

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 4 日 (04.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/190665 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 7/54 (2006.01) C07K 1/107 (2006.01)
C07K 5/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/086071
- (22) 国际申请日: 2013 年 10 月 28 日 (28.10.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310205762.0 2013 年 5 月 29 日 (29.05.2013) CN
- (71) 申请人: 北京大学深圳研究生院 (PEKING UNIVERSITY SHENZHEN GRADUATE SCHOOL) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城北大校区 E301, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 李子刚 (LI, Zigang); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城北大校区西丽大学城北大校区 E301, Guangdong 518055 (CN)。 张庆舟 (ZHANG, Qinzhou); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城北大校区 E301, Guangdong 518055 (CN)。
- (74) 代理人: 上海精晟知识产权代理有限公司 (SHANGHAI CPTO INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD); 中国上海市杨浦区国顺东路 800 号东楼 511 室, Shanghai 200433 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR STABILIZING POLYPEPTIDE AS ALPHA HELICAL SECONDARY STRUCTURE

(54) 发明名称: 一种将多肽稳定为 alpha 螺旋二级结构的方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for stabilizing polypeptide as an alpha helical secondary structure. The method comprises the following steps: (1) connecting an amino terminal of polypeptide to an unnatural amino acid, and performing acetylated endcapping; (2) performing a thiol-ene reaction on a product of step (1) to obtain a polypeptide compound modified by a thiether side linkage; (3) oxidizing the polypeptide compound modified by the thiether side linkage to obtain a polypeptide compound modified by an R-type or S-type sulfoxide side linkage; and (4) separating and purifying the product obtained in step (3) to obtain a polypeptide compound modified by the R-type sulfoxide side linkage. By means of CD, it shows that the method has a good effect for stabilizing an alpha helical secondary structure of polypeptide by using a chirality sulfoxide side linkage, and good tolerance to a polypeptide sequence is provided.

(57) 摘要: 本发明提供了一种将多肽稳定为 alpha 螺旋二级结构的方法, 其依次包括如下步骤: (1) 将多肽的氨基端连接非天然氨基酸, 并乙酰化封尾; (2) 将步骤 (1) 的产物经过巯基-烯反应获得硫醚侧链修饰的多肽化合物; (3) 将硫醚侧链修饰的多肽化合物氧化, 获得 R 型或者 S 型亚砜侧链修饰的多肽化合物; (4) 将步骤 (3) 的产物分离纯化, 获得 R 型亚砜侧链修饰的多肽化合物。通过 CD 证明了该方法利用手性亚砜侧链对稳定多肽的 alpha 螺旋二级结构效果很好, 而且对多肽序列有良好的耐受性。



WO 2014/190665 A1

一种将多肽稳定为 α 螺旋二级结构的方法

技术领域

本发明属于多肽结构稳定技术领域。更具体地说，本发明涉及一种通过构建侧链来稳定多肽 α 螺旋的方法以及由该方法构建的带有侧链修饰的多肽化合物。

背景技术

研究发现：在一个蛋白质中真正起到结合作用的往往只有很小的一段序列，而其他部分往往是为了达到这一序列的结构专一性而存在的。 α -helix 构象作为蛋白最重要的二级构象之一，在细胞生理过程起着至关重要的作用，如很多蛋白-蛋白相互作用的区域多为 α 螺旋构象。此外，使多肽具有稳定的 α 螺旋构象还能大幅提升多肽的抗蛋白降解能力和穿膜能力。

为了使多肽具有稳定的 α 螺旋构象，研究人员开发了各种各样的多肽构象稳定技术，如盐桥、金属螯合、HBS、构建共价侧链等。其中构建共价侧链是其中较为常用的方法，最早出现的是以酰胺键的形成作为侧链构建方法。此后二硫键，碳碳双键的形成等均被用于构建侧链以稳定多肽的 α 构象。

在侧链共价键的构建过程中偶联的侧链一般在 α 螺旋的同一面上，所以侧链偶联氨基酸的位置一般为 $i/i+3$, $i/i+4$, $i/i+7$, $i/i+11$ 等。其中应用较多的是 $i/i+4$ 与 $i/i+7$ 。

但是每种稳定方法都有其一定的局限性，例如在酰胺键稳定技术中，由于酰胺键本身易水解所以在体内可能很容易被水解掉而无法发挥作用；以两个半胱氨酸为侧链形成基础的稳定技术中的侧链结构往往含有芳香基团，其对多肽本身的性质影响较大；基于叠氮与炔反应的侧链形成的三氮唑本身就是一个药效基团，其对多肽成药性影响可能更大。

所以至今为止并没有一种侧链技术是普适性的，故而需要开发多种多肽稳定技术以便于研发人员针对不同情况选择适合的技术。

发明内容

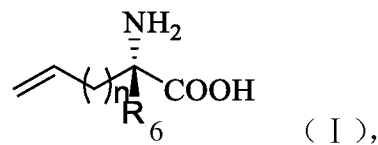
本发明的目的是提供一种通过构建新型的含有手性亚砷的侧链来稳定多肽的 α 螺旋的方法。

本发明的另一目的是提供一种具有稳定 α 螺旋结构的带有侧链修饰的多肽化合物及其制备方法。

进而，本发明提供了一种将多肽稳定为 α 螺旋二级结构的方法，它包括如下步骤：

- (1) 将多肽的氨基端连接非天然氨基酸，并乙酰化封尾；
- (2) 将步骤 (1) 的产物经过巯基-烯反应获得硫醚侧链修饰的多肽化合物；该硫醚侧链偶联氨基酸的位置为 $i/i+4$ ；
- (3) 将硫醚侧链修饰的多肽化合物氧化，获得 R 型或者 S 型亚砷侧链修饰的多肽化合物；
- (4) 将步骤 (3) 的产物分离纯化，获得 R 型亚砷侧链修饰的多肽化合物。

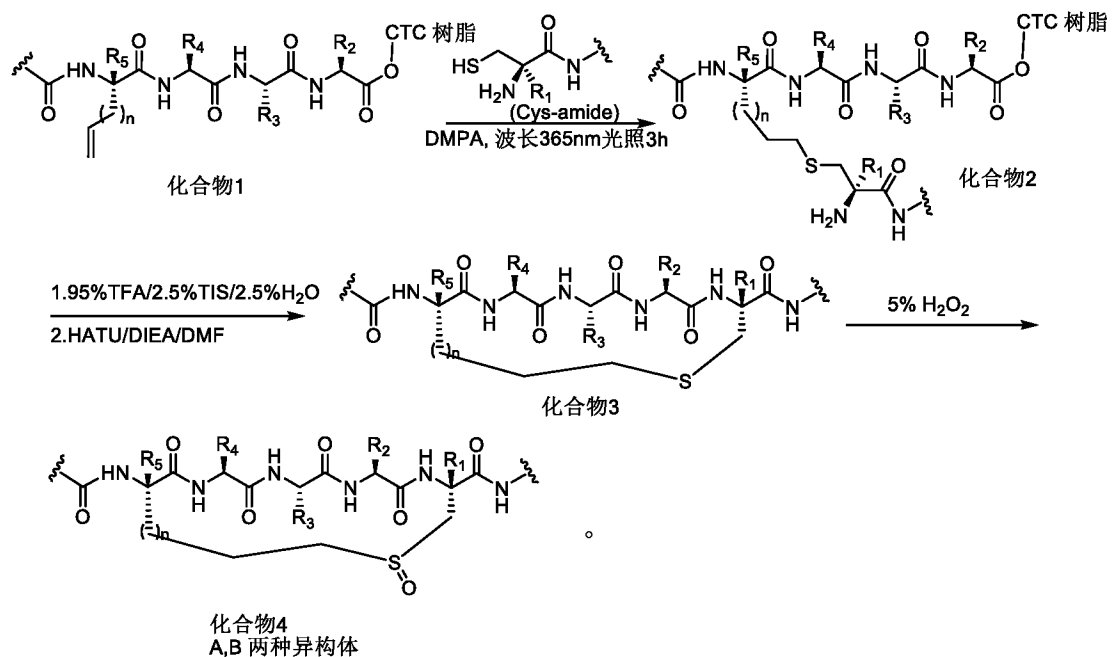
在一优选例中，所述步骤 (1) 中的非天然氨基酸具有如下结构式：



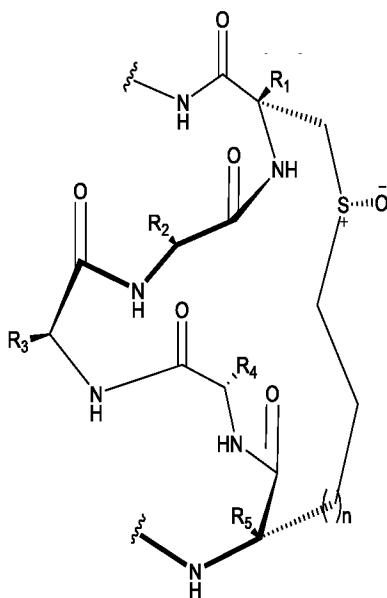
其中 R_6 为氢或亚甲基， n 为 1~6 的正整数。

在另一优选例中，所述步骤 (2) 中的巯基-烯反应是先将步骤 (1) 的产物与半胱氨酸或者半胱氨酸衍生物进行光聚合反应，然后通过酰胺键的形成合成硫醚侧链修饰的多肽化合物。

在另一优选例中，所述步骤 (2) 和步骤 (3) 的反应式如下：



本发明第二方面是提供了一种带有侧链修饰的多肽化合物，该多肽化合物具有如下结构式：



(II),

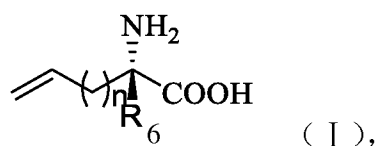
其中, R_1 和 R_5 各自独立地为氢或甲基, $R_2 \sim R_4$ 各自独立地为氨基酸残基, n 为 1-6 的正整数, 亚砷的构型为 R 。

在一优选例中, 所述多肽的长度不大于 20 个氨基酸。

在另一优选例中, 所述 n 为 3 或 4。

本发明还提供了上述多肽化合物的制备方法, 它包括如下步骤:

(i) 将多肽的氨基端连接非天然氨基酸, 并乙酰化封尾, 所述非天然氨基酸具有如下结构式:



(I),

其中 R_6 为氢或亚甲基, n 为 1~6 的正整数;

