

研究报告

杂环肽 FIK 的 Fmoc 固相合成法研究

张俊君, 石伟, 陈五岭

西北大学生命科学学院, 西安 710069

摘要: 为研究二硫键成环的杂环肽 FIK 的合成工艺, 以 Fmoc 氨基酸为原料, 采用固相合成法, 经 TBTU/HOBT/DIEA 复合缩合剂催化合成直链肽, 再经 I_2 氧化肽链上两个半胱氨酸的巯基生成分子内二硫键而得到目标环肽, 将其用切割试剂切割脱离树脂得到粗产品, MALDI-MS 和 RP-HPLC 进行鉴定, 分析和纯化。产率可以达到 18%, 纯化后纯度达 97% 以上, 经 MALDI-MS 和 Ellman 试剂检测确定为目标肽。该合成法高效, 简便, 快速, 目标肽收到较理想产率, 适合大批量生产。

关键词: 环肽, FIK, 固相合成, 二硫键, 环化

Fmoc Solid-phase Synthesis of Cyclopeptide FIK

Junjun Zhang, Wei Shi, and Wuling Chen

College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: We study the techniques of synthesis of disulfide bond-bearing cyclopeptides FIK. This experimentation with the material of Fmoc-aa use Solid-Phase synthesis after condensation by HBTU/HOBT/DIEA to synthesize linear peptide, then cyclopeptide was synthesized by creation of intramolecular disulfide bond by means of I_2 oxidation of bis cysteine sulfhydryl of the linear peptide. The crude production was cleaved from the resin together with all protecting group and identified and separated by MALDI-MS and RP-HPLC. The peptide yield was 18%, after purification the purity was more than 97%. It was identified on MALDI-MS and Ellman reagent detection. This method is effective, simple, rapid and obtained good yield, and it's fit for the large-scale production.

Keywords: cyclopeptide, FIK, solid-phase synthesis, disulfide bond, cyclization

近年来, 胰岛素、催产素、抗体、真菌毒素等生理活性环肽结构的阐明及成功合成使得环肽的合成成为研究热点^[1], 杂环肽的氨基酸(包括非蛋白氨基酸)残基之间存在的非酰胺键主要是酯键和二硫键^[2-3], 酯键的形成与酰胺键的形成类似, 而二硫键的形成则与酰胺键的形成相差较大。通过二硫键形成环肽是非常方便的一种途径, 虽然它也存在很多局限性, 比如巯基在空气中易于被氧化, 多个巯基存在时, 经常会伴有严重的副反应等, 但是该法环合条件简单, 因而一直被视为一种非常重要的环合

方法。二硫键的形成其实是一种氧化反应, 即利用一定的氧化剂在一定条件下将两个 Cys 的巯基氧化成-S-S-键, 因此氧化剂的选择很关键^[4]。

FIK 是由 12 个氨基酸组成的含二硫键的杂环肽, 是由第四军医大学研制的一种在肿瘤发生、发展中起重要的调节作用、助于肿瘤生长和转移的生物活性肽^[5], 对其的研究对探讨肿瘤治疗有重要意义。本试验采用固相合成法^[6], 综合考虑了半胱氨酸残基侧链巯基保护基、缩合试剂、切割试剂的选择以及反应溶液浓度、反应时间, 并选用不同于以往的氧

化剂氧化-SH 生成-S-S-, 得到含二硫键的目标环十二肽。

1 材料和方法

1.1 材料

PR-HPLC 型反相高效液相色谱仪(Waters 公司); 基质辅助激光解吸附电离飞行质谱仪(MALDI-MS Hewlett-Packard); 台式冷冻干燥机(军事医科学院四环仪器厂); 小型台式离心机(北京仪器六厂); 净水仪(法国); 2-chlorotriethyl chloro resin(二氯树脂取代度 0.3mmol/g); Fmoc 保护的氨基酸; 侧链保护基 Cys(三苯甲基, AcM); Asp(叔丁基, tBu); His(Trt); Tyr (tBu); DCM(二氯甲烷); DIEA(二异丙基乙胺); HOBt(1-羟基-苯并-三氮唑); TBTU(1-氧-3-双二甲胺羰基苯并三氮唑四氯化硼盐); DMF(N, N-二甲基甲酰胺); 异丙醇; 甲醇(MeOH)等, 以上试剂均由吉生化(上海)有限公司提供; TFA(三氟乙酸, 法国 CRhodia 公司); 乙腈: 色谱纯(美国); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 Fmoc 固相合成

