

蝎子毒素多肽 WaTx 的高效化学合成及氧化折叠研究

尹昊^{†,a,c} 陈西同^{†,a,c} 付邢言^{†,a,c} 马艳楠^{a,c} 徐以梅^{a,c}
张特^{a,c} 梁帅^{a,c} 杜姗姗^{*,b} 齐昀坤^{*,a,c} 王克威^{a,c}

(^a 青岛大学药学院 山东青岛 266073)

(^b 青岛科技大学化工学院 山东青岛 266042)

(^c 青岛大学创新药物研究院 山东青岛 266021)

摘要 相比于 1-羟基-7-氮杂苯并三氮唑(HOAt)、1-羟基苯并三唑(HOBT)等传统偶联试剂, 新型多肽偶联试剂 2-胍氧乙酸乙酯(Oxyma)具有安全、偶联效率高、消旋率低等优势, 在多肽合成特别是微波固相合成中得到广泛应用。但是, 不同反应温度(例如 28、50 和 75 °C)对 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC)/Oxyma 的偶联效率以及对甲硫氨酸(Met)等易氧化氨基酸的影响尚有待研究。瞬时受体电位锚蛋白 1(TRPA1)通道在感受温度、听觉和炎症痛中发挥重要作用。蝎子毒素多肽芥末受体毒素(WaTx)是一种新型、非共价结合的 TRPA1 特异性激动剂。本研究利用 6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)/*N,N'*-二异丙基乙胺(DIEA)和 DIC/Oxyma 缩合体系, 首次探索了不同温度下线性 WaTx 的合成效率以及 Met 残基的氧化情况。通过一次氧化折叠和两次氧化折叠策略, 实现了 WaTx 的体外快速复性折叠, 利用圆二色谱和钙荧光检测等技术评价 WaTx 的结构和活性。本研究建立了 WaTx 的温和、高效合成以及复性折叠方法, 为固相多肽合成特别是手动固相合成 WaTx 等含有易氧化基团的二硫键构象锁定多肽提供了重要参考。

关键词 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC); Oxyma; 固相多肽合成; 二硫键; 氧化折叠; 芥末受体毒素(WaTx); 多肽毒素

Efficient Chemical Synthesis and Oxidative Folding Studies of Scorpion Toxin Peptide WaTx

Yin, Hao^{†,a,c} Chen, Xitong^{†,a,c} Fu, Xingyan^{†,a,c} Ma, Yannan^{a,c} Xu, Yimei^{a,c}
Zhang, Te^{a,c} Liang, Shuai^{a,c} Du, Shanshan^{*,b} Qi, Yunkun^{*,a,c} Wang, Kewei^{a,c}

(^a School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266073)

(^b College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042)

(^c Institute of Innovative Drugs, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021)

Abstract Coupling or condensation reagents that could be used to promote the condensation of carboxylic acids with amines to furnish amide bonds play crucial roles in solid phase peptide synthesis (SPPS) of peptides and peptide-based derivatives. Compared with traditional coupling reagents used in SPPS such as 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), the novel *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC)/ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino) acetate (Oxyma) condensation system has advantages of inexpensiveness, safety, high coupling efficiency, low racemic rate, and compatibility with manual and automatic peptide synthesis represented by microwave-assisted SPPS. However, the effects of different reaction temperatures (e.g. 28, 50, and 75 °C) on the coupling efficiency of DIC/Oxyma and on the easily oxidized amino acids such as methionine (Met) remain to be further investigated. The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel plays an important role in temperature perception, auditory perception, and inflammatory pain. As a novel non-covalently TRPA1-specific agonist, Wasabi Receptor Toxin (WaTx) that consists of 33 amino acid residues and two pairs of disulfide bonds is considered as an important molecular tool to study the opening mechanism and function of TRPA1. In this study, 2-(6-chloro-1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammoniumhexa-fluorophosphate (HCTU)/*N,N'*-diisopropylethylamine (DIEA) and DIC/Oxyma condensation systems were separately utilized to explore the synthetic efficiency of linear WaTx and the oxidative degree of Met residues at different temperatures. The robustness of DIC/Oxyma condensation system was validated by the rapid manual synthesis of linear WaTx. The one-step and two-step oxidative folding strategies were separately applied for the construction of two pairs of disulfide bridges, affording the active WaTx, which was further confirmed by circular dichroism and calcium fluorescence assay. In this study, a moderate, efficient synthesis and renaturation folding method of WaTx was established. Moreover, the effects of different reaction temperatures on the synthetic efficiency of DIC/Oxyma and on amino acid residues oxidation were compared for the first time. From the aspects of reaction

* E-mail: shanshandu@qust.edu.cn; qiyunkun@qdu.edu.cn

† 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

Received December 24, 2021; published February 15, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21807063, 82003647, 22177058, 81870653).

国家自然科学基金(Nos. 21807063, 82003647, 22177058, 81870653)资助项目。

efficiency (represented by the timescale of the overall Fmoc deprotection-washing-amino acid coupling SPPS cycle), amino acid residues oxidization and synthetic cost, $\eta(\text{Fmoc-amino acid}) : \eta(\text{DIC}) : \eta(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$ under $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ should be the ideal reaction condition. This work provides both an imperative complement for SPPS and a particularly useful strategy for the manual efficient synthesis of disulfide-containing peptides with easily oxidized groups.

Keywords N,N' -diisopropylcarbodiimide (DIC); oxyma; solid phase peptide synthesis; disulfide bond; oxidative folding; Wasabi Receptor Toxin (WaTx); peptide toxin

1 引言

多肽分子在自然界中广泛存在, 并且具有多种生物活性, 例如抗菌、抗艾滋病、抗癌、阻断或激活离子通道、抑制或激活蛋白酶等^[1]. 一些二硫键构象锁定多肽(如齐考诺肽、利那洛肽、催产素、普利康肽等)具有较好的靶向选择性和生物活性, 已被开发成为多种诊断分子工具和治疗药物^[2]. 二硫键具有良好的热稳定性、水解酶稳定性和结构多样性, 这对于维持多肽的结构和功能等方面起着至关重要的作用. 由于天然多肽在自然界中的丰度较低或提纯困难, 固相多肽合成(solid phase peptide synthesis, SPPS)已成为制备多肽类分子和多肽药物的最常用方法.

偶联试剂介导一个氨基酸的主链氨基和另一个氨基酸的主链羧基形成酰胺键, 该过程是多肽和蛋白质合成过程中最基本的化学反应, 选择合适的偶联试剂对于 SPPS 至关重要^[3]. 为了抑制 N,N' -二异丙基碳二亚胺(DIC)等经典偶联试剂导致的外消旋化, 化学家开发了多种消旋抑制剂, 如 1-羟基-7-氮杂苯并三氮唑(HOAt)和 1-羟基苯并三唑(HOBt)^[1a,3b,4] (图 1A). 基于 HOBt 结构的消旋抑制剂与碳二亚胺型缩合剂联合使用, 已被广泛用于多肽分子的固相合成中. 然而, 基于 HOBt 结构的消旋抑制剂在反应过程中存在着爆炸风险, 限制了其广泛应用^[5]. 2-脒氧乙酸乙酯(Oxyma)是近年来开发出来的一种新型消旋抑制剂^[5c] (图 1A). 与传统的 HOAt 和 HOBt 等消旋抑制剂相比, Oxyma 具有经济、安全、偶联效率高、消旋率低、兼容手动和自动多肽合成等优势, 被广泛用于多肽以及多肽素链、蛋白探针等的合成^[6]. 此外, DIC/Oxyma 试剂已成为微波固相多肽合成仪使用最多的偶联体系^[7].

