



论文

具有抗糖尿病活性(拟)二肽分子的设计、合成及生物活性

刘建^①, 晏菊芳^②, 汪林发^①, 范莉^①, 杨大成^{①*}^① 西南大学化学化工学院, 重庆 400715^② 成都地奥制药集团药物筛选中心, 成都 610041

*通讯作者, E-mail: hxydc@swu.edu.cn

谨以本文祝贺西南大学药学院成立五周年

收稿日期: 2010-11-16; 接受日期: 2011-01-09; 网络版发表日期: 2011-08-10

doi: 10.1360/032010-845

摘要 采用液相缩合法, 保护的苯丙氨酸衍生物和氨基葡萄糖衍生物分别与 Fmoc 氨基酸偶联, 简便地得到 9 个未见报道的 L-对硝基苯丙氨酸二肽衍生物 **4a~i** 和 4 个 2-氨基- β -D-葡萄糖拟二肽衍生物 **8a~d**, 收率为 52.4%~88.1%. **4a~i** 选择性碱性水解, 得到 9 个对应的水解产物 **5a~i**, 收率为 64.4%~90.4%. 产物的化学结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HR MS 表征及证实. 体外抗糖尿病活性测试结果表明, 某些化合物具有很强的抗糖尿病活性, 其中化合物 **4c** 和 **8b** 的过氧化物酶体增殖物激活受体反应元件(PPRE)相对激动活性分别达到 150.59% 和 185.23%, EC_{50} 分别为 1.37 μM 和 0.64 μM , 作为新型抗糖尿病先导分子值得进一步研究.

关键词L-对硝基苯丙氨酸
D-氨基葡萄糖
(拟)二肽
合成
过氧化物酶体增殖
物激活受体
抗糖尿病活性

1 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由于机体胰岛素绝对或相对不足以及细胞对胰岛素敏感性降低而引起的内分泌代谢疾病. 目前, DM 已成为全球发病率和死亡率最高的三大非传染性疾病之一, 是威胁人类健康的重大社会问题. 2010 年中国的 DM 患者已达到了 9200 万^[1], 大多数为 2 型糖尿病患者, 表现为胰岛 β 细胞分泌功能缺陷及胰岛素抵抗所致的高血糖及脂肪代谢紊乱等. 目前糖尿病治疗药物种类繁多, 类型各异, 临床上使用的口服 2 型糖尿病治疗药物主要有: 磺酰脲类(甲苯磺丁脲、格列苯脲和格列美脲等)和非磺酰脲类(瑞格列奈、那格列奈和米格列奈等列奈类药物, 磷酸西他列汀和维达列汀等二肽基肽酶-IV 抑制剂)促胰岛素分泌剂^[2, 3], 双胍类抑制胰岛素抵抗药物^[4], 噻唑烷二酮类(吡格列酮和罗格列酮等)

胰岛素增敏剂^[5], 醛糖还原酶抑制剂(托瑞司他和依帕司他等)^[6], α -葡萄糖苷酶抑制剂(阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇等)^[7, 8]. 这些口服药物的出现和广泛使用, 为世界范围 2 型糖尿病的治疗做出了重要贡献. 但是这些药物长期使用会出现程度不等的肝毒性、体重增加、水肿和消化不良等副作用; 更重要的是, 现有降糖药物都不能有效改善糖尿病伴发的脂代谢紊乱. 因此, 研究开发高效低毒的新颖抗糖尿病药物, 既是解决上市药物毒副作用的希望, 也是该领域研究者追求的目标.

近年来多肽类药物在防病治病、调节人体生理机能、降低血压以及抑制肿瘤等方面应用广泛. 小肽类分子, 既可以用于长肽的合成, 也可能体现出重要的生理作用, 如胃泌素四肽、胸腺五肽, 早已用于临床实践. 在抗糖尿病研究方面, 简单二肽 Trp-Glu 也表现出很高的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)拮抗性^[9]. D-氨基葡萄糖(即 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)作为甲壳素的最终降解产物, 参与构成人体组织和细胞膜, 是蛋白多糖大分子制备的中间物质, 其衍生物具有多种重要的生物活性, 在医药领域中有着广泛的应用前景^[10]. L-对硝基苯丙氨酸作为天然氨基酸的替代物在研究 tRNA 运转核糖核酸^[11]以及蛋白质结构与功能的研究^[12]等方面有越来越广泛的应用.

PPAR 是核受体超家族的一员^[13, 14], 存在 PPAR α 、PPAR γ 和 PPAR β (或称 PPAR δ)三种亚型. PPAR 与许多生理和病理过程如细胞分化、脂质代谢、糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化、肿瘤抑制和能量平衡^[15]等密切相关, 其激动剂被成功地应用于 2 型糖尿病的治疗. 目前研究最多的是 PPAR α 和 PPAR γ 及其多重激动剂. 噻唑烷二酮(TZD)类化合物是最早报道的 PPAR γ 合成激动剂, 是 PPAR γ 特异性的高亲和力配体, 能够提高机体对胰岛素的敏感性, 从而改善糖代谢异常, 降低高糖毒性, 并且不出现低血糖现象^[16], 是近年来研究最多也是被认为最有开发潜力的胰岛素增敏剂. TZD 通过激动 PPAR γ 来调节脂肪细胞的分化、提高对胰岛素的敏感性. 这类能激动 PPAR γ 的上市药物有罗格列酮(rosiglitazone)和吡格列酮(pioglitazone)等, 它们的化学结构如图 1 所示.

经典 TZD 类 PPAR 激动剂通常由三部分组成(见图 1): A 部分为亲水性较强的分子结构单元, B 部分是 linker, C 部分为疏水性较强的片段. 我们将手性的 L-对硝基苯丙氨酸或氨基葡萄糖衍生物作为 A 部分, 以氧甲酰基和氨基酸主链骨架充任 linker 部分, 选用疏

水性较强的苄甲基代替 C 部分, 设计了 3 类新型的(拟)二肽类分子, 如图 2.

目标化合物的合成路线如图 3.

通过条件优化, 成功合成了 4a~i, 5a~i 及 8a~d. 所得化合物的结构通过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HR MS 确认. 抗糖尿病体外模型筛选发现, 某些化合物显示很强的 PPAR 激动活性, 其中化合物 4c 和 8b 的过氧化氢酶体增殖物激活受体反应元件(PPRE)相对激动活性分别达到 150.59% 和 185.23%, EC_{50} 为 1.37 μM 和 0.64 μM , 值得进一步研究.

2 实验部分

2.1 主要试剂和仪器

AV-300 型超导核磁共振仪(300 MHz, TMS 为内标, DMSO- d_6 为溶剂); Agilent 1946B MS 质谱仪(ESI, USA); HR ESI-FTICR MS (Varian 7.0T, USA); X-6 型精密显微熔点测定仪(北京福凯仪器有限公司). 葡萄糖苷酶(Sigma, G-0660), 葡萄糖检测试剂(南京建成公司), D-氨基葡萄糖盐酸盐(CP, 中国医药集团上海化学试剂公司), 无水四氢呋喃(AR, 重庆川东化工有限公司, 钠丝干燥蒸馏), 其余试剂均为市售化学纯或分析纯产品.

