_β 值, 每个区域均由三种残基组成。

估算 P_α 和 P_β 值时, 从图4.5可以看到, 螺旋区域 $\langle P_\alpha \rangle_N = 1.04$, $\langle P_\alpha \rangle_C = 1.09$, $\langle P_\alpha \rangle_1 = 1.13$, β 区域的 $\langle P_\beta \rangle_N = 1.17$, $\langle P_\beta \rangle_C = 1.11$, $\langle P_\beta \rangle_1 = 1.17$ 。很清楚, 最高螺旋潜能的残基占据中心螺核, 接近螺旋两端 P_α 值递减, 到达螺旋边界时 P_α 值进一步下降, N 端非螺旋区 $\langle P_\alpha \rangle_{nN} = 0.96$, C 端非螺旋区 $\langle P_\alpha \rangle_{nC} = 0.94$ 。虽然最高 β 潜能的残基出现在中心 β 片层核, 但随着接近 β 区域的两端, P_β 值下降并不厉害。事实上, 正如表4.7表明的, 在 β 区域的 N 端、C 端及中心部分似乎有少量的强 β 构象体。仅仅在 β 片层的边界 P_β 值明显下降, $\langle P_\beta \rangle_{nN} = 0.92$ (非 β-N 端) 和 $\langle P_\beta \rangle_{nC} =$

0.97 (非 β -C 端)。三种中心无规则残基的平均 P_{α} 和 P_{β} 值分别是 $\langle P_{\alpha} \rangle_{CI} = 0.93$ 和 $\langle P_{\beta} \rangle_{CI} = 0.97$, 结果与螺旋和 β 区域边界上无规则残基的 P_{α} 和 P 值相似。这样, 螺旋和 β 片层区域二者在它们的构象边界都显示一势垒, 说明一些螺旋和 β 片层破坏残基在终止构象中起了重要作用。

6. 从螺旋中心残基估算 σ

已注意到, 最强的螺旋破坏残基 Gly, Pro, Tyr 和 Asn (表 4.3) 也经常出现在非螺旋区的 N 端和 C 端 (表 4.5)。它们的 (f_{nN}) 和 (f_{nC}) 值大约为 0.80—0.14, 这表明它们在终止它们的 N 端或 C 端的螺旋片段生长时, 具有相等的效力。因为最强的螺旋残基恰好出现在螺核中心, 因而对于螺旋形成的机理可以作如下假设: 螺旋的形成实际是从中心开始的, 最强的螺旋残基起核化作用, 然后双向蔓延, 直至螺旋区域的 N 端和 C 端均被螺旋破坏残基终止。表 4.5 中的 f_{n1} 值是以螺旋区域中间的三种残基为基础的。如果假设这些中心残基之一起到一核化点的作用, 那么可以再定义螺旋核化参数 $P_{n1} = (f_{n1}/3)^2 \propto \sigma$ 。当螺旋中心的启动开始时, 中心的核化残基必须具有氨基和羧基两种氢键, 而在螺旋端只包括一种氢键。所以在估算 P_{n1} 时, 把 $(f_{nN}/3)$ 平方与螺旋核化过程中两个氢键冻结的两种情形中的 $P_{nNC} = (f_{nN}/3)(f_{nC}/3)$ 是类似的。以螺旋中心的螺旋启动为基础重新估算的 P_{n1} 值列入表 4.6 的最后一栏, 这些值与实验 $\langle \sigma \rangle$ 值符合得很好。特别是 $\langle P_{n1} \rangle_{Leu}$ 和 $\langle \sigma_{Leu} \rangle$ 符合得比 $\langle P_{nNC} \rangle_{Leu}$ 和 $\langle \sigma_{Leu} \rangle$ 以及 $\langle \sigma \rangle$ 和 P_{n1} 的一般数量级更好。早期认为 Leu 是强螺旋形成残基及弱的螺旋启动基之间的矛盾现在得到解决, 即 Leu 被考虑在螺旋中心时, 它同样是强的螺旋启动基。由于在某些情形下, 实验 σ 值难以估计, 所以列在表 4.6 的 P_{n1} 值可

作为未知 σ 参数的近似估计。

7. 蛋白构象的预测

为了精确预测蛋白的完整的二级结构，获得螺旋、 β 片层和随机盘绕构象中的20种氨基酸的精确构象潜能及决定这些区域折叠的一套规则至关重要。Robson 和 Pain 使用信息理论，指定了20种氨基酸的不同螺旋形成参数，并十分成功地预测了五种球蛋白中的螺旋区域。他们用更复杂的计算方法获得的螺旋形成信息参数 I 本质上与更早获得的 P 参数相符。不过，他们发现的 Gly ($I = +0.18$) 在螺旋形成中比 Phe ($I = +0.11$) 更有利，与这里发现的 Gly ($P_{\alpha} = 0.53$) 是最强的螺旋破坏残基及 Phe ($P_{\alpha} = 1.12$) 是适中的螺旋形成基相矛盾。支持这里提出的说法的事实是，poly (Glu⁷⁶Phe²⁴) (48%螺旋区) 比 poly (Glu) (30%螺旋区) (pH 为5.2, poly (Glu) 60%荷电, $\mu = 0.2$, 20°C) 具有更多的螺旋区域表明，Phe 确实是螺旋促进基，与这里的预测相符。

因为只有少数实验 S 值可资利用，Lewis 等把20种氨基酸分为三组：螺旋形成基 ($S = 1.05$)、螺旋惰性基 ($S = 1.00$)、螺旋破坏基 ($S = 0.385$)，并能正确地预测所有残基68%构象，及11种蛋白里的螺旋残基的64%构象。即使 Tyr 被错误地指定为螺旋形成基，Ala, Gln, His 被错误地指定为螺旋惰性剂。后来他们又把 Tyr 指定为螺旋惰性基，Ala, Glu, His 被指定为螺旋形成基，因为螺旋形成基的 S 值为 1.05，螺旋惰性基的 S 值为 1.00，非常相似，所以得到的结果本质上类似。如果按照表4.3中总结的数据，把 Tyr 指定为螺旋破坏基 ($P_{\alpha} = 0.61$)，并把不同的 P_{α} 值用于每种氨基酸，那么就可以简单地将考虑的任何片段中的平均 P_{α} 值更准确地预测天然蛋白中的螺旋残基， $\langle P_{\alpha} \rangle > 1$ 的任何序列考虑为螺

旋, $\langle P_{\alpha} \rangle < 1$ 的任何序列都考虑为非螺旋。后面将提供一套更完全的规则。

Lewis 和 Scheraga 使用 Zimm-Bragg 矩阵公式把葡萄球菌核酸酶的残基 91-94 (Tyr-Ile-Tyr-Ala) 误定为螺旋构象。采用表 4.3 中列出的数据, $\langle P_{\alpha} \rangle_{\text{Tyr}} = 0.61$, $\langle P_{\alpha} \rangle_{\text{Ile}} = 1.00$, $\langle P_{\alpha} \rangle_{\text{Ala}} = 1.45$ 得到 $\langle P_{\alpha} \rangle = 0.92$, 作出了正确的预测, 即该片段是非螺旋构象。类似地, 核糖核酸酶中 Tyr⁹², Tyr⁹⁷ 和 Tyr¹¹⁵ 的螺旋破坏本性, 导致残基 92-115 的 $\langle P_{\alpha} \rangle = 0.95$, 表明该片段不含螺旋, 该结果为 X 射线衍射确认。这样便明显地改进了以前预测的该区域存在螺旋构象的说法, (例如残基 105-113, 104-112 和 96-110)。采用表 4.3 的 P_{α} 和 P_{β} 两种值表明, 事实上核糖核酸酶的 96-110 区域为 β 片层 ($\langle P_{\beta} \rangle = 1.12 > \langle P_{\alpha} \rangle = 1.05$), 这与 X 射线衍射结果相符。另外, 采用本法正确地预测了核糖核酸酶的其它五个 β 区域 (由 $\langle P_{\beta} \rangle > \langle P_{\alpha} \rangle$ 确定)、和所有六个随机盘绕区域。类似地, $\langle P_{\beta} \rangle$ 值正确地鉴定了葡萄球菌核酸酶的三个 β 区域, 而以前的预测力图把这些区域指定为螺旋。与 Kabat 及 Wu 以 Φ 和 Ψ 二面角为基础的方法及 Nagano 的计算方法相比较, 本法同样显示了明显的优势。

8. 蛋白链折叠

Lewis 等曾假设, 高螺旋概率的区域协助多肽链折叠的取向, 以便形成最终的天然蛋白构象。他们还指出: β 扭曲在 β 结构的折叠机制中可能起重要作用。但无人指出过蛋白的哪一部分可能首先折叠。使用表 4.3 中估算的构象参数 P 和 P_{β} 通过 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 和 $\langle P_{\beta} \rangle$ 值, 有可能比较每种蛋白中不同螺旋和 β 片段。因为有指征说明螺旋启动过程要比 β 形成快, 所以可以假定, 蛋白的第一折叠应发生在靠近螺旋区域, 具有最高螺旋潜能, 即最大的 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 值处。

第二个折叠应发生在接近第二个 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 值处，以此类推。同样，蛋白中的 β 片层区域也应按 $\langle P_{\beta} \rangle$ 值的次序发生折叠。也有可能出现这种现象， β 区域的 $\langle P_{\beta} \rangle$ 值高于螺旋的 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 值时， β 区域首先发生折叠。

表4.3中的 P_{α} 值可用于假定肌红蛋白的折叠机制。Putt 选择人为的 S 值用于脱辅基肌红蛋白的不同片段。该模型虽然仅把Pro作为螺旋破坏基而具有局限性，但毕竟得出了片段37—87和100—119分别具有最低($S = 1.06$)和最高($S = 1.30$)螺旋形成潜能的结论。这些结论与估算的片段37—87 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 为1.15，100—119的 $\langle P_{\alpha} \rangle$ 为1.09不符， $\langle P_{\alpha} \rangle$ 值表明，片段37—87在肌红蛋白链折叠中作为核化中心似乎更具竞争力。肌红蛋白分子的三维图表明，片段37—87的螺旋C,D,E 围绕着血红素紧紧地包裹，所以可能具有最大的稳定性，而片段100—119(G 螺旋)位于分子周围，因而可能不够稳定，也不大像核化区。McLachlan 后来的工作支持了采用本法得出的结论。

9. S 值的溶剂规则

谷氨酸和丙氨酸的实验 S 值显得比蛋白中对应的 P_{α} 值低(表4.4)，这种现象表明这些残基在蛋白中的环境可能不同于在多肽中的环境。也就是说，孤立的多肽链主要是线型的，极少或没有三级结构，而球蛋白的一些链将埋入分子内部，模拟了一种非水环境。有趣的是，Harrison 和 Blout 在处理去辅基肌红蛋白的旋光色散时发现，最好地描述了该蛋白的水溶液的旋光参数与溶在有机溶剂中的旋光参数相似。Hermans 表明，水溶液中 $S_{\text{Glu}} = 1.19$ ，20%乙醇中变为 $S_{\text{Glu}} = 1.43$ 。25°C下，在水溶液中聚谷氨酸的较高的 S 值与蛋白中谷氨酸残基 $P_{\alpha} = 1.53$ 值十分相符。表4.4中亮

氨酸的 S 和 P_{α} 值符合较好可能是由于亮氨酸侧链强的疏水特性，它在非水介质中保持多肽骨架。蛋白中的亮氨酸残基占据类似的非水环境的标志，反映在高 P_{α} 和 $P_{\alpha\alpha}$ 值中以及亮氨酸最常出现在蛋白的内螺核这样一个事实中。谷氨酸和丙氨酸在蛋白内螺旋区出现的几率占第二和第三位，表明这些残基也主要处于一种非水环境，特别是当螺旋处于球蛋白内部时如此。然而当存在于孤立的多肽中时，它们完全暴露于水。这可以说明表 4.4 中 S 和 P_{α} 值之间的矛盾，虽然七种残基的平均差仅有 10%。

表 4.4 中赖氨酸的 S 和 P_{α} 值很相似说明与谷氨酸及丙氨酸不同，赖氨酸残基在多肽和蛋白中具有大至相似的环境。赖氨酸的非极性侧链的贡献(四个亚甲基)对螺旋的疏水稳定性的作用已经得到了实验说明。Nemethy 和 Scheraga 从理论上得到亮氨酸和谷氨酸之间和亮氨酸及丙氨酸之间形成疏水键的自由能和焓分别为 $\Delta G_{H_2O} = 0.5 \text{ Kcal/mol}$ 和 $\Delta H_{H_2O} = 0.7 \text{ Kcal/mol}$ ，亮氨酸和赖氨酸的相互作用是 $\Delta G_{H_2O} = -1.0 \text{ Kcal/mol}$ 和 $\Delta H_{H_2O} = 1.4 \text{ Kcal/mol}$ 。由于赖氨酸的疏水性稳定性是谷氨酸或丙氨酸的两倍，故可以预料，聚赖氨酸的非极性残基比侧链短的聚谷氨酸和聚丙氨酸产生更非水性的环境。另一方面，蛋白中赖氨酸残基出现在内螺旋中的机会少于 Glu 和 Ala，这可从 $\langle P_{\alpha} \rangle_{Lys} = 1.13$ ， $\langle P_{\alpha} \rangle_{Glu} = 1.45$ 以及 $\langle P_{\alpha} \rangle_{Ala} = 1.59$ 看出来；在无规则区域出现的机会则多于 Glu 和 Ala，因为 $\langle P_C \rangle_{Lys} = 1.05$ 、 $\langle P_C \rangle_{Glu} = 0.87$ 和 $\langle P_C \rangle_{Ala} = 0.66$ (表 4.3)。这意味着在蛋白中赖氨酸的溶剂化更甚或比谷氨酸和丙氨酸更处于水性环境中。可以比较聚赖氨酸的非极性残基和具有低介电常数的蛋白中的内螺旋赖氨酸残基以及聚赖氨酸的亲水部分和具有高介电常数的蛋白无规则区域的赖氨酸残基。类似地，蛋白中的内螺旋内的丝氨酸和甘氨酸出现的频率 $\langle P_{\alpha} \rangle_{Ser} = 0.70$ 和

$\langle P_{\alpha} \rangle_{\text{Gly}} = 0.53$, 以及它们在蛋白无规则区域的高频率, $\langle P_{\alpha} \rangle_{\text{Ser}} = 1.27$ 和 $\langle P_{\alpha} \rangle_{\text{Gly}} = 1.42$, 与它们在多肽中的情形相似, 在多肽中它们显示为螺旋破坏残基并偏向于随机构象。这样一来, 在多肽中的环境与在蛋白中相似的氨基酸残基的 S 和 P_{α} 值之间将符合得很好。Applequist 从理论上预测, 侧链和高聚物-溶剂相互作用将用 S 值表示。多肽在不同溶剂中的实验数据表明这是真实的。另外, 本章提出的蛋白中氨基酸的 P_{α} 值, 反映了各种残基的固有螺旋形成潜能以及这种螺旋生长参数的环境因子。由于不能得到所有氨基酸的 S 值, 这里给出的 P_{α} 和 P_{β} 值已用于预测蛋白的构象, 以及关联蛋白片段例如去辅基肌红蛋白中的实验数据。当然必须记住螺旋成长参数 S 受邻基相互作用、温度、以及溶剂的影响。

10. 有关的公式

在蛋白中发现 j 氨基酸残基的概率是:

$$P_j = n_j / \sum n_i \quad (1)$$

其中 n_j 是蛋白中 j 残基的数目, $\sum n_i$ 是蛋白中总残基数。在蛋白中的构象状态 K 中发现 j 残基的概率为:

$$P_{j,K} = n_{j,K} / \sum n_{i,K} \quad (2)$$

其中 $n_{j,K}$ 为 K 状态下 j 残基的数目, $\sum n_{i,K}$ 为 K 状态下的残基总数。蛋白中 K 状态下 j 残基出现的概率或频率为:

$$f_{j,K} = n_{j,K} / n_j \quad (3)$$

所以在蛋白的 K 状态下发现 20 种氨基酸残基的平均频率 $\langle f_j \rangle$ 可以写为:

$$\langle f_K \rangle = \sum f_{j,K} / \sum_j = \sum n_{j,K} / \sum n_j \quad (4)$$

其中 $\sum_j = 20$ 。 $f_{j,k}$ 被 $\langle f_k \rangle$ 除, 可得到 j 氨基酸残基的构象参数 $P_{j,k}$:

$$P_{j,k} = f_{j,k} / \langle f_k \rangle \quad (5)$$

把方程(1)–(4)代入(5), 得到:

$$P_{j,k} = P_{j,k} / P_j \quad (6)$$

这就是是说, K 状态下 j 氨基酸残基的构象参数 $P_{j,k}$ 等于在 K 状态下发现 j 残基的概率除以在蛋白中发现 j 残基的概率。蛋白中的 K 构象状态代表 α, β 或随机盘绕。

11. 预测二级结构的实施规则

应用前面涉及的理论, 可以概括为表4.8及下述规则, 依赖于它们可以预测蛋白中的片段的构象。

(1) 寻找螺旋区域

(1.1) 螺旋核化: 从沿多肽链的六个残基中定位出四个螺旋残基(h_a 或 H_a)族。弱螺旋残基(l_a)记作 $0.5 h_a$ (即三个 h_a 和两个 l_a 一来自六个残基—也能核化成一个螺旋)。如果片段中含 $1/3$ 以上的螺旋破坏基(b_a 或 B_a), 或含不足 $1/2$ 螺旋形成基, 则不利于形成螺旋。

(1.2) 螺旋终止: 螺旋残基向两个方向扩张, 直至被 $\langle P \rangle < 1.00$ 的四肽终止。下述螺旋破坏基能终止螺旋蔓延: $b_4, b_3i, b_3h, b_2i_2, b_2ih, b_2h_2, bi_3, bi_2h, bih_2$ 和 i_4 。螺旋一旦确定, 上述四肽中的一些残基(特别是 b 或 i)可以结合到螺旋端。四肽中标为 i, b, h 的破坏基也分别包括 l, B, H 。邻接的 β 区域也能终止螺旋区域。

(1.3) Pro 不能出现在内螺旋或 C 端螺旋端。

(1.4) 螺旋边界: Pro, Asp(—), Glu(—), 偏爱于 N 端螺旋

端, His(+), Lys(+), Arg(+), 偏爱于 C 端螺旋端。若必须满足条件(1.1), I_{α} 指定也给予 Pro 和 Asp(靠近 N 端螺旋)以及 Arg(靠近 C 端螺旋)。

表 4.8 螺旋、 β 片层的形成破坏和惰性氨基酸残基的 P_{α} 和 P_{β}

螺旋残基	P_{α}	β -片层残基	P_{β}
Glu(-)	1.53	Met	1.67
Ala	1.45	Val	1.65
Leu	1.34	Ile	1.60
His(+)	1.24	Cys	1.30
Met	1.20	Tyr	1.29
Gln	1.17	Phe	1.28
Trp	1.14	Gln	1.23
Val	1.14	Leu	1.22
Phe	1.12	Thr	1.20
Lys(+)	1.07	Trp	1.19
Ile	1.00	Ala	0.97
Asp(-)	0.98	Arg(+)	0.90
Thr	0.82	Gly	0.81
Ser	0.79	Asp(-)	0.80
Arg(+)	0.79	Lys(+)	0.74
Cys	0.77	Ser	0.72
Asn	0.73	His(+)	0.71
Tyr	0.61	Asn	0.65
Pro	0.59	Pro	0.62
Gly	0.53	Glu(-)	0.26

表中 H_{α} 为强的 α 螺旋形成基、 h_{α} 为 α 螺旋形成基、 I_{α} 为弱 α 形成基、 i_{α} 为 α 螺旋惰性基、 b_{α} 为 α 螺旋破坏基、 B_{α} 为强 α 螺旋破坏基； I_{α} 也指定给 Pro 和 Asp(靠近 N 端螺旋)以及 Arg(靠近 C 端螺旋)。 H_{β} 为强 β 形成基、 h_{β} 为 β 形成基、 I_{β} 为弱 β 形成基、 i_{β} 为 β 惰性基、 b_{β} 为 β 破坏基、 B_{β} 为强 β 破坏基、 b_{β} 也指定给 Trp(靠近 C 端 β 区域)。

规则1. 天然蛋白中含有六个残基或更长的片段, 若 $\langle P_{\alpha} \rangle \geq$

1.03, 和 $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$, 并满足条件(1.1)–(1.4), 则预测为螺旋。

(2) 寻找 β 片层区域

(2.1) β 片层核化: 从沿多肽链的五个残基中定位出三个 β 残基族 (h_β 或 H_β)。如果片段中含1/3以上的 β 片层破坏基 (b_β 或 B_β), 或含不足1/2的 β 片层形成基, 则不利于 β 片层形成。

(2.2) β 片层终止: 把列为螺旋终止的条件(1.2)用于终止 β 片层的蔓延, 用 β 代替 α , 反过来也一样。

(2.3) Glu(–)很少出现在 β 区域, Pro 很少出现在内 β 区域。

(2.4) β 片层边界: 荷电残基极少出现在 N 端 β 片层区, 不常出现在内 β 区域和 C 端 β 端。Trp 最常出现在 N 端 β 片层端, 极少出现在 C 端 β 片层端。

规则2. 天然蛋白中含有五个残基或更长的片段时, 若 $\langle P_\beta \rangle \geq 1.65$, 和 $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$, 并满足条件(2.1)到(2.2)则可预测为 β 片层。

综上所述, 只有两条基本规则用来预测蛋白。上面给出的预测条件, 有许多是相互交盖和相互加强的, 所以有时只需使用条件(1.1), (1.2)和(2.1)。只有在 α 和 β 残基重叠时, 才需要象规则1和2中规定的那样计算 $\langle P_\alpha \rangle$ 和 $\langle P_\beta \rangle$ 值。如果指定的 α 和 β 潜能归入各自的所属级别, 甚至可以免去 $\langle P_\alpha \rangle$ 和 $\langle P_\beta \rangle$ 的计算。这样一来 (H_2h_2ib) $_\alpha$ 和 (Hh_3iB) $_\beta$ 的六残基区域能预测为 α -螺旋, 因为有两个强 α -螺旋形成基 (H_α) 和一个 α -螺旋破坏基 (b_α), 而有一个强 β 形成基 (H_β) 和一个强 β 破坏基 (B_β)。

Aubert 等^[3]采用 Lim 方法、Chou 和 Fasman 方法预测了 α_1 -糖蛋白酸中蛋白的二级结构, 结果见表4.9。蛋白部分见图4.6。

表 4.9 预测 α_1 -糖蛋白酸的二级结构

	Chou 和 Fasman 方法	Lim 方法	选择
β 片层	若20位为 Gln, 13-20; 若20位为 Arg, 13-18, 25-29; 若47位为 Thr, 47-51; 若47位为 Ala, 48-51; 59-63; 65-69; 79-83; 87-90; 若115位为 Asp, 109-114; 若115位为 Tyr, 109-116; 146-150	13-18; 若20位为 Gln, 19-22; 24-31; 59-64; 79-83; 108-16; 146-150	13-18; 若20位为 Gln, 19-20; 25-29; 若47位为 Thr, 47-51; 若47位为 Ala, 48-51; 59-63; 79-81; 87-88; 若115位为 Asp, 109-114; 若115位为 Tyr, 109-116; 146-150, 21%
	1-3; 10-12; 若20位为 Arg, 19-20; 56-58; 64; 70-74; 84-86; 95-108; 若115位为 Asp, 115-117; 若115位为 Tyr, 117; 122-135; 155-156; 161-166; 178-181	1-3; 10-12; 若20位为 Arg, 19-22; 23; 48-58; 65-78; 84-107; 117-134; 151-167; 178-181	1-3; 10-12; 若20位为 Arg, 19-20; 30-31; 56-58; 64-74; 82-86; 89-90; 95-108; 若115位为 Asp, 115-117; 若115位为 Tyr, 117; 122-136; 155-156; 161-166; 178-181 40, 33%
α -螺旋	4-9; 30-36; 若47位为 Thr, 41-46; 若47位为 Ala, 41-47; 136-145; 167-177	4-9; 32-47; 137-145; 168-177	1-9; 32-36; 若47位为 Thr, 41-46; 若47位为 Ala, 41-47; 167-145; 167-177 21, 55%
β 折叠	21-24; 37-40; 52-55; 75-78; 91-94; 113-121; 151-154; 157-160		21-24; 37-40; 52-55; 75-78; 91-94; 118-121; 151-154; 157-160 17, 68%

Schmid 等^[12]确定了 α_1 -糖蛋白酸的全部序列。五聚杂多糖单元通过 *N*-苷的方式在一些确定位置连接到天冬酰胺残基上。一级结构中存在 α -螺旋、 β 伸展、 β 折叠及无规则构象。

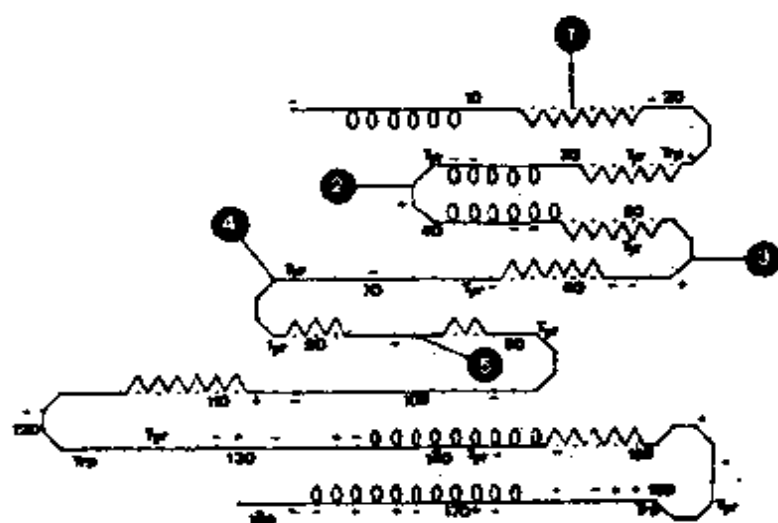


图 4.6 α_1 -糖蛋白酸的螺旋、 β -片层和 β 转角

以表 4.2 及 Chou-Fasman 方法预测每一个点表示各构象状态的一种残基，螺旋(○)、 β -片层(△)、盘绕(—)，每一个环表示单一残基而不是 3.6 个残基，带电残基及酪氨酸、色氨酸残基均加注(+)、(-)，图中的 20, 47 和 115 分别是精氨酸、苏氨酸及天冬氨酸残基

为了确定整体分子的二级结构，研究了再酰化的糖基链的 CD 谱。

图 4.7 以 210nm 处 (负峰) 和 192nm (正峰) 处的两个圆二色峰为特征。还记录了糖链对应组分的 CD 谱 (图 4.8)。从图 4.7 和 4.8 可以看出，从 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰神经胺酸到糖链，在 210 和 192nm 处的跃迁不发生重大变化。

作者们还比较了 α_1 -糖蛋白酸的实验 CD 谱和计算 CD 谱。结

果表明，实验曲线和计算曲线在200和250nm 之间符合得很好。由于 CD 谱参考的误差，在180—200nm 之间符合得不好。另外，在180和250之间，糖基对 CD 谱的贡献很小，因而在该区域有可能依赖 CD 谱测定糖蛋白的二级结构。相反，采用 ORD 谱则无此可能性。因在糖蛋白中，180nm 以下肯定存在一个峰。

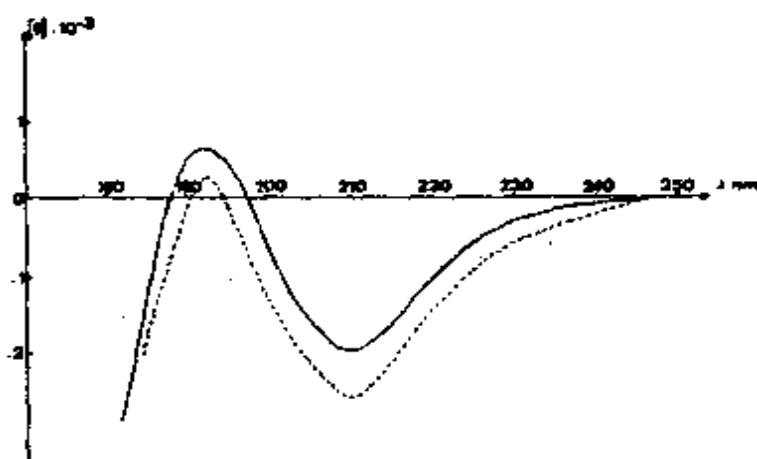


图 4.7 再酰化糖基链的 CD 谱(虚线)

用度·厘米²/0.1摩尔/升椭圆率表示，平均残基量为 205，水溶液中的浓度为大约5g/l，实线为糖链中对应的每种单糖的椭圆率线性组合算得的 CD 谱

上述结果说明，在酰胺发色团显示 CD 峰的180至250nm 的区域里，糖基对光学活性无贡献，糖基与蛋白基之间的相互作用也无贡献。糖蛋白和球蛋白之间的主要 CD 差异，来自肽链的相互作用。 α_1 -糖蛋白酸 五个糖链中的 4 个都连接到 β 转角上，并处于荷电和极性残基很多的区域，即处于蛋白的外侧。在糖蛋白中，这是普遍现象。作为糖蛋白二级结构的预测，以及糖基化的位置，

该例子具有参考价值。

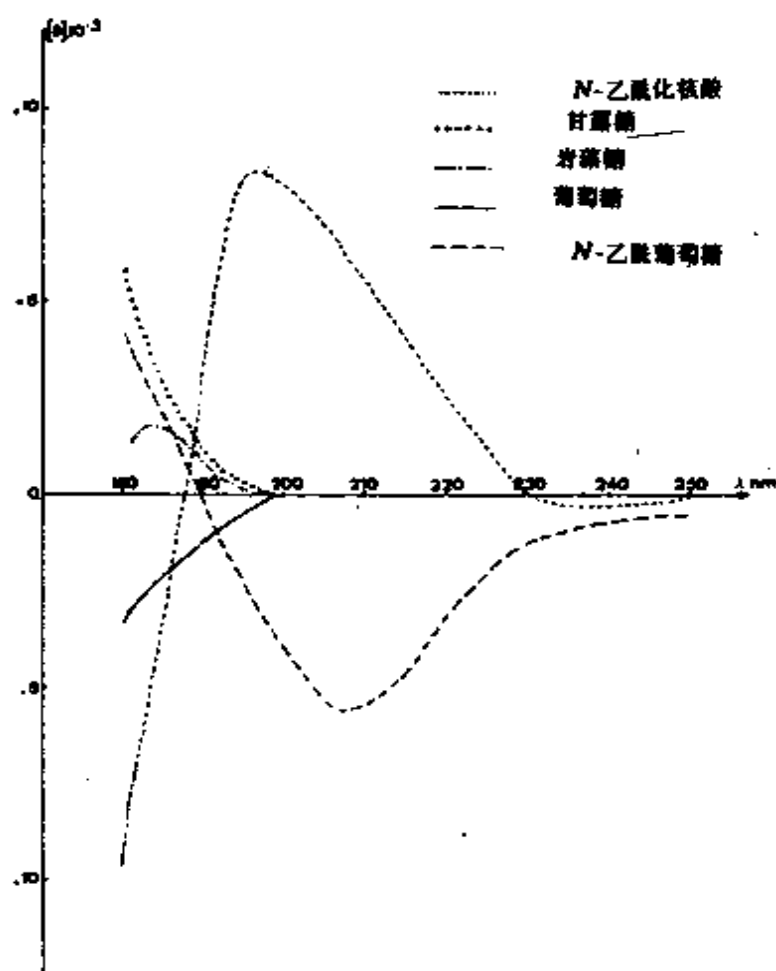


图 4.8 糖链对应组分的 CD 谱

实线为 *D*-半乳糖，仅显示 CD 峰的尾端，可能来自环氧的电性跃迁，相反信号的 CD 峰可归结于第二电性跃迁的重叠，出现在稍短波长，来源于羟基，信号取决于羟基位置，...为 *N*-乙酰神经氨酸的 CD 谱，195nm (强正峰)，240nm (弱负峰) 和 265nm (弱正峰)。---为乙酰葡萄糖胺的 CD 谱，207nm (强负峰)，这些峰可能对应于 *N*-乙酰基的 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁，+++为 *D*-甘露糖的 CD 谱，- - - - 为 *D*-岩藻糖的 CD 谱。水溶液中的浓度大约为 9g/l

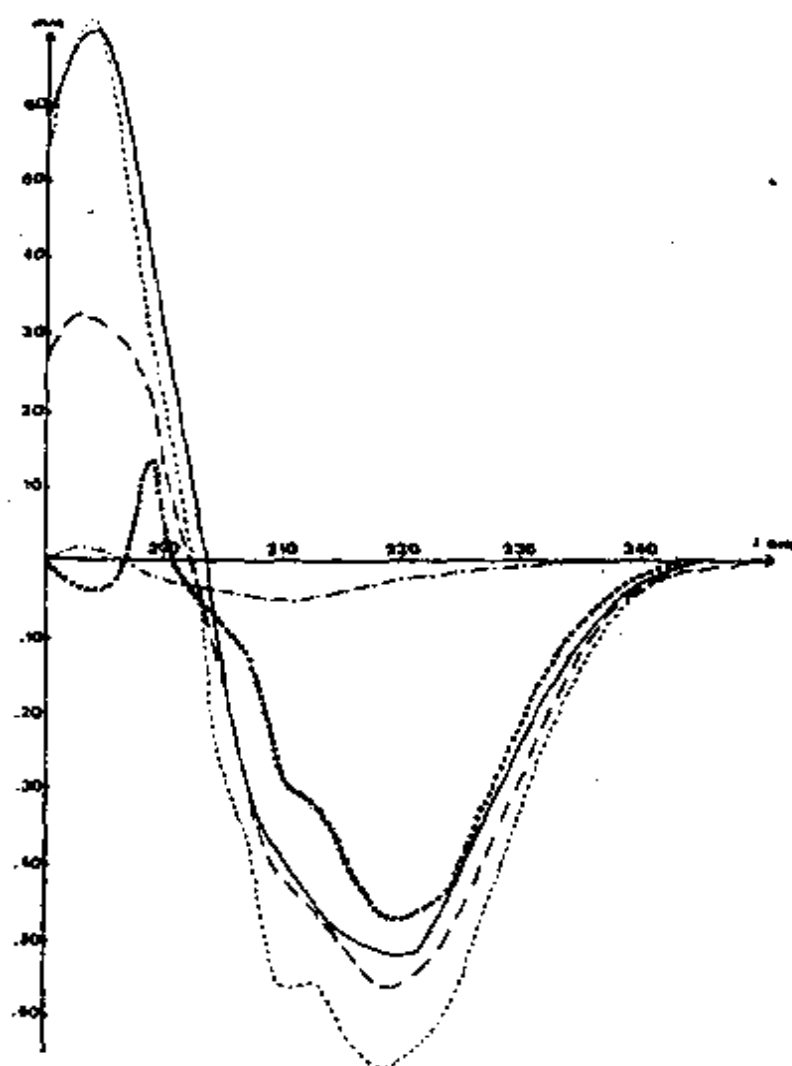


图4.9 α_1 -糖蛋白酸的实验CD谱与计算CD谱

α_1 -糖蛋白酸的实验CD谱 在 $c = 2.57\text{g/l}$, $l = 0.01\text{cm}$, $s = 5 \times 10^{-6}$, 在 0.214mol/L NaF 中, pH 7.3(—)条件下测定; 糖基的实验CD谱, 在 $c = 1.15\text{g/l}$, $l = 0.01\text{cm}$, $s = 5 \times 10^{-6}$ 在 0.214mol/L NaF 中, pH 7.3(---)的条件下测定; 对应于糖基和蛋白加和而计算的CD谱, 蛋白残基的二级结构计为21% α -螺旋, 21% β 伸展, 18% β 折叠和40%无规则构象(···), 计算的CD谱在下述条件下归一化, 在该条件下记录 α_1 -acid glycoprotein 的实验谱, 即蛋白残基使用 $l = 0.01\text{cm}$, $s = 5 \times 10^{-6}$, $c = 1.42\text{g/l}$; 糖残基 1.15g/l 。在上面给定的条件下计算极端的CD谱, 26% α -螺旋, 27% β 伸展, 14% β 折叠和33% U表示为(---), 19% α -螺旋, 20% β 伸展, 21%折叠和40%无规则构象表示为(···)

在二级结构中， α -旋和 β 伸展由于链链扭角的可重复性，以及周期性出现的NH和CO基之间的氢键，而称为有序结构。相反， β 折叠是无序结构，骨架的扭角不能重复，分子内只有一个 $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ 氢键，具有随机盘绕的性质。实际上，在无规则的二级结构中，存在一环状结构。一个理想化的环状结构的形迹就像希腊字母中的 Ω ，骨架的扭角不重复，几乎没有骨架氢键^[5]。这种环状结构在蛋白中出现的几率不低，研究了67种蛋白的X射线衍射，发现了270个 Ω 环，差不多每个蛋白分子中有4个这样的环。这类环几乎总是位于分子的表面，而且对分子的功能有重要性。

Ω 环的片段长度必须在6至16个残基之间，下限用以区别仅仅可以是小环的可逆性折叠。折叠的长度为3至5个残基，骨架基团紧紧挤在一起，迫使侧链外指。在大片段中，这种立体化学限制不再存在，侧链原子可以装在环本身的核内。上限用于强调大多数环的阈值。

环可以不含有有序二级结构，该标准排除了反平行 β 伸展的相邻接股分及不确定的结构等情形。

片段的端点至端点间的距离是指片段的第一个 α 碳到最后一个 α 碳之间的距离。该距离必须小于10 Å，并可以不超过该最大距离的2/3，该标准使得片段内陷象 Ω 。实际上，该距离在3.7至10 Å之间。

粗略估计蛋白折叠时，两种相反的但非独立的趋势反映在最终的结构中。导致的折衷方案是，亲水性侧链与水溶液接近，同时疏水侧链与水的接触减至最小。虽然在蛋白分子中，氨基酸残基被包藏的程度，不仅取决于疏水性，而且依赖于立体效应，该立体效应决定了大分子中拥挤的内部二级结构的接近程度。但是若能估价残基本身固有的疏水性和亲水性两种相反的力，那么至

少可以区别蛋白的外部 and 内部两部分。当蛋白与磷酸酯双层的烷烃部分作用时 涉及的氨基酸侧链主要是疏水性的。已有的研究工作表明, 水溶性蛋白的内部主要由疏水性氨基酸组成, 亲水性侧链处于与水接触的外部。早期的经验观察是, 疏水性侧链趋向于包藏在天然结构的内部。

表 4.10 水化程度及用于指定的信息

侧链	水化指数	ΔG° 转化能 (水-蒸汽)	侧链 100% 包藏的分數	侧链95% 包藏的分數
Ile	4.5	4.4	4.5	5.2
Val	4.2	4.2	4.3	4.2
Leu	3.8	4.5	3.2	2.8
Phe	2.8	2.5	2.5	3.5
Cys	2.5	1.9	6.0	3.2
Met	1.9	1.9	1.0	1.9
Ala	1.8	3.9	5.3	1.6
Gly	-0.4	—	4.2	1.3
Thr	-0.7	-0.6	-0.5	-1.0
Trp	-0.9	-0.9	-2.4	-0.3
Ser	-0.8	-0.8	-0.7	-1.0
Tyr	-1.3	-1.1	-3.3	-2.2
Pro	-1.6	—	-2.4	-1.8
His	-3.2	-4.2	-3.6	-1.9
Glu	-3.5	-3.9	-2.8	-1.7
Gln	-3.5	-3.5	-4.0	-3.6
Asp	-3.5	-4.5	-2.5	-2.3
Asn	-3.5	-3.8	-3.1	-2.7
Lys	-3.9	-3.2	—	-4.2
Arg	-4.5	—	—	—

Rose 和 Roy^[6]把二级结构的预测的渐进评价与经验观察相结合, 以便区分蛋白的内部序列区域和外部序列区域。Kyte 和

Doolittle⁽⁷⁾提出了与此相类似的计算机程序，其中使用了水化程度的概念，从氨端到羧端连续确定一移动片段的水化程度。并且对每种氨基酸都指定了反映它的疏水性和亲水性的相对值（见于表4.10）。

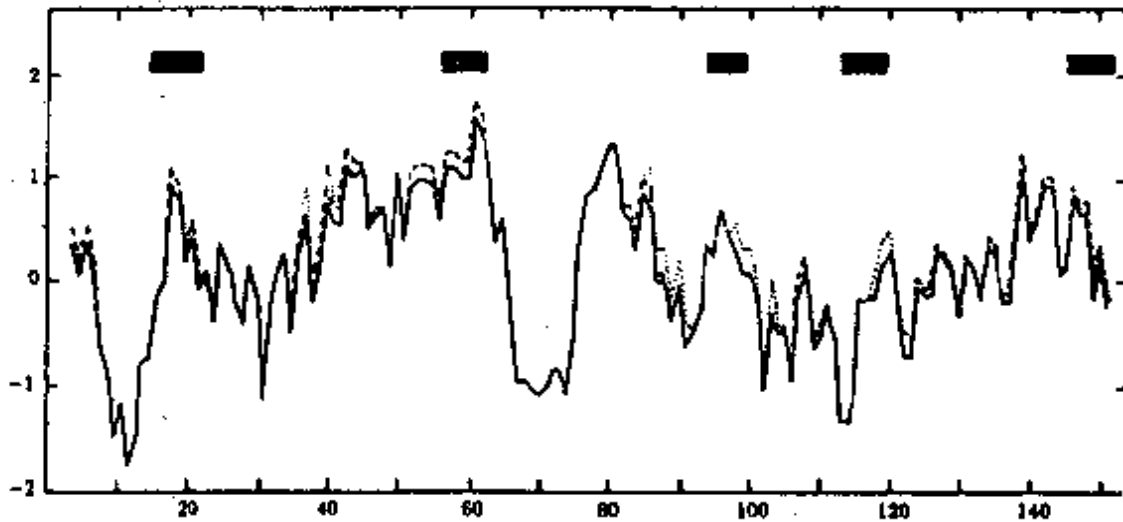


图4.10 精鲸肌红蛋白的六肽平均图

纵坐标为平均抗原值（平均亲水值），横坐标为氨基酸序列的位置。横坐标的153个分度代表153个氨基酸。纵坐标的幅度从3至-3.4。数据点划在平均基团的中心。上方的黑色方块是已知的抗原决定簇。实线——是用下表中的溶剂数值指定给每种氨基得到的。虚线---是天冬氨酸和谷氨酸值升至3.0得到的。……是脯氨酸的值指定为零得到的。

用已知三维结构的蛋白对该法进行考察，发现观测的内部区域和计算得到的内部区域吻合得很好。

Hopp 和 Woods⁽⁸⁾提出了确定蛋白抗原决定簇的方法。该法通过分析氨基酸序列、去寻找亲水性最强的部位。具体做法是，给每个氨基酸赋值，该值即氨基酸的亲水值，然后沿着肽链对这些值反复进行平均化。用来进行平均化的亲水值的每次的量是人为的。因为抗原决定簇的大概尺寸是六个残基，所以一般选六个亲水值

来进行平均。获得了所有的平均值以后，确定最高值。发现，最高点总是落入或接近抗原决定簇。用该方法预测的成功率取决于用来平均化的片段的长度，用六肽片段进行平均化时，结果最佳。记录该分析结果的最好方法是，用平均亲水值对序列的位置作图。

表 4.11 亲水值

氨基酸	$s, (\text{kcal/mol})$	亲水值
Arg	3.0	3.0
Asp	2.5	3.0
Glu	2.5	3.0
Lys	3.0	3.0
Ser	0.3	0.3
Asn	0.2	0.2
Gln	0.2	0.2
Gly	0.0	0.0
Pro	-1.4	0.0
Thr	-0.4	-0.4
Ala	-0.5	-0.5
His	-0.5	-0.5
Cys	-1.0	-1.0
Met	-1.3	-1.3
Val	-1.5	-1.5
Ile	-1.8	-1.8
Leu	-1.8	-1.8
Tyr	-2.3	-2.3
Phe	-2.5	-2.5
Trp	-3.4	-3.4

表4.11是用来平均化时，指定的各氨基酸的亲水值。表中的溶剂参数值是 Levitt 指定的^[9]。

在过去的20多年里，发表了一系列根据氨基酸序列测定蛋白

二级结构的方法，这就是上面归纳的预测多肽立体化学的经验方法。这些方法大致可以分为三大类：

1. 以数据库为基础的统计分析^[10-16]，由于计算机程序的改进，以及可以利用的数据增加，Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR) 方法^[17]由 Gibrat 等采用信息理论的仿真观察进行改良，从而提高了预测的准确性。这些方法为一种或一组氨基酸出现在一给定二级结构中的趋势提供了清单。

2. 以物理化学（例如位阻、亲水性、电荷、给出或接受氢键的可能性等等）考虑为基础的方法^[1, 16-23]。这些方法总结了一系列规则，使用这些规则可以沿着多肽链定义一系列二级结构。

3. 使用序列片段和蛋白构象的数据库中序列之间的同源性的算法预测，以便指定二级结构^[24-26]。

还有许多经验方法可以用来预测多肽的立体化学，由于篇幅的限制本章不能一一提到。虽然经验方法的准确性并不总是令人满意，但对于某一确切的论题却有很大的参考价值。计算机的普及使得许多实验室都可以建立与此有关的数据库，因而经验方法的实用性会越来越广泛。在药物化学研究中，构效关系的预测是不可缺少的步骤，由于研究经费和条件的限制，不大可能时时使用理论处理。运用简单方法预测多肽的立体化学，阐明构效关系，是最好的出路。可以相信，随着多肽药物的发展，有关内容会越来越受到注意。

参 考 文 献

- [1] Lim, V. L., 1974, *J. Mol. Biol.*, **88**, 873.
- [2] Chou, P. Y., and Fasman, G. D., 1974, *Biochem.*, **13**, 211.

