

LHRH类似物的设计和合成

褚季瑜 丁捷飞* 刘寅曾** 朱宝亭*** 褚云鸿***

*华东化工学院, 上海 201107; **上海有机化学研究所, 上海 200032;

***上海第一医科大学, 上海 200032)

提要 为了寻找新的高效 LHRH 类似物, 设计并合成了带有 (D-Trp³, desGly¹⁰)-LHRHEA, (D-Arg⁸, desGly¹⁰)-LHRHEA 变换 5 位残基的六个类似物。并应用体外黄体细胞培养法测定了它们的生理活性。

关键词 LHRH 类似物; 固相合成

促黄体激素释放激素(LHRH)是下丘脑释放的一种肽类激素, 其主要生理功能是通过垂体门脉系统刺激垂体, 合成和分泌促性腺激素, 对维持动物性腺功能起重要作用。化学上, LHRH 是一个含有十个氨基酸残基的多肽, 结构为: p-Gly¹, His², Trp³, Ser⁴, Tyr⁵, Gly⁶, Leu⁷, Arg⁸, Pro⁹, Gly¹⁰-NH₂。

其高效类似物可作为抗生育药物⁽¹⁾及用于治疗对性腺敏感的肿瘤(如: 乳腺癌、子宫癌、前列腺癌、骨癌等)⁽²⁾。目前已知的五种天然 LHRH, 仅 5, 7, 8 位上的氨基酸有差别, 表现在这些位置上, 适当改变氨基酸仍能保持 LHRH 的活性。Monany 从构象能的计算中发现, 在 5 至 8 位可形成 β -折叠⁽³⁾, 并可能是与受体结合的部位。改变 5 位氨基酸可以提高相应的拮抗剂(LHRH)的活性也已见报道⁽⁴⁾。

本文报道 LHRH 在具有 6 位 D-Arg 或 D-Trp 和 9 位为 Pro-EA 的基本结构中, 改变 5 位氨基酸的八个类似物的合成, 其中六个为新设计的类似物, 未见文献报道。所有化合物均采用 Merrifield 固相合成法。用乙胺进行氨解, 将保护肽从树脂上断裂下来。再用氟化氢处理, 得粗品肽。再经 Sephadex-25 硅胶柱层析及制备性高压液相色谱纯化。化合物纯度均经硅胶薄层层析(三种溶剂体系)检查为一点, 高压液相色谱分析鉴定为单峰。化合物的生物活性应用体外黄体细胞培养法, 由 hcg 引起孕酮增加, 测定各 LHRH 类似物对孕酮产生的直接影响。

实验部分

原料及仪器 各氨基酸均为层析纯(上海东风生化试剂厂和美国 Peninsula Lab 提供)。 α -氨基均用叔丁氧羰基保护。侧链保护基: 丝氨酸和酪氨酸为苯甲基; 精氨酸、组氨酸为对甲苯磺酰基。叔丁氧羰基-对-氯苯丙氨酸由华东化工学院制药组合成。三乙胺, DCC 及

本文于 1988 年 2 月 8 日收到。

* 一九八六届硕士生, 现址: 中国科学院上海生物工程中心。本文为国家计划生育委员会七五研究基金资助课题。曾参加 1986 年 11 月上海“中法天然产物研讨会”交流。本文用下列缩写和符号: Boc, 叔丁氧羰基; AA, 氨基酸; DCC, 二环己基碳二亚胺; EA, 乙胺; TFA, 三氟乙酸; HOBt, 1-羟基苯并三氮唑; pGlu, 焦谷氨酸; His, 组氨酸; Trp, 色氨酸; Ser, 丝氨酸; Tyr, 酪氨酸; Gly, 甘氨酸; Leu, 亮氨酸; Arg, 精氨酸; Pfo, 脯氨酸; Phe, 苯丙氨酸; pCIPhe, 对氯苯丙氨酸; hcg, 绒毛膜促性腺激素

