

含全氟烷基修飾之聚脯胺酸多肽的合成

關鍵字：脯胺酸多肽、有機氟化學、多肽合成

作者：彭威融、蔡祐銘、薛尚齊

指導教授：王聖凱 教授

指導助教：李孟哲 學長

壹、摘要

脯胺酸多肽鏈為一性質特殊之多肽鏈。由於脯胺酸單體的二級胺結構，使其在 PPII (polyproline II helix) 的構型下擁有結構剛性，即三個一圈的聚脯胺酸螺旋結構。其在藥物化學與生物化學中，可作為載體接上配基(ligand)和受體結合。其中全氟烷基為一重要官能基。由於含氟烷基上的氟原子體積小、偶極矩互相抵消且可極化性低，其可用於阻斷部分非預期之反應途徑以增加藥物效率；或是利用氟原子強大的交互作用力，使特定分子能以指定方向接合。但也因此特性，含全氟烷基的部分成為難溶於水（非水相）亦難溶於烴類（非有機相）之第三相（氟相），而對整體多肽性質造成影響。本研究透過一系列有機合成步驟合成含全氟烷基之脯胺酸單體，並利用固相多肽合成技術(SPPS)合成多肽鏈，以期在日後更深入探討全氟烷基修飾對聚脯胺酸多肽在溶液中構型改變之影響。

貳、研究背景與先備知識

蛋白質由許多胺基酸所組成，數量通常在兩百個以上，數量較少的胺基酸鏈狀結構則稱作多肽。胺基酸的鏈狀結構一共可分為四個層次：一級結構描述的是胺基酸殘基鏈中的排列順序及側鏈等；二級結構指的則是胺基酸殘基鏈的局部相對位置，最常見的有 α 螺旋及 β 摺板等，通常與殘基間的氫鍵有關；至於三級結構與四級結構為蛋白質整體之立體結構。由於多肽鏈的長度太短，性質大多不明顯或不穩定，在此先不討論。

脯胺酸為一種人體可自行合成的非必須胺基酸。一般胺基酸殘基中的 α 碳都同時接了一個胺基、一個羧基、一個側鏈以及一個氫原子，且按照 L 手性排列。但是脯胺酸特別之處在於其側鏈為環狀結構，環的另一端直接接回胺基，成為唯一具二級胺的胺基酸。

由於脯胺酸的二級胺，脯胺酸殘基僅能成為氫鍵受體而不能成為供體，又不論 α 螺旋或是 β 摺板都具有殘基間氫鍵，因此脯胺酸殘基大多只出現在 α 螺旋端點。但當數個脯胺酸組合成多肽時，會形成獨特的聚脯胺酸螺旋。不同於 α 螺旋與 β 摺板，聚脯胺酸螺旋內不具有氫鍵，而是純粹以分子之混成軌域決定旋轉的角度。同樣以左旋脯胺酸鍵結，會形成兩種不同的聚脯胺酸螺旋結構：PPII(polyproline II helix)和 PPI(polyproline I helix)。兩者最主要的差別在縮合反應時 α 碳相對於肽鏈的方向。

胺基酸在縮合的時候，氮原子上的孤對電子會和肽鏈產生共振而有部分雙鍵的性質，無法旋轉而具有固定的順反性。其中，由於立體障礙的緣故，大多數的胺基酸都是以反式為主，比例遠大於順式。但脯胺酸殘基中的氮原子兩邊接的都是碳原子，而且對稱性較佳，所以相對而言，聚脯胺酸多肽的順反比例較為平均一些。換句話說，聚脯胺酸多肽要從反式轉為順式也相對容易。

回到聚脯胺酸螺旋，反式多肽對應到的即是 PPII，而順式多肽對應到的則是 PPI。 α 螺旋和兩種聚脯胺酸螺旋同樣都是多肽形成的螺旋二級結構，性質卻不太相同： α 螺旋最為常見，殘基限制不多，每一個胺基酸殘基會連接兩條氫鍵，每 3.6 個殘基旋轉一圈；PPI 僅能由脯胺酸殘基構成，穩定性較差，每 3.3 個殘基旋轉一圈；PPII 不一定要含有脯胺酸，但是脯胺酸高度傾向 PPII 結構。在水溶液中，聚脯胺酸多肽為 PPII 的左旋結構。PPII 結構比 PPI 細長，神奇的是，每一個脯胺酸殘基幾乎剛好旋轉 120° ，也造成了從側面的角度來看，第一個和第四個脯胺酸殘基幾乎是完全重疊的情形。