2.2 (拟)二肽目标化合物的合成

2.2.1 L-对硝基苯丙氨酸(2)的制备

参照文献[17]的方法, 将配制好的混酸(体积比

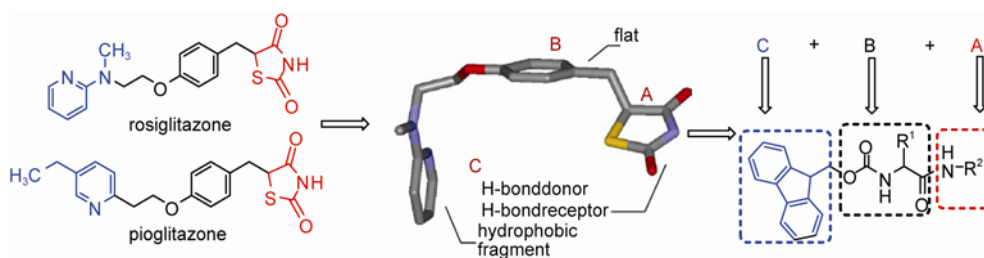


图 1 目标分子设计思路

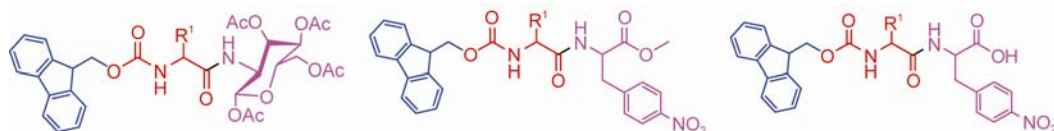


图 2 新型目标分子

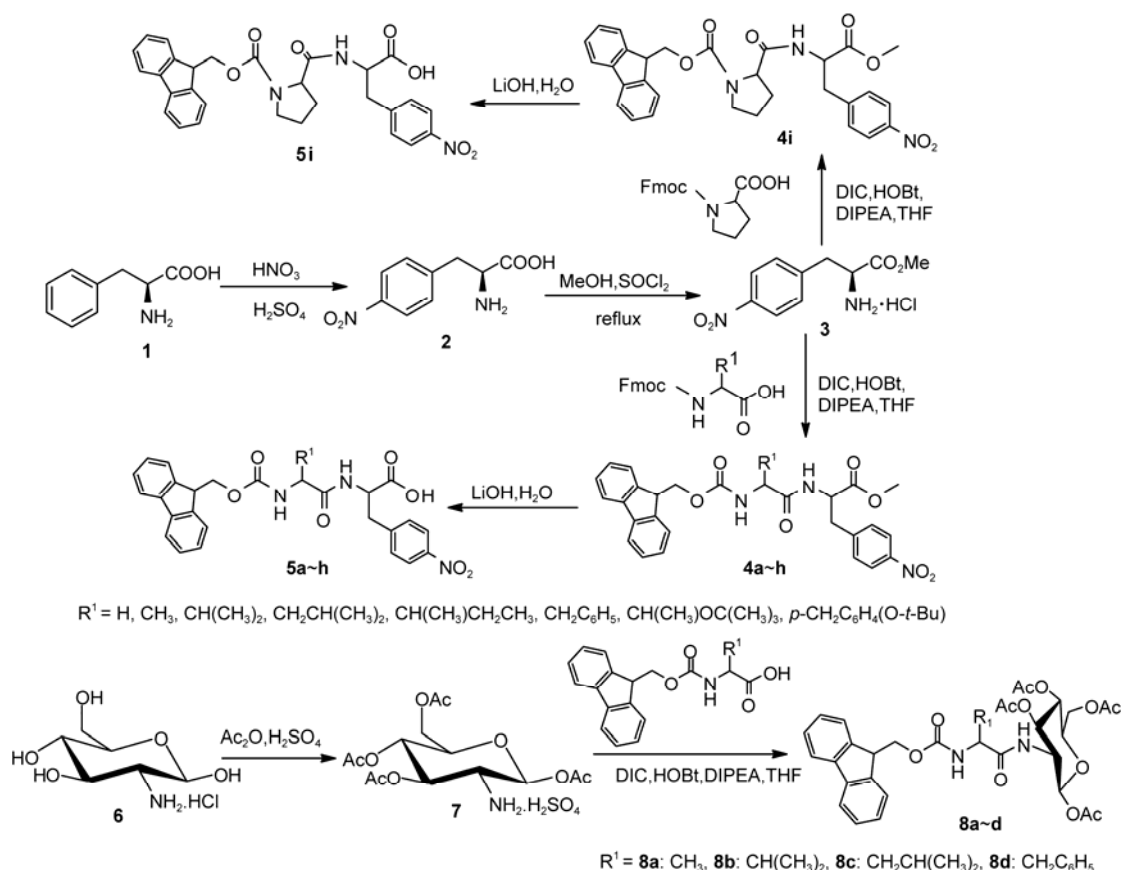


图3 目标化合物的合成路线

$\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4 = 1:1.4$) 12 mL 加入到圆底烧瓶中, 冰浴下分批缓慢加入 L-苯丙氨酸 8.26 g (50 mmol), 搅拌反应约 60 min 后, 升温至室温后继续反应 60 min. 反应结束, 加入少量冰水混合物, 继续搅拌约 15 min, 冰浴冷却下用浓氨水调节 $\text{pH} = 6$, 析出大量沉淀. 冷藏, 过滤, 滤饼用冰水洗涤 3 次、乙醇洗涤 2 次, 干燥, 得纯净 L-对硝基苯丙氨酸白色固体 8.76 g, 收率为 83.4%, $\text{m.p. } 229.0\sim 231.2^\circ\text{C}$.

2.2.2 L-对硝基苯丙氨酸甲酯盐酸盐(3)的制备

量取 20 mL 无水甲醇于 100 mL 圆底烧瓶中, 冰盐浴冷却 20 min, 缓慢滴加 2 mL SOCl_2 (20 min). 继续冰盐浴搅拌 20 min 后, 一次加入对硝基苯丙氨酸 2.133 g. 继续搅拌, 原料逐渐溶解, 呈白色浑浊液. 将反应瓶转移至 70°C 油浴锅中, 搅拌反应, 原料很快全部溶解成黄色澄清液. TLC 监测反应进程, 约 3 h 反应瓶中开始析出白色固体. 待反应完全后, 减压旋蒸至干, 补加适量甲醇且旋蒸至干, 重复 3 次, 以

除去游离 HCl , SOCl_2 和 SO_2 . 抽真空, 称重, 得 2.366 g 白色固体, 收率 89.45%, $\text{m.p. } 223.3\sim 226.1^\circ\text{C}$.

2.2.3 L-对硝基苯丙氨酸甲酯二肽衍生物(4a~i)的制备通法

Fmoc-AA-OH (2 mmol) 溶于无水 THF 2 mL 中, 冰浴、搅拌下加入 HOBt (2.4 mmol)、 DIC (2.4 mmol) 和 DIPEA (2.0 mmol), 加毕, 冰浴下搅拌反应 30~60 min, TLC 法监测活化酯生成情况; L-对硝基苯丙氨酸甲酯盐酸盐 2.0 mmol 溶于无水 THF 1.5 mL 中, 加入 DIPEA (3.0 mmol), 搅拌, 备用; 将上述两种溶液混合, 室温下搅拌反应, TLC 法监测反应进程. 反应完毕后, 减压蒸馏除去 THF, 向残余液中加入水 30 mL, 乙酸乙酯 30 mL 萃取, 分出有机层, 水层用乙酸乙酯 20 mL 萃取, 合并有机层, 依次用 10% 柠檬酸水溶液 (20 mL $\times$ 2)、0.5 mol/L NaHCO_3 水溶液 (20 mL $\times$ 2)、饱和 NaCl 水溶液 (20 mL $\times$ 2) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 柱层析纯化, 得纯品, 实验结果见表 1.