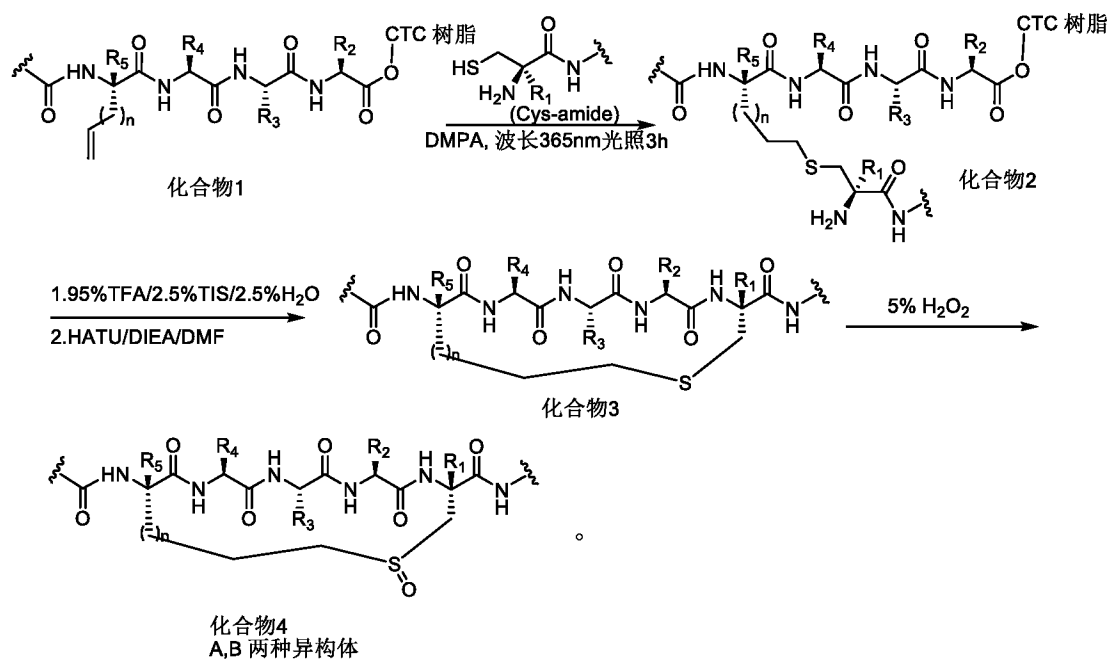
(ii) 将步骤 (i) 的产物经过巯基-烯反应获得硫醚侧链修饰的多肽化合物, 该侧链偶联氨基酸的位置为 $i/i+4$;

(iii) 将硫醚侧链修饰的多肽化合物氧化, 获得 R 型或者 S 型亚砷侧链修饰的多肽化合物;

(iv) 将步骤 (iii) 的产物分离纯化, 获得 R 型亚砷侧链修饰的多肽化合物。

在一优选例中, 所述步骤 (ii) 中的巯基-烯反应是先将步骤 (i) 的产物与半胱氨酸或者半胱氨酸衍生物进行光聚合反应, 然后通过酰胺键的形成合成硫醚侧链修饰的多肽化合物。

在另一优选例中, 所述步骤 (ii) 和步骤 (iii) 的反应式如下:



本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图1 为 $n = 3$ 时，Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide A 和 B 在 10mM pH=7.4 的 PBS 缓冲液里的 CD 图。

图2 为 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide B 在 PBS 和 50% TFE 溶液里的 CD 图。

图3 为 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide B (ASOB)，
Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AGAC-NH₂ sulfoxide B(GSOB)，Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AIAC-NH₂ sulfoxide B(ISOB)的 CD 图。

图4 为 $n = 4$ 时，Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide A 和 B 在 10mM pH=7.4 的 PBS 缓冲液里的 CD 图。

图5 为纯化 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ 的 HPLC 色谱图。

图6 为多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ 的 LC-MS 色谱图。

图7 为多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide A 的 LC-MS 色谱图。

图8 为多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide B 的 LC-MS 色谱图。

图9 为多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide A 的 LC-MS 色谱图。

图10 为多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide B 的 LC-MS 色谱图。

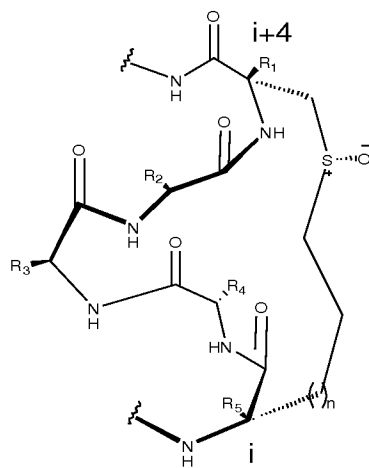
图11 为多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide A 和 B 的 HPLC 色谱图。

具体实施方式

研究证实，多肽分子具有小分子药物所不具有的大接触面积和低毒性，但多肽往往不具有蛋白的二级或三级结构。此外，在生理环境下少于二十个氨基酸的短肽往往不具有稳定的构象。所以如何使少于 20 个氨基酸的多肽在水相中具有稳定构象一直是多肽化学中的研究热点。 α 螺旋是蛋白中最重要的二级结构之一，在很多重要的生理过程，如信号传导、蛋白-蛋白相互作用等中起着重要作用，所以如果能够使多肽具有稳定的 α 螺旋结构将会使这些过程更加容易调控。以构建共价键的侧链来稳定多肽 α 螺旋构象是其中应用最多的策略之一。

本发明人以五肽为模型，通过构建一种新的侧链使得多肽 α 螺旋的稳定性有明显提高，而且这一侧链具有很高的序列耐受能力。这一新型的多肽稳定方法将具有良好的运用前景。首先，本发明人运用 thiolene 反应构建硫醚侧链稳定的多肽化合物，并进一步将硫醚氧化成含手性亚砷。之后通过 CD 证明了这一手性亚砷侧链对稳定多肽的 α 螺旋二级结构效果很好，而且对多肽序列有良好的耐受性。

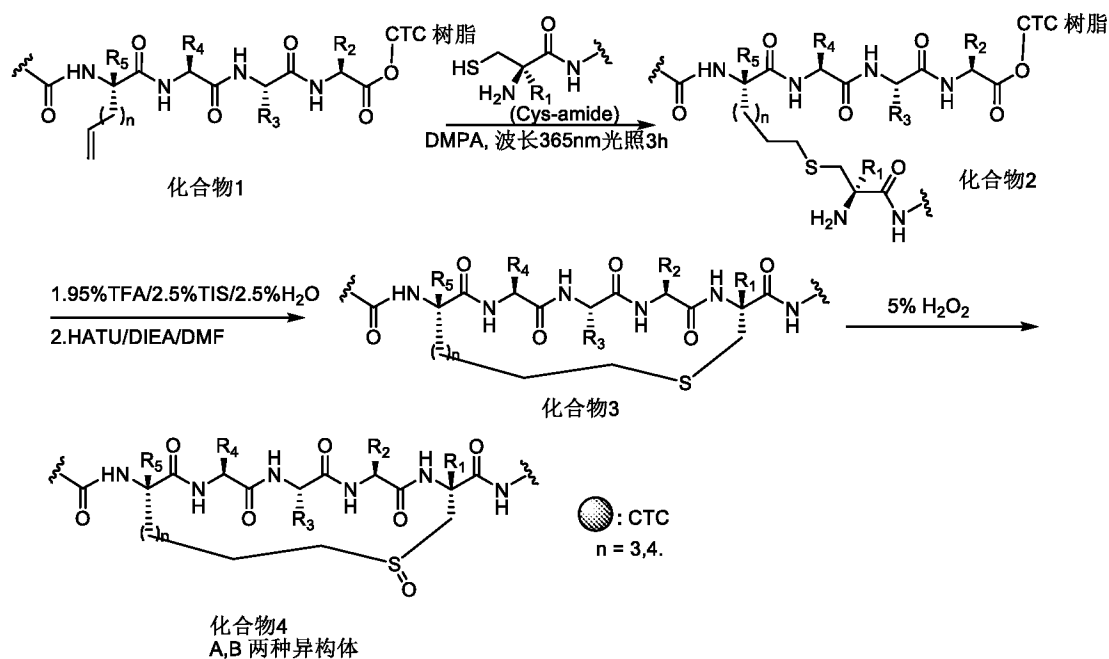
所述侧链在多肽化合物中的位置有如下结构通式：



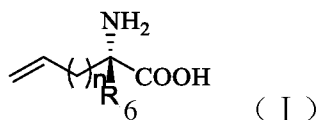
(II)

通式中 R_1 和 R_5 各自独立地为氢或甲基， $R_2 \sim R_4$ 各自独立地为二十种天然氨基酸的残基， n 为 1~6 的正整数，较优选地， n 为 3 或 4，亚砷的构型为 R 。

制备上述侧链稳定的多肽化合物的核心反应步骤如下：



化合物 1 是将多肽的氨基端连接非天然氨基酸，并乙酰化封尾而得。其中的天然氨基酸是由 Fmoc（苄氧羰基）保护的固相接肽完成，所述非天然氨基酸（简称为 monoS_{n+2} ）的结构式如下：



所述非天然氨基酸可通过固相接肽连接到树脂上，其中 R_6 可以为氢或亚甲基。

n 可以为 1~6 中的任何一个正整数。在本发明的一个优选例中，以 $n=3$ 或 4 为示例进行表述。

化合物 2，是由化合物 1 与半胱氨酸（Cys-amide）及其衍生物进行反应而得。反应条件设定为：取化合物 1 0.5mmol，加入光引发剂 DMPA 1.5mmol，Cys-amide 衍生物 1.5-2.5mmol，然后加入 10ml DMF 作溶剂，脱气于 365nm 紫外光下反应 3h，滤掉反应液洗涤即可得化合物 2。

将上一步得到的化合物 2 加入 10ml 三氟乙酸（TFA）/三异丙基硅烷（TIS）/水（ H_2O ）（9.5: 0.25: 0.25 体积/体积）的剪切液中反应 3h，用氮气将剪切液吹干，10ml 乙醚/正己烷（4: 1）沉淀；将沉淀抽干后溶于 200ml N,N' -二甲基甲酰胺（DMF）中，脱气，冰浴下加入 1.0g 2-(7-偶氮苯并三氮唑)- N,N,N',N' -四甲基脒六氟磷酸酯（HATU），0.9ml 二异丙基乙胺（DIEA），缓慢升至室温反应 36h；LCMS 检测反应完全后，将溶剂旋干，HPLC 纯化，冻干，得到干净的化合物 3，即硫醚侧链修饰的多肽化合物。