合成 H₂N-Gly-Gly-Gly-Cys-Ser-Asp-Tyr-Asn-His-His-Trp-Cys-COOH 过程如下。

1.2.1 树脂的选择及活化处理

本实验选择二氯树脂。取二氯树脂 1.5 g 加入到用 DCM 浸泡过的反应柱中, 用 DCM 15 mL 浸泡 30 min 使树脂充分膨胀, 以活化待用。

1.2.2 第一个氨基酸的连接

称取 Fmoc-Cys(AcM)-OH 0.31 g(依据为: 树脂量 × 取代度 × 氨基酸分子量 × 过量倍数)于 DCM 中溶解, 再加入 DIEA 0.5 mL, 混合加入反应容器中, 吹 N₂ 反应 2 h, 将反应液过滤除去加入 MeOH 5 mL 封闭反应 1 h 后用 DCM、异丙醇、DMF 各洗涤树脂 3 次。

1.2.3 脱除氨基保护基

加入约 15 mL 20% 哌啶的 DMF 溶液反应 5 min, 滤掉, 再加入 15 mL 反应 20 min 后用异丙醇洗涤树脂 2 次、DMF 洗涤树脂 3 次。茚三酮法检测: 取少量树脂加入到 5% 茚三酮的无水乙醇溶液(W/V)中, 沸水浴 3 min, 检验结果树脂颜色呈黑色或紫色^[7]。

1.2.4 肽键的形成

称取 0.55 g Fmoc-Trp(boc)-OH, 0.35 g TBTU 以

DMF 溶解, 与 0.6 mL HOBt (2 mol/L), 0.2 mL DIEA 混合加入盛有树脂的反应容器中, 吹 N₂ 反应 2 h 后用异丙醇洗涤树脂 2 次、DMF 洗涤树脂 3 次。取少量树脂加入到 5% 茚三酮的无水乙醇溶液(W/V)中, 沸水浴 3 min, 树脂呈无色, 即阴性反应, 进行下一步反应。

重复上述步骤(脱保护和接肽), 按还未成环前的直链肽的序列由羧基端→氨基端的顺序依次连接氨基酸。接完最后一个氨基酸后, 暂不脱除最后一个氨基酸 Gly 的 Fmoc 保护基团。

1.2.5 二硫键的形成

称取 2.6 g I₂ 溶于 85 mL 甲醇与 15 mL DMF 混合液中, 配成 0.1 mol/L I₂ 溶液, 混匀加入反应容器中, 吹 N₂ 反应 6 h 成环。

1.2.6 侧链脱保护及环肽脱离树脂

洗涤、脱除最后一个氨基酸的 Fmoc 保护后用 N₂ 将环肽-树脂复合物吹干, 加入 50 mL 小烧瓶中, 按 10 mL/0.5 mL/0.25 mL/0.5 mL/0.75 g 的比例加入 TFA/苯甲硫醚/巯基乙醇/水/苯酚配成的切割试剂。室温磁力搅拌反应 3 h 后, 过滤入冰乙醚中, 置冰箱 2 h, 离心收集, 沉淀用纯水溶解, 再置冰箱冷冻, 后将冻结的冰状物置真空冷冻干燥机, 冻干至恒重即得粗肽。

1.3 合成样品的纯化和分析

1.3.1 反相高效液相色谱纯化及分析

色谱分析条件: 4.6 mm×250 mm(C₁₈, 反相, 柱号: 272010); 流动相: A 液为 0.1% 三氟乙酸的超纯水溶液, B 液为 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液; 梯度洗脱方式: 90%A+10%B 在 30 min 内降为 10%A+90%B; 流速 1 mL/min; 检测波长: 215 nm。自动收集洗脱峰。

1.3.2 质谱分析

Shimadzu 公司 Axima CFR plus 型 MALDI-TOF MS, 离子线性飞行距离 65 cm, N₂ 激光器(激光波长 337 nm), 质谱信号为 50~100 次单次扫描的累加, 基质为 CHCA, 样品与基质饱和溶液以 1:1(V/V)混合点样, 室温自然挥发干燥, 线性模式下, 20 kV 加速电压分析。操作按质谱仪说明进行。

