

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 20520141151528

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于稳定硫醚键构建多元环肽分子模板
及多肽探针

Development of multicyclic peptide templates and peptide probes
through stable thioether-bond

王靖惠

指导教师姓名: 赵一兵 教授

吴川六 教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 6 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于年月日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	A
Abstract.....	B
第一章 前言.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 蛋白酶-底物作用及蛋白酶的调控机制.....	1
1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI)	3
1.4 多肽、环肽及自然界构建环肽的常用方法.....	6
1.5 多肽环化方法及应用.....	10
1.5.1 多肽环化方法.....	10
1.5.2 环肽药物.....	23
1.6 研究思路及意义.....	24
第二章 4F-2CN 分子与含氨基巯基模板肽反应性质探究.....	28
2.1 引言.....	28
2.2 实验部分.....	29
2.2.1 主要试剂.....	30
2.2.2 主要仪器.....	30
2.2.3 基本实验方法.....	31
2.3 实验结果与讨论.....	32
2.3.1 双半胱氨酸线性肽 ($\text{NH}_2\text{-C}-\text{C}$) 与 4F-2CN 反应性质探究.....	32
2.3.2 三半胱氨酸线性肽 ($\text{NH}_2\text{-C}-\text{C}-\text{C}$ & $\text{NH}_2\text{-C}-\text{Pen}-\text{C}$) 与 4F-2CN 反应性质探究.....	37
2.3.3 氨基为非 N 端 Cys 氨基的多肽与 4F-2CN 反应性质探究.....	44
2.4 本章小结.....	46
第二章 附录部分.....	48
第三章 4F-2CN 分子构建多元环肽 PPI 调控剂或蛋白酶抑制剂.....	54
3.1 引言.....	54
3.2 实验部分.....	55

3.2.1	主要试剂:	55
3.2.2	主要仪器:	55
3.2.3	基本实验方法:	55
3.3	实验结果与讨论	59
3.3.1	NH ₂ -C—C 型活性环肽的构建与表征	59
3.3.2	NH ₂ -C—Pen—C 型活性环肽的构建与表征	63
3.3.3	NH ₂ -C—PenGC 型活性环肽的构建与表征	67
3.4	本章小结	71
第三章	附录部分	73
第四章	基于 Cys 与 Dha 迈克尔加成反应构建多元环肽	80
4.1	引言	80
4.2	实验部分	83
4.2.1	主要试剂	83
4.2.2	主要仪器	83
4.2.3	基本实验方法	83
4.3	实验结果与讨论	84
4.3.1	氨基酸 Fmoc-Sec(Ph)-COOH 的合成	84
4.3.2	含有 Fmoc-Sec(Ph)-OH 的模板肽合成及氧化	86
4.4	本章小结	89
第四章	附录部分	90
	总结与展望	94
	参考文献	95
	硕士期间发表的文章	105
	硕士期间所获奖项	106
	致谢	107

Contents

Chinese Abstract	A
English Abstract	B
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Introduction	1
1.2 Protease-substrate interactions and the control mechanism of proteases.....	1
1.3 Protein-protein interactions (PPIs)	3
1.4 Peptides / cyclopeptides and the way of nature to get cyclopeptides.....	6
1.5 Strategies of peptide cyclization and their applications	10
1.5.1 Strategies of peptide cyclization	10
1.5.2 Cyclopeptide drugs	23
1.6 Dissertation Structure	24
Chapter 2 The reaction properties of 4F-2CN molecule and different model peptides which have amino and thiols.....	28
2.1 Introduction	28
2.2 Experimental Section	29
2.2.1 Materials	30
2.2.2 Instruments.....	30
2.2.3 Basic experimental methods	31
2.3 Results and discussion.....	32
2.3.1 Exploration on the mechanism of peptides $\text{NH}_2\text{-C-C}$ reacting with 4F-2CN	32
2.3.2 Exploration on the mechanism of peptides $\text{NH}_2\text{-C-C-C}$ & $\text{NH}_2\text{-C-Pen-C}$ reacting with 4F-2CN.....	37
2.3.3 Exploration on the mechanism of peptides whose amino are not the amino of N-terminal Cys reacting with 4F-2CN	44
2.4 Conclusion.....	46
Chapter S2.....	48
Chapter 3 Using 4F-2CN to synthesize bioactive multicyclic peptides to regulate	

