

基于 DIC/Oxyma 的蜘蛛毒素多肽 GsMTx4 的高效合成及活性评价

马艳楠^{†,a} 刘雅妮^{†,a} 王金艳^a 陈西同^a 尹昊^a 迟巧娜^b
贾世玺^b 杜姗姗^{b,c} 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 偶联试剂介导酰胺键形成,在固相多肽合成中发挥关键作用.新型 DIC (*N,N*-二异丙基碳二亚胺)/Oxyma (2-脲基乙酸乙酯)缩合体系具有廉价、操作安全、缩合效率高和抑制消旋等优势,在手动和自动多肽合成中得到广泛应用.但是, DIC/Oxyma 缩合体系的理想反应比例和温和反应温度尚有待探索. Piezo 通道是一种多功能的机械敏感阳离子通道,与多种遗传性疾病相关,蜘蛛毒素多肽 GsMTx4 是目前唯一的特异性靶向 Piezo 通道的抑制剂.本研究探索了 DIC/Oxyma 缩合体系在温和条件下的最佳反应比例,实现了线性 GsMTx4 的高效手动固相合成.通过一次氧化折叠策略构建三对二硫键,得到活性的 GsMTx4.利用圆二色谱和膜片钳技术等评价 GsMTx4 的结构和活性.本工作建立了基于 DIC/Oxyma 缩合体系的快速、稳健和安全的合成方法,为固相多肽合成特别是手动固相多肽合成提供了重要方法参考.

关键词 DIC; Oxyma; 固相多肽合成; 二硫键; 氧化折叠; GsMTx4; 多肽毒素

DIC/Oxyma Based Efficient Synthesis and Activity Evaluation of Spider Peptide Toxin GsMTx4

Ma, Yannan^{†,a} Liu, Ya'ni^{†,a} Wang, Jinyan^a Chen, Xitong^a Yin, Hao^a
Chi, Qiaona^b Jia, Shixi^b Du, Shanshan^{b,c} 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 reagents mediate the formation of amide bonds and play a key role in solid phase peptide synthesis. The novel *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC)/ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime (Oxyma) condensation system has the advantages of low cost, operational safety, higher coupling efficiency and lower rate of racemization. The DIC/Oxyma condensation system has been widely used in manual and automated synthesis of peptides. However, the ideal reaction ratio in DIC/Oxyma condensation system at mild reaction temperature remains to be further investigated. GsMTx4 is a cysteine rich peptide toxin identified from the venom of *Grammostola spatulata* spider, which consists of 34 amino acid residues and three pairs of disulfide bonds. GsMTx4 is the only inhibitor specifically targeting piezo channel, which is a multifunctional mechanically sensitive cation channel and associated with a variety of hereditary diseases. Herein, the synthetic efficiencies of different reaction ratios of DIC and Oxyma at moderate reaction temperature were systematically evaluated. The efficiency and robustness of DIC/Oxyma condensation system were validated by the rapid manual synthesis of linear GsMTx4. The one-step oxidative folding strategy was applied for the construction of three pairs of disulfide bridges, affording the active GsMTx4. The circular dichroism and patch-clamp electrophysiology tests were conducted to evaluate the structure and activity of synthetic GsMTx4. In summary, a fast, robust and safe synthetic method based on DIC/Oxyma is established, which is particularly useful for the manual synthesis of peptides.

* Corresponding author. E-mail: qiyunkun@qdu.edu.cn

Received September 1, 2021; revised September 21, 2021; published online October 20, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21807063, 82003647, 22177058), the China Postdoctoral Science Foundation (Nos. 2019M652307, 2020T130332), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (Nos. ZR2019BH045, ZR2020QH100).

国家自然科学基金(Nos. 21807063, 82003647, 22177058)、中国博士后科学基金(Nos. 2019M652307, 2020T130332)和山东省自然科学基金(Nos. ZR2019BH045, ZR2020QH100).

