

• 研究论文 •

半胱氨酸肽片段连接法合成 ω -芋螺毒素 MVIIA

代先东 范崇旭* 曹 瑛 刘尚义 蒋 辉 陈冀胜

(北京药物化学研究所 北京 102205)

摘要 ω -芋螺毒素 MVIIA 是已上市的镇痛药 Ziconotide 的有效成分. 采用标准 Fmoc 保护策略在聚苯乙烯树脂上合成 ω -MVIIA 比较困难, 是固相合成中的“困难肽”. 本研究将 ω -MVIIA 分为 N-端 15 肽硫酯和 C-端 10 肽两个片段采用标准 Fmoc 保护策略分别合成, 再通过半胱氨酸肽片段连接得到全长的 ω -芋螺毒素 MVIIA 肽链. 该方法提高了合成 ω -芋螺毒素 MVIIA 产率. 该研究为“困难肽”的合成提供了较好的参考方法.

关键词 半胱氨酸肽片段连接; 多肽硫酯; 多肽合成; ω -芋螺毒素 MVIIA

Synthesis of ω -Conotoxin MVIIA by Native Chemical Ligation

Dai, Xiandong Fan, Chongxu* Cao, Ying Liu, Shangyi Jiang, Hui Chen, Jisheng

(Beijing Institute of Pharmaceutical Chemistry, Beijing 102205)

Abstract ω -Conotoxin MVIIA is the main component of Ziconotide, a therapeutic drug on the market as treatment of chronic pain. It is difficult to be synthesized by using standard Fmoc strategy solid phase peptide synthesis (SPPS) on polystyrene resin. ω -MVIIA is a typical “difficult sequence” for SPPS. In this work, N-terminal 15-residue peptide thioester and C-terminal 10-residue peptide amide of ω -MVIIA were synthesized using standard Fmoc protocol respectively. The full-length chain of ω -MVIIA was prepared by native chemical ligation. This method increased the yield of ω -MVIIA greatly. The results provide a good reference for synthesis of “difficult sequence”.

Keywords native chemical ligation; peptide thioester; peptide synthesis; ω -conotoxin MVIIA

ω -芋螺毒素 MVIIA(ω -MVIIA)是从幻芋螺(*C. magus*)毒液中分离出的肽类毒素^[1], 其氨基酸序列为 CKGKG⁵AKCSR¹⁰LMYDC¹⁵CTGSC²⁰RSGKC^{*}(*表示 C 端酰胺化), 含三个链内二硫键(Cys¹-Cys¹⁶, Cys⁸-Cys²⁰, Cys¹⁵-Cys²⁵). ω -MVIIA 能可逆地阻断 N-型钙离子通道, 从而阻止疼痛信号的传导^[2,3]. 以 ω -MVIIA 为有效成分的特效镇痛药 Ziconotide(商品名 PrialtTM)于 2004 年得到美国 FDA 批准作为治疗慢性疼痛的药物^[4-6]. 临床试验表明, Ziconotide 具有无耐药性和成瘾性等优点, 对癌症、脊柱损伤、丘脑损伤等引起的严重慢性疼痛都有显著的镇痛效果^[7,8].

Olivera 等^[1]在首次报道 ω -MVIIA 分离鉴定时即进行了该毒素的固相合成, 采用的是 Boc 保护策略. Oliv-

era 在文中提到 ω -MVIIA 的合成很困难, 在经过多次尝试后才获得成功. 所选择的路线中, 对第 20 个氨基酸 C²⁰和第 10 个氨基酸 R¹⁰进行了二次连接, 即使如此, 总产率也很低(约 0.4%). 我们在聚苯乙烯树脂上用 Fmoc 保护策略合成该肽时, 从树脂上裂解所得粗肽中目标产物的含量仅为 0.1%左右(数据见实验及讨论部分), 虽然经过多种条件优化, 结果都没有明显改观, 这表明 ω -MVIIA 属于固相合成中的“困难肽(difficult sequence)”^[9]. 对于困难肽的合成人们进行了很多研究^[10-12], 本文探索使用半胱氨酸肽片段连接方法, 通过两个肽片段缩合来合成 ω -MVIIA, 希望以此提高 ω -MVIIA 的合成产率.