1.3.3 环化效果分析

定量取两份 FIK 样品溶解, 一份加入 0.1 mL 2-硝基苯甲酸(Ellman), pH 8.0, 室温下反应 30 min, 一份不加做为空白对照, 利用分光光度计在波长

412 nm 处测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 合成方法的创新选择

传统环肽的合成液相和固相两种^[4]。线型肽成环属于分子内反应, 为避免发生分子间反应生成线性或环状的二聚和多聚体, 一般在高度稀释的溶液(10^{-3} ~ 10^{-4} mol/L) 中进行。液相法合成环肽可直接反应, 即将脱保护后的线型肽前体直接在缩合试剂的缩合下成环。这种方法的缺点在于肽分子间的低聚反应易造成环肽产率和纯度的严重降低, 反应常需用到繁琐的侧链保护策略, 环合反应时间长, 反应需要不断添加缩合剂, 并且由于应用侧链保护策略, 降低了线性肽前体的水溶性, 反应只能在低浓度下进行。固相法合成环肽是在树脂上环化, 然后脱落下来, 因而避免了分子间的二聚和多聚, 反应不需在高度稀释的溶液中进行, 过量的缩合试剂及副产物可通过洗涤与过滤除去。对于利用氧化-SH 形成二硫键成环, 传统方式是采用液相合成法, 而本实验对于氧化-SH 形成二硫键成环则采用固相合成法, 合成完线性肽后不切割直接在树脂上氧化-SH 形成分子内二硫键成环, 并且采用不同于以往的氧化剂 I_2 , 取得了较理想的结果。

2.2 未反应氨基酸的封闭

固相合成中, 如 3 次重复缩合后仍呈茚三酮阳性反应, 表明未被缩合的少量氨基组分已很难被酰化, 再次重复缩合已无必要。为避免残存的氨基在以后的接肽循环中参与反应, 生成各种分子量不同的缺失肽, 一般需要对未反应的少量氨基进行主动封闭。封闭的方法有: 醋酐(1 mol/L)和三乙胺(0.3 mol/L)于 DMF 或 DCM 中对树脂反应 20~120 min, 或者用醋酐-吡啶(1:1)25 下反应 2 h。本次试验采用前一种方法反应 2 h 基本封闭完全。

2.3 α -氨基保护基团的选择和脱除

相对于 Boc 法, Fmoc 法反应条件温和, 副反应少, 产率高^[8], 适合合成对酸不稳定肽, 并且可以与侧链保护基最后一同脱除。绘制 Fmoc 基团的脱除效果与哌啶的含量及脱除时间关系曲线, 可以看出随着哌啶含量的增加, 脱除反应速度在加快, 但若哌啶含量过高就会引起副反应。本次试验采用 Fmoc 法对 α -氨基进行保护, 脱除采用 20% 哌啶的

DMF 溶液反应 30 min, 脱除率在 99% 以上, 很好的脱除了 Fmoc 保护基团^[9] (图 1)。

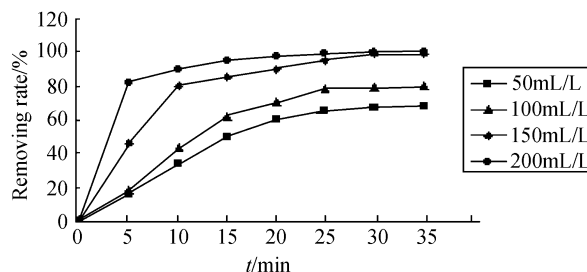


图 1 Fmoc 保护基脱除率随哌啶含量及时间的变化
Fig. 1 Changes of the removing rate of Fmoc group with amount of hexahydropyridine and time

2.4 二硫键的形成

二硫键的形成本质是一种氧化反应, 氧化剂的选择很重要。常用有先脱保护基再环化的氧化剂: DMSO, $K_3Fe(CN)_6$, H_2O_2 及空气等; 有直接氧化再脱保护的氧化剂: I_2 , $Tl(tfa)_3$, 氯硅烷-砷类氧化剂等。Kudryavtseva^[10]等对 I_2 , $K_3Fe(CN)_6$, $Tl(tfa)_3$ 空气及氯硅烷-砷类等氧化剂进行了比较, 以 I_2 的氧化反应效果最好, 简便速度, 环化率高。