前人使用 DIC/Oxyma 缩合体系的反应温度通常高于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 但高温条件对操作者不友好^[6b,8]. 此外, 高温条件下容易导致甲硫氨酸(Met)等的氧化, 在合成过程中需要将 Met 突变成疏水性的正亮氨酸(Nle), 该点突变有改变多肽结构和机制的风险^[7a]. 胡宏岗等^[7a]使用微波固相合成仪和 DIC/Oxyma 缩合体系, 建立了泛素多肽片段等在相对温和条件下(例如 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$)下的快速合成方法. 但是, 微波合成仪(如 CEM Liberty Blue)较高的价格限制了该策略的广泛使用. 齐昀坤等^[9]探索了 DIC/Oxyma 缩合体系在温和条件下的最佳反应比例, 实现了蜈蚣毒素多肽 RhTx 和蜘蛛毒素多肽 GsMTx4 的高效手动固相合成, 极大拓展了 DIC/Oxyma 体系在固相多肽合成中的应用. 前人研究表明, 使用 DIC/Oxyma 缩合

体系在较高的反应温度下, 微波固相多肽合成和手动多肽合成均易造成 Met 的显著氧化. 但是, 不同反应温度(例如 28 、 50 和 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$)对 DIC/Oxyma 的偶联效率以及对甲硫氨酸(Met)等易氧化氨基酸的影响尚有待研究.

TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1)是一种钙通透的非选择性阳离子通道, 在感受温度、听觉和炎症痛中发挥重要作用, 是一类重要的镇痛药靶点^[10]. 2019 年, Julius 课题组^[11]从黑岩蝎子(Black Rock Scorpions)分离出可以特异性激活 TRPA1 通道的新型蝎子毒素多肽 WaTx (Wasabi Receptor Toxin) (图 1B). WaTx 通过非共价作用使 TRPA1 稳定在一种独特的开放状态, 已成为研究 TRPA1 开放机制和功能等的重要工具. WaTx 含有 33 个氨基酸, 其中 Cys9 和 Cys27 形成一对二硫键, Cys13 和 Cys23 形成一对二硫键. 由于 WaTx 在自然界中的丰度较低(10 pmol/mg 蝎子毒液), 有必要人工合成来弥补天然 WaTx 来源不足的问题^[11].

WaTx 的第 26 位氨基酸为 Met, 所以, 本文选择 WaTx 作为模型肽研究不同反应温度(例如 28 、 50 和 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$)下 DIC/Oxyma 体系的偶联效率以及 Met 的氧化比例, 建立了 WaTx 的温和、高效的固相合成和体外复性折叠方法, 实现了 WaTx 的高效制备(图 1C). 第一, 利用 HCTU/DIEA 缩合体系, 反应温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 实现线性肽 1 的手动固相合成. 第二, 为了实现线性 WaTx 的高效合成以及验证 DIC/Oxyma 缩合体系的普适性, 使用 Ring Amide AM 树脂或 Wang 树脂, 利用 DIC/Oxyma 缩合体系, 反应温度 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, 探索线性 WaTx 的高效合成. 第三, 为了避免 Met 在合成中的氧化, 用正亮氨酸(Nle)代替甲硫氨酸(Met), 使用 6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)/ N,N' -二异丙基乙胺(DIEA)缩合体系, 制备线性 WaTx 模拟物. 同时, 在反应温度 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 探索线性 WaTx 模拟物的快速合成. 第四, 使用 DIC/Oxyma 缩合体系, 反应温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 探索线性肽 7 和肽 8 的合成, 比较不同温度下 Met 的氧化程度. 第五, 通过一次氧化折叠(图 1D)和两次氧化折叠(图 1E)策略, 实现 WaTx 的体外复性折叠. 通过高分辨电喷雾电离质谱(ESI-MS)、反相高效液相色谱(RP-HPLC)和圆二色谱(CD)等对复性产物进行分析.

2 结果与讨论

2.1 线性多肽的合成和分离纯化

以 DIC/Oxyma 为缩合体系的固相多肽合成特别是基于微波的固相多肽合成中, 为了避免 Met 的硫醚侧链

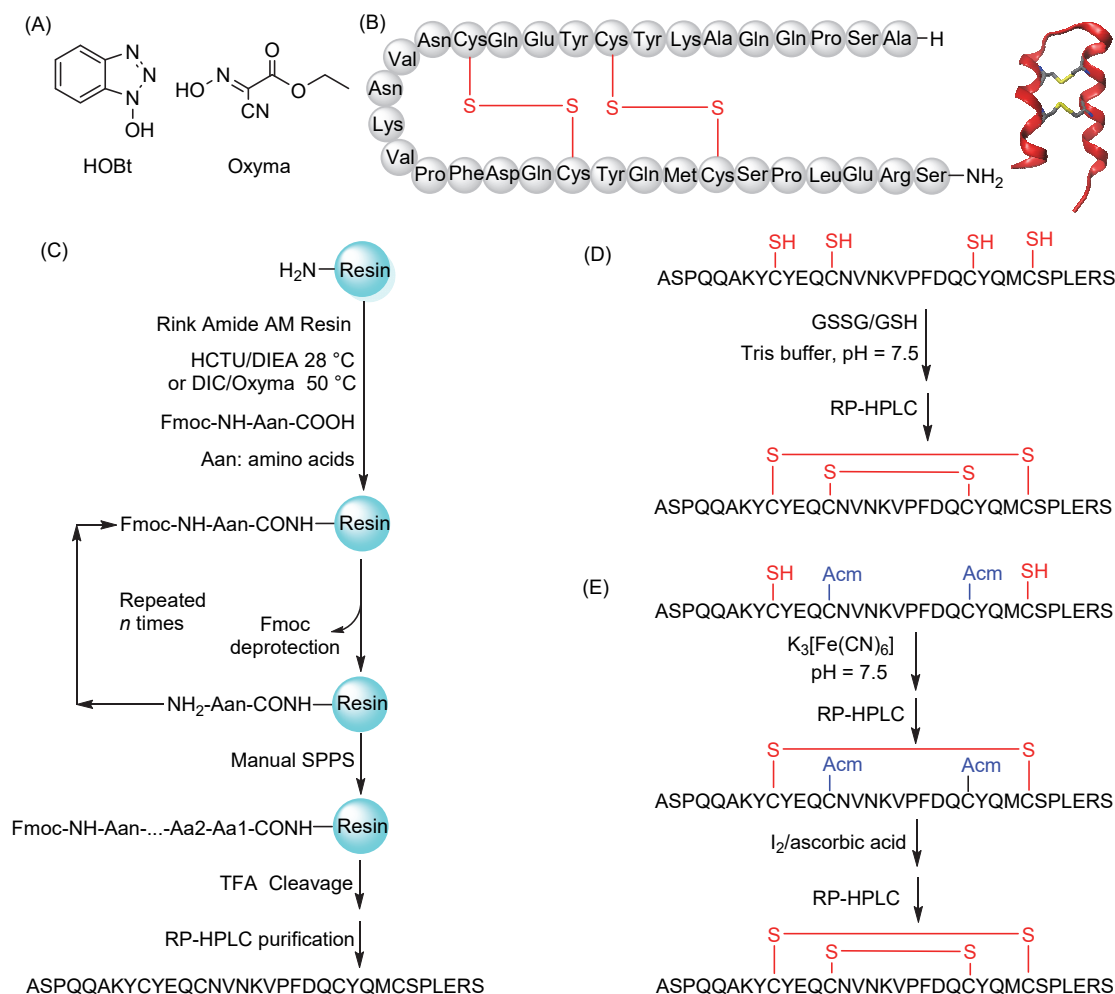


图1 (A) HOBt、Oxyma 的结构式; (B) 蝎子毒素 WaTx 的氨基酸序列(左)和结构(右, PDB: 6OFA); (C) 线性 WaTx 的合成路线; (D) 线性肽的一次氧化折叠策略和(E) 线性肽(2,3-Cys 被乙酰氨基保护)的两次氧化折叠策略

Figure 1 (A) The structures of HOBt and Oxyma. (B) The amino acid sequences (left panel) and structure (right panel, PDB: 6OFA) of scorpion toxin WaTx. (C) The synthetic route of linear WaTx. (D) The one-step oxidative folding strategy for the linear peptide. (E) The two-step oxidative folding strategy for the linear peptide with 2,3-Cys protected by the acetamidomethyl (Acm) group

在高温下氧化成亚砷, 前人一般把 Met 替换成 Nle^[7]. 但是, 不同反应温度(例如 28、50 和 75 °C)下 Met 的氧化程度, 目前研究的较少. 因此, 本文分别在 28、50 和 75 °C, 系统比较 Met 的氧化程度以及 DIC/Oxyma 体系的缩合效率(表 1). 本文中各肽的氨基酸序列在支持信息表 S1 中给出.