半胱氨酸肽片段连接(native chemical ligation)是通

* E-mail: fancx@263.net

Received December 23, 2009; revised February 23, 2010; accepted March 29, 2010.

过硫酯交换和 S→N 酰基转移将侧链未保护的两个多肽片段连接得到新的长肽链^[13~15], 其反应机理见图 1^[16]. 该方法采用侧链未保护的多肽片段在水溶液中进行选择性连接反应, 解决了传统片段合成法中侧链保护的肽段溶解性差、纯化困难等问题, 使得合成长链多肽或蛋白质成为可能, 该方法还可以用于“困难肽”的合成.

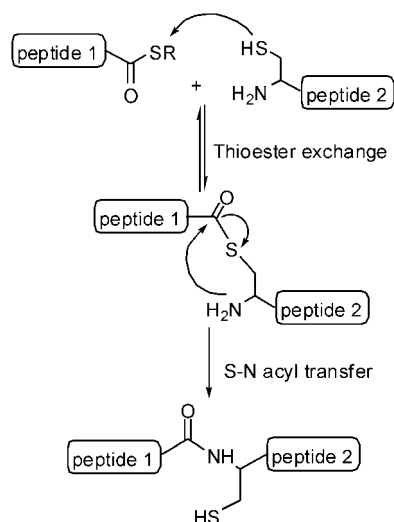


图1 半胱氨酸肽片段连接机理

Figure 1 Mechanism of native chemical ligation

本文将 ω -MVIIA 分为 N-端 15 肽和 C-端 10 肽两个片段分别合成, 其中 C-端 10 肽片段在聚苯乙烯 Rink Amide-AM 树脂上用 Fmoc 保护策略直接合成. N-端 15 肽片段先在聚苯乙烯 2-chlorotrityl 树脂上构建肽链, 裂解后得到全保护肽链, 然后与硫苄醇形成硫酯, 最后脱保护得到 ω -MVIIA 的 N-端 15 肽片段的硫酯. 合成的两个片段通过半胱氨酸肽片段连接得到 ω -MVIIA 的肽链, 最后空气氧化形成二硫键, 其合成路线见图 2.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HPLC 分析和制备使用 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Vydac 218TP54 C18 (4.6 mm×250 mm) 分析柱和 Vydac 218TP510 C18 (10 mm×250 mm) 半制备柱. 质谱仪为 Bruker ultraflex TOF/TOF 型质谱仪.

色谱纯乙腈购自 Dikma 公司; HOBt(1-羟基苯并三唑)、DIPCDI(二异丙基碳二亚胺)、DIEA(二异丙基乙基胺)、哌啶、EDT(1,2-二巯基乙烷)、硫代苯甲醚、TFA(三氟乙酸)、合成多肽用树脂和保护氨基酸购自吉尔生化公司; 苄硫醇购自 Alfa Aesar 公司; ω -MVIIA 标准样品购自 Bachem 公司; 其他试剂均为国产分析纯.