protease and PPIs.....	54
3.1 Introduction.....	54
3.2 Experimental Section.....	55
3.2.1 Materials.....	55
3.2.2 Instruments.....	55
3.2.3 Basic experimental methods.....	55
3.3 Results and discussion.....	59
3.3.1 Synthesis and characterization of NH ₂ -C—C— type bioactive cyclopeptides.....	59
3.3.2 Synthesis and characterization of NH ₂ -C—Pen—C type bioactive cyclopeptides.....	63
3.3.3 Synthesis and characterization of NH ₂ -C—PenGC type bioactive cyclopeptides.....	67
3.4 Conclusion.....	71
Chapter S3.....	73
Chapter 4 Synthesis of stable muticyclic peptides based on the Micheal addition reaction of Cys and Dha.....	80
4.1 Introduction.....	80
4.2 Experimental Section.....	83
4.2.1 Materials.....	83
4.2.2 Instruments.....	83
4.2.3 Basic experimental methods.....	83
4.3 Results and discussion.....	84
4.3.1 Synthesis of amino acid Fmoc-Sec(Ph)-COOH.....	84
4.3.2 Synthesis of model peptides contain Fmoc-Sec(Ph)-OH and their turned to Dha.....	86
4.4 Conclusion.....	89
Chapter S4.....	90
References.....	95

摘要

蛋白质通过各类蛋白酶的催化反应或蛋白质-蛋白质间相互作用参与了细胞内大多数的机制运作过程。因此,研究和调控生物体内异常的蛋白酶表达及蛋白质相互作用对理解生命体系、发展新型药物疗法有着重要意义。多肽类调控剂有着易合成修饰、免疫原性低、与靶蛋白结合特异性高等优点,环肽分子(特别是多元环肽)又进一步通过构象限制提高了多肽的稳定性、刚性及结合亲合力,因此是一类很有潜力的蛋白酶或蛋白质相互作用调控剂。在自然界中,常通过二硫键对蛋白或活性肽构象进行环化限制,这些富二硫键天然生物分子也为多肽环化提供了丰富的模板,但多肽中二硫键作为动态共价键在细胞内高还原性条件下或在其他巯基化合物存在时易被还原或发生重排,因此限制了其应用前景。为了解决这个问题,化学家们发展了各种环化方法来构建更稳定的环肽,如通过酰胺键、碳碳键、碳氮键、硫醚键等将多肽两端、侧链或一端及侧链间环化起来,其中通过巯基与卤代芳烃或共轭二烯反应生成硫醚键的方法直接利用多肽中的半胱氨酸,无需重金属催化剂,简单、温和且高效。

因此,本论文旨在基于硫醚键构建可精确调控反应过程的、超刚性的稳定多元环肽分子模板,并在此基础上构建具有蛋白酶抑制活性或蛋白质相互作用抑制活性的多元环肽。我们主要通过一个对称的多氟苯小分子 2,3,5,6-四氟对苯二甲腈(4F-2CN)与含有多个巯基及 N 端半胱氨酸的线性多肽的反应得到多元环肽,该反应随时间逐步而有序地进行,速率快、产率高,且生成的多元环肽构型明确、唯一。同时,通过在多肽序列中引入 PenXC 基序,反应后进一步提高了环肽的整体刚性与稳定性。通过该方法构建的针对蛋白质相互作用的大环肽抑制剂也在稳定性提高的同时表现出较高的亲合力和抗酶解稳定性。此外,为了更好地调控多肽环化后的构型,我们也尝试通过半胱氨酸与脱氢丙氨酸(Dha)反应得到更接近于天然多肽中二硫键尺寸的硫醚键来发展精确配对的多元环肽模板。

本论文分为四章,包括以下内容:

第一章:首先介绍了蛋白酶、蛋白质相互作用的作用机制,阐述了环肽作为蛋白酶或 PPI 抑制剂的显著优势。其次详细综述了受自然界二硫键环化启发而发

展出的几大类多肽环化方法并列举了目前已广泛应用的一些环肽药物。在此基础上提出本论文的研究思路及意义。

第二章：基于 4F-2CN 分子考察其与含有 N 端半胱氨酸及多个巯基氨基酸的各类型模板多肽的反应条件和反应过程，明确其与不同多肽在不同条件下的反应机制，探究该反应适用范围，实现高效精确调控反应过程、构建超刚性环肽的目的。

第三章：在第二章基础上，通过 4F-2CN 分子与一系列生物活性肽的反应，首先考察并证明了该方法对活性序列的耐受性，其次考察了针对蛋白酶（尿激酶，uPA）或蛋白质相互作用（MDM2-p53 & Keap1-Nrf2）的多元环肽抑制剂的生物活性与稳定性。