- [3] Aubert, J. , and Loucheux-Leferbver, M. H. , 1976, *Archives of Biochem. and Biophys.* **175**, 460.
- [4] Schmid, K. , Kaufman, M. , Isemura, S. , Bauer, F. , Emura, J. , Motoyama, T. , Ishiguro, M. , and Namo, S. , 1973, *Biochem.* , **12**, 2711.
- [5] Leszczynski, J. F. , and Rose, G. D. , 1986, *Science*, **234**, 849.
- [6] Rose, G. D. , and Roy, S. , 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 4643.
- [7] Kyte, J. , and Doolittle, R. F. , 1982, *J. Mol. Biol.* , **157**, 105.
- [8] Hopp, T. P. , and Woods, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3824.
- [9] Levitt, M. , 1976, *J. Mol. Biol.* , **104**, 59.
- [10] Robson, B. and Pain, R. H. , 1971, *J. Mol. Biol.* , **58**, 237.
- [11] Finkelstein, A. V. , and Ptisyn, O. B. , 1971, *J. Mol. Biol.* , **62**, 613.
- [12] Wu, T. T. , and Kabat, E. A. , 1973, *J. Mol. Biol.* , **75**, 13.
- [13] Nagano, K. , 1977, *J. Mol. Biol.* , **108**, 251.
- [14] Garnier, J. , Osguthorpe, D. J. , and Robson, B. , 1978, *J. Mol. Biol.* , **120**, 97.
- [15] Maxfield, F. R. , and Scheraga, H. A. , 1979, *Biochemistry*, **18**, 697.
- [16] Palau, J. , Argos, P. , and Puigdomenech, P. , 1982, *Int. J. Pept. Protein Res.* , **19**, 394.
- [17] Gibrat, J.-F. , Garnier, J. , and Robson, B. , 1987, *J. Mol. Biol.* , **198**, 425.
- [18] Perutz, M. F. , Kendrew, J. C. , and Watson, H. C. , 1965, *J. Mol. Biol.* , **13**, 669.
- [19] McLachlan, A. D. , and Stewart, M. , 1976, *J. Mol. Biol.* , **103**, 271.
- [20] Kaiser, E. T. , and Kezdy, F. J. , 1983, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 1137.
- [21] Schiffer, M. , and Edmundson, A. B. , 1967, *Biophys. J.* , **7**, 121.
- [22] Eisenberg, D. , Weiss, R. M. , and Terwilliger, T. G. , 1984, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 140.
- [23] Cornette, J. L. , Cease, K. B. , Margalit, H. , Spouge, J. L. , Berzofsky, J. A. , and DeLisi, C. , 1987, *J. Mol. Biol.* , **195**, 659.
- [24] Nishikawa, K. , and Ooi, T. , 1986, *Biochem. Biophys. Acta*, **871**, 45.
- [25] Levin, J. M. , Robson, B. , and Garnier, J. , 1986, *FEBS Letters*, **205**, 303.
- [26] Ning, Q. , and Sejnowski, T. J. , 1988, *J. Mol. Biol.* , **202**, 865.

第五章 生物活性多肽

多肽已经成为多学科研究人员注意的中心,许多具有确切生物活性的多肽被分离并合成出来,于是,生物活性构成了多肽药物化学的一个重要方面。本章力图回顾有关的进展,为感兴趣的研究人员描绘出该领域的初步轮廓^[1-21]。

一、神经肽

在过去的十多年里,神经肽(中枢神经系统的多肽)的生物化学、生理学、药理学和合成,一直是人和动物的生长和激素调节研究中的主流^[22]。从1931年发现P物质到合成P物质,花了整整40年的时间。在过去的16年中,从神经系统中发现了许多神经肽。

1. P物质(SP)

SP(1)存在于人、哺乳动物和鸟的大脑和肠道中,Tregear^[23]于1971年用固相法合成。它具有典型的激肽作用:例如兴奋平滑肌和由于舒张血管而降低血压。SP能在各种脑区作为神经递质发挥功效,抑制吗啡和内啡肽的作用,因而被认为起到对抗应力决定失调的保护作用。

SP分子的构效关系研究表明,C端五肽是活性中心。随着C端五肽逐步增长,生物效应增加(表5.1)。

SP片段3,4,5的亲肌效应(兴奋平滑肌)比SP大。碎片6已

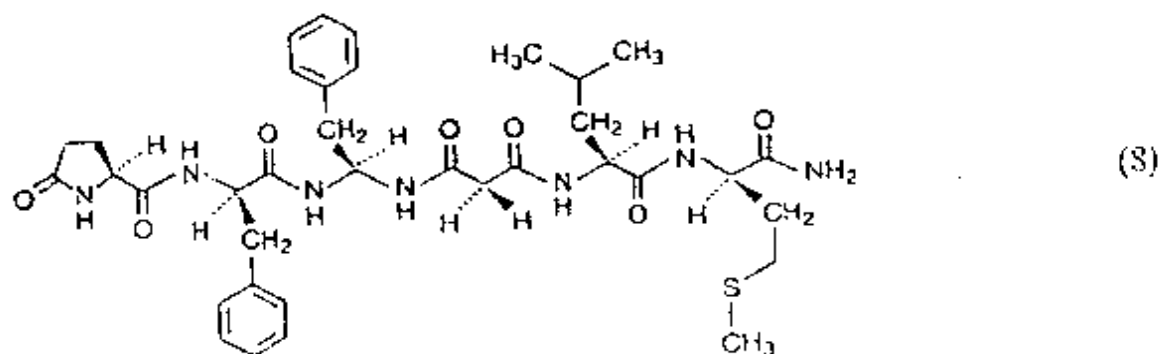
经显示了全部的生物活性。碎片 4 的活性达到顶峰。在血管减压响应测试中, SP 衍生物 pGlu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ 是最有效的化合物之一^[24]。

表 5.1 SP 衍生物对豚鼠回肠(GPI)的相对活性

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	活性	
Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	100	(1)
	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	60	(2)
		Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	160	(3)
			Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	200	(4)
				Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	125	(5)
					Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	100	(6)
						Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH ₂	2	(7)

含 D 型氨基酸的一些 SP 衍生物, 例如 (Arg⁶, D-Trp¹⁰)-SP(6-11) 和 (D-Pro⁴, D-Trp⁷⁻⁹)-SP(4-11) 是很强的竞争性拮抗剂^[25]。

衍生物 8 (pGlu⁶, gPhe⁸, mGly⁹)SP(6-11) (g=偕二氨基酸残基, m=丙二酸残基), 是 SP 的整体协同剂^[26], 而且不易水解^[27]。



2. 神经激肽

神经激肽 9 和 10 从猪脊髓萃取物中分离到, 并于 1984 年由 Munekata 等^[28]合成, 显示象 P 物质一样的降血压作用。



3. 神经紧张素(NT)

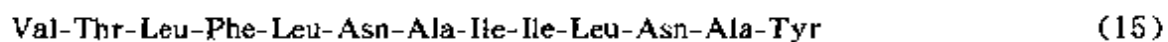
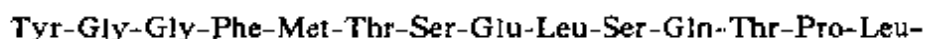
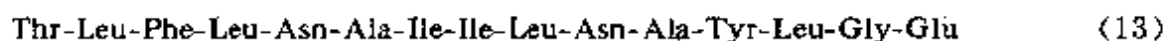
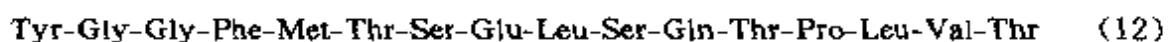


神经紧张素(11)^[29]于 1973 年从牛小肠中分离得到, 除典型的血浆激肽效应(降低血压、对肠和子宫的收缩作用)外, 还能在不影响生长激素或促甲状腺激素释放的情况下, 增加 LH 和 FSH 的分泌。

合成了许多对心血管系统有生物活性的 NT 片段^[30], NT8—13 显示了天然神经紧张素的全部作用。

4. 内啡肽、脑啡肽、Dynorphin 和 Dermorphin(鸦片肽)

1975 年 Hughes 和 Kosterlitz^[31]最早从人和动物的神经组织中分离到的内源性肽是 16 和 17。



稍后, β -脂肪酸释放激素(LPH)的部分片段, 例如 α -、 β -、 γ -和 δ -内啡肽(12—15)从垂体物中分离得到。13 的类似物(Phe²⁷-Gly³¹)- β 内啡肽(人)于 1978 年用固相法合成^[32], 它显示的镇痛效应比天然肽强。所有内啡肽都有相同的初序列, 它对应于 Met-脑啡肽的结构。

拟吗啡肽与鸦片生物碱有相同的受体作用, 并可能代表这些受体的内源性激动剂。代表功能活性分子的 β -内啡肽, 在机体对紧张刺激的反应中起了重要作用。人体的镇痛效应能够反过来追踪到 β -内啡肽的分泌。例如针灸, 就是活化中枢神经系统的内啡肽系统, 使得内啡肽浓度增加, 从而降低了痛觉的敏感度。可能在中枢神经系统存在内啡肽源系统, 在中枢神经系统中内啡肽发挥神经调节功能。

几乎在所有神经系统的区域和垂体后叶和肾上腺皮质中都存在不同量的脑啡肽。脑啡肽在痛觉传递中作为脊髓中疼痛抑制神经的递质起作用。

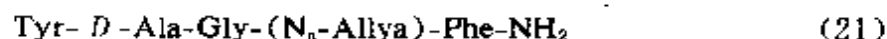
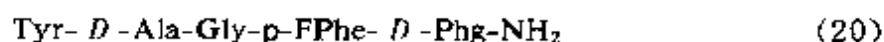
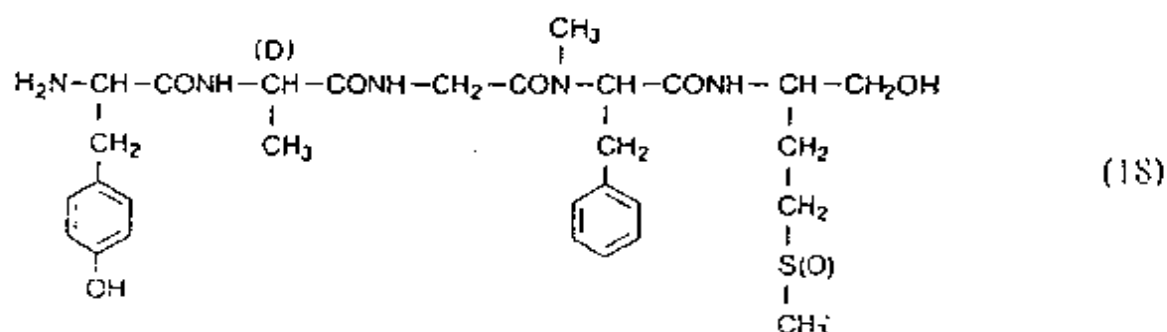
由于多肽本身的性质, 脑啡肽和内啡肽难以用于治疗。这些“脑吗啡”将允许镇痛从成瘾和依赖的发展中分离出来的愿望尚未实现。

已合成了 1000 多种脑啡肽衍生物, 与脑啡肽相比它们之中有些可能提高了镇痛效应^[33—37]。脑啡肽衍生物 18^[38] (Sandoz, FK 33—824), 由于不再被酶降解, 在动物上有强镇痛作用。

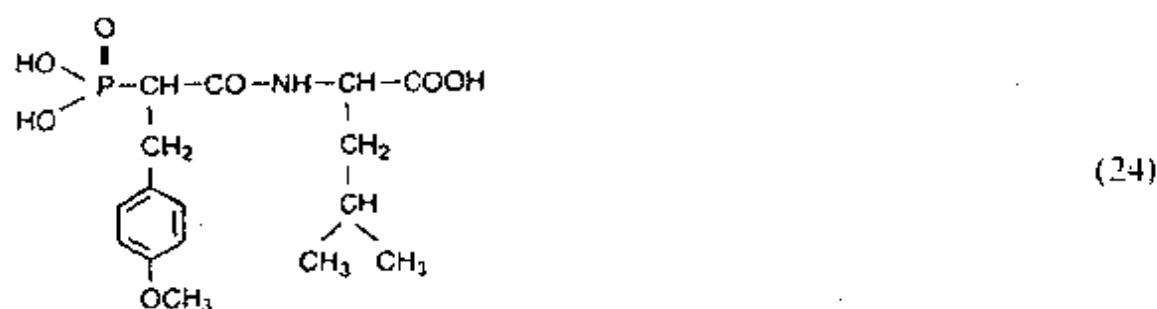
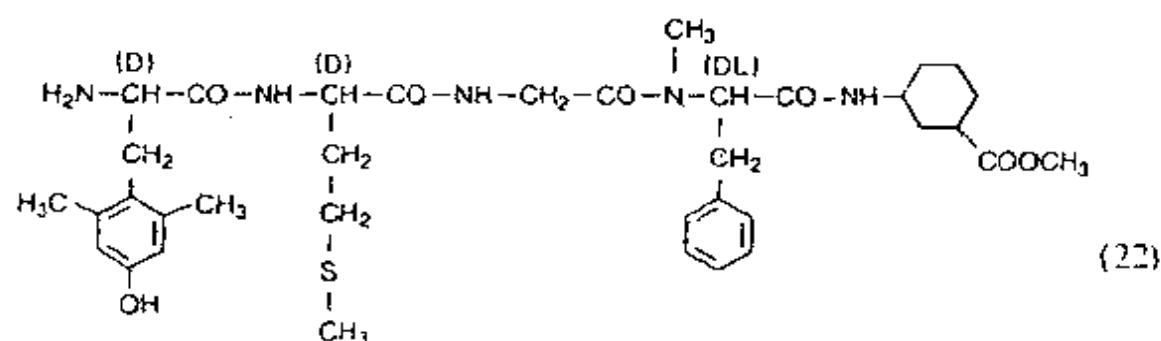
与 Leu-脑啡肽相比, 脑啡肽的类似物 Tyr- D-Ala-Gly-Paa-Leu^[39] 只显示轻度的鸦片样作用。Phe¹ 被 Paa(β -pyrazinylalanine) 替换, 导致活性的严重损失。

Schiller 等^[40]采用线型脑啡肽的逆转修饰, 例如 Tyr- D-Ala-Gly-Phe-Leu-NH₂(19)(14% Leu-脑啡肽活性), 获得了进一步的构

效关系。来自 E1 Lilly & Co^[41, 42]的脑啡肽衍生物 20 和 21 具有镇痛性质。

消旋的抑制剂 Thiorphan^[46] (25) 抑制脑啡肽酶并选择性地支

持脑啡肽的镇痛作用。



类似地, Spatola 等^[47]合成了硫亚甲基-脑啡肽的伪肽(见图 5.3), 该化合物对蛋白水解降解稳定, 并显示与亮氨酸-脑啡肽可比拟的生物活性。

(D-Ala²)-Met-脑啡肽酰胺^[48] Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH₂ 和 Morpiceptin^[49] Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂ 具有高度的吗啡样活性(激动吗啡的 μ 受体)。

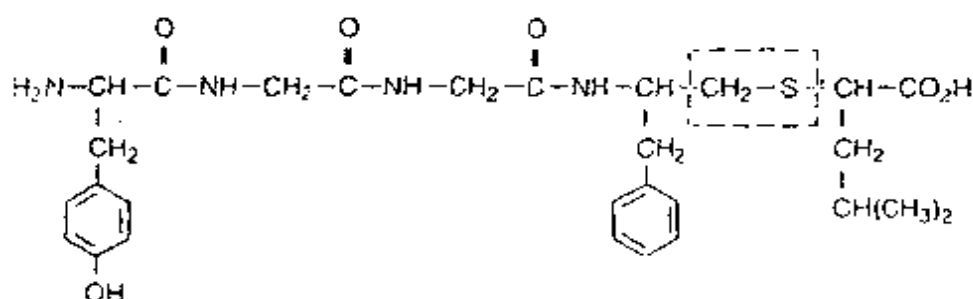
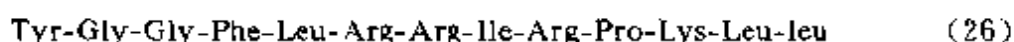
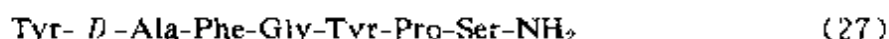


图 5.3 伪硫亚甲基-脑啡肽(CH_2S 取代了 CO-NH)

1975 年 Goldstein 等^[50, 51]从猪的垂体中分离出了 Dynorphin (26), 它的活性是 Leu-脑啡肽的 700 倍。



Dermorphin 27, 从 *phyllomedusa sauvagei* 蛙皮中分离到, 显示强镇痛效应, 而且效力为吗啡的 700 倍^[52, 53]。



合成的 Dermorphin 四肽, 例如 Tyr-D-Ala-Phe-Gly 和 Tomatis 等^[54]合成的 PMRI 异构体(部分修饰的逆转异构体)对 GPI 试验(豚鼠回肠试验), 比吗啡或 Dermorphin 更有效。

5. 京都啡肽和新京都啡肽

具有镇痛活性的京都二肽 Tyr-Arg^[55]于 1979 年被 Takagi 等从牛的下丘脑分离得到, 被假定引起 Met-脑啡肽的分泌, 1982 年又分离到新京都肽五肽(NK)Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg^[56]。

6. Delta 催眠肽(DSIP)

1975 年 Monnier 等^[58]从沉睡的兔子的血液中分离到催眠肽

28, Ivanov 等合成了类似物 29^[59], 向动物心室内灌注 28 和 29 后都产生与催眠类似的状态(δ 慢波催眠)。

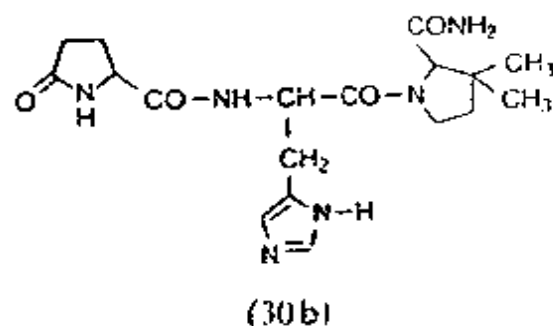
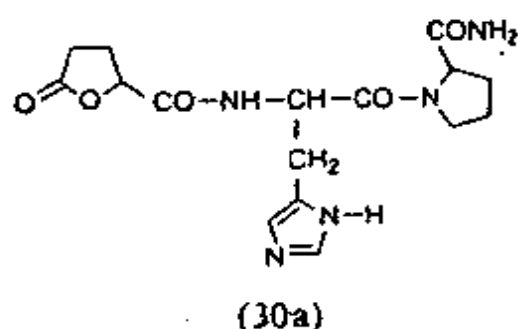


二、下丘脑的释放激素和释放抑制激素

释放激素^[60]和释放抑制激素与垂体前叶激素相比,是低分子肽,存在于下丘脑的一些区域,它们能刺激垂体前叶,使之进入生成激素或抑制激素释放的状态。下丘脑对机体的许多致命的生理过程都施加影响。

1. 促甲状腺素释放激素(TRH)

第一个释放激素就是 1969 年从羊和猪的下丘脑分离得到的 TRH(pGlu-His-Pro-NH₂)^[61, 62]。Burgus 等^[63]合成的 pGlu-3-Me-His-Pro-NH₂ 的生物活性超出天然和合成 TRH10 倍^[64]。TRH 调节促甲



状腺素和催乳激素的合成和释放,并用于治疗 and 诊断甲状腺疾患。丁内酯衍生物(30a)^[66]和 pGlu-His-3,3-二甲基脯氨酸酰胺(30b)^[66]显示中枢神经系统活性。

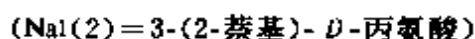
2. 黄体激素释放激素(LHRH)或促性腺激素释放激素

LHRH(31)于1971年和1974年从猪和羊的下丘脑组织中分离得到^[67],具有黄体激素释放和促卵泡成熟激素释放活性,商品名为 Lutal^[68]。



刺激女性器官中的黄体分泌,可以引起排卵和形成对保胎有作用的 corpus luteum,促卵泡成熟激素(FSH-糖蛋白)的分泌,可以刺激卵巢中卵泡成长并开始成熟,因而促进雌性激素的生物合成。

LHRH 类似物的广泛应用体现在避孕和生育能力治疗领域内。通过1000多种LHRH类似物的合成,已经发现了生物活性超过母体化合物30倍以上的结构。目前比较感兴趣的化合物有, buserelin(32)^[69, 70], leuprorelin(33)^[71], 和 Nafarelin(34)^[72], 它们与天然的LHRH相比较,显示的激动剂效应,为天然物的200倍以上。



睾丸素依赖性肿瘤的生长,通过长期服用三种LHRH类似物而阻断。化合物32-34首先应用于前列腺癌的治疗。Buserelin以鼻喷雾剂(Suprefact, 32)投放市场, leuprorelin carbinil(33)作为注射

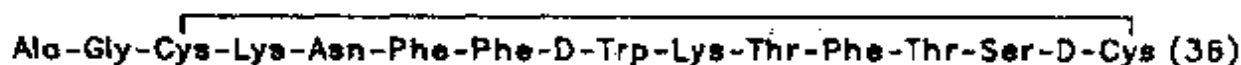
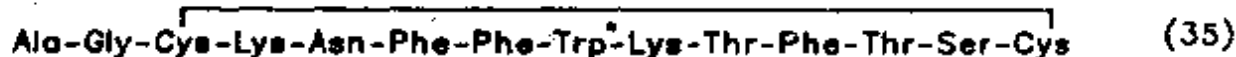
剂推出(1984)。

这些产品阻断垂体促性腺激素的分泌,减少睾丸中莱迪希细胞(间质细胞)里的黄体激素受体,导致睾丸酮水平下降(药物阉割)。

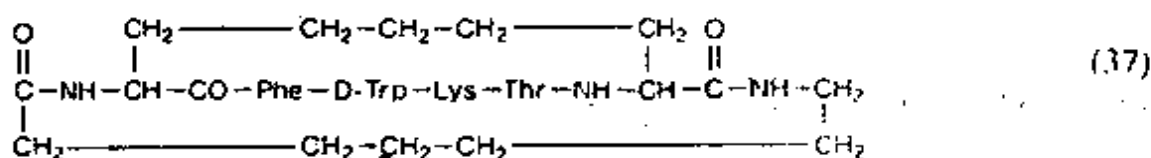
3. Somatostatin(生长激素释放抑制激素)

Somatostatin(SST)(35),是一种环状十四肽,具有二硫桥,于1973年由Guillemin从下丘脑分离得到。SST具有的广泛的内分泌和胃肠道功能,不仅抑制生长激素的分泌,也抑制胰岛素和高血糖素的分泌,因此在葡萄糖的分泌中起重要作用。在胃中,SST抑制促胃液素、盐酸和胃蛋白酶的分泌。尽管它缺乏选择性,半衰期短,注射给药也只有几分钟的作用时间,但somatostatatin还是已经引起了人们作为治疗剂应用的兴趣(治疗糖尿病、胃溃疡、胰腺炎)。类似物的合成发现了一些选择性地抑制高血糖素和胰岛道分泌的化合物,对胰岛素的释放只有轻微的影响,而对高血糖素的释放有强烈的影响。

以达到分离各效应和制备口服活性衍生物为目标的SST结构修饰,有实际上的重要性^[73-77]。这样一来,(D-Trp⁸, D-Cys¹⁴)-SST(36)优先抑制高血糖素和生长激素(GH)的释放;des(Ala¹, Gly², Asn⁵)-SST和des-Asn-SST抑制胰岛素的释放,而高血糖素和GH不受影响^[78]。



双环 SST 类似物 37^[79], 静脉注射或口服, 都能抑制胰岛素、高血糖素和生长因子的分泌。



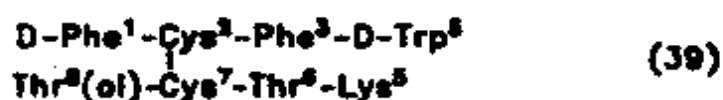
逆对映异构的 SST 的环状六肽 38, 具有很高的代谢稳定性, 抑制胰岛素、高血糖素和生长激素⁽³⁸⁾的释放。

环八肽 SMS201-995(39)比天然 SST 的作用时间更长, 并且更选择性地抑制生长激素分泌。另外, 它加强胰岛素的低血糖效应, 同时减少高血糖素。



(MeAla = N-methylalanine)

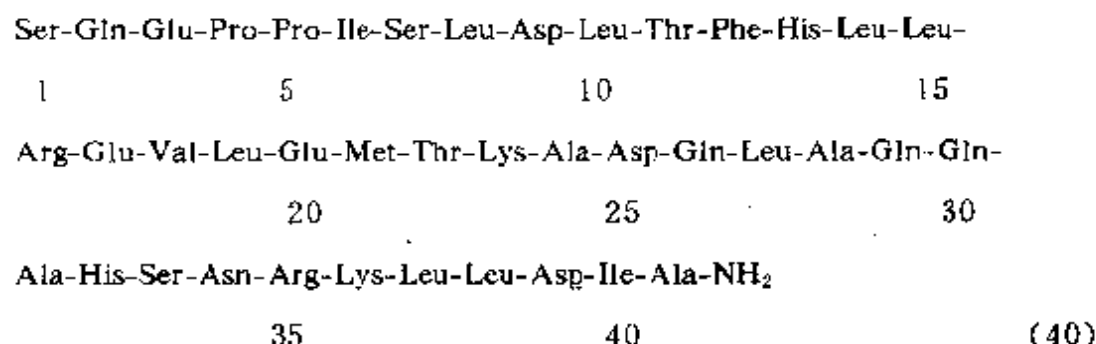
临床研究表明, SMS201-995^[80]能够降低血浆中生长激素的浓度, 按照这一途径, 肢端肥大症(肢端区域例如鼻子、额、手、足等过分发育)通过皮下给药可以得到治疗。



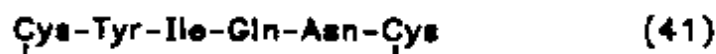
4. CRH(或 CRF), MRH 和 PRH)

促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)(40), 是 Vale 等^[81]于

1981 年从羊的下丘脑中分离到的含 41 个氨基酸的线型肽酰胺, 结构肯定且与血管紧张肽原相似。它刺激促肾上腺皮质激素及 β -内啡肽分泌。1985 年 Morell 等用固相法合成了羊 CRH。



催产素的 N 端环状六肽和 C 端三肽从下丘脑分离得到, 分别为黑色素释放激素(MRH, 41)和黑色素抑制激素(MIH, 42)。二级激素先质催产素可以被看作是 MIH 的前体。

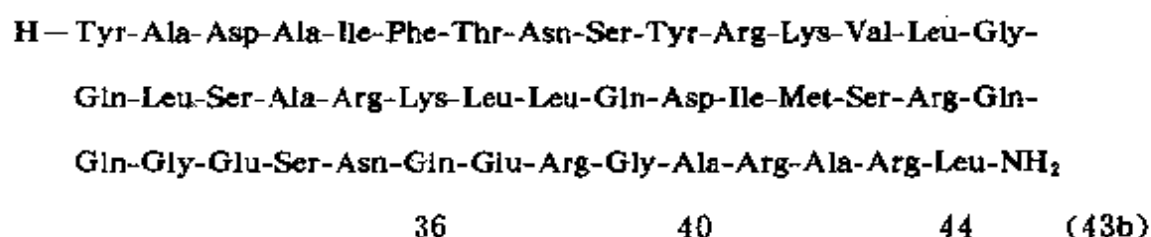


催乳激素释放激素(PRH)和催乳激素释放抑制激素(PTH)调节垂体前叶中催乳激素的形成和分泌^[83]。催乳激素本身刺激乳腺释放乳汁, 并刺激这些腺体发育。PRH 和 PIH 这两种激素的化学结构尚未澄清。

5. 生长激素释放激素(GH-RH 或 GRF)或 somatocrinin

1982 年^[84, 85]从人胰腺肿瘤细胞中分离到了具有 GRF 活性(刺激生长激素分泌)的三种多肽 43a, 并通过固相法合成。Yajima 等^[86]的其它合成已为人们熟知, 43b 用于促进伤口愈合一类的治疗。





6. 垂体蛋白激素

下丘脑激素总应控制垂体前叶的激素，这是一个规则。然后，垂体激素(例如卵泡刺激激素、催乳激素、或促甲状腺激素)通过血流输送到二级靶器官，例如在二级靶器官刺激肾上腺产生皮质激素，或在甲状腺中形成甲状腺素。

7. 生长激素

生长激素(STH)或人体生长激素(HGH)，是由 191 个氨基酸构成的线型多肽激素，分子内有两个二硫桥，不仅受 somatostatin 的控制，而且影响生长期间的成熟过程(例如增加蛋白质和重量)。

从人的垂体分离到的物质(例如 asellacrin)可用于治疗侏儒症，侏儒症患者肯定缺乏 STH。另一方面，在发育年令 HGH 的过度分泌，可以导致巨人症。HGH 还用于肌肉营养不良、骨脱钙(骨质疏松)、和出血性胃溃疡。从全合成困难的观点讲，通过 DNA 重组来合成人体生长激素具有重要意义。

8. 促肾上腺皮质激素(ACTH)

促肾上腺皮质激素(结构见图 5.4)刺激肾上腺皮层细胞分泌和产生甾体激素。通过反馈机制，皮质激素抑制 ACTH 的垂体分泌。

从 1956 年以来,150 多种部分序列或类似物^[88, 89]已合成出来,链长主要为 1 至 16 或 1 至 28。猪的 ACTH 的首次全合成是 1963 年由 Schwyzer 等完成的^[90]。在 ACTH 骨架的合成中,获得了构效关系的广泛知识,主要涉及链长对生物活性的影响。

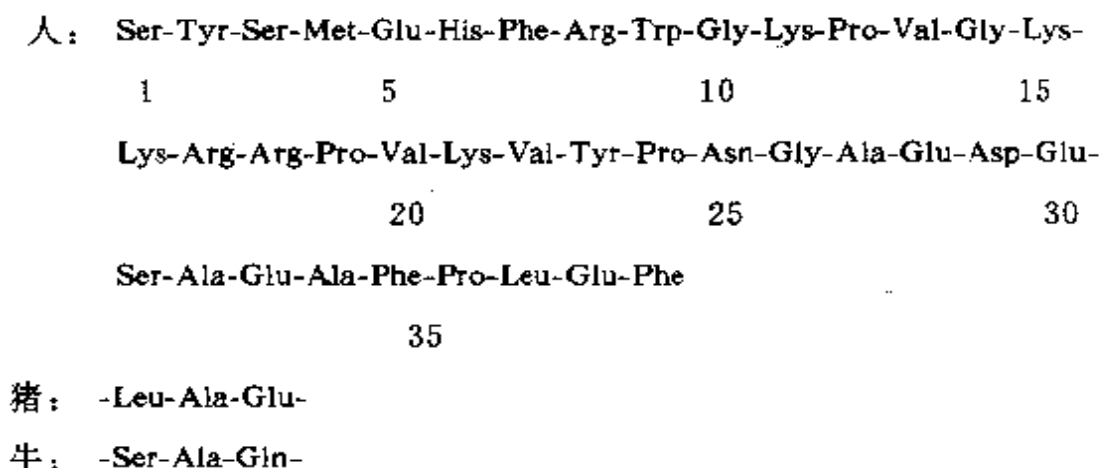


图 5.4 人、猪、牛的 ACTH 的氨基酸序列

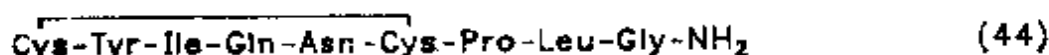
ACTH 序列从分子式看,可以细分为具有不同生物学意义的不同部分。N 端 1—10 部分代表活性中心,11—18 与受体结合有关。C 端 25—39 部分包含种专属性和抗原性的激素信息。

ACTH(synachen)的 N 端二十四肽在治疗风湿关节病、支气管哮喘和肾病中有应用价值。

9. 催产素和后叶加压素

催产素和后叶加压素的实际形成部位是下丘脑,然后这两种肽从下丘脑转运到垂体后叶,与后叶激素运载蛋白结合并储存。Vigneaud 等^[91]完成了催产素(44)和后叶加压素(45)的结构和合成研究。这些多肽激素是研究得最彻底的活性多肽化合物。在文献中已经报道了 350 种催产素和后叶加压素。

后叶加压素通过增加肾渗透性引起水的再吸收,使初级尿浓缩。如果后叶加压素水平太低,水的再吸收就不再有保障,以至于排泄大量低比重的尿(水利尿等于尿崩症)。使用高剂量后叶加压素,可以增高血压和肠蠕动。



催产素用于产科的引产,例如在生育中保持子宫收缩和促进排乳。后叶加压素的最重要的治疗作用,是在尿崩症中的抗利尿作用(例如 1-去氨基-*D*-Arg⁸-后叶加压素的鼻喷雾剂^[92]。)

三、肌肽

肌肽 β -Ala-His 在骨骼肌中的含量相对高,可作为神经递质起作用。临床研究表明,肌肽促进创口愈合。

四、无脊椎动物神经肽激素

无脊椎动物肽 PCH(色素浓缩激素 46)和 AKHI(脂肪氧化激素 47),是从无脊椎动物中最先发现的神经肽,Josefsson 于 1983 年描述了它们的结构和合成^[94]。这两种多肽在昆虫的颜色适应的机制中都起作用。



五、DBI 肽(苯并二氮杂卓结合抑制剂)

Guidotti 和 Ferrero^[95]从人和大鼠的脑萃取物分离到具有神经活性的多肽,这些多肽与苯并二氮杂卓(例如安定和利眠宁)发生生物学效应的受体发生相互作用。与苯并二氮杂卓相反, DBI 肽 48 (“焦虑”肽),是苯并二氮杂卓受体的内源性配基,能够引起焦虑。

Gln-Ala-Thr-Val-Gly-Asn-Val-Asn-Thr-

Asp-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu-Asp-Leu-Lys (48)

神经肽的研究无疑会为发展比精神药理学中目前应用的药物更有效、更安全、专属性更高的新活性化合物,提供一切可能。

六、胃肠肽(胃、肠和胰腺肽)

胃肠肽使得可能的分泌过程成为消化过程中正常途径必须的过程的多肽激素(非腺体激素),它是在胃肠粘膜和胰腺组织(胰岛)分泌中形成的。

1. 肠促胰液肽、胰高血糖素、VIP、PHI 和 GIP

肠促胰液肽^[96]是 1961 年从十二指肠粘膜中分离到的,四年后发现该化合物为线型二十七肽,刺激胰腺产生含酸式碳酸盐的分泌物。已经合成了肠促胰液肽的衍生物^[97-99]。另一个合成是 Uchiyama 等^[100]采用片段组合法完成的,该合成规模大、时间短、纯度高。

胰高血糖素是 Staub 等^[101]于 1953 年从猪的胰腺中分离到的,1956 年由 Bromer 等^[102]阐明了结构,该化合物显示高血糖

(胰岛素拮抗)和增强收缩力的效应。胰高血糖素用于治疗胰岛素寿命过长的低血糖状态、心脏病、或 β -阻断剂过量。Wunsch 等^[103]和 Merrifield^[104]在胰高血糖素方面做了广泛的工作。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
a	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys
b	His	Ser	Asp	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Asp
c	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Leu	Asp
d	Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Met	Asp
e	His	Ala	Asp	Gly	Val	Phe	Thr	Ser	Asp	Phe	Ser	Arg	Leu	Leu	Gly
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
a	Gln	Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn	NH ₂	
b	Ser	Ala	Arg	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	NH ₂		
c	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	
d	Lys	Ile	Arg	Gln	Gln	Asp	Phe	Val	Asn	Trp	Leu	Ala	Gln	Gln	... Gln
e	Gln	Leu	Ser	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Glu	Ser	Leu	Ile	NH ₂		

