

· 药物化学 ·

# 含 β-丙氨酸的双链寡聚酰胺的合成

李 鹏<sup>1</sup>, 姜志辉<sup>1</sup>, 邱财荣<sup>2</sup>, 谢伟杰<sup>1</sup>, 祝绍隆<sup>1</sup>, 王 亮<sup>1</sup>, 张大志<sup>1</sup> (1 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 2 解放军第三医院药剂科, 陕西 宝鸡 721004)

**[摘要]** 目的 建立分子内含 β-丙氨酸的双链寡聚酰胺的合成新方法和策略。方法 通过优化硝基氢化还原的方法, 采用 2+ 2 片段偶合的策略, 以 1-羟基苯并三唑 (HOBT) /N, N'-二环乙基碳酰亚胺 (DCC) 为缩合剂进行双链寡聚酰胺的合成。结果 高产率合成出了双链寡聚酰胺分子 NO<sub>2</sub> ImPyβ ImPyβ PyPyβ COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>。结论 通过对反应温度、反应溶剂以及片段的选择优化, 可以简便有效地合成分子内含有 β-丙氨酸的双链寡聚酰胺。

**[关键词]** β-丙氨酸; 寡聚酰胺; N-甲基吡咯; N-甲基咪唑; 合成

**[中图分类号]** TQ460.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0217-04

## Synthesis of hairpin-polyamides containing β-alanine

LI Peng<sup>1</sup>, JIANG Zhihui<sup>1</sup>, QIU Cairong<sup>2</sup>, XIE Weijie<sup>1</sup>, ZHU Shaolong<sup>1</sup>, WANG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Dazhi<sup>1</sup> (1. Department of Organic Chemistry School of Pharmacy Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy The 3th Hospital of PLA, Baoji 721004, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a new method and strategy for the synthesis of hairpin-polyamides containing β-alanine. **Methods** The hairpin-polyamides were synthesized by the HOBT/DCC coupling reaction in good yields through the optimization of hydrogenation of nitro group and the 2+ 2 fragment coupling strategy. **Results** A hairpin-polyamide NO<sub>2</sub> ImPyβ ImPyβ PyPyβ COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> was synthesized successfully with good yield. **Conclusion** The hairpin-polyamides containing β-alanine in the molecular can be easily and efficiently synthesized through the optimization of reaction temperature, solvent and fragment coupling strategy.

**[Key words]** β-alanine; polyamide; N-methylpyrrole; N-methylimidazole; synthesis

含有 N-甲基吡咯 (Py), N-甲基咪唑 (Im) 的寡聚酰胺 (图 1 a) 是一类 DNA 识别小分子化合物, 能高亲合力和特异地与 DNA 的特定序列进行结合<sup>[1]</sup>。寡聚酰胺识别 DNA 碱基的配对规则: 反向平行的 Py/Im 特异识别 C·G 碱基对; Im/Py 识别 G·C 碱基对; Py/Py 识别 A·T 或 T·A 碱基对<sup>[2]</sup>。根据以上配对规则, 针对一段特定序列, 就可以设计出相应的寡聚酰胺分子与之结合 (图 1 b), 能够调控基因的转录和表达。此外, 该类分子与 DNA 螺旋速率吻合, 结构稳定, 易透过细胞膜和核膜, 是一种很有前途的基因调控分子。

基因表达受多种转录因子的调控, 转录激活因子与启动子上的特定序列结合启动各类基因的转录和表达。寡聚酰胺分子与启动子上的这些序列结合可以阻断转录激活因子与 DNA 的结合, 从而影响功能基因的转录和表达。据此原理, 设计合成的寡聚

酰胺分子已被用于多种基因的调控和表达, 例如, 非洲蟾蜍肾细胞 5S RNA 的基因<sup>[3]</sup>; HIV-1 病毒的复制<sup>[4]</sup>; 人转化生长因子-β1 基因<sup>[5]</sup>; 血管内皮生长因子基因<sup>[6]</sup>; 雄激素受体介导的基因<sup>[7]</sup>; 脊髓小脑性共济失调相关基因<sup>[8]</sup>。

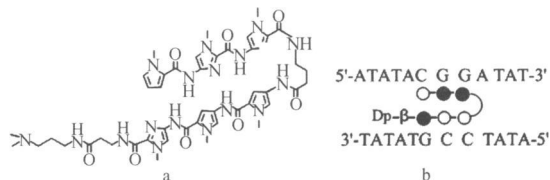


图 1 寡聚酰胺分子及其与 DNA 结合模式图

○-N-甲基吡咯 (Py), ●-N-甲基咪唑 (Im),  
β-β-丙氨酸, Dp-N, N'-二甲基-1, 3-丙二胺

目前寡聚酰胺的合成有固相法<sup>[9]</sup>和液相法<sup>[10]</sup>两种。固相合成法最大优点是缩短了合成时间, 但此法需昂贵的树脂和试剂, 而且这种合成法需使用过量的氨基酸组分, 还需氨基的保护与脱保护, 制备量亦然很少 (mg 级); 液相合成法易于控制, 制备量