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

Keywords DIC; Oxyrna; solid phase peptide synthesis; disulfide bond; oxidative folding; GsMTx4; peptide toxin

肽类分子在疾病治疗、生物成像和诊断等领域得到广泛应用, 全球已经有 70 多个多肽药物相继上市^[1]. 基于 Fmoc 的固相多肽合成(solid phase peptide synthesis, SPPS)是制备多肽类分子的常用方法^[2]. 偶联试剂介导一个氨基酸的羧酸和另一个氨基酸的氨基形成酰胺键, 在 SPPS 过程中发挥关键作用^[1a,3]. 为了减少传统偶联试剂引起的外消旋化等副反应, 化学家开发了一系列外消旋抑制剂, 如广泛使用的 1-羟基-7-氮杂苯并三氮唑(HOAt)和 1-羟基苯并三唑(HOBt)(图 1)^[1a,4]. 基于 HOBt 结构的消旋抑制剂在使用过程中存在着潜在的爆炸风险, 已被多个国家禁用^[3c,5]. 2-脲基乙酸乙酯(Oxyrna)是一种新型的外消旋抑制剂, 可以抑制碳二亚胺法(如 *N,N*-二异丙基碳二亚胺, DIC)形成肽键过程中的外消旋化(图 2)^[6]. 相比于传统的 HOBt 和 HOAt 等外消旋抑制剂, Oxyrna 具有廉价、安全、缩合效率高、兼容手动和微波固相多肽合成等优势^[7]. 基于 DIC/Oxyrna 的缩合体系已被广泛用于蛋白探针、多肽素链和利拉鲁肽等的合成^[7-8].

Piezo 通道是一个多功能的机械敏感的阳离子通道, 在痛觉、触觉、血压调节、听觉等过程中发挥重要作用^[9]. Piezo 通道的突变与多种涉及机械传导的遗传性疾病有关, 是一个非常重要的潜在药物治疗靶点^[10]. 2000 年, Frederick 等^[11]从 *Grammostola spatulata* 蜘蛛的毒液中分离出了一种毒素多肽 GsMTx4. GsMTx4 是一种富含半胱氨酸的多肽, 由 34 个氨基酸残基组成, 包含三对二硫键(图 3). 作为目前唯一特异性靶向 Piezo 通道的抑制剂, GsMTx4 是研究 Piezo 通道生理结构机制以及进行合理药物设计等的重要分子工具^[12].

GsMTx4 的自然丰度较低, 传统的蛋白质重组表达等方法难以获取足量的目标多肽, 化学方法是获取足量 GsMTx4 的有效途径. 李宜明课题组将 GsMTx4 分为两个肽片段: GsMTx4[Arg₁-Lys₁₆]-NH₂ 和 GsMTx4-[Cys₁₇-Phe₃₄]-NH₂, 综合使用微波固相合成仪和基于 DIC/Oxyrna 的缩合体系合成两个多肽片段, 通过基于酰肼的自然化学连接技术得到全长的多肽片段^[13], 通过一次氧化折叠策略得到天然的 GsMTx4^[12a]. 但是, 微波固相合成仪价格较昂贵, 自然化学连接方法操作较复杂, 89 °C 的固相多肽反应温度对仪器和实验人员等不友好.

本研究探索了 DIC/Oxyrna 缩合体系在温和条件下的最佳反应比例, 建立了 GsMTx4 的高效、稳健化学合成方法和体外复性折叠策略, 实现了 GsMTx4 的高效制备(图 4). 首先, 利用 6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲

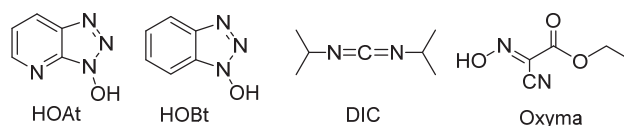


图 1 HOAt, HOBt, DIC 和 Oxyrna 的结构式
Figure 1 Structures of HOAt, HOBt, DIC and Oxyrna