2.2.4 L-对硝基苯丙氨酸二肽衍生物(5a~i)的制备通法

Fmoc-AA-Phe(*p*-NO₂)-OMe (0.3 mmol)溶于 THF 3 mL 中,冰浴搅拌下加入 1 mol/L 氢氧化锂水溶液 2 mL. 加毕,继续搅拌 10 min,加入乙酸乙酯 20 mL 和 0.3 mol/L 盐酸水溶液 15 mL,继续搅拌 5 min, 停止反应,静置分层,分出有机层,水层用乙酸乙酯(15 mL×2)萃取,合并有机层,纯水(20 mL×2)洗涤,无水 Na₂SO₄ 干燥,旋蒸除去乙酸乙酯,乙酸乙酯/石油醚重结晶或柱层析纯化,得 Fmoc-AA-Phe(*p*-NO₂)-OH, 实验结果见表 1.

2.2.5 氨基酸修饰的氨基葡萄糖(8a~d)的制备

化合物 8a~d 的合成及结果参见文献[18].

2.3 PPRE 激动活性检测试验

HepG2 肝癌细胞常规培养于 37 ℃、5%CO₂、含 100 U/mL 链霉素和青霉素的低糖 DMEM 中. 1.5×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板后培养过夜,参照转染试剂说明书进行质粒转染. 转染的质粒包括带有 PPAR 反应元件和萤火虫荧光素酶报告基因的质粒 pPPRE-Luc, 及用作转染内参照的带有海肾荧光素酶的质粒 pHRL-TK, 转染 24 h 后换用含待测样品的培养基,同时设立空白对照(未转染的细胞)、阴性对照(转染的细胞不加样品)和阳性对照(转染的细胞加入匹格列酮,

Pioglitazone). 继续培养 24 h 后用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega)检测荧光素酶活性,根据检测到的化学发光强度 *L* 值计算激动率. 激动率 = [(*L*_{1 样品} - *L*_{1 空白})/(*L*_{1 阴性} - *L*_{1 空白})]/[(*L*_{2 样品} - *L*_{2 空白})/(*L*_{2 阴性} - *L*_{2 空白})]×100%, 其中 *L*₁ 为萤火虫荧光素酶的化学发光强度, *L*₂ 为内参照海肾荧光素酶的化学发光强度;样品检测浓度为 10 μg/mL,检测时设双复孔,重复两次,实验结果见表 2. 相对激动率大于 70%的待测样品进一步测定半数效应浓度(EC₅₀),应用 Xlfit 软件中的 4 Parameter Logistic Model 计算 EC₅₀,实验结果见表 3.

2.4 二肽基肽酶(DPP-IV)抑制剂筛选实验

200 μL 反应体系中含 DPP-IV(Sigma)、25 mmol/L HEPES 缓冲液(含 140 mmol/L NaCl, 1% BSA, 80 mmol/L MgCl₂)和样品,同时设立空白对照(不含酶和样品)和阴性对照(不含样品),室温反应 10 min,加入二肽基肽酶底物 Gly-Pro-Gly-Gly,室温反应 25-40 min,测定荧光强度 *F*,激发波长 355 nm,发射波长 460 nm. 根据荧光强度 *F* 值计算抑制率,抑制率 = [1 - (*F*_{样品} - *F*_{空白})/(*F*_{阴性} - *F*_{空白})]×100%. 初筛时每个样品单浓度设双复孔,重复两次,实验结果见表 2.

3 结果与讨论

郭宗儒教授等^[19]指出,配体分子以 U 形构象结

表 1 目标化合物实验结果及 HR MS 数据

化合物	R	时间 (h)	质量 (mg)	产率 (%)	熔点 (℃)	高分辨质谱		
						分子离子峰	计算值	实验值
4a	H	29.5	586	57.7	182.2~183.1	[M+Na] ⁺	526.1580	526.1585
4b	CH ₃	26.0	596	57.6	177.6~178.1	[M+Na] ⁺	540.1740	540.1741
4c	CH(CH ₃) ₂	22.0	851	77.9	189.7~191.3	[M+Na] ⁺	568.2060	568.2064
4d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	22.5	770	68.7	171.3~173.2	[M+Na] ⁺	582.2219	582.2211
4e	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	20.0	813	72.7	177.6~178.8	[M+Na] ⁺	582.2212	582.2211
4f	CH ₂ C ₆ H ₅	25.5	793	66.3	185.7~188.6	[M+Na] ⁺	616.2060	616.2054
4g	CH(CH ₃)OBu ^t	20.0	748	71.6	136.8~138.1	[M+Na] ⁺	626.2477	626.2473
4h	<i>p</i> -CH ₂ C ₆ H ₄ (OBu ^t)	27.5	640	52.4	171.8~174.7	[M+Na] ⁺	688.2625	688.2629
4i	Pro*	23.0	913	84.5	166.2~167.3	—	—	—
5a	H	0.15	130	88.7	165.6~168.2	[M+Na] ⁺	512.1420	512.1428
5b	CH ₃	0.10	115	76.5	143.3~144.6	—	—	—
5c	CH(CH ₃) ₂	0.10	113	70.7	166.6~167.4	[M-H] ⁻	530.1932	530.1933
5d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.15	144	87.9	146.8~148.2	[M+Na] ⁺	568.2049	568.2064
5e	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	0.15	121	73.8.	167.2~168.5	—	—	—
5f	CH ₂ C ₆ H ₅	0.20	157	90.4	158.2~160.6	[M+Na] ⁺	602.1899	602.1898
5g	CH(CH ₃)OBu ^t	0.25	114	64.4	114.2~116.6	[M+Na] ⁺	612.2322	612.2316
5h	<i>p</i> -CH ₂ C ₆ H ₄ (OBu ^t)	0.25	148	75.9	166.5~167.2	[M+Na] ⁺	674.2470	674.2473
5i	Pro*	0.25	127	80.0	137.8~139.6	[M+Na] ⁺	552.1745	552.1745