将化合物 3 溶于 4ml 水中加入 1ml 30%双氧水反应 3h。HPLC 纯化得化合物 4，即亚砷

侧链修饰的多肽化合物。化合物 4 含有两个异构体，其中出峰在前的称为化合物 4A，出峰在后的为化合物 4B。

将得到的化合物溶于 10mM pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中测 CD 谱。化合物 4B 具有良好的 α 螺旋，与传统的酰胺键稳定方法相比，相同序列下可以有更高的螺旋含量。

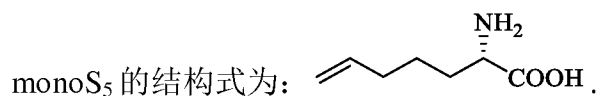
本发明人进而通过 CD 结果证实了这一手性亚砷侧链对稳定多肽的 α 螺旋二级结构效果很好，而且对多肽序列有良好的耐受性。

综上所述，本发明提供了一种通过构建新型的侧链稳定多肽 α 螺旋的方法，而且该方法在一定范围内可通过调节链长来控制 α 螺旋的含量。通过与酰胺键稳定 α 螺旋对比，该方法可以产生更好的 α 螺旋稳定效果。其侧链简单、螺旋含量高、序列耐受性好以及螺旋含量通过链长调节在一定范围内可调等优点是目前本领域的其他稳定方法所不具备的。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例 1 $n=3$ 时，手性亚砷侧链稳定的多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide 的合成：



首先是以 Fmoc 固相多肽合成法合成 Ac-monoS₅AAA-CTC 树脂：

具体路线如下：

1. CTC树脂 $\xrightarrow[\text{in NMP, 室温鼓N}_2, 3\text{h}]{\text{Fmoc-Ala-OH/DIEA}}$ $\xrightarrow[\text{鼓N}_2 5\text{min}]{\text{NMP/MeOH/DIEA=17: 2:1}}$ Fmoc-Ala-CTC 树脂
2. $\xrightarrow[\text{室温鼓N}_2 30\text{min}]{25\% \text{ 吗啡啶}}$ H₂N-Ala-CTC 树脂 $\xrightarrow[\text{in NMP, 室温鼓N}_2, 50\text{min}]{\text{Fmoc-Ala-OH/HCTU/DIEA}}$ Fmoc-Ala-Ala-CTC 树脂
3. $\xrightarrow[\text{室温鼓N}_2 30\text{min}]{25\% \text{ 吗啡啶}}$ H₂N-Ala-Ala-CTC 树脂 $\xrightarrow[\text{in NMP, 室温鼓N}_2, 50\text{min}]{\text{Fmoc-Ala-OH/HCTU/DIEA}}$
4. Fmoc-Ala-Ala-Ala-CTC 树脂
5. $\xrightarrow[\text{室温鼓N}_2 30\text{min}]{25\% \text{ 吗啡啶}}$ H₂N-Ala-Ala-Ala-CTC 树脂 $\xrightarrow[\text{in NMP, 室温鼓N}_2, 90\text{min}]{\text{Fmoc-monoS}_5\text{-OH/HCTU/DIEA}}$ Fmoc-monoS₅-Ala-Ala-Ala-CTC 树脂
- $\xrightarrow[\text{室温鼓N}_2 30\text{min}]{25\% \text{ 吗啡啶}}$ H₂N-monoS₅-Ala-Ala-Ala-CTC 树脂 $\xrightarrow[\text{鼓N}_2 50\text{min}]{\text{Ac}_2\text{O/DIEA/NMP=1:3:16}}$ Ac-monoS₅-Ala-Ala-Ala-CTC 树脂

具体操作为:

1. 接第一个氨基酸: 称取 1.0g CTC 树脂于 100ml 接肽管中, 加入 20ml N-甲基吡咯烷酮 (NMP) 鼓氮气溶胀 30min; 滤掉溶剂加入用 9331mg Fmoc-Ala-OH, 9.6ml NMP 及 2.11ml DIEA 配制成的溶液, 鼓氮气 3.0h; 洗涤: 将接肽管中的溶剂抽干, 将树脂用 NMP (10ml*3) 洗涤三次, 每次一分钟; 封闭: 洗涤结束后, 滤掉反应液, 加入 NMP/MeOH/DIEA (体积比 17/2/1) 10mL 鼓氮气 5min, 滤掉反应液, 洗涤并进行下一步反应。

2. 接第二个氨基酸: 脱保护: 加入体积比为 25% 吗啡啶的 NMP 溶液, 鼓氮气 30min, 洗涤; 连接反应: 将配制好的 Fmoc-Ala-OH (0.4M in NMP) 溶液, 6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯 (HCUT) (0.38M in NMP), DIEA 按 7.5ml/7.5ml/1ml 混匀加入树脂中鼓氮气 50min; 滤掉反应液, 洗涤然后进行下一步操作。

3. 接第三个氨基酸: 操作同 2 接第三个 Ala。

4. 接非天然氨基酸 monoS₅: 脱保护, 加入 Fmoc-monoS₅-OH (0.4M in NMP) 溶液, HCUT (0.38M in NMP), DIEA 按 5.0ml/5.0ml/0.71ml 混匀加入树脂中鼓氮气 120min, 滤掉反应液进行下一步反应。

5. 乙酰化封尾: 脱保护, 洗涤, 滤掉 NMP; 加入 10ml Ac₂O/DIEA/NMP (1: 3: 16) 的混合液, 鼓氮气 50min。

6. 滤掉反应液, 将树脂依次用 NMP (10ml), 二氯甲烷 (DCM) (10ml), 甲醇 (MeOH) (10ml) 交替洗涤, 抽干保存或用于下一步反应。

切割: 取 30mg 树脂于 1.5ml eppendof 管中, 加入 0.5ml TFA/TIPS/H₂O (体积比 9.5: 0.25: 0.25) 震荡反应 0.5h; 沉淀: 树脂过滤除去, 用氮气把剪切液吹干, 然后加入冷的 1ml 乙醚/

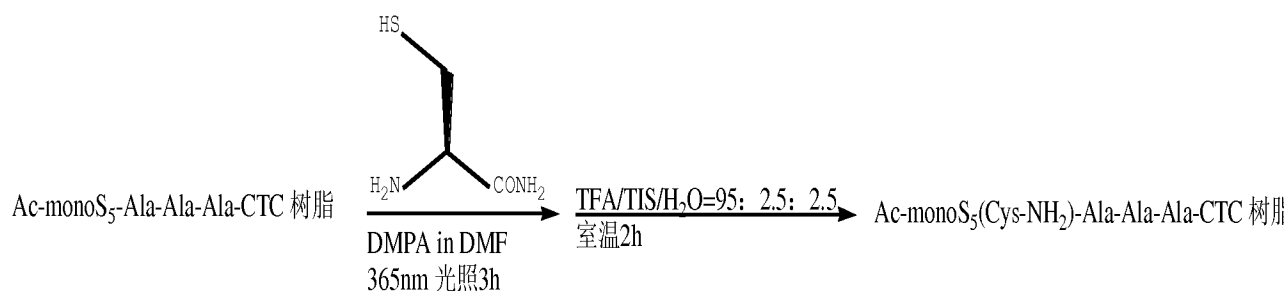
正己烷（4:1）的混合液；离心去上清，将固体沉淀抽干。

将产物溶于 0.5ml 氘代 DMSO 中进行核磁检测：

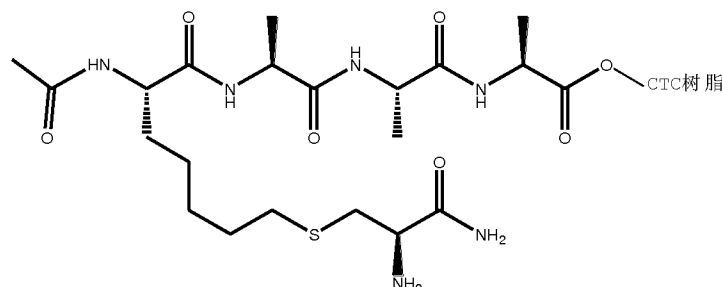
^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.07 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.80 – 5.71 (m, 1H), 5.02 – 4.89 (m, 2H), 4.23 – 4.15 (m, 4H), 1.82 (s, 3H), 1.59 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 1.45 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 1.39 – 1.28 (m, 2H), 1.28 – 1.13 (m, 11H).

通过 thiol-ene 反应（巯基-烯反应）来完成侧链构建。

首先进行光聚合反应：



所获得反应中间体的结构式为：



具体操作为：称取 1.0g Ac-monoS₅AAA-CTC 树脂于 25ml 烧瓶中,依次然后加入 780mg Cys-amide, 380mg DMPA, 50ml DMF; 用氮气换气三次除掉溶剂中的氧;将该烧瓶置于高压汞灯 20cm 处搅拌下反应 3h; 将反应树脂转入接肽管中,滤除反应液,用 DMF(10ml), DCM(10ml), MeOH(10ml)交替洗涤, 抽干得 Ac-monoS₅ (Cys-NH₂) AAA-CTC 树脂。

取 30mg Ac-monoS₅ (Cys-NH₂) AAA-CTC 树脂切割, 沉淀, 核磁检测, 通过观察氢谱上 5.80 – 5.71 (m, 1H), 5.02 – 4.89 (m, 2H) 两处的双键峰来检测反应是否进行完全, 如仍有双键峰则重复 thiol-ene 反应。如双键峰消失说明反应完全, 将剩余的树脂用 10ml 切割液反应 3h, 氮气吹干切割液, 加 10ml 冻乙醚/正己烷 (4:1) 10ml 沉淀, 离心去上清, 最后将所得固体抽干保存。

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.14 (s, 3H), 8.08 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.05 – 7.96 (m, 2H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 4.30 – 4.11 (m, 5H), 2.93 – 2.91 (m, 1H), 2.87 – 2.77 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.65 – 1.54 (m, 1H), 1.54 – 1.39 (m, 3H), 1.39 – 1.16 (m, 13H).