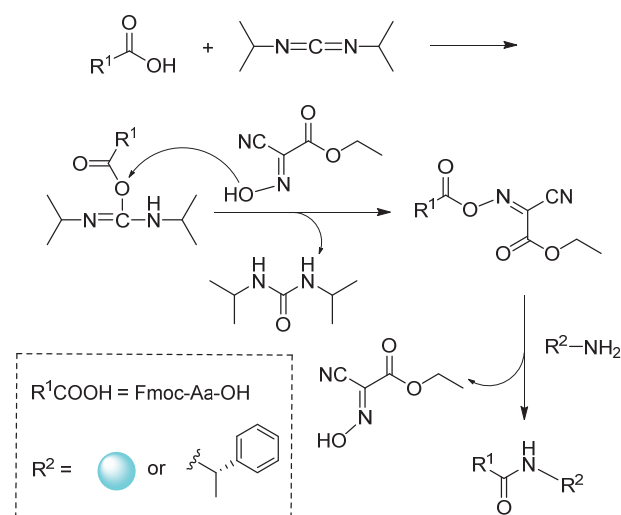


图 2 DIC/Oxyrna 缩合体系的反应机理
Figure 2 Reaction mechanism of DIC/Oxyrna condensation system

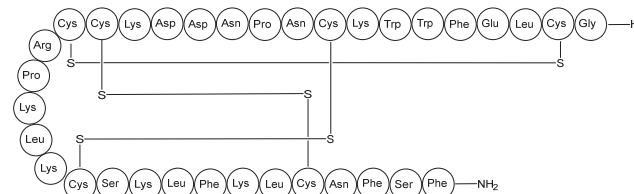


图 3 蜘蛛毒素 GsMTx4 的氨基酸序列
Figure 3 Amino acid sequence of spider toxin GsMTx4

六氟磷酸酯(HCTU)/*N,N*-二异丙基乙胺(DIEA)缩合体系, 在常温条件下合成了线性肽 GsMTx4-1. 第二, 探索 DIC/Oxyrna 缩合体系在温和条件(50 °C)的最佳反应比例, 实现线性 GsMTx4 的快速合成, 制备 3 条 GsMTx4 线性肽. 第三, 通过一次氧化折叠策略对 4 条线性 GsMTx4 进行体外复性折叠. 第四, 利用圆二色谱(CD)以及膜片钳技术等评价复性后 GsMTx4 的结构和活性.