溶剂均为化学纯, 用前重蒸。乙腈为 BDH HPLC 纯。1% 交联度的苯乙烯-二乙烯苯氯甲基树脂 0.75 mmol/g (美国 Peninsula Lab. 提供)。HPLC 色谱仪为 Varian SY-L 5000, 分离柱为 ALTEX, ULTRASIL TM ODS 1×25 cm; 分析柱为 LICHROSORB RP-18 0.36×30 cm。氨基酸分析仪为 LKB 4400。

N-叔丁氧羰酰-脯氨酸钾盐⁽⁵⁾

将叔丁氧羰酰脯氨酸 2.15 g (10 mmol) 溶于甲醇 15 ml 中, 加入等当量 KOH 粉末, 全部溶解后减压浓缩, 残渣置于 P₂O₅ 干燥器中, 真空干燥过液, 得钾盐 2.54 g (收率 100%) 待用。

N-叔丁氧羰酰-脯氨酸树脂 (Boc-Pro-Resin)

上述钾盐 2.54 g、二甲基甲酰胺 30 ml、氯甲基树脂 6.67 g (0.75 mmol/g) 置于 50 ml 烧瓶中, 80°C 搅拌反应 24 h。再加入醋酸钠 0.33 g, 80°C 保温搅拌 24 h。冷至室温, 过滤。树脂依次用二甲基甲酰胺、无水乙醇、水、无水乙醇洗涤, 干燥。测定树脂残氯量为零。得树脂重为 7.83 g。分析脯氨酸含量相当于 0.383 mmol/g 树脂。

肽的合成 (Merrifield 固相合成法)⁽⁶⁾

Boc-Pro-Resin 0.783 g (0.3 mmol) 按下述步骤接肽

1. CH₂Cl₂ 3×15 ml, 溶胀后每次洗 5 min。
2. 30% TFA-CH₂Cl₂ (含 10% 吡啶) 15 ml, 洗 1.5 min。
3. 30% TFA-CH₂Cl₂ (含 10% 吡啶) 15 ml, 洗 20 min, 切除 Boc-保护基。
4. CH₂Cl₂ 3×15 ml, 每次洗涤 2 min。
5. C₂H₅OH 2×15 ml, 每次洗涤 2 min。
6. CH₂Cl₂ 3×15 ml, 每次洗涤 2 min。
7. 10% (C₂H₅)₃N/CH₂Cl₂ 15 ml, 洗 1 min。
8. 10% (C₂H₅)₃N/CH₂Cl₂ 15 ml, 洗 10 min, 游离。
9. Boc-AA/CH₂Cl₂ 15 ml (0.9 mmol); 10% DCC/CH₂Cl₂ 15 ml (0.9 mmol); HOBT 10 mg 缩合反应 3 h。
10. CH₂Cl₂ 3×15 ml, 每次洗涤 2 min。
11. C₂H₅OH 2×15 ml, 每次洗涤 2 min。
12. CH₂Cl₂ 6×15 ml, 每次洗涤 6 min。

参照 Kaiser 法⁽⁷⁾ 用茚三酮试验监测反应是否完全, 第 8 步后应为兰色, 第 12 步后应为无色或淡黄色。如反应不完全应重复肽的缩合反应一次或用 25% 乙酸酐-二氯甲烷在吡啶存在下乙酰化, 再开始下一轮接肽循环。在本文中大多数氨基酸均一次完成, 产率 98% 以上。组氨酸、焦谷氨酸个别须重复一次接肽方能达到完全。所得各肽粗品重量及收率见表 1。

氢解

将上述所得保护肽树脂置于 50 ml 蛋形瓶中, 加入甲醇 4 ml、无水乙胺 6.5 ml, 封闭瓶口, 30°C 搅拌反应 18 h, 减压除去过量乙胺和溶剂。残渣用二甲基甲酰胺和甲醇交替萃取 3×10 ml, 合并滤液, 减压浓缩得淡黄色油状物。用无水乙醚研磨可得淡黄色粉末状保护九肽酰乙胺, 重量及收率见表 1。