表 2 目标化合物的抗糖尿病活性测试结果

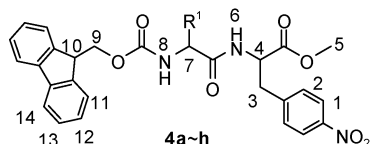
化合物	浓度		DPP-IV 抑制率 (%)	PPRE 激动率 (%)
	($\mu\text{g/mL}$)	(μM)		
4a	10.0	19.87	-2.42	35.46
4b	10.0	19.32	-2.60	16.07
4c	10.0	18.33	-5.83	150.59
4d	10.0	17.87	-6.63	36.25
4e	10.0	17.87	-6.88	47.41
4f	10.0	16.85	-0.89	12.91
4g	10.0	18.40	0.70	8.16
4h	10.0	16.57	0.70	18.45
4i	10.0	15.02	-5.64	21.22
5a	10.0	20.43	-3.70	11.72
5b	10.0	19.87	-1.32	1.83
5c	10.0	18.82	-4.78	27.55
5d	10.0	18.33	-3.84	14.09
5e	10.0	18.33	1.95	31.11
5f	10.0	17.25	2.45	21.22
5g	10.0	18.88	-2.21	12.51
5h	10.0	16.96	-0.60	15.68
5i	10.0	15.34	-3.47	17.66
8a	10.0	15.61	-14.51	20.82
8b	10.0	14.95	-9.77	185.23
8c	10.0	14.65	-6.55	21.22
8d	10.0	13.95	-8.06	6.88
KR-62436	0.30	1.00	73.14	—
Pioglitazone	0.78	2.19	—	100

合在 PPAR 受体腔内. 通过对 TZD 类分子结构的仔细分析, 我们将 Fmoc 的苄甲基设计为 TZD 类分子的疏水部分、氧甲酰基和氨基酸主链骨架充任 Linker、氨基酸或氨基葡萄糖衍生物作为亲水部分, 设计了新型的目标分子. 通过体外抗糖尿病活性筛选, 发现了具有高活性的 PPRE 先导分子.

3.1 实验结果

通过选定的合成方法, 我们成功合成了 3 类具有抗糖尿病活性的目标分子, 收率中等至良好. 将得到的化合物进行表征, 证实合成成功. 实验结果见表 1 及产物结构表征.

3.2 产物结构表征



Fmoc-Gly-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-[2-[(9*H*-苄甲氧基)羰基氨基]-乙酰氨基]-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4a)

表 3 EC₅₀测定结果

化合物	浓度 (μM)	最大激动率 (%)	EC ₅₀ (μM)
4c	18.33	215.81	1.37
8b	14.95	256.96	0.64
Pioglitazone	2.19	123.88	0.03

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.40 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-8), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-14), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-11), 7.48~7.53 (m, 3H, H-2, H-6), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-13), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-12), 4.57~4.61 (m, 1H, H-10), 4.21~4.25 (m, 4H, H-7, H-9), 3.62 (s, 3H, H-5), 3.53~3.58 (m, 1H, H-4), 3.17~3.23 (m, 1H, H-3), 3.02~3.09 (m, 1H, H-3); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.5, 169.3, 156.4, 146.6, 145.5, 143.8, 140.7, 130.6, 127.7, 127.1, 125.2, 123.3, 120.1, 65.7, 52.9, 52.1, 46.6, 43.1, 36.4.

Fmoc-Ala-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-[2-[(9*H*-苄甲氧基)羰基氨基]-丙酰氨基]-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4b)
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.39 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-8), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.8 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-14), 7.71 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-11),

7.49~7.52 (m, 3H, H-2, H-6), 7.42 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-13), 7.32 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-12), 4.56~4.61 (m, 1H, H-10), 4.20~4.24 (m, 3H, H-7, H-9), 4.03~4.08 (m, 1H, H-4), 3.59 (s, 3H, H-5), 3.17~3.24 (m, 1H, H-3), 3.07~3.11 (m, 1H, H-3), 1.17 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.7, 171.4, 155.5, 146.3, 145.5, 143.8, 140.7, 130.5, 127.6, 127.0, 125.2, 123.2, 120.0, 65.8, 52.7, 52.0, 49.7, 46.6, 36.2, 18.0.

Fmoc-Val-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{3-甲基-2-[(9*H*-茛甲氧基)羰基氨基]-丁酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4c) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.49 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-8), 8.09 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-1), 7.89 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, H-14), 7.73 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-11), 7.52 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H-2), 7.30~7.44 (m, 5H, H-6, H-12, H-13), 4.52~4.58 (m, 1H, H-10), 4.20~4.27 (m, 3H, H-7, H-9), 3.80~3.85 (m, 1H, H-4), 3.60 (s, 3H, H-5), 3.05~3.23 (m, 2H, H-3), 1.87~1.94 (m, 1H, CH), 0.82 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 171.4, 171.3, 155.9, 146.3, 145.5, 143.7, 140.7, 130.5, 127.6, 127.0, 125.3, 123.1, 120.1, 65.7, 60.1, 52.6, 51.9, 46.7, 36.2, 30.3, 19.0, 18.3.

Fmoc-Leu-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{4-甲基-2-[(9*H*-茛甲氧基)羰基氨基]-戊酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4d) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.40 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-8), 8.10 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-1), 7.89 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-14), 7.71 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-11), 7.51 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-2), 7.42 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-13), 7.40 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-6), 7.32 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-12), 4.57~4.60 (m, 1H, H-10), 4.19~4.29 (m, 3H, H-7, H-9), 4.00~4.03 (m, 1H, H-4), 3.60 (s, 3H, H-5), 3.17~3.20 (m, 1H, H-3), 3.07~3.11 (m, 1H, H-3), 1.55~1.58 (m, 1H, CH), 1.29~1.34 (m, 2H, CH₂), 0.84 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 173.4, 172.3, 156.7, 147.2, 146.4, 144.9, 141.6, 131.5, 128.5, 127.9, 126.2, 124.1, 121.0, 66.4, 53.8, 53.5, 52.9, 47.6, 40.9, 37.1, 25.0, 23.8.

Fmoc-Ile-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{3-甲基-2-[(9*H*-茛甲氧基)羰基氨基]-戊酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4e) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.49 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-8), 8.08 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-14), 7.72 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz, H-11), 7.51 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-2), 7.38~7.43 (m, 3H, H-6, H-13), 7.32 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-12), 4.57~4.61 (m, 1H, H-10), 4.19~4.27 (m, 3H, H-7, H-9), 3.83~3.87 (m, 1H, H-4), 3.60 (s, 3H, H-5), 3.06~3.25 (m, 2H, H-3),

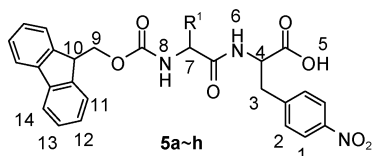
1.64~1.69 (m, 1H, CH), 1.30~1.34 (m, 2H, CH₂), 1.00 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, CH₃), 0.78 (t, 3H, $J = 5.7$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 174.7, 171.5, 155.9, 146.3, 145.6, 144.0, 140.8, 130.6, 127.7, 127.1, 125.4, 123.2, 120.2, 65.7, 59.0, 52.7, 52.0, 46.8, 36.2, 36.2, 24.4, 15.1, 10.8.

Fmoc-Phe-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{3-苯基-2-[(9*H*-茛甲氧基)羰基氨基]-丙酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4f) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.56 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-8), 8.11 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, H-14), 7.64~7.59 (m, 3H, H-6, H-11), 7.52 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-2), 7.40 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-13), 7.18~7.33 (m, 7H, H-12, Ar-H), 4.62~4.64 (m, 1H, H-10), 4.10~4.16 (m, 4H, H-4, H-7, H-9), 3.62 (s, 3H, H-5), 3.10~3.22 (m, 2H, H-3), 2.73~2.92 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 171.8, 171.4, 155.7, 146.3, 145.4, 143.8, 140.7, 138.0, 130.6, 129.2, 128.0, 127.6, 127.0, 126.3, 125.7, 123.2, 120.1, 65.6, 55.8, 52.8, 52.1, 46.5, 37.3, 36.2.