1 结果与讨论

1.1 线性多肽的合成和分离纯化

前人使用 DIC/Oxyrna 缩合体系的反应温度高于 70 °C, 对反应仪器的要求较高, 较高的反应温度也可

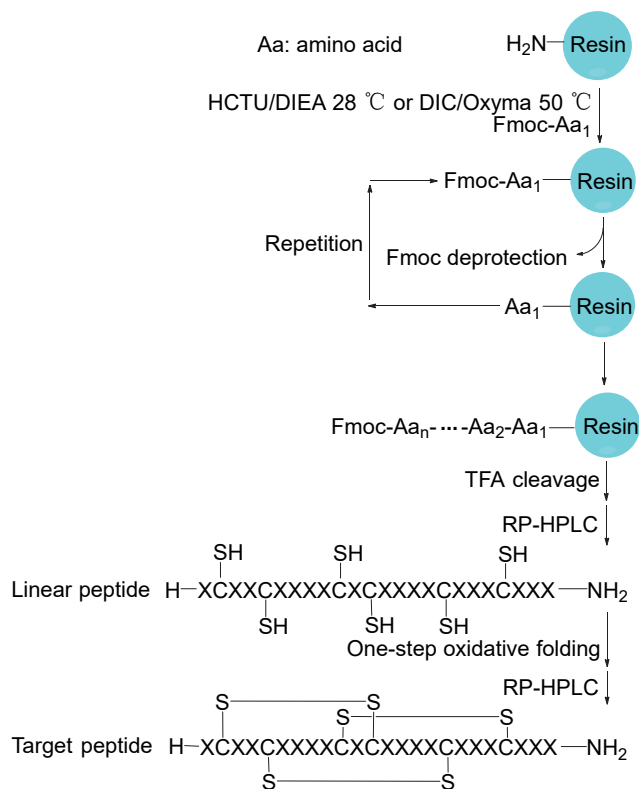


图4 GsMTx4的固相合成及复性折叠

Figure 4 Solid phase peptide synthesis and oxidative folding of GsMTx4

能导致烫伤操作者^[7-8,14]。胡宏岗课题组^[8a]在 50 °C 下,联合使用 DIC/Oxyma 缩合体系和微波固相合成仪,实现了泛素多肽片段的快速合成。然而,微波合成仪(如 CEM Liberty Blue)高昂的价格限制了该方法的广泛使用。此外, DIC/Oxyma 反应体系通常使用等物质的量的 DIC 和 Oxyma。综上,探索 DIC/Oxyma 体系在温和条件下(例如: 50 °C)的最佳反应比例,将极大促进 DIC/Oxyma 在固相多肽合成特别是手动固相多肽合成中的应用。本研究合成了 4 条 GsMTx4 线性肽: (1)使用传统的 HCTU/DIEA 缩合体系,在 28 °C 条件下手动合成 GsMTx4-1; (2)使用 DIC/Oxyma 缩合体系,在 50 °C 条件下手动合成 GsMTx4-2、GsMTx4-3 和 GsMTx4-4 (表 1)。

表1 线性 GsMTx4 的合成策略、高效液相色谱纯度及产量

Table 1 Synthetic strategy, HPLC (high performance liquid chromatography) purity and isolated yield of linear GsMTx4

Linear peptide	Reaction molar ratio	Reaction temperature/°C	HPLC purity/%	Isolated yield/%	Yield/mg
GsMTx4-1	$n(\text{Aa}) : n(\text{HCTU}) : n(\text{DIEA}) = 4 : 3.8 : 8$	28	51	18	37
GsMTx4-2	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 8 : 4$	50	46	16	33
GsMTx4-3	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 12 : 4$	50	41	14	29
GsMTx4-4	$n(\text{Aa}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 4 : 8$	50	37	12	25

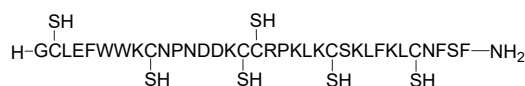
1.1.1 常温法合成 GsMTx4-1

在 28 °C 条件下,使用 Rink Amide AM 树脂(1 equiv.),利用 HCTU/DIEA 缩合体系^[15],手动合成蜘蛛毒素 GsMTx4-1。反应比例为 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{HCTU}) : n(\text{DIEA}) = 4 : 3.8 : 8$,单次缩合反应 60 min。对于一些较难连接的疏水性氨基酸、空间位阻较大的氨基酸,使用两次缩合方法,第一次反应 40 min,第二次反应 60 min。通过分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 确认多肽的纯度和分子量的正确性。使用 HCTU/DIEA 缩合体系得到 6 个 Cys 侧链巯基均裸露的线性肽 GsMTx4-1,色谱纯度为 51%,分离收率为 18%(图 5A)。

1.1.2 高温法合成 GsMTx4-2, GsMTx4-3 和 GsMTx4-4

在 50 °C 条件下,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 GsMTx4。第一次缩合反应 10 min,第二次根据氨基酸连接的难易程度反应 15~30 min。使用 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 8 : 4$,制备得到线性肽 GsMTx4-2(色谱纯度为 46%,分离收率为 16%)。使用 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 12 : 4$,制备得到线性肽 GsMTx4-3(色谱纯度为 41%,分离收率为 14%)。使用 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 4 : 8$,得到线性肽 GsMTx4-4(色谱纯度为 37%,分离收率为 12%)。

