使用新型耦合活化剂 Oxyma 高效合成利拉鲁肽

王凤亮 许 玲 储国超 石 景* 郭庆祥*

(中国科学技术大学化学系 合肥 230026)

摘要 Oxyma 作为一种重要的新型耦合活化剂, 相比于 HOBt, HOAt 等传统活化剂具有在多肽偶联反应中消旋率较低及耦合效率更高等优势. 本研究使用 Oxyma 作为耦合活化剂在树脂上一次性合成了具有治疗糖尿病功能的多肽药物利拉鲁肽(Liraglutide), 且具有较高的合成效率. 该策略的运用为使用化学方法大规模合成 Liraglutide 提供了可能.

关键词 Oxyma; 利拉鲁肽; 多肽药物; 多肽固相合成

Efficient Synthesis of Liraglutide by Using Oxyma as Coupling Reagent

Wang, Fengliang^a Xu, Ling^a Chu, Guochao^a Shi, Jing* Guo, Qingxiang*

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract As a newly efficient reagent, Oxyma [ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate] has a lower rate of racemization and relative higher coupling efficiency as compared with HOBt, HOAt, etc. In this work, as an important polypeptide drug for the treatment of diabetes, liraglutide was firstly chemically synthesized with high efficiency by solid chemical synthesis using Oxyma as coupling reagent. The strategy presented here provides an efficient strategy for the chemical synthesis of liraglutide with enlarged scales.

Keywords oxyma; liraglutide; polypeptide drug; solid poly-peptide synthesis

多肽固相合成是通过在固相载体上逐个添加氨基酸以合成所需的目标多肽的方法^[1], 相比于多肽液相合成技术, 该方法具有易分离, 操作简便等优势^[2], 其中使用最广泛的是基于 9-芴甲氧羰基(Fmoc)的固相合成方法^[3]. 近年来, 使用 Fmoc 固相合成技术已经可以大量获得纯度较高的多肽及蛋白质, 而该技术也已被广泛运用于多肽药物的合成中^[4]. 在氨基酸偶联过程中, 使用最广泛的活化剂为苯并三氮唑类, 例如 1-羟基苯并三唑(HOBt)^[5]、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑(HOAt)^[6]等, 但这些活化剂都具有各自的缺陷^[7]. 此外, *O*-苯并三氮唑-2-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、*O*-(6-氯苯并三氮唑)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)、*O*-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)等也是经常使用的一类鎧盐缩合剂, 而且缩合效率相较于 HOBt 更高^[8]. 近期, 有研究发现了一种新型的缩合剂 2-脒基乙酸乙酯(Oxyma), 在多肽耦合中显示出更高的效

率, 且使用的安全性更高^[9]. 而且相比于 HOBt, HOAt, HCTU 等缩合剂, 使用 Oxyma 合成的多肽具有更低的消旋率, 且可以与高温耦合策略较好地兼容^[10]. 此外, 对于超过 40 个氨基酸的长肽合成也表现出更好的稳定性. 近期, Oxyma 被用来缩合合成各类多肽物质, 例如, 抗菌的环脂肽^[11]、刺激神经组织的多肽 Nobiletin B^[12] 及用于生物标记的咕吨染料^[13]等. 该耦合活化剂的使用将为多肽药物的高效化学合成带来更多的选择及帮助^[9].

利拉鲁肽(Liraglutide)是一类重要的用于治疗糖尿病的多肽类药物, 在降低血糖、促进胰岛细胞再生等方面发挥着非常重要的作用^[14]. 该药物的设计来源于人类胰高血糖素样肽 1 (GLP-1), 设计者将其 34 位赖氨酸替换为精氨酸, 并对 26 位赖氨酸由谷氨酸介导发生棕榈酰化, 该策略大大延长了 Liraglutide 在体内的半衰期, 为 Liraglutide 成为具有较高药效的多肽药物提供

* E-mail: shijing@ustc.edu.cn; qxguo@ustc.edu.cn

Received May 8, 2015; revised August 3, 2015; published online September 6, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21272223, 21572214).