图 5.5 VIP(a)、肠促胰液肽(b)、胰高血糖素(c)、GIP(d)和 PHI(e)的序列

作为线型多肽，舒血管肠肽(VIP)^[105]，PHI(N 端组氨酸 C 端异亮氨酸肽)^[106, 107]和肠抑肽(GIP, 含 43 个氨基酸)，结构与肠促胰液肽和胰高血糖素类似。VIP 和 PHI 作为血管舒张剂起作用，产生低血糖效应，并影响胆囊平滑肌。GIP 则完全阻断胃液分泌。

2. 促胃液素、缩胆囊素-促胰酶素(CCK-PZ)和 Galanin

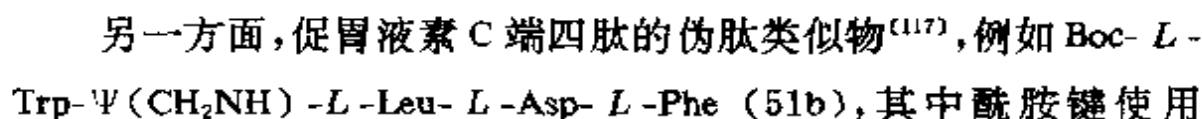
促胃液素 I 和 II (Tyr¹²-O-sulfated gastrin I)(49)，于 1964 年由 Gregory 等^[109]阐明结构，它们形成于胃窦粘膜内衬，对胃内盐酸分泌和胰腺中的酶分泌产生强烈的刺激作用。它的 C 端 Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ 四肽具有天然激素的生物学性质^[110]。Shepard^[111]证实，固相法适宜于合成促胃液素肽。后来 Merrifield

pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (49)

Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-Asn-Leu-
Gln-Ser-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-
Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (50)

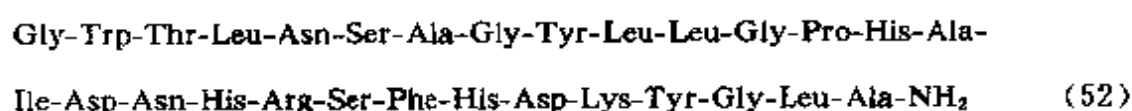
$$\begin{array}{ccccccc} (\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}- & \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}- & \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}- & \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2 \\ | & | & | & | \\ \text{CH}_2 & \text{CH}_2 & \text{CH}_2 & \text{CH}_2 \\ | & | & | & | \\ \text{Indole ring} & \text{S} & \text{COOH} & \\ | & | & & \\ \text{H} & \text{CH}_3 & & \end{array}$$

(51a)



CH₃NH 进行了异立体修饰, 该化合物是胃酸分泌的有效激动剂。

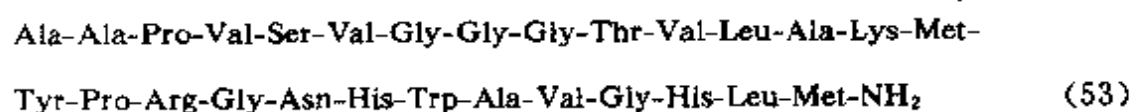
1983 年 Tatemoto 等^[116]从猪肠中分离到 Galanin (52), 用狗作试验表明该化合物引起平滑肌收缩和中度低血糖。



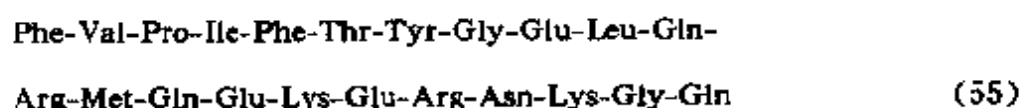
3. 促胃液素释放肽 (GRP)、Bombesin 和蠕动素

GRP^[119] (53) 分离自猪的胃粘膜, 引起胃液分泌。除 His²⁰ 外, GRP 的 C 端 10 肽与 Bombesin (54) C 端 10 肽相同, 也和 10 肽 neuromedin C^[119] (Gly¹⁸-Met²⁷)-GRP 的序列相符。Neuromedin C 是猪脊髓肽, 也可以看作 Bombesin 类肽, 对子宫平滑肌有刺激作用, 而且在哺乳动物的神经信息系统有神经介质的功效。

Bombesin^[120, 121] (54) 分离自蛙皮, 被认为具有抗利尿和抗高血压性能。该化合物刺激促胃液素、胰腺和胃液的分泌, 引起胆囊收缩。后来 Moody 等^[122]发现 bombesin 和 bombesin 类肽 (BLPs) C 端部分序列能够起到人小细胞肺癌 (SCLS) 细胞内衬里自分泌生长因子的功效。



蠕动素 (胃蠕动活性激动多肽, 55) 是由 Mutt 和 Brown^[123] 从猪肠中分离得到的, 该化合物刺激胃蠕动和胃蛋白酶分泌。Wunsch 等^[124] 合成了 (Nle¹³, Glu¹⁴) 蠕动素和 (Leu¹³, Glu¹⁴) 蠕动素的 9—22 片段。



七、胰岛素

胰岛素^[5, 21, 89, 125] (图 5.6) 于 1921 年由 Banting 和 Best 发现, 1955 年 Sanger 阐明了它的一级结构。因为该化合物的合成和生物学文献极多, 这里只能进行一般的概括。

1963 年 Zahn 等^[126] 完成了 A 链、B 链的全合成, 并把它们组合成了胰岛素。

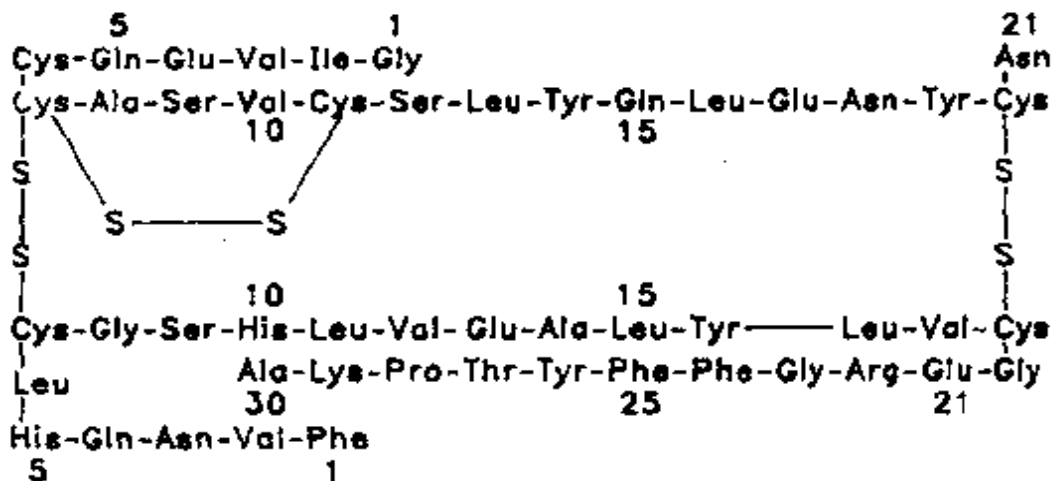


图 5.6 胰岛素的结构

胰岛素对任何器官都不显示专属性, 实际上在肝、肌肉和脂肪细胞中进行的大量代谢过程都是依赖胰岛素的。在胰岛素的影响下, 许多器官和组织的细胞膜的通透性增加, 而且促进物质从细胞外空间向肝、脂肪和肌肉细胞内转运。因胰岛素促进的葡萄糖向这些细胞内涌入, 导致加速葡萄糖降解, 因而葡萄糖的水平被胰岛素降低。由于胰岛素通过脂肪和肌肉细胞血浆膜大大影响葡萄糖的转运, 所以这些细胞表面的胰岛素受体可能是该激素的主

要作用部位。胰岛素通过增加氨基酸的摄入而影响蛋白质代谢，结果增加了细胞膜的通透性。

糖尿病是胰岛的 β -细胞释放的胰岛素太少的结果，或在靶组织上活性胰岛素受体数量减少的结果。有许多制品可用于治疗与胰岛素有关的糖尿病。1974 年 Rittel 等^[128]报道了胰岛素的全合成。从那时开始，已经发展了制备胰岛素的新方法，即 E. Litaly 和公司通过微生物的基因修饰^[129](DNA 重组)的生物技术合成和胰蛋白酶催化的，把 C 端 Ala^{30} 替换 β 链中的苏氨酸，将猪的胰岛素转变为人胰岛素^[130]。

八、具有免疫重要性的多肽

多肽化学家对合成免疫抑制和免疫激动多肽的兴趣日益增加，下面讨论这些多肽。

1. 胸腺肽

胸腺是位于胸(初级淋巴组织)下的腺体，它在免疫系统中占有中心位置。其功能包括刺激免疫反应，以及细胞分化。一旦外来物入侵机体，机体即经由它的免疫系统进行防御。

免疫系统的载体是白细胞，即免疫细胞^[21]。这些细胞或者是吞噬细胞(例如粒性白细胞和巨噬细胞)，或者是淋巴细胞，即淋巴 T 细胞和 β -淋巴细胞。淋巴 T 细胞在胸腺中进一步分化，而 β -淋巴细胞起源于脊髓母体细胞。

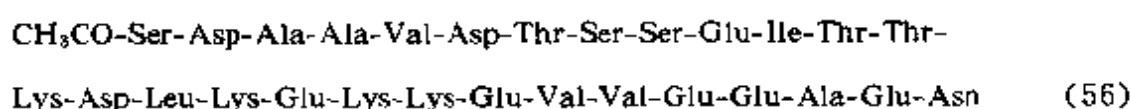
在免疫反应过程中，功能为抗体合成的最终分化的血浆细胞是由 β -淋巴细胞在淋巴 T 细胞和胸腺肽的影响下形成的。

2. Thymopoietin 衍生物(TP)

Thymopoietin 是腓肠胸腺多肽, 含 49 个氨基酸, 可引起选择性 T 细胞分化, 所以它是细胞结合免疫反应的缘由。考虑到较小的肽对免疫系统具有相同性质, 导致合成了 thymopentin (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr^[131, 132]) 以及衍生物, 例如 Lys-Lys-Tyr-Phe-Arg^[133]。

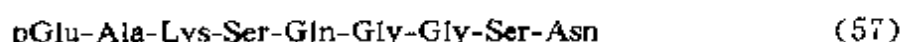
3. 胸腺素 α_1

胸腺素 α_1 是 Goldstein 等^[134]从牛的胸腺中分离到的, 它对于胸腺依赖的淋巴细胞的发育有重要作用。胸腺素 α_1 已由多个研究组采用固相法^[135, 136]以及适宜的合成技术^[137, 138]合成。



4. 血清胸腺因子(FTS 或 Thymulin)

Bach 等^[139]从猪血清中分离到血清胸腺因子, 该因子(57)负责 T 细胞分化。



已经合成了大量在淋巴 T 细胞的分化中显示生物学效应 m 的 FTS 类似物^[140]。在免疫系统紊乱(例如先天 T 细胞缺陷或慢性细菌感染)的治疗中, 有可能使用肽衍生物 Thymosin α_1 和 FTS。

5. Tuftsin

1970 年 Najjar 等^[141]从蛋白 leukokinin 中分离到 tuftsin(58), 该化合物是用酶法切割 γ -球蛋白馏分得到的, 它刺激吞噬作用。因为它作用于巨噬细胞和粒性白细胞, 所以它被试用于各种感染

性疾病^[142]。

Thr-Lys-Pro-Arg

(58)

九、环孢菌素

环孢菌素^[143] (图 5.7) 是环状十一肽，在组成它的十一个氨

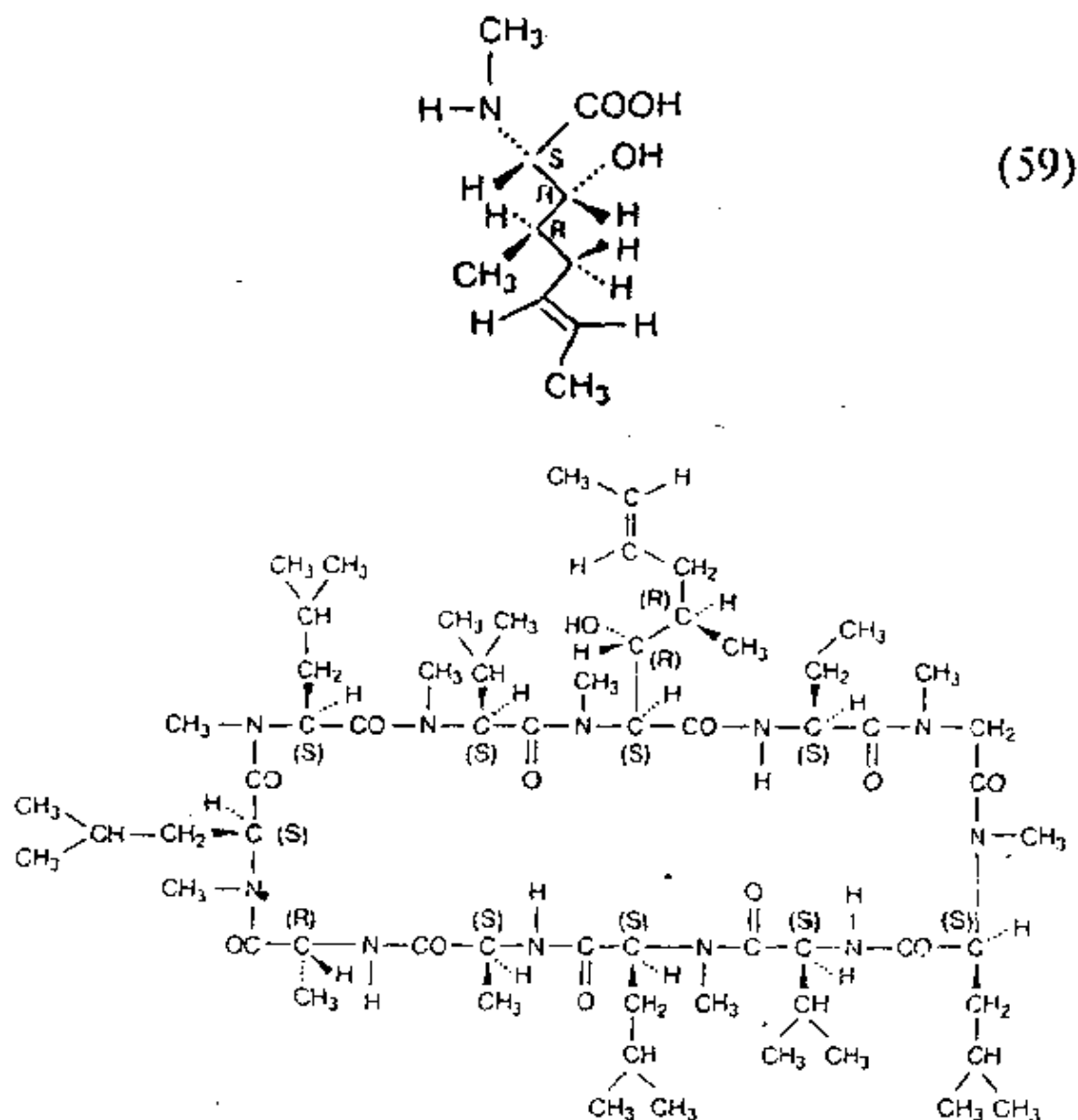


图 5.7 环孢菌素 A 的结构

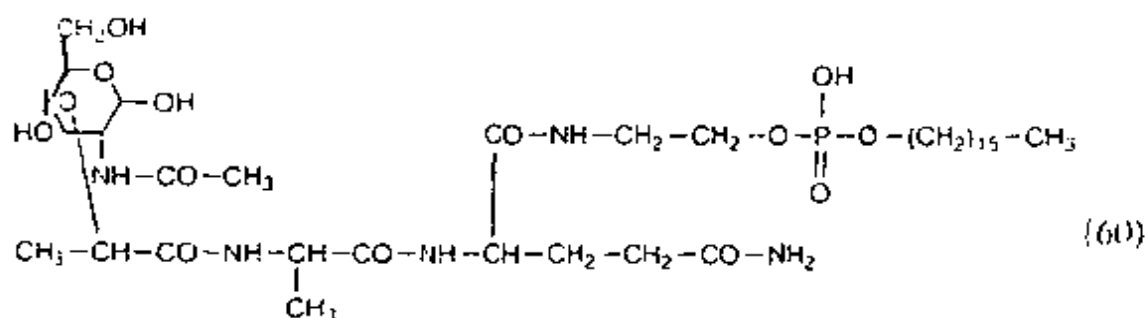
基酸中，有些是 N 端甲基化的，其中的氨基酸 (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4, N-dimethyl-L-threonine (MeBmt) 59 是特征组分，而且在生物活性中起重要作用。

环孢菌素 A 从真菌 (*Tolypocladium*) 培养液^[144]中分离到，从 1983 年以来在骨髓移植、器官移植和自身免疫疾病中，已被用作具有杀真菌和抗炎性质的免疫抑制剂。1976 年 Petcher 等^[145]确定了环孢菌素的结构，1984 年 Wenger^[146, 147]完成了它的全合成。

十、胞壁酰肽(糖肽)

细菌的细胞壁的胞壁酰肽 (MP) 是由 N-乙酰化葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸组成的高聚链分子，各带一多肽侧链，并相互交联 (图 5.8)。侧链的 N 端 D-Ala 残基经由五个葡萄糖单位共价键连接到相邻的多聚糖链上。

Ciba-Geigy AG^[148]已经合成了 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺-2-(十六烷氧磷酰氧)-乙基酰胺 (60)，它具有增强免疫的性质。



胞壁酰肽可以用作佐剂与疫苗结合 (增加体液和细胞免疫)，与抗菌素结合 (增强抗菌效应)。

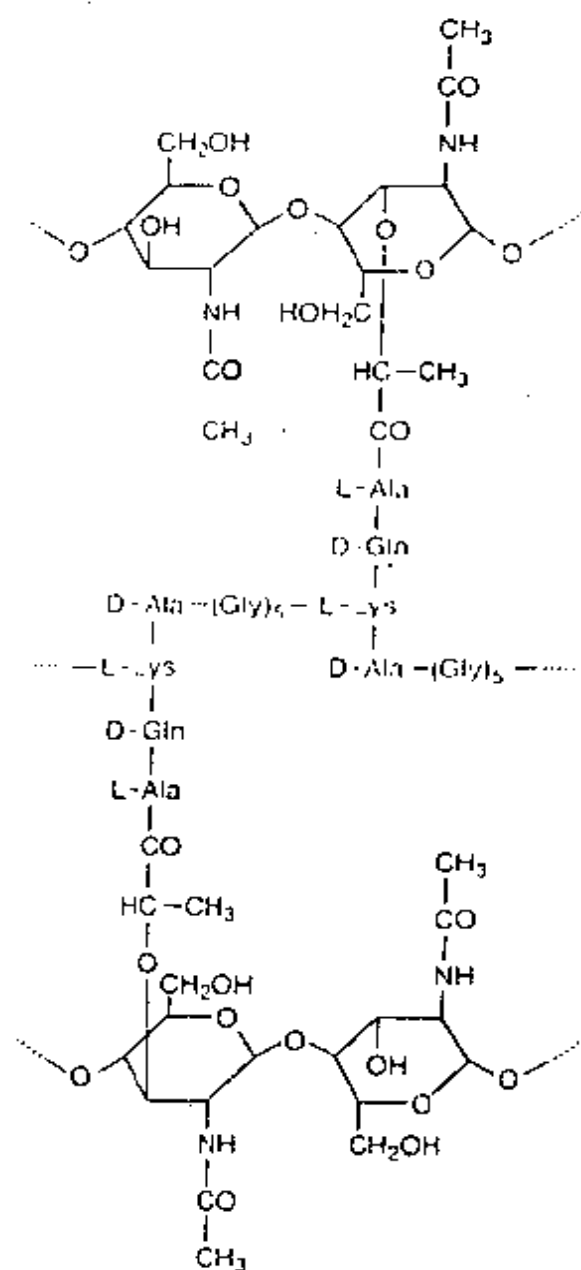
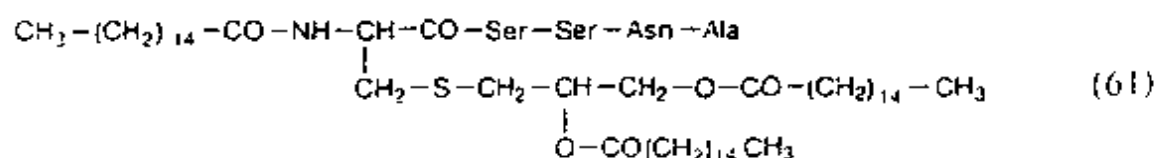


图 5.8 葡萄球菌细胞壁肽糖的基本结构单位

Jung 等^[149] 的促有丝分裂五肽 S-[2, 3,-bis (palmitoyloxy)-
(2*R*, 3*S*)-propyl]-*N*-palmitoyl-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala (TPP) (61),

是来自于大肠杆菌外膜的脂蛋白的成分,也是 β -淋巴细胞活化剂的强有力的佐剂。



胞壁酰衍生物的生物学效应是以下列事实为基础的:组织的巨噬细胞被活化并形成对抗入侵(抗原吞噬)免疫系统的第一道防线。另外,淋巴系统活化,即 β -淋巴细胞和淋巴 T 细胞被激活(专属性免疫反应)^[150]。保护的天冬酰胺糖肽(62)是 Kunz 等^[151]通过增长 N 端肽链而合成的。

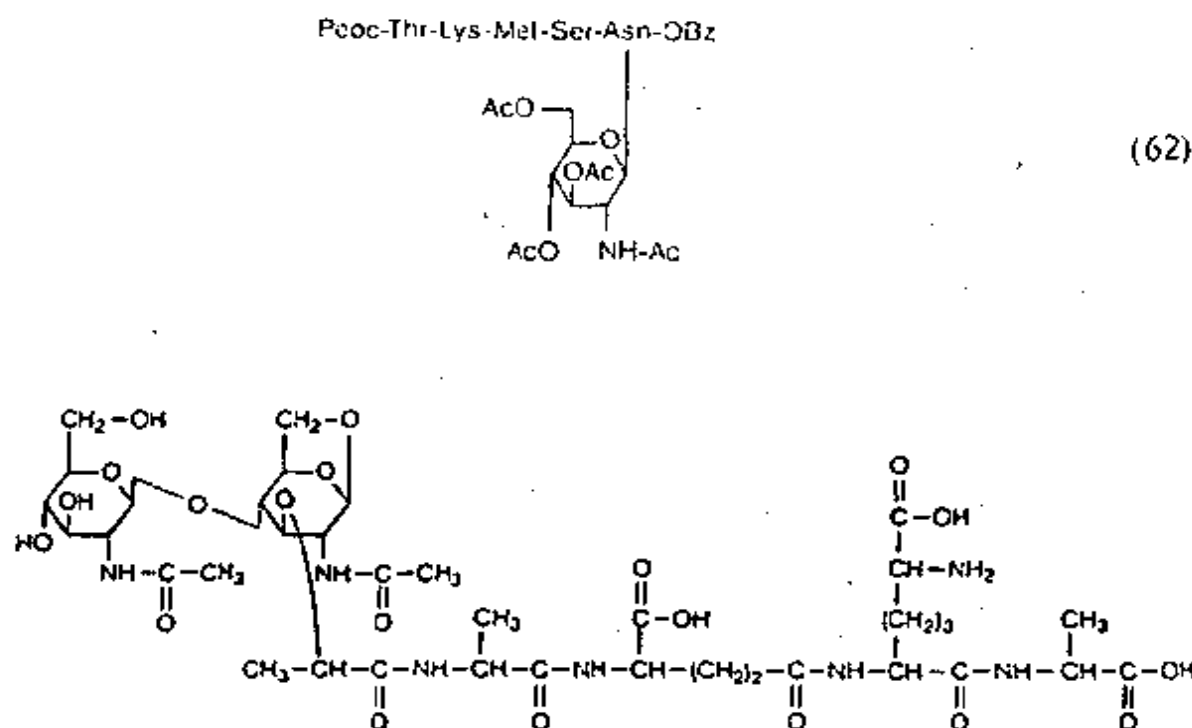


图 5.9 促睡眠因子

N-acetylglucosaminyl-1, 6-anhydro-*N*-acetylmuramyl-alanyl-glutamyl-diaminopimelylalanine (NAG-1, 6-anhydro-NAM-Ala-Glu-Dap-Ala, 图 5.9) 是 Krueger 等^[152]从人尿中分离到的促睡眠因子, 它显示瞌睡效应, 即延长慢波睡眠状态(SWS)。

已经合成了大量胞壁肽因子^[153, 154], 目标在于寻找非依赖性的内源性催眠剂。

十一、多肽疫苗

许多研究组致力于合成蛋白片段抗体^[155, 156]。多肽作为高等机体内引起效应细胞(杀伤细胞)抗体形成的免疫原, 可能为疫苗开辟新的来源。

如果用作免疫原的合成多肽与蛋白(抗体)的片段相同, 该蛋白位于它的天然形态的表面上, 而且它的天然构象又能部分地被多肽(抗原)所适应, 那么就可以形成这种类型的抗体。

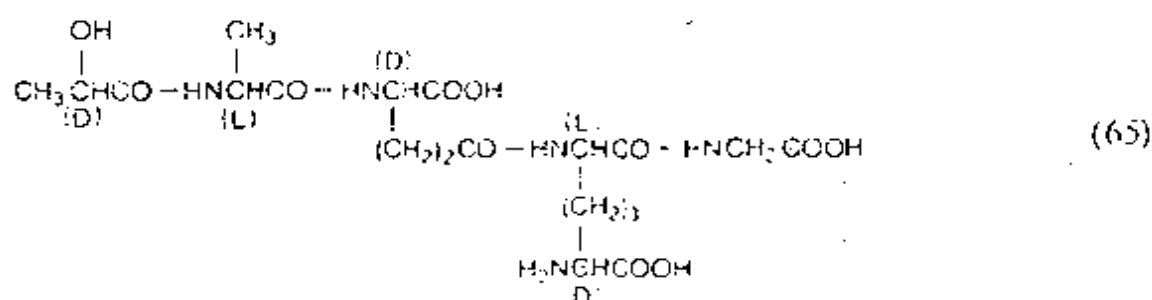
若形成的抗体防御病毒或毒素对机体的侵害, 就出现自动免疫。希望引起抗体形成的合成多肽将作为潜在的疫苗使用。多肽疫苗的将来的重要性是以这样一个事实为依据的: 人们能够取代失活的或活性衰减的微生物病原体或毒素, 这些病原体或毒素由于是高分子, 所以用高度专一的合成多肽难以定性或标准化。Em-ini 等^[157]已经合成了启动免疫系统的寡肽, 该寡肽具有抗脊髓灰质炎活性。多肽疫苗(63)和(64)的氨基酸序列来源于脊髓灰质炎病毒 VP₁ 蛋白。抗流感病毒可能成为合成多肽疫苗另一个主要兴奋点。

Tyr-Gly-Gly-Ser-Thr-Thr-Asn-Lys-Asp-Lys-Gly (63)

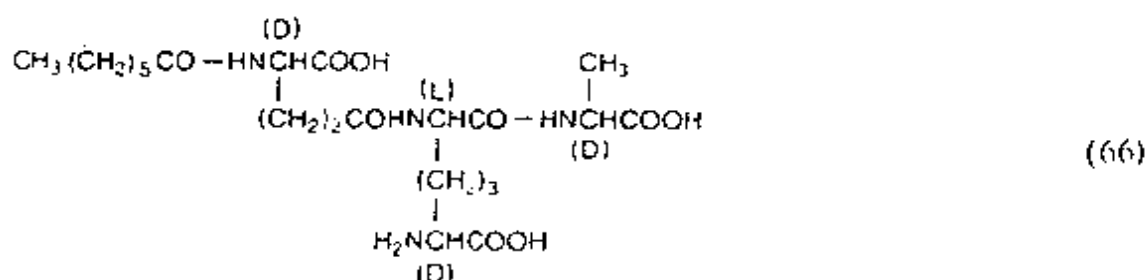
Tyr-Gly-Gly-Asp-Asn-Pro-Ala-Ser-Thr-Thr-Asn-Lys-Asp-Lys (64)

1. FK-156 和 FK-565

D-Lactoyl-*L*-alanyl- γ -*D*-glutamyl-(*L*)-meso-diaminopimelyl-(*L*)-glycine(FK-156) (65), 从 *Streptomyces olivaceogriseus*^[158] 中分离到, 然后被合成^[159], 是一种辅助活性和免疫激动肽^[160]。



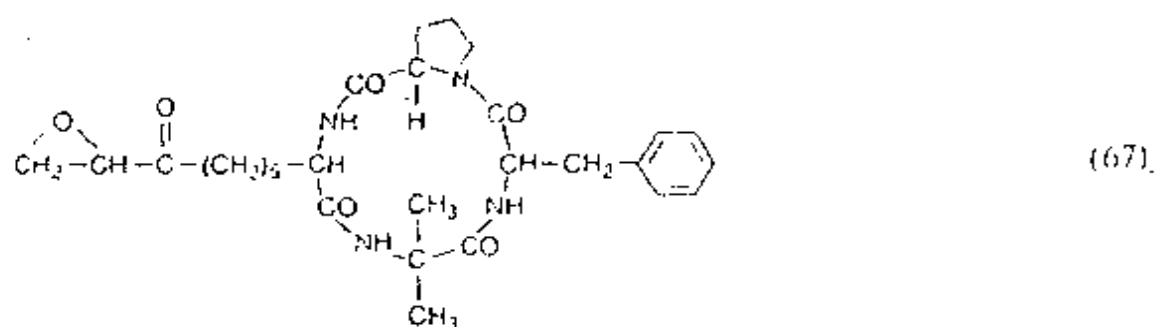
Heptanoyl- γ -*D*-glutamyl-(*L*)-meso-diaminopimelyl-(*D*)-alanine (FK-565) (66), 细菌细胞壁肽聚糖的脂肪酸衍生物, 以及 FK-156 的类似物^[161, 162], 当皮下和口服给药时都抑制肿瘤生成, 同时有效地抗细菌感染。



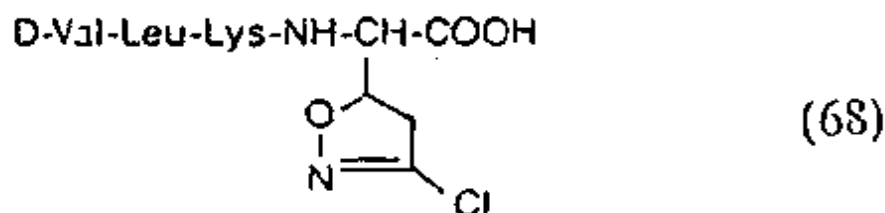
2. Chlamydocins 和 Peptidylacivicans

Chlamydocin (67) 是 1974 年 Clossé 等^[163] 从 *Diheterospora*

chlamydosporia 的培养肉汤中分离出来的环状四肽，在抑制老鼠细胞生长方面是放线菌素 D 抑制细胞活性的 100 倍。Rich 等^[164]已经合成了大量 Chlamydocin 衍生物。

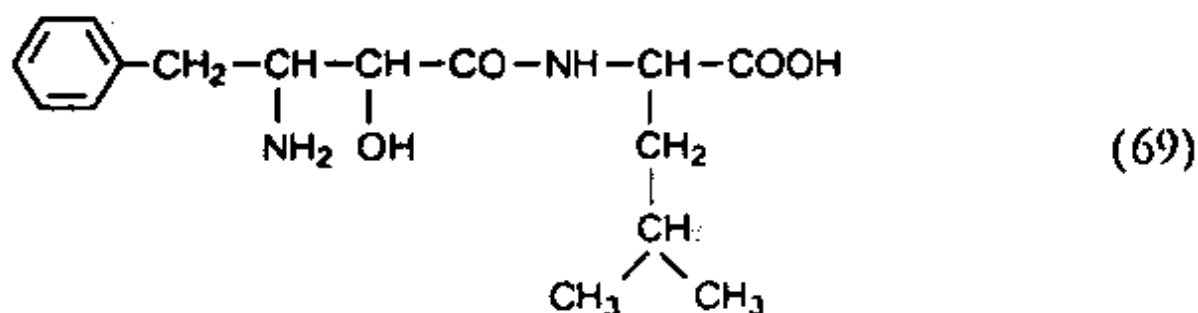


Chamydocin 的特征基本单位是 S-2-氨基-S-9,10-桥氧-8-氧代癸酸。Schmidt 等曾报道 Chlamydocin 和 epichlamydocin 的合成^[165]。癌治疗中的一个主要问题常常是抑制细胞的高毒性和抗恶性细胞的低选择性。使用 peptidylacivicins 通过抑制肿瘤酶仅仅活化肿瘤近邻发展前药是一种尝试。肿瘤细胞含有高水平的纤维蛋白溶酶活化因子，因而具有高的蛋白酶-纤维蛋白溶酶水平。按照 Katzenellenbogen 等的说法^[166]，借助于 AT-125 肽(68)的帮助，可以达到仅在癌细胞中的纤维蛋白溶酶活化前药的全部效应。



3. Bestatin

Bestatin (69), [(2*S*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-*L*-leucine, 既可以从 *Streptomyces olivoreticuli* 的培养液中得到^[167], 也可以合成^[168], 该化合物可用于治疗恶性皮肤癌。



十二、肾素-血管紧张素系统的多肽

1. 肾素-血管紧张素系统的蛋白水解连续效应^[169, 170]

由于肾素-血管紧张素系统被包括在血压调节之中, 所以遇到的抗高血压化合物也包括对该系统显示效应的多肽。图 5.10 描述了肾素-血管紧张素系统的机制。

当血压降低或交感神经兴奋时, 肾素即从近肾小球的肾细胞分泌。这种酶释放一种生物学非活性 10 肽, 血管紧张素 I。它是从产生于肝的肾素底物(血管紧张素原)释放的, 伴随着 Leu-Leu 或 Leu-Val 键断裂。在似乎存在于血浆中的肽基二肽水解酶(血管紧张素转化酶, ACE)的影响下, 通过脱去 C 端 His-Leu 二肽, 从血管紧张素 I 形成生物活性的血管紧张素 II (图 5.10)。血管紧张素

Ⅱ 具有收缩血管平滑肌的效应，是已知最强的缩血管物之一。

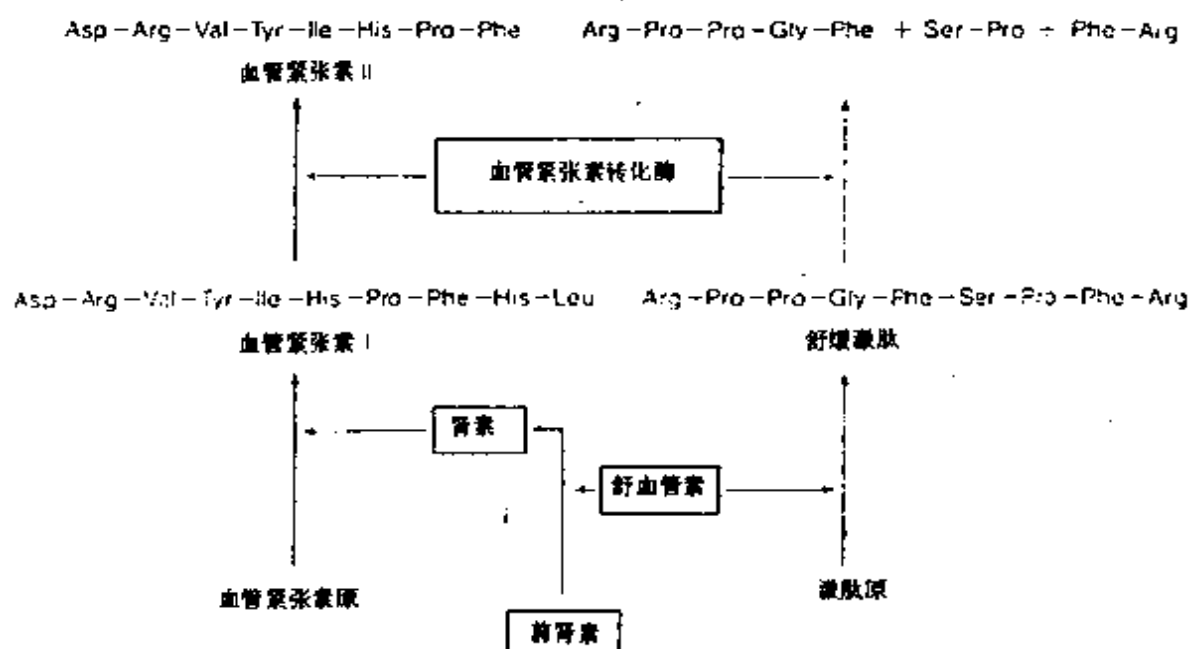
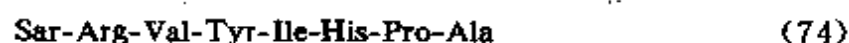
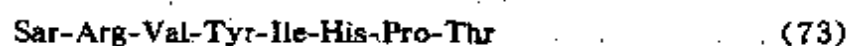
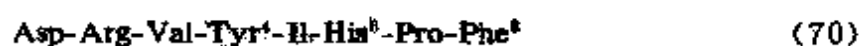


图 5.10 血管紧张肽原和激肽原的转化

2. 血管紧张素Ⅱ拮抗剂和 ACE 抑制剂

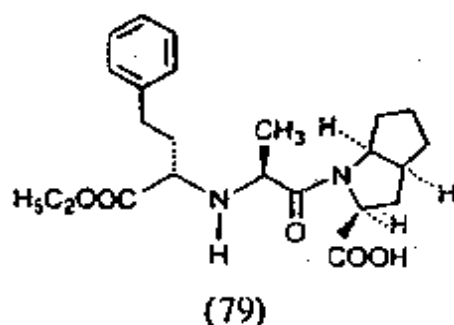
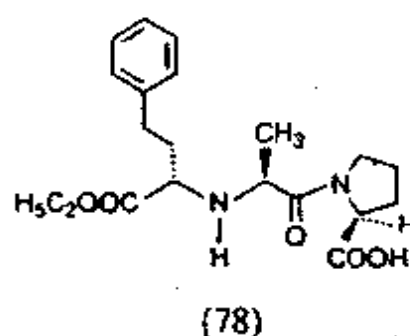
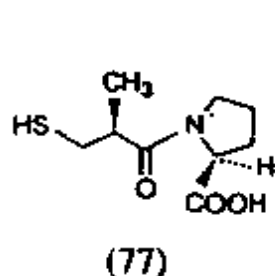
许多血管紧张素Ⅰ和Ⅱ的类似物(图 5.11)已经达到了对血管紧张素Ⅱ的抑制作用，依据构效关系，其中本质的功能被归结于 Phe⁸ 残基兴奋受体，虽然 Tyr⁴ 和 His⁶ 残基被认为在与受体结合时，是重要的。这些血管紧张素Ⅱ阻断剂(70—75)^[8,171-176]阻碍了肾素-血管紧张素系统的效应肽对靶器官的作用。