2.1.1 28 °C 下合成肽 1

HCTU/DIEA 是多肽固相合成最常用的缩合体系之一, 反应温度通常为 25~30 °C^[12], 首先使用该体系合成线性 WaTx 标准品. 在 28 °C 条件下, 使用 Rink Amide AM 树脂(1 equiv.), 利用 HCTU/DIEA 缩合体系, 手动合成肽 1. 反应比例为 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{HCTU}) : n(\text{DIEA}) = 3 : 2.8 : 6$, 全程为两次缩合方式(double 缩合).

第一次缩合反应 30 min, 第二次缩合反应 40~60 min. Fmoc 脱除反应时间为第一次 5 min, 第二次 10 min. 通过固相合成、切肽以及分离纯化操作, 得到 4 个

Cys 侧链巯基均裸露的线性肽 1. 粗肽的色谱纯度为 34%, 分离收率为 28% (图 2A). 常温条件仍然会导致大约 23.9% 的 Met 被氧化.

2.1.2 75 °C 下合成肽 2 和肽 3

DIC/Oxyma 体系的常用反应温度为 75 °C, 本文使用 DIC/Oxyma 体系, 探索了 75 °C 下线性 WaTx 的合成效率(Fmoc 脱保护和氨基酸缩合所需要的总时间)以及 Met 的氧化情况. 首先, 使用 Rink Amide AM 树脂(0.05 mmol, 1 equiv.), 利用 DIC/Oxyma 缩合体系, 手动合成线性肽 2 (色谱纯度为 19%, 分离收率为 13%). 氨基酸缩合反应时间为第一次 10 min, 第二次 15~20 min. Fmoc 脱除反应时间为第一次 2 min, 第二次 6 min. RP-HPLC 表明 63% 的 Met 残基被氧化, 得到氧化副产物肽 2' (图 2B, 支持信息表 S1). 为了探索 Met 在不同固相载体上的氧化情况, 使用相同的缩合条件, 在 Wang 树脂上进行线性 WaTx 的合成. RP-HPLC 表明 74% 的 Met

表 1 线性肽 1~8 的合成策略

Table 1 The synthetic strategies for linear peptides 1~8

Linear peptide ^c	Reaction temperature/°C	Condensation system ^a	Resin type	Retention time/min	The oxidation ratio of Met ^b /%	HPLC purity/%	Isolated yield/%	Yield/mg
1	28	$n(\text{Aa}) : n(\text{HCTU}) : n(\text{DIEA}) = 3 : 2.8 : 6$	Rink Amide AM	20.9	24	34	28	54
2	75	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$	Rink Amide AM	20.9	63	19	13	25
3	75	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$	Wang resin	19.6	74	41	36	70
4	28	$n(\text{Aa}) : n(\text{HCTU}) : n(\text{DIEA}) = 3 : 2.8 : 6$	Rink Amide AM	21.8	Not detected	26	18	34
5	75	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$	Rink Amide AM	21.8	Not detected	6	2	4
6	50	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$	Rink Amide AM	21.8	Not detected	10	3	6
7	50	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$	Rink Amide AM	20.9	24	35	27	52
8	50	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$	Rink Amide AM	22.4	20	42	36	72

The synthetic method, RP-HPLC purity, the oxidation ratio of Met and isolated yield for peptides 1~8. Note: ^aAa: Fmoc-amino acid. One molar equivalent of Rink Amide AM resin (for peptides 1, 2, and 4~8) or the Wang resin (for peptide 3) was applied as the solid support. ^bThe oxidation ratios were determined based on the peak area of the oxidized by-products and target peptides. ^cThe amino acid sequences of peptides 1~8 were provided in table S1. The four Cys residues in linear peptide 1~7 were coupled by Fmoc-Cys(Trt)-OH. For linear peptide 8, Fmoc-Cys(Trt)-OH was used for 1,4-Cys coupling and Fmoc-Cys(Acm)-OH was used for 2,3-Cys coupling.

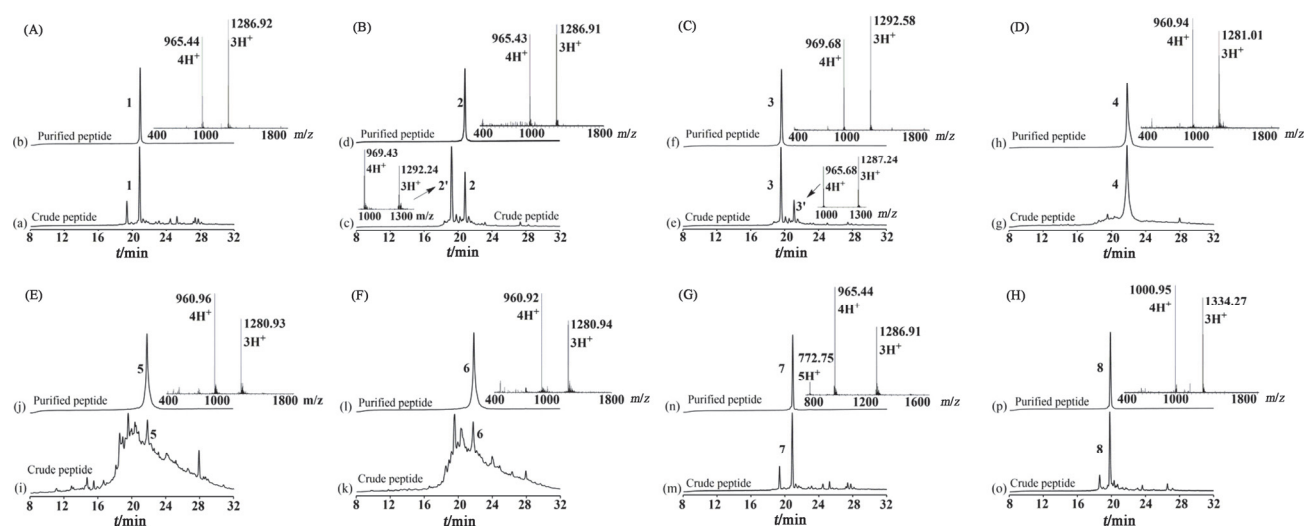


图 2 (A)多肽 1、(B)多肽 2、(C)多肽 3、(D)多肽 4、(E)多肽 5、(F)多肽 6、(G)多肽 7 和(H)多肽 8 的粗肽和分离纯化后多肽的分析型 RP-HPLC 色谱图和 ESI-MS 质谱图

Figure 2 Analytical RP-HPLC and ESI-MS spectra of crude and purified peptides (A) peptide 1, (B) peptide 2, (C) peptide 3, (D) peptide 4, (E) peptide 5, (F) peptide 6, (G) peptide 7, and (H) peptide 8

The amino acid sequences of peptides 2' and 3' were provided in table S1. RP-HPLC conditions: a linear gradient of 10%~60% buffer B (0.08%~0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in CH_3CN) in buffer A (0.1% TFA in water) over 30 min (10% for 2 min, then 10%~60% for 30 min) on a Vydac C18 column, $\lambda=214$ nm

残基被氧化, 氧化副产物肽 3 (图 2C, 支持信息表 S1) 成为主要的合成产物(色谱纯度为 41%, 分离收率为 36%)。以上数据表明, 75 °C 合成条件会造成 Met 残基的严重氧化。使用相同的缩合条件, 在 Wang 树脂上 Met 的氧化程度更高, 并进一步证实 Met 突变成 Nle 在高温固相多肽合成过程中的必要性。

2.1.3 Met 替换成 Nle, 合成肽 4~6

为了避免 Met 在多肽合成中的氧化, 将 Met 突变成 Nle, 进行线性 WaTx 的合成(图 2)。首先, 在 28 °C 下, 利用 HCTU/DIEA 缩合体系, 手动合成肽 4 (色谱纯度为 26%, 分离收率为 18%)。第二, 在 75 °C 下, 利用 DIC/Oxyma 缩合体系, 手动合成线性肽 5 (色谱纯度为 6%,