Fmoc-Thr(*t*-Bu)-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{2-[(9*H*-茛甲氧基)羰基氨基]-3-叔丁氧基丁酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4g) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.24 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-8), 8.12 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H-1), 7.89 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, H-14), 7.73 (d, 2H, $J = 6.1$ Hz, H-11), 7.50 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-2), 7.42 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-13), 7.31 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-12), 6.93 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-6), 4.64~4.67 (m, 1H, H-10), 4.21~4.33 (m, 3H, H-7, H-9), 3.95~3.98 (m, 1H, H-4), 3.72~3.75 (m, 1H, CH), 3.61 (s, 3H, H-5), 3.19~3.21 (m, 1H, H-3), 3.10~3.12 (m, 1H, H-3), 1.01 (s, 9H, 3CH₃), 0.95 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 171.2, 169.7, 155.8, 146.4, 145.2, 143.6, 140.7, 130.6, 127.6, 127.0, 125.3, 123.3, 120.1, 73.7, 67.5, 65.8, 59.6, 52.7, 52.0, 46.7, 36.5, 28.0, 19.2.

Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{2-[(9*H*-茛甲氧基)羰基氨基]-3-(4-叔丁氧基苯基)丙酰基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4h) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.41 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-8), 8.11 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-1), 7.87 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-14), 7.64 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz, H-11), 7.58 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-6), 7.52 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-2), 7.40 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-13), 7.30 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, H-12), 7.17 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 6.80 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 4.61~4.64 (m, 1H, H-10), 4.10~4.23 (m, 4H, H-4, H-7, H-9), 3.62 (s, 3H, H-5), 3.21~3.23 (m, 1H, H-3),

3.09~3.13 (m, 1H, H-3), 2.86~2.90 (m, 1H, CH₂), 2.68~2.72 (m, 1H, CH₂), 1.00 (s, 9H, 3CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 171.8, 171.4, 155.7, 153.4, 146.3, 145.4, 143.7, 140.7, 132.5, 130.6, 129.7, 127.7, 127.1, 125.3, 123.2, 120.0, 77.5, 65.7, 55.9, 52.7, 52.0, 46.5, 36.7, 36.2, 28.5.



Fmoc-Gly-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{2-[(9*H*-芴甲氧基)羰基氨基]-乙酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5a) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.95 (s, 1H, H-5), 8.23 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.90 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-14), 7.72 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-11), 7.49~7.55 (m, 3H, H-2, H-6), 7.42 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-13), 7.30 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-12), 4.49~4.56 (m, 1H, H-10), 4.22~4.28 (m, 3H, H-7, H-9), 3.55~3.59 (m, 1H, H-4), 3.20~3.26 (m, 1H, H-3), 3.00~3.08 (m, 1H, H-3); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.8, 169.5, 156.8, 146.7, 145.3, 144.2, 141.1, 131.0, 128.0, 127.4, 125.7, 123.6, 120.5, 66.2, 53.3, 47.0, 43.6, 36.9.

Fmoc-Ala-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{2-[(9*H*-芴甲氧基)羰基氨基]-丙酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5b) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.15 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-8), 8.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-1), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-14), 7.71 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-11), 7.48~7.53 (m, 3H, H-2, H-6), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-13), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-12), 4.43~4.48 (m, 1H, H-10), 4.21~4.24 (m, 3H, H-7, H-9), 4.00~4.05 (m, 1H, H-4), 3.19~3.25 (m, 1H, H-3), 3.01~3.08 (m, 1H, H-3), 1.17 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.5, 172.4, 156.0, 146.7, 145.9, 144.1, 141.1, 131.1, 128.0, 127.5, 125.7, 123.4, 120.5, 66.0, 53.1, 52.1, 47.0, 36.8, 18.5.

Fmoc-Val-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{3-甲基-2-[(9*H*-芴甲氧基)羰基氨基]-丁酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5c) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.30 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-8), 8.07 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-14), 7.72 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-11), 7.51 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-2), 7.28~7.42 (m, 5H, H-6, H-12, H-13), 4.51~4.58 (m, 1H, H-10), 4.18~4.27 (m, 3H, H-7, H-9), 3.78~3.84 (m, 1H, H-4), 3.18~3.24 (m, 1H, H-3), 2.97~3.04 (m, 1H, H-3), 1.85~1.92 (m, 1H,

CH), 0.80 (d, 6H, *J* = 6.0 Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.8, 171.4, 156.3, 146.6, 146.2, 144.1, 141.1, 130.9, 128.0, 127.5, 125.7, 123.5, 120.5, 66.1, 60.5, 53.0, 47.1, 36.8, 30.7, 19.5, 18.7.

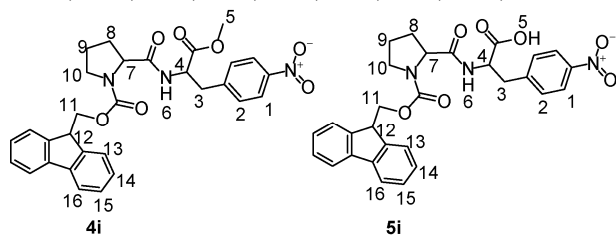
Fmoc-Leu-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{4-甲基-2-[(9*H*-芴甲氧基)羰基氨基]-戊酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5d) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.17 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8), 8.08 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-14), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-11), 7.47 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-2), 7.37~7.42 (m, 3H, H-6, H-13), 7.30 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-12), 4.46~4.54 (m, 1H, H-10), 4.17~4.27 (m, 3H, H-7, H-9), 3.97~4.03 (m, 1H, H-4), 3.18~3.23 (m, 1H, H-3), 2.99~3.07 (m, 1H, H-3), 1.50~1.54 (m, 1H, CH), 1.30~1.38 (m, 2H, CH₂), 0.85 (d, 6H, *J* = 6.3 Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.8, 172.7, 156.2, 146.4, 144.4, 144.1, 141.1, 131.0, 128.0, 127.4, 125.7, 123.5, 120.5, 65.9, 53.4, 53.0, 47.1, 46.8, 36.8, 24.5, 21.8.

Fmoc-Ile-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{3-甲基-2-[(9*H*-芴甲氧基)羰基氨基]-戊酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5e) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.28 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-8), 8.07 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-1), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-14), 7.72 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, H-11), 7.52 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-2), 7.37~7.44 (m, 3H, H-6, H-13), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-12), 4.52~4.59 (m, 1H, H-10), 4.20~4.27 (m, 3H, H-7, H-9), 3.83~3.89 (m, 1H, H-4), 3.20~3.26 (m, 1H, H-3), 2.99~3.06 (m, 2H, H-3), 1.63~1.70 (m, 1H, CH), 1.29~1.37 (m, 2H, CH₂), 1.00 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, CHCH₃), 0.77 (t, 3H, *J* = 5.4 Hz, CH₂CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.5, 171.3, 155.9, 146.2, 144.0, 143.7, 140.7, 130.6, 127.6, 127.1, 125.3, 123.0, 120.1, 65.6, 59.1, 52.8, 46.7, 36.5, 36.3, 24.3, 15.2, 10.7.