利用此性質，我們可以設法在脯胺酸殘基上修飾不同的原子團，而做出固定長度的奈米級物質。例如：最基本的就是奈米尺度下的尺。在 PPII 的結構下，同側的兩個脯胺酸殘

基相距 9.4\AA 。因此，只要連接四個脯胺酸，並在第一個與第四個殘基修飾上特定的官能基，便能測出 9.4\AA 之距離。此外，積體電路如欲繼續縮小，也可以利用這項技術，由更小的單位向上發展。然而由於聚脯胺酸螺旋的殘基間並沒有氫鍵，相對較不穩定，容易在 PPI 及 PPII 構型間轉換。

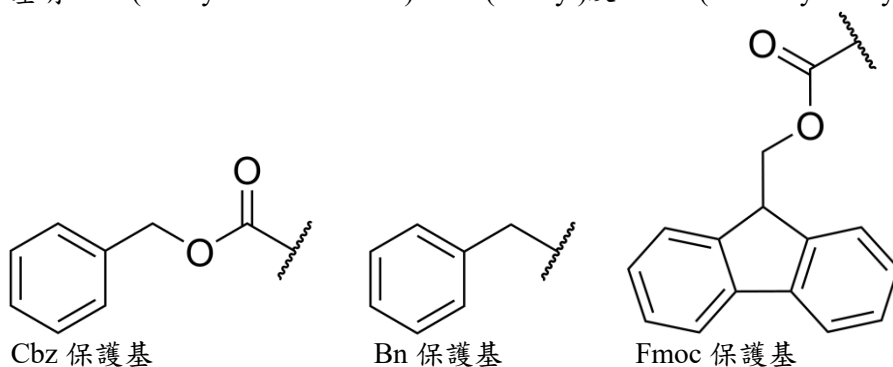
全氟烷類為利用碳作為骨架，上面接滿氟的烷。氟—碳鍵的鍵能極大且極為穩定；而氟鏈與其它氟鏈之間有互相穩定的效果，因此能強化碳骨架，故適合作為一支鏈。由於氟原子的半徑非常小，造成可極化性低，與水、有機物的混溶性都很差，形成第三相：氟相。

如果將氟鏈連接在多肽鏈上每三個一圈的同方向位置上，不僅能幫助穩定 PPII 結構，同時也能固定旁邊的分子。而氟鏈越長，結合性就越好，越能維持 PPII 結構。而我們對於其中轉換的原因、條件與機構很感興趣，因此合成出含有全氟烷基修飾之脯胺酸單體，以便日後繼續研究其性質。

參、研究過程與方法

一、保護基(Protecting Group)

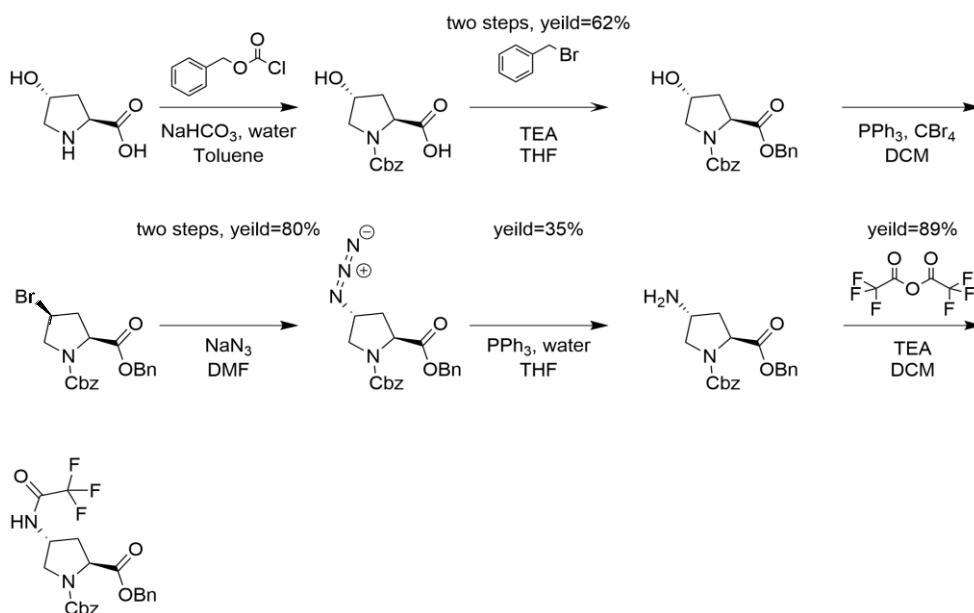
在有機化學中，加入保護基之目的為使反應在特定官能基上進行，被保護的官能基則不發生反應。保護基需有反應性低且容易獲得及脫除等特點。本實驗使用之保護基有 Cbz (Benzyl Chloroformate)、Bn (Benzyl) 及 Fmoc (Fluorenylmethyloxycarbonyl)。