分离收率为 2%)。第三, 在 50 °C 下, 利用 DIC/Oxyma 缩合体系, 手动合成线性肽 6 (色谱纯度为 10%, 分离收率为 3%)。RP-HPLC 表明, 将 Met 突变成 Nle 后, 多肽的保留时间发生改变, 说明线性肽的极性发生了改变(图 2)。此外, 肽 5 和肽 6 粗肽的色谱纯度均远低于其它多肽, 说明 Met 突变成 Nle 会导致 DIC/Oxyma 合成效率的降低。

2.1.4 50 °C 下合成肽 7 和肽 8

2.1.1 部分使用 HCTU/DIEA 缩合体系, 可以实现肽 1 的稳健合成, Met 的氧化程度较低, 但合成效率有待提高。2.1.2 部分使用 DIC/Oxyma 缩合体系, 在 75 °C 条件下实现肽 2 和 3 的快速合成。75 °C 条件下虽然可以显著

提高固相合成效率, 但会导致较大比例 Met 残基的氧化. 另外, 75 °C 对常规国产仪器的损害较大、且对多肽合成操作人员不友好. 2.1.3 部分将 Met 替换成 Nle, 可以避免氧化的发生, 但可能会导致多肽极性的改变以及固相缩合效率的降低. 为了减少 Met 的氧化并提高缩合效率, 本部分探索在 50 °C 条件下, 利用 DIC/Oxyma 缩合体系, 手动合成线性肽 7 和肽 8. 氨基酸缩合反应时间为第一次 15 min, 第二次 15~30 min. Fmoc 脱除反应时间为第一次 3 min, 第二次 6 min.

首先, 在 50 °C 条件下, 利用 DIC/Oxyma 缩合体系, 合成 4 个半胱氨酸侧链巯基均裸露的线性肽 7 (色谱纯度为 35%, 分离收率为 27%). 为了探索 WaTx 的两次氧化折叠策略, 在多肽合成中 Cys9 和 Cys27 使用 Trt (三苯甲基) 保护, Cys13 和 Cys23 使用 AcM (乙酰胺甲基) 保护. 使用相同的策略合成了线性肽 8 (色谱纯度为 42%, 分

离收率为 36%). 与 HCTU/DIEA 缩合体系相比, 50 °C 下 DIC/Oxyma 缩合体系的反应效率提高一倍以上. 在 50 °C 条件下, 仅有 20.9%~22.4% 的 Met 被氧化, Met 的氧化程度与常温法(28 °C, HCTU/DIEA 缩合体系)没有显著差异. 该部分实验说明, 50 °C 条件下的 DIC/Oxyma 缩合体系可以实现多肽特别是含有易氧化残基的稳健、高效合成.

2.2 线性 WaTx 的复性折叠

线性肽 1~7 通过一次氧化折叠策略进行复性折叠^[12a], 线性肽 8 通过两次氧化折叠策略进行复性折叠, 得到目标多肽 WaTx (如图 3, 表 2). 一次氧化折叠策略的复性体系为 0.1 mol/L Tris 缓冲溶液(pH=7.5)、线性肽(30 mmol/L)、还原型谷胱甘肽(GSH, 1 mmol/L)和氧化型谷胱甘肽(GSSG, 0.1 mmol/L), 在 25 °C 恒温振荡条

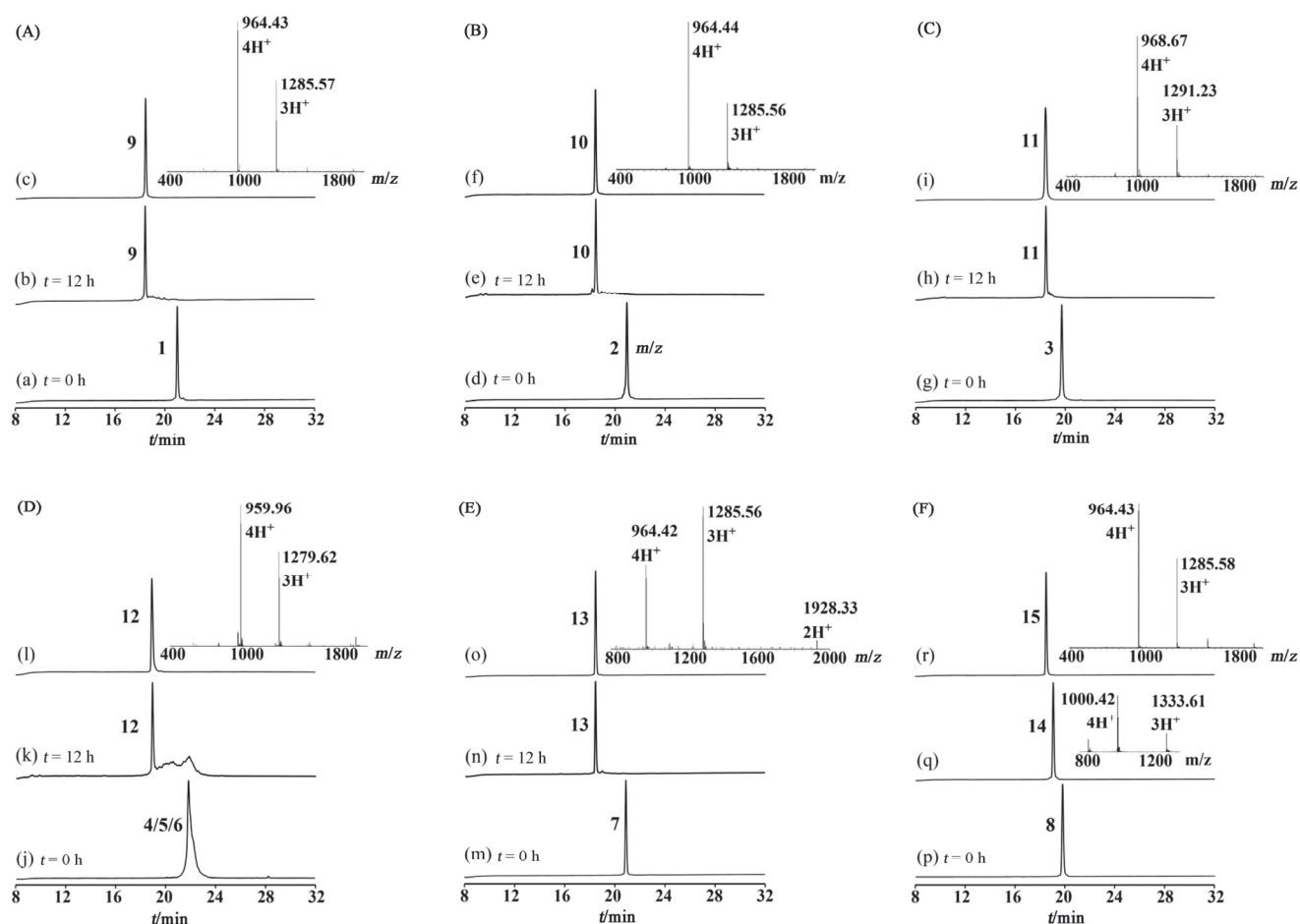


图 3 (A)肽 1、(B)肽 2、(C)肽 3 和(D)肽 4/5/6 (肽 4/5/6 的混合物)、(E)肽 7 和(F)肽 8 的氧化折叠分析型 RP-HPLC 色谱图和 ESI-MS 质谱图
Figure 3 Analytical RP-HPLC and ESI-MS spectra of oxidative folding process of peptides (A) peptide 1, (B) peptide 2, (C) peptide 3, (D) peptides 4/5/6 (the mixtures of peptides 4, 5, and 6), (E) peptide 7 and (F) peptide 8
 (A) (a)~(b) The RP-HPLC spectra of the folding solution for peptide 1 at 0 min and 12 h. (c) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 9. (B) (d)~(e) The RP-HPLC spectra of the folding solution for peptide 2 at 0 min and 12 h. (f) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 10. (C) (g)~(h) The RP-HPLC spectra of the folding solution for peptides 3 at 0 min and 12 h. (i) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 11. (D) (j)~(k) The RP-HPLC spectra of the folding solution for peptides 4/5/6 at 0 min and 12 h. (l) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 12. (E) (m)~(n) The RP-HPLC spectra of the folding solution for peptide 7 at 0 min and 12 h. (o) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 13. (F) The analytical RP-HPLC spectra of two-step oxidative folding process of peptide 8. (p) The RP-HPLC spectrum of the folding solution for peptide 8 at 0 min. (q) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 14 with one disulfide bond (observed mass of 3997.76 Da, calculated 3998.53 Da, average isotopes). (r) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified peptide 15. RP-HPLC conditions: a linear gradient of 10%~60% buffer B in buffer A over 30 min (10% for 2 min, then 10%~60% for 30 min) on a Vydac C18 column, $\lambda=214$ nm. The amino acid sequences of peptides 9~15 were provided in table S1