Fmoc-Phe-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{3-苯基-2-[(9*H*-芴甲氧基)羰基氨基]-丙酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸 (5f) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.39 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8), 8.11 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-14), 7.59~7.63 (m, 3H, H-6, H-11), 7.52 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-2), 7.29~7.33 (m, 2H, H-13), 7.16~7.25 (m, 7H, H-12, Ar-H), 4.55~4.58 (m, 1H, H-10), 4.12~4.26 (m, 4H, H-4, H-7, H-9), 3.04~3.24 (m, 2H, H-3), 2.69~2.98 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.4, 171.6, 155.7, 146.3, 145.9, 143.8, 140.7, 138.1, 130.6, 129.2, 128.0, 127.6, 127.1, 126.3, 125.3, 123.2, 120.1, 65.6, 56.0, 52.9, 46.5, 37.3, 36.5.

Fmoc-Thr(*t*-Bu)-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{2-[(9*H*- 芴甲氧基)羰基氨基]-3-叔丁氧基丁酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸(5g) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.16 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8), 8.11 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-1), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-14), 7.72 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-11), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-2), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-13), 7.31 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-12), 6.90 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-6), 4.56~4.61 (m, 1H, H-10), 4.20~4.32 (m, 3H, H-7, H-9), 3.93~3.97 (m, 1H, H-4), 3.70~3.74 (m, 1H, CH), 3.19~3.25 (m, 1H, H-3), 3.01~3.08 (m, 1H, H-3), 1.00 (s, 9H, 3CH₃), 0.93 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, CHCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.5, 170.0, 156.2, 146.7, 146.1, 144.1, 141.2, 131.1, 128.0, 127.5, 125.6, 123.6, 120.5, 74.1, 67.9, 66.1, 60.1, 53.1, 47.1, 37.1, 28.5, 19.6.

Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{2-[(9*H*- 芴甲氧基)羰基氨基]-3-(4-叔丁氧基苯基)丙酰基}-3-(4-硝基苯基)丙酸(5h) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.35 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-8), 8.11 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.87 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-14), 7.63 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-11), 7.57 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-2), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-6), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-13), 7.30 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-12), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, Ar-H), 6.79 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, Ar-H), 4.60~4.63 (m, 1H, H-10), 4.08~4.22 (m, 4H, H-4, H-7, H-9), 3.07~3.24 (m, 2H, CH₂), 2.68~2.93 (m, 2H, H-3), 0.99 (s, 9H, 3CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 171.7, 171.6, 155.8, 153.5, 146.3, 146.1, 143.8, 140.7, 132.7, 130.7, 129.8, 127.7, 127.1, 125.3, 123.3, 123.2, 120.1, 77.6, 65.8, 56.2, 53.1, 46.6, 36.8, 36.2, 28.5.



Fmoc-Pro-Phe(*p*-NO₂)-OMe: 2-{1-[(9*H*- 芴甲氧基)羰基]-吡咯烷-2-甲酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸甲酯(4i) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.40 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-6), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.78~7.91 (m, 4H, H-16, H-13), 7.51 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-2), 7.27~7.43 (m, 4H, H-14, H-15), 4.52~4.58 (m, 1H, H-12), 3.81~4.35 (m, 6H, H-4, H-7, H-10, H-11), 3.59 (s, 3H, H-5), 2.98~3.21 (m, 2H, H-3), 1.73~1.81 (m, 4H, H-8, H-9). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ

(ppm): 172.9, 172.1, 154.2, 145.9, 144.2, 141.8, 130.6, 128.0, 127.5, 125.5, 123.3, 120.4, 67.5, 60.0, 53.2, 52.5, 47.5, 46.8, 36.4, 31.5, 23.3.

Fmoc-Pro-Phe(*p*-NO₂)-OH: 2-{1-[(9*H*- 芴甲氧基)羰基]-吡咯烷-2-甲酰氨基}-3-(4-硝基苯基)丙酸(5i) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.84 (s, 1H, H-5), 8.24 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-6), 8.10 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-1), 7.74~7.90 (m, 4H, H-16, H-13), 7.51 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-2), 7.22~7.41 (m, 4H, H-14, H-15), 4.49~4.59 (m, 1H, H-12), 3.80~4.36 (m, 6H, H-4, H-7, H-10, H-11), 2.97~3.23 (m, 2H, H-3), 1.73~1.81 (m, 4H, H-8, H-9). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.9, 172.3, 154.2, 146.4, 144.3, 143.8, 141.1, 130.6, 128.0, 127.4, 125.7, 123.5, 120.4, 66.9, 60.0, 53.3, 47.7, 46.7, 36.8, 30.2, 24.2.

3.3 实验结果讨论

L-苯丙氨酸的硝化必须控制条件, 既要防止多硝化的发生, 也要尽量减少硝化过程可能导致的消旋. 此外, 由于 L-对硝基苯丙氨酸仍然是两性分子, 分子极性较大, 产物提纯时不能采取常规的萃取、柱层析等方法. 因此, 合理的后处理方法对于简便地得到高纯度的产品至关重要. 通过条件探索和借鉴前人经验, 我们最终采用低温浓 H₂SO₄/浓 HNO₃ 硝化的方法, 先在 0 °C 投料反应 1 h, 然后室温搅拌反应 1 h, 保证硝化反应尽可能不发生副反应; 后处理时, 冰浴冷却下用氨水调至 pH 6~8, 既可防止消旋发生, 又可高收率高纯度地得到 L-对硝基苯丙氨酸(2). 旋光度测定表明, 产物的旋光性与文献一致^[17].

氨基酸酯的合成方法, 常见的有强酸催化直接合成法、辅助试剂催化酯化法、SOCl₂ 催化法以及氨基酸羧酸盐合成法等. L-对硝基苯丙氨酸甲酯盐酸盐(3)的制备我们采用 SOCl₂/MeOH 法, 过量及残存的 SOCl₂ 采用多次加入 MeOH 并减压旋蒸的方式除去. 氨基酸几乎不发生消旋, 收率高纯度好, 是一种可靠的合成方法.

L-对硝基苯丙氨酸二肽衍生物(4a~i)的制备过程中, 很关键的问题是防止消旋. 控制消旋的主要措施是选择合适的偶联剂及温和的碱. 偶联所需的碱, 既要有利于中和氨基组分结合的碱, 也要防止碱性过高导致的消旋和 Fmoc 脱除. 试验发现, 选择 *N,N*-二异丙基乙二胺(DIPEA)为好, 加入碱的量以控制 pH = 8~9 的弱碱性条件为宜. 其次, 偶联方法和偶联剂的

选择也很重要. 多肽的偶联方法主要有叠氮物法、酰氯法、活性酯法及混合酸酐法等. 考虑成本、反应速度、反应收率及产物后处理方法等因素, 我们最终采用反应较为温和的活性酯法, 选用 DIC/HOBt/DIPEA 组合试剂在无水 THF-DMF 混合溶剂中偶联, 基本上可以顺利合成目标分子. 还试验过 DCC、TBTU 等偶联剂, 收率没有显著性变化.