国家自然科学基金(Nos. 21272223, 21572214)资助项目.

了可能^[15]. 目前该药已在2011年4月获得了中国国家食品药品监督管理局(SFDA)批准上市, 应用于治疗2型糖尿病患者^[16].

早期研究人员为得到纯度较高的 Liraglutide, 采用了固-液相结合的方法, 即 Liraglutide 的主链采用固相合成. 此后将预先制备好的谷氨酸-棕榈酸在液相中与 Liraglutide 中 26 位赖氨酸的侧链发生缩合, 进一步得到完整的 Liraglutide 多肽^[16]. 该方法的主要缺点在于, 合成路线较为复杂, 操作繁琐, 且采用的液相偶联策略不易分离, 使得合成产率较低. 本研究以 Oxyrna 作为耦合活化剂, 可以在树脂上完成 Liraglutide 的一次性全合成, 操作步骤简单, 易分离, 可以较为高效地获得 Liraglutide.

1 结果与讨论

总体来说, 我们首先使用多肽固相合成(SPPS)策略, 以 Oxyrna 作为耦合活化剂合成 Liraglutide 主链片段(1a), 在此过程中对赖氨酸的侧链使用特殊保护基保护. 此后将赖氨酸侧链保护基脱除并耦合谷氨酸(1b), 进一步使用 Oxyrna 耦合棕榈酸(1c), 实现在树脂上一次性全合成 Liraglutide(图 1).

图 1 Liraglutide 的合成策略

Figure 1 The chemical synthesis of liraglutide

1.1 Liraglutide 主链片段的合成

使用 Oxyrna 作为活化剂从 C 端到 N 端合成 Liraglutide 的主链片段, 其中赖氨酸侧链使用 Mtt 保护基保护[Fmoc-Lys(Mtt)-OH]. 在耦连上最后一个氨基酸后, 脱除 Fmoc 基团并上 Boc 基团保护. 在树脂上切割后(切割液为: 88% TFA, 5%苯酚, 5%水, 2% TIPS)得到粗肽(1a) 560 mg, 产率约为 66%. 粗肽样品使用液相色谱(HPLC)进行纯化, 并通过质谱(ESI-MS)进一步确认

分子量正确(图 2).

图 2 色谱及质谱纯化、鉴定 liraglutide (1a)主链

Figure 2 HPLC and ESI-MS analysis of the main chain of liraglutide (1a)

1.2 侧链保护基 Mtt 的切割及谷氨酸的缩合

在得到主链产物之后需要脱除 Mtt 保护基以便进行后续谷氨酸及棕榈酸的耦合. 最初使用 3% TFA 切割 20 min 后再正常耦合谷氨酸, 实验结果发现将近 80%的主链多肽未发生反应. 我们认为这是由于 Mtt 没有切割完全所致, 故需要进一步增加切割时间. 在改用 3% TFA 切割 40 min 后产物峰明显增加, 但仍有 30%的主链多肽未反应. 进一步延长反应时间至切割 60 min 后色谱结果显示主链产物基本反应完全(图 3), 此后再延长切割反应的时间, 产率并未增加. 在获得脱除了 Mtt 保护基的主链产物后, 我们进一步在 26 位赖氨酸侧链耦合上谷氨酸, 以便之后进行棕榈酸的偶联, 可以较为高效地获得产物 1b, 产率约为 90%.

图 3 3% TFA 切割赖氨酸侧链 Mtt 保护基的效率图

Figure 3 The efficiency diagram of the cleavage for Lys side chain Mtt protecting group by using 3% TFA

1.3 棕榈酸的缩合-耦合效率的比较

在获得耦合了谷氨酸的产物后(1b), 为了进一步在侧链上高效耦合棕榈酸, 我们分别尝试使用 HCTU, Oxyrna 对棕榈酸进行缩合. 实验结果表明(图 4)使用 HCTU 作为缩合剂时, 只有 40%的谷氨酸能够完全接上

棕榈酸. 而使用 Oxyrna 来耦合棕榈酸, 发现原料 **1b** 可以完全转变为产物 **1c**, 说明棕榈酸能够几乎完全与谷氨酸偶联.