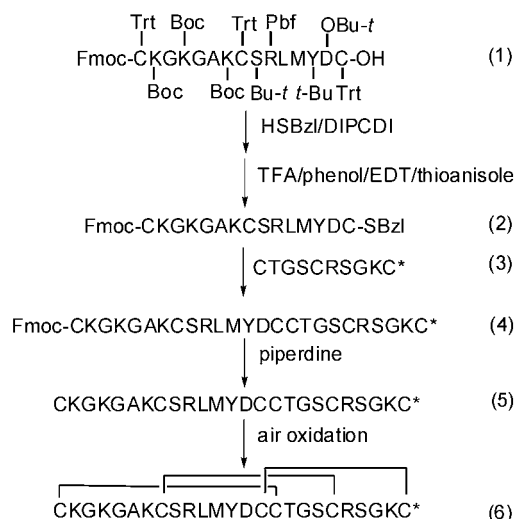


图2 ω -MVIIA 的合成路线

Figure 2 Synthetic route of ω -MVIIA

1.2 实验方法

1.2.1 用 Fmoc 保护策略合成 ω -MVIIA

树脂为聚苯乙烯 Rink Amide-AM 树脂(取代度为 0.74 mmol·g⁻¹), 各侧链保护的氨基酸分别选用 Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(Bu-t)-OH, Fmoc-Asp(OBu-t)-OH, Fmoc-Tyr(Bu-t)-OH, Fmoc-Ser(Bu-t)-OH. 树脂以 20%(V/V)哌啶/DMF(*N,N*-二甲基甲酰胺)溶液脱保护后与 C 端的第一个氨基酸残基 Fmoc-Cys(Trt)-OH 连接, 以 20%哌啶/DMF 溶液作为脱保护剂, 肽键形成采用 HBTU 方法偶联. 完成连接后, 肽树脂用裂解液[V(苯酚): V(EDT): V(硫代苯甲醚): V(水): V(TFA)=0.5:0.25:0.5:0.5:8.25]裂解, 室温反应 1.5 h, 减压除去 TFA, 用冷的无水乙醚沉淀出粗肽. 粗肽溶于水中, HPLC 分析. 色谱条件: Vydac 218TP54 C18 分析柱; 流动相 A, B 二元线性梯度, A 为 0.1% TFA/水溶液(V/V), B 为 0.1% TFA/乙腈溶液(V/V), 梯度在 60 min 内 B 的含量由 0%变为 60%; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 214 nm.

1.2.2 全保护 N-端片段(1)的合成

采用 Fmoc 保护策略固相合成全保护 ω -MVIIA(1-15) (1). 树脂为聚苯乙烯 2-chlorotrityl 树脂(取代度为 1.31 mmol·g⁻¹), 各侧链保护的氨基酸分别选用 Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBu-t)-OH, Fmoc-Tyr(Bu-t)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(Bu-t)-OH. C-端的第一个氨基酸与树脂的连接参照文献方法进行^[17]. 然后以 20%哌啶/DMF 溶液作为脱保护试剂, 采用 HBTU 方法偶联下一个氨基酸, 重复脱保护-偶联步骤. 多肽链构建完成后, 肽树脂用 30

mL 裂解液[V (乙酸): V (三氟乙醇): V (二氯甲烷)=1:1:8]裂解, 室温反应 30 min, 减压除去二氯甲烷, 反复加入正己烷, 旋转蒸发, 直至将乙酸全部除去, 得到全保护 ω -MVIIA(1-15) (1).

1.2.3 N-端片段硫酯(2)的合成

N-端片段硫酯的合成参考文献方法进行^[18]. 取全保护 ω -MVIIA(1-15) (1) 0.66 g (0.2 mmol), 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 加入 DIPCDI 126 μ L (0.8 mmol)、HOBt 108 mg (0.8 mmol)、DIEA 280 μ L (1.6 mmol)、苄硫醇 240 μ L (2 mmol), 常温反应过夜, 减压除去二氯甲烷, 残余物用 10 mL 裂解液[V (苯酚): V (EDT): V (硫代苯甲醚): V (水): V (TFA)=0.5:0.25:0.5:0.5:8.25]裂解, 室温反应 1.5 h, 减压除去 TFA, 用冷的无水乙醚沉淀出粗肽. 粗肽溶于 10%乙腈/水溶液(V/V), HPLC 纯化, 得 Fmoc- ω -MVIIA(1-15)-S-Bzl (2).

1.2.4 C-端片段(3)的合成

采用 Fmoc 保护策略固相合成 ω -MVIIA(16-25) (3). 树脂为聚苯乙烯 Rink Amide-AM 树脂(取代度为 0.74 mmol \cdot g⁻¹), 各侧链保护的氨基酸分别选用 Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(Bu-*t*)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(Bu-*t*)-OH. 树脂以 20%哌啶/DMF 溶液脱保护后与 C 端的第一个氨基酸残基 Fmoc-Cys(Trt)-OH 连接, 以 20%哌啶/DMF 溶液作为脱保护剂, 肽键形成采用 HBTU 方法偶联.