然后通过酰胺键的形成合成环状多肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂。

具体操作：将 thiol-ene 反应中所得的固体转移到 1000ml 烧瓶中，加入 500ml DMF,氮气换气三次；氮气保护下冰浴加入 1.0g 接肽试剂 HATU，搅拌 10min 后加入 0.9ml DIEA,缓慢升至室温反应 12h。

反应液旋干之后用 HPLC 纯化，250*10mm C18 反相色谱，A 液：0.1% TFA H₂O, B 液：0.1%TFA 乙腈；溶剂梯度：0-45min 5-50%；R_t=31.492。HPLC 色谱图（图 5）及 LCMS 检测（图 6）。

图 5 的具体结果如表 1 所示。

表 1 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ 的 HPLC 分析结果

峰名称	保留时间	高度	峰开始	峰结束	面积%
P	31.492	2712473	30.808	31.983	10.7948

产物冻干后取 2mg 溶于 0.5ml 氘代 DMSO 中核磁检测：

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.38 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 4.29 – 4.05 (m, 5H), 2.84 (dd, J = 13.9, 4.4 Hz, 1H), 2.76 – 2.65 (m, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.74 – 1.69 (m, 1H), 1.62 – 1.12 (m, 18H).

将产物环肽 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ 3mg 溶于 4ml 水中然后加入 1ml 30% H₂O₂ 反应 3h HPLC 纯化，得到侧链含有手性亚砷的两种环肽非对应异构体：Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide A, Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide B. 如图 11：

图 11 的具体结果如表 2 所示。

表 2 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide A 和 B 的 HPLC 分析结果

峰名称	保留时间	高度	峰开始	峰结束	面积%
A	22.860	31087340	22.483	23.850	41.0151
B	27.398	44707504	27.050	28.600	58.9849

两个产物用 LC-MS 分析（图 7，图 8），及核磁氢谱分析：

Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide A

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.36 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 5 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 7.5Hz, 2H), 4.51 – 4.39 (m, 1H), 4.25 – 4.19 (m, 2H), 4.01 – 3.95 (m, 1H), 3.15 – 3.03 (m, 2H), 2.87 – 2.81 (m, 1H), 2.70 – 2.64 (m, 1H), 1.81 (s, 3H),

1.75– 1.62 (m, 2H), 1.45 – 1.34 (m, 5H), 1.32 (s, 3H), 1.25 – 1.21 (m, 9H).

Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide B

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.42 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 10.4 Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 4.57 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 3H), 4.06 – 3.97 (m, 1H), 3.08 – 2.94 (m, 2H), 2.87 (dd, J = 13.2, 7.1 Hz, 1H), 2.70 – 2.60 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.79 (dd, J = 18.3, 11.6 Hz, 2H), 1.60 – 1.47 (m, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.24 (t, J = 6.5 Hz, 9H).

将 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide 两种异构体 ASOA/ASOB 溶于 10mM PBS 溶液中测定 CD 图谱：取 0.1-0.5mg 样品分别溶于 0.5ml 10mmol PBS 中测 CD 波长为 190nm-250nm 处的色谱图，然后根据以下公式计算得 alpha 螺旋含量；结果如表 3。

alpha 螺旋计算公式：

$$f_H = ([\theta]_{\text{obs}215} - [\theta]_C) / ([\theta]_{\infty 215} - [\theta]_C)$$

$$[\theta]_{\text{obs}215} = \theta / (10 * C * N_p * l)$$

$$[\theta]_{\infty 215} = (-44000 + 250T) (1 - \kappa / N_p)$$

$$[\theta]_C = 2220 - 53T = 1054$$

T=22°C, κ=4.0, N_p=6 (对于五肽), l=0.1(cm), C 为样品摩尔浓度 M。

从 CD (图 1) 可以看出两种异构体只有在 HPLC 分离中出峰靠后的异构体 B 具有稳定的 alpha 螺旋。

对比 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AAAC-NH₂ sulfoxide B 在 PBS 和 50% TFE 缓冲液中的 CD 图可发现，TFE 缓冲液对这一异构体没有 alpha 螺旋的提高，说明这一侧链稳定方法已经将短肽的 alpha 螺旋提高到了最佳值。

改变五肽的中间氨基酸为不利于 alpha 螺旋的 G 和 I 得到 Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AGAC-NH₂ sulfoxide B(GSOB), Ac-cyclo(1,5)-monoS₅AIAC-NH₂ sulfoxide B(ISOB) 结果同样有很高的 alpha 螺旋含量 (表 3, 图 3)

将本发明的方法与传统的酰胺键稳定方法进行对比，表 3 中 ASOA/对照，结果表明相同中间序列情况下，这一稳定方法相对于酰胺键侧链稳定多肽 alpha 螺旋稳定效果提高 14%。

表 3 多肽在 pH=7.4 22℃ 10mM PBS 中的相对 alpha 螺旋含量

多肽	$[\theta]_{215}$	$[\theta]_{207}$	$[\theta]_{190}$	$[\theta]_{215}/[\theta]_{207}$	相对 alpha 螺旋含量*
ASOA	672	-4667	-14594	-0.14	-0.04
ASOB	-15666	-16054	25987	0.98	1.00
GSOB	-7920	-7777	9121	1.02	0.51
ISOB	-13558	-15556	26306	0.87	0.87
对照	-13537	-13684	39352	0.99	0.86**

*以 ASOB 为标准 $[\theta]_{215} (x) / [\theta]_{215} (\text{ASOB})$ 为相对 alpha 螺旋含量

**control 为酰胺键侧链的环肽 Ac-(cyclo2,6)-R[KAAAD]-NH₂

实施例 2 n=4 时亚砷侧链稳定的多肽的合成及 CD 图谱的测定

将 monoS₅ 换成多一个碳原子的 monoS₆ 用同样的合成路线，我们得到了两个非对映异构体，同样根据 HPLC 上出峰时间的先后命名为 Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide A 和 Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide B，LCMS 鉴定（图 9，图 10），及核磁氢谱：

Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide A

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.42 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.24 – 7.16 (m, 3H), 4.68 – 4.61 (m, 1H), 4.30 – 4.08 (m, 4H), 3.17 (dd, J = 13.8, 3.0 Hz, 1H), 3.02 (dd, J = 13.9, 9.3 Hz, 1H), 2.71 (dd, J = 13.7, 6.5 Hz, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.76 – 1.67 (m, 1H), 1.67 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.40 (m, 3H), 1.40 – 1.18 (m, 13H).

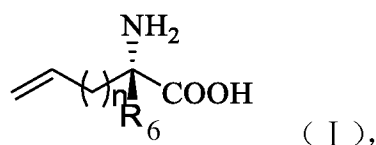
Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide B

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.41 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.20 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.54 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.29 – 4.13 (m, 4H), 3.08 – 2.93 (m, 2H), 2.74 (td, J = 13.3, 6.4 Hz, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.64 (t, J = 18.4 Hz, 3H), 1.44 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.38 – 1.17 (m, 13H).

测定 Ac-cyclo(1,5)-monoS₆AAAC-NH₂ sulfoxide A/B 的 CD（图 4），同样只有 B 异构体才有 alpha 螺旋稳定效果。

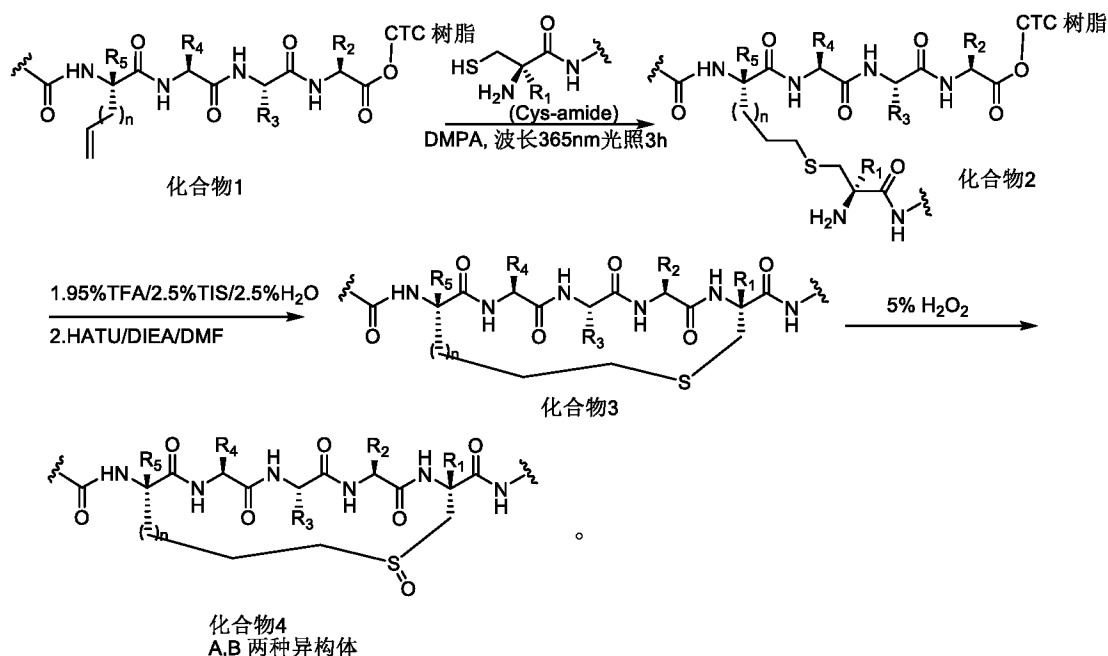
本发明所涉及的多个方面已做如上阐述。然而，应理解的是，在不偏离本发明精神之前提下，本领域专业人员可对其进行等同改变和修饰，所述改变和修饰同样落入本专利申请所附权利要求的覆盖范围。

1. 一种将多肽稳定为 α 螺旋二级结构的方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：
 - (1) 将多肽的氨基端连接非天然氨基酸，并乙酰化封尾；
 - (2) 将步骤 (1) 的产物经过巯基-烯反应获得硫醚侧链修饰的多肽化合物，该硫醚侧链偶联氨基酸的位置为 $i/i+4$ ；
 - (3) 将硫醚侧链修饰的多肽化合物氧化，获得 R 型或 S 型亚砷侧链修饰的多肽化合物；
 - (4) 将步骤 (3) 的产物分离纯化，获得 R 型亚砷侧链修饰的多肽化合物。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (1) 中的非天然氨基酸具有如下结构式：