Saralasi (71)虽然有部分激动剂的效应，但在治疗高血压中被用作血管紧张素受体拮抗剂。化合物 71 的缺点是需要静脉给药及有效作用时间短。

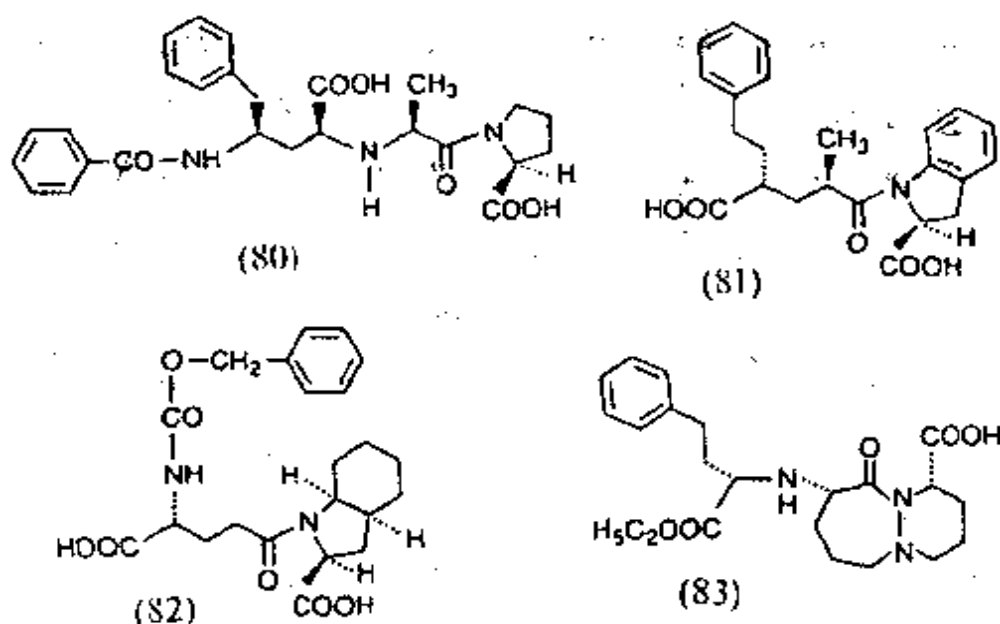


Teprotide BPP₉ (缓激肽-增效肽, 76) 及类似物 BPP 肽⁽¹⁷⁰⁾ 已经从蛇毒中分离到, 与 ACE 结合比血管紧张素 I 强得多。

转化酶(ACE)抑制剂⁽¹⁷⁴⁾ 似乎是阻止血管紧张素 I 的生成, 并用于治疗肾性和原发性高血压。口服活性的 ACE 抑制剂的例子有 (2S)-1-[(2S)-3-[N-(S)-mercapto-2-methylpropanoyl]] proline (captopril 77)⁽¹⁷⁰⁾, 1-[N-(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-alanyl-L-proline-1'-ethyl ester (Enalapril 78)⁽¹⁷⁷⁾ 及 2-[N-(S)-1-ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]-L-alanyl-(1S, 3S, 5S)-2-azabicyclo[3.3.0]octan-3-carboxylic acid (Hoe 498, 79)⁽¹⁷⁸⁾。



现在 captopril (capoten R) 在高血压治疗中是最常用的药物。从 1985 年以来, Enalapril (Xanef R) 作为 ACE 第二拮抗剂, 可以从市场上买到。发现了 Captopril 后使得研究工作开始涌向合成血管紧张素转化酶抑制剂。新的发展包括 Enalapril (80)⁽¹⁷⁹⁾ 的三肽类似物, 例如 81, 82 和 83⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾。



3. 肾素抑制剂

降血压的另一途径是(也经过肾素-血管紧张素系统)抑制肾素, 阻断血管紧张素原转化为血管紧张素 I。有两种不同类型的肾素抑制剂。

(1) 底物-类似物肾素抑制剂

作为高度专一的酸性肽酶, 肾素从十肽血管紧张素 I 底物, 血管紧张素原的 N 端切得血管紧张素 I (图 5.11)。

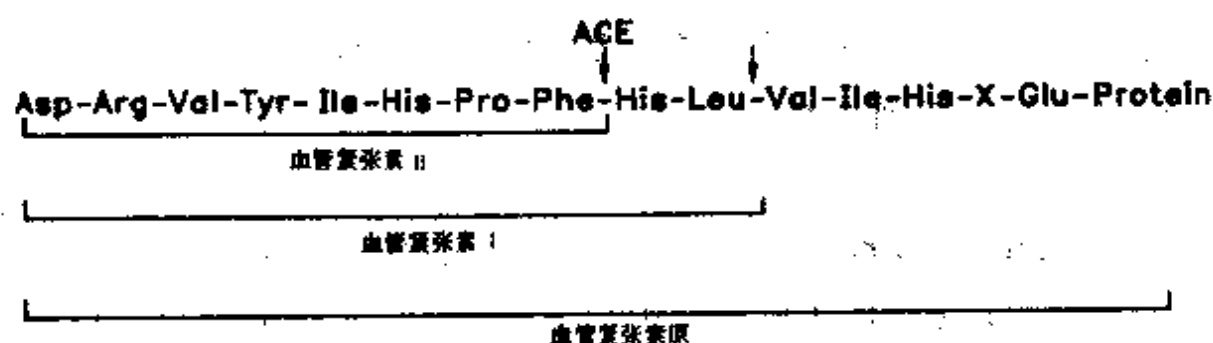


图 5.11 人血管紧张肽原分步酶解

(X=血管紧张肽原片段)

表 5.2 具有修饰肽键的肾素抑制剂(R=还原的肽键底物序列)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	人血浆
Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu	Leu	Val	Tyr	Ser	IC ₅₀ [M]K
										R				
						His	Pro	Phe	His	Leu-Leu	Val	Tyr		1x10 ⁻⁶
										R				
H-77						D-His	Pro	Phe	His	Leu-Leu	Val	Tyr		1x10 ⁻⁶
										R				
						His	Pro	Phe	His	Phe-Phe	Val	Tyr		5.2x10 ⁻⁷
										R				
						His	Pro	Phe	His	Leu-Val	Ile	His		1.9x10 ⁻⁷
										R				
						His	Pro	Phe	His	Leu-Val	Ile	Tyr		1x10 ⁻⁷
						Pro	His	Pro	Phe	His	Leu-Val	Ile	His	1.6x10 ⁻⁸
										R				
H-142						Pro	His	Pro	Phe	His	Leu-Val	Ile	His	1.0x10 ⁻⁸
Pepstatin								Iva	Val	Val	Sta-Ala	Sta		2.2x10 ⁻⁸

从人血管紧张素原的 N 端序列衍生化, 导致活性弱的肾素抑制剂^[183]。根据 Szelke 等^[184]的观点, 肽键修饰(-CH₂-NH-)的高活

性底物类似物，是通过还原 Leu-Leu 或 Phe-Phe 中的 CO-NH 键而生成的(表 5.2)。体外实验和志愿者的研究结果表明到目前为止最好的肾素抑制剂是 H-142。

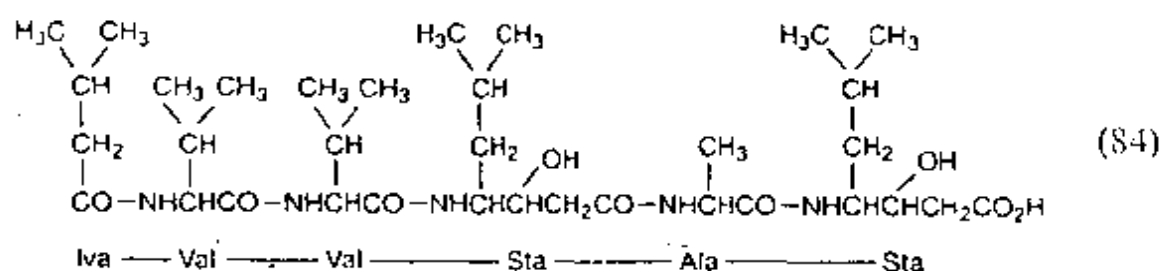
(2) 含 Statin 的肾素抑制剂

Pepstatin (84)是从放线菌中分离出来的，它含有不寻常的氨基酸 Statine(Sta)，该化合物抑制肾素和其它酸性肽酶。

表 5.3 含 Statine 的底物类似物对猪肾素的抑制作用

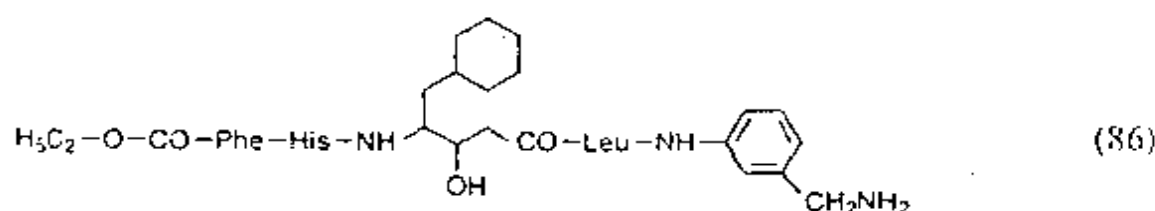
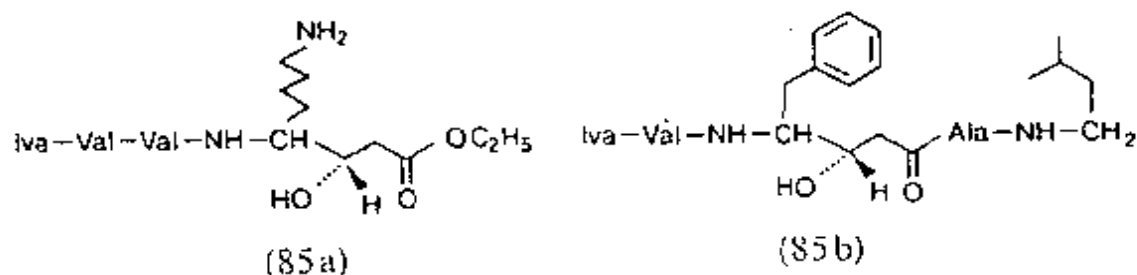
6	7	8	9	10	11	12	13	IC ₅₀ (M)
His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr								
His-Pro-Phe-His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								(5.5x10 ⁻⁸)
Iva-His-Pro-Phe-His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								2.0x10 ⁻⁸
Boc-His-Pro-Phe-His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								3.1x10 ⁻⁸
Sta—Leu—Phe-NH ₂								2.7x10 ⁻⁸
His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								2.0x10 ⁻⁸
Phe-His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								3.7x10 ⁻⁸
Pro-Phe-His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								1.3x10 ⁻⁸
Ibu-His-Pro-Phe-His-Sta-NH ₂								2.9x10 ⁻⁸
Ibu-His-Pro-Phe-His-Sta—Leu-NH ₂								6.7x10 ⁻⁷
Ibu-His-Pro-Phe-His-Sta—Leu—Phe-NH ₂								4.3x10 ⁻⁸
Ibu-His-Pro-Phe-His-Sta—Ala—Phe-NH ₂								5.7x10 ⁻⁸
Ibu-His-Pro-Phe-His-Sta—Val—Phe-NH ₂								1.2x10 ⁻⁷
Iva-His-Pro-Phe-His-Sta—Ile—Phe-NH ₂								1.3x10 ⁻⁷
Boc-His-Pro-Phe-His-Sta—Leu—Tyr-NH ₂								2.6x10 ⁻⁸
Boc-His-Pro-Phe-His-Sta—Leu—Phe-OCH ₃								1.1x10 ⁻⁸
Iva-His-Pro-Phe-His-Sta-Leu-Val-Phe-NH ₂								4.6x10 ⁻⁸

把 Leu¹⁰(血管紧张素原 N 端 10 位)换成 Sta, 即得到活性肾素抑制剂 (表 5.3)^{〔185-188〕}。假设在血管紧张素原的 Leu¹⁰-Val¹¹肽链酶解的期间, statine 对应着四面体中间体。



Val-His-Pro-Phe-His-Sta-Ile-Phe-NH₂ 是目前最好的含 statine 的肾素抑制剂。

按照 Rich 等的观点, 新蛋白酶抑制剂是通过用 (3*S*, 4*S*)-4, 8-二氨基-3-羟基辛酸(DAHOA, 85A)^{〔189〕}或 4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸(AHPPA, 85b)^{〔189〕}, 取代 pepstatin 衍生物中的 Statin 生成的。



L364210(86)及类似物,是高活性的肾素抑制剂,由于它们的极性和溶解度都得到改进,因而在体内作用时间长,稳定性高。它们已由美国 Merck 公司生产。

开发肾性高血压新药,不仅有科学意义,也有商业价值。

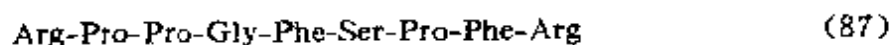
十三、血浆激肽

血浆激肽是血管舒缓素从血浆的 γ -球蛋白释放的组织激素。

1. 缓激肽和胰激肽

缓激肽(87)和胰激肽(赖氨酰缓激十肽),是分别通过胰蛋白酶和血管舒缓素从血浆中的激肽原上脱下来的(图 5.10),药理活性几乎没有差异。激肽最重要的作用是扩张外周血管,例如扩张肾中的血管,导致血流的改善,因而增加利尿。通过作用于血管紧张素 II 的形成,激肽能够对血压的调节产生贡献。而且激肽引起支气管收缩。

许多研究组报道了缓激肽类似物^[89], Boissonnas 等^[191]首先合成了缓激肽。



2. 速激肽

图 5.12 的活性物质称为速激肽^[192],与缓慢作用的激肽相反,它们对平滑肌显示快速的兴奋作用。这些化合物虽然结构相似,但来源不同。Eledosin 是 1949 年 Erspamer 在地中海足纲动物的唾液中发现的,它显示抗高血压活性,并用作致癌物。已经制备了大量的 Eledosin 类似物^[193-195]。

Physalaemin^[197, 198] 是 Erspamer 于 1964 年从美国的两栖动物的皮中分离到的, 具有强大的血管扩张作用和抗高血压作用。

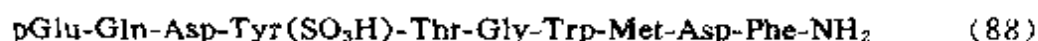
Pyr-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala	Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	Eledoisin
Pyr-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂		Physalaemin
Pyr-Ala-Asp-Pro-Lys-Thr-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂		[Lys ⁸ , Thr ⁸]Physalaemin
Pyr-Pro-Asp-Pro-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂		Uperolein
Pyr—Asn-Pro-Asn-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂		Phyllomedusin
Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂		Kassinin
Asp-Glu-Pro-Lys-Pro-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂		[Glu ² , Pro ⁶]Kassinin
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂		Substance P
Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂		Substance K

图 5.12 速激肽家族的一级结构

Uperolein, phyllomedusin 和 Kassinin 是 Anastasi^[199] 从蛙皮中分离到的, 它们与其它的速激肽广泛地相似。

从化学关系看, P 物质和 K 物质可以被看作是哺乳动物的速激肽。

蛙皮素(88)从澳大利亚树蛙(*Hyla caerulea*)皮的萃取物中分离到, 它比速激肽或 physalaemin 的抗高血压活性持续时间长。它引起胆囊和胆管收缩, 并刺激肠蠕动, Berardi 等^[200, 201] 已经合成了蛙皮素衍生物。



十四、心钠素(ANP 或 ANF)

1983 年 Bold 等^[202] 首次从鼠心肌的匀浆中分离到心房肽 ANP-(6-33), 并阐明了结构(图 5.13)。1984 年 Kangawa 等从人的心组织制备了纯的 α -人心钠素(6-33 Met17)^[203] 和含 126 个氨基

表中数据说明，N 端的 Arg 残基增加生物活性。Tyr^[33] 不是绝对必需，但 C 端的所有其它氨基酸都是必需的（见 AP I）。

从高分子量前体 (atriopeptigens) 衍生的 ANF 激素，具有利尿性质，鼠服用 ANF 增加利尿和利钠 (Arg-加压素的释放被抑制)，同时扩张血管，明显地是由于儿茶酚胺和血管紧张素 I 被抑制。已经表明，在体积负荷下，ANF 肽从心脏释放并作为激素在肾、血管和其它组织扩展它的效应。它们可以被看作是肾素-血管紧张素系统的功能拮抗剂。

在抗人类高血压疾病中，ANF 的抗高血压性质确实可以表示为新治疗的起点。

十五、甲状腺激素(降钙素)

降钙素(图 5. 14)为 N 端链内 23 圆环二硫桥式分子，由四个研究组独立地分离到，1968 年阐明了结构并合成。

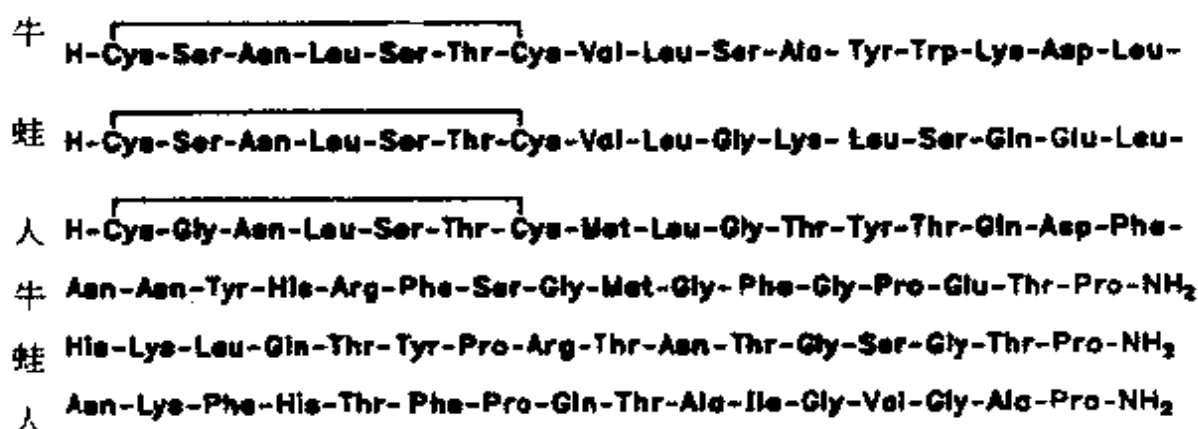


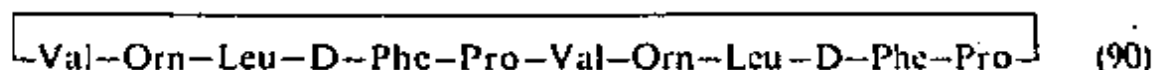
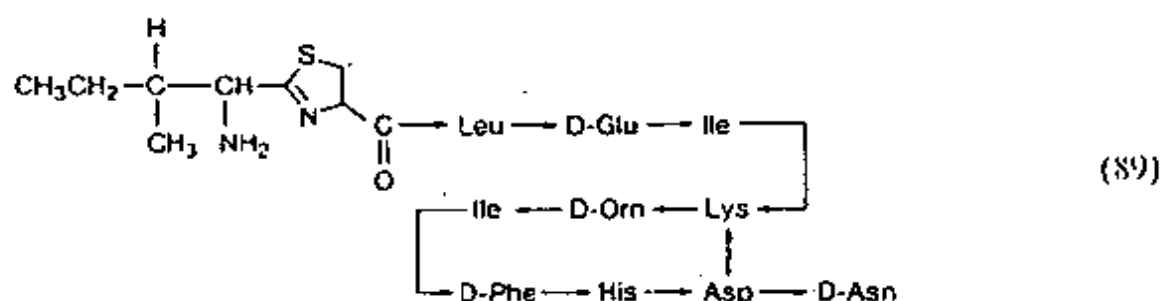
图 5. 14 各种来源降钙素的一级结构

降钙素通过刺激骨形成细胞引起磷酸钙在骨架上沉降，由此

降低血液中的钙和磷酸根的水平(血钙过低)。全合成的降钙素产品, 例如 salmcalcitonin^[208], elcitonin^[209] 和 [16-alanine]-salmcalcitonin^[210], 可用作治疗剂(骨萎缩)。

十六、肽类抗菌素

自从 40 年前发现杆菌肽(89)和 1946 年发现短杆菌肽(90)^[211]以来, 已经合成了数百种肽类抗菌素。它们抗格兰氏阳性细菌, 而对格兰氏阴性细菌无效。与青霉素及头孢菌素衍生物比较, 肽类抗菌素不是“主要抗菌素”成员。它们的作用机制不同, 例如抑制细胞壁的合成增加细胞壁的渗透性或影响核酸合成。*D*-氨基酸和其它不寻常的蛋白原氨基酸的存在, 是它们的特点。

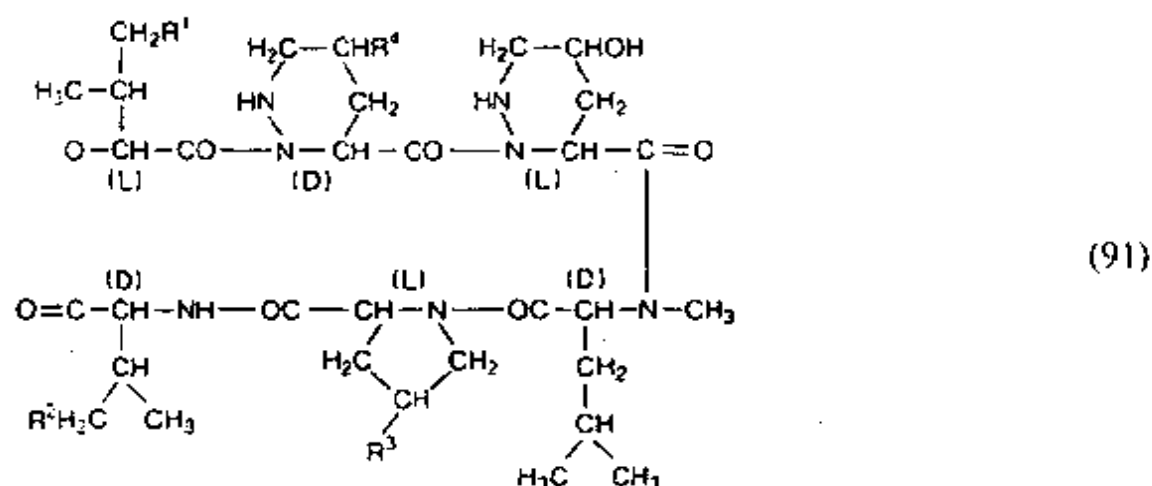


1. Monamycins

Monamycins(91)是 15 种六肽组成的家族, 作为离子电泳引起离子通过生物膜, 它具有六氢吡嗪-1-羧酸作为特征的基本单位, 并显示抗菌活性。

Hassall^[212]合成了环状的 hexadepsipeptides($R_1=R_2=R_4=H$, R_3

$=\text{CH}_3$), 它与 K^+ , Rb^+ 和 Cs^+ 形成强的络合物。



2. 磷肽^[213-215]

肽类抗菌素, 例如 (*S*)-丙氨酰(*R*)-氮乙基磷酸(alafosfalin) (92), 在肽链的 C 端具有氨基磷酸, 已经合成^[216]。Alafosfalin 抑制细菌细胞壁的合成, 对格兰氏阳性和阴性菌都有效。

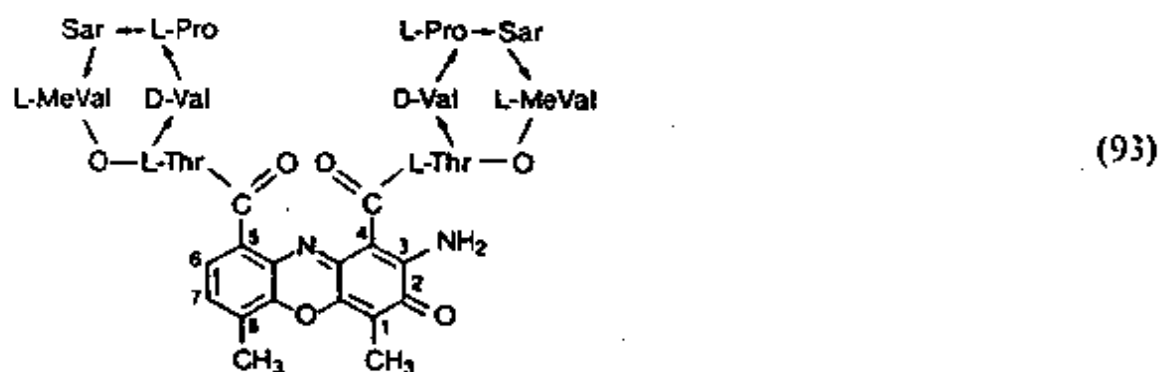


3. 放线菌素

放线菌素 D(93)是 1940 年从 *Streptomyces antibioticus* 中分离出来的, 属于色素多肽族, 特征是抑制肿瘤细胞生长和抗菌作用。

目前已经知道有 30 多种天然放线菌素和大量的合成品^[89, 217], 它们的结构都是由两个内脂五肽环与氨基酚恶嗪酮生

色团相连接。放线菌素因毒性高而在应用上受到限制。



4. 白霉素

白霉素 (desferriforms, 图 5. 15) 是从 *Streptomyces spec.* 菌株中分离得到的, 它的商品名为白霉素 WS 116, 它不仅是显示抗菌活性的核苷肽⁽²¹⁸⁾, 而且具有离子络合物的性质。

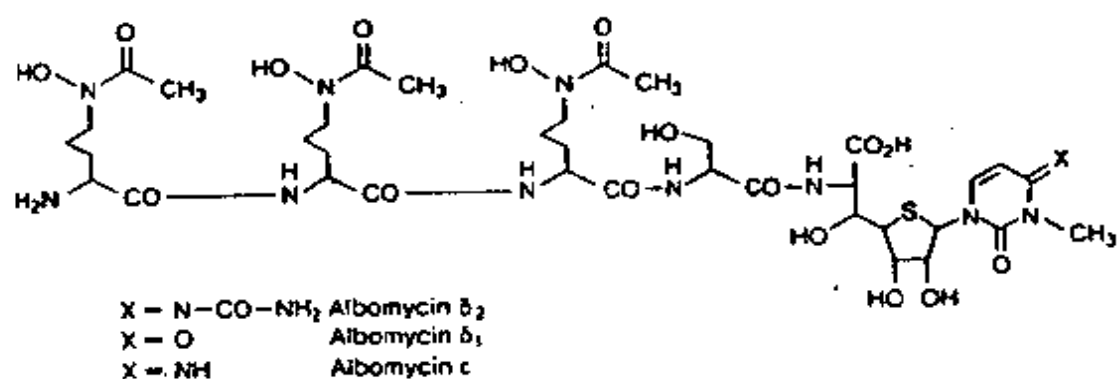


图 5. 15 白霉素

5. 乳酸链球菌肽

乳酸链球菌肽虽然 1952 年就从 *Streptococcus lactis* 培养肉汤中

分离出来了,但直到1970年^[219]阐明结构。1983年^[220]才合成了乳酸链球菌肽的部分序列(环A)。乳酸链球菌肽证实了自然界存在 α,β -不饱和氨基酸(Dha=去氢丙氨酸, Dhb= α 氨基去氢丁酸)。

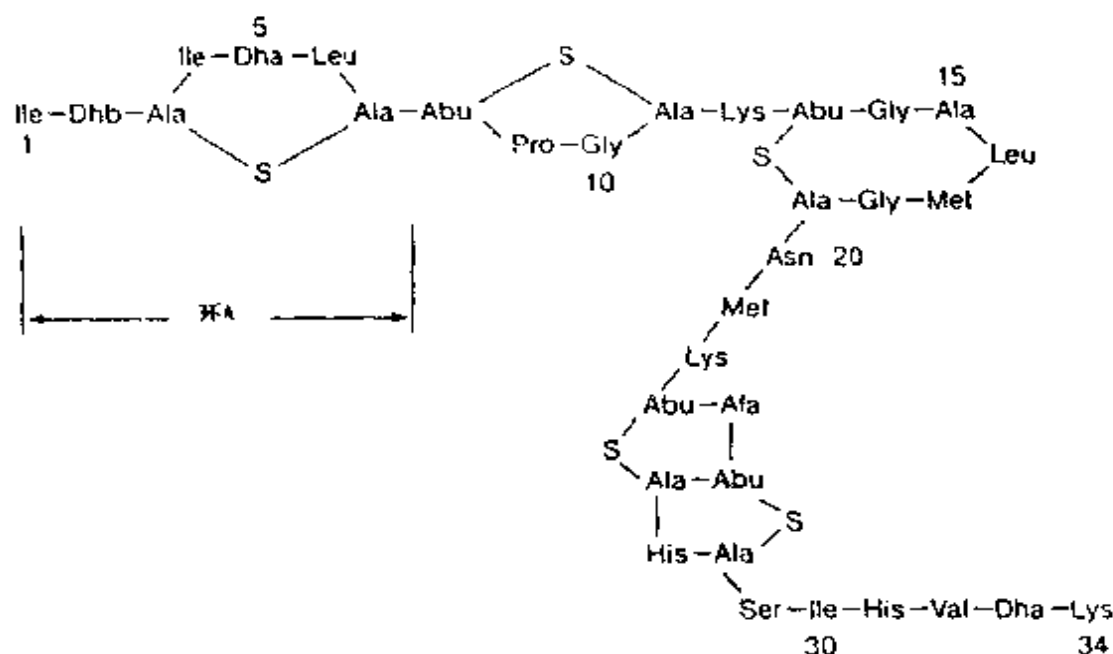
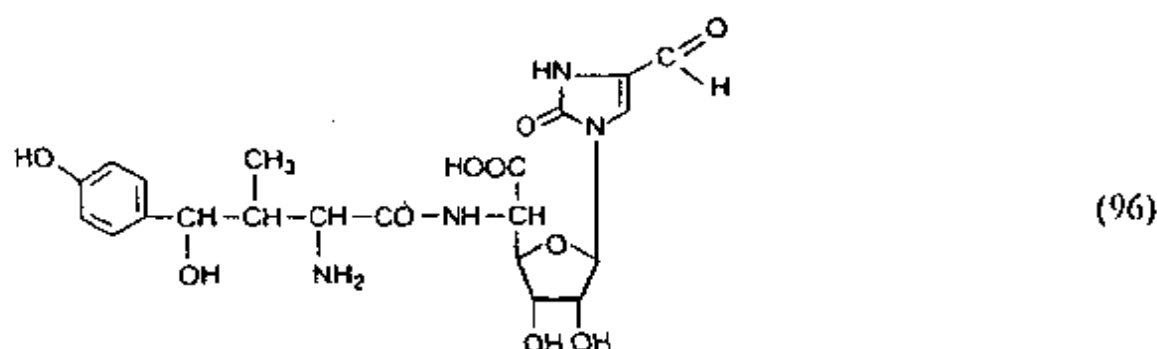
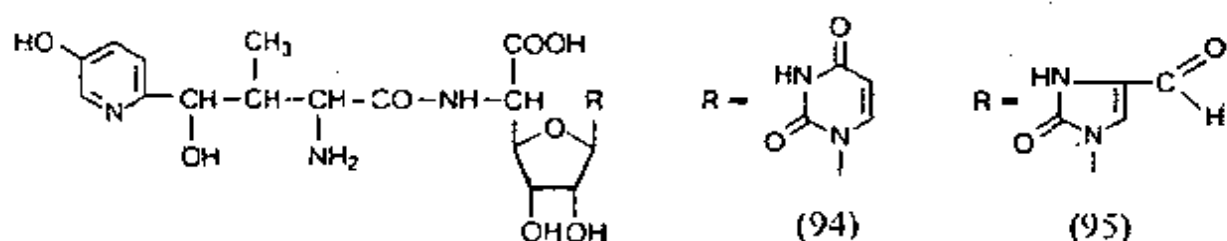


图 5.16 乳酸链球菌肽的氨基酸序列(Abu=2-氨基丁酸)

6. Nikkomycins(尼可霉素族)

Nikkomycins Z (94)和X (95)是从 *Streptomyces tendae*^[221]中分离到的核苷抗菌素,它们抑制聚乙酰胺基葡萄糖的合成,并具有杀真菌和杀昆虫作用。Konig 等^[222]等发表了一些核苷肽的结构解析和合成。

另外, Nikkomycin B (96)^[223], 其中N端氨基酸中的对羟基苯基代替了化合物95的3-羟基吡啶系统,96是从 *Streptomyces tendae* 的培养滤液中分离到的。

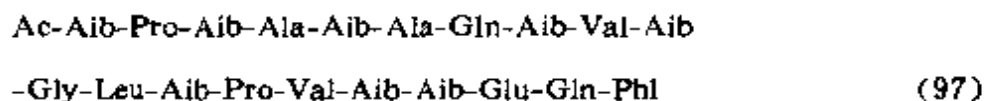


7. Cecropin A

Cecropin A 是昆虫由于缺乏淋巴细胞和免疫球蛋白，通过体液免疫反应生成的，具有广谱抗菌活性。Andreu 等^[225]用固相法合成了 Cecropin A 的类似物(图 5. 17)。

8. Alamethicins(丙甲菌素)

1970 年 Payne 等^[226]解析了亲脂性 eicosapeptide 丙甲菌素(97) (八个 α -氨基丁酸残基 = Aib, *L*-phenylalaninol = Phl)的 α -螺旋结构，该化合物是从真菌 *Trichoderma viride* 的培养液中分离出来的。两亲性多肽抗菌素的序列于 1985 年由 Jung 等^[227]通过全合成得到证实。



丙甲菌素显示抗菌、抗真菌、抑制细胞生长和溶血效应。丙甲菌素的最重要的性质是，在作为传导神经冲动的模型的脂质膜上，形成势能依赖的离子传导通道^[227]。

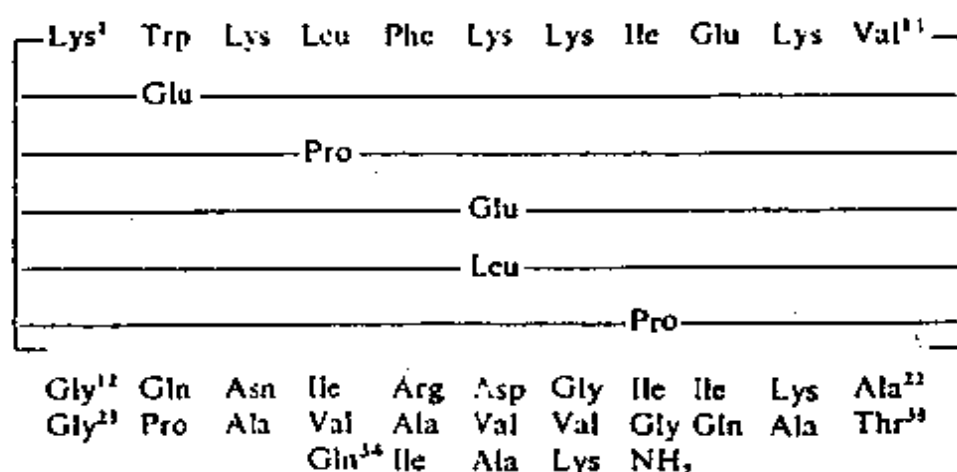


图 5.17 Cecropin A 类似物的氨基酸序列

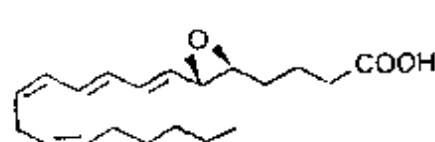
十七、Peptide Leukotrienes

Leukotriene LTC₄ (99)^[228] 是通过酶促法由 Leukotriene LTA₄ (98)形成的，后者是由花生四烯酸通过脂氧合酶的途径生成的。在由(98)生成(99)时，谷胱甘肽的硫醇基实施了亲核性进攻。

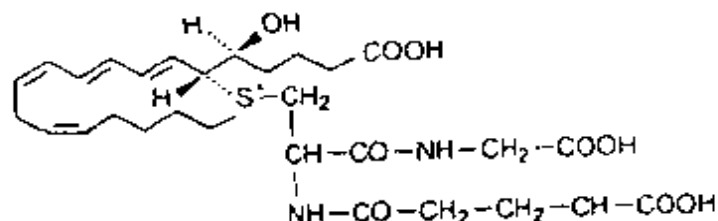
Corey 等^[229]合成的 LTC₄(慢反应物=SRS)在体内可转化为生物活性更强的 *S*-cysteine-glycylleukotriene LTD₄ (100) 或 *S*-cysteinylleukotriene LTE₄ (101)。该转化是在谷氨酰转肽酶(GGTP)的影响下完成的。

Peptide leukotrienes (99、100 和 101)可引起支气管平滑肌收缩，而且可能在应变反应中(例如气喘)和炎症中作为介质起重要

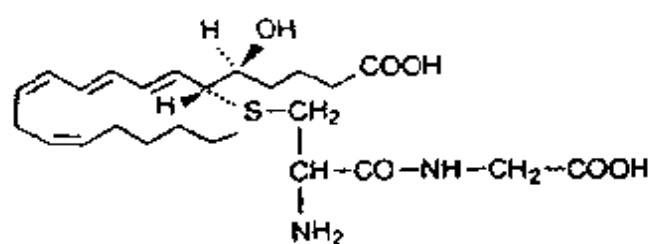
作用。使用组胺 H₁ 受体拮抗剂拮抗性地阻断 99、100 和 101 的 leukotriene 作用，因而将成为治疗应变症状的重要原则。已经合成了一系列选择性的 peptide leukotriene 拮抗剂，例如 4-*R*-hydroxy-5-*S*-cysteinylglycyl-6-*Z*-nonadecenoic acid (102)。



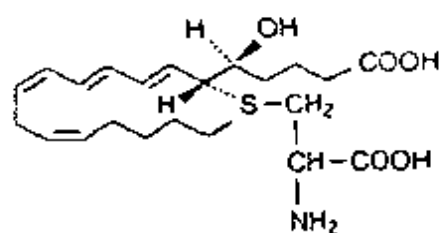
(98)



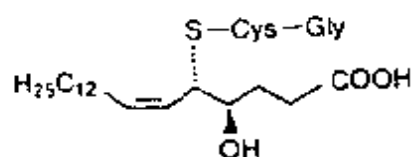
(99)



(100)



(101)



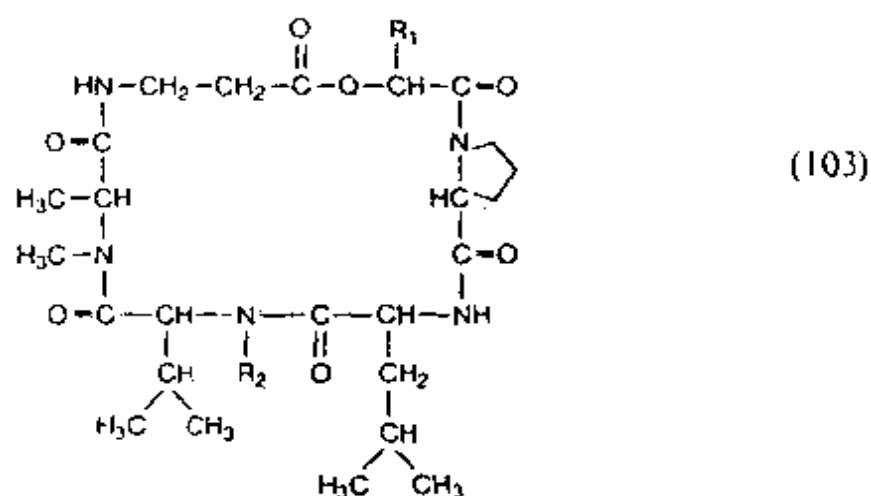
(102)

十八、肽类杀虫剂和除草剂

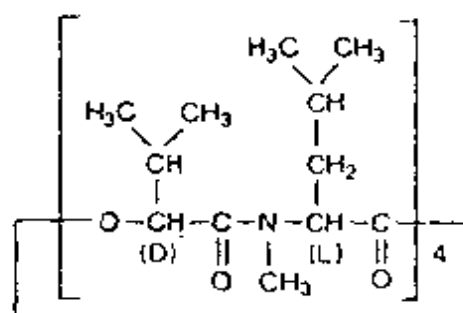
在环状的 depsipeptides destruxin C 以及 D (103) 和 bassianolid (104) (231) 中，它们含有 α -羟基异戊酸、*N*-甲基缬氨酸或 *N*-甲基亮氨酸，被用作杀虫剂。

Zahner 等 (215, 232) 从 *Streptomyces* 菌株的培养滤液中分离到的

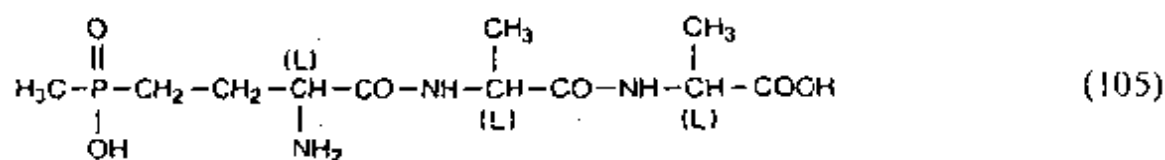
phosphinotricylalnine (105, bialaphos), 具有强的除草作用。



Destruxin	R ₁	R ₂
G	HO-CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -	H ₃ C-
D	H ₃ C-CH(COOH)-CH ₂ -	H ₃ C-