2.5 FIK 粗品质谱分析

FIK 粗品的质谱分析结果显示^[11], 质谱图中含有 m/z 值为 1333.63 的峰, 与 FIK 理论分子量 1333.39 D 基本相符, 说明粗品中含有 FIK。同时从图中看出有多个副产物的存在, 说明在合成时某些不利的因素干扰了 FIK 的正常合成。分析反应过程, 可能是环合氧化时间过长, 树脂对氧化液有敏感性造成的, 有待进一步改进(图 2)。

2.6 FIK 的纯化及纯化后分析

质谱鉴定含有目标肽后用 RP-HPLC 对 FIK 粗品进行分析^[11], 收集各个峰进行质谱分析, 确定目标峰与杂质峰, 收集目标峰进行纯化, 色谱分析结果显示经纯化后几乎除去了所有杂质, 样品的纯度显著提高, 经面积归一法分析目标产物含量达 97.6092%(图 3)。

2.7 FIK 纯化后质谱鉴定

MALDI-MS 对纯化后的 FIK 分析结果显示(图 4), 得到的分子离子峰为: 1333.63 D, 与理论分子量 1333.39 D 接近, 在飞行时间质谱仪允许的 0.4% 的误差范围以内。此外高分辨率质谱图中出现了双电荷峰 M^{2+} 及多电荷峰是对分子离子峰的进一步证明, 由此确定样品为目标肽。