制备含有氨基葡萄糖拟二肽分子 **8a~d** 具有一定的难度, 其中高纯度中间体原料的制备、高纯度无消旋产物的合成及纯化, 是主要问题. 我们以 2-氨基- β -D-葡萄糖盐酸盐为起始原料, 采用改进的乙酸酐-硫酸法一步合成中间体 2-氨基-1,3,4,6-四-*O*- β -D-葡萄糖硫酸盐(**7**), 再与保护氨基酸在缩合剂的作用下偶联, 经过一次柱层析, 即可得到拟二肽(**8**)^[18]. **7** 的纯度很高, 产物 **8** 没有发生消旋. 曾经试验换用不同的偶联剂提高收率, 但是收率变化不明显, 可能和这类分子的结构有关.

化合物 **4a~i** 进行甲酯的碱性水解, 最重要的是防止 Fmoc 脱除以及目标分子的消旋. 因此, 反应所选用的碱、碱的浓度、反应温度及反应时间的控制至关重要. 碱性太强、浓度太大、反应温度太高、反应时间过长都会导致 Fmoc 基团部分或全部脱除. 实验显示, 选用 1 mol/L LiOH 水溶液、冰浴冷却下搅拌反应 10~20 min, 可以选择性地将甲酯水解而 Fmoc 基团几乎没有脱除, 产物未见消旋. 也曾试用过 NaOH, K_2CO_3 , $NaHCO_3$ 等无机碱, 要么 Fmoc 明显脱除 (NaOH, K_2CO_3), 要么反应较慢($NaHCO_3$); 选用 0.2 mol/L LiOH, 水解能够发生, 但是要在室温反应 50 min 左右, 时间相对较长, 没有明显的优势.

3.4 生物活性结果分析

从表 2 数据看出, 所合成的化合物的 DPP-IV 抑制活性都很弱, 显示很低的抗糖尿病活性, 大部分化合物反而显示出 DPP-IV 拮抗活性. 然而在 13.95~20.43 μ mol/L 检测浓度下, 目标化合物均具有一定的 PPARE 激动活性. 相对参照物 Pioglitazone, 化合物 **4c** 和 **8b** 的相对 PPARE 激动活性分别达到 150.59% 及 185.23%, 其 EC_{50} 值分别可达到 1.37 μ M 和 0.64 μ M. 分析图 4、图 5 和表 2 数据, 考察化合物 **4a~i** 结构-活性关系, 可以发现: 当取代基 R 空间体积较小(如化合物 **4a** 和 **4b**)、或 R 空间体积太大(如化合物 **4g**)以及 R 空间体积中等(如 R 中含有苯环结构

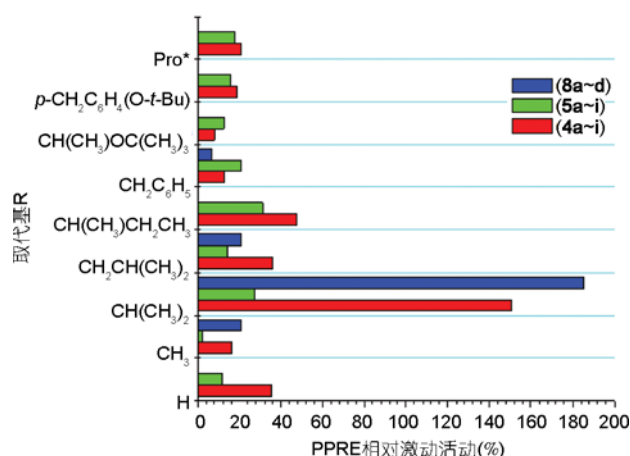


图4 目标化合物 PPARE 激动活性与取代基 R 结构关系图

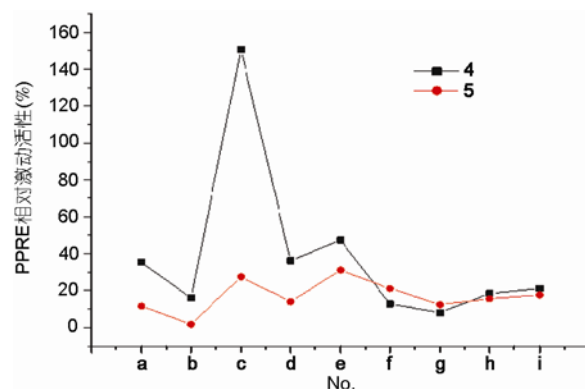


图5 目标化合物 **4** 与 **5** PPARE 激动活性对照图

的 **4f** 和 **4h**), 其相应产物的活性都较差;反之, 取代基 R 空间体积较大而不是太大(如化合物 **4c**, **4e**), 其 PPARE 激动活性很好(如化合物 **4c**)或较好(如化合物 **4e**). 化合物 **5a~i** 和 **8a~d** 有相同的规律. 三个系列的共同点是: 均是取代基 R 为 $CH(CH_3)_2$ 时, 相应产物的相对 PPARE 激动活性最/较大, 且变化趋势基本一致.

上述结果表明, 目标分子的生物活性, 主要取决于其适宜的空间体积, 很可能和其三维结构相关. 采用目前较为常用的 ChemDraw3D 结构模拟^[20~22](图 6)发现, 相对活性很好的化合物 **4c** 和 **8b**, 分子呈现 U 型结构, 取代基 R 正好位于 U 型结构的底部. 我们推测化合物 **4c** 活性很好, 与其结构中侧链异丙基处于底部、整个分子正好可以相对较好地与 PPAR 受体结合相关. 然而, 比较活性较差的化合物 **4g** 的三维空间结构发现, 化合物的中间链状部分也是呈 U 型结构, **4g** 的取代基 R 的体积太大, 分子难以进入 PPAR

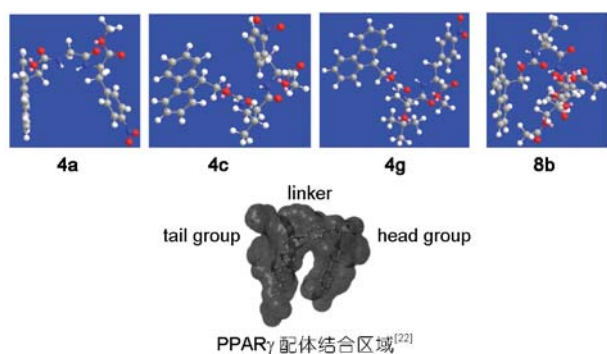


图6 部分化合物三维空间结构图和 PPAR γ 配体结合区域

受体腔中故不表现强的激动活性。取代基 R 体积很小的化合物 **4a**, 其活性很低, 可能是它与底物分子和作用靶点之间的有效结合相关。

一个值得注意的结果是, 化合物 **4a~i** 的 PPRe 活性强于对应化合物 **5a~i** (见图 4 和图 5)。化合物 **4a~i** 的羧酸甲酯变成了 **5a~i** 的游离羧基, **5a~i** 的水溶性增加了, 亲水性也增强了, 按照目前的观点^[23], 化合物 **5a~i** 的 PPRe 活性应该强于化合物 **4a~i**。然而, 从图 5 我们可以很明显地看出, **4a~i** 的绝大多数分子的

PPRe 活性强于化合物 **5a~i**。因此我们认为, 并不是化合物亲水端的亲水性越大, 其相应的 PPRe 激动活性越强。**4a~i** 系列分子既水解又脱去 Fmoc, 活性非常差(PPRe 相对活性低于 20%, 未报道的结果), 表明苄甲基可能是一种好的疏水端、化合物亲水端的亲水性要适中。其他取代基作为疏水端的研究仍在进行中。