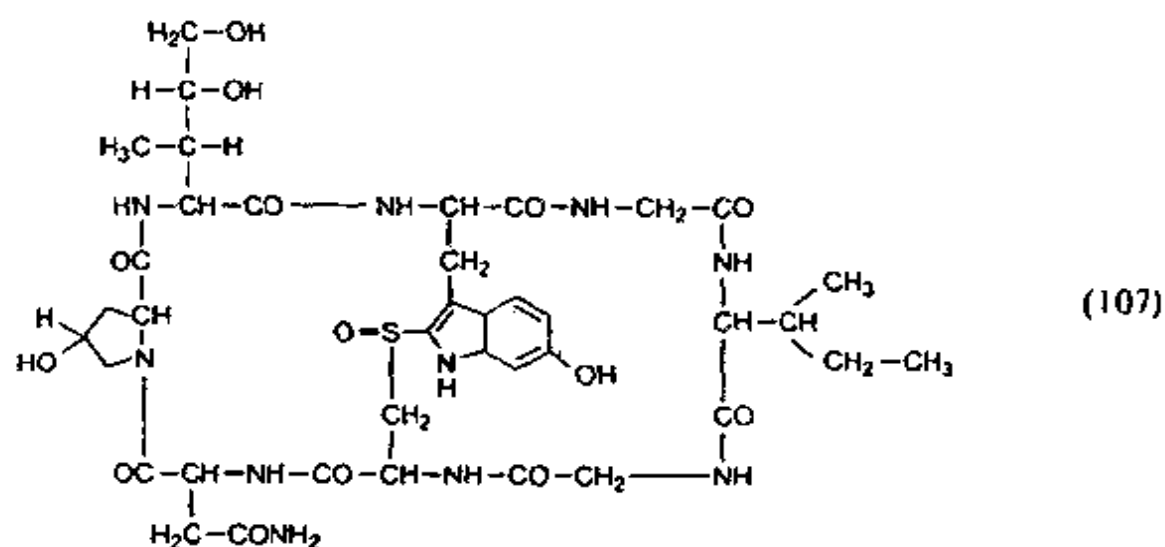
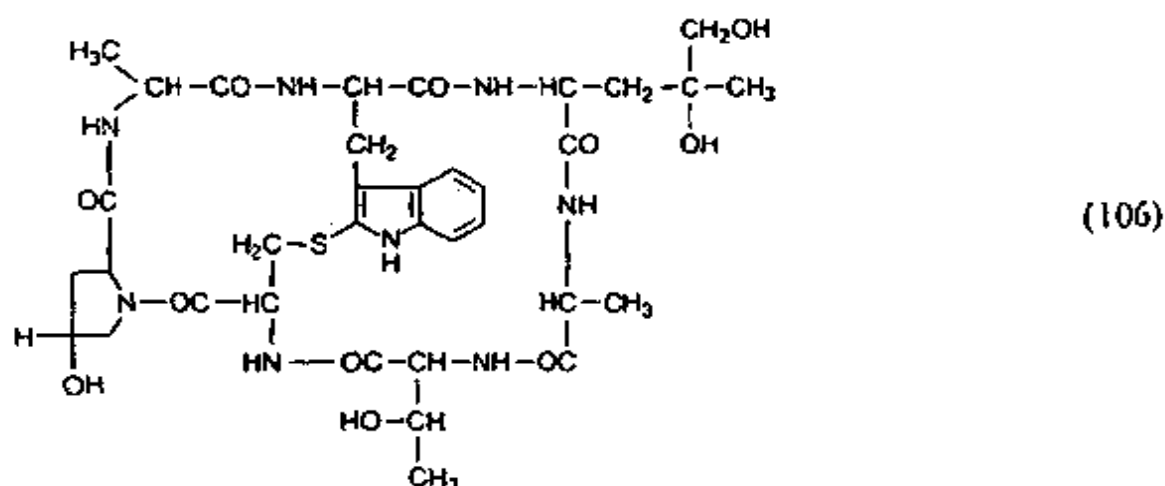
(104)



十九、毒肽

Phallotoxins (106, 如次毒蕈环肽) 和 Amatoxins (107, 如 α-蛾

膏菌素是由 *Amanita phalloide* 或死亡杯(death cup)产生的,包括在最有名的多肽毒素中^[233]。



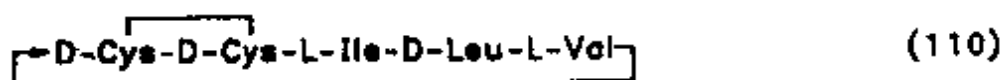
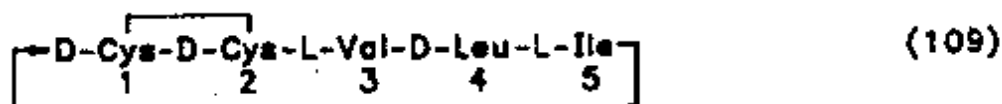
Amatoxins 是环八肽,仅由 *L*-氨基酸组成,含亚砷基而不是 Phallotoxin 中的硫醚桥。90%以上的蘑菇毒素的致命病例都可以追溯到 amatoxins。Wieland 等^[234]表明除毒素以外,死亡杯还含有低浓度的环十肽抗毒素 antamanide(108)。



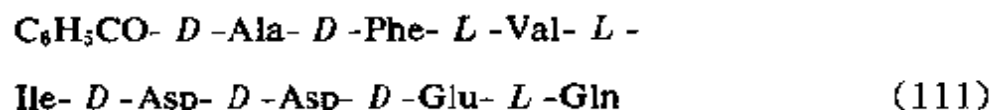
环状五肽致畸肽(109)是 *Aspergillus niger* 的代谢物,由 Bodan-

szky⁽²³⁵⁾阐明了结构,并于1973年合成出来。该化合物具有抗菌和抗真菌性能,并可以引起鼠和高等植物畸形。

天然产物致畸肽[Ile³, Val⁵](110)的异构体的序列作为别致畸肽于1982年由Bodanszky等⁽²³⁵⁾合成。

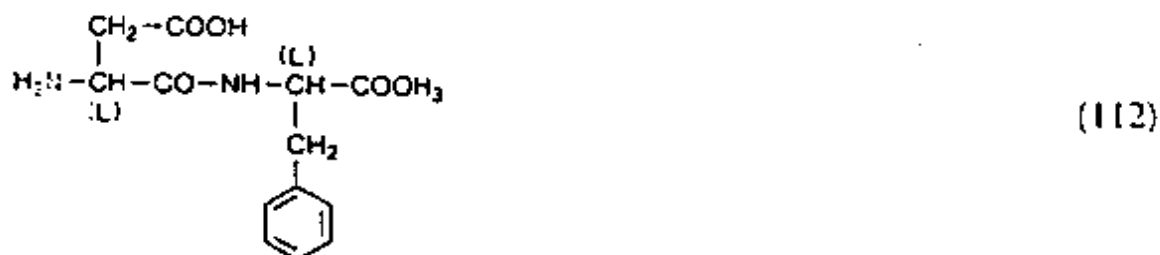


毒八肽 lophyrotomin (111) (LD₁₀₀ = 2mg/Kg) 是由澳大利亚叶蜂幼虫中分离到的,并于1983年由Williams等⁽²³⁶⁾确定了结构。Lophyrotomin 可以导致牛和羊致命中毒,伴随肌肉颤搐,拒食以及急性肝坏死。



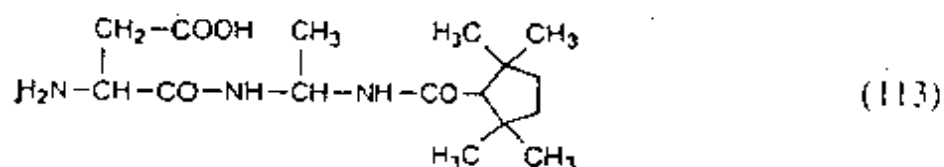
二十、甜肽和苦肽

在合成促胃液素的过程中, Schiatter 等⁽²³⁷⁾获得了附带的但极有意义的发现,即二肽 aspartyl-phenylalanine 甲酯(112)(天冬酰苯丙氨酸甲酯, aspartame)的甜味是蔗糖的100—200倍。aspartame



作为甜味剂，在美国极为畅销。

根据结构修饰，Goodman 等^[238]开发了 1, 1-二氨基链烷衍生物，例如化合物 (113)，作为新的甜肽族，它们的甜味是蔗糖的 800-1000 倍。



苦肽 BPl_a (114) 是 Okai 等^[239]从酪蛋白水解酶中分离到的，还有美味肽是从鱼蛋白中分离到的，毫无疑问它们在食品工业中将有实际的重要性。



二十一、结束语

本章的意图是想把 70 年代末到 90 年代初合成的、或从天然产物中分离出来的各种多肽描述出来，按照它们是如何生成的、以及在何处形成的、它们的转运、它们的细胞活性，把生物活性肽分成各种类型。在过去的一些年代里，生物活性多肽的数量急剧增加，这主要是由于多肽合成方法的改进而导致的，目前已知有 130 余种不同的偶联方法。

由于分析方法和分离方法的改进，在人、动物和蔬菜的器官中，也发现了新的有意义的多肽激素。例如放射免疫的开发为神经肽的研究首先开辟了道路。这样一来，Guillemin 和 Schanly 才有能力合成第一个下丘脑激素并确定了结构。在神经系统发现立体

专属性受体, 开拓并扩展了这种受体的内源性底物(内啡肽)的研究。或许我们还是仅仅处在神经肽(例如中枢活性肽)发展的起点, 还看不到它的终点。

采用 DNA 重组技术合成多肽已经有些年了。基因工程使高分子量多肽的合成可以大规模地进行, 这已经是事实。多肽药物压倒优势的临床应用和它们的诊断应用, 目前已经在窄小的限度内保持它们的市场潜力。由于血管紧张素 II 拮抗剂(例如 saralasin)和 ACE 抑制剂(例如 saptopril)的发现都使多肽化学在药物研究的长河之中具有重要性。不过, 在药物治疗中广泛引入活性多肽化合物, 则不得不等待到多肽药物发展到适合于以口服给药之时。

参 考 文 献

- [1] Wunsch, E., 1974, *Synthese von Peptiden*, Houben — Weyl, Georg Thieme, Stuttgart, Bd. 15(1 & 2).
- [2] Schroder, E., and Lubke, K., 1965, *The Peptides I*, Academic Press, New York; Schroder, E., Lubke, K. Kloss, G., 1975, *Peptide und Proteine I und II*, Georg Thieme, Stuttgart.
- [3] Gross, E., and Meienhofer, J., 1979, *The Peptides*, Academic Press, New York, Vol. 1; Gross, E., and Meienhofer, J., 1980, *The Peptides*, Academic Press, New York, Vol. 2; Gross, E., and Meienhofer, J., 1981, *The Peptides*, Academic Press, New York, Vol. 3.
- [4] Finn, F. M., and Hofmann, K., 1976, *The Proteins*, ed. Neurath, H., and Hill, R. L., Academic Press, New York, Vol. II, 105.
- [5] Jakubke, H.-D., and Jeschkeit, H., 1982, *Aminosäuren, Peptide, Protein*, Verlag Chemie, Weinheim.
- [6] Blaha, K., 1976, *Amino Acids, Peptides and Related Compounds, International Review of Science*, ed. Rydon, H. N., Butterworths, London, Vol. 6, 73; Wade, R., 1976.

- Amino Acids, Peptides and Related Compounds, International Review of Science*, ed. Rydon, H. N., Butterworths, London, Vol. 6, 97; Wieland, T., and Birr, C., 1976, *Amino Acids, Peptides and Related Compounds, International Review of Science*, ed. Rydon, H. N., Butterworths, London, Vol. 6, 183.
- [7] Stammer, C. H., 1976, *Amino Acids, Peptides and Related Compounds, MTP International Review of Science*, ed. Hey, D. H., and John, D. I., Butterworths, London, Vol. 6, 135; Wade, R., 1976, *Amino Acids, Peptides and Related Compounds, MTP International Review of Science*, ed. Hey, D. H., and John, D. I., Butterworths, London, Vol. 6, 161.
- [8] Bodanzsky, M., 1984, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin; Bodanzsky, M., and Bodanzsky, A., 1982, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin.
- [9] Erickson, B. W., and Merrifield, R. B., 1976, *The Proteins*, ed. Neurath, H., and Hill, R. L., Academic Press, New York, Vol. I, 225; Barany, G., and Merrifield, T. B., 1980, *The Peptides*, ed. Gross, E., Meienhofer, J., Academic Press, New York, Vol. 2, 1.
- [10] Birr, C., 1978, *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin.
- [11] Pillai, V. N. R., and Moutter, M., 1982, *Topics in Current Chemistry*, ed. Boschke, F. L., Springer Verlag, Berlin, 119; Atherton, E., Logan, C. J., and Sheppard, R. C., 1981, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 538; Sheppard, R. C., 1983, *Chemistry in Britain* 19, 402.
- [12] Mutter, M., Hagenmaier, H. and Bayer, E., 1971, *Angew. Chemie.*, 83, 883; Mutter, M., and Bayer, E., 1980, *The Peptides*, ed. Gross, E., and Meienhofer, J., Academic Press, New York, Vol. 2, 285.
- [13] Jakubke, H. D.; Kuhl, P., and Konnecke, A., 1985, *Angew. Chem.*, 87, 79.
- [14] Kuhl, P., Zapevalova, N. P., Konnecke, A., and Jakubke, H. D., 1983, *Monatsh. Chem.*, 114, 343.
- [15] Kallmann, W., 1982, *J. Org. Chem.*, 47, 5300.
- [16] Chaiken, I. M., Komoriya, A., Ohno, M., and Widmer, F., 1982, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 7, 385.

- [17] Davies, J. E. , and Gassen, H. G. , 1983, *Angew. Chem.* , **95**, 26.
- [18] Wengenmayer, F. , 1983, *Angew. Chem.* , **95**, 874.
- [19] Spatola, A. F. , 1983, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. Weinstein, B. , Dekker, New York, Vol. 7, 267.
- [20] Goodman, M. , and Chorev, M. , 1981, *Perspective in Peptide Chemistry*, ed. Eberle, A. , Geiger, R. , and Weiland, T. , S. Karger, Basel, 283.
- [21] Schrodter, E. , Rufer, C. , and Schmiechen, R. , 1982, *Pharmazeutische Chemie.* , Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 468.
- [22] Greven, H. M. , and de Wied, D. , 1981, *Perspective in Peptide Chemistry*, ed. Eberle, A. , Geiger, R. , and Weiland, T. , S. Karger, Basel, 356.
- [23] Tregear, G. W. , Niall, H. D. , Potts, J. T. , Leemann, S. E. , and Chang, M. M. , 1971, *Nature, New Biol.* , **232**, 87.
- [24] Niedrich, H. , Ochme, P. , Mehli, B. , Bienert, M. , Bergmann, J. and Berger, H. , 1981, *Perspective in Peptide Chemistry*, ed. Eberle, A. , Geiger, R. , and Weiland, T. , S. Karger, Basel, 344.
- [25] Caranikas, S. , Mizrahi, J. , Escher, E. , and Regoli D. , 1982, *J. Med. Chem.* , **25**, 1313.
- [26] Chorev, M. , Rubini, E. , Gilon, C. , Wormser, U. , and Selinger, Z. , 1983, *J. Med. Chem.* , **26**, 129.
- [27] Pessi, A. , Pinotti, M. , Verdini, A. S. , and Viscomi , G. C. , 1983, *J. Chem. Soc. Commun.* , 195.
- [28] Munekata, E. , Okada, M. , Kimura, S. , Sugita, Y. , Karazawa, I. , and Matsudo, T. , and Otsuka, M. , 1984, *Chem. Lett.* , 1013.
- [29] Carraway, R. , and Leeman, S. E. , 1973, *J. Biol. Chem.* , **248**, 6854; Carraway, R. , and Leeman, S. E. , 1975, *J. Biol. Chem.* , **250**, 1907.
- [30] St-Pierre, S. , Lalonde, J. -M. , Gendreau, M. , Quirion, R. , Regoli, D. , and Rioux, F. , 1981, *J. Med. Chem.* , **24**, 370.
- [31] Hughes, J. , Smith, T. W. , Kosterlitz, H. W. , Fothergill, L. A. , Morgan, B. A. , and Morris, H. R. , 1975, *Nature* , **258**, 577.
- [32] Blake, J. , Tseng, L. -F. , Chang, W. -C. , and Li, C. H. , 1978, *Int. J. Peptide*

Protein Res. , 11, 323.

- [33] Yamashiro, D. , Westphal, M. , Holy, K. , and Li, C. H. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , 21, 389.
- [34] Shimohiagashi, Y. , and Stammer, C. H. , 1983, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* , 1, 803.
- [35] Deeks, T. , Crooks, P. A. , and Waigh, R. D. , 1983, *J. Med. Chem.* , 26, 762.
- [36] Fauchere, J. -L. , Pfenninger, S. , Do, K. Q. , Lemieux, C. , and Schiller, P. W. , 1983, *Helv. Chim. Acta*, 66, 1053.
- [37] Shimohiagashi, Y. , Dunning, jr. J. W. , Kolar, A. J. , and Stammer, C. H. , 1975, *Int. J. Peptide Protein Res.* 21, 202.
- [38] Pless, J. , Bauer, W. , Cardinaux, F. , Closse, A. , Hauser, D. , Huguenin, R. , Roemer, D. , Buescher, H. -H. , and Hill, R. C. , 1979, *Helv. Chim. Acta*, 62, 398.
- [39] Peterman, C. , and Fauchere, J. -L. , 1983, *Helv. Chim. Acta*, 66, 1513.
- [40] Richman, S. J. , Goodman, M. , Nguyen, T. M. - D. , and Schiller, P. W. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 648.
- [41] Gesellchen, P. D. , and Shuman, R. T. , 1980, *Brit. -Pat.* , 2065 132 (E. Lilly).
- [42] Shuman, R. T. , 1981, *Brit. -Pat.* , 2065 135 (E. Lilly).
- [43] Mazur, R. H. , Tyner, D. A. , and Hallinan, E. A. , 1982, EP 0 081 838 (C. D. Searle & Co.).
- [44] Morley, J. S. , 1982, EP 0 083 849 (ICI Ltd).
- [45] Wilkinson, S. , Wrigglesworth, R. , and Hardy, G. W. , 1982, EP 0 075 334 (The Wellcome Foundation Ltd.) ; Schwartz, J. -C. , Costentin, J. , and Lecomte, J. - M. , 1985, *Trends in Pharmacological Sciences*, 6, 472.
- [46] Llorens, C. , Gilles, G. , Swerts, J. -P. , Perdrisot, R. , Fournie-Zaluski, M. -C. , Schwartz, J. -C. , and Roques , B. P. , 1980, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 96, 1710.
- [47] Benovitz, D. E. , and Spatola, A. F. , 1985, *Peptides*, 6, 648.
- [48] Evans, D. A. , and Mathre, D. J. , 1985, *J. Org. Chem.* , 50, 1830.
- [49] Chang, K. -J. , Kiljian, A. , Hazum, E. , and Cuatrecasas, P. , 1981, *Science*.

212, 75.

- [50] Goldstein, A. , Tachibana, S. , Lowney, L. L. , Hunkapiller, M. , and Hood, L. . 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6666.
- [51] Li, C. H. , Yamashiro, D. , Ferrara, P. , Tseng, L. —F. , and Way, E. L. . 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **21**, 331.
- [52] Montecucchi, P. C. , DeCastiglione, R. , and Erspamer, V. , 1981, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **17**, 316.
- [53] Yamashiro, D. , Nicolas, P. and Li, C. H. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **21**, 219.
- [54] Salvadori, S. , Marastoni, M. , Balboni, G. P. , Sarto, G. P. , and Tomatis, R. , 1985, *J. Med. Chem.* , **28**, 769.
- [55] Takagi, H. , Shiomu, H. , Ueda, H. , and Amano, H. , 1979, *Nature* , **282**, 410.
- [56] Takagi, H. , Shiomu, H. , Fukui, K. , Hayashi, K. , Kiso, Y. , and Kitagawa, K. , 1982, *Life Sci.* , **31**, 1733.
- [57] Kitagawa, K. , Kawai, N. , Kiso, Y. , Akita, T. , Fukui, K. , Amano, H. , and Takagi, H. , 1983, *Chem. Pharm. Bull.* , **31**, 2349; Kitagawa, K. , Kawai, N. , Kiso, Y. , Akita, T. , Kiso, Y. , Ueda, H. , Ming, G. , and Takagi, H. , 1985, *Chem. Pharm. Bull.* , **33**, 377.
- [58] Schonenberger, G. A. , and Monnier, M. , 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **74**, 1282.
- [59] Mikhaleva, I. , Sargsyan, A. , and Ivanov, V. , 1982, *Proc. of the 17th Eur. Peptide Symp.* , 563.
- [60] Schmidt, G. , 1972, *Pharmazie in unserer Zeit* , 181.
- [61] Boler, J. , Enzmann, F. , Folkers, K. , Bowers, C. Y. , and Schally, A. V. , 1969, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **37**, 705.
- [62] Burgus, R. , Dunn, T. F. , Desiderio, D. , Ward, D. , Vale, W. , and Guillemin, R. , 1970, *Nature* , **226**, 321.
- [63] Rivier, J. , Vale, W. , Monahan, M. , Ling, N. , and Burgus, R. , 1972, *J. Med. Chem.* , **15**, 479.
- [64] Wissmann, H. , Konig, W. , and Geiger, R. , 1972, DE 2 033 600 (Hoechst AG).

- [65] Fujino, M. , Nishimura, O. , Nagawa, Y. , and Fukuda, N. , 1977, DOS 2 712 086 (Takeda).
- [66] Folkers, K. and Enzmann, F. H. , 1973, US-Pat. 3 746 697 (Austin, USA).
- [67] Schally, A. W. , Arimura, A. , Baba, Y. , Nair, R. M. G. , Matsuo, H. , Redding, T. W. , Debeljuk, L. , and White , W. F. , 1971, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **43**, 393.
- [68] Konig, W. , Geiger, R. , and Sandow, J. K. , 1980, EP 0 041 243 (Hoechst AG); Konig, W. , Teetz, V. , Jager , G. , and Geiger, R. , 1980, DE 2 905 502 (Hoechst AG).
- [69] Konig, W. , Geiger, R. , and Sandow, J. , 1974, DOS 2 438 350 (Hoechst AG).
- [70] Karcher, H. L. , 1984, *Selecta*, **43**, 3548.
- [71] Coy, D. H. , Vilchez-Martinez, J. A. , Coy, E. J. , and Schally, A. V. , 1976, *J. Med. Chem.* , **19**, 423; Gendrich, R. L. , Rippel, R. H. , and Seely, J. H. , 1977, US—Pat. 4 005 063 (Abbott Lab.).
- [72] Nestor, J. J. , Jones, G. H. , and Vickery, B. H. , 1980, DE 3 021 736 (Syntex, USA).
- [73] Nutt, R. F. , 1982, EP 0 070 021 (Merck, USA)
- [74] Nutt, R. F. , Veber, D. F. , Curley, P. E. , Saperstein, R. , and Hirschmann, R. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* **21**, 66.
- [75] Veber, D. F. , Holly, F. W. , Strachan, R. G. , Paleveda, W. J. , Nutt, R. F. , and Hirschmann, R. , 1979, US-Pat. 4 161 521 (Merck, USA).
- [76] Kamber, B. , 1982, EP 0 083 305 (Ciba-Geigy).
- [77] Sarantakis, D. , 1978, US-Pat. 4 093 609 (American Home).
- [78] Freidinger, R. M. , Colton, C. D. , Perlow, D. S. , Whitter, W. L. , Paleveda, W. J. , and Veber, D. F. , 1983, *Proc. of the 8th Amer. Peptide Symp.* , Tucson, 349.
- [79] Veber, D. F. , and Nutt, R. F. , 1980, US-Pat. 4 191 754 (Merck, USA); Freidinger, R. M. , and Veber, D. F. , 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* , **101**, 6129.
- [80] Wynants, C. , van Binst, G. , and Loosli, H. R. , 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **25**, 608; Lamberts, S. W. J. , Uitterlinden, P. , Verschoor, L. , van Don-

- gen, K. J. , and del Pozo, E. , 1985, *New Engl. J. Med.* , **313**, 1576.
- [81] Vale, W. , Spiess, J. , Rivier, C. , and Rivier, J. , 1981, *Science* , **213**, 1394.
- [82] Morell, J. L. , and Brown, J. H. , 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **28**, 49.
- [83] Schally, A. V. , Redding, T. W. , Chang R. C. C. , Arimura, A. , Huang, W. Y. , Coy, D. H. , Méyers, C. A. , Pedroza, E. , Kastin, A. J. , and Turkelson, C. , 1980, *Polypeptide Hormones*, ed. Beers, R. F. , and Bassett , E. G. , Ravens Press, New York, 169.
- [84] Guillemin, R. , Brazeau, P. , Bohlen, P. , Esch, F. , Ling, N. , and Wehrenberg, W. B. , 1982, *Science* , **218**, 585.
- [85] Rivier, J. , Spiess, J. , Thorner, M. , and Vale, W. , 1982, *Nature* , **300**, 276.
- [86] Fujii, N. , Shimokura, M. , Nomizu, M. , Yajima, H. , Shono, F. , Tsuda, M. , and Yoshitake, A. , 1984, *Chem. Pharm. Bull.* , **32**, 520; Fujii, N. , Lee, W. , Shimoruka, M. , and Yajima, H. , 1984, *Chem. Pharm. Bull.* , **32**, 739.
- [87] Li, C. H. , and Yamashiro, D. , 1970, *J. Amer. Chem. Soc.* , **92**, 7608; Blake, J. , and Li, C. H. , 1975, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **7**, 495; Blake, J. , and Li, C. H. , 1978, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **11**, 323.
- [88] Kappeler, H. , and Schwyzler, R. , 1961, *Helv. Chim. Acta* , **44**, 1136.
- [89] Schroder, E. , and Lubke, K. , 1966, *The Peptides II* , Academic Press, New York.
- [90] Schwyzler, R. , and Sieber, P. , 1963, *Helv. Chim. Acta* , **46**, 134.
- [91] du Vigneaud, V. , Ressler, C. , Swan, J. M. , Roberts , C. W. , Katsoyannis, P. G. , and Gordon, S. , 1953, *J. Amer. Chem. Soc.* , **75**, 4879; Katsoyannis, P. G. , Gish, D. T. , and du Vigneaud, V. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , **79**, 4516.
- [92] Zaoral, M. , Vavra, I. , Machova, A. , and Sorm, F. , 1967, DOS 1 643 273 (Czechoslovenska akademie Prag).
- [93] Vinik, F. J. , and Jung, S. , 1983, *J. Org. Chem.* , **48**, 392.
- [94] Josefsson, L. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **21**, 459.
- [95] Ferrero, P. , Guidotti, A. , Conti-Tronconi, B. , and Costa, E. , 1984, *Neuropharmacology* , **23**, 1359.
- [96] Jorpes, J. E. , and Mutt, V. , 1961, *Acta Chem. Scand.* , **15**, 1790.
- [97] Bodanszky, M. , Ondetti, M. A. , Levine, S. D. , and Williams, N. J. , 1967, *J.*

Amer. Chem. Soc. , **89** , 6753.

- [98] Ondetti, M. A. , Narayanan, V. L. , von Saltza, M. , Shachan, J. T. , Sabo, E. F. , and Bodanszky, M. , 1968, *J. Amer. Chem. Soc.* , **90** , 4711.
- [99] Wunsch, E. , and Wendlberger, G. , 1972, *Chem. Ber.* , **105** , 2508.
- [100] Uehiyama, M. , Sato, T. , Yoshino, H. , Tsuchiya, Y. , Tsuda, T. , Konishi, M. , Tsujii, M. , Hisatake, Y. , and Koiwa, A. , 1985, *Chem. Pharm. Bull.* , **33** , 1990.
- [101] Staub, A. , Sinn, L. G. , and Behrens, O. K. , 1953, *Science* , **117** , 628.
- [102] Bromer, W. W. , Sinn, L. G. , Staub, A. , and Behrens, O. K. , 1957, *J. Amer. Chem. Soc.* , **79** , 2798.
- [103] Wunsch, E. , 1967, *Z. Naturforschg.* , **22b** , 1269; Wunsch, E. , Zwick, A. , and Fontana, A. , 1968, *Chem. Ber.* , **101** , 326.
- [104] Merrifield, R. B. , and Mojsov, S. , 1983, *Glucagon I, Handbook of Experimental Pharmacology* , ed. Lefebvre, P. J. , Springer Verlag, Berlin, Vol. **86/1** , 23.
- [105] Bodanszky, M. , Klausner, Y. S. , and Said, S. I. , 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70** , 382.
- [106] Tatemoto, K. , 1984, *Peptides* **5** , 151; Nukihara, K. , Yanaihara, C. , Iguchi, K. , Fukuta, S. , Tanaka, M. , Mochizuki, T. , Tatemoto, K. , Lundberg, J. M. , Mutt, V. , and Yanaihara, N. , 1984, *J. Amer. Chem. Soc.* , **106** , 7909.
- [107] Moroder, L. , Gohring, W. , Thamm, P. , Wunsch, E. , Tatemoto, K. , Mutt, V. , and Bataille, D. , 1982, *Z. Naturforschg.* , **37b** , 772.
- [108] Brown, J. C. , and Dryburgh, J. R. , 1971, *Can. J. Biochem.* , **49** , 867.
- [109] Gregory, H. , Hardy, P. M. , Jones, D. S. , Kenner, G. W. , and Sheppard, R. C. , 1964, *Nature.* **204** , 931.
- [110] Gregory, H. , Laird, A. H. , Morley, J. S. , and Smith, J. M. , 1968, *J. Chem. Soc.* , C, 552; Gregory, H. , and Morley, J. , 1968, *J. Chem. Soc.* , C, 910; Morley, J. S. , 1969, *J. Chem. Soc.* , C, 809; Briggs, M. T. , and Morley, J. S. , 1979, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* , I, 2138.
- [111] Brown, E. , Sheppard, R. C. , Williams, B. J. , 1983, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* , I, 1161; Brown, E. , Sheppard, R. C. , Williams, B. J. , 1983, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* , I, 75.

- [112] Tam, J. P. , Merrifield, R. B. , 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **26**, 262.
- [113] Mutt, V. , Jorpes, J. E. , 1968, *Eur. J. Biochem.* , **6**, 156.
- [114] Wunsch, E. , Moroder, L. , Wilschowitz, L. , Gohring, W. , Scharf, R. , and Gardner, J. D. , 1981, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , **362**, 143.
- [115] Moroder, L. , Wilschowitz, L. , Gemeiner, M. , Gohring, W. , Knof, S. , Scharf, R. , Thamm, P. , Gardner, J. D. , Solomon, T. E. , and Wunsch, E. , 1981, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , **362**, 929.
- [116] Bodanszky, M. , Natarajan, S. , Hahne, W. , and Gardner, J. D. , 1977, *J. Med. Chem.* , **20**, 1047.
- [117] Martinez, J. , Bali, J.-P. , Magous, R. , Laur, J. , Lignon, M.-F. , Briet, C. , Nisato, D. , and Castro, B. , 1985, *J. Med. Chem.* , **28**, 273; Martinez, J. , Bali, J.-P. , Rodriguez, M. , Castro, B. , Magous, R. , Laur, J. , and Lignon, M.-F. , 1985, *J. Med. Chem.* , **28**, 1874.
- [118] Yajima, H. , Futaki, S. , Fujii, N. , Akaji, K. , Funakoshi, S. , Sakurai, M. , Katakura, S. , Inoue, K. , Hosotani, R. , Tobe, T. , Segawa, T. , Inoue, A. , Tatamoto, K. , and Mutt, V. , 1985, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 877.
- [119] Marki, W. , Spiess, J. , Tache, Y. , Brown, M. , and Rivier, J. E. , 1981, *J. Amer. Chem. Soc.* , **103**, 3178; Minamino, N. , Kangawa, K. , and Hisayuki, M. , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **119**, 14; Fujii, N. , Futaki, S. , Akaji, K. , Yajima, H. , Inoue, A. , and Segawa, T. , 1985, *Chem. Pharm. Bull.* , **33**, 3731.
- [120] Rivier, J. E. , and Brown, M. R. , 1978, *Biochemistry* , **17**, 1766.
- [121] Bernardi, L. , Bosisio, G. , DeCastiglione, R. , and Goffredo, O. , 1967, *Experientia* **23**, 700.
- [122] Cuttitta, F. , Carney, D. N. , Mulshine, J. , Moody, T. W. , Fedorko, J. , Fischler, A. , and Minna, J. D. , 1985, *Nature* , **316**, 823.
- [123] Brown, J. C. , Cook, M. A. , and Dryburgh, J. R. , 1973, *Can. J. Biochem.* , **51**, 533.
- [124] Wunsch, E. , Wedelberger, G. , and Deimer, K.-H. , 1976, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , **357**, 447.
- [125] Geiger, R. , 1976, *Chemiker-Ztg.* , **100**, 111.

- [126] Meienhofer, J. , Schnabel, E. , Bremer, H. , Brinkhoff, O. , Zabel, R. , Sroka, W. , Klostermeyer, H. , Brandenburg, D. , Okuda, T. , and Zahn, H. , 1963, *Z. Naturforsch.* , **18b**, 1120.
- [127] Ullrich, A. , Bell, J. R. , Chen, E. Y. , Herrera, R. , Petruzzelli, L. M. , Dull, T. J. , Gray, A. , Coussens, L. Liao, Y. -C. , Tsubokawa, M. , Mason, A. , Seeburg, P. H. , Grunfeld, C. , Rosen, O. M. , and Ramachandran, J. , 1985, *Nature* , **313**, 756.
- [128] Sieber, P. , Kamber, B. , Hartmann, A. , Johl, A. , Riniker, B. , and Rittel, W. , 1974, *Helv. Chim. Acta* , **57**, 2617.
- [129] Kovacevic, S. , Fayerman, J. T. , Miller, J. R. , and Richardson, M. A. , 1983, *Brit. Pat.* , 2 133 798 (E. Lilly); Kovacevic, S. , Miller, J. R. , and Hsiung, H. M. , 1983, *Brit. Pat.* , 2 133 797 (E. Lilly).
- [130] Markussen, J. , 1981, BE 887. 780 (Novo Industri); Markussen, J. , 1982, DE 3 229 674 (Novo Industri).
- [131] Tischio, J. P. , Patrick, J. E. , Weintraub, H. S. , Chasin, M. , and Goldstein, G. , 1979, *Int. Peptide Protein Res.* , **14**, 479.
- [132] Audhya, T. , and Goldstein, G. , 1983, *Int. Peptide Protein Res.* , **22**, 187.
- [133] Kohig, W. , Geiger, R. , Obermeier, R. , and Mullner, H. , 1981, DE 3 146 598 (Hoechst AG).
- [134] Goldstein, A. L. , Low, T. L. K. , McAdoo, M. , McClure, J. , Thurman, G. B. , Rossio, J. , Lai, C. -Y. , Chang, D. , Wang, S. -S. , Harvey, C. , Ramel, A. H. , and Meienhofer, J. , 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **74** , 725.
- [135] Wang, S. S. , Makofske, R. , Bach, A. , and Merrifield, R. B. , 1980, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **15**, 1.
- [136] Makottof, M. , and Patchornik, A. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **21**, 145.
- [137] S. , Kulesha, I. D. , and Winter, D. P. , 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* , **101**, 253.
- [138] Felix, A. M. , Heimer, E. P. , Wang, C. -T. , Lambros, T. J. , Swistok, J. , Roszkowski, M. , Ahmad, M. , Confalone, D. , Scott, J. W. , Parker, D. , and Meienhofer, J. , Trzeciak, A. , and Gillessen, D. , 1985, *Int. Peptide Protein Res.* , **26**, 130.

- [139] Bach, J. F. , Dardenne, M. , Pleau, J. -M. , and Rosa, J. , 1977, *Nature*, **265**, 55.
- [140] Abiko, T. , Kumikawa, M. , Dazai, S. , Sekino, H. , and Higuchi, H. , 1979, *Chem. Pharm. Bull.* , **27**, 2207; Blanot, D. , Martinez, J. , Anger, G. , and Bricas, E. , 1979, *Int. Peptide Protein Res.* , **14**, 41; Gyotoku, J. , Imaizumi, A. , Terada, S. , and Kimoto, E. , 1983, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **21**, 135.
- [141] Najjar, V. A. , and Nishioka, K. , 1970, *Nature*, **228** , 672.
- [142] Nishioka, K. , Amoscato, A. A. , Babcock, G. F. , Banks, R. A. , and Phillips, J. H. , 1984, *Cancer Investigation*, **2**, 39.
- [143] Wenger, R. M. , 1985, *Angew. Chem.* , **97**, 88.
- [144] Traber, R. , Loosli, H. -R. , Hofmann, H. , Kuhn, M. , and von Wartburg, A. , *Helv. Chim. Acta*, **65**, 1655.
- [145] Petcher, T. J. , Weber, H. P. , and Ruegger, A. , 1976, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1480.
- [146] Wenger, R. M. , 1983, *Helv. Chim. Acta*, **66**, 2672.
- [147] Wenger, R. M. , 1984, *Helv. Chim. Acta*, **67**, 502.
- [148] Baschang, G. , Taresay, L. , Hartmann, A. , and Stanek, J. , 1980, EP 0 027 258 (Ciba-Geigy).
- [149] Wiesmuller, K. -H. , Bessler, W. , and Jung, G. , 1983 , *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , **364**, 593.
- [150] Kralovec, J. , 1983, *Drugs of the Future*, **8**, 615.
- [151] Kunz, H. , and Kauth, H. , 1983, *Liebigs Ann. Chem.* , 337; Kunz, H. , and Kauth, H. , 1983, *Liebigs Ann. Chem.* , 360.
- [152] Krueger, J. M. , Pappenheimer, J. R. , and Karnovsky , M. L. , 1982, *J. Biol. Chem.* , **257**, 1564.
- [153] Krueger, J. M. , Walter, J. , Karnovsky, M. L. , Chedid, L. , Choay, J. P. , Lefrancier, P. , and Lederer, E. , 1984, *J. Exp. Med.* , **159**, 68.
- [154] Krueger, J. M. , Kornovsky, M. L. , Martin, S. A. , Pappenheimer, J. R. , Walter, J. and Biemann, K. , 1984, *J. Biol. Chem.* , **259**, 12659.
- [155] Lerner, R. A. , Green, N. , Alexander, H. , Liu, F. -T. , Sutcliffe, J. G. , and Shinnick, T. M. , 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3403.

- [156] Audibert, F. , Jolivet, M. , Chedid, L. , Alouf, J. E. , Boquet, P. , Rivaille, P. , and Siffert, O. , 1981, *Nature*, **289**, 593.
- [157] Emini, E. A. , Jameson, B. A. , and Wimmer, E. , 1983 , *Nature*, **304**, 699.
- [158] Hemmi, K. , Aratani, M. , Takeno, H. , Okada, S. , Miyazaki, Y. , Nakaguchi, O. , Kitaura, Y. , and Hashimoto , M. , 1982, *J. Antibiot.* , **35**, 1300.
- [159] Kitaura, Y. , Nakaguchi, O. , Hemmi, K. , Aratani, M. , Takeno, H. , Okada, S. , Tanaka, H. , and Hashimoto, M. , 1980, EP 0 627 280 (Fujisawa Pharmaceutical); Kitaura, Y. , Nakaguchi, O. , Hemmi, K. , Yonishi, S. , Takeno, H. , Okada, S. , and Hashimoto, M. , 1982, EP 0 057 416 (Fujisawa Pharmaceutical).
- [160] Izumi, S. , Nakahara, K. , Gotoh, T. , Hashimoto, S. , Kino, T. , Okuhara, M. , Aoki, H. , and Imanaka, H. , 1983, *J. Antibiot.* , **36**, 566.
- [161] Mine, Y. , Yokota, Y. , Wakai, Y. , Fukuda, S. , Nishida, M. , Goto, S. , and Kuwahara, S. , 1983, *J. Antibiot.* , **36**, 1045.
- [162] Mine, Y. , Watanabe, Y. , Tawara, S. , Yokota, Y. , Nishida, M. , Goto, S. , and Kuwahara, S. , 1983, *J. Antibiot.* , **36**, 1059.
- [163] Closse, A. , and Huguenin, R. , 1974, *Heb. Chim. Acta*, **57**, 553.
- [164] Rich, D. H. , and Jasensky, R. D. , 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* , **101**, 5413; Pastuszak, J. , Gardenr, J. H. , Singh, J. , and Rich, D. H. , 1982, *J. Org. Chem.* , **47**, 2982; Kawai, M. , Jasensky, R. D. , and Rich, D. H. , 1983, *J. Amer. Chem. Soc.* , **105**, 4456.
- [165] Schmidt, U. , Beuttler, T. , Lieberknecht, A. , and Grisser, H. , 1983, *Tetrahedron Lett.* , **24**, 3573.
- [166] Chakravaty, P. K. , Carl, P. L. , Weber, M. J. , and Katzenellenbogen, J. A. , 1983, *J. Med. Chem.* , **26**, 633.
- [167] Umezawa, H. , Aoyagi, T. , Shirai, T. , Nishizawa, R. , Suzuki, M. , and Saino, T. , 1979, DOS 2 947 140 (Nippon Kayaku).
- [168] *Drugs of the Future*, 1981, **6**, 604.
- [169] Cushman, D. W. , and Ondetti, M. A. , 1980, *Prog. Med. Chem.* , **17**, 41.
- [170] Ondetti, M. A. , and Cushman, D. W. , 1981, *J. Med. Chem.* , **24**, 355.
- [171] Khosla, M. C. , Hall, M. M. , Smeby, R. R. , and Bumpus, F. M. , 1974, *J.*

Med. Chem. , 17, 431.