件下进行复性折叠, 12 h 内复性折叠完成. 因为一次氧化折叠存在错配风险, 所以本文使用两次氧化折叠方式实现 WaTx 的复性折叠^[13]. 两次氧化折叠策略首先使用 $K_3[Fe(CN)_6]$, 在 45 min 内构建第一对二硫键. 经过 RP-HPLC 分离纯化后, 使用碘进行 Acm 基团的脱除以及第二对二硫键的构建. 第二对二硫键的构建在 15 min 内完成. 分析型 RP-HPLC 表明, 肽 9, 10, 11, 13 和 15 在复性溶液中的色谱纯度(均高于 70%)和分离收率(均高于 30%, 表 2)没有显著差异. 肽 12 的色谱纯度仅有 29%, 分离收率仅有 13%. 复性实验表明, 将 Met 突变成 Nle, 影响了 WaTx 的复性折叠.

2.3 WaTx 的质谱和圆二色谱分析

RP-HPLC 和 ESI-MS 表明, 复性操作得到 WaTx (9~13 和 15) 的色谱纯度均大于 95%. 肽 9、10、13 和 15 共进样, RP-HPLC 谱图只有一个吸收峰, 色谱纯度大于 95% (图 4A). 圆二色谱(CD)表明, 肽 9~11、13 和 15 的 CD 谱图没有显著差异, 与前人合成 WaTx 的 CD 谱图趋势一致^[11], 通过不同合成方法和复性折叠策略均可实现 WaTx 的正确折叠. 肽 11 和 12 的 CD 谱图与其它复性折叠肽略有差异, 说明 Met 侧链硫醚的氧化以及 Met 突变成 Nle 都可能影响 WaTx 的结构. 线性肽 1 与复性折叠后多肽的 CD 谱图有显著差异, 说明二硫键对于维持 WaTx 的结构是必不可少的. 除线性肽 1 以外, 其它复性折叠多肽的 α -螺旋度无统计学差异, 且与前人

报道的一致(见支持信息, 表 S4)^[11].

2.4 WaTx 的活性测定

通过钙荧光方法测定不同合成方法和氧化折叠策略得到 WaTx 对 TRPA1 通道的激动作用(图 5). 以去离子 H_2O 作为阴性对照, TRPA1 的特异性激动剂异硫氰酸烯丙酯(AITC)作为阳性对照. 在表达 TRPA1 通道的 HEK293 细胞中加入复性折叠后的多肽, 监测钙荧光的强度. 线性肽 1 和只含有一对二硫键的肽 14 仅能引起少量钙内流, 而正确折叠二硫键的多肽引起了大量的钙离子内流(图 5A). 以曲线下面积来量化各组的钙内流, 复性折叠后的肽 9~13 和 15 诱发的钙内流无统计学差异(图 5B). 钙荧光实验表明二硫键对于 WaTx 的活性是必不可少的. 不同合成方法和复性策略得到的 WaTx (9~13 和 15) 均可有效激动 TRPA1 通道, 且活性无明显差别.

3 结论

DIC/Oxyma 缩合体系在高温固相多肽合成中得到广泛应用, 已成为基于微波合成仪的高温固相多肽合成中使用最多的缩合体系. 本文以蝎子毒素多肽 WaTx 为模型, 首次比较了不同反应温度(50 °C 和 75 °C)对 DIC/Oxyma 的偶联效率以及对甲硫氨酸(Met)等易氧化氨基酸的影响. 与常规 HCTU/DIEA 缩合体系相比, 在 75 °C 下, DIC/Oxyma [$n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$] 的氨基酸缩合效率提高一倍以上, 一个线性肽

表 2 WaTx (肽 9~15) 氧化折叠的色谱纯度、分离收率及 ESI-MS 数据

Table 2 The HPLC purity, isolated yield and ESI-MS data of oxidative folding products (WaTx, peptides 9~15)

Oxidation product	Precursor peptide	HPLC purity/%	Isolated yield/%	Yield/mg	Calculated mass ^a /Da	Observed mass ^b /Da
9	1	79	47	9.4	3854.34	3853.72
10	2	75	36	7.2	3854.34	3853.72
11	3	76	42	8.4	3871.33	3870.69
12	4/5/6	29	13	2.6	3836.31	3835.85
13	7	78	43	8.6	3854.34	3853.68
15	8	73	31	6.2	3854.34	3853.73

^a The calculated mass of the corresponding oxidative folding products. ^b The observed mass of the corresponding oxidative folding products.

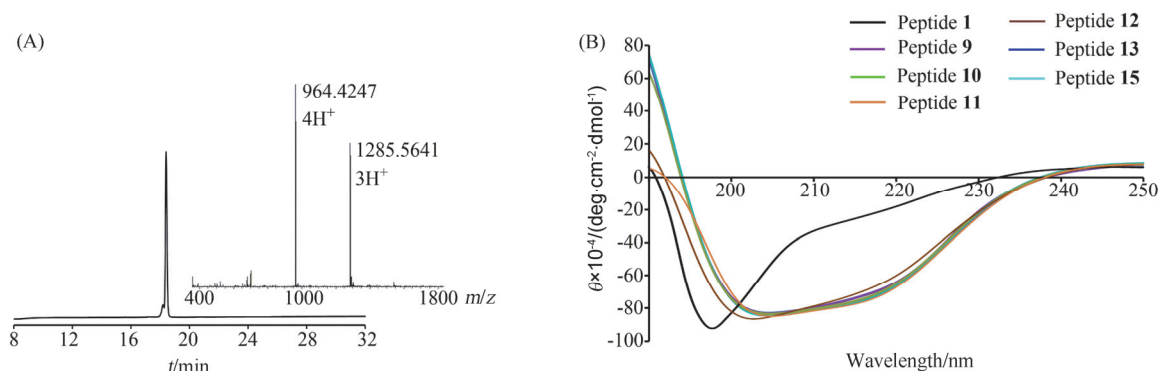


图 4 (A) 肽 9、10、13 和 15 共进样的分析型 RP-HPLC 色谱图和高分辨 ESI-MS 质谱图; (B) 肽 1、9~13 和 15 的圆二色谱图

Figure 4 (A) Analytical RP-HPLC and ESI-MS spectra of peptides 9, 10, 13 and 15 co-injections; (B) The circular dichroism (CD) spectra of peptides 1, 9~13 and 15

The ESI-MS spectrum gave an observed mass of 3853.70 Da (calculated 3854.34 Da, average isotopes). RP-HPLC condition: a linear gradient of 10%~60% buffer B in buffer A over 30 min (10% for 2 min, then 10%~60% for 30 min) on a Vydac C18 column, $\lambda = 214$ nm.