1.2 g 肽树脂用 20 mL 裂解液[V (苯酚): V (EDT): V (硫代苯甲醚): V (水): V (TFA)=0.5:0.25:0.5:0.5:8.25]裂解, 室温反应 1.5 h, 减压除去 TFA, 用冷的无水乙醚沉淀出粗肽. 粗肽溶于水中, HPLC 纯化, 得 ω -MVIIA(16-25) (3).

1.2.5 半胱氨酸肽片段连接

取 Fmoc- ω -MVIIA(1-15)-S-Bzl (2) 1 mg (0.5 μ mol), ω -MVIIA(16-25) (3) 0.5 mg (0.5 μ mol), 溶于 0.5 mL 0.1 mol \cdot L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH=6.5, 含 6 mol \cdot L⁻¹ 盐酸胍), 常温反应 3 h, 加入 1 mg 三(羧乙基)膦(TCEP), 50 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 取反应液 HPLC 分析(色谱条件同 1.2.1 节). 收集馏出产物, MALDI-TOF 质谱分析. 反应液使用半制备柱制备, 冻干, 得 Fmoc- ω -MVIIA (4).

1.2.6 Fmoc 保护基的脱除

使用 20%哌啶/DMF 溶液脱除肽链 N-端 Fmoc 保护基. 向 1 mg Fmoc- ω -MVIIA (4)中加入 100 μ L 20%哌啶/DMF 溶液, 常温反应 15 min, 加入冷的无水乙醚, 将沉淀物离心, 晾干. 晾干后的沉淀物溶于 1 mL 水中, 加入 2 mg TCEP, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, HPLC 分析(色谱条件同 1.2.1 节), 收集馏出产物, MALDI-TOF 质谱分析. 反应液使用分析柱制备, 冻干, 得 ω -MVIIA 线形肽(5).

1.2.7 二硫键的构建

采用空气氧化法构建二硫键. 0.2 mg ω -MVIIA 线形肽(5)溶于氧化缓冲液(含 0.1 mol \cdot L⁻¹ 乙酸铵, 1 mmol \cdot L⁻¹ 氧化型谷胱甘肽, 2 mmol \cdot L⁻¹ 还原型谷胱甘肽), 常温反应过夜, HPLC 分析(色谱条件同 1.2.1 节), 收集馏出产物, MALDI-TOF 质谱分析. 反应液使用分析柱制备, 冻干, 得 ω -MVIIA (6).

2 结果与讨论

2.1 用 Fmoc 保护策略合成 ω -MVIIA

ω -MVIIA 是一个 25 肽, 通常情况下可以通过固相合成得到较好的线形肽. 但是本研究在聚苯乙烯树脂上使用 Fmoc 保护策略进行合成时, 遇到了困难. 第 11 个氨基酸残基 L¹¹ 第一次连接后, 未能通过茚三酮检测, 进行了第二次连接, 并延长了反应时间后, 才通过茚三酮检测. 而接下来的 R¹⁰, S⁹, C⁸ 出现了类似的情形, 其中 R¹⁰ 经过两次连接也未能通过茚三酮检测. 在完成全部合成后, 对粗肽进行了 HPLC 分析(图 3), 经过质谱分析确定了产物峰, 其含量非常低, 归一化计算含量不足 0.1%. 其后, 对反应使用的溶剂及主要试剂进行了纯化处理, 并对反应条件进行了优化, 但随后进行的两次合成, 其结果与第一次类似, 这说明 ω -MVIIA 是固相合成中的困难肽.