[172] *Drugs of the Future*, 1981, 6, 542.

[173] Bumps, F. M. , Khosla, M. C. , and Smeby, R. R. , 1975, DOS 2 520 106 (Abbott Laboratories).

[174] *Drugs of the Future*, 1981, 6, 534.

[175] *Drugs of the Future*, 1981, 6, 527.

[176] Geiger, R. , 1984, *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* , 34, 1386.

[177] Patchett, A. A. , Harris, E. , Tristram, E. W. , Wyvratt, M. J. , Wu, M. T. , Taub, D. , Peterson, E. R. , Ikeler, T. J. , ten Broeke, J. , Payne, L. G. , Ondeyka, D. L. , Thorsett, E. D. , Greenlee, W. J. , Lohr, N. S. , Hoffsommer, R. D. , Joshua, H. , Ruyle, W. V. , Rothrock, J. W. , Aster, S. D. , Maycock, A. L. , Robinson, F. M. , Hirschmann, R. , Sweet, C. S. , Uim, E. H. , Gross, D. M. , Vassil, T. C. , and Stone, C. A. , 1980, *Nature*, 288 , 280.

[178] Teetz, V. , Geiger, R. , Henning, R. , and Urbach, H. , 1984, *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* , 34, 1399.

[179] Greenlee, W. J. , Allibone, P. L. , Perlow, D. S. , Patchett, A. A. , Uim, E. H. , and Vassil, T. C. , 1985, *J. Med. Chem.* , 28, 434.

[180] Gruenfeld, N. , Stanton, J. L. , Yan, A. M. , Ebetino, F. H. , Browne, L. J. , Gude, C. , and Huebner, C. F. , 1983, *J. Med. Chem.* , 26, 1277.

[181] Ksander, G. M. , Yan, A. M. , Diefenbacher, C. G. , and Stanton, J. L. , 1985, *J. Med. Chem.* , 28, 1606.

[182] Attwood, M. R. , Hassall, C. H. , Lambert, R. W. , and Lawton, G. R. , 1983, DOS 3 317 290 (Hoffmann- La Roche, Schweiz).

[183] Skeggs, L. T. , Lentz, K. E. , Kahn, J. R. , and Hochstrasser, H. , 1968, *J. Exp. Med.* , 128, 13.

[184] Szelke, M. , Leckie, B. , Hallett, A. , Jones, D. M. , Sueiras, J. , Atrash, B. , and Lever, A. F. , 1982, *Nature* , 299, 555; Leckie, B. , Szelke, M. , Hallett, A. , Hughes, M. , Lever, A. F. , McIntyre, G. , Morton, J. J. , and Tree, M. , 1983, *Clin. Exp. Hypertens.* , A 5, 1221; Haber, E. , 1983, *Clin. Exp. Hypertens.* , A 5, 1193.

- [185] Boger, J. , Lohr, N. S. , Uim, E. H. , Poe, M. , Blaine, E. H. , Fanelli, G. M. , Lin, T. -Y. , Payne, L. S. , Schorn, T. W. , La Mont, B. I. , Vassil, T. C. , Stabilito, I. I. , Veber, D. F. , Rich, D. H. , and Bopari , A. S. , 1983, *Nature*, **303**, 81.
- [186] Rittle, K. E. , Homnick, C. F. , Ponticello, G. S. , and Evans, B. J. E. , 1982, *J. Org. Chem.* , **47**, 3016.
- [187] Veber, D. F. , and Boger, J. , 1982, EP 0 077 028 (Merck, USA); Veber, D. F. , and Rich, D. H. , 1982, EP 0 077 029 (Merck, USA).
- [188] Boger, J. , 1983, *Proc. of the 8th Amer. Peptide Symp.* , Tucson, 569.
- [189] Rich, D. H. , Salituro, F. G. , and Holladay, M. W. , 1983, *Proc. of the 8th Amer. Peptide Symp.* , Tucson, **139**, 511; Rich, D. H. , and Sun, E. T. O. , 1980, *J. Med. Chem.* , **23**, 27; Rich, D. H. , 1985, *J. Med. Chem.* , **28**, 263.
- [190] Bock, M. G. , Boger, J. S. , Brady, S. F. , and Veber , D. F. , 1985, EP 0 157 409(Merck, USA); Boger, J. S. , 1985, EP 0 156 318(Merck, USA); Boger, J. S. , 1985, EP 0 156 320(Merck, USA); Bock, M. G. , Dipardo, R. M. , and Boger, J. S. , 1985, EP 0 156 321(Merck, USA); Boger, J. S. , and Bock, M. G. , 1985, EP 0 156 322(Merck , USA); Boger, J. , Payne, L. S. , Perlow, D. S. , Lohr, N. S. , Poe, M. , Blaine, E. H. , Uim, E. H. , Schorn, T. W. , LaMont, B. I. , Lin, T. -Y. , Kawai, M. , Rich, D. H. , and Veber, D. F. , 1985, *J. Med. Chem.* , **28**, 1779.
- [191] Boissonas, R. A. , Guttman, St. , and Jaquenoud, P. -A. , 1960, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1349; Boissonas, R. A. , Guttman, St. , and Jaquenoud, P. -A. , 1960, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1481.
- [192] Bertaccini, G. , 1976, *Pharmacol. Rev.* , **28**, 127; Miller, R. J. , 1984, *J. Med. Chem.* , **27**, 1239.
- [193] Sandrin, E. , and Boissonas, R. A. , 1962, *Experientia* , **18**, 59.
- [194] Lubke, K. , Schroder, E. , Schmiechen, R. , and Gibian , H. , 1964, *Liebigs, Ann. Chem.* , **679**, 195.
- [195] Chillemi, F. , Bernardi, L. , and Bosisio, G. , 1964, *Gazz. Chim. Ital.* , **94**, 891; Bernardi, L. , Bosisio, G. , Chillemi, F. , DeCaro, G. , DeCastiglione, R. ,

- Erspamer, V. , Glaesser, A. , and Goffredo, O. , 1964, *Experientia*, **20**, 306;
- Buck, S. H. , and Burcher, E. , 1986, *Trends in Pharmacological Sciences*, **7**, 65.
- [196] Voelter, W. , Zech, K. , Jung, G. , and Sewing, K.-F. , 1972, *Tetrahedron*, **28**, 2649.
- [197] Chillemi, F. , 1965, *Gazz. Chim. Ital.* , **95**, 402.
- [198] Voelter, W. , Zech, K. , Jung, G. , and Sewing, K.-F. , 1972, *Tetrahedron*, **28**, 5963.
- [199] Anastasi, A. , 1977, *Experientia*, **33**, 857.
- [200] Bernardi, L. , Bosisio, G. , and DeCastiglione, R. , 1967, *Experientia*, **23**, 700.
- [201] Zetler, G. , 1981, DE 3 138 233 (Farmitalia- Carlo Erba).
- [202] Flynn, T. G. , de Bold, M. L. , and de Bold, A. J. , 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **117**, 859.
- [203] Kangawa, K. , and Matsuo, H. 1984, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 131, Kangawa, K. , Fukada, A. , and Matsuo, H. , 1985, *Nature*, **313**, 397.
- [204] Kangawa, K. , Tawaragi, Y. , Oikawa, S. , Mizuno, A. , Sakuragawa, Y. , Yakazato, H. , Fukuda, A. , Minamino, N. , and Matsuo, H. , 1984, *Nature*, **312**, 152.
- [205] Seidah, N. G. , Lazure, C. , Chretien, M. , Thibault, G. , Gracia, R. , Cantin, M. , Genest, J. , Nutt, R. F. , Brady, S. F. , Lyle, T. A. , Paleveda, W. J. , Colton, C. D. , Ciccarone, T. M. , and Veber, D. F. , 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2640; Nutt, R. F. , Brady, S. F. , Lyle, T. A. , Dyllion-Colton, C. , Paleveda, W. J. , Ciccarone, T. M. , Blaine, E. H. , Winquist, R. J. , Bennet, C. D. , Hirschmann, R. , and Veber, D. F. , 1984, *Proc. of 18th Eur. Peptide Symp.* , Sweden, 513.
- [206] Currie, M. G. , Geller, D. M. , Cole, B. R. , Siegel, N. R. , Fok, K. F. , Adams, S. P. , Eubanks, S. R. , Galluppi, G. R. , and Needleman, P. , 1983, *Science*, **67**, Needleman, P. , 1985, US-Pat. 4 496 544 (Washington University, St. Louis); Needleman, P. , 1985, US- Pat. 4 508 712 (Washington University, St. Louis).
- [207] Fok, K. F. , Tjoeng, F. S. , Houbion, J. A. , Spear, K. L. , Nugent, S. T. , Eubanks, S. R. , Zupec, M. E. , Olins, G. , Blehm, D. J. , Adams, S. P. , Waki-

- tani, K. , and Needleman, P. , 1985, *Proc. of the 9th Amer. Peptide Symp.* , Toronto, 953.
- [208] Riniker, B. , Brugger, M. , Kamber, B. , Sieber, P. , and Rittel, W. , 1969, *Helv. Chim. Acta*, **52**, 1073.
- [209] Sakakibara, S. , Noda, T. , Morikawa, T. , Munekata, E. , Kimura, T. , and Nakagawa, Y. , 1976, DOS 2 616 399 (Toyo Jozo K. K.).
- [210] Orłowski, R. C. , Stahl, G. L. , and Colescott, R. L. , 1984, US-Pat. 4 528 132 (Armour Pharmaceutical Co. , USA).
- [211] Izumia, N. , Kato, T. , Aoyagi, H. , Waki, M. , and Kondo, M. , 1979, *Synthetic Aspects of Biologically Active Cyclic Peptides*, J. Wiley & Sons. New York.
- [212] Hassall, C. H. , Johnson, W. H. , and Theobald, C. J. , 1979, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1451.
- [213] Kupryszewski, G. , 1981, *Perspectives Peptide Chemistry*, ed. Eberle, A. , Geiger, R. , and Wisland, T. , S. Karger. Basel, 307.
- [214] Alewood, P. F. , Perich, J. W. , and Johns, R. B. , 1982, *Synthetic Commun.* , **12**, 821.
- [215] Maier, L. , 1983, *Phosphorus and Sulfur* , Vol. 14, 295.
- [216] Atherton, R. F. , Hall, J. M. , Hassall, C. H. , Lambert, R. W. , and Ringrose, P. S. , 1977, DOS 2 730 524 (Hoffmann—La Roche, Switzerland); Atherton, R. F. , Hall, J. M. , Hassall, C. H. , Lambert, R. W. , and Ringrose, P. S. , 1977, DOS 2 730 549 (Hoffmann—La Roche, Switzerland); Atherton, R. F. , Hassall, C. H. , and Lambert, R. W. , 1986, *J. Med. Chem.* , **29**, 29.
- [217] Meienhofer, J. , and Patel, R. P. , 1971, *Int. J. Peptide Protein Res.* , **3**, 347.
- [218] Benz, G. , 1984, *Liebigs Ann. Chem.* , 1399; Metzger, K. G. , Pftzner, J. , Schmidt, D. , Weyland, H. , Benz, G. , and Schroder, T. , 1981, DOS 3 102 137 (Bayer AG); Metzger, K. G. , Pftzner, J. , Schmidt, D. , Weyland, H. , Benz, G. , and Schroder, T. , 1981, DOS 3 102 136 (Bayer AG).
- [219] Gross, E. , and Morell, J. L. , 1970, *J. Amer. Chem. Soc.* , **92**, 2919; Gross, E. , and Morell, J. L. , 1971, *J. Amer. Chem. Soc.* , **93**, 4634.
- [220] Wakamiya, T. , Shimbo, K. , Sano, A. , Fukase, K. , and Shiba, T. , 1983, *Bull.*

Chem. Soc. Jpn. , **56**, 2044.

- [221] Hagenmaier, H. , Keckeisen, A. , Zahner, H. , and Konig, W. A. , 1979, *Liebigs Ann. Chem.* , 1494.
- [222] Hass, W. , and Konig, W. A. , 1982, *Liebigs Ann. Chem.* , 1615; Rathmann, R. , Konig, W. A. , Schmalke, H. , Carlsson, G. , Bosch, R. , Hagenmaier, H. , and Winter, W. , 1984, *Liebigs Ann. Chem.* , 1216.
- [223] Konig, W. A. , Hass, W. , Deheler, W. , Fiedler, H. -P , and Zahner, H. , 1980, *Liebigs Ann. Chem.* , 622; Zimmermann, G. , Hass, W. , Faasch, H. , Schmalke, H. , and Konig, W. A. , 1983, *Liebigs Ann. Chem.* , 2165.
- [224] Merrifield, R. B. , Vizoli, L. D. , and Boman, H. G. , 1982, *Biochemistry* , **21**, 5020.
- [225] Andreau, D. , Merrifield, R. B. , Steiner, H. , and Boman, H. G. , 1984, *Proc. of the 18th Eur. Peptide Symp.* , Djuröaset, Sweden, 541.
- [226] Payne, J. W. , Jakes, R. , and Hartley, B. S. , 1970, *Biochem. J.* , **117**, 757.
- [227] Schmitt, H. , and Jung, G. , 1985, *Liebigs Ann. Chem.* , 321; Jung, G. , Bruckner, H. , and Schmitt, H. , 1981, *Structure and Activity of Natural Peptides*, ed. Voelter, W. , and Weitzel, G. , Walter de Gruyter, Berlin, 75.
- [228] Bartmann, W. , and Beck, G. , 1982, *Angew. Chem.* , **94** , 767; Samuelsson, B. , 1983, *Science* , **220** , 588.
- [229] Corey, E. J. , Clark, D. A. , Goto, G. , Marfat, A. , and Mioskowski, C. , 1980, *J. Amer. Chem. Soc.* , **102**, 1436.
- [230] Gleason, J. G. , 1983, *Abstracts of the 2nd SCI-RSC Medicinal Chemistry Symposium*, Cambridge; Saksena, A. K. , Green, M. J. , Mengiaracina, P. , Wong, J. K. , Kreutner, W. , and Gulbenkian, A. R. , 1985, *Tetrahedron Lett.* , **26** , 6423.
- [231] Schiba, T. , 1977, *Proc. of the 15th Symp. on Pept. Chem.* , Osaka.
- [232] Bayer, E. , Gugel, K. H. , Hagele, K. , Hagenmaier, H. , Jessipow, S. , Konig, W. A. , and Zahner, H. , 1972, *Helv. Chim. Acta* , **55** , 224.
- [233] Wieland, T. , 1979, *Chemie in unserer Zeit* , **13**, 56; Witkop, B. , 1983, *Adhuc wissenschaftliche Rundschau* , **36** , 261.
- [234] Wieland, T. , Fasel, J. , and Konz, W. , 1974, *Liebigs Ann. Chem.* , 722.

- [235] Bodanszky, M. , and Stahl, G. L. , 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 71, 2791;
Bodanszky, M. , Bednarek, M. A. , Yiotakis, A. E. , and Curtis, R. W. , 1982,
Int. J. Peptide Protein Res. , 20, 16.
- [236] Williams, D. H. , Santikarn, S. , DeAngelis, F. , Smith, R. J. , Reid, D. G. , Oel-
richs, P. B. , and McLeod, J. K. , 1983, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* , 1, 1869.
- [237] Mazur, R. H. , Schlatter, J. M. , and Goldcamp, A. H. , 1969, *J. Amer. Chem.*
Soc. , 91, 2684; Mazur, R. H. , Reuter, J. A. , Swiatek, K. A. , and Schlatter,
J. M. , 1973, *J. Med. Chem.* , 16, 1284.
- [238] Otagiri, K. , Miyake, I. , Ishibashi, N. , Fukui, H. , Kanehisa, H. , and Okai, H. ,
1983, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* , 56, 1116; Otagiri, K. , Shigenaga, T. , Kanehisa,
H. , and Okai, H. , 1984, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* , 57, 90.
- [239] Fuller, W. D. , Goodman, M. , and Verlander, M. S. , 1985, *J. Amer. Chem.*
Soc. , 107, 5821.

第六章 多肽及相关药物设计的新思维

一、引言

传统医学有十分独特的认识论。在传统医学的思维中，人体环境构成一个子系统，自然环境构成一个子系统，人体环境与自然环境组合为社会环境，构成一个大系统。从这个意义上说，传统医学最早应用了系统论。依据所处理问题的性质，人体环境、自然环境和社会环境既相互独立，又相互联系。各个环境中都包含无数成对的因子，它们分别处于各自的平衡状态之中发挥相反的功能，这种相反功能的因子对称作偶联子。偶联过程是物态平衡过程，在正常状态下，三种环境处于平衡状态。系统的任何环节一旦被扰动，人就进入病态。药物的治疗作用，实质是调控作用，亦即恢复或维持各种环节的稳态平衡。在许多场合，药物作用于偶联过程，在某些场合，药物作用于环境和偶联子。认识环境和偶联子对药学研究的制约或调控是药学研究的任务之一。

传统药学的基本思维是，利用天然药物保持或恢复人体环境的稳态，保持或恢复自然环境的稳态，保持或恢复社会环境的稳态，使人与自然维系在和谐之中，这是五千年传统文化的精华之一。现代物质文明唤起了人类对天然产物的偏爱。粗糙的原始制品倍受发达国家的推崇，与之有关的现象被称为回归大自然。这种现象体现了人类对自身与大自然的关系有了更深层次的觉悟，显示了东西方文化的共识与交融。

笼统地说，人体经过长期进化，形成了高度的适应能力与应

变能力。在一定意义上,人体环境、自然环境及社会环境中致病因子与抗病因子同在。如果把疾病与健康看作一般概念上的偶联过程,那么有许多途径可以实施对该偶联过程的调控,维持所述环境的稳态。无论是按照传统药学的观念,还是按照现代药学的认识,天然产物和/或内源性物质对机体可以实现最佳调控。

根据传统药学的思维模式,把健康与环境关联,把环境稳态与药学研究关联,是社会发展的进程对药学研究提出的挑战。例如从维持或恢复人体环境稳态的观念出发,按照活性物质在体内如何形成、如何转运、如何归宿、如何生效,以及依赖何种机制发挥生物效应等多方面的表现与活性物质的结构与性质之间的公共关系进行药物设计,探索构效关系的本质,并在高层次上模拟原型结构或机理,探索新型药物,实现药物研究与人体环境在思维、研究和应用等步骤及层次上的统一和协调。这是药学研究的本来面目,涉及化学、医学、生物学及各种现代技术包括计算机和光谱在内的多学科合作。药学研究正是在对环境的思考与处理中根本区别于化学研究。

由于内源性介质失衡导致的疾病举不胜数。与血管栓塞性疾病相联系的许多重大心血管疾病,例如高血压、心肌梗死、半身不遂和脑卒中等疾病的发生与发展过程,很大程度上能够归结到内源性介质的平衡失调。

首先可以举出的一对偶联子是前列环素(PGI_2)/血栓素(TXA_2)。在正常生理情况下,二者在体内维持动态平衡。 PGI_2 和 TXA_2 对血小板有十分强烈但又完全相反的作用。血小板受到刺激时,游离出来的花生四烯酸在血小板内合成 TXA_2 ,促进血小板聚集,导致血栓形成。 PGI_2 与血小板上的膜受体结合时,激活膜上的腺苷酸环化酶,抑制 TXA_2 的合成,抑制血栓形成。 PGI_2 /

TXA₂ 偶联过程一旦受到扰动,就会产生血栓性疾病。针对该偶联过程的调控设计的抗栓药物,可以产生明确的治疗作用。

Ca²⁺ 的细胞外流/内流是另一对偶联子。Ca²⁺ 具有重要的生理功能,是心肌、血管平滑肌等肌肉兴奋/舒张偶联过程中的关键介质。Ca²⁺ 直接引发肌肉收缩。细胞外 Ca²⁺ 通过钙通道向细胞内流动时,还可以导致细胞内肌浆网中的结合态 Ca²⁺ 释放。细胞内 Ca²⁺ 浓度升高,导致血管平滑肌痉挛,促使血栓形成。相反,G-激酶激活时,一方面关闭 Ca²⁺ 通道,使 Ca²⁺ 内流减少,一方面启动钙泵,使 Ca²⁺ 外流,并抑制肌浆网内 Ca²⁺ 释放。细胞内 Ca²⁺ 浓度下降,导致血管平滑肌舒张,抑制血栓形成。Ca²⁺ 的细胞外流/内流偶联过程受到扰动,即产生血栓性疾病。针对该偶联过程的调控设计的抗栓药物,可以产生明确的治疗作用。

内皮舒张因子(EDRF)/内皮收缩因子(EDCF)虽然尚未发现处于同一偶联过程,但它们导致的血管舒张/收缩过程却形成了一对偶联子。EDRF 具有舒张血管、降低血压、增加冠脉血流量等许多重要的生理活性。EDCF 是迄今发现的最强大的缩血管物质,参与许多重要的病理过程。针对 EDRF 设计的前药或针对 EDCF 设计的拮抗剂,可以调控血管舒张/收缩偶联过程,造成明确的治疗作用。

纤维蛋白 α 或 γ 链/RGD 是竞争血小板表面糖蛋白 I_b/II_a (GP I_b/II_a)受体的一对偶联子。血小板活化时,纤维蛋白 α 或 γ 链与激活的血小板表面受体结合,使前血栓转变为血栓。RGD 是血小板表面受体识别的关键序列,含 RGD 序列的多肽可以竞争性地占据血小板表面的受体,中断凝血过程。针对所述偶联过程设计的 RGDS,对血小板聚集及凝血有明确的治疗作用。

血管收缩或痉挛使管道变窄,由于机械摩擦或各种结果性的

原因,使得变窄部分的血管内皮容易破损,血栓容易形成,使血管易于堵塞。血管收缩/舒张是一对偶联子,这种偶联过程是一种协调的动态平衡。收缩过甚,呈现血压升高或血栓形成,收缩不足,导致相反的后果。按照经典的认识,正常血管处于舒张状态,舒张状态受到破坏时,引起血压上升。自从发现了EDRF以后,这种认识发生了革命。基于最新的研究结果提出的看法是,人体的血管在正常状态下处于收缩状态,内源性介质通过舒张作用调控人体血压,舒张性调控受到障碍时,产生高血压症状。针对血管收缩/舒张偶联过程设计舒血管药物,是心血管药物研究的重要方向。根据这种思路设计的许多化合物,确实显示了对这种功能性偶联过程的调控。

外源性小分子/生物大分子是一对具有特殊意义的偶联子。外源性小分子药物,只有进入体内,经转运到达靶部位才能发挥生物学效应。一般说来,药物小分子与靶部位的生物大分子作用,使后者发生变化,由于这种变化而引起的一系列生物体内的物理变化或化学反应,最终体现为效应。药物的效应可以简单理解为机体对外源性小分子与生物大分子相互作用的整体应答。根据外源性小分子在体内转运、吸收及分布;根据与外源性小分子匹配的生物大分子(受体、靶点或作用部位)的状态;根据外源性小分子与生物大分子相互作用的类型及导致的后果,可以设计出选择性高、作用强、毒副作用小的靶向药物。

把人体的健康与环境(社会环境、自然环境和人体环境)的稳态相联系,是一种全新的观念。从这种观念出发,以天然产物和内源性物质为先导化合物进行药物设计,并把这些本质上是天然产物或内源性物质的所谓药物送回体内,根本目标在于使机体内被扰乱的功能正常化,使体内活性物质的调节达到稳态。这种做

法根本区别于传统的药物研究,形成了药学、化学、药理学、生物学、医学交叉的最热烈、最有活力的新领域—生源药物化学。本章主要介绍作者及同事在生源药物化学研究中取得的部分前沿性研究结果,用以阐明所述新思维对现代药物化学的巧妙贡献。

二、血管源性活性多肽与药物设计中的新思维

血管源性活性多肽在内源性物质中占有特殊地位。80年代以来已分离到相当数量的多肽化合物,它们大都具有重要的生物学意义,对于一些重大疾病的发生、发展与治疗有重要影响。其中有一类小分子多肽与血管内皮及纤维蛋白相关,它们或显示明确的扩冠作用;或显示明确的抗血小板聚集作用;或显示明确的抗栓作用;或显示强大的缩血管作用。鉴于致命的血管栓塞性疾病化疗上的困境以及与血管内皮损伤相关的心血管疾病的治疗所面临的挑战,这类小分子多肽作为潜在的抗栓剂引起了许多研究人员的重视,兴起了研究热潮。

1. P6A 及相关多肽

1978年 Belew 等在 37℃, pH8 的含纤维蛋白溶解酶的体系中将人纤维蛋白孵育 60min, 在孵育中生成了低分子量的 12 种馏分, 其中两个馏分具有血管通透性增加的活性, 另外两个馏分具有收缩血管的活性。1980 年测定了分离到的三种多肽的氨基酸序列, 这些多肽来自于纤维蛋白 β 链的不同区域, 具有血管通透性增加活性的两种多肽来自于纤维蛋白 β 链的容易被纤维蛋白溶解酶进攻的区域, 第三种多肽具有轻度的缩血管效应, 是经纤维蛋白溶解酶降解后从纤维蛋白 β 链释放的片段 E 的一部分。这三种

多肽分别命名为 P6A (Ala-Arg-Pro-Ala-Lys), P6D (Ser-Glu-Leu-Gln-Lys-Val-Pro-Pro-Glu-Trp-Lys), P6E (Thr-Ser-Glu-Val-Lys)。

(1) 利用 P6A 对 PGI_2 的调控增加冠脉灌流量(CPF)

70 年代中期,具有强大生物活性的物质 PGI_2 和 TXA_2 被发现之后,大大促进了对冠心病的病理和防治研究。在正常生理情况下, PGI_2 和 TXA_2 在体内保持动态平衡,对维持内环境的稳定和血管的完整性起十分重要的作用。虽然 PGI_2 和 TXA_2 来自花生四烯酸代谢的同一中间产物($\text{PGG}_2, \text{PGH}_2$),但 PGI_2 与 TXA_2 对血小板却有完全相反的作用。 PGI_2 为自然界现有的最强烈的抗血小板聚集物质,具有扩张冠状动脉、抗血栓形成、抗动脉粥样硬化的作用, PGI_2 - TXA_2 的平衡对血小板聚集功能的调节有重要意义。 PGI_2 - TXA_2 平衡失调时,容易发生血小板聚集和血栓形成等血液病理改变。

血小板受刺激时,游离出来的花生四烯酸在血小板内合成 TXA_2 。 TXA_2 使 Ca^{2+} 从结合状态中游离出来,造成血小板内 Ca^{2+} 的浓度升高,促进血小板聚集。同时, TXA_2 还能使血小板致密管中的 Ca^{2+} 游离出来,游离 Ca^{2+} 浓度升高后,能导致血小板致密体收缩,使其中的 ADP 和 5-HT 释放到血小板外,刺激附近的血小板,引起新的聚集。

血小板膜上存在 PGI_2 受体, PGI_2 与它结合时,能激活膜上的 cAMP,使血小板内的 cAMP 水平增高,cAMP 不仅能抑制 TXA_2 合成酶,还能抑制 Ca^{2+} 的释放。

冠内凝血酶造成的急性心肌缺血常常可以被溶栓剂缓解,1989 年发现 P6A 可以通过刺激 PGI_2 的释放而增加冠脉血流量(CBF),使狗的实验性血栓模型重建了冠脉血流,揭示了 P6A 对

体内这种因子的调控或介导作用,以及对血管栓塞性疾病的治疗作用。

1990年我们采用液相法合成了P6A。该人工合成品可调控体内PGI₂合成,成功地增加大鼠的CPF。用合成的P6A灌流离体大鼠心脏,发现CPF呈剂量依赖性增加(5×10^{-5} mol/l P6A),CPF增加的幅度与 10^{-5} mol/l PGI₂相似,CPF分别增加 $49.7 \pm 3.4\%$ 和 $60.7 \pm 8.1\%$ 。有关数据列入表6.1^[1-3]。

表 6.1 P6A 对冠脉灌流量(CPF)的影响

	剂量(mol/l)	CPF 增加的幅度(%)
PGI ₂	1×10^{-5}	60.7 ± 8.1
P6A	5×10^{-5}	49.7 ± 3.4
P6A	5×10^{-6}	10.1 ± 1.6
P6A	1×10^{-6}	10.9 ± 9.4
P6A	1×10^{-5}	32.2 ± 12.5
P6A	5×10^{-5}	43.3 ± 6.3
P6A	1×10^{-4}	70.9 ± 17.2

为确认P6A增加CPF与体内PGI₂释放的关系,P6A治疗前我们预先灌流消炎痛阻断PGI₂的合成。结果表明6-keto-PGF_{1 α} 释放量为 4.65 ± 0.66 ng/g心肌(与对照组相比较, $P < 0.05$),显著减弱P6A的冠脉扩张作用,CPF较对照组仅增加 $12.1 \pm 1.4\%$ (P6A组增加 $49.7 \pm 1.4\%$, $P < 0.01$)。可见消炎痛能显著抑制P6A的扩冠作用,但不能完全消除P6A的扩冠作用。该结果表明,促进内源性PGI₂释放是P6A扩冠作用的重要机制,但不是唯一机制。

(2) 利用P6A对EDRF的影响产生治疗作用

调节血管舒张功能是实现血管效应的有效手段,EDRF 是作用确切的舒血管介质,P6A 能够促使内源性 EDRF 释放,我们使用 P6A 灌流大鼠主动脉肌条,有效地对抗了去甲肾上腺素(NE)引起的血管收缩作用,剂量依赖性地舒张血管条,有关数据见于表 6.2^[3]。

表 6.2 P6A 的舒血管效应

组别(mol/l)	最大舒张效应($\bar{X} \pm S\%$)	
	有内皮	去内皮
对照	2.56 \pm 0.30	2.40 \pm 0.64
1 $\times 10^{-6}$	5.72 \pm 0.42 *	2.74 \pm 0.34
5 $\times 10^{-6}$	10.14 \pm 0.32 *	2.52 \pm 0.45
1 $\times 10^{-5}$	22.57 \pm 1.67 *	2.27 \pm 0.33
1 $\times 10^{-4}$	29.42 \pm 0.84 *	3.03 \pm 0.27
5 $\times 10^{-4}$	47.64 \pm 1.34 *	2.65 \pm 0.43

$n=5$, NE(5×10^{-8} mol/l) 的最大收缩张力为

100%; *与对照组比较, $P < 0.01$

(3) 利用 P6A 的血管及血流效应产生治疗作用

CPF 的增加或血管舒张可以导致对血栓的治疗作用。Nichols 等研究了 P6A 与 tPA 的联合治疗效应,结果表明, tPA+P6A 所获得的抗栓作用与单独使用 P6A 相似。在我们的研究中,静脉滴注或血栓局部使用 P6A,都能够明显地抑制大鼠静脉血栓模型中的血栓形成,血栓重量分别较对照组减少 36.9%和 53.9% ($P < 0.01$)。单独使用 P6A 虽然能够有效地降低血栓干重,但是对鼠尾出血时间(TBT)及血浆促凝血酶原激活时间(PTT)均无明显影响。结果列于表 6.3^[4]。

表 6.3 P6A 对血栓, PTT 和 TBT 的影响($\bar{X} \pm S$) *

组别	血栓重量(mg)	PTT(%)	TBT(%)
对照	10.4 ± 1.7	109.1 ± 9.8	93.4 ± 14.9
P6A I	6.6 ± 1.5	108.5 ± 8.3	105.9 ± 18.9
P6A II	4.8 ± 1.2	105.4 ± 8.6	102.8 ± 14.5

*与对照组比较都有 $P < 0.01$; P6A II 组(剂量, 5 μ mol/kg)

与 P6A I 组(剂量, 50 μ mol/kg)比较 $P < 0.05$

(4) 利用 P6A 对纤溶系统的影响产生治疗作用

为了探讨 P6A 的临床应用前景, 我们在三氯化铁引起的大鼠颈总动脉血栓形成模型上比较了 P6A 和尿激酶(UK)的抗栓作用及可能的协同作用, 结果列入表 6.4。数据表明, 假血栓组无一例

表 6.4 P6A 和 UK 对血栓的影响

组别	血栓湿重(mg)	血浆 Fgn 含量(mg/ml)
假血栓组	无血栓形成	2.27 ± 0.06*
血栓对照组	5.90 ± 0.26	1.65 ± 0.03
UK 组	3.15 ± 0.27**	1.48 ± 0.03**
P6A 预防组	1.81 ± 0.08**	1.54 ± 0.02**
P6A 治疗组	3.19 ± 0.13**	1.51 ± 0.04**
UK + P6A 组	3.09 ± 0.06**	1.55 ± 0.02**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

血栓形成, 血管壁无异常改变。UK, P6A 及 UK + P6A 预防治疗, 各组动物血管腔内侧及血栓内可见大量大小不等的血液隧道, 血栓的重量分别较血栓对照组轻 46.61%, 69.32%, 45.93% 以及 47.63%。从预防角度看, P6A 优于 UK, 它们之间不存在协同作用。血栓形成激活体内纤溶系统, 血浆中纤维蛋白(Fgn)减少。UK 和 P6A 处理的动物血浆 Fgn 含量进一步显著减少, 意味着它们都

能增强纤溶活性,但未观察到协同作用^[5]。

(5) 利用 P6A 对 ADP 的影响产生治疗作用

血小板聚集是血栓形成的重要途径和环节,内源性介质 PAF 和 ADP 是诱导血小板聚集形成血栓的重要介质,我们利用 P6A 对 ADP 的拮抗作用,成功地抑制了血小板的聚集,结果见表 6.5 和表 6.6^[6]。

表 6.5 P6A 对 ADP 的拮抗作用

P6A	给 药 前		给 药 后	
	最大聚集	最大聚集	最大聚集	最大聚集
	时间(s)	率(%)	时间(s)	率(%)
10^{-6}	80.3 ± 20.0	71.3 ± 8.1	$69.3 \pm 22.8^*$	71.9 ± 4.5
10^{-5}	96.5 ± 24.0	77.8 ± 1.7	$65.0 \pm 16.7^*$	$73.4 \pm 3.8^*$
10^{-4}	96.3 ± 21.9	78.0 ± 1.5	$65.7 \pm 11.3^*$	$73.5 \pm 2.6^*$

与给药前比较(t 检验): * $P < 0.05$, 剂量单位为 mol/l

表 6.6 P6A 对 ADP 的拮抗作用

P6A	给 药 前		给 药 后	
	有效聚集率(%)		有效聚集率(%)	
	3min	5min	3min	5min
10^{-6}	7.1 ± 4.5	25.1 ± 15.4	22.2 ± 21.4	51.9 ± 39.1
10^{-5}	5.7 ± 1.2	22.3 ± 4.0	13.4 ± 9.3	39.0 ± 27.7
10^{-4}	5.9 ± 1.2	22.7 ± 4.1	$18.0 \pm 8.8^*$	$50.5 \pm 18.0^{\#}$

与给药前比较(t 检验): * $P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$; 剂量单位为 mol/l;

$$\text{有效解聚率} = \frac{\text{最大聚集率} - \text{某时聚集率}}{\text{最大聚集率}} \times 100\%$$

(6) 利用 P6A 对 ACE 的影响产生治疗作用

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin System, RAS) 在机体的心血管活动和水电解质平衡调节中有非常重要的作用。肾素不仅是存在于肾脏近小球旁器分泌的一种循环激素,而且还存在于肾外组织,特别在脑和心血管系统本身也存在局部的肾素-血管紧张素系统。它们不依赖于肾脏,可以自身合成、释放肾素和血管紧张素,起着自分泌、旁分泌和胞内分泌的作用,调节局部的血流和血管紧张性,促进心肌和血管平滑肌的生长和代谢。它们在高血压、心肌缺血、心肌肥厚、心肌梗塞和心率失常等疾病的发生中起重要作用。肾素-血管紧张素系统由肾素、血管紧张素转化酶 (ACE) 及血管紧张素原组成,最后生成血管紧张素而发挥生理效应。

血管紧张素原通过肾素的作用成为血管紧张素 I (AGT I), 后者通过 ACE 的作用生成血管紧张素 II (AGT II), AGT II 抑制醛固酮分泌,并促进血管收缩。

ACE 是含锌的二羧基肽酶,它主要存在于血管内皮细胞中,在正常条件下是 AGT I 生成的派遣因子,它的活性决定了 AGT II 的量。

P6A 是 ACE 中等强度的抑制剂。我们的结果表明, P6A 灌流离体大鼠主动脉肌条时,对 AGT II -ir 的含量有明显抑制作用,结果见于表 6.7。AGT II -ir 含量的降低不仅取决于血管中 AGT II 产率的降低,更取决于 AGT II 的释放量下降。

P6A 在 ACE 的作用下水解为两种产物 Ala-Arg-Pro 和 Ala-Lys, 这种水解应当发生在 P6A 与 ACE 结合之后,从这种意义上说, P6A 是 ACE 的底物之一。根据这一推论, P6A 可以成为 ACE 其它底物的竞争性抑制剂。我们的研究表明, P6A 能够明显抑制

大鼠血浆 ACE 的活性和各种组织中 ACE 的活性, 结果见表 6. 8, 6. 9^[5]。

表 6. 7 P6A 对 AGT I -ir 含量的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组别	动脉条 AGT I -ir (pg/100mg)	释放 AGT I -ir (pg/100mg)	AGT I -ir 总量 (pg/100mg)	释放率(%)
1	120.5 ± 32.8	99.3 ± 34.8	219.8 ± 53.2	44.9 ± 4.4
2	98.1 ± 23.8	81.3 ± 16.9	179.4 ± 27.2	44.3 ± 3.2
3	101.5 ± 21.8	76.7 ± 5.6	178.2 ± 18.9*	41.2 ± 1.7*
4	92.6 ± 14.5*	59.8 ± 6.9*	152.4 ± 21.6*	39.3 ± 1.2#

1, 对照; 2, P6A (10^{-5} mol/l); 3, P6A (10^{-6} mol/l); 4, P6A (10^{-4} mol/l); n = 6;
 释放 AGT I -ir 即流出液 AGT I -ir 含量, AGT I -ir 总量 = 动脉条 AGT I -ir + 释放 AGT I -ir, 释放率(%) = 释放 AGT I -ir / 总量 AGT I -ir × 100%; 与对照组比较 *P < 0. 05, #P < 0. 01

表 6. 8 P6A 对 ACE 活性的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组别	血浆 ACE 活性的影响 (U/l)
对照	21.6 ± 0.2
P6A (1×10^{-6})	18.4 ± 0.6*
P6A (1×10^{-5})	13.2 ± 4.4**
P6A (1×10^{-4})	3.5 ± 1.2**

n = 5; 与对照组相比; *P < 0. 05, **P < 0. 01

表 6. 9 P6A 对不同组织 ACE 的抑制作用

	P6A (mol/l)			
	0	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}
心脏	2.154	2.016	1.55	0.358 (u/min/gPr)
主动脉	15.804	12.614	7.584	1.978 (u/min/gPr)
肾	30.666	29.652	26.456	10.854 (u/min/gPr)
肺	227.714	167.748	96.856	19.532 (u/min/gPr)
血清	93.896	76.448	50.9	11.692 (u/min/l)

n = 5

(7) 利用 P6A 对 Ca^{2+} 的影响产生治疗作用

Ca^{2+} 有极重要的生理功能, 是心肌、血管平滑肌等肌肉兴奋-舒张偶联过程中的关键物质, 肌肉收缩是 Ca^{2+} 直接引发的。肌细

表 6.10 P6A 对 Ca^{2+} 的影响

分组	心肌钙含量	肌浆网	
	($\mu\text{molCa}^{2+}/\text{g}$ 干重)	Ca^{2+} -ATP 酶活性 ($\mu\text{molpi}/\text{mg hr}^{-1}$)	Ca^{2+} 摄取(nmol $/\text{mg min}^{-1}$)
对照	$7.94 \pm 1.25^{\#}$	$8.34 \pm 0.3^*$	$18.78 \pm 1.89^{\#}$
缺血	8.56 ± 2.09	7.61 ± 1.05	$11.49 \pm 2.29^*$
缺血/再灌注	14.5 ± 2.85	4.07 ± 0.72	7.83 ± 1.79
巯甲丙脯酸	$7.61 \pm 2.12^{\#}$	$9.63 \pm 1.95^*$	$27.8 \pm 3.86^{\#}$
P6A	$3.2 \pm 0.55^{\#}$	$10.32 \pm 1.49^*$	$14.2 \pm 1.83^*$

$\bar{x} \pm \text{SE}$ 与缺血/再灌注组相比 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ P6A 浓度为 10^{-5}mol/l