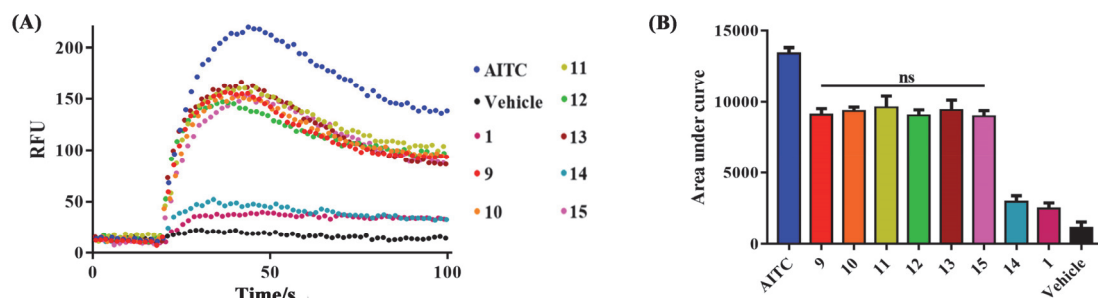


图5 利用钙荧光法评价肽1和9~15对TRPA1通道的激动作用

Figure 5 The agonistic effect of peptides **1** and **9~15** on TRPA1 channel was evaluated by calcium fluorescence assay

(A) The time courses of calcium influx caused by 5 $\mu\text{mol/L}$ peptides (**1**, **9~15**), AITC (100 $\mu\text{mol/L}$) and vehicle (deionized H_2O). Results are representative of 3 independent experiments. (B) Quantification of calcium influx by area under curve. $n=3$, mean $\pm$ SD. One way ANOVA. ns, no significance

合成周期所需时间约为 HCTU/DIEA 缩合体系的 45%。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下, DIC/Oxyma [$n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$] 的反应速率提高大约 80%, 一个线性肽合成周期所需时间约为 HCTU/DIEA 缩合体系的 50%。在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下, 62.9% 的 Met 在合成过程中被氧化, 氧化程度显著高于 HCTU/DIEA 缩合体系下 Met 的氧化程度。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下, 20.9%~22.4% 的 Met 在合成过程中被氧化, 与 HCTU/DIEA 缩合体系下 Met 的氧化程度没有显著差异。除了高温下 Met 的氧化, 50 $^{\circ}\text{C}$ 和 75 $^{\circ}\text{C}$ 下 DIC/Oxyma 缩合体系没有导致消旋等副反应, 说明 DIC/Oxyma 缩合体系的稳健性。与 75 $^{\circ}\text{C}$ 相比, 50 $^{\circ}\text{C}$ 在不显著降低合成效率和合成纯度的前提下, 显著降低了 Met 等敏感氨基酸的氧化。

本文研究表明, 75 $^{\circ}\text{C}$ 固相合成条件下, Met 的侧链硫醚极易氧化成亚砷。为了避免 Met 在合成过程中的氧化, 在 75 $^{\circ}\text{C}$ 固相合成条件下, 将 Met 突变成 Nle 是有必要的。本文比较了天然 WaTx 和 WaTx 突变体 (Met 突变成 Nle) 的固相合成及复性折叠。将 Met 突变成 Nle 会显著降低多肽合成的色谱纯度、分离收率, 以及复性纯化的色谱纯度和分离收率。另外, 线性 WaTx 突变体的色谱保留时间与天然线性 WaTx 的保留时间有较大差异。CD 表明复性纯化后 WaTx 突变体和天然 WaTx 在结构上有差异。虽然将 Met 突变成 Nle 是高温固相多肽合成的常用突变, 但在进行该点突变时, 结构和活性的验证是必要的。在复性折叠过程中, 本文分别采用了一次氧化折叠和两次氧化折叠策略。两种氧化折叠策略均能得到活性 WaTx。虽然两次氧化折叠策略可以确保二硫键的正确构建, 但两次氧化策略需要经过两次色谱分离纯化且分离收率低于一次氧化折叠策略。

RP-HPLC、ESI-MS、CD 以及钙荧光成像等实验表明, 通过不同合成方法和复性折叠策略制备的 WaTx 在二级结构和活性上没有显著差异。二硫键的断裂会导致 WaTx 结构的改变以及活性显著降低, 说明二硫键对于维持 WaTx 的结构和活性等发挥至关重要的作用。本文建立了 WaTx 的快速合成及复性折叠方法, 为研究 TRPA1 等离子通道提供重要分子工具。本文研究表明,

DIC/Oxyma 缩合体系是一种快速、稳健的缩合系统, 能够较为成功地应用于 30 个氨基酸以上长肽的固相合成中。与基于 HCTU/DIEA 缩合体系相比, 基于 DIC/Oxyma 的高温固相缩合策略可以显著提高缩合效率, 但存在 Met 氧化、对多肽合成仪器要求较高等不足。从操作友好和避免 Met 氧化的角度, 基于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 DIC/Oxyma 缩合体系 [$n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 3 : 6 : 3$] 更加温和, 更适用于多肽的固相合成特别是手动固相多肽合成。考虑到微波合成仪等高温多肽合成仪器较高的价格以及较低的普及率, 本文的研究为固相合成特别是手动固相合成二硫键构象锁定多肽提供了重要参考。

4 实验部分

4.1 固相多肽合成

本研究合成了 8 条线性肽。在固相合成过程中, 线性肽 **8** 的 2,3-Cys 被 AcM 基团保护, 1,4-Cys 被 Trt 基团保护。线性肽 **1~7** 的 4 个 Cys 侧链巯基在固相合成过程中均被 Trt 基团保护。线性肽 **1~2** 和 **4~8** 使用的固相载体为 Rink Amide AM 树脂, 线性肽 **3** 使用的固相载体为 Wang 树脂。

4.1.1 树脂的活化以及 Fmoc 脱保护

采用基于 Fmoc (*N*-9-苄氧羰基) 的固相多肽合成方法合成蝎子毒素 WaTx。称取 160 mg 的 Rink Amide AM 树脂 (取代度为 0.32 mmol/g, 0.05 mmol) 置于多肽合成管中, 标准洗一次 [*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 洗 2 次, 二氯甲烷 (DCM) 洗 2 次, DMF 洗 1 次, DCM 洗 1 次, DMF 洗 2 次], 抽干溶剂, 加入 DMF 静置, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡中活化树脂 1 h, 标准洗一次。再加入混合的 DMF/DCM ($V : V = 1 : 1$) 活化树脂 30 min, 标准洗一次。加入体积分数为 20% 的哌啶/DMF ($V : V = 1 : 4$) 溶液于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中反应 5 min, 标准洗两次, 取出少量树脂后, 加入 Kaiser 试剂 (体积分数为 80% 的苯酚/乙醇溶液, 5% 的茚三酮/乙醇溶液 (w/V)), 在加热条件下检测, 显蓝紫色或橙红色^[14]。再次加入体积分数为 20% 的哌啶溶液反

应 10 min, 标准洗一次, 抽干后进行氨基酸缩合。

4.1.2 基于 HCTU/DIEA 的氨基酸缩合

缩合体系为 Fmoc-氨基酸(3 equiv.)/HCTU (2.8 equiv.)/DIEA (6 equiv.)的 DMF 溶液, 加入树脂(Fmoc 已脱除)。置于 28 °C 恒温振荡器中反应 30 min。标准洗一次。根据氨基酸缩合难易程度, 使用相同的氨基酸缩合体系, 28 °C 恒温振荡器中反应 30~40 min。取少量树脂, 使用 Kaiser 测试检测氨基的反应程度。向树脂中加入体积分数为 20% 的哌啶溶液, 在 28 °C 下脱保护反应 5 min, DMF 冲洗两次。再次添加体积分数为 20% 的哌啶溶液, 在 28 °C 下脱保护反应 10 min。标准洗一次。取少量树脂, 使用 Kaiser 测试检测 Fmoc 的脱除情况。重复缩合 40~60 min。重复上述缩合方法, 按照氨基酸序列将所有氨基酸依次偶联到树脂上。