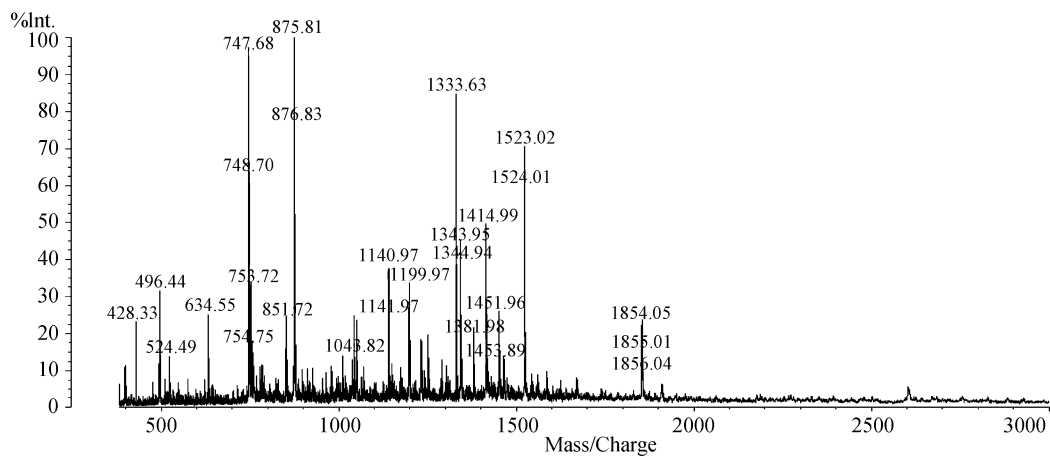


图 2 粗肽质谱图

Fig. 2 The MS spectrum of crude peptide

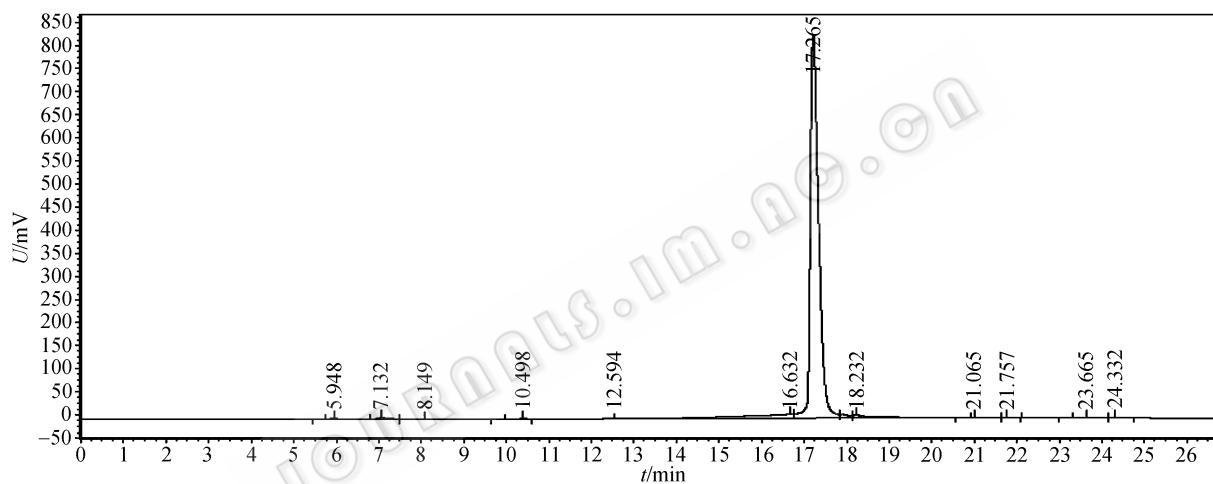


图 3 纯化后 FIK 的色谱图

Fig. 3 The chromatography of purified peptide FIK

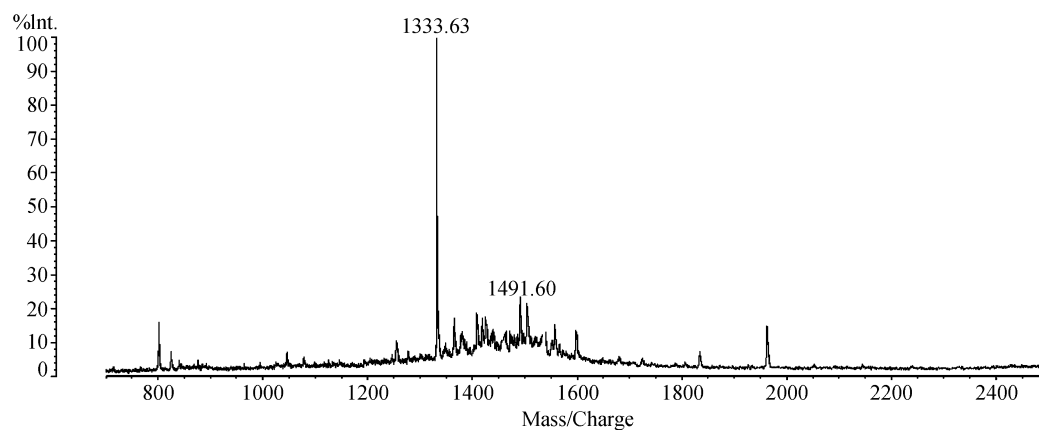


图 4 纯化后 FIK 的质谱图

Fig. 4 The MS spectrum of purified peptide FIK

2.8 环化效果检测

半胱氨酸 R 侧链上的-SH, pH 8.0. 室温下与 5,5 -双巯基-双(2-硝基苯甲酸)试剂(又称 Ellman 试

剂)反应^[12], 产生一种含有-SH 的硝基苯甲酸, 此产物在波长 412 nm 处有一个最大吸收峰, 利用此方法可以检测环化效果。结果如表 1。

表 1 吸光度测定结果

Table 1 Results of absorbance measurement

Sample	Absorbency				
Adding Ellman	2.678	2.642	2.711	2.655	2.702
Not adding Ellman	2.574	2.551	2.564	2.594	2.542

根据朗伯-比尔定律: $c=A/\epsilon b$ (c 浓度, ϵ 摩尔吸收系数, b 溶液厚度), 由 $[-SH]= [A_{412}(\text{加})-A_{412}(\text{不加})]/13650$ 计算结果接近于 0, 从计算结果可以看出-SH 几乎完全被氧化成 R-S-S-R。结合质谱图以及 Ellman 检测, 确定样品为目标环肽 FIK, 且环化率高。