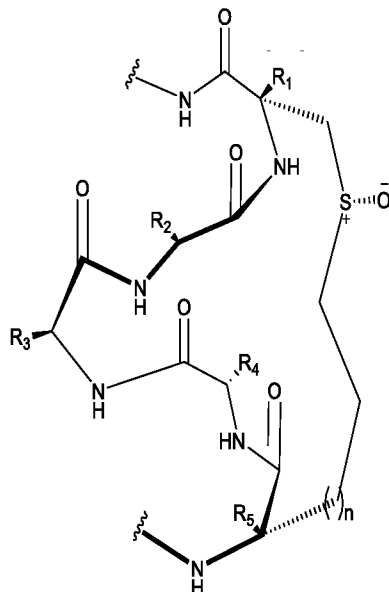


其中 R_6 为氢或亚甲基， n 为 1~6 的正整数。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 中的巯基-烯反应是先将步骤 (1) 的产物与半胱氨酸或半胱氨酸衍生物进行光聚合反应，然后通过酰胺键的形成合成硫醚侧链修饰的多肽化合物。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 和步骤 (3) 的反应式如下：



5. 一种带有侧链修饰的多肽化合物，其特征在于，该多肽化合物具有如下结构式：



(II),

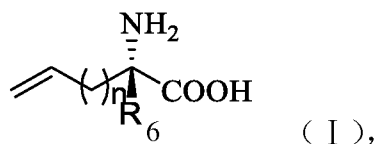
其中， R_1 和 R_5 各自独立地为氢或甲基， $R_2 \sim R_4$ 各自独立地为氨基酸残基， n 为 1~6 的正整数，亚砷的构型为 R。

6. 如权利要求 5 所述的多肽化合物，其特征在于，所述多肽的长度不大于 20 个氨基酸。

7. 如权利要求 5 所述的多肽化合物，其特征在于，所述 n 为 3 或 4。

8. 如权利要求 5 所述的多肽化合物的制备方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：

(i) 将多肽的氨基端连接非天然氨基酸，并乙酰化封尾，所述非天然氨基酸具有如下结构式：



(I),

其中 R_6 为氢或亚甲基， n 为 1~6 的正整数；

(ii) 将步骤 (i) 的产物经过巯基-烯反应获得硫醚侧链修饰的多肽化合物，该侧链偶联氨基酸的位置为 $i/i+4$ ；

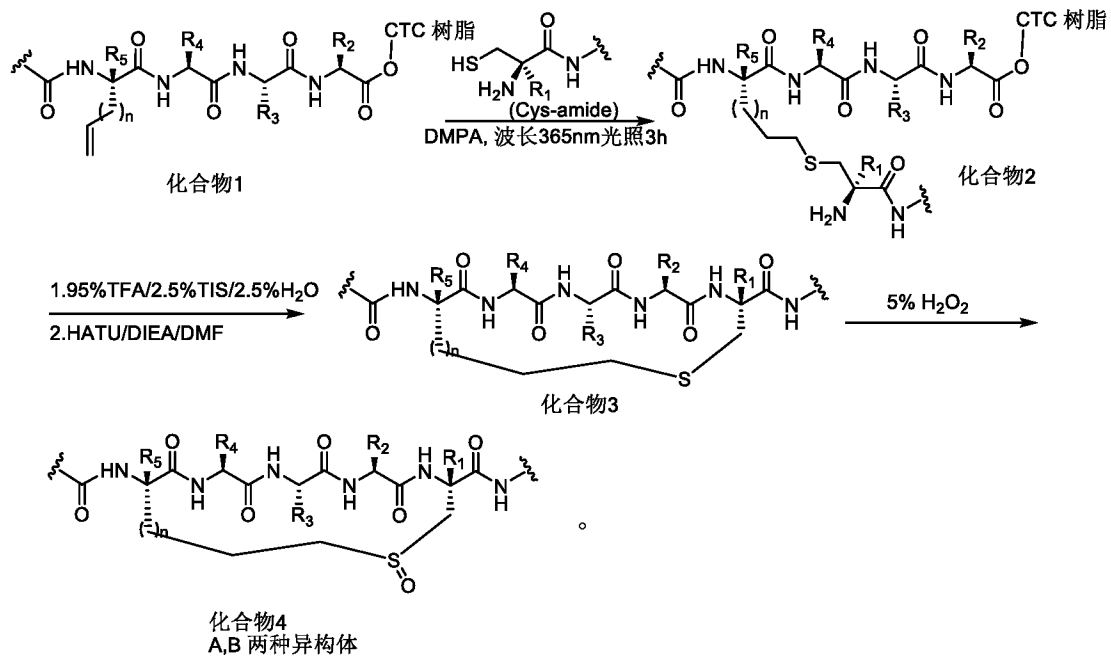
(iii) 将硫醚侧链修饰的多肽化合物氧化，获得 R 型或 S 型亚砷侧链修饰的多肽化合物；

(iv) 将步骤 (iii) 的产物分离纯化，获得 R 型亚砷侧链修饰的多肽化合物。

9. 如权利要求 8 所述的多肽化合物的制备方法，其特征在于，所述步骤 (ii) 中的巯基-烯反应是先将步骤 (i) 的产物与半胱氨酸或半胱氨酸衍生物进行光聚合反应，然后通过酰胺键的形成合成硫醚侧链修饰的多肽化合物。

10. 如权利要求 8 所述的多肽化合物的制备方法，其特征在于，所述步骤 (ii) 和步骤

(iii) 的反应式如下:



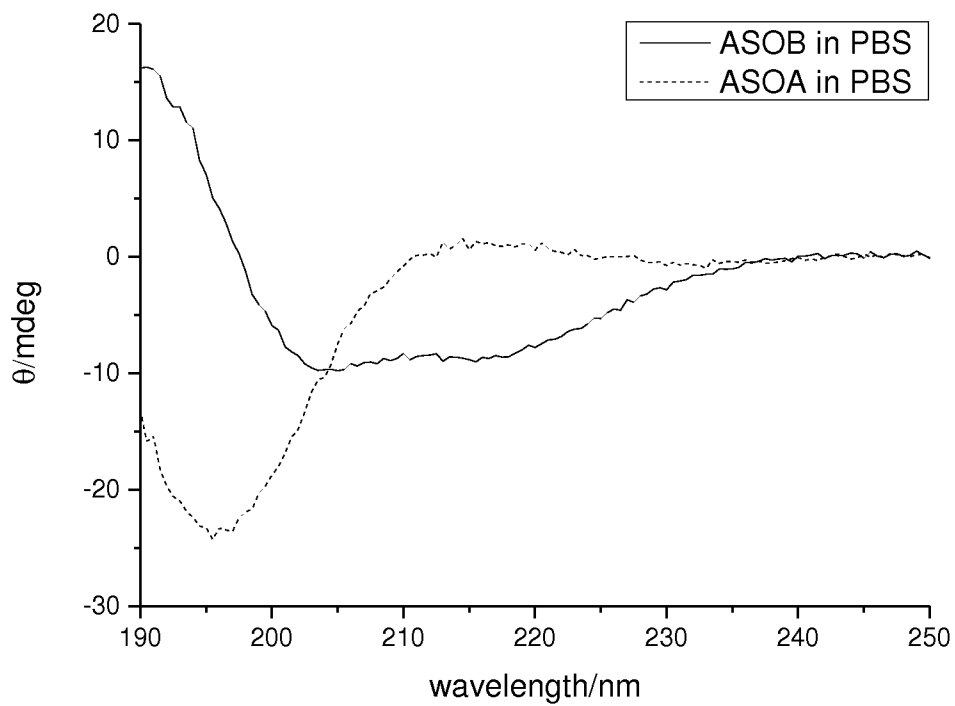


图 1

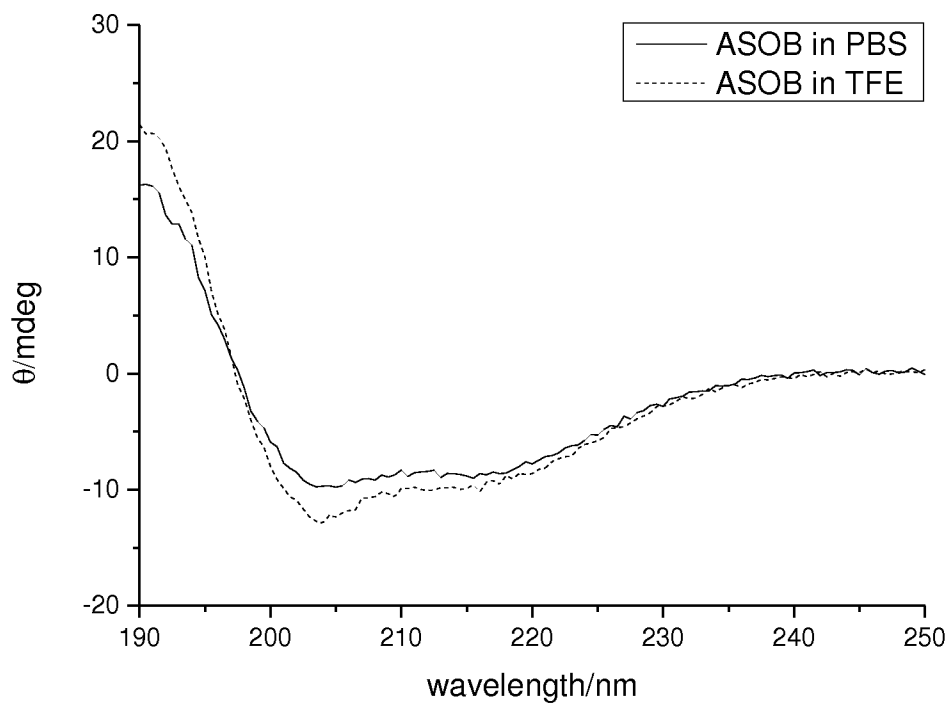


图 2

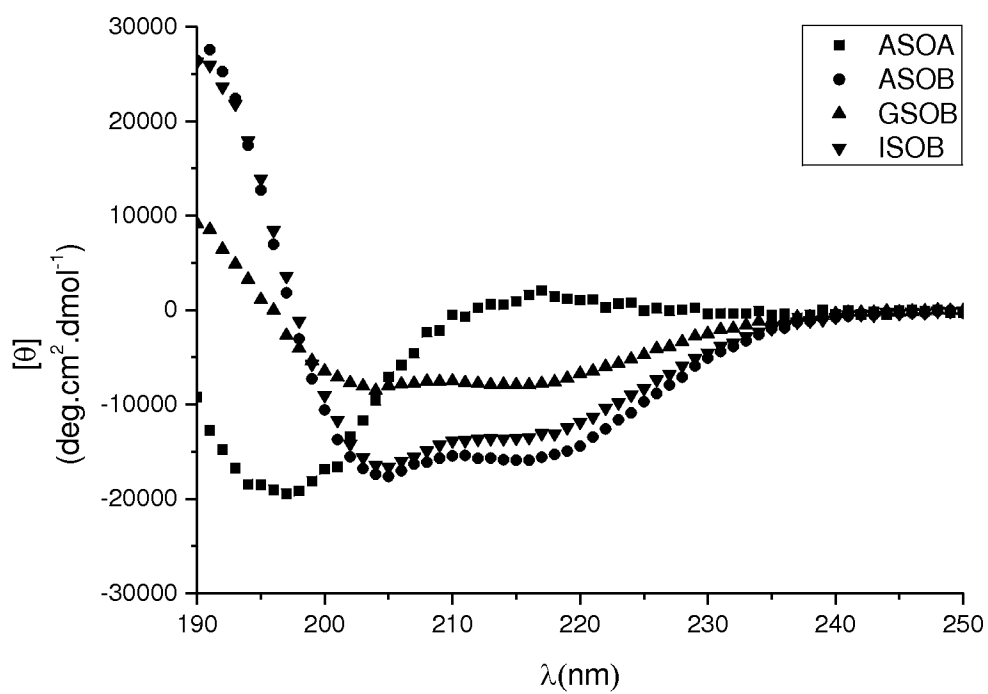


图 3

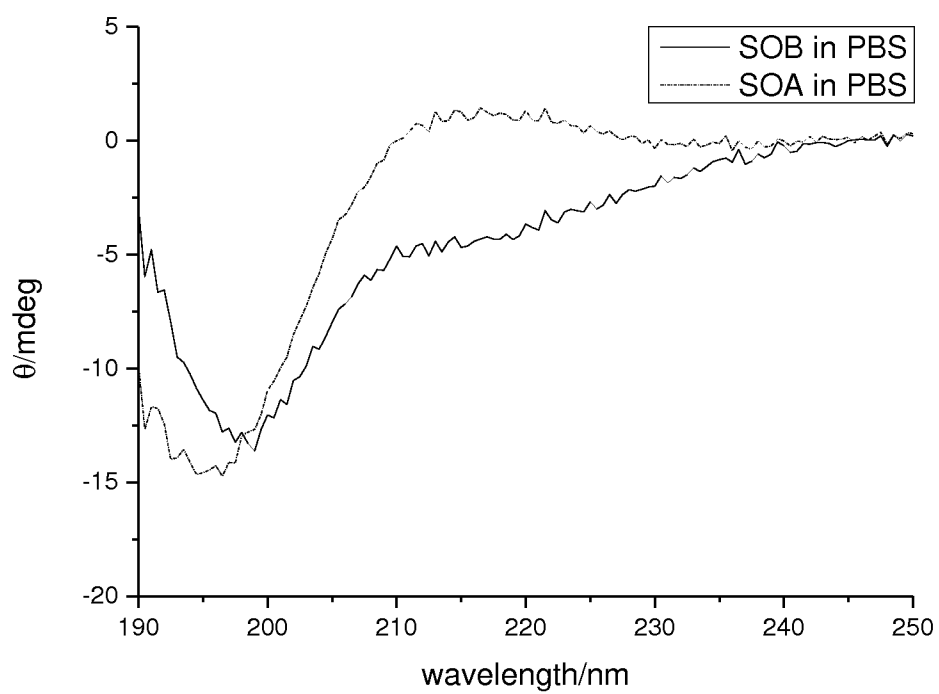


图 4

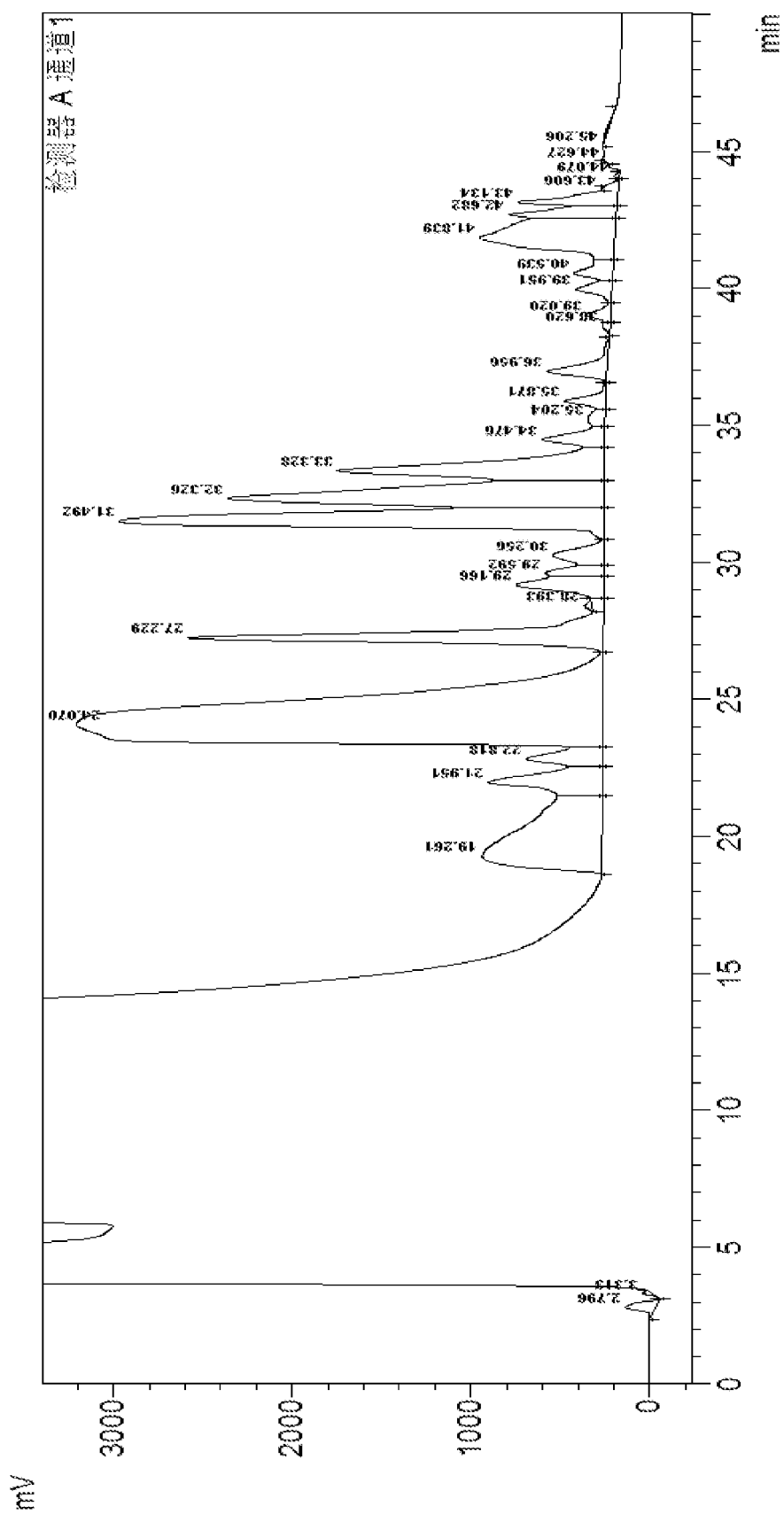


图 5

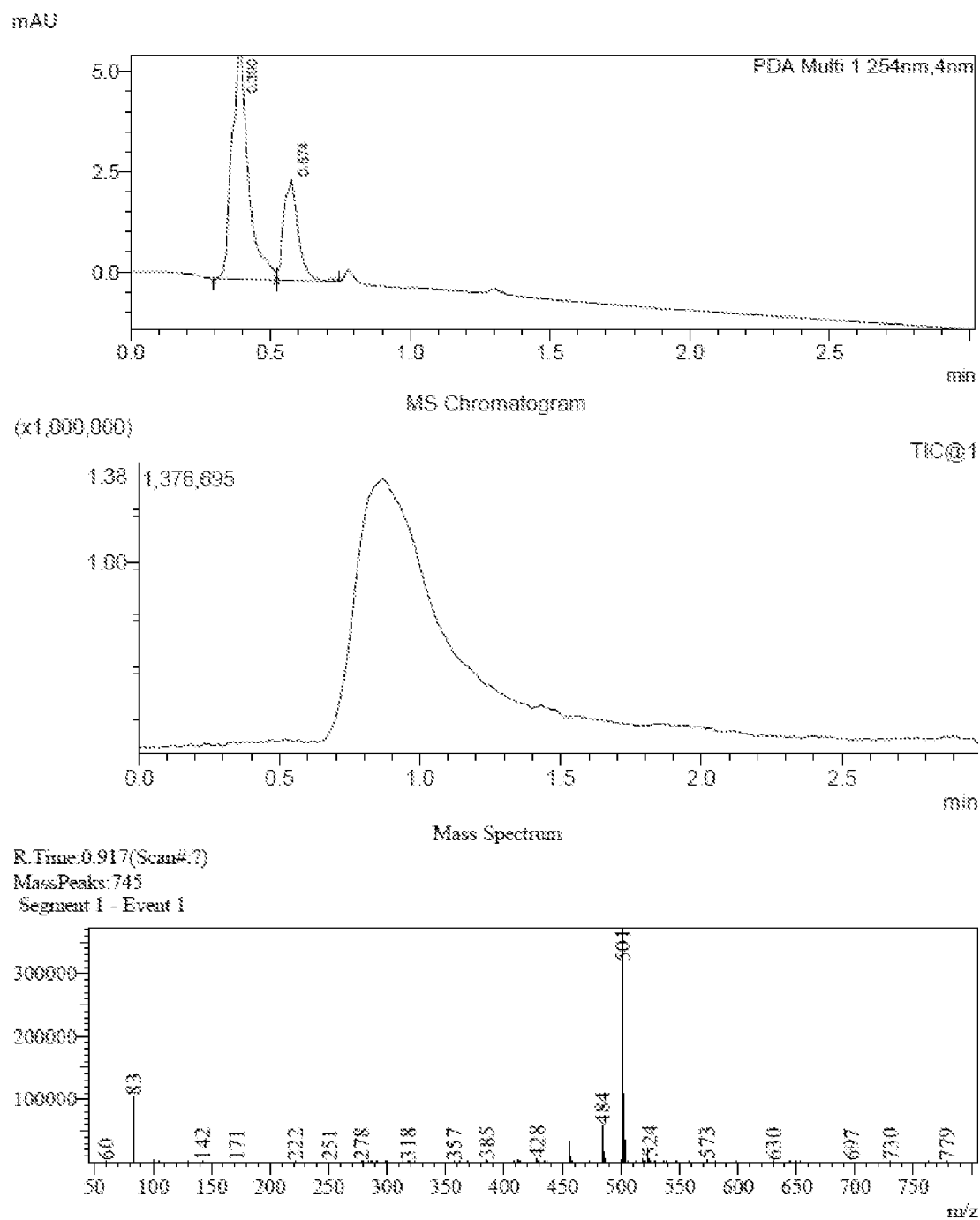


图 6

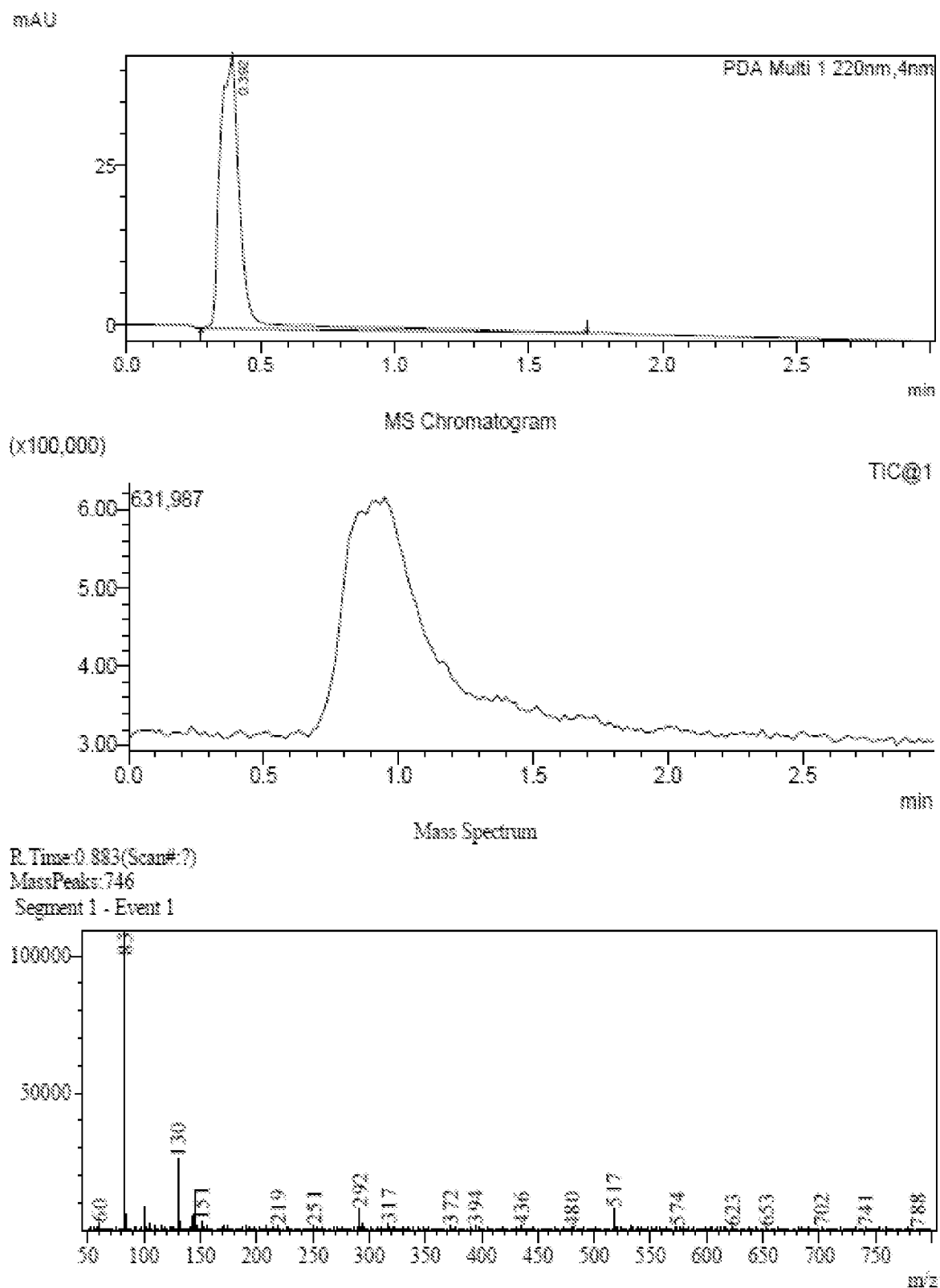


图 7

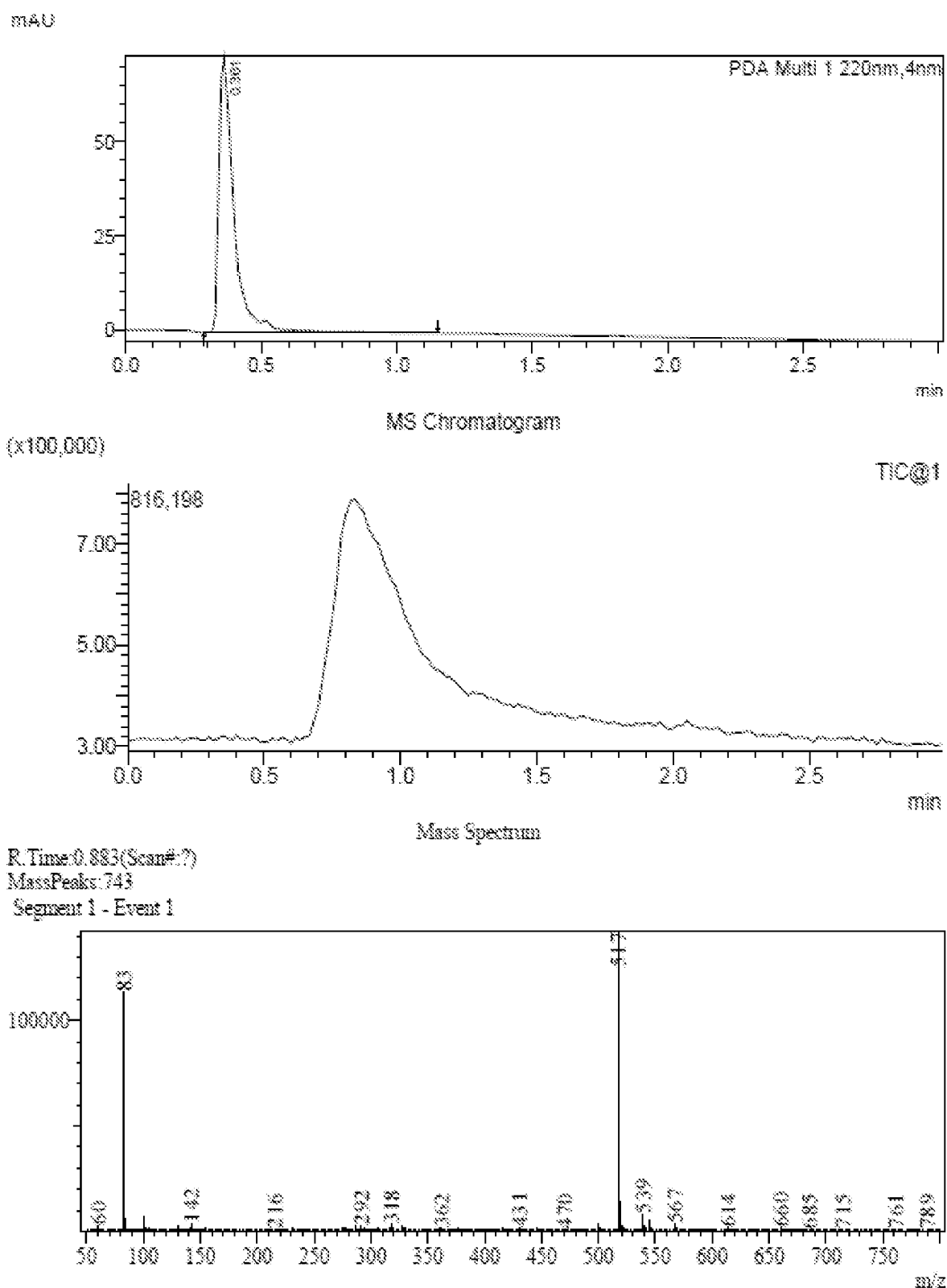


图 8

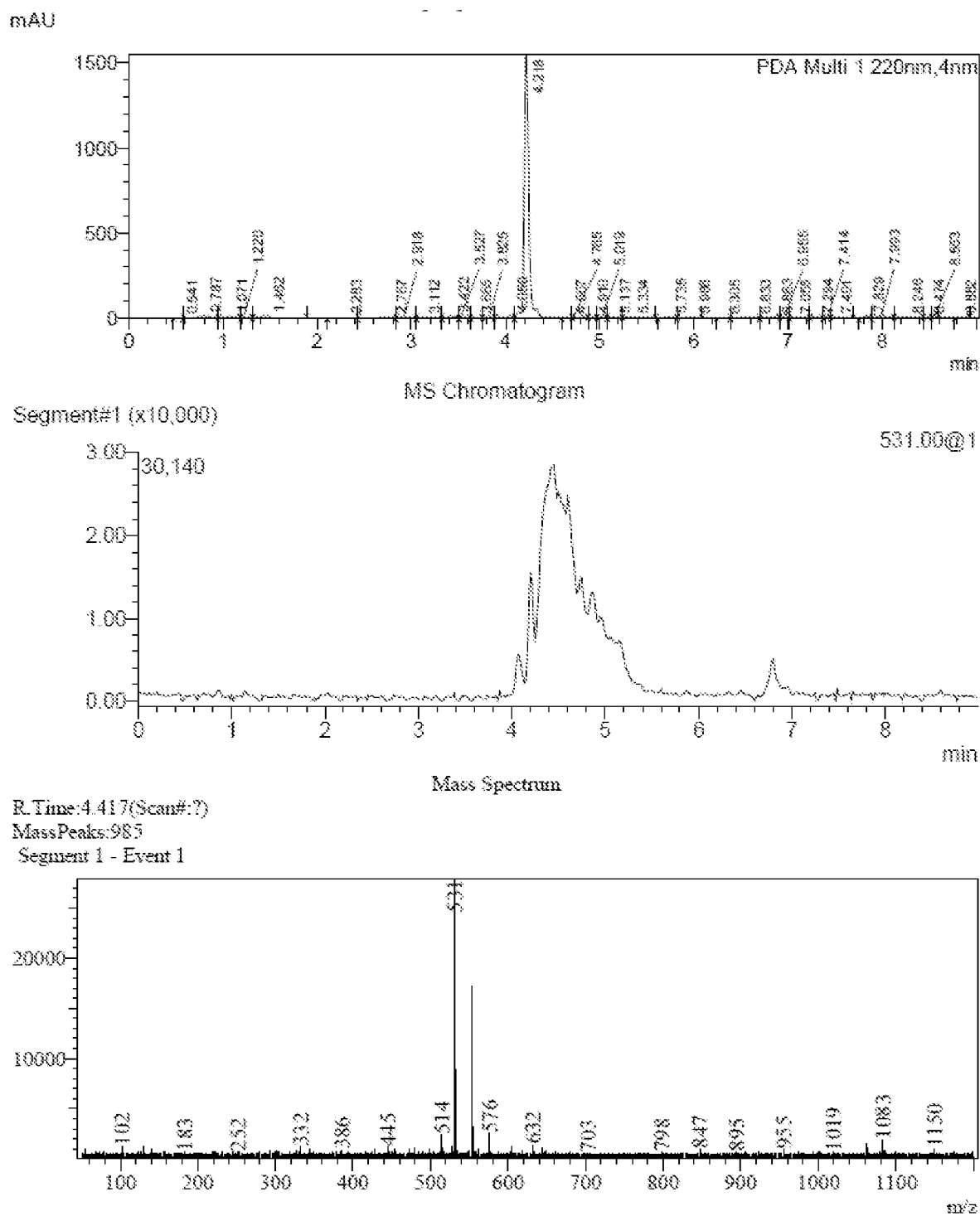


图 9

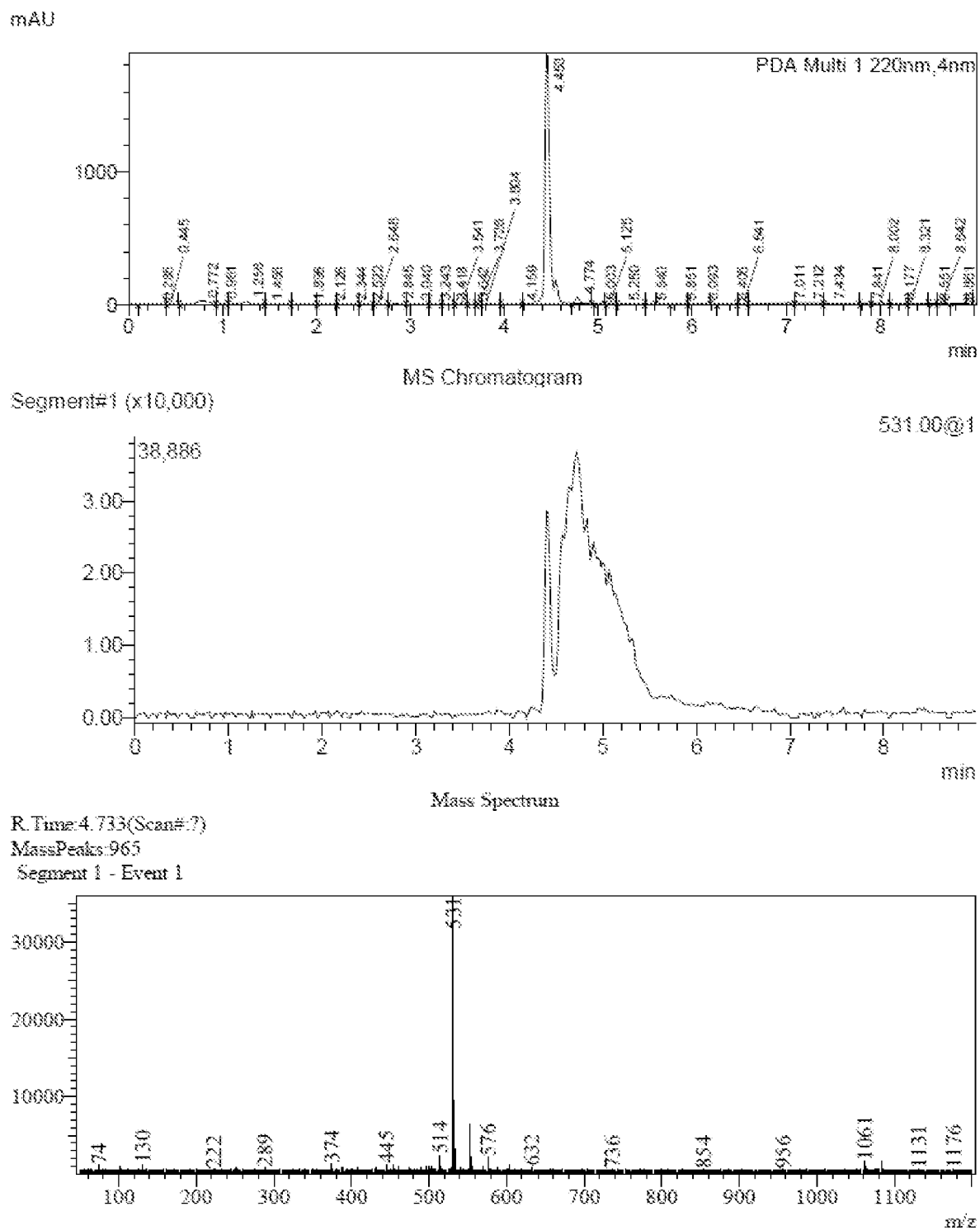


图 10

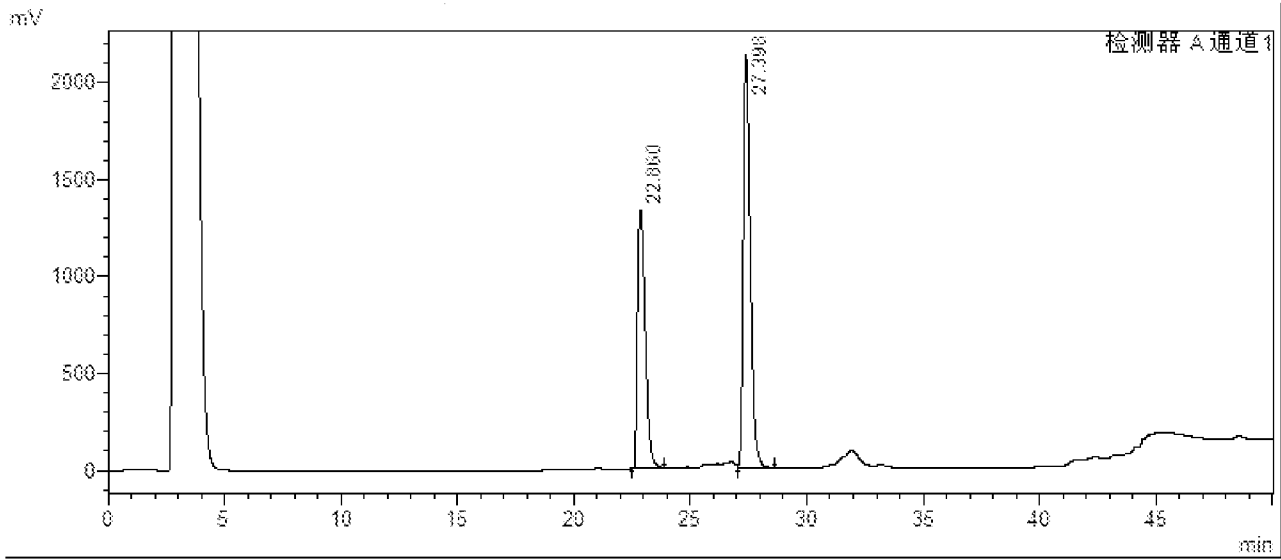


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/086071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see the extra sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WANG, Dexin, et al. Progress in Synthesis of Cyclopeptides. Chinese Journal of Organic Chemistry, vol. 28, No. 4, pages 549-573. 31 December 2008 (31.12.2008) see the introduction, section 5, and the abstract	5-7 1-4, 8-10