4.1.3 基于 DIC/Oxyma 的氨基酸缩合, 反应温度为 50 °C

缩合体系为 Fmoc-氨基酸(3 equiv.)/DIC (6 equiv.)/Oxyma (3 equiv.)的 DMF 溶液, 加入树脂(Fmoc 已脱除)。置于 50 °C 恒温振荡器中反应 15 min。标准洗一次。使用 Kaiser 测试检测氨基的反应程度。使用相同的氨基酸缩合体系, 50 °C 恒温振荡器中反应 15~30 min。然后标准洗一次。向树脂中加入体积分数为 20% 的哌啶溶液, 在 50 °C 下脱保护基反应 3 min, DMF 洗两次, 取少量树脂, Kaiser 测试显色。再次添加体积分数为 20% 的哌啶溶液, 在 50 °C 下脱保护反应 6 min。标准洗一次。重复上述缩合方法, 按照氨基酸序列将所有氨基酸依次偶联到树脂上。

4.1.4 基于 DIC/Oxyma 的氨基酸缩合, 反应温度为 75 °C

缩合体系为 Fmoc-氨基酸(3 equiv.)/DIC (6 equiv.)/Oxyma (3 equiv.)的 DMF 溶液, 加入树脂(Fmoc 已脱除)。置于 75 °C 恒温振荡器中反应 10 min。标准洗一次。使用 Kaiser 测试检测氨基的反应程度。使用相同的氨基酸缩合体系, 75 °C 恒温振荡器中反应 15~20 min。然后标准洗一次。向树脂中加入体积分数为 20% 的哌啶溶液, 在 75 °C 下反应 2 min, DMF 洗两次, 取少量树脂, Kaiser 测试显色。再次添加体积分数为 20% 的哌啶溶液, 在 75 °C 下脱保护反应 6 min。标准洗一次。重复上述缩合方法, 按照氨基酸序列将所有氨基酸依次偶联到树脂上。

4.1.5 切肽及多肽的沉淀

当所有氨基酸完成缩合后, 用体积分数为 20% 的哌啶溶液脱除最后一个氨基酸的氨基末端 Fmoc 保护基。标准洗一次, DCM 洗 5 次, 水泵抽真空 3 min, 油泵抽真空 6 min, 将溶剂等去除。向树脂中加入提前冰浴的切肽试剂 [$V(\text{TFA}) : V(\text{phenol}) : V(\text{water}) : V(\text{thioanisole}) : V(\text{EDT}) = 82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5$]。在 28 °C 气浴恒温振荡器中反应 2.5 h。反应完毕后, 反应溶液用高纯氮气鼓泡

浓缩至总体积约 2 mL。使用提前冰浴的无水乙醚对溶液中的多肽进行沉淀, 离心, 弃去上清液, 保留沉淀。再用预冷的无水乙醚清洗粗肽, 重复溶解-离心-沉淀步骤两次。得到的粗肽在通风橱中静置, 得到粗肽固体。

4.2 多肽的分离纯化

用于多肽分离纯化和纯度鉴定的半制备型与分析型 RP-HPLC 为岛津 LC-20 AT。半制备型色谱柱为 Grace Vydac “Protein C4” (250 mm×10 mm), 色谱流速为 4 mL/min。分析型色谱柱为 Agilent 5 TC-C18 (2) (250 mm×4.6 mm), 色谱流速为 1 mL/min。半制备型与分析型 RP-HPLC 的色谱条件均为: 体积分数为 10% 的流动相 B 2 min, 然后体积分数为 10%~60% 流动相 B 30 min。色谱的流动相 A 为含有体积分数为 0.1% TFA 的去离子水, 流动相 B 为含有体积分数为 0.08%~0.1% TFA 的乙腈, 紫外检测器使用 214 nm 和 254 nm 双波长进行检测。

粗肽溶解于乙腈/水混合溶液中 [$V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 1 : 5$, 含体积分数为 0.1% 的 TFA], 液氮冻成固体, 通过低温冷冻干燥机进行冷冻干燥。得到的多肽固体再次溶解于乙腈/水混合溶液中, 使用半制备型 RP-HPLC 进行分离纯化。纯化后的多肽溶液经过冷冻干燥后得到线性 WaTx 固体, -20 °C 条件下密封保存。在分离纯化过程中, 合成的粗肽先经过溶解-冷冻干燥过程, 然后再进行色谱分离纯化, 比直接进行色谱分离纯化的效果更好。使用分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 检测多肽的纯度和分子量。分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 表明, 肽 1、2、3、7 和 8 分离纯化后的色谱纯度均大于 95%, 肽 4、5 和 6 分离纯化后的色谱纯度大于 85%。

4.3 氧化折叠流程

4.3.1 一次氧化折叠策略

配制 0.1 mol/L Tris 水溶液, 然后加入还原型谷胱甘肽(终浓度 5 mmol/L)、氧化型谷胱甘肽(终浓度 0.5 mmol/L), 用 1 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 到 7.5, 定容, 将配置好的缓冲溶液过滤。称取纯化后的 WaTx 线性肽 1 20 mg (5.18 μmol), 加入少量的纯水溶解后, 在振荡的条件下逐滴加入 Tris 缓冲液中, 得到 WaTx 终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的复性溶液。复性过程在 25 °C 恒温振荡器中进行。然后使用分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 对复性过程进行分析监测。复性完成后, 使用半制备型 RP-HPLC 进行分离纯化。纯化后的多肽溶液经过冷冻干燥得到目标 WaTx, -20 °C 条件下密封保存。

4.3.2 两次氧化折叠策略

纯化后的线性肽 8 (20 mg, 复性浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$) 溶解于 100 mL 的乙腈/水溶液 [$V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 1 : 9$] 中, 搅拌下逐滴加入等体积的含有 20 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 0.1 mol/L Tris 缓冲液, 用乙酸调节 pH 到

7.5, 在 25 °C 气浴恒温振荡器中进行复性折叠. 使用分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 分析监测复性过程. 45 min 后复性完成, 使用 RP-HPLC 分离纯化, 得到构建一对二硫键的多肽溶液(肽 14). 搅拌下, 将等体积的 10 mmol/L 碘(I₂)溶液(碘固体溶解于混合溶剂[V(H₂O):V(TFA):V(乙腈)=78:2:20]中), 逐滴加入到纯化后的多肽溶液(肽 14)中. 在 25 °C 气浴恒温振荡器中进行复性折叠. 通过分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 显示出 15 min 内第二对二硫键构建完成. 搅拌下, 向复性溶液中逐滴加入维生素 C 水溶液(维生素 C 1.6 mg 溶解于 3.3 mL 含有体积分数为 0.1% 的 TFA 的去离子水), 复性溶液由黄色变成无色. 复性完成后, 使用半制备型 RP-HPLC 进行分离纯化. 纯化后的多肽溶液经过冷冻干燥得到目标多肽 WaTx (肽 15), -20 °C 下密封保存.

4.4 圆二色谱测试

将多肽 WaTx (1、9~13 和 15)溶解于 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 1 mg/mL 的多肽溶液. 通过梯度稀释得到浓度为 0.5、0.125 mg/mL 的多肽溶液. 将多肽溶液加入 1 mm 的石英比色皿中, 使用 J-815 CD 光谱仪对不同浓度的多肽溶液进行扫描. 仪器的参数设定为: 波长为 170~260 nm、扫描带宽为 1 nm、扫描速度为 100 nm/min. 每个多肽溶液重复测量 3 次并取平均值. 校正和数据处理均使用 Jasco 标准分析程序, 螺旋度由 222 nm 处的平均椭圆率 $[\theta]$ 计算得出^[15].

4.5 Flexstation 3 胞内钙流检测

6 孔板中 HEK293 细胞长至 80%~90%密度时, 用 lipofectamine 2000 (Invitrogen)负载 TRPA1 质粒转染细胞, 转染完成后消化细胞, 细胞悬液用完全培养基稀释, 100 μ L 每孔转移到黑壁透明底 96 孔板中, 置于培养箱中(37 °C、体积分数为 5%的 CO₂)培养过夜. 过夜后的细胞每孔加入经 HBSS 稀释的钙离子敏感荧光染料 Cal-520 (AAT Bioquest), 放回培养箱中培养 1.5 h. 上机前, 用 HBSS 稀释各肽的母液(5 mmol/L, 去离子水配置)到 5 μ mol/L 测试浓度. 以 AITC (100 μ mol/L)作为阳性对照, 以去离子水作为阴性对照. 使用 Flexstation 3 的快速动力学荧光分析模块进行检测, 每个肽设置三个复孔, 激发波长 485 nm, 发射波长 525 nm, 时间间隔 1.6 s, 17 s 时加入待测肽, 持续记录到 100 s. 数据使用 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software)软件进行统计与分析.