与常规 HCTU/DIEA 缩合体系相比, $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 8 : 4$ 的反应速率提高了一倍以上,一个线性肽合成周期所需时间约为 HCTU/DIEA 缩合体系的 40%。基于 DIC/Oxyma 缩合体系得到线性 GsMTx4 的色谱纯度和分离收率,与 HCTU/DIEA 缩合体系没有明显差别(表 1 和图 5)。增大 DIC 或 Oxyma 的反应比例,反应效率、色谱纯度和分离收率等没有明显提高。此外,增加 DIC 或 Oxyma 的反应比例,没有监测到明显的消旋产物,说明 DIC/Oxyma 缩合体系的稳健性。综合考虑制备成本、合成效率和分离收率



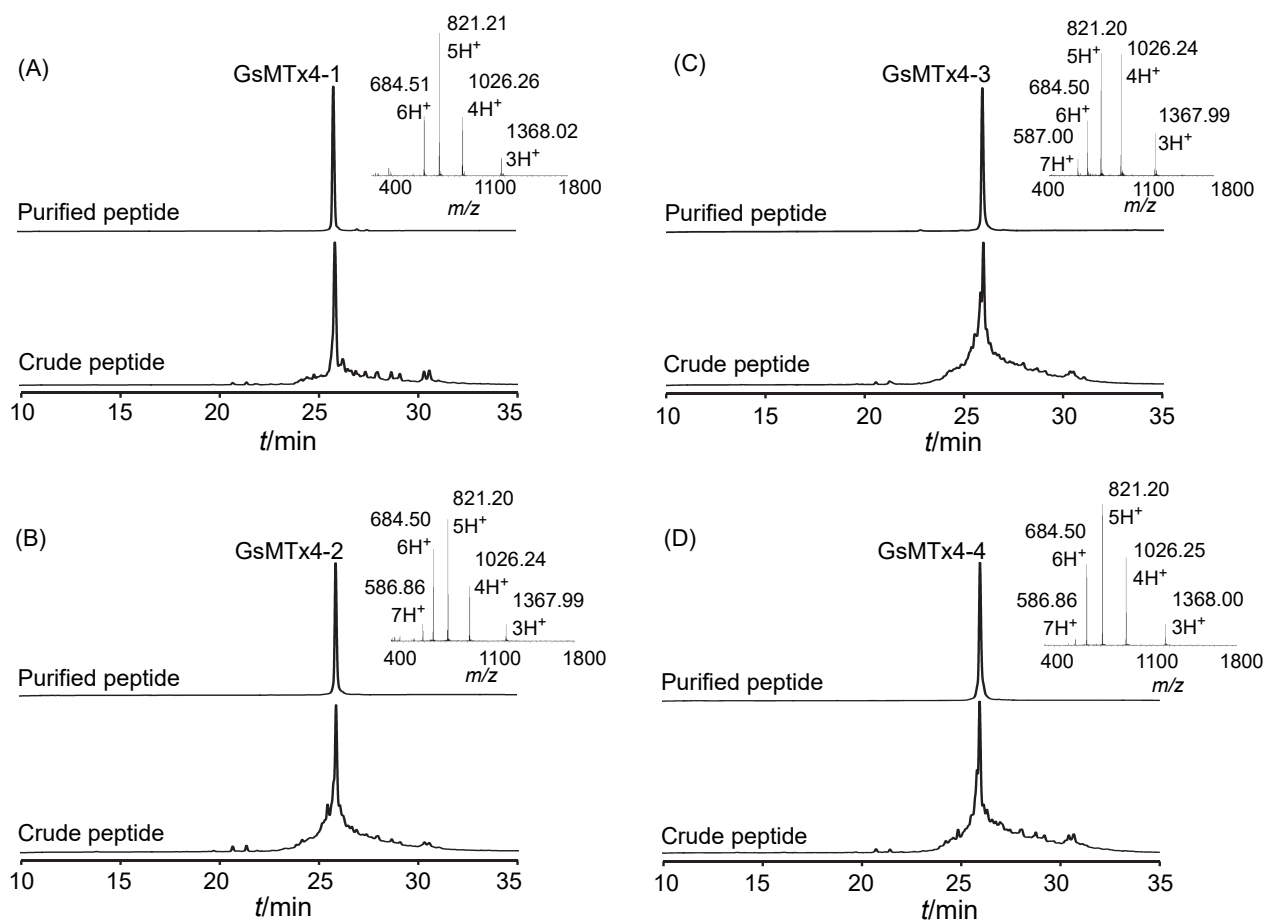


图5 (A) GsMTx4-1, (B) GsMTx4-2, (C) GsMTx4-3 和(D) GsMTx4-4 的分析型 RP-HPLC 色谱图和 ESI-MS 质谱图

Figure 5 Analytical RP-HPLC and ESI-MS spectra of crude peptides and purified peptides of (A) GsMTx4-1, (B) GsMTx4-2, (C) GsMTx4-3 and (D) GsMTx4-4

RP-HPLC conditions: a linear gradient of 5%~60% buffer B [0.08%~0.1% TFA (trifluoroacetic acid) in CH₃CN] in buffer A (0.1% TFA in water) over 30 min (5% for 2 min, then 5%~60% for 30 min) on a Vydac C18 column, λ =214 nm

等, $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 8 : 4$ 条件为 50 °C 下手动多肽合成的理想反应比例, 已成为齐昀坤课题组合成多肽使用最广泛的方法, 实现了蜈蚣毒素多肽 RhTx 和蝎子毒素多肽 WaTx 等的全合成. 与前人使用的 DIC/Oxyma 缩合体系相比^[7-8], 本文发展的方法仅需使用常规的气浴恒温摇床, 不依赖微波固相合成仪等专门的多肽合成仪器, 且反应条件更加温和.