3 结论

本实验以 Fmoc-aa 为原料, TBTU/HOBt/DIEA 为肽键缩合剂, 利用固相合成法逐步合成直链肽, 经 I_2 氧化形成环肽后切割、分析和纯化。

从结果中可看出本方法反应条件温和, 反应快速, 副反应少, 产物易于纯化, 且用固相合成法, 避免了分子间的二聚和多聚, 反应不需要在高度稀释的溶液中进行, 过量的缩合试剂及副产物可通过洗涤与过滤除去。多肽合成中二硫键的形成一直是多肽合成中的一个难点, 形成二硫键的方法很多, 各种方法各有其优缺点。综合比较本试验用 I_2 氧化法形成分子内二硫键, 结果显示此法氧化速度快, 环化率高, 合成的环肽经质谱测定分子量为 1333.63 D, 与理论值 1333.39 D 一致, 并经 Ellman 试剂检测证实环化效果好。经 RP-HPLC 分析目标肽产率约 18%, 收率约 62%, 经 RP-HPLC 纯化后纯度达 97% 以上, 取得了较满意的结果。对于质谱分析有多个副产物的结果, 综合考虑, 主要原因可能是环化时间过长造成的, 有待进一步改进。

REFERENCES

- [1] Wang T, Xiang QX, Li ZK, *et al.* Progress in cyclopeptides research. *Chemistry Research and Application*, 2002, **14**(1): 3-8.
王涛, 向清祥, 李正凯, 等. 环肽研究新进展. *化学研究与应用*, 2002, **14**(1): 3-8.
- [2] Huang XY, Wang T, Xia CQ, *et al.* Synthesis of novel disulfide bond-bearing cyclopeptides. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2004, **24**: 1629-1632.
黄小毅, 王涛, 夏传琴, 等. 新型含二硫键的环肽的合成. *有机化学*, 2004, **24**: 1629-1632.
- [3] Xing QY, Xu RQ, Zhou Z, *et al.* Basic Organic Chemistry. Beijing: High Education Press, 1994, 340.
邢其毅, 徐瑞秋, 周政, 等. 基础有机化学. 北京: 高等教育出版社, 1994, 340.
- [4] Tang YC, Tian GL, Ye YH. Progress in the study on synthetic method of cyclopeptide. *Chinese Universities chemistry Journal*, 2000, **21**(7): 1056-1063.
唐艳春, 田桂玲, 叶蕴华. 环肽合成方法的研究进展. *高等学校化学学报*, 2000, **21**(7): 1056-1063.
- [5] Shen XH, Jiang EQ. Progress in the study on relations of vascular endothelial growth factor and its receptor with tumour. *Chinese Journal of Clinic and Experimental Pathology*, 1999, **15**(1): 60-61.
沈秀华, 江悦琴. 血管内皮生长因子及其受体与肿瘤关系的研究进展. *临床与实验病理学杂志*, 1999, **15**(1): 60-61.
- [6] Akaji Kenichi, Kiso Yoshiaki. Macrocyclization on solid support using Heck reaction. *Tetrahedron Lett*, 1997, **38**(29): 5185-5188.
- [7] Han X, Gu J. Fmoc solid-phase synthesis of polypeptide. *Tianjin Pharmics*, 2001, **14**(1): 8.
韩香, 顾军. 多肽的固相合成. *天津药学*, 2001, **14**(1): 8.
- [8] Chen X, Luo SL, Zhang B, *et al.* Development of solid-phase polypeptide synthesis. *Biology technology*, 2006, **16**(1): 81-82.
陈心, 罗素兰, 张本, 等. 多肽固相合成的研究进展. *生物技术*, 2006, **16**(1): 81-82.
- [9] Ramage R, Jiang L, Kim YD, *et al.* Comparative studies of Nsc and Fmoc as N(alpha)-protecting groups for SPPS. *Pept sci*, 1999, **5**(4): 195-200.
- [10] Tam J P, Lu YA, Yu QT. Thia-zip reaction for synthesis of large cyclic peptides: mechanism and applications. *J Am Chem Soc*, 1999, **121**(18): 4316-4324.
- [11] Qi W, Jia CX, He ZM. Analysis of racemization products of synthetic heptapeptide by reversed phase high performance liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2006, **34**(9): 1244-1248.
齐葳, 贾辰熙, 何志敏. 反相高效液相色谱与质谱联用分析合成七肽的消旋产物. *分析化学*, 2006, **34**(9): 1244-1248.
- [12] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry. 3 ed, Beijing: High Education Press, 2002, 141-142.
王镜岩, 朱圣庚, 许长法. 生物化学. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002, 141-142.