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (NO. 30672533); 军队“十一五”课题 06H 013

**[作者简介]** 李 鹏 (1984-), 男, 硕士研究生。

**[通讯作者]** 张大志. Tel (021) 81871226 E-mail zhangdzh@hotmail.com.

大大提高,但产率较低。因此,提高液相法合成的收率是寡聚酰胺合成的关键问题。

本研究以硝基咪唑与硝基吡咯为合成单元,通过优化合成方法和策略,控制反应条件,采用片段偶合法,提高了寡聚酰胺分子的合成收率,成功合成出分子中含β丙氨酸的双链寡聚酰胺分子  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{-ImPy}\beta\text{-PyPy}\beta\text{-COOC}_2\text{H}_5$ , 为此类化合物的合成提供了一种简便易行的方法。

### 1 材料与方 法

**1.1 仪器和原料** N,N-二甲基甲酰胺(DMF)用前作无水处理,其它溶剂均购自上海国药集团。TLC薄板用烟台黄海化工厂生产的GF254制备;柱层析

使用薄层层析硅胶H(60型)。NMR用Varian OXFORD YH 300MHz测定(以TMS为内标,CDCl<sub>3</sub>或DMF-d<sub>7</sub>作溶剂);MS用VG 22AB2HS及Finnigan GCQ质谱仪测定(EI, 70eV)。

**1.2 化合物的合成** 起始原料N-甲基吡咯(Py),N-甲基咪唑(Im)按文献方法制备重要氨基酸单体<sup>[9]</sup>。以1-羟基苯并三唑(HOBT)和N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)为缩合剂,运用氨基酸缩合的方法<sup>[10]</sup>已经成功合成出  $\text{NO}_2\text{-ImPyCOOCH}_3$ ,  $\text{NO}_2\text{-PyPyCOOCH}_3$ ,  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{COOCH}_3$ ,  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\gamma\text{COOCH}_3$ ,  $\text{NO}_2\text{-PyPy}\beta\text{COOCH}_3$ 等一系列中间体。利用这些中间体,可以方便地合成分子内含有β丙氨酸的双链寡聚酰胺分子。合成路线如图2。