胞兴奋时, 细胞外 Ca^{2+} 经肌膜 Ca^{2+} 通道内流, 这又引发细胞内肌浆网 Ca^{2+} 的进一步释放, 胞浆内 Ca^{2+} 触发肌丝滑行而引起肌肉收缩。平滑肌肌浆网发育较差, 血管平滑肌所需要的 Ca^{2+} 主要是细胞外 Ca^{2+} 往钙通道内流而来。钙拮抗剂主要抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 使细胞内缺乏足够的 Ca^{2+} , 进而对心血管系统产生广泛的影响, 例如, 减慢心率、舒张血管。P6A 能有效地降低细胞内 Ca^{2+} 的浓度, 降低缺血再灌注心肌组织中钙离子含量, 提高肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶的活性, 增加 Ca^{2+} 的摄取量, 结果见表 6.10。

(8) 利用 P6A 对 cGMP 的影响产生治疗作用

细胞内 cGMP 水平升高, 可激活 G-激酶, G-激酶既可进一步

促进细胞膜上 Ca^{2+} 泵的转运, 使细胞内 Ca^{2+} 外流, 又可抑制 Ca^{2+} 通道, 减少 Ca^{2+} 内流。还可以抑制肌浆网内贮存 Ca^{2+} 的释放。P6A 显著增加内皮完整的血管的 cGMP 的含量, 与对照组比较, $P < 0.01$ 。对照组血管去内皮后, cGMP 含量降低 7 倍, P6A 孵育可轻度增高 cGMP 含量, 但较孵育内皮完整的血管低 5—7 倍, 亦较对照组内皮完整的血管低 1 倍以上, 结果列入表 6.11。

表 6.11 P6A 对大鼠主动脉 cGMP 含量的影响

组别(mol/l)	cGMP 含量(pmol/mg, $\bar{X} \pm S$)	
	内皮	去内皮
对照	2.02 ± 0.11	0.28 ± 0.01
P6A(10^{-8})	$5.03 \pm 0.18^*$	$0.57 \pm 0.04^*$
P6A(10^{-5})	$5.14 \pm 0.20^*$	$0.80 \pm 0.07^*$
P5A(10^{-4})	$6.08 \pm 0.33^*$	$0.95 \pm 0.05^*$

$n = 5$ * 与对照组相比 $P < 0.01$

表 6.12 P6A 和 UK 对 cGMP 的影响

组别	血浆 cGMP 含量	动脉条 cGMP 含量
	(pmol/ml)	(pmol/mg · pr.)
假血栓组	$2.23 \pm 0.22^{**}$	$1.50 \pm 0.22^{**}$
血栓对照组	3.47 ± 0.32	2.33 ± 0.22
UK 组	2.98 ± 0.32	2.68 ± 0.17
P6A 预防组	$4.23 \pm 0.21^*$	$5.03 \pm 0.12^{**}$
P6A 治疗组	4.05 ± 0.12	$4.72 \pm 0.22^{**}$
UK+P6A 组	$4.36 \pm 0.21^*$	$4.26 \pm 0.33^{**}$

与血栓组相比 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

P6A 还能够有效地提高血浆和动脉肌条中 cGMP 的含量, 临床广泛应用的尿激酶 (UK) 对血浆和动脉肌条中 cGMP 无影响,

UK 也不能协同性地增强 P6A 的这种作用, 结果列入表 6. 12, 该结果说明, UK 和 P6A 有不同的作用机理^[7]。

表 6. 13 P6A 对离体灌流大鼠心脏的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	LVESP		
	灌药前 kPa	药物灌流(%)	停药 10min(%)
对照	8.40 \pm 0.67	99.9 \pm 4.7	102.3 \pm 3.4
P6A(10^{-6})	8.53 \pm 0.93	95.2 \pm 4.6	101.4 \pm 3.7
1×10^{-5}	8.40 \pm 0.93	97.2 \pm 5.9	99.9 \pm 5.1
5×10^{-5}	8.53 \pm 1.33	108.9 \pm 2.9*	100.1 \pm 5.4
1×10^{-4}	9.46 \pm 0.93	110.8 \pm 3.2*	98.8 \pm 4.4
PGI ₂ (10^{-6})	8.53 \pm 1.60	122.4 \pm 10.8*	105.4 \pm 3.4
消+P6A	9.85 \pm 1.33	103.5 \pm 5.6 [#]	101.6 \pm 3.9

注: 药物灌流浓度为 mol/l; 消+P6A 组的 P6A 浓度为 5×10^{-5} mol/

l; 以灌流前水平为 100%; 与对照组比较* $P < 0.01$; 消+P6A 组

与 5×10^{-5} mol/l P6A 组比较[#] $P < 0.05$

(9) P6A 作为临床可用药物的安全度

前面提到的所有生物学活性都表明了 P6A 具有可靠的药效, 为了探讨它的安全性, 我们观察了不同剂量的 P6A 对心脏的影响, 结果表明低剂量的 P6A (10^{-6} /l, 10^{-5} /l) 对心功能未见明显影响, 高浓度 (5×10^{-5} mol/l 和 5×10^{-4} mol/l) 能轻度增加心肌收缩力, 表现为左室末期收缩压 (LVESP) 和左室舒张压峰值 (LV dp/dt_{max}) 增加, 停药后 (3~5 分钟) 迅速恢复到原始水平。在各组心脏实验过程中, LVESP 和心律无明显改变, 组间亦无明显差异, 心电图未见心律异常, 结果见表 6. 13 和表 6. 14^[4]。这些结果说明, P6A 是安全、有效的血管再通剂。

表 6.14 P6A 对离体灌流大鼠心脏的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	LV dp/dt _{max}		
	灌药前(kPa)	药物灌流(%)	停药 10min(%)
对照	148.56±30.33	99.6±13.5	102.5±13.5
P6A 10^{-6}	154.94±35.24	107.4±2.7	100.7±3.9
1×10^{-5}	199.89±16.89	109.9±3.4	98.3±4.2
5×10^{-5}	138.72±27.00	115.5±5.4*	99.5±10.0
1×10^{-4}	152.02±24.07	115.5±6.1*	96.3±3.7
PGI ₂ (10^{-6})	151.89±22.48	123.5±11.3 [§]	106.9±4.4
消-P6A	166.65±52.90	104.1±8.6 [§]	103.9±4.7

药物灌流浓度为 mol/l; 消+P6A 组的 P6A 浓度为 5×10^{-5} mol/l;

以灌流前水平为 100%; 与对照组比较 * $P < 0.05$; $^{\S}P < 0.01$; 消+

P6A 组与 P6A 组 5×10^{-5} mol/l 组比较[§] $P < 0.01$

(10) 对 P6A 进行结构改造, 寻找优秀的抗栓剂

为了建立 P6A 以及类似物在溶液中的构象与生物活性之间关系的理论模型, 我们根据肽段序列中氨基酸侧链的酸碱性及空

表 6.15 P6A 及类似物的舒血管效应

编号	不同剂量下 NE 收缩肌条被舒张的幅度($\bar{X} \pm S$ %)	
	10^{-5} mol/l	10^{-6} mol/l
1	4.37 ± 5.10	6.70 ± 6.96**
2	0.00 ± 0.00	1.31 ± 5.29**
3	-3.20 ± 5.99**	-6.87 ± 3.04**
4	5.96 ± 6.95	16.00 ± 3.84
5	-2.40 ± 5.14*	3.60 ± 9.77
6	29.70 ± 4.16**	33.1 ± 6.59
7	5.72 ± 2.14	22.57 ± 8.35

$n = 6$; 以 NE(10^{-9} mol/L)收缩肌条高度为 100%; 表中的负值表示缩

血管效应; 与 P6A(7)相比, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

间效应,设计并合成了一系列 P6A 类似物,以化合物对大鼠胸主动脉血管条的舒张作用为生物活性指标,进行生物学评价。化合物 1—7 用离体大鼠胸主动脉肌条观察舒血管效应。结果见于表 6.15^[8,9]。

Lys-Arg-Pro-Ala-Lys	(1)
Arg-Arg-Pro-Ala-Lys	(2)
Asp-Arg-Pro-Ala-Lys	(3)
Asn-Arg-Pro-Ala-Lys	(4)
Glu-Arg-Pro-Ala-Lys	(5)
Gln-Arg-Pro-Ala-Lys	(6)
Ala-Arg-Pro-Ala-Lys	(7)
Gly-Arg-Pro-Ala-Lys	(8)

结果表明, P6A 的 N 端残基对舒血管效应有重要影响。化合物 3 和 5 的 N 端残基分别为具有羧基侧链的 Asp 和 Glu, 引入酸性侧链, 使 P6A 的舒血管作用逆转为缩血管作用; 化合物 1 和 2 的 N 端残基分别为具有碱性侧链的 Lys 和 Arg, 引入碱性侧链, 使 P6A 的舒血管作用减弱乃至完全消失; 化合物 4 和 6 的 N 端残基分别为具有酰胺基侧链的 Asn 和 Gln, 前者的舒血管效应与 P6A 相当, 后者则明显强于 P6A, 在 10^{-6} mol/l 的剂量下, 它的作用强度相当于 P6A 作用强度的 6 倍。我们选择舒血管作用较好的 Gln¹P6A (化合物 6) 与 P6A (化合物 7) 分别使用 0.020 mmol/kg 和 0.022 mmol/kg 的剂量, 观察了它们对大鼠平均动脉血压和心率的影响。整体动物实验说明化合物 6 有明确的降压作用和减慢心率的作用。

综上所述, 针对内源性介质 (如 PGI_2 , ACE, ADP, AGT I) 的调控及纤溶系统和肾素-血管紧张素系统的稳态进行的 P6A 类抗

血栓药物研究在纤维蛋白 β 链降解产物的分离、纯化、结构、功能、机理诸方面的研究工作都取得了明显的进展。

2. NO 在细胞中的化学过程及前药设计

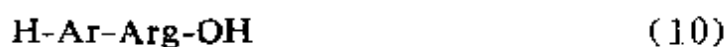
在传统观念中,一氧化氮(NO)是极不受欢迎的小分子化合物之一,因为它污染大气,形成酸雨而危害人类。只是到了最近,由于细胞生物学的研究进展才导致了对 NO 认识的革命性变化。例如在人体中已经发现包括脑、肝脏、胃肠道、胰腺、血管等在内的许多部位,至少有 12 种类型的细胞都存在 NO。NO 作为细胞与细胞间通讯联络的信号分子而成为有益的信使;NO 作为血管内皮舒张因子参与血压控制;NO 因为细胞毒性可以使机体抵御入侵的病源体,NO 也参与一系列疾病(例如 Huntington 舞蹈病、败血性休克、糖尿病、Alzheimer 痴呆及癌症等疾病)的发病过程。这些重要的生物学性质使 NO 研究迅速形成热潮,并取得了一批非常有意义的实验结果。

细胞内存在一种鲜为人知的酶,它的唯一功能就是参与 NO 的生物合成,这种酶被称作 NO 合成酶。NO 合成酶在催化 NO 的合成时有非常特殊的要求,即它所需要的氮来自 L-精氨酸,氧来自氧气。同时还需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)作为电子给予体及四氢生物喋呤(H_4BPT)作为辅因子。在反应过程中,除生成 NO 外,还生成 L-胍氨酸。研究表明,至少存在两种形式的 NO 合成酶。脑和血管壁细胞中的合成酶是时刻存在的组成酶,这种酶通过调节蛋白活化,调节蛋白自身则通过钙离子的细胞内流而活化。在免疫系统的巨噬细胞中,存在另一种形式的 NO 合成酶,这种酶并非时刻存在,只有巨噬细胞接受了特殊的分子信号被活化时才能生成,亦称诱生酶。组成酶和诱生酶被活化的方

式不同,生成的 NO 的量不同。合成 NO 的量的差异造成了它们在人体中的功能差异。根据药物设计理论,我们首先提出了 NO 前药概念,模拟 NO 的各种生物学效应。

(1) 设计 NO 前药,模拟 NO 的舒血管效应^[10]

在试管内, L-精氨酸的胍基对空气中的氧气很稳定,在细胞内酶催化下, L-精氨酸的氧化反应却极为迅速,以至于使用外源性 L-精氨酸,无论是体外还是体内实验,都检测不到与氧化产物有关的生物学效应。虽然外源性 L-精氨酸不能产生 NO 的生物学效应,但从药物设计的角度看,利用前药原理,这种作用是可以模拟的。根据 NO 前体的假设和药物设计理论,具有 NO 样作用的模拟化合物,应以 L-精氨酸为母体,又不像外源性的游离 L-精氨酸那样被体内的酶降解,以便在靶部位保持有效的作用浓度;另一方面,化合物中的胍基又能在代谢过程中转化为 NO,以便发挥预期的生物学效应。根据这些考虑,我们设计并合成了一系列聚 L-精氨酸寡肽及相关化合物。



合成的化合物经 TLC 或 HPLC 确认纯度后,用离体大鼠胸主动脉肌条观察其舒血管效应。结果表明,在 37℃ 的恒温槽内装入以 5%CO₂ 和 95%O₂ 混合气平衡的 Krebs 溶液后, L-精氨酸对 NE 收缩的胸主动脉肌条无影响(剂量为 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴mol/L),而大约 10⁻⁴mol/L 的聚精寡肽类似物均显示明确的舒张效应,化合物 10 和 11 的数据列入表 6.16。

表 6.16 聚精寡肽的舒血管效应

化合物(剂量)	NE 收缩肌条被舒张的幅度 ($\bar{X} \pm S\%$)
8(1×10^{-4})	1.30 \pm 2.60
9(3×10^{-4})	22.71 \pm 12.77
10(1×10^{-4})	36.76 \pm 7.80
11a (1×10^{-5})	39.75 \pm 8.57
11b (5×10^{-5})	44.75 \pm 0.70
11c (1×10^{-4})	48.75 \pm 3.40

NE(10^{-6} mol/l)收缩肌条高度为 100%；实验用肌条内皮完整，

$n=6$ ；9—11c 组与 8 组比， $P < 0.01$ ；10 组与 9 组比， $P < 0.05$ ；11b 组与 10 组比， $P < 0.05$ ；

在 1×10^{-4} mol/l 的剂量下，化合物 9 对 NE 收缩的胸主动脉肌条无影响，化合物 11 在 1×10^{-5} mol/l 的剂量下的舒血管效应与 1×10^{-4} 剂量下化合物 10 的效应相当，这意味着前者的作用强度是后者的十倍。表中所述的三种聚精寡肽都观察到明确的量效依赖关系。

(2) NO 的前药无内皮依赖性

为了考察聚精寡肽的舒血管效应与血管内皮的关系，我们观察了化合物 8、10 和乙酰胆碱对 NE 收缩的有内皮和无内皮的肌条的舒张效应，结果见于表 6.17。聚精寡肽的舒血管效应不依赖于血管内皮细胞，该结果意味着在平滑肌细胞中与内皮细胞一样，也存在 NO 合成酶。

(3) NO 前药的降压效应

在离体动物实验的基础上，进一步观察了化合物 10 和 11 对大鼠平均动脉血压(MAP)的影响，结果见于表 6.18。

表 6.17 化合物 10 的舒血管效应

化合物(剂量)	NE 收缩肌条被舒张的幅度($\bar{X} \pm S\%$)
8a (1×10^{-4} , 有内皮)	1.31 ± 2.60
8b (1×10^{-4} , 无内皮)	2.88 ± 1.42
10a (1×10^{-4} , 有内皮)	36.76 ± 7.80
10b (1×10^{-4} , 无内皮)	32.20 ± 10.90

以 NE (10^{-8} mol/l) 收缩肌条高度为 100%；在使用的实验条件下，乙酰胆碱对 NE 收缩的云内皮肌条无舒张效应；8b 组与 8a 组比，无显著性差异；10b 组与 10a 组比，无显著性差异；10a, 10b 组与 8a, 8b 组比， $P < 0.01$

各组动物给药前 MAP(14.3—17.1 kPa)都很接近，组间差异无统计学意义。静脉注射不同剂量的化合物 8, 大鼠的 MAP 无明显变化。静脉注射 1/2 量的化合物 10(0.010 mmol/kg 和 0.015 mmol/kg)或化合物 11(0.010 mmol/kg)，则明显降低大鼠的 MAP，呈现量效依赖关系。5min 后降至最低，10 min 后 MAP 开始回升，30 min 内仍不能恢复到给药前水平。化合物 10 的剂量降至 0.006 mmol/kg，化合物 11 的剂量降至 0.004 mmol/kg 时，看不到明显的生物学效应。化合物 11 与化合物 10 相比(剂量，0.01 mmol/kg)，前者的舒血管和降血压作用均比后者强。

离体和整体动物实验，得到了相互支持的结果。这些结果表明，聚精寡肽具有明确的舒血管和降血压作用。这种类型的生物学效应，正是预期的 EDRF 样作用。化合物 9 的舒血管效应弱于化合物 10，说明羧基对生物活性有影响；化合物 11 的舒血管效应强于化合物 10，说明分子中的胍基数量对生物活性有贡献。

(4) 精氨酸衍生物的生物学效应

Hecker 和同事指出 N^G -NO₂-L-精氨酸和它的甲酯在体外和

表 6.18 聚精寡肽对大鼠 MAP 的影响

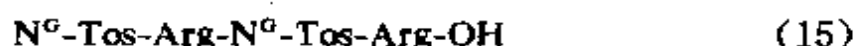
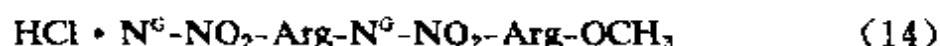
化合物	用药后不同时间 (min) 的 ΔMAP (kPa) ($\bar{X} \pm S$)			
	5	10	20	30
8a	0 ± 0.60	-0.34 ± 0.46	-0.99 ± 0.57	-0.55 ± 0.43
8b	0.37 ± 0.33	-0.34 ± 0.35	-0.50 ± 0.54	-0.53 ± 0.53
8c	-0.39 ± 0.57	-0.58 ± 0.38	-0.47 ± 0.34	-0.53 ± 0.31
10a	-0.66 ± 0.49	-0.37 ± 0.23	-0.31 ± 0.34	-0.42 ± 0.31
10b	-2.52 ± 0.52	-1.56 ± 0.57	-1.40 ± 0.52	-1.09 ± 0.54
10c	-3.96 ± 0.18	-3.32 ± 0.18	-1.80 ± 0.75	-1.75 ± 0.87
11a	-0.23 ± 0.25	-0.39 ± 0.26	-0.42 ± 0.74	-0.50 ± 0.52
11b	-3.11 ± 0.98	-2.26 ± 1.39	-2.26 ± 1.39	-2.15 ± 1.37

$n=5$, 10b, 10c, 11b 与 10a 组比, $P<0.01$; 11b 组与 10b 组比, $P<0.05$;

剂量 (mmol/kg): 8a, 0.011; 8b, 0.020; 8c, 0.029; 10a, 0.006;

10b, 0.010; 10c, 0.015; 11a, 0.004; 11b, 0.010

体内均是 NO 生物合成的有效抑制剂。近几年由于 NO 研究的进展, 以 L-精氨酸衍生物为热点的研究也不断增多。揭示 L-精氨酸衍生物结构对生物活性的作用可能为我们研究有关 EDRF 的药物提供重要信息。为了探索 $\text{N}^G\text{-NO}_2\text{-L-精氨酸}$ 和有关寡肽的生物活性, 我们合成了一系列精氨酸衍生物。合成的化合物经 TLC 和 HPLC 确认纯度 (98—99%) 后用离体大鼠胸主动脉肌条观察其舒血管效应, 结果见于表 6.19。



实验表明, 化合物 8 (10^{-2}mol/l , 10^{-3}mol/l 和 10^{-4}mol/l) 对 NE 收缩的胸主动脉肌条无影响, 而其它四个化合物具有明显的舒张作用。

表 6.19 精氨酸衍生物的舒血管效应

化合物	使收缩肌条舒张的幅度 ($\bar{X} \pm DS\%$)
8	3.88 \pm 1.05
12	61.3 \pm 15.4
13	66.3 \pm 20.7
14	31.9 \pm 13.1
15	15.5 \pm 3.6

剂量为 10^{-4} mol/l, NE(10^{-9} mol/l) 收缩肌条高度为100%, 12-15组与8组相比 $P < 0.01$, 肌条有内皮, $n=6$

表6.20 化合物12和13的舒血管效应

化合物	使收缩肌条舒张的幅度 ($\bar{X} \pm S\%$)
8	2.88 \pm 1.20
12	3.10 \pm 2.50
13	75.2 \pm 24.7

剂量为 10^{-4} mol/l, NE(10^{-9} mol/l)收缩(无内皮)肌条高度为100%, 化合物12与8比较无统计学差异, 化合物13与8比较 $P < 0.01$, $n=6$

表 6.21 化合物13-15对鼠 MAP 的影响

化合物 (mmol/kg)	不同时间的 MAP ($\bar{X} \pm S\%$) (min)		
	10	20	30
8(0.029)	96 \pm 2.9	97 \pm 2.6	96 \pm 2.3
13a(0.059)	128 \pm 4.3 [#]	134 \pm 10.6 [#]	138 \pm 3.8
13b(0.015)	120 \pm 18.0 [#]	124 \pm 20.2 [#]	127 \pm 22.9
14a(0.009)	107 \pm 6.2 [#]	108 \pm 17.9	117 \pm 5.6 [#]
14b(0.004)	92 \pm 9.2	94 \pm 10.0	85 \pm 7.0 [#]
15(0.006)	98 \pm 16.6	88 \pm 16.2	81 \pm 14.8

起始 MAP 为100%, 与化合物8比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$, $n=5$

尽管化合物12和13对有内皮的鼠肌条的舒张作用基本相同, 但在没有内皮细胞存在时, 它们对 NE 收缩的影响有很大差别, 化

合物12具有内皮依赖性, 化合物13无内皮依赖性, 有关数据见表6. 20。各化合物对大鼠平均动脉血压(MAP)的影响见表6. 21。

表6. 21表明化合物13使 MAP 明显增加; 化合物14具有双向作用, 高剂量时使 MAP 增加, 低剂量时使 MAP 降低。化合物15显示明显的降血压作用。所有这些作用都持续1小时以上。另外观察了化合物15对高血压大鼠 MAP 的影响。数据见表6. 22。

表6. 22 化合物15对正常大鼠和高血压大鼠 MAP 的影响

化合物	不同时间(min)的 MAP($\bar{X} \pm S\%$)			
	10	20	30	50
A	94.2 \pm 7.4	96.4 \pm 7.7	94.7 \pm 9.4	96.4 \pm 7.7
B	87.8 \pm 16.2	86.5 \pm 16.3	82.3 \pm 12.4	84.6 \pm 7.2*
C	82.8 \pm 18.8	81.2 \pm 9.8*	81.1 \pm 7.7*	80.7 \pm 6.6 [#]
D	96.6 \pm 8.1	96.2 \pm 4.6	96.1 \pm 7.7	98.9 \pm 6.4
E	93.2 \pm 12.9	90.7 \pm 9.9	94.4 \pm 18.3	96.2 \pm 7.7
F	86.6 \pm 7.5*	88.2 \pm 6.4*	90.2 \pm 12.4	92.1 \pm 10.4

起始 MAP 为100%, A, B, C 为正常鼠组; D, E, F 为高血压鼠组;

A, D = 化合物8, 剂量为0.013 mmol/kg; 在剂量为0.032 mmol/kg

和0.064 mmol/kg 时 D 没有降压作用; B, C, E, F = 化合物15, 前

二者剂量为0.008 mmol/kg, 后二者剂量为0.016 mmol/kg, 与化

合物8相比 * $P < 0.05$; [#] $P < 0.01$; $n = 5$

实验表明剂量为 0.016 mmol/kg 对化合物15具有明显的降压作用, 而且作用持续20 min, 该结果与化合物10具有相似性。这可能是前者在体内代谢时脱去 Tos 保护基转变为化合物10导致的。

实验提示, 化合物15可能对高血压大鼠也有明显的舒血管作用。由于它的生物活性可以被化合物12阻断, 所以可以认为它在

体内是通过 NO 显示活性, 而且具有内皮依赖性, 有关数据见表 6. 23。

表 6. 23 化合物 15 对高血压鼠肌条的影响

化合物	使 NE 收缩肌条舒张的幅度 ($\bar{X} \pm S\%$)
8	1.20 \pm 1.38
15a(有内皮)	20.08 \pm 6.90
15b(无内皮)	8.57 \pm 1.93

$n = 6$; 剂量为 10^{-6} mol/l, NE (10^{-6} mol/l) 收缩肌条高度为 100%, 与化合物 8 相比均有 $P < 0.01$ 。舒张后使用 2×10^{-3} mol 的化合物 12, 收缩幅度为 $25.08 \pm 18.09\%$, 且 $P < 0.01$

化合物 13 对鼠动脉肌条 cGMP 水平有明显影响, 数据见于表 6. 24。这种影响可能是它作为 NO 拮抗剂的根据。

表 6. 24 化合物 13 对鼠动脉肌条的 cGMP 影响

组	剂量 (mol/l)	cGMP (pmol/mg) ($\bar{X} \pm S$)
正常组		2.84 \pm 0.88
13a	10^{-5}	1.34 \pm 0.74
13b	10^{-4}	0.69 \pm 0.70
12a	10^{-5}	1.38 \pm 0.71
12b	10^{-4}	0.75 \pm 0.34
8	10^{-3}	2.34 \pm 0.63
13b + 8		2.07 \pm 0.71
13a + 8		2.23 \pm 0.77

(5) 用桥联精氨酸模拟 NO 的生物效应

我们的研究表明, 采用特殊的形式对 L-Arg 的 N 端或 C 端进行封锁, L-精氨酸的胍基在体内的氧化反应速度减慢, 并宏观

检测到 NO 样效应。桥联化合物包括 $\text{CH}_2(\text{COArg})_2$ 和 $(\text{CH}_2\text{COArg})_2$ 。这些化合物无论是离体还是整体动物实验，都获得了有意义的 NO 样生物效应，强度一方面是剂量依赖的，一方面是与 L-Arg 的 C 端或 N 端封闭的形式相关联的。该结果为设计新的 NO 前体药物，提供了依据。

NO 在细胞内的生物功能，归结到底与它的物理(小分子、脂溶性)及化学性质(电子排布)相联系。例如小分子化合物易于扩散，电中性的脂溶性化合物易于通过细胞膜。又例如 NO 至少含一个未用电子，可以和许多含未享电子的其它原子或分子迅速反应。普通存在于细胞内的分子中的最重要的顺磁性物质是 O_2 、过氧根及各种结合到蛋白上的金属(通常是铁、铜、锰)。与这类物质的反应恰恰是细胞内 NO 作用的化学基础。在已知的反应中，意义最明确的是 NO 与金属蛋白反应生成配位化合物。与蛋白上的金属的络合反应可以导致两种相反的生物效应，一些场合下，NO 激发某种酶的催化效应而活化蛋白；在另一些场合下，NO 结合到蛋白活性部位的金属上，阻止它发挥正常功能。例如 NO 结合到血红蛋白分子输氧位置导致失活。生物体内的金属蛋白对正常的生理过程或异常的病理过程均有重要影响，NO 与金属蛋白反应的产物可产生非常的生物效应。例如 NO 与 $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4]_2$ 型铁硫蛋白生成的络合物具有致癌作用，而 NO 与另一类铁酶发生特异性反应，生成的 $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4]_2$ 型络合物，则具有明确的抗菌作用。

甚至在不清楚巨噬细胞利用 NO 损伤感染细胞之前就已经发现巨噬细胞影响感染肿瘤细胞呼吸和 DNA 合成，故这种功能损失是致命的。导致铁酶失活的根本原因，当然是 NO 与铁的络合反应。这是很有意义的结果，它支持了肿瘤的免疫监视理论。从这个

角度讲，体内随时都在发生癌细胞的转移，癌细胞一出现，免疫系统就通过 NO 与癌细胞中的铁酶配位，导致杀灭作用，只有在免疫系统功能低下时，癌才能生长。

无论是在细胞间传递信息，还是到达作用靶点，往往依赖于分子的扩散或穿透能力。NO 在神经系统中的情形正是如此。一般说来，神经递质从一个神经元释放并作用于细胞间紧紧偶联位置的第二个神经元。这种作用可以是增加细胞电活性的兴奋作用，也可以是降低电活性的抑制作用。两种作用通常都通过分子事件流来完成，最终导致神经膜中离子通道的启开或关闭。正离子或负离子流入或流出神经元，改变了细胞膜的电势，使兴奋或抑制作用到达终点。

NO 不仅是中枢神经系统的信使物质，脑和外周神经系统中似乎有更多的区域也使用它作为神经递质。NO 作为神经递质与传统神经递质明显不同。大多数神经递质制造于突触前，储存于突触前末端，NO 则不储存于突触颗粒中，制成后立即使用。正因为 NO 是小分子并呈电中性，故极易自由扩散透过细胞膜进入靶细胞内与受体鸟苷酸环化酶结合。NO 的中性小分子所具备的易扩散性，同样使它具有细胞间信息交换功能。例如 NO 的亲脂性使之能在血管平滑肌细胞之间，与鸟苷酸环化酶的血红素分子配位生成络合物，这是鸟苷酸环化酶的活化形式。激活的鸟苷酸环化酶使细胞大量合成 cGMP，后者作为信号发挥功能，导致血管舒张效应。

测定金属存在的一种有效方法是顺磁共振。由于不同的顺磁化合物具有不同的顺磁性质，所以顺磁共振谱可以区别不同类型的顺磁分子及由它们形成的络合物。另外，由于实质上的所有其它生物分子不是顺磁性的，而结合了 NO 的生物分子是顺磁性

的,所以该技术可以识别组织和细胞中的金属-NO 络合物。正是利用 NO 的顺磁性质, Lancaster 等使用顺磁共振谱为亚硝基化合物的致癌机理,以及 NO 在器官移植的排斥反应中的作用提供了实验证据。

在细胞免疫过程中,具有杀灭功能的细胞会释放进一步活化其它细胞的分子信号或毒素。在过去的几十年里,免疫学的任务之一便是寻找这些信号和毒素。八十年代,揭示出 NO 是其中的一种。NO 的这种作用使能够产生 NO 的药物具有抗菌、抗病毒和抗癌等重要的临床意义。

八十年代发现乙酰胆碱的舒血管作用,是通过刺激血管内皮释放的因子来实现的。这种因子就是前面提到过的 EDRF,后来确认它就是 NO。NO 可以有效地扩张血管、抑制血小板聚集、降低血压。NO 的这类效应使能够产生 NO 的药物具有血管再通和降低血压等重要的临床意义。由于澄清了 NO 舒张血管的机制,使得对人体如何控制血压的理解发生了革命性的变化。在发现 NO 以前,一般都假定未兴奋的血管是舒张的,现在很明确,未兴奋的血管是收缩的,只有调节舒张因子的生成才能使得血管保持持续舒张而维持血压控制。

在大脑的兴奋性神经传递中,受体分子 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)活化,并与药物选择性结合,有特殊意义。因为在对 NMDA 受体活化的应答中,突触后神经元释放 NO,兴奋相邻神经元产生 cGMP。这样一来,NO 实际上介导了神经元的相互作用。NO 的这种类型的作用还和脑细胞的发育、学习和记忆过程等有关,因而具有明显的临床意义。对于 NO 是组织和人体中许多细胞维持每日活性至关重要的因子,现在几乎没有任何疑义。像生命过程中的许多方面一样,NO 也具有不好的一面。在过去的两年

中，澄清了 NO 参与的许多疾病过程。

败血性休克的典型症状是血压急剧下降以及肝脏、胃脏和心脏的功能衰竭。这些致命的功能衰竭导致大部分患者不能存活，死亡率高达80%，仅美国每年就有三十万人因此丧生。这些器官的功能衰竭并非由细菌感染直接引起，而是由过分的免疫应答所致，特别是免疫系统中细胞介导的应答失控。目前虽然对 NO 的确切作用并不清楚，但 NO 是败血性休克中器官衰竭的主要因素已确定无疑，而且至少有一例严重的患者应用 L-精氨酸的类似物进行治疗而存活。胰岛素依赖形成的糖尿病 mellitus 是免疫应答错误导向造成的，在一些糖尿病 mellitus 的病例中，宿主的免疫系统把宿主胰岛的胰岛素生成细胞当做外来机体，在应答中加以摧毁。这种免疫应答的错误导向与 NO 有直接关联。

除前面提到 NO 与 Huntington 舞蹈病及 Alzheimer 痴呆等神经系统疾患有关外，还与癌症及心血管疾病有关。例如心脏病之后的心肌损伤，虽然 NO 在其中的确切作用还不清楚，但 NO 是损害心肌细胞毒性游离基的重要中间体这一点却已十分明了。

NO 与氧反应最终生成大体上无活性的 NO_2 和亚硝酸盐。这是 NO 在细胞中失活的典型途径。因为 NO 与氧的反应活性极高，所以细胞不需要酶机制清除 NO。NO 分子的高度活性，同样意味着它的生物学效应在很大程度上直接依赖于它在细胞中的生成量及它介导的环境。

NO 的理化性质虽然为广大化学工作者所熟悉，但在细胞中由这些理化性质造成的重要的生物学效应，却是近几年来逐步揭示出来的。有关的信息为我们认识小分子化合物在生命过程中的重要作用提供了极好的范例。从生物学现象中可以抽出许多药物化学问题进行研究，例如 NO 相关药物及拮抗剂的设计与合成。

与 NO 相关的生物学研究已经是极为热烈的领域,从药物化学角度进行的研究刚刚起步,有关结果已经显示了广阔的发展前景,今后必定会给许多重大疾病的防治工作提供新的武器。

3. 纤维蛋白 α 及 γ 链相关多肽

纤维蛋白与血小板表面受体糖蛋白 I_b/II_a ($\text{GP I}_b/\text{II}_a$) 复合物结合,是血小板聚集和血栓形成的重要原因之一。研究 $\text{GP I}_b/\text{II}_a$ 与纤维蛋白 α 及 γ 链的结合确定了在介导其自身与 $\text{GP I}_b/\text{II}_a$ 接触的纤维蛋白分子中存在三种不同的识别序列,即纤维蛋白 α 链序列 572—575 (Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS)、95—98 (Arg-Gly-Asp-Phe, RGDF) 和 γ 链序列 400—411 (His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, HHLGGAKQAGDV, 隐义的 RGD 型序列),后者有时扩大到 397—411 (Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, GQQHHLGGAKQAGDV),是血小板聚集过程中纤维蛋白识别和结合到血小板表面受体 $\text{GP I}_b/\text{II}_a$ 的关键序列。这些序列及其衍生物能够有效地抑制各种因子诱导的血小板聚集,有些还显示明确的抗栓作用。由于对致命的血管栓塞性疾病化疗上的困境,这类小分子多肽作为潜在的抗栓剂引起了研究人员的广泛兴趣,迅速形成了一个令人振奋的领域,发表了大量论文,取得了许多进展。

研究表明,血小板膜 $\text{GP I}_b/\text{II}_a$ 是名为 integrins 受体家族的成员,integrins 可以识别它们配基中的 RGD 序列。 $\text{GP I}_b/\text{II}_a$ 至少与三种不同的粘附配基(纤维蛋白、fibronectin, FN 以及 von Willebrand factor, vWF)相互作用,这些相互作用被含 RGD 序列的多肽抑制。多克隆抗体引起对 RGDF 序列的对抗,而 γ 链羧端区域专属性地与固相酶连接的免疫吸附剂起检测反应以及与溶液中的

蛋白发生免疫沉淀,这些抗体制备的纤维蛋白片段可以抑制纤维蛋白-血小板相互作用及聚集。这些结果说明,这两种序列在纤维蛋白中都可接近,并参与配基结合和细胞-细胞相互作用中。进一步考查 γ 链多肽与血小板的相互作用,发现RGDF和 γ 链多肽对标记的 γ 链多肽结合到ADP兴奋的血小板上产生类似的剂量依赖的抑制。这些结果为存在于 α 链95—98的RGDF序列及 γ 链401—411序列存在两个识别部位提供了佐证,这两个部位分别有RGD和隐义的RGD序列,并与血小板GP I_b/II_a上的相同部位或相互排斥的部位发生相互作用。

血小板聚集是正常止血的要素,并依赖于膜糖蛋白 I_b/II_a。与血浆粘附糖蛋白包括纤维蛋白原 von Willebrand 因子和 fibronectin 的相互作用。血小板纤维蛋白原受体糖蛋白 I_b/II_a属于细胞表面受体 integrin supergene 家族,该受体造成纤维结合于各种粘附蛋白。虽然在未激活的血小板中仅存在极少功能化的糖蛋白的 I_b/II_a。但血小板活化时功能化受体的数目增加,这或许是由于受体的构象变化使得容易为纤维蛋白接近,或者由于血小板表面重组,使更多的受体暴露。

在血小板聚集中,纤维蛋白作为辅因子的作用是通过它结合到血小板受体上介导的,而血小板受体是激动的ADP诱导的。含RGD序列的多肽能够抑制三种粘附蛋白向兴奋的血小板粘附,如RGDS能明显抑制ADP和PAF诱导的血小板聚集。用0.38%(终浓度)柠檬酸钠抗凝的正常兔血离心,制备富血小板的血浆。加入自体血浆使血小板数调节至200000/ μ l。在血小板聚集仪中采用标准比浊技术进行血小板聚集研究。使用PAF和ADP为激动剂(终浓度,5 μ l)进行血小板聚集研究。RGDS溶于生理盐水,并加入100 μ l富血小板的血浆中,37℃搅拌。用生理盐水作对照。有关数

据列入表6. 25^[15]。

该观察与 RGDS 延缓血栓形成的发现相符。Krishnamurthi 等研究了 RGDS 对血小板活化过程的影响, 在100—300 μ M 的浓度下, RGDS 能够完全阻断各种血小板激动剂诱导的血小板聚集, 与早时报道的弱激动剂诱导的血栓素合成和5-HT 释放的聚集依赖性相一致, RGDS (100—300 μ M) 抑制由 ADP、肾上腺素、低浓度的凝血酶和胶原诱导的血小板聚集, 但不抑制高浓度的凝血酶和胶原诱导的血小板聚集。由蛋白激酶 C (PKC) 活化剂和 PMA 诱导的5-HT 分泌也不受 RGDS 的影响。但由于 Ca^{2+} 依赖的蛋白酶 (Ca-DP) 的作用, 在 PMA 处理的血小板中的易位膜结合的酶的蛋白水解性降解在 RGDS 的存在下被完全阻断, 从而观察到了膜结合的 PKC 活性的持续增高。RGDS 的这种影响与最近报道的血小板中的 Ca-DP 抑制剂, E₆₄-d 的效应相似, 或者与 PMA 在未搅拌的非聚集的血小板中观察到的效应相似。可见 RGDS 是通过抑制聚集来抑制 Ca-DP 在血小板中的功能。

表6. 25 RGDS 抗血小板聚集作用

诱导剂	RGDS 的终浓度 (mol/l)	抑制率 (%)
ADP	2.4×10^{-7}	37
	4.8×10^{-7}	68
	9.6×10^{-7}	87
PAF	4.8×10^{-7}	12
	9.6×10^{-7}	67

RGDS 的舒血管研究见表6. 26^[16]。断头大鼠的主动脉肌条立即放入装有5ml 用95%O₂和5%CO₂饱和的 Krebs' 溶液 (pH 7. 4)

中。主动脉肌条连接到张力转换器上,记录舒张-收缩曲线。主动脉肌条用 10^{-9} mol/l的去甲肾上腺素收缩。收缩值达峰值后洗净主动脉肌条,并稳定30分钟。更换溶液后,加入去甲肾上腺素(10^{-9} mol/l)。当主动脉肌条的收缩达峰值时,施用RGDS以便观察血管舒张效应。

表6.26 RGDS的舒血管效应

化合物(mol/kg)	NE收缩的肌条被舒张的幅度($\bar{X} \pm S\%$)
对照组	3.00 ± 3.4
RGDS(10^{-6})	$8.08 \pm 5.0^*$
RGDS(10^{-4})	$9.65 \pm 1.5^*$

与对照组比较 $P < 0.05$

用RGDS治疗缺血/再灌注心脏,然后测定心肌中的 Ca^{2+} 含量及肌浆网的钙离子行为,发现RGDS对 Ca^{2+} 的确有直接影响,使心肌中的钙离子含量降低,肌浆网中的钙离子含量升高。结果见表6.27。