二、短氟鏈脯胺酸單體的合成

下頁圖為進行短氟鏈脯胺酸構築單元的合成圖。共分成以下步驟：

- (一) 將胺基加上 Cbz 保護基。
- (二) 將羧基加上 Bn 的保護基。至此步驟已將脯胺酸的兩個官能基保護，可進行羥基的修飾。
- (三) 為保持相同位向，我們先將羥基以 Appel reaction 取代為溴並轉換位向，再行一次 $\text{S}_\text{N}2$ 反應將溴轉為疊氮基，以便在下一步轉為胺基。
- (四) 藉由 Staudinger reaction 將疊氮基還原為胺基。
- (五) 以脯胺酸單體之胺基攻擊製成酸酐的氟鏈，形成醯胺鍵接上短氟鏈。



三、固相多肽合成技術(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)

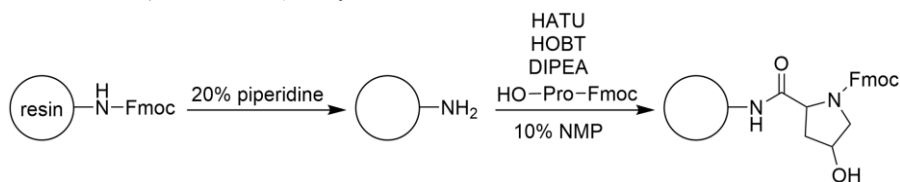
為求方便及快速，我們使用固相多肽合成技術進行多肽的合成。在有篩板的針筒中，我們加入含有胺基修飾之樹脂微粒，作為我們多肽的合成起點。因此，我們只需在反應時吸入欲加入的藥品，即可使反應在針筒中進行，反應結束後再將液體噴出。

以下為我們每接上一個胺基酸單體的步驟：

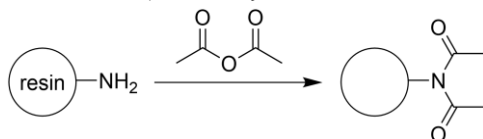
- (一) 去保護(deprotection)：將多肽上保護胺基之 Fmoc 保護基以 20% 的哌啶 DMF 溶液去除。
- (二) 耦合(coupling)：以 HATU、HOBT、DIPEA 作為耦合試劑將胺基酸接上多肽鏈。
- (三) 去活化(capping)：以 10% 之乙酸酐溶液於鹼性條件將未反應之胺基乙醯化使其在下一輪合成中不參與反應。

在合成出所需之多肽長度後，利用 TFA 溶液將多肽由樹脂上切除，再進行純化分離。

下圖為去保護及耦合步驟之示意圖：



下圖為去活化步驟之示意圖：



肆、結果與討論

一、顯色劑

(一) Ninhydrin 茚三酮

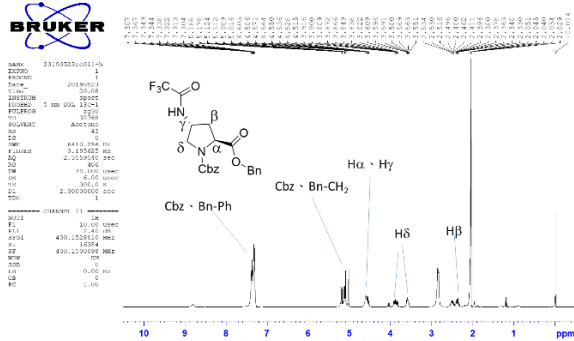
含有一級胺或二級胺的物質皆可與茚三酮(Ninhydrin)產生有色產物。特別的是，

節三酮在與二級胺反應時，會產生黃色物質，如脯胺酸；而其它僅有一級胺的蛋白質則是藍紫色，可作為產物及其他雜質的區分依據。因此在我們的實驗過程中，大多以節三酮作為產物的顯色劑。

(二) CAM 鉀—鉬酸鉍

此溶液為硫酸鉀、鉬酸鉍、硫酸及水之混合物，呈淡黃色。當和大多數有機物質共熱時，會還原產生深藍色之印記。值得注意的是若將具有疊氮基之產物以此法顯色，將產生棕色印記，推測是因為氧化價數的不同所導致。

二、核磁共振儀



此圖中 H α , β , γ , δ 分別對應到左上分子中四個不同位置之氫原子，而波峰曲線下面積則和其含量成正相關，而最高的峰值則為 solvent peak。此結果與先前類似的研究所得到的圖形相符