第四章：基于多肽中半胱氨酸与 α,β -不饱和氨基酸 Dha 间的 Micheal 加成反应构建更接近于天然多肽二硫键的硫醚键环化的多元环肽。首先合成了 Dha 的前体氨基酸 Fmoc-Sec(Ph)-COOH，然后通过条件优化成功将其偶联入多肽并转化为 Dha。这部分后续的工作尚在进展当中。

关键词：

多肽环化；多元环肽；硫醚键；富巯基多肽；蛋白抑制剂。

Abstract

Proteins participate in most of biological and pathological processes in cells via catalyzing different kinds of reactions or via thousands of protein- protein interactions. Consequently, investigate and control over inappropriate proteases expression and protein-protein interactions are important for better understanding of biology systems and can potentially be the effective strategy for therapeutic intervention. Peptide modulators combine the advantages of protein and small-molecules, such as easy to synthesis and modify, binding to proteins with high specificity. On this basis, benefit from being structurally constrained, cyclopeptides, especially multicyclic peptides are further stable to enzymatic hydrolysis, rigid and with better binding affinity. As a result, they are promising protein inhibitors and ligands. Nature most frequently use disulfide bonds to stabilize the structure and function of proteins and peptides, these molecules also provide various motifs for peptide cycliazation. However, disulfide bonds can be reduced in cytoplasm and can be isomerized in the presence of other thios, thus limit their applications. To solve the problem, chemists developed many strategies of peptides cyclization, among which thioether bond produced via thios in the peptides is much easier to operate, mild and efficient.

In this work, we aimed to develop some hyper-rigid and stable multicyclic peptide templates and bioactive peptides based on the thioether bond. We mainly get multicyclic peptides via the reaction of a small phenyl molecule 2,3,5,6-tetrafluoro terephthalonitrile (4F-2CN) and linear peptides contain some thios and N-terminal cysteine. This reaction is programmed and can gradually turn to the only tetra-substitution product. Furthermore, we rigidify the peptide structure by constraining one of the loops at the C-terminus with ‘PenXC’ motif. Using this strategy, we get stable bioactive cyclopeptides with high affinity to inhibite protein-protein interactions as well as high stability. Besides, in order to further modulate the configuration of cyclopeptides, we try to use thioether bonds which as the most

similar size as natural disulfide bonds to develop peptide templates.

This thesis comprises four chapters listed below :

Chapter 1: The first chapter is a literature review. Initially, we introduced the mechanism of proteases and protein-protein interactions, explained the remarkable properties of cyclopeptides as proteases inhibitors and PPI regulators. Then we gave a detailed introduction on the three classes of strategies of peptides cyclization, as well as some cyclic peptide drugs on the market. On this basis, we introduced the research topic and significance.

Chapter 2: We discovered that a small molecule 4F-2CN can react with different kinds of template peptides contain a N-terminal cysteine with some thios. We investigated in detail of the reaction properties among them, identified their reaction mechanisms, as well as the range of application.

Chapter 3: On the basis of Chapter 2, we used 4F-2CN to synthesize a series of bioactive multicyclic peptides aimed to inhibit proteases (uPA) or some PPIs (p53-MDM2 & Keap1-Nrf2). As same as the template peptides, they all react with 4F-2CN and convert into the only final-product with definite structures. Most of all, in the case of bioactive tricyclic peptides binding to Keap1, we get the result with both hyper rigidity and high binding affinity.

Chapter 4: We designed to use the reaction of Cys 的巯基 and α,β -unsaturated amino acid dehydroalanine (Dha) to achieve multicyclic peptides in which the thioether bonds are as the most similar size as natural disulfide bonds. We synthesised the masked amino acid of Dha, Fmoc-Sec(Ph)-COOH, succeeded in coupling it into the peptides during SPPS and then converting it into Dha. Follow-on work is still underway.

Key Words :

Peptide cyclization; multicyclic peptides; thioether bond; disulfide-rich peptides; protein inhibitors.

第一章 前言

1.1 引言

蛋白质是由基因编码的许多个氨基酸组成一条或多条的多肽链再通过折叠形成的有一定空间构象的生物大分子化合物。它们是生命活动的主要承担者，承担着生物体内催化代谢反应的进行、生物的运动与支持、DNA 的复制、基因表达的调节、物质的转运与信息的递送、能量的供给、免疫防御系统的应答等等。在人体中，蛋白质一般占体重的 16 %-20 %，是构成人体组织和器官的支架及重要组成，分布广，含量高，参与了细胞内几乎所有的机制运作过程。可以说，没有蛋白质就没有生命。