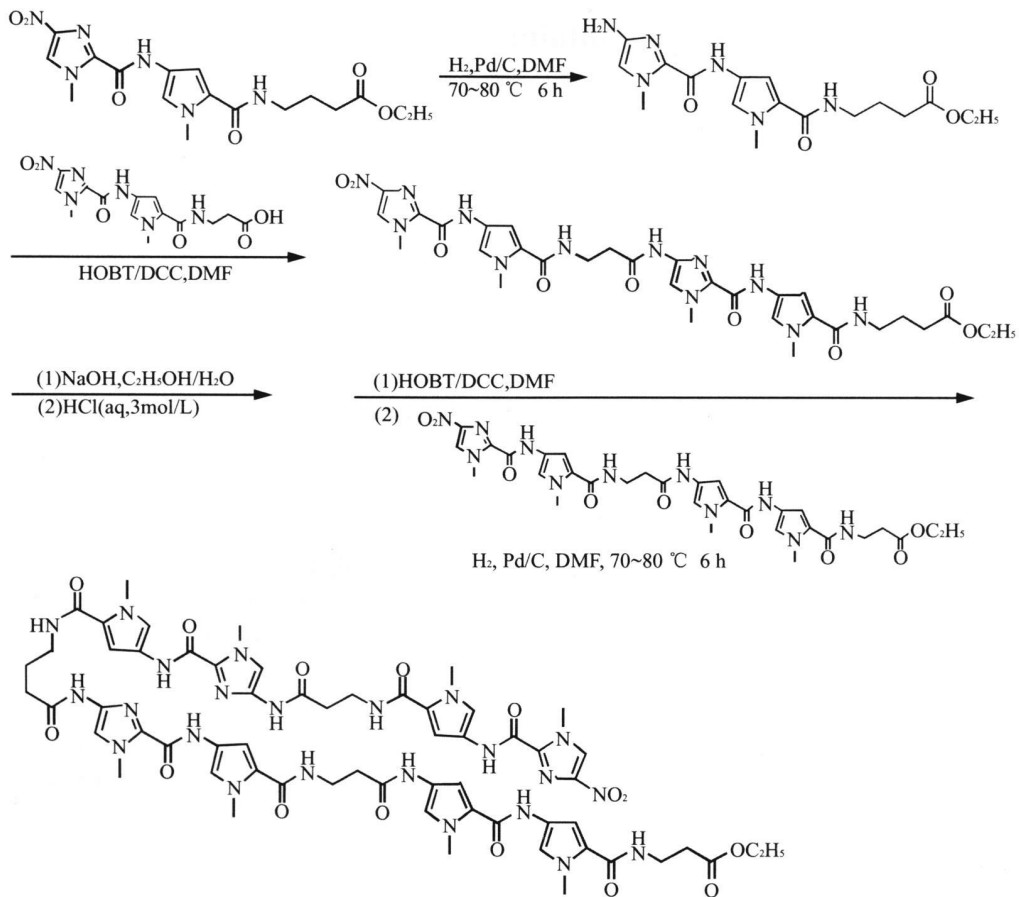


图 2 目标化合物的合成路线

**1.2.1  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{COOC}_2\text{H}_5$  的制备** 取 812 mg  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\gamma\text{COOC}_2\text{H}_5$  (2 mmol)溶于 30 mL 干燥的 DMF中,加入 100 mg Pd/C, 油浴加热至 70~80 °C, 常压氢化反应 6 h。在还原反应进行 4 h时,取 324 mg HOBT(2.4 mmol), 492 mg DCC(2.4 mmol)溶于 10 mL DMF中,置于冰浴,冷却到 0 °C,加入 728 mg

$\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{COOH}$  (2 mmol), 搅拌 2 h。滤去还原反应液中的 Pd/C, 将滤液直接加入到活泼酯溶液中, 室温搅拌 12 h。过滤除去沉淀, 滤液直接加入 10~20 倍水, 有大量沉淀产生, 过滤得滤渣, 50 °C 烘干得粗品 1.4 g。粗品用四氢呋喃(THF)和少量甲醇溶解, 用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  作为洗脱液, 柱层析分离得

1. 17g 黄棕色固体  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{COOC}_2\text{H}_5$ , 产率 81%。mp 123.5 ~ 125.5 °C。 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 300MHz),  $\delta$  10.40(s, 1H), 10.37(s, 1H), 9.94(s, 1H), 8.62(s, 1H), 8.19(s, 1H), 8.05(s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.46(s, 1H), 7.29(s, 1H), 7.20(s, 1H), 6.94(s, 1H), 4.04(t, 2H,  $J=6.9\text{Hz}$ ), 3.99(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.78(s, 3H), 3.51(d, 2H,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 3.18(t, 2H,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 2.61(t, 2H,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 2.31(t, 2H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.72(t, 2H,  $J=6.9\text{Hz}$ ), 1.16(t, 3H,  $J=7.2\text{Hz}$ ); MS(M+H)<sup>+</sup>: 723.29

化合物  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{PyPy}\beta\text{COOC}_2\text{H}_5$  具体的制备方法同上, 最终产率 78%。mp 128.9 ~ 131.2 °C。 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 300MHz),  $\delta$  10.23(s, 1H), 9.90(s, 1H), 9.86(s, 1H), 8.16(s, 1H), 8.13(s, 1H), 8.04(s, 1H), 7.56(s, 1H), 7.21(s, 1H), 7.17(s, 2H), 6.82(s, 2H), 4.06(t, 2H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.01(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.81(s, 3H), 3.77(s, 3H), 3.42(s, 2H), 3.38(d, 2H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.49(s, 4H), 1.16(t, 3H,  $J=7.2\text{Hz}$ )。MS(M+H)<sup>+</sup>: 708.28