切除侧链保护基⁽⁹⁾

在 HF 反应器中, 加入上述所得保护九肽酰乙胺、苯甲醚 1 ml, 外用干冰-丙酮浴冷却, 通入经 CoF₃ 干燥并重蒸过的 HF 15 ml。0°C 搅拌 45 min。反应完毕, 减压除去过量 HF。残渣用无水乙醚洗涤三次。过滤, 残渣用乙酸及水充分萃取, 并使滤液中最终乙酸的含量不超

Tab 1. Structures and yields of LHRH analogs

No.	Structure										Yield g (%)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Protected peptide-resin	Protected peptide	Peptide
1	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂			
2	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Trp	Leu	Arg	Pro	EA	1.35(100)	0.45(85)	0.37(97)
3	pGlu	His	Trp	Ser	Trp	D-Trp	Leu	Arg	Pro	EA	1.30(99)	0.52(100)	0.46(100)
4	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	D-Trp	Leu	Arg	Pro	EA	1.27(99)	0.49(99)	0.44(100)
5	pGlu	His	Trp	Ser	pClPhe	D-Trp	Leu	Arg	Pro	EA	1.21(94)	0.31(61)	0.25(64)
6	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Arg	Leu	Arg	Pro	EA	1.18(89)	0.33(59)	0.24(65)
7	pGlu	His	Trp	Ser	Trp	D-Arg	Leu	Arg	Pro	EA	1.23(93)	0.40(74)	0.31(82)
8	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	D-Arg	Leu	Arg	Pro	EA	1.10(83)	0.34(64)	0.29(78)
9	pGlu	His	Trp	Ser	pClPhe	D-Arg	Leu	Arg	Pro	EA	1.19(90)	0.42(78)	0.28(74)

过 10%。滤液冷冻干燥, 得淡黄色九肽粗品, 重量及收率见表 1。

纯化

上述粗肽过 Sephadex G-25(2.5 × 100 cm) 柱, 用 10% 乙酸水洗脱。然后过硅胶柱(200 ~ 300 目), 正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5 上相)洗脱。如纯度不够, 再经半制备 HPLC 柱分离, 洗脱缓冲液为(A)0.1% TFA-H₂O; (B)60% CH₃CN-H₂O + 0.1% TFA。流速 3 ml/min。波长 230 nm。各肽主峰均在 39~45 min 内出现。

纯度检定

所得肽的纯度均用硅胶薄层层析鉴定, 用三种溶剂展开(1) 正丁醇-乙酸乙酯-冰乙酸-水(5:5:1:3); (2) 正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5 上相); (3) 正丁醇-吡啶-冰乙酸-水(5:3.3:1:4)。次氯酸钠-邻甲联苯-碘化钾系统显色。各纯化后的合成肽在三种溶剂中展开均为一点。各肽 R_f 值列于表 2。所有纯化后的肽样品在 HPLC 分析柱中, 应用上述(A), (B)液梯变洗脱, 均为单一峰, 保留时间列于表 2 中。

Tab 2. Analytical data and bioactivity of LHRH analogs

No.	Structure	TLC (R _f)			HPLC(t) (min)	Inhibition of progesterone(%)
		1	2	3		
1	LHRH					30.2
2	(D-Trp ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.07	0.26	0.72	27.77	46.0
3	(Trp ⁶ , D-Trp ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.13	0.30	0.76	28.40	25.0
4	(Phe ⁶ , D-Trp ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.14	0.32	0.78	27.72	40.4
5	(pClPhe ⁶ , D-Trp ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.16	0.34	0.79	27.58	8.4
6	(Tyr ⁶ , D-Arg ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.02	0.26	0.57	25.67	/
7	(Trp ⁶ , D-Arg ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.04	0.21	0.63	26.64	38.0
8	(Phe ⁶ , D-Arg ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.04	0.22	0.63	26.44	35.1
9	(pClPhe ⁶ , D-Arg ⁶ , ProEA ⁹)-LHRH	0.04	0.23	0.70	26.66	15.2

氨基酸分析

0.2~0.5 mg 肽样品, 6 mol/L HCl 水解后, 用氨基酸自动分析仪测定各氨基酸组成, 色氨酸及非天然氨基酸只作定性测定。各类似物分析结果列于表 3。