基于此, 一次固相全合成全长 Liraglutide 的步骤如下: 首先使用 Oxyrna 作为耦合活化剂完成主链氨基酸的偶联, 以 3% TFA 切割赖氨酸上的 Mtt 保护基 60 min(以 20 min 切割 3 次为最佳). 之后使用 Oxyrna 分别耦合谷氨酸、棕榈酸可得到粗肽 580 mg, 使用半制备色谱纯化后得到纯肽 194 mg, 总产率约为 20.7%. 产物经 HPLC 纯化后使用 ESI-MS 确定其分子量正确(图 4).

图 4 Oxyrna 和 HCTU 与棕榈酸耦合的效率比较

Figure 4 The synthesis of full chain of liraglutide by using coupling reagent for coupling with palmitic acid (A) HCTU coupling with palmitic acid; (B) Oxyrna coupling with palmitic acid; (C) full length purified liraglutide

1.4 Liraglutide 的 MS/MS 谱图

获得产物 **1c** 后, 我们进一步测定了产物的串联质谱(MS/MS), 并通过解析得到了 MS/MS 谱图(图 5), 确

定产物 **1c** 的氨基酸序列与 Liraglutide 一致.

2 结论

利拉鲁肽是一种用于治疗糖尿病的多肽药物, 具有较好的市场价值. 目前生产该药物所采用的固-液相相结合的方法存在操作繁琐、分离纯化困难且合成效率较低等缺陷. 本研究使用 Oxyrna 作为耦合活化剂, 高效地在固相树脂上实现一次性全合成 Liraglutide, 且相比于前人的策略, 在很大程度上提高了合成效率. 同时, 本研究证明 Oxyrna 作为一种高效的耦合活化剂, 能够较为成功地应用于长肽的合成中, 并且相比于其它类型的活化剂具有更高的耦合效率.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

分析型与半制备型 HPLC 为岛津(Prominence LC-20AT), 且分析型与半制备型色谱柱均使用 Grace Vydac “Peptide C18”. 分析型色谱柱大小为 150 mm×4.6 mm, 半制备型则为 250 mm×10 mm. 两者的流动相 A 均为含有 0.08% TFA 的乙腈, 流动相 B 则是含有 0.1% TFA 的水, 紫外检测器均使用 214 和 254 nm 波长进行检测. 分析型 HPLC 采用乙腈浓度为 1%~91%的梯度洗脱, 流速 1.2 mL/min, 梯度时间为 30 min. 半制备型 HPLC 采用乙腈浓度为 1%~69%的梯度洗脱, 流速 4.0 mL/min 梯度时间为 50 min. 除特殊说明, 本实验所采用试剂均使用市售分析纯试剂.

图 5 Liraglutide 的 MS/MS 谱图

Figure 5 The MS/MS spectrogram of liraglutide

3.2 实验方法

3.2.1 Liraglutide 主链的合成

称取 0.454 g 2-Cl-Trt(Cl) 树脂 (取代度为 0.55 mmol/g) 于固相合成管内, 使用 5 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 洗涤树脂 3 次, 之后用 10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 与二氯甲烷 (DCM) 的混合液 ($V:V=1:1$) 溶胀 10 min. 之后抽干树脂, 加入 Liraglutide C-末端第一个氨基酸 Fmoc-Gly (4 equiv. 氨基酸, 8 equiv. DIEA), 反应两次, 每次各为 1 h. 反应完毕后加入 2 mL 甲醇继续反应 10 min. 之后用 DMF, DCM, DMF 各洗 5 次, 加入 5 mL 20% 哌啶切割 Fmoc 基团, 反应两次, 分别为 2, 10 min, 再用 DMF, DCM, DMF 各洗 5 次, 加入 C 末端第二个氨基酸 Arg (4 equiv. 氨基酸, 3.6 equiv. HCTU, 8 equiv. DIEA), 若用 Oxyma 活化, 添加为 4 equiv. 氨基酸, 4 equiv. Oxyma, 4 equiv. DIC, 预活化 10 min, 90 °C 高温反应 20 min (此高温反应不可用于 Arg, 且 His 室温反应 45 min, 而 Cys 则为 50 °C 反应). 其中肽链中部的赖氨酸则用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 按正常氨基酸连接. 接完最后一个氨基酸后脱除 Fmoc 基团, 加入 Boc/DIEA 体积比为 1/4 的反应液, 反应两次, 时间分别为 5, 10 min.