Y A	WO 0073326 A2 (US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICES) 07 December 2000 (07.12.2000) see claims 1 and 2, and the abstract	5-7 1-4, 8-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 December 2013 (25.12.2013)	Date of mailing of the international search report 23 January 2014 (23.01.2014)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WU, Yongqing Telephone No. (86-10) 62411103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/086071

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 0073326 A2	07.12.2000	AU 6047600 A	18.12.2000
		US 2003078368 A1	24.04.2003
		US 6951915 B2	04.10.2005
		US 2006014927 A1	19.01.2006
		US 7259142 B2	21.08.2007
		US 2008031812 A1	07.02.2008
		WO 0073326 A3	25.05.2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/086071

Continuation of: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/54 (2006.01) i

C07K 5/12 (2006.01) i

C07K 1/107 (2006.01) i

Continuation of: Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, PUBMED: SULFOXIDE, SULPHOXIDE, ALKYL SULFIDE, SULFOETHER, SULFUR ETHER, THIO ETHER, THIOETHER, SULFUR, SUFONE, etc.

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

见附加页

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y A	王德心,等.环肽的合成研究进展.有机化学, 第 28 卷, 第 4 期, 第 549-573 页. 31.12 月 2008 (31.12.2008) 参见引言、第 5 节和摘要	5-7 1-4, 8-10
Y A	WO 0073326 A2 (US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICES) 07.12 月 2000 (07.12.2000) 参见权利要求 1 和 2, 和摘要	5-7 1-4, 8-10



其余文件在 C 栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

25.12 月 2013 (25.12.2013)

国际检索报告邮寄日期

23.1 月 2014 (23.01.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

吴永庆

电话号码: (86-10) 62411103

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/086071

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 0073326 A2	07.12.2000	AU 6047600 A	18.12.2000
		US 2003078368 A1	24.04.2003
		US 6951915 B2	04.10.2005
		US 2006014927 A1	19.01.2006
		US 7259142 B2	21.08.2007
		US 2008031812 A1	07.02.2008
		WO 0073326 A3	25.05.2001

续：主题的分类

C07K 7/54 (2006.01) i

C07K 5/12 (2006.01) i

C07K 1/107 (2006.01) i

续：在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, PUBMED: 亚砷, 硫醚, 硫, SULFOXIDE, SULPHOXIDE, ALKYL SULFIDE, SULFOETHER, SULFUR ETHER, THIO ETHER, THIOETHER, SULFUR, SUFONE, 等