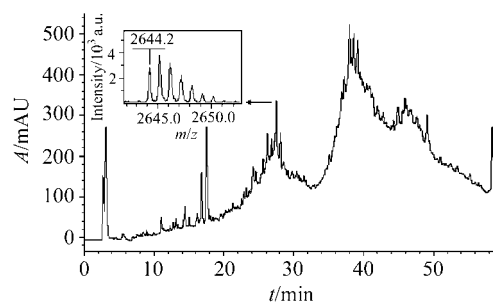


图 3 ω -MVIIA 粗肽色谱分析图

Figure 3 HPLC analysis of crude peptide of ω -MVIIA

2.2 全保护 N-端片段(1)的合成

N-端片段的合成在对酸敏感的聚苯乙烯 2-chlorotrityl 树脂上采用标准 Fmoc 合成策略进行. 由于 ω -MVIIA 的 N-端残基为 Cys, 能与自身的 C-端硫酯发生半胱氨酸肽片段连接反应, 因此, 必须对其采取必要的保护, 防止发生不希望的自身连接反应. 采用 Fmoc 保护基保护 N-端 Cys, 合成肽链时, 在连接上最后一个保护氨基酸 Fmoc-Cys(Trt)-OH 后, 不脱除 Fmoc 保护基, 直接收缩树脂. 本文使用乙酸将全保护肽链从树脂上裂解, 但残留的乙酸会在下一步硫酯化反应中消耗反应

物, 因此, 产物中的乙酸必须完全除去。

2.3 N-端片段硫酯(2)的合成

全保护 Fmoc- ω -MVIIA(1-15) 肽片段从肽树脂上裂解后, 直接将其与苄硫醇反应, 形成硫苄酯, 脱除侧链保护后再用 HPLC 纯化. 140 mg 粗肽经 HPLC 半制备柱纯化, 得产物 11 mg, 产物在粗肽中的含量约 8%。

2.4 C-端片段(3)的合成

C-端片段在聚苯乙烯 Rink Amide-AM 树脂上采用标准 Fmoc 合成策略进行. 1.2 g 肽树脂经裂解液裂解得粗肽, 400 mg 粗肽经 HPLC 半制备柱制备, 得 70 mg ω -MVIIA(16-25) (3), 产物在粗肽中的含量约 18%。

2.5 半胱氨酸肽片段连接

HPLC 分析表明 Fmoc- ω -MVIIA(16-25)-S-Bzl (2) 与 ω -MVIIA(16-25) (3) 在 pH=6.5 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(含 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍)中 3 h 即可完成连接反应, 反应原料峰几乎完全消失(图 4). 产物经 MALDI-TOF-MS 分析, 单同位素峰为 2866.1 Da $[\text{M} + \text{H}]^+$, 与计算值(2866.2 Da)相符. HPLC 纯化, 得约 0.8 mg 产物 4, 产率 56%。

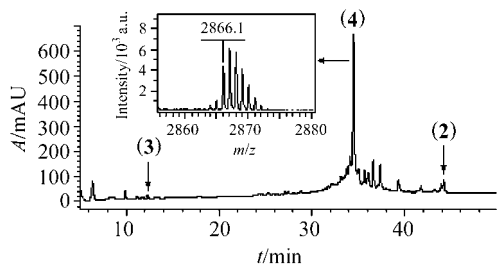


图 4 半胱氨酸肽片段连接反应液色谱分析图

Figure 4 HPLC analysis of native chemical ligation reaction mixture

2.6 Fmoc 保护基的脱除

Fmoc- ω -MVIIA (4) 中加入 20% 哌啶/DMF 溶液, 有白色固体沉淀, 可能是由于肽链在 DMF 中的溶解度较小所致, 但并不影响肽链上的 Fmoc 保护基被完全脱除, HPLC 分析表明原料已完全消失(图 5). 产物经 MALDI-TOF-MS 分析, 单同位素峰为 2644.2 Da $[\text{M} + \text{H}]^+$, 与计算值(2644.1 Da)相符. 反应液用分析柱纯化, 得约 0.25 mg 产物 5, 产率 27%。

2.7 二硫键的构建

$200 \mu\text{g}$ 线肽空气氧化过夜后, HPLC 分析表明原料已完全消失(图 6). 产物经 MALDI-TOF-MS 分析, 单同位素峰为 2638.2 Da $[\text{M} + \text{H}]^+$, 与计算值(2638.1 Da)相符. 反应液用分析柱纯化, 得约 $60 \mu\text{g}$ ω -MVIIA (6), 产