蛋白质功能的发挥，有些通过各类酶对反应的催化调节^[1]，有些通过蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interactions, PPI) 实现^[2]。只有当这些蛋白酶、PPI 正常表达并正常发挥功能时，细胞的生命活动才能顺利进行，异常的蛋白酶表达或异常的 PPI 作用都将会导致生物体机能紊乱和各种疾病发生。因此研究和调控蛋白酶活性及 PPI 对于更好地理解生命体系、建立疾病医疗诊断方法、发展研发新型药物有着重要的意义。

1.2 蛋白酶-底物作用及蛋白酶的调控机制

蛋白酶是具有水解肽键功能的酶的总称。蛋白酶调控的蛋白质肽键断裂对于蛋白的合成、翻转至关重要，这也进而决定着蛋白的折叠结构和功能。因此，蛋白酶直接或间接地参与了生物体内几乎所有的生命活动进程。

生物体对蛋白酶的调控最主要通过两种途径：首先几乎所有的蛋白酶都是以无活性的酶原或前蛋白的形式被生物体合成并存储起来，在需要时才通过活性中心残基变化被激活；其次还存在特异性的内生蛋白酶抑制剂抑制酶活性。这些抑制剂通常也是蛋白，它们会与相应的蛋白酶结合为无活性或活性微弱的蛋白质复合物^[3]。因此通过合适的抑制剂与异常蛋白酶特异性、高亲合力地结合是一种非

常有潜力的疾病治疗方式。

根据起催化作用的活性中心的不同,蛋白酶可以分为金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和苏氨酸蛋白酶五大类^[4]。蛋白酶通常有一个由许多个亚位点(subsites,每个位点用 S_n 表示)组成的深而大的凹槽,通过合适的底物各位点(每个位点 P_n 表示,从断键处酰基侧开始向外依次为 $P_1/P_2/P_3\cdots$,氨基处开始向外依次为 $P_1'/P_2'/P_3'\cdots$)插入对应各 S_n 凹槽中进行相应水解反应^[4]。研究表明同类蛋白酶的活性结构域及催化机制具有很高的保守性。

以丝氨酸蛋白酶(serine proteinases)为例,丝氨酸蛋白酶是最早被广泛研究的酶,包括一些消化酶如胰蛋白酶(trypsin)、糜蛋白酶(chymotrypsin)、弹性蛋白酶(elastase)等,一些凝血相关酶如凝血酶(thrombin)、纤溶酶(plasmin)、纤溶酶原激酶(uPA/tPA)等,和一些补体系统酶如C1酯酶(C1 esterase)等^[5],参与了细胞内蛋白酶原激活、纤维蛋白溶解、细胞外基质重塑、肿瘤侵袭转移、细胞分化、免疫响应、激素运输、血液凝固、血压调节等一系列生理过程。

酶解时,首先 trypsin S1 口袋底部的 Asp189、Ser190 可以特异性识别并高亲和力结合底物 P1 位点正电性的 Lys 或 Arg 残基,然后在 Gly216 共同作用下使底物 P1-P4 位点以反平行 β -sheet 结构插入对应的酶 S1-S4 口袋中,水解位点合适地呈现于 Ser195 与 His57 间的催化位置。一旦插入, Ser195 亲核性增强,亲核进攻底物中 P1 肽键的 C 原子, His57 和 Asp102 直接或间接地为肽键 N 原子提供质子,使氮端游离脱去,形成以乙酰基连接的底物-酶复合物, Gly193 与 Ser195 通过酰胺 N 原子与乙酰基的 O 作用形成氧洞,帮助稳定氧离子中间体。复合物进一步脱酰基后被 H₂O 分子亲核进攻,最终将底物碳端释放^[6](Figure 1.1a)。

uPA 活性结构与 trypsin 几乎完全一致,酶解机制也相同^[7]。Chymotrypsin 与之不同的是 S1 口袋底部为 Ser189 而非 Asp189,尽管结构与 trypsin S1 非常相近,但特异性识别并结合 P1 位点为较大疏水残基的 Trp、Phe、Tyr、Leu 的底物^[6]。

生物体中都广泛存在一类重要的丝氨酸蛋白酶抑制剂^[5](serine proteinase inhibitors, serpin),对调控丝氨酸蛋白酶稳态起着关键作用,如 uPA 抑制剂 PAI-1、chymotrypsin 抑制剂 α_1 -Achy 等都属于 serpin 家族成员。它们通过一个含有结合活性位点(P1)的位于表面的 30-40 个残基的环状结构(reactive site loop, RSL)发挥对靶蛋白酶的抑制作用,作用机制通常是靶酶首先识别 serpin P1 位点并与

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库