4 结论

首次将合成的 18 个 L-对硝基苯丙氨酸二肽衍生物和 4 个 D-氨基葡萄糖的氨基酸衍生物用于抗糖尿病活性研究。虽然多数化合物显示强度不等的 PPRe 活性, 但是化合物 **4c** 和 **8b** 的 PPRe 活性分别达到 150.59% 和 185.23%, EC₅₀ 分别达到 1.37 μ M (**4c**) 和 0.64 μ M (**8b**), 显示了很强的 PPRe 活性, 可作为新型抗糖尿病药物先导分子进一步研究。同时, 首次发现 D-氨基葡萄糖的氨基酸衍生物具有抗糖尿病活性, 为新型抗糖尿病药物的研制提供了新的分子结构类型。

致谢 本工作得到重庆市自然科学基金(2005BB5095)、西南大学博士科研基金(SWNU.B2005010)和高新技术培育基金(XSGX05)资助, 特此一并致谢。

参考文献

- 1 Yang WY, Lu JM, Weng JP, Jia WP, Ji LN, Xiao JZ, Shan ZY, Liu J, Tian HM, Ji QH, Zhu DL, Ge JP, Lin LX, Chen L, Guo XH, Zhao ZG, Li Q, Zhou ZG, Shan GL, He J. Prevalence of diabetes among men and women in China. *New Engl J Med*, 2010, 362: 1090–1101
- 2 Coutts SJ, Kelly TA, Snow RJ, Kennedy CA, Barton RW, Adams J, Krolkowski DA, Freeman DM, Campbell SJ, Ksiazek JF, Bachovchin WW. Structure-activity relationships of boronic acid inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. 1. Variation of the P2 position of Xaa-boroPro dipeptides. *J Med Chem*, 1996, 39: 2087–2094
- 3 Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature*, 1983, 302: 716–718
- 4 Huttunen KM, Mannila A, Laine K, Kemppainen E, Leppanen J, Vepsalainen J, Jarvinen T, Rautio J. The first bioreversible prodrug of metformin with improved lipophilicity and enhanced intestinal absorption. *J Med Chem*, 2009, 52: 4142–4148
- 5 Eckhardt M, Langkopf E, Mark M, Tadayyon M, Thomas L, Nar H, Pfrengle W, Guth B, Lotz R, Sieger P, Fuchs H, Himmelsbach F. 8-(3-(R)-Aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione(BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem*, 2007, 50: 6450–6453
- 6 Cosconati S, Marinelli L, LaMotta C, Sartini S, Da Settimo Federico, Olson AJ, Novellino E. Pursuing aldose reductase inhibitors through *in situ* cross-docking and similarity-based virtual screening. *J Med Chem*, 2009, 52: 5578–5581
- 7 Kaori Y, Atsuyuki H, Osamu I, Keizo H, Jun K. Flavonol caffeoylglycosides as α -glucosidase inhibitors from spiraea cantoniensis flower. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 4367–4371
- 8 Slama G, Elgrably F, Sola A, Mbemba J, Larger E. Postprandial glycaemia: A plea for the frequent use of delta postprandial glycaemia in the treatment of diabetic patients. *Diabetes Metab*, 2006, 32: 187–192

- 9 Ye F, Zhang ZS, Luo HB, Shen JH, Chen KX, Shen X, Jiang HL. The dipeptide *H*-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against PPAR gamma: bioassay with molecular modeling simulation. *Chem bio chem*, 2006, 7: 74–82
- 10 Ashcroft SJ, Crossley JR, Crossley PC. The effect of *N*-acetylglucosamine on the biosynthesis and secretion of insulin on the rat. *J Biochem*, 1976, 154: 701–707
- 11 Takashi O, Taishi M, Masahiko S. Multiple incorporation of non-natural amino acids into a single protein using tRNAs with non-standard structures. *FEBS Lett*, 2005, 579: 6769–6774
- 12 Tsao ML, Summerer D, Ryu Y, Schultz PG. The genetic incorporation of a distance probe into proteins in *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 4572–4573
- 13 Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 1999, 97: 161–163
- 14 Willson TM, Brown PJ, Stembach DD, Henke BR. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, 2000, 43: 527–550
- 15 Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage *in vivo*. *Diabetes Care*, 2004, 27: 1660–1667
- 16 Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ) and its agonists: A review. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 22: 1–23
- 17 孔令强, 苏小燕, 汪林发, 杜培彦, 杨大成. L-对硝基苯丙氨酸的合成工艺研究. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31: 102–105
- 18 Wang LF, Kong LQ, Fan L, Yang DC. Facile synthesis of chiral *N*-glycosylated amino acids. *Res Chem Intermed*, 2010, 36: 237–243
- 19 冯君, 郭彦伸, 陆颖, 郭宗儒. PPAR 激动剂的定向设计、虚拟筛选及合成. 化学学报, 2004, 62: 1544–1550
- 20 Zhou C, Wu G, Feng Y, Li Q, Su H, Mais DE, Zhu Y, Li N, Deng Y, Yang D, Wang MW. Discovery and biological characterization of a novel series of androgen receptor modulators. *Br J Pharmacol*, 2008, 154: 440–450
- 21 陈旭东, 王新波, 范莉, 杨大成. CdS 纳米晶与多肽相互作用研究. 化学学报, 2005, 63: 1600–1606
- 22 Cantet AC, Carreyre H, Gesson JP, Jouannetaud MP, Renoux B. *gem*-Difluorination of aminoalkynes via highly reactive dicationic species in superacid HF-SbF₅: Application to the efficient synthesis of difluorinated cinchona alkaloid derivatives. *J Org Chem*, 2008, 73: 2875–2878
- 23 成峰, 沈建华, 罗小民, 沈竞康, 杨一鸣, 沈旭, 蒋华良, 陈凯先. PPAR γ 激动剂的研究进展. 中国药物化学杂志, 2003, 13: 110–118, 124

Design, synthesis and evaluation of (pseudo)dipeptide compounds with potential antidiabetic activity

LIU Jian¹, YAN JuFang², WANG LinFa¹, FAN Li¹ & YANG DaCheng¹

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Drug Screening Center, Chengdu DiAo Pharmaceutical Group Co. Ltd, Chengdu 610041, China

Abstract: Nine new dipeptide derivatives of L-4-nitrophenylalanine(**4a–i**) and four chiral *N*-glycosylated amino acids (**8a–d**) were prepared by coupling reaction. The overall yields were 52.41%–88.08%. Nine corresponding hydrolysis products **5a–i** were obtained by alkaline hydrolysis of compounds **4a–i** in yields of 64.4%–90.4%. The chemical structures of these products were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HR MS. The peroxisome proliferator-activated receptor response element (PPRE) relative agonist activities of **4c** and **8b** reached 150.59% and 185.23%, the EC₅₀ values were 1.37 μ M and 0.64 μ M, respectively, which exhibited excellent antidiabetic activity and thus deserved further study as lead compounds of antidiabetic agents.

Keywords: L-4-nitrophenylalanine, D-glucosamine, (pseudo)dipeptides, synthesis, peroxisome proliferator-activated receptor, antidiabetic activity