**1.2.2**  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{-ImPy}\beta\text{PyPy}\beta\text{COOC}_2\text{H}_5$  的制备  
取 706 mg (1 mmol) 化合物  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{PyPy}\beta\text{COOC}_2\text{H}_5$  溶于 25 ml 干燥的 DMF 中, 加入 80 mg Pd/C, 油浴加热至 70~80 °C, 常压氢化反应 6 h, 在还原反应进行 4 h 时, 取 162 mg HOBT (1.2 mmol), 247 mg DCC (1.2 mmol) 溶于 10 ml DMF 中, 置于冰浴, 冷却到 0 °C, 加入 694 mg  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{COOH}$  (该酸是由酯  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{COOC}_2\text{H}_5$  经水解酸化得到), 搅拌 2 h, 滤去还原反应液中的 Pd/C, 将滤液直接加入到活泼酯溶液中, 室温搅拌 16 h, 过滤除去沉淀, 滤液直接加入 10~20 倍水, 有大量沉淀产生, 过滤得滤渣, 50 °C 烘干得粗品 1.1 g, 粗品用四氢呋喃 (THF) 和少量甲醇溶解, 用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  作为洗脱液, 柱层析分离得 956 mg 棕色固体  $\text{NO}_2\text{-ImPy}\beta\text{-ImPy}\gamma\text{-ImPy}\beta\text{PyPy}\beta\text{COOC}_2\text{H}_5$ , 产率 71%。mp 131.2 ~ 132.7 °C。 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 300 MHz),  $\delta$  10.45(s, 1H), 10.37(s, 1H), 9.96(s, 1H), 9.92(s, 1H), 9.86(d, 3H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 8.61(s, 1H), 8.25(t, 2H,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 8.06(q, 3H,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 7.54(s, 1H), 7.46(s, 1H), 7.16(m, 3H), 6.95(d, 1H,  $J=1.8\text{Hz}$ ), 6.83(q, 4H,  $J=1.8\text{Hz}$ ), 4.06(t, 2H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.02(s, 3H), 3.94(d, 6H,  $J=5.4\text{Hz}$ ), 3.81(s, 3H), 3.80(s, 3H), 3.79(s, 6H), 3.77(s, 3H), 3.55(t, 2H,  $J=5.4\text{Hz}$ ), 3.18(t, 2H,  $J=6.6\text{Hz}$ ), 2.61(t, 2H,  $J=6.6\text{Hz}$ ), 2.51(m,

8H), 2.26(t, 2H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.77(t, 2H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 1.29(t, 3H,  $J=7.2\text{Hz}$ )。MS(M+H)<sup>+</sup>: 1354.55

## 2 结果与讨论

本研究将硝基作为潜在的氨基, 酯基作为潜在的羧基, 用于寡聚酰胺的制备。通常硝基氢化还原为氨基以甲醇、四氢呋喃、二氯甲烷作溶剂, 但是随着寡聚酰胺片段分子量的增大, 在上述溶剂中的溶解度降低, 导致氢化还原的产率很低。本研究以 DMF 为溶剂, 虽然寡聚酰胺片段的溶解度增大, 但是常温常压下的氢化还原产率仍然很低, 仅为 50% ~ 60%, 且反应时间长。通过提高反应温度, 还原收率得以提高, 其中以 70~80 °C 最优, 产率几乎定量。

另外, 本研究采用片段偶合的合成策略, 以 HOBT/DCC 作为缩合试剂。合成双链所需两条单链的合成采用 2+2 的片段偶合, 以其达到最大产率; 通过对反应各个阶段温度的合理控制, 保证了原料能够彻底、高活性地反应; 采用 DMF 作为反应溶剂, 增加了原料的溶解度, 促进反应的同时, 简化了后处理。通过一步偶联两个含四个杂环和一个  $\beta$ -丙氨酸的片段, 成功地合成了分子内含  $\beta$ -丙氨酸的双链寡聚酰胺。采用以上合成策略合成了一系列寡聚酰胺分子, 这些分子的生物活性正在测试中。

## 【参考文献】

- [1] Dervan PB, Doss RM, Marques MA. Programmable DNA Binding Oligomers for Control of Transcription [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 5: 373.
- [2] Rennberg D, Dervan PB. Imidazopyridine/pyrrole and hydroxybenzimidazole/pyrrole pairs for DNA minor groove recognition [J]. *J Am Chem Soc* 2003, 125: 5707.
- [3] Gottesfeld M, Neely L, Trauger JW, *et al*. Regulation of gene expression by small molecules [J]. *Nature*, 1997, 387: 202.
- [4] Dickinson LA, Gulizia RJ, Trauger JW, *et al*. Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 12890.
- [5] Lai YM, Fukuda N, Ueno T, *et al*. Synthetic pyrrole imidazole polyamide inhibits expression of the human transforming growth factor  $\beta_1$  gene [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 315: 571.
- [6] Olenyuk BZ, Zhang GJ, Kibco M, *et al*. Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2004, 101: 16768.
- [7] Nickols NG, Dervan PB. Suppression of androgen receptor mediated gene expression by a sequence specific DNA-binding polyamide [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2007, 104: 10418.