生理活性测定(黄体细胞体外短期培养法)

25 d 雌大鼠, 用孕马血清促性腺激素(PMSG)50 u, sc 处理, 65 h 后再 sc hcg 25 u。在 hcg 注射后 d 6 杀鼠取卵巢。分离除去结缔组织, Hanks 液清洗血块, 剪碎成约 0.3 mm 小

Tab 3. Data on amino acid analyses

No	Arg	Glu	His	Leu	Phe	Pro	Ser	Tyr	pCIPhe	Trp
2	1.08	0.86	0.92	1.13		1.06	0.97	0.99		++
3	1.07	0.82	1.01	1.05		1.14	0.92			+++
4	1.19	0.85	1.00	1.01	0.93	0.91	0.89			++
5	1.07	0.93	0.96	0.96	1.07	0.97			+	++
6	2.04	0.95	0.85	0.77	1.01	0.98	1.04			++
7	2.02	0.99	1.05	0.85		1.00	0.79			++
8	2.04	1.00	1.05	0.85	1.00	1.04	0.92			++
9	1.93	0.91	1.05	0.71		1.21	1.13		+	+

表,用 Collagenase 2 mg/ml 消化 10 min。吸管反复吹吸 3~5 min, NYLON 网过滤除去组织碎片。2500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 D-Hanks 溶液悬浮。2500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加 RPM 1(1640) 适量溶解, 细胞计数, 使悬液成 5×10^5 个黄体细胞/ml。用苔芬兰定性检查细胞的存活率, 细胞存活率大于 75%。每管盛细胞悬液 2 ml, 每个药物浓度做 3 管。培养 3 h 后, 3000 r/min 离心, 取上清液用放免法测孕酮(progesterone)量。每管 hcg 浓度为 5 miu/ml。LHRH 及其类似物的浓度为 10^{-7} mol/L。结果见表 2。

致谢 本研究工作得到严秉淳教授的关心指教, 中国科学院上海有机化学研究所刘永福协助氨基酸分析。

参 考 文 献

1. Them RB. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its analogs for contraception. *Contraception* 1984; 29:143.
2. Schally AV, et al Antitumor effects of analogs of hypothalamic hormones in endocrine-dependent cancers. *Proc Soc Exper Biol Med* 1984; 175:259.
3. Monany FA. Conformational energy analysis of the molecule, luteinizing hormone-releasing hormone. 1. Native decapeptide. *J Am Chem Soc* 1976; 98:2990.
4. Folkers K, et al Antagonists of the luteinizing hormone releasing hormone with emphasis on amino acids in position five *Z Naturforsch* 1985; 403:313.
5. 中国科学院上海生化所多肽组。固相法合成促黄体生成释放激素及其类似物。生物化学和生物物理学报 1976; 8:121.
6. Stewart JM. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1984:76.
7. Kaiser E, et al. Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptide. *Anal Biochem* 1970; 34:595.
8. David HC, et al. Stimulatory and inhibitory analogs of luteinizing hormone releasing hormone. *Biochemistry* 1974; 13:323.
9. Sakakibara S, et al A new method for releasing oxytocin from fullyprotected nona-peptides using anhydrous hydrogen fluoride. *Bull Chem Soc Japan* 1965; 38:1412.

DESIGN AND SYNTHESIS OF LHRH ANALOGS

JY Chu, JF Ding*, YZ Liu**, BT Zhu*** and YH Chu***

(East China University of Chemistry and Technology, Shanghai 201107; **Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai 200032; ***Shanghai First Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT In the hope to find new superagonists of LHRH, here we report the synthesis of six analogs by changing residue 5 of [D-Trp⁶ (or D-Arg⁶), des-Gly¹⁰]-LHRH-EA. For the convenience of comparison, the known compound [D-Trp⁶, desGly¹⁰]-LHRH-EA was also synthesized.

These peptides were synthesized by Merrifield's solid phase method.

The agonistic activities of these analogs are also reported.

Key words LHRH analogs; Solid phase synthesis

* Address: Shanghai Centre of Biogenic Engineering, Shanghai