1.2 GsMTx4 的氧化折叠

线性肽 GsMTx4-1、GsMTx4-2、GsMTx4-3 和 GsMTx4-4 均通过一次氧化折叠策略进行复性折叠^[12a], 得到目标多肽 GsMTx4(图 6). GsMTx4-1 复性折叠的色谱纯度为 51%, 分离收率为 28%. GsMTx4-2 复性折叠的色谱纯度为 45%, 分离收率为 24%. GsMTx4-3 复性折叠的色谱纯度为 46%, 分离收率为 25%. GsMTx4-4 复性折叠的色谱纯度为 45%, 分离收率为 25%. 四条线性 GsMTx4 复性的色谱纯度(45%~51%)和分离收率(24%~28%)没有显著差异(表 2).

1.3 GsMTx4 的质谱和圆二色谱分析

RP-HPLC 和 ESI-MS 监测表明, 复性操作得到 GsMTx4 (GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7 和 GsMTx4-8)的色谱纯度均达到 95%以上, 一次复性折叠可以得到 7 mg 以上的目标蛋白. GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 和 GsMTx4 标准品(缩写为 GsMTx4-9)共进样, RP-HPLC 只有一个吸收峰, 色谱纯度高于 93%(图 7A). 高分辨 ESI-MS 确认复性折叠后 GsMTx4 的分子量正确(图 7A). 圆二色谱表明, 线性 GsMTx4-1 的 CD 谱图与复性纯化后 GsMTx4 的 CD 谱图有明显差别, 说明二硫键对于 GsMTx4 的结构是必不可少的(图 7B). 通过不同合成方法得到的 GsMTx4-5、GsMTx4-6、GsMTx4-7 和 GsMTx4-8 的 CD 谱图与 GsMTx4-9 的 CD 谱图基本一致. 此外, 本工作制备 GsMTx4 的 CD 谱图与前人制备 GsMTx4 的 CD 谱图趋势一致^[12a]. RP-HPLC 和圆二色谱等数据表明, 通过一