表 8 三级医院心血管用药中主要生产企业排序及年增长率

生产企业	2007年		2008年		2009年		年均增长率 (%)
	金额 (万元)	排序	金额 (万元)	排序	金额 (万元)	排序	
辉瑞	1 122.51	1	1 479.59	1	2 070.59	1	35.82
诺华	812.80	3	1 052.67	2	1 362.11	2	29.45
默沙东	947.18	2	1 028.37	3	1 214.62	3	13.24
北京泰德	507.19	7	642.73	6	903.81	4	33.49
山东鲁南贝特	575.97	5	693.36	5	839.86	5	20.75
拜耳	685.25	4	764.19	4	817.90	6	9.25
赛诺菲 安万特	447.86	9	638.49	7	806.45	7	34.19
施维雅	351.89	11	481.81	10	722.94	8	43.33
阿斯利康	516.48	6	568.44	9	686.38	9	15.28
北京双鹭	465.52	8	578.90	8	539.30	10	7.63

由表 7 和表 8 可见, 3 年间二级医院心血管药物主要生产企业更替趋势较三级医院明显, 但外资企业均占据主导地位。辉瑞公司以氨氯地平和阿托伐他汀钙的高销量自 2008 年起位居二、三级医院销售金额首位, 并保持较高的增长态势。二级医院丹参多酚酸盐的广泛应用也为上海绿谷创造了巨大收益, 销售金额年均增长率位居首位, 说明国内企业的品牌优势逐渐凸显。施维雅以其在心血管药物方面的研发优势位居三级医院销售金额年均增长率首位。

### 3 讨论

由以上分析可见, 2007~2009 年上海市二、三级医院心血管药物用药金额、处方量、均次费用均有不同幅度的增长, 说明心血管药物仍占据医院用药的重要地位。由于三级医院依靠自身技术优势主攻疑难杂症和重症, 而二级医院主要诊疗方向为慢性病和常见病, 因此二级医院心血管药物用药金额占总用药金额比明显高于三级医院。新型 CCB、ARB 凭借疗效好、不良反应少而逐渐成为心血管疾病临床用药的新趋势, 在具体品种上也有所体现。丹参多酚酸盐用药金额的高增长反映了中药注射剂在心血管疾病治疗中的地位, 但合理性应用问题也不容忽视。心血管药物以其在临床应用中的重要地位, 受到众多厂家的重视, 但目前优势品种多来自外资企业, 且价格较高。由于医改的日趋推进必然会对

医院的合理用药与费用控制产生影响, 因此对于国内药品生产企业而言, 应更加注重药品的研发和创新, 生产“品质优异, 价格适中”的高性价比药物。

处方是将药品直接交予患者应用的终端环节, 是体现药品使用的最终信息载体。通过处方用药数据分析, 探讨不同等级医院心血管药物应用特点, 有助于健全和完善心血管药物的合理使用规范。只有充分发挥管理者、医生、药师及社会各方面的力量, 才能使心血管药物的使用更加合理, 使临床用药更加安全、有效、经济。

### 【参考文献】

- [1] 张应辉, 吴雪, 申庆荣. 我院 2005~2006 年心血管类药物的用药分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(10): 849.
- [2] 陈邕, 王嘉凌, 陈庆宪. 2002 年~2004 年西南地区 62 家医院抗高血压药利用分析 [J]. 中国药房, 2005, 16(22): 1718.
- [3] 沈爱宗, 李民, 周书明, 等. 我院 2001 年~2003 年心血管类药物利用分析 [J]. 中国药房, 2005, 16(4): 283.
- [4] 刘宝兰, 刘生友, 余雄杰. 2005~2007 年某心脏病专科医院血管紧张素 II 受体拮抗剂用药分析 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2008, 8(6): 412.
- [5] 洪晓丹, 任斌, 黎曙霞, 等. 2002 年~2004 年广东省近 50 家医院抗高血压药利用分析 [J]. 中国药房, 2005, 16(24): 1879.
- [6] 杨赞, 孙浩珍, 沈陶冶. 杭州地区 20 家医院 2004~2006 年口服调脂药应用分析 [J]. 中国药房, 2008, 19(26): 2016.

[收稿日期] 2010-03-24

[修回日期] 2010-05-01

(上接第 219 页)

- [8] Bumett R, Melander C, Puckett JW. DNA sequence-specific polyamides alleviate transcription inhibition associated with long GAA•TTC repeats in Friedreich's ataxia [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103: 11497.
- [9] Baird EE, Dervan PB. Solid Phase Synthesis of Polyamides Con-

taining Imidazole and Pyromellitic Acids [J]. J Am Chem Soc, 1996, 118: 6141.

- [10] 黄伟强, 袁谷, 肖军华. 含六个杂环的寡聚酰胺的合成 [J]. 化学通报, 2001, 7: 425.

[收稿日期] 2009-11-04

[修回日期] 2010-01-22