References

- [1] (a) Liu, T.; Xu, S. L.; Zhao, J. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 873 (in Chinese). (刘涛, 许泗林, 赵军锋, 有机化学, **2021**, *41*, 873.) (b) Chang, H. N.; Liu, B. Y.; Qi, Y. K.; Zhou, Y.; Chen, Y. P.; Pan, K. M.; Li, W. W.; Zhou, X. M.; Ma, W. W.; Fu, C. Y.; Qi, Y. M.; Liu, L.; Gao, Y. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 11760. (c) Guo, Y.; Zhou, P. P.; Zhang, S. Y.; Fan, X. W.; Dou, Y. W.; Shi, X. L. *Med*

- ChemComm* **2018**, *9*, 1226. (d) Zhou, X. M.; Zuo, C.; Li, W. Q.; Shi, W. W.; Zhou, X. W.; Wang, H. F.; Chen, S. M.; Du, J. F.; Chen, G. Y.; Zhai, W. J.; Zhao, W. S.; Wu, Y. H.; Qi, Y. M.; Liu, L.; Gao, Y. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 15114. (e) Song, H.; Liu, C.; Wu, Y. J.; Hu, H. G.; Yan, F. *Acta Chim. Sinica* **2018**, *76*, 95 (in Chinese). (宋慧, 刘超, 吴仪君, 胡宏岗, 阎芳, 化学学报, **2018**, *76*, 95.) (f) Cui, T. T.; Chen, J. Y.; Zhao, R.; Guo, Y. Y.; Tang, J. H.; Li, Y. L.; Li, Y. M.; Bierer, D.; Liu, L. *Chin. J. Chem.* **2021**, *39*, 2517.
- [2] (a) Guo, Y.; Fu, L. L.; Fan, X. W.; Shi, X. L. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 1267 (in Chinese). (郭叶, 傅莉莉, 范晓文, 史宣玲, 有机化学, **2018**, *38*, 1267.) (b) Qi, Y. K.; Qu, Q.; Bierer, D.; Liu, L. *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 2793. (c) Guo, Y.; Fu, L. L.; Fan, X. W.; Shi, X. L. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 1167.
- [3] (a) Muramatsu, W.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6792. (b) Hu, L.; Xu, S.; Zhao, Z.; Yang, Y.; Peng, Z.; Yang, M.; Wang, C.; Zhao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13135. (c) Jaradat, D. M. *Amino Acids* **2018**, *50*, 39.
- [4] Wang, Z.; Wang, X.; Wang, P.; Zhao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10374.
- [5] (a) Albericio, F.; El-Faham, A. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 760. (b) Isidro-Llobet, A.; Kenworthy, M. N.; Mukherjee, S.; Kopach, M. E.; Wegner, K.; Gallou, F.; Smith, A. G.; Roschangar, F. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 4615. (c) Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394.
- [6] (a) Wang, F.; Xu, L.; Chu, G.; Shi, J.; Guo, Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 218 (in Chinese). (王凤亮, 许玲, 储国超, 石景, 郭庆祥, 有机化学, **2016**, *36*, 218.) (b) Pan, M.; Gao, S.; Zheng, Y.; Tan, X.; Lan, H.; Tan, X.; Sun, D.; Lu, L.; Wang, T.; Zheng, Q.; Huang, Y.; Wang, J.; Liu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 7429. (c) Qi, Y.-K.; Si, Y.-Y.; Du, S.-S.; Liang, J.; Wang, K.-W.; Zheng, J.-S. *Sci. China Chem.* **2019**, *62*, 299. (d) Qi, Y. K.; Ai, H. S.; Li, Y. M.; Yan, B. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 19. (e) Huang, Y. C.; Guan, C. J.; Tan, X. L.; Chen, C. C.; Guo, Q. X.; Li, Y. M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1500. (f) Ben Haj Salah, K.; Inguibert, N. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1783.
- [7] (a) Qu, Q.; Pan, M.; Gao, S.; Zheng, Q. Y.; Yu, Y. Y.; Su, J. C.; Li, X.; Hu, H. G. *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1800234. (b) Qu, Q.; Gao, S.; Wu, F.; Zhang, M. G.; Li, Y.; Zhang, L. H.; Bierer, D.; Tian, C. L.; Zheng, J. S.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 6037. (c) Zuo, C.; Shi, W.-W.; Chen, X.-X.; Glatz, M.; Riedl, B.; Flamme, I.; Pook, E.; Wang, J.; Fang, G.-M.; Bierer, D.; Liu, L. *Sci. China Chem.* **2019**, *62*, 1371.
- [8] Liang, L. J.; Chu, G. C.; Qu, Q.; Zuo, C.; Mao, J.; Zheng, Q.; Chen, J.; Meng, X.; Jing, Y.; Deng, H.; Li, Y. M.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 17171.
- [9] (a) Ma, Y.; Liu, Y.; Wang, J.; Chen, X.; Yin, H.; Chi, Q.; Jia, S.; Du, S.; Qi, Y.; Wang, K. *Chin. J. Org. Chem.* **2022**, *42*, 10.6023/cjoc202109003 (in Chinese). (马艳楠, 刘雅妮, 王金艳, 陈西同, 尹昊, 迟巧娜, 贾世玺, 杜姗姗, 齐昀坤, 王克威, 有机化学, **2022**, *42*, 10.6023/cjoc202109003.) (b) Chen, X. T.; Wang, J. Y.; Ma, Y. N.; Dong, L. Y.; Jia, S. X.; Yin, H.; Fu, X. Y.; Du, S. S.; Qi, Y. K.; Wang, K. *J. Pept. Sci.* **2022**, *28*, e3368.
- [10] Qiao, Z.; Luo, J.; Tang, Y. Q.; Zhou, Q.; Qi, H.; Yin, Z.; Tang, X.; Zhu, W.; Zhang, Y.; Wei, N.; Wang, K. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 16282.
- [11] King, J. V. L.; Emrick, J. J.; Kelly, M. J. S.; Herzig, V.; King, G. F.; Medzihradsky, K. F.; Julius, D. *Cell* **2019**, *178*, 1362.
- [12] (a) Wang, J.; Dong, L.; Liu, Y.; Chen, X.; Ma, Y.; Yin, H.; Du, S.; Qi, Y.; Wang, K. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 2800 (in Chinese). (王金艳, 董黎颖, 刘雅妮, 陈西同, 马艳楠, 尹昊, 杜姗姗, 齐昀坤, 王克威, 有机化学, **2021**, *41*, 2800.) (b) Qi, Y. K.; He, Q. Q.; Ai, H. S.; Guo, J.; Li, J. B. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 4148.
- [13] (a) Shi, J.; So, L. Y.; Chen, F.; Liang, J.; Chow, H. Y.; Wong, K. Y.; Wan, S.; Jiang, T.; Yu, R. *J. Pept. Sci.* **2018**, *24*, e3087. (b) Guo, Y.; Sun, D. M.; Wang, F. L.; He, Y.; Liu, L.; Tian, C. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 14276.
- [14] (a) Zheng, J. S.; Tang, S.; Qi, Y. K.; Wang, Z. P.; Liu, L. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2483. (b) Li, J. B.; Qi, Y. K.; He, Q. Q.; Ai, H. S.; Liu, S. L.; Wang, J. X.; Zheng, J. S.; Liu, L.; Tian, C. L. *Cell Res.* **2018**, *28*, 257. (c) Zheng, J. S.; Liang, J.; Shi, W. W.; Li, Y.; Hu, H. G.; Tian, C. L.; Liu, L. *Sci. Bull.* **2021**, *66*, 1542.
- [15] Wang, N.; Xie, G.; Liu, C.; Cong, W.; He, S.; Li, Y.; Fan, L.; Hu, H. G. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 616147.

(Cheng, F.)