三、產率計算

(一) 第一次將羥基取代為溴產率偏低(62%)，推測是因為使用之溶劑 THF(四氫呋喃)可能溶有少許水，使剛取代上的溴容易被脫除。而後改用無水 DCM(二氯甲烷)後此情況有所改善。

(二) 將疊氮基還原為胺基產率低(35%)，主要是因為當時生成雜質偏多也不易分離，導致在純化過程中損失了不少產物。

伍、結論與未來展望

在本研究中，我們以人工方法合成出全氟甲基修飾的脯胺酸單體的半產物並以 NMR(核磁共振儀)確認其結構。日後完成含 Fmoc 保護基的脯胺酸單體後，將以固相多肽合成技術連結形成多肽鏈，並加入目前尚未完成之全氟丁基修飾之脯胺酸單體，期望能夠更加全面地了解全氟烷基對脯胺酸多肽鏈縮合效果之影響。

陸、參考資料

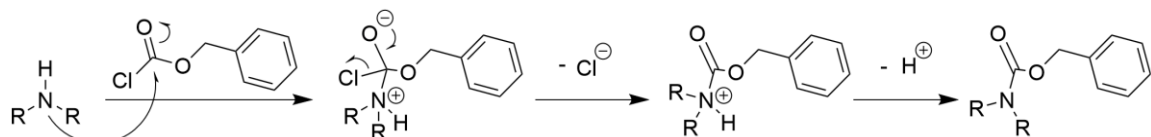
[1]黃君逸 (民 106)。含氟聚脯胺酸多肽的合成及性質研究 (未出版論文)。國立清華大學化學系，新竹市。

[2]Lin, T., Lin, C., Liu, Y., Huang, C. Y., Lin, Y., and Wang, S. (2017). Controlling Ligand Spacing on Surface: Polyproline-Based Fluorous Microarray as a Tool in Spatial Specificity Analysis and Inhibitor Development for Carbohydrate-Protein Interactions. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(48), 41691-41699. doi:10.1021/acsami.7b13200

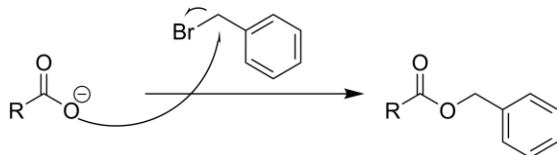
柒、補充資料

以下為合成步驟中之反應機構圖

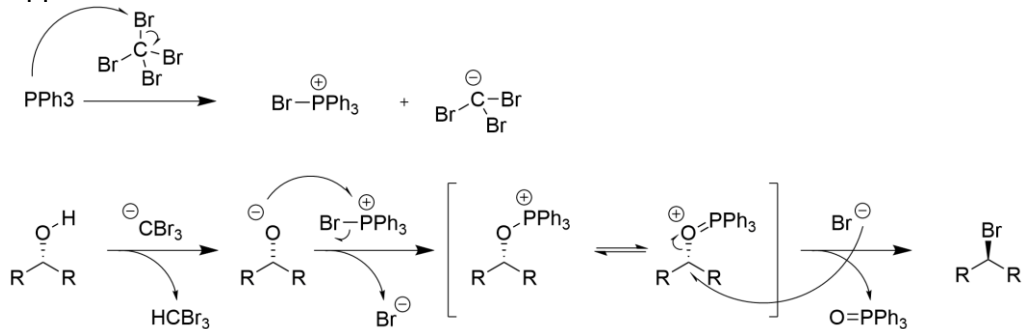
接上 Cbz 保護基



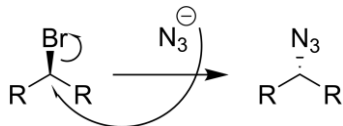
接上 Bn 保護基



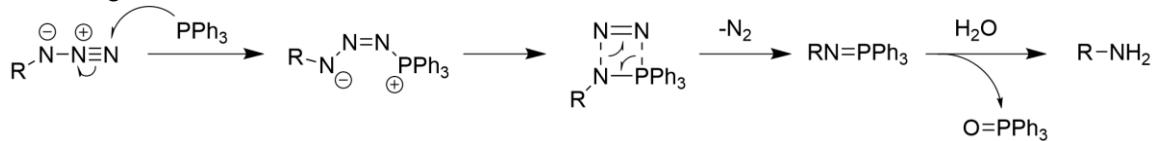
Appel reaction



以疊氮基取代溴



Staudinger Reaction



以胺基攻擊三氟乙酸酐