3.2.2 侧链保护基 Mtt 的切割及谷氨酸的缩合

赖氨酸侧链保护基 Mtt 由于受酸敏感, 使用 3% TFA 溶于 DCM 进行切割, 分别切割 20 min 一次, 40 min (20 min 两次), 60 min (20 min 三次). 此后使用 Oxyma (方法同上述) 耦合 Fmoc-Glu-OtBu 形成异肽键.

3.2.3 棕榈酸的缩合

耦合完 Glu 之后, 仍用 20% 的哌啶切割 Fmoc 基团, DMF, DCM, DMF 洗涤后分别用 HCTU, Oxyma 耦合棕榈酸, 反应 1 h 后得到最终的产物. DMF, DCM 洗涤后, 使用 8 mL 的切割试剂 (88% TFA, 5% 苯酚, 5% 水, 2% TIPS) 切割多肽, 反应 2 h. 之后将切割液聚集于 50 mL 离心管内, 氮气鼓吹浓缩, 再使用冰乙醚沉淀、离心, 置于室温晾干后得到粗肽. 最后使用半制备型 HPLC 得到纯肽.

辅助材料 (Supporting Information) Liraglutide 主链片段和全长质的谱图, 以及 Liraglutide 的 CD 谱图. 这些材

料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [2] Kent, S. B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338.
- [3] Carpino, L.; Han, G. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [4] (a) Mäde, V.; Els-Heindl, S. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197.
(b) Si, Y. Y.; Guo, Y.; Li, H. Y.; Sun, H. Y.; Fang, G. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 450.
(c) Bruckdorfer, T.; Marder, O.; Albericio, F. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *35*, 29.
(d) Chen, C. C.; Li, S. J.; Chen, Y. Q.; Xu, H. J.; Li, Y. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 1452.
(e) Fang, G. M.; Li, Y. M.; Shen, F.; Huang, Y. C.; Li, J. B.; Lin, Y.; Cui, H. K.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645.
(f) Tang, S.; Si, Y. Y.; Wang, Z. P.; Mei, K. R.; Chen, X.; Chen, J. Y.; Zheng, J. S.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 5713.
- [5] (a) Kçnig, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
(b) Kçnig, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034.
(c) Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126*, 1.
- [6] (a) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
(b) Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3561.
- [7] Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126*, 1.
- [8] Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H. *Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97.
- [9] (a) Itoh, M.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 2219.
(b) Collins, J. M.; Porter, K. A.; Singh, S. K. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 940.
(c) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(37), 9394.
- [10] (a) El-Faham, A.; Subirós-Funosas, R.; Prohens, R. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404.
(b) Subirós-Funosas, R.; Acosta, G. A.; El-Faham, A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6200.
(c) Sherine, N. K. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 501.
(d) Sherine, N. K. *B. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, *83*, 1374.
- [11] Silvia, V.; Esther, B.; Emilio, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3365.
- [12] Jacinto, M. P. V.; Flores, M. S.; Lin, Z. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 37609.
- [13] Cardenas-Maestre, J. M.; Sanchez-Martin, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1720.
- [14] Kanoski, S. E.; Ong, Z. Y.; Fortin, S. M. *Diabetes, Obes. Metab.* **2015**, *3*.
- [15] Merani, S.; Truong, W.; Emamullee, J. A. *Endocrinology* **2008**, *149*, 4322.
- [16] Ma, Y. C.; Dong, Y. Z.; Zhang, X. Q. *J. Chin. Med. Ind.* **2013**, *44*, 121 (in Chinese).
(马艳珍, 东圆珍, 张喜全, 中国医药工业杂志, **2013**, *44*, 121.)

(Lu, Y.)