表6.27 RGDS对 Ca^{2+} 的影响

分组	心肌钙含量	肌浆网	
	(μmolCa^{2+} /g 干重)	Ca^{2+} -ATP酶活性 ($\mu\text{molPi}/\text{mg h}^{-1}$)	Ca^{2+} 摄取(nmol /mg min $^{-1}$)
对照	7.94 ± 1.25^a	$8.34 \pm 0.3^*$	18.78 ± 1.89^a
缺血	8.56 ± 2.09	7.61 ± 1.05	$11.49 \pm 2.29^*$
缺血/再灌注	14.5 ± 2.85	4.07 ± 0.72	7.83 ± 1.79
硫甲丙脯酸	7.61 ± 2.12^a	$9.63 \pm 1.95^*$	27.8 ± 3.86^a
RGDS	6.05 ± 1.77^a	$10.93 \pm 1.68^*$	$18.34 \pm 3.39^*$

$\bar{X} \pm \text{SE}$ 与缺血/再灌注组比较 $^*P < 0.05$, $^aP < 0.01$ RGDS浓度为 10^{-5} mol/l

在平行实验中,将肌条放入装有 Krebs-Ringer 的碳酸氢钠溶液中,并使其平衡。组织暴露于 RGDS 中,操作同上。然后放入液氮预冷夹中冷却。cGMP 水平分析如前所述。冷冻的组织在 6 % 三氯乙酸中均浆化,离心。上清液用乙醚萃取,部分提取物乙酰化,并用于 cGMP 的放射免疫测定。结果表明, RGDS 可以明显提高主动脉条中 cGMP 含量,数据列入表 6. 28。

表 6. 28 RGDS 对 cGMP 水平的影响

组别	cGMP(pmol/mg) ($\bar{X} \pm S$)
正常主动脉条(空白对照)	1. 89 \pm 0. 3
主动脉条 + RGDS(10^{-5} mol)	4. 68 \pm 1. 9 *
主动脉条 + RGDS(10^{-4} mol)	6. 14 \pm 2. 8 *

与对照组相比 $P < 0. 05$; $n = 6$

三、甾体-多肽相互作用与药物设计中的新思维

类固醇激素是脂溶性化合物,它可自由穿过细胞膜的脂双层结构。一旦进入细胞内,便立即与细胞内受体结合成一种复合物。甾体-受体复合物经“活化”,“位移”后,进入细胞核内,与染色体结合,从而导致染色体的结构发生变化,并产生新的 mRNA,最终诱导合成特异的蛋白质。这就是甾体激素的经典作用机制。

肽类激素一般是与细胞膜表面上的特异受体结合。受体与激素结合后,活化膜内侧的一种或几种效应器。这样激素信号转换为某种可溶性细胞内化学成分,即第二信使,在第二信使的作用下发生一系列生化过程,最后表现特有的生理效应。

随着对激素认识的逐步深入,多肽激素和甾体激素在生物学上的相互关联日益暴露。同时也揭示出许多与经典的激素受体作

用不相吻合的作用模式。例如甾体激素在靶细胞膜上也存在着专属的受体。通过该受体,甾体激素可实现快速膜效应。另一方面,许多多肽激素(如肽类生长因子)的受体也存在于细胞核上,并推测有甾体激素样作用。到目前为止,已有多篇文献报道了动物和人的多种组织细胞存在 NGF, EGF, PDGF 和胰岛素等肽类生长因子的核转移和核结合现象,并且确认了相应核受体存在的可能性。体内某些组织既是类固醇激素的靶组织,也是多肽激素的靶组织。这样,类固醇激素对同时也是肽类激素靶组织的效应就显得异常引人注目。

在所谓允许作用中,类固醇激素确实与多肽激素起增效作用。此现象是 Dwight Ingle 于40年代提出的。尽管允许作用的机理至今尚未澄清,但是这种效应已被不少文献证实。甾体激素和多肽激素之间存在的不容置疑的相互作用构成了我们设计和合成甾体-多肽缀合激素的基础。在这种新型激素中,期望多肽激素的生物学效应被加强,作用时间被延长。根据这种构思,我们合成了具有确切镇痛效果的二肽 H-Arg-Tyr-OH 和 H-Tyr-Arg-OH,并连接到氢化可的松分子上,制得化合物19和20,生物学评价结果见于表6.29和表6.30。

表6.29 化合物19和20的免疫抑制活性

浓度(mol/l)	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	933±160	881±64	1000±195	1088±370
19	799±92	998±400	834±61	1067±231
20	938±293	855±223	1005±392	855±223

对照+细胞: 3354±484

氢化可的松

(16)

H-Arg-Tyr-OH (17)

H-Tyr-Arg-OH (18)

氢化可的松-Arg-Tyr-OH (19)

氢化可的松-Tyr-Arg-OH (20)

体外实验表明, 化合物19和20中氢化可的松的免疫活性得到保留。

表6.30 化合物19和20的镇痛作用

化合物	注药后不同时间(min)测得的痛阈增加($\bar{X} \pm S\%$)			
	10	20	30	40
NS	9.0 \pm 5.0	-1.0 \pm 4.0	-1.0 \pm 6.0	-3.0 \pm 8.0
16	21.2 \pm 7.1	7.0 \pm 8.5	21.5 \pm 8.5	14.3 \pm 12.8
17	35.9 \pm 12.2	55.0 \pm 18.2	57.9 \pm 17.6	22.9 \pm 23.7
19	3.6 \pm 25.9	106.4 \pm 21.0	94.5 \pm 21.4	44.0 \pm 12.7
18	89.1 \pm 18.0	88.5 \pm 17.3	80.8 \pm 21.1	60.8 \pm 14.1
20	115.0 \pm 13.2	70.3 \pm 9.8	106.2 \pm 13.9	97.2 \pm 15.2

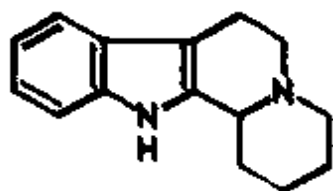
$n = 6$; 化合物19和20的剂量均为0.24 μ mol/10 μ l; 与生理盐水(NS)相比, 化合物16除10min($P < 0.05$)和30min($P < 0.01$)数据点外, 其它各点均无统计学意义。与化合物16相比, 化合物17除40min点外, 所有其它各点都有 $P < 0.01$; 与化合物17相比, 化合物19所有各点都具有 $P < 0.01$; 化合物18与化合物16相比, 各点均有 $P < 0.01$; 与18组相比, 化合物20的10分钟和30min $P < 0.05$, 40min $P < 0.01$, 60min后仍能观察到化合物19和20的镇痛作用, 化合物19使痛阈增加92.0 \pm 8.4%, 化合物20使痛阈增加51.6 \pm 4.6%

上述实验数据证实了预期的设想, 即由甾体激素和多肽激素构成的缀合物相对于多肽激素, 确实一方面起到增效作用, 一方面起到长效作用。这类新型激素无论从非成瘾性镇痛药还是从有

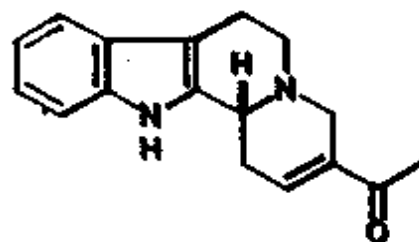
实用价值的肽类药物的研制看都显示了潜在的前途。

四、L-色氨酸的构型诱导及药物设计中的新思维

自然界吲哚生物碱种类繁多，结构复杂，生物活性明确而又重要。吲哚生物碱的消炎、止泻、平喘、止咳、降压、兴奋中枢神经，乃至抗肿瘤作用，在临床上被广泛应用。剖析结构，它们中有相当数量的化合物与 β -咔啉及吲哚喹啉相关。例如 N₆-甲基四氢海曼、6-甲基四氢海曼、6-甲氧四氢 β -咔啉、1-异丁基四氢 β -咔啉、胡颓子碱以及骆驼蓬碱的共同母核为1, 2, 3, 4-四氢- β -咔啉。又例如育亨宾、利血平、利血胺、阿里新以及胆木碱庚和胆木碱辛的共同母核为吲哚喹啉^[19]。外消旋3-乙酰-1, 4, 6, 7, 12, 12b-六氢吲哚[2, 3-a]喹啉作为通用的建筑块，曾被用于一系列吲哚生物碱及羟吲哚生物碱的全合成。作为改进阿马灵新全合成的关键步骤，1985年 Mandal 等发表了该外消旋体的合成。与 Winterfeldt 教授的早期工作相比，该法并无实质性进展。



吲哚喹啉

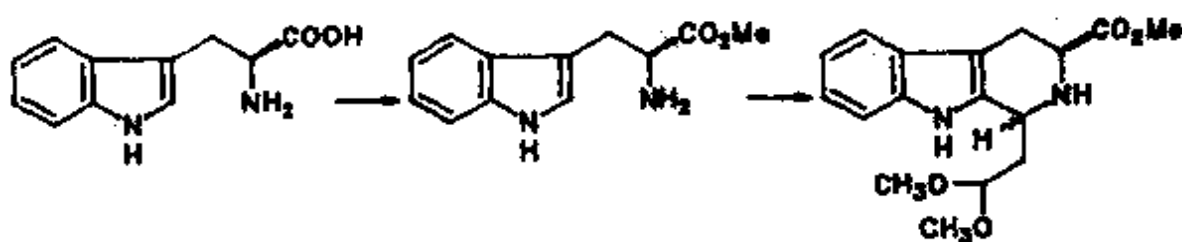


3-乙酰吲哚喹啉

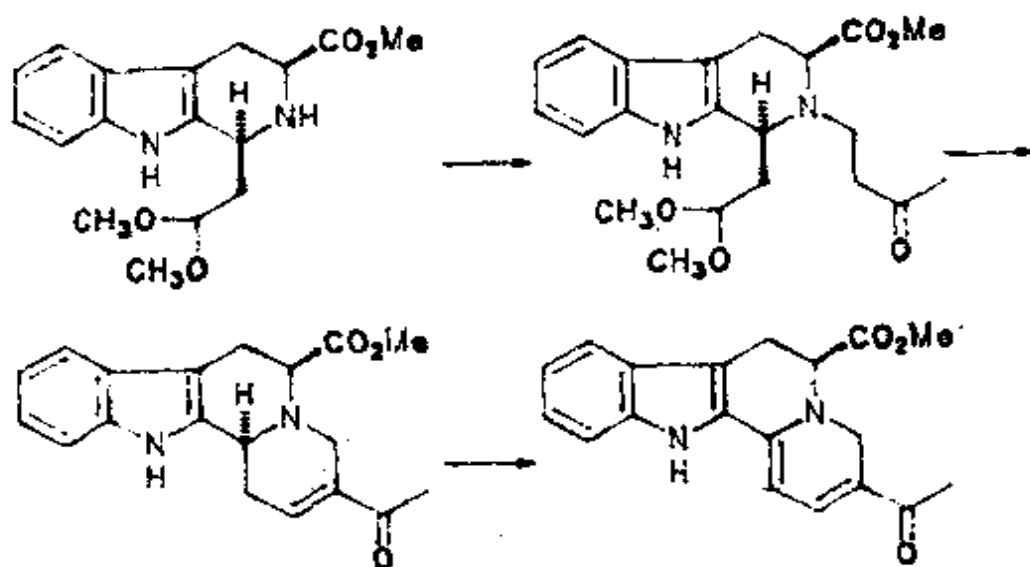
四环的吲哚喹啉是三环 β -咔啉的环合产物，后者由吲哚衍生物在 Pictet-Spengler 反应中环合生成。早期完成的 Pictet-Spengler 反应，大体显示反应在酸催化下进行、用来与色胺缩合的醛必须

对酸稳定以及产物无光学活性等三方面的特点。

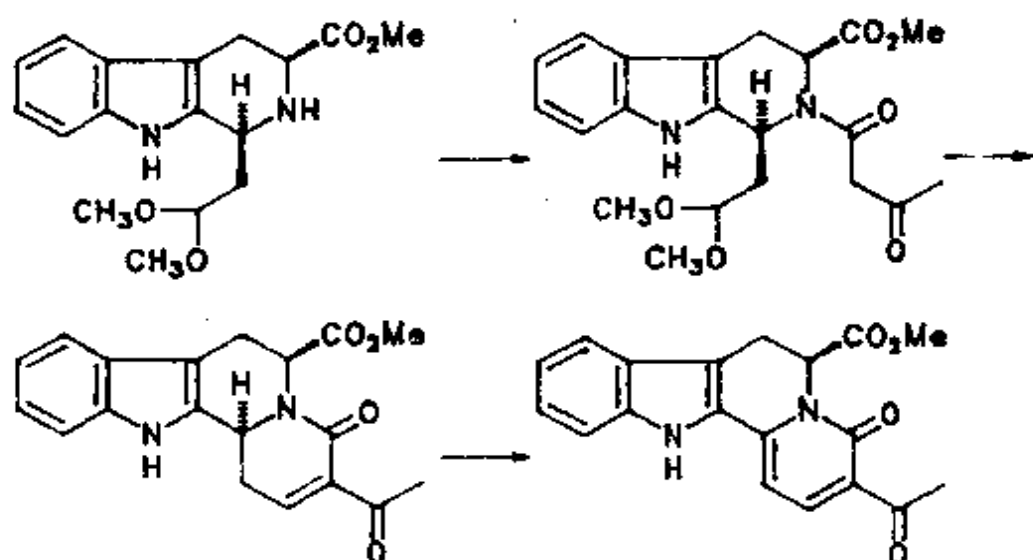
为了实现吲哚喹啉的立体选择性合成，我们以 *L*-色氨酸为原料，利用存在的手性中心的构型诱导作用合成了1, 3-二取代四氢 β -咔啉。在浓盐酸或三氟乙酸催化下，*L*-色氨酸甲酯与丙二醛单甲缩醛室温反应，顺利地生成光学纯的对应的四氢 β -咔啉，并显示了很好的立体选择性，体现了 *L*-色氨酸的构型诱导作用^(20, 21)。正如后面将要看到的那样，这种光学活性 β -咔啉为吲哚生物碱的立体选择性合成开拓了新途径。因为由此出发可以合成各种形式的产物，因此是万能中间体。比如，利用该中间体，我们按下述路线合成了各种各样的光学活性吲哚喹啉衍生物。



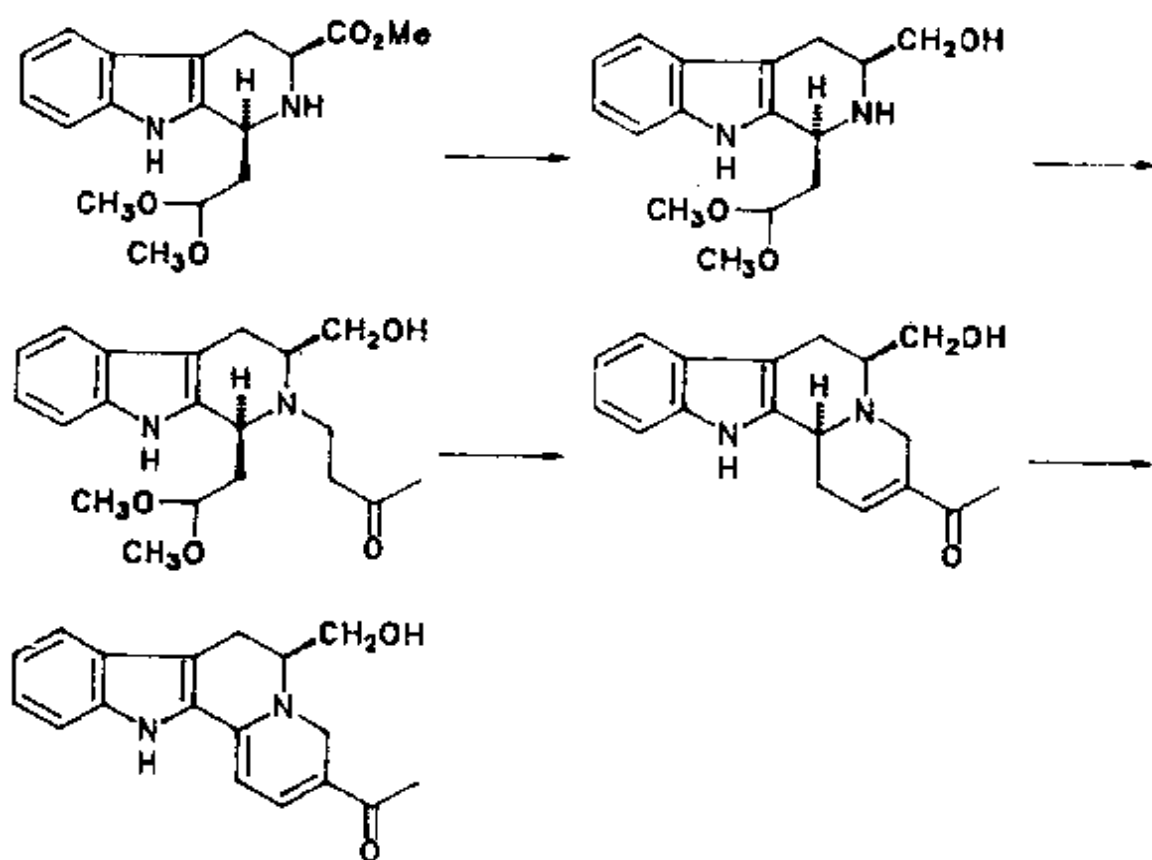
(1) 吲哚喹啉酯的合成



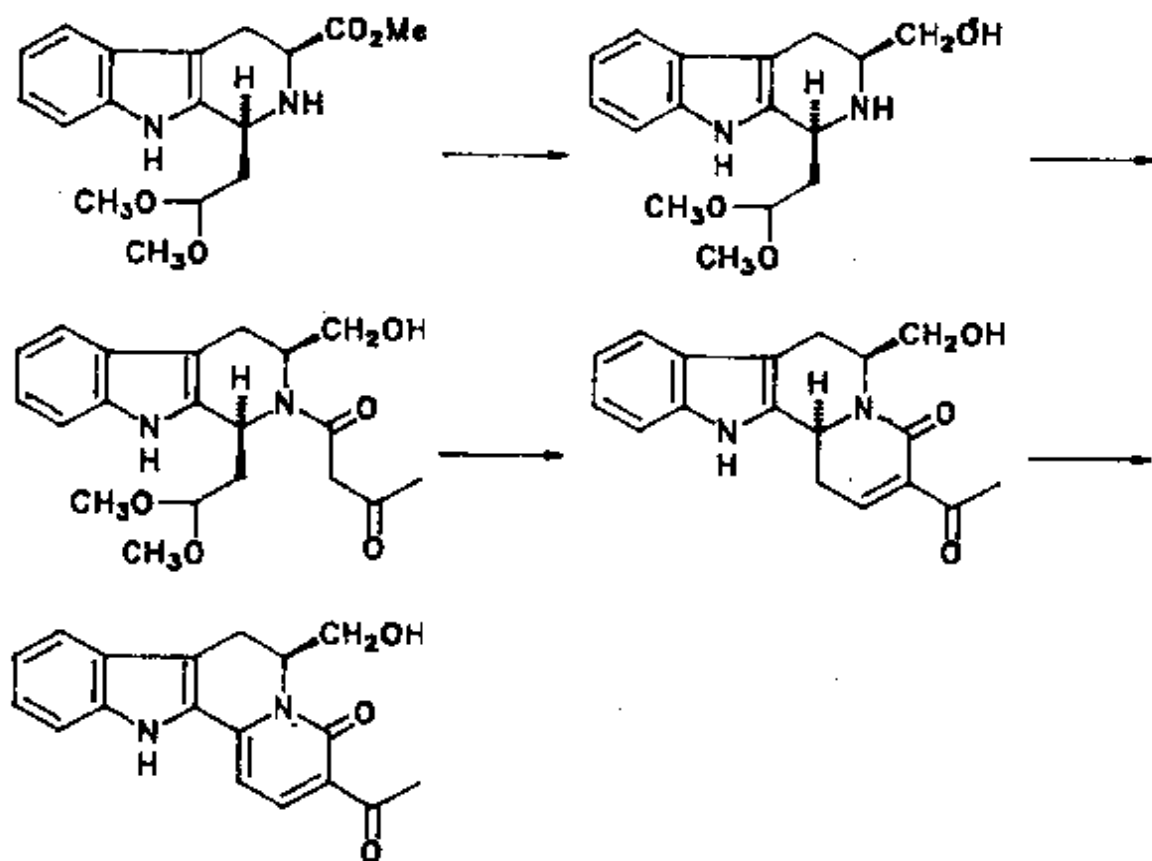
(2) 吲哚嗉酮酯的合成



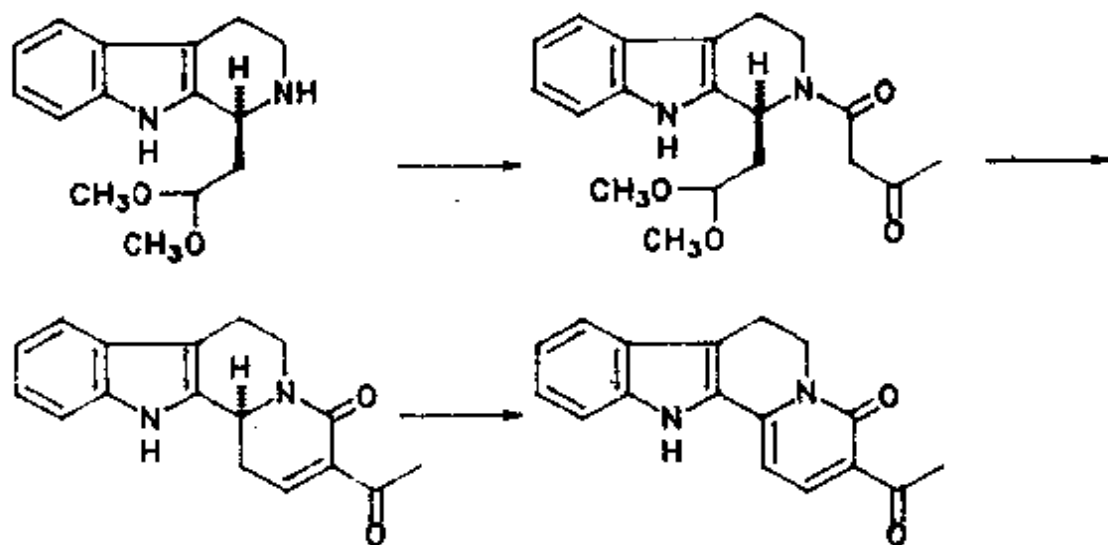
(3) 吲哚嗉醇的合成



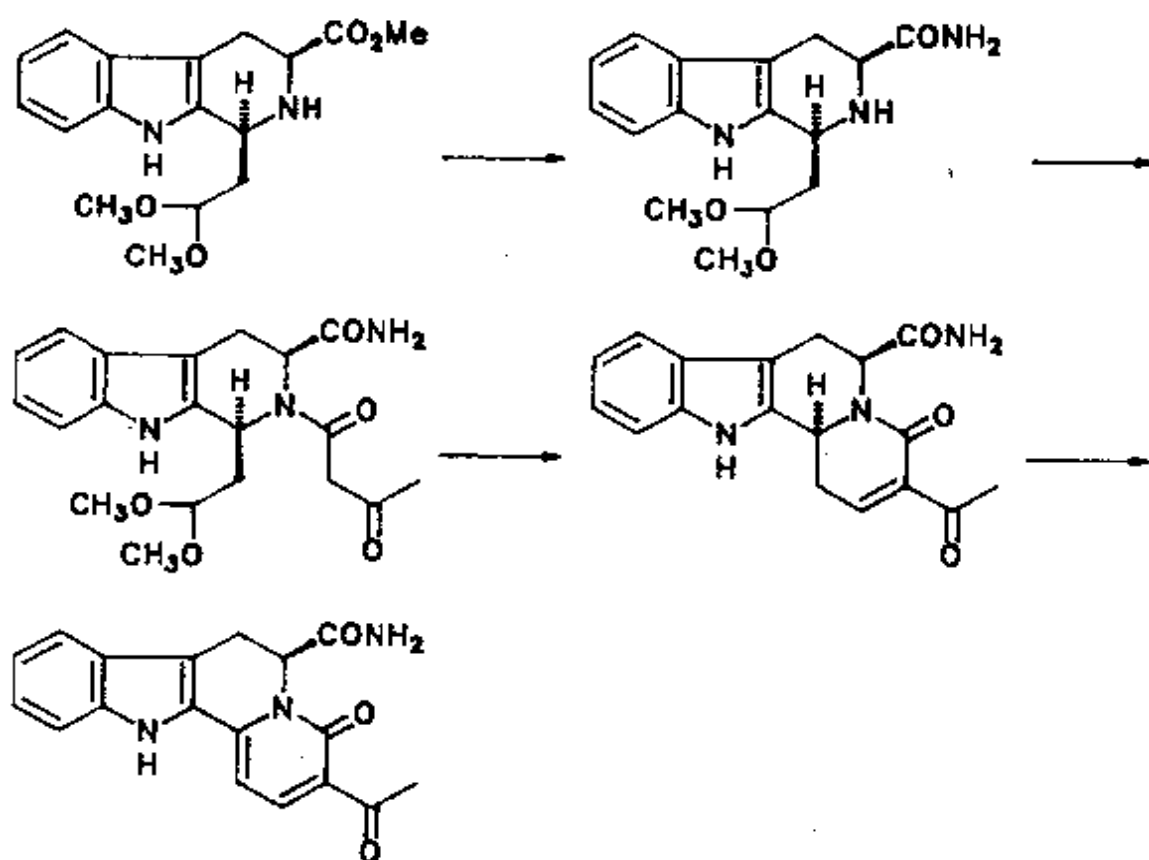
(4) 吡啶嗪酮醇的合成



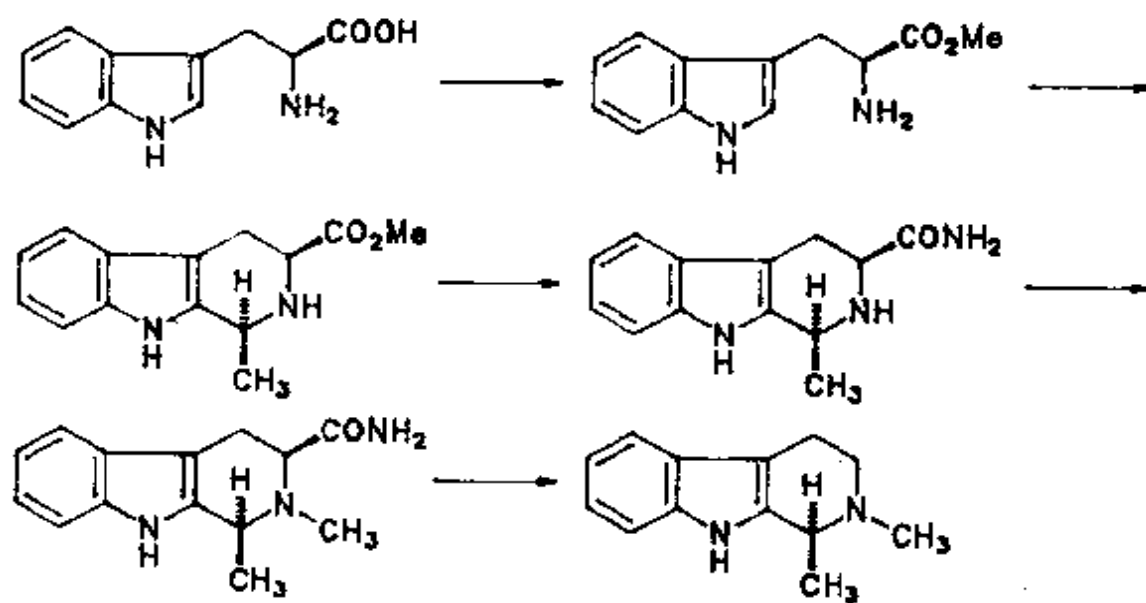
(5) 吲哚嗉嗉酮的合成



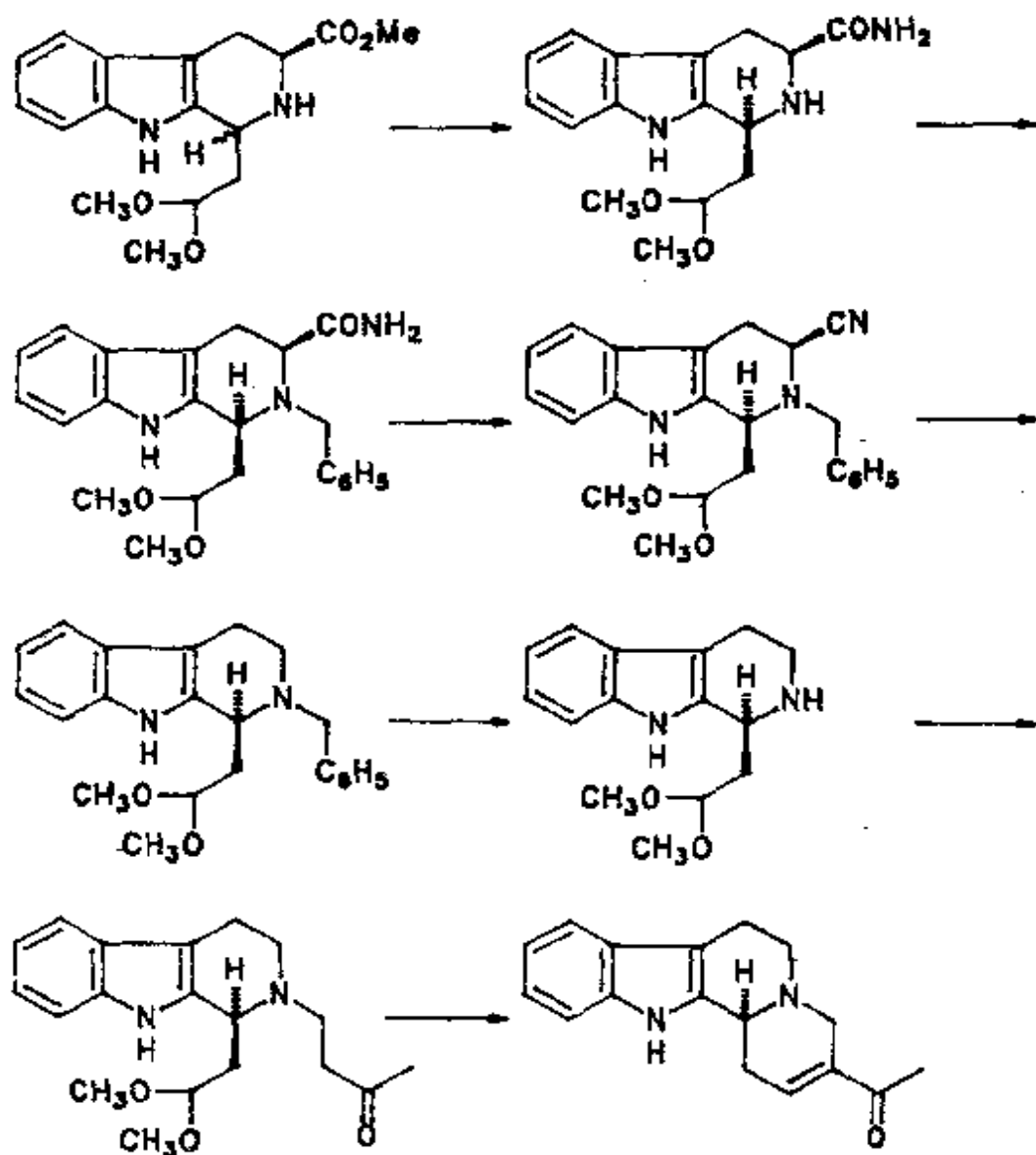
(6) 吲哚嗉酮酰胺的合成



(7) N -甲基四氢海曼的合成



(8) 吲哚嗪的合成



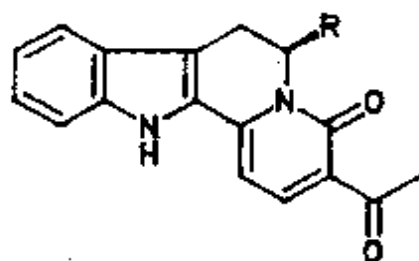
该研究综合了化学方法学、反应机理及立体化学等多方面的成果，为复杂的吲哚生物碱的全合成奠定了基础。

与化学研究的结果相平行，有重要药理作用的吲哚生物碱的全合成开始得到发展，例如按上述路线合成了光学纯的天然产物 N₆-甲基四氢海曼。

在吲哚喹啉酮衍生物的研究中,抗肿瘤活性与结构的关系开始阐明,例如发现了化合物25具有明确的抗肿瘤活性表6.31。

表6.31构芳化吲哚喹啉酮的 HL_{50} 抑制活性

化合物	不同剂量($\mu\text{g/ml}$)的抑制率(%)				
	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
21		—13.9155		—30.7300	—51.6420
22		0.8014		—31.0602	—61.2614
23		5.7170		0.0211	—9.1420
24		11.1958		8.9817	—3.8304
25	5.5264		17.0462		61.0317



- 21: $R = \text{CONH}_2$
 22: $R = \text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{COMe}$
 23: $R = \text{H}$
 24: $R = \text{CH}_2\text{OH}$
 25: $R = \text{CO}_2\text{Me}$

(赵明, 彭师奇)

参 考 文 献

- [1] 赵明, 彭师奇等, 1990, 化学通报, 12, 29。
- [2] 汤健, 赵明, 彭师奇等, 1990, 北京医科大学学报, 22(8), 416。
- [3] 樊贵, 赵明, 彭师奇等, 1991, 北京医科大学学报, 23(5), 358。
- [4] 唐朝枢, 赵明, 彭师奇等, 1991, 中国循环杂志, 28, 606。
- [5] 于严, 赵明, 彭师奇等, 1992, 北京医科大学学报, 24(1), 31。
- [6] 吴翔, 赵明, 彭师奇等, 1992, 北京医科大学学报, 24(3), 185。
- [7] 姚兴海, 赵明, 彭师奇等, 1992, 心肺血管学报, 11(4), 226。

- [8] 赵明,彭师奇等,1992,自然科学进展,待发表。
- [9] 赵明,彭师奇等,1993,化学通报,1,43。
- [10] 顾鸣镛、彭师奇,1991,化学通报,10,32。
- [11] 顾鸣镛、彭师奇等,1992,自然科学进展,2,231。
- [12] 顾鸣镛、彭师奇,唐朝枢,1992,全国科协首届青年年会论文集(医学分册)。
- [13] Gu, M. D. , and Peng S. Q. , et al. , 1992, *J. Chinese Phar.* , 1, 34.
- [14] Gu, M. D. , and Peng S. Q. , et al. , 1992, *Chinese Peptide Symposium*.
- [15] Zhao, M. , Peng, S. Q. , and Tang, C. S. , et al. , 1992, *Chinese Peptide Symposium*, 62.
- [16] Zhao, M. , Peng, S. Q. , and Tang, C. S. , 1993, *J. Chinese Phar.* 2, 18.
- [17] 王超,彭师奇,邱学才,1992,化学通报,9,32。
- [18] Wang, C. , Peng, S. Q. , and Qiu, X. C. et al. , 1992, *Chinese Peptide Symposium*, 76.
- [19] 彭师奇,1991,化学通报,7,1。
- [20] Peng, S. Q. , and Winterfeldt, E. , 1989, *Liebigs Ann. Chem.* , 1045.
- [21] Peng, S. Q. , and Winterfeldt, E. , 1990, *Liebigs Ann. Chem.* , 313.
- [22] Peng, S. Q. , and Winterfeldt, E. , 1990, *Liebigs Ann. Chem.* , 319.
- [23] 杨宪斌,彭师奇, Winterfeldt, E. 等, 1991, 波谱学杂志, 8, 317.
- [24] 江忝益,彭师奇, Winterfeldt, E. 等, 1991, 波谱学杂志, 8, 403.
- [25] 张黎,彭师奇, Winterfeldt, E. 等, 1991, 化学通报, 8, 31.
- [26] 彭师奇,董颖, Winterfeldt, E. 等, 1993, 自然科学进展, 3, 245.
- [27] Peng, S. Q. , Dong Ying, Winterfeldt, E. 等, 1993, 有机化学, 1, 13, 305.
- [28] 杨宪斌,彭师奇, 1993, 波谱学杂志, (清样).
- [29] Peng, S. Q. , and Winterfeldt, E. , 1993, *Liebigs Ann. Chem.* , 137.
- [30] Peng, S. Q. , and Winterfeldt, E. , 1993, *Liebigs Ann. Chem.* , 141.

英(缩写)中名词对照索引

ACE	血管紧张素转化酶
ACM	乙酰氨基甲基
ACTH	促肾上腺皮质激素
Adoc	金刚烷羰基
ADP	二磷酸腺苷
AGT I	血管紧张素 I
AGT II	血管紧张素 II
AHPPA	4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸
AKHI	脂肪氧化激素
Ala(A)	丙氨酸
cAMP	环腺苷酸
ANP(ANF)	心钠素
Aoc	叔戊氧羰基
Arg(R)	精氨酸
Asn(N)	天冬酰胺
Asp(D)	天冬氨酸
ATP	三磷酸腺苷
Boc	叔丁氧羰基
Bpoc	二苯基异丙氧羰基
Bzl	苄基
CD	圆二色散
CPF	冠脉灌流量

CRH	促肾上腺皮质激素释放激素
Cys(C)	半胱氨酸
DAHOA	4,6-二氨基-3-羟基辛酸
DCA	二氯乙酸
DCC	<i>N,N'</i> -二环己基碳二亚胺
DCE	二氯乙醇
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
DNA	脱氧核糖核酸
DNP	二硝基酚
DSIP	催眠肽
EC	乙酰氨基甲酰胺
EDA	乙基二异丙基胺
EDCF	内皮收缩因子
EDRF	内皮舒张因子
EEDQ	1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉
EGF	表皮生长因子
Fgn	纤维蛋白
For	甲酰基
Fm	9-芴甲基
Fmoc	9-芴甲氧羰基
FSH	促卵泡成熟激素
FTS	血清胸腺因子
GH	生长激素
GHRH	生长激素释放激素
GIP	胃抑制肽

Gln(Q)	谷氨酰胺
Glu(E)	谷氨酸
Gly(G)	甘氨酸
cGMP	环鸟苷酸
GP	糖蛋白
GPI	豚鼠回肠
GRP	促胃液素释放肽
H ₄ BPT	四氢生物嘌呤
HDQ	1-异丁氧羰基-2-异丁氧基-1,2-二氢喹啉
HF	氟化氢
HGH	人体生长激素
His(H)	组氨酸
HOBt	1-羟基苯并三唑
HONb	N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰胺
HOSu	N-羟基琥珀酰亚胺
HPLC	高压液相
5-HT	5-羟色胺
Ile	异亮氨酸
IR	红外光谱
LCAO	原子轨道线性组合
Leu(L)	亮氨酸
LHRH	黄体激素释放激素
LPH	β -脂肪酸释放激素
LV dp/dt max	左室舒张压峰值
LVESP	左室末期收缩压
Lys(K)	赖氨酸

MAP	平均动脉血压
Met(M)	蛋氨酸
MIH	黑色素抑制激素
MRH	黑色素释放激素
NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
NCA	<i>N</i> -羧基内酸酐
NE	去甲肾上腺素
NEM	<i>N</i> -乙基吗啉
NGF	神经生长因子
NMDA	<i>N</i> -甲基- <i>D</i> -天冬氨酸
NMM	<i>N</i> -甲基吗啉
NMR	核磁共振
NPS	邻硝基苯硫酯
NT	神经紧张素
OCP	2,4,5-三氯酚酯
ONP	对硝基酚酯
OPCP	五氯酚酯
OPFP	五氟酚酯
OPIP	1-哌啶酯
OPY	2-哌啶酯
ORD	旋光色散
ORF	生长激素释放激素
Orn(O)	鸟氨酸
OSPy	2-哌啶硫酯
OBn ⁺	叔丁酯基
OBzl	苄酯基

PAF	血小板衍化因子
PCH	色素浓缩激素
PDGF	血小板衍化生长因子
PGI ₂	前列环素
pGlu	焦谷氨酸
Phe(F)	苯丙氨酸
PIH	催乳激素释放抑制激素
PKC	蛋白激酶 C
pMZ	对甲氧苄基羰基
PRH	催乳激素释放激素
Pro(P)	脯氨酸
PTT	血浆促凝血酶原激活时间
Pyr	吡啶
REMA	反复过量的混合酸酐法
STH	生长激素
Ser(S)	丝氨酸
SP	P 物质
SWS	慢波睡眠状态
TBT	鼠尾出血时间
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
TFE	三氟乙醇
THF	四氢呋喃
Thr(T)	苏氨酸
TLC	薄层色谱
Tos	对甲加磺酸

TRH	促甲状腺激素释放激素
Trp(W)	色氨酸
TX ₂	血栓素
Tyr(Y)	酪氨酸
UK	尿激酶
UV	紫外光谱
VIP	血管肠肽
Val(V)	缬氨酸
Z-TH	2,2,2-三氟-1-苄氧羰基氨基乙基
Z	苄氧羰基