率 30%. 将合成品与购买的 ω -MVIIA 标准品混和进样, 进行 HPLC 分析, 得到单一的色谱峰, 说明二硫键配对正确。

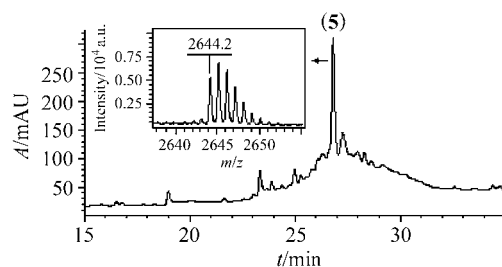


图 5 脱保护产物色谱分析图

Figure 5 HPLC analysis of deprotection products

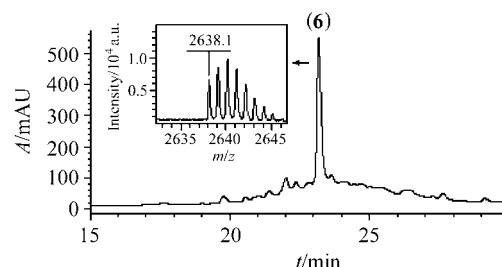


图 6 空气氧化反应液色谱分析图

Figure 6 HPLC analysis of air oxidation reaction mixture

3 结论

本文采用标准的 Fmoc 策略在聚苯乙烯树脂上分别合成了 ω -MVIIA 的两个片段, 所合成的片段通过半胱氨酸肽片段连接法构建了 ω -MVIIA 的肽链, 经空气氧化得到 ω -MVIIA. 该方法合成片段时目标产物在粗肽中的平均含量达到 13%, 片段连接产率达到 56%, 脱 Fmoc 保护基产率 27%, 总产率为 1.9%, 远高于直接用标准的 Fmoc 策略在聚苯乙烯树脂上合成肽链的产率(0.1%), 表明半胱氨酸肽片段连接法可用于“困难肽”合成。

References

- 1 Olivera, B. M.; Cruz, L. J.; Santos, V.; Lecheminant, G.; Griffin, D.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Galyean, R.; Varga, J.; Gray, W. R.; Rivier, J. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2086.
- 2 Miljanich, G. P. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3029.
- 3 Yu, Y.; Chen, J.-H. *Chin. Med. Biotechnol.* **2008**, *3*, 457 (in Chinese).
(余艳, 陈建华, 中国医药生物技术, **2008**, *3*, 457.)
- 4 Levin, T.; Petride, G.; Wiener, J.; Saravay, S.; Multz, A.; Bailine, S. *Psychosomatics* **2002**, *43*, 63.
- 5 Jain, K. K. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2403.

- 6 Browersox, S. S. *Toxicon* **1998**, 36, 1651.
- 7 Terlau, H.; Olivera, B. M. *Physiol Rev.* **2004**, 84, 41.
- 8 Chen, S.-H. *Chin. J. New Drugs* **2005**, 14, 490 (in Chinese).
(陈时宏, 中国新药杂志, **2005**, 14, 490.)
- 9 Miranda, L. P.; Alewood, P. F. *Pept. Sci.* **2000**, 55, 217.
- 10 Sampson, W. R.; Patsiouras, H.; Ede, N. J. *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 403.
- 11 Schnölzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 40, 180.
- 12 Cremer, G.; Tariq, H.; Delmas, A. F. *J. Pept. Sci.* **2006**, 12, 437.
- 13 Schnölzer, M.; Kent, S. B. *Science* **1992**, 256, 221.
- 14 Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* **1994**, 266, 776.
- 15 Dawson, P. E.; Kent, S. B. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923.
- 16 Johnson, E. C.; Kent, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640.
- 17 Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotirus, P.; Yao, W.; Schafer, W. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943.
- 18 Eggelkraut-Gottanka, R.; Klose, A.; Beck-Sickinger, A. G.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3551.

(A0912206 Cheng, B.)