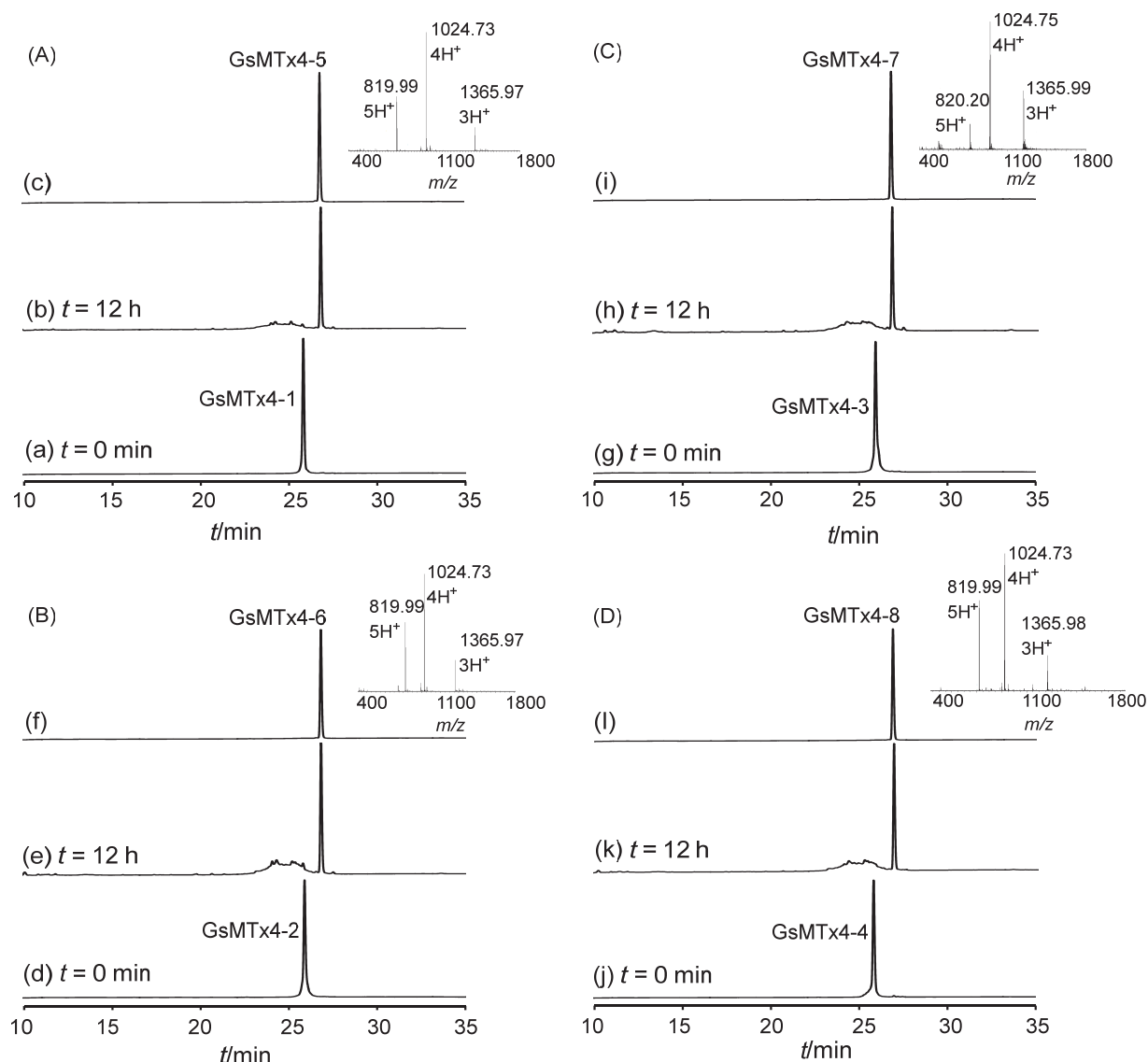


图 6 (A) GsMTx4-1、(B) GsMTx4-2、(C) GsMTx4-3 和(D) GsMTx4-4 的一次氧化折叠 RP-HPLC 色谱图和 ESI-MS 质谱图
Figure 6 Analytical RP-HPLC and ESI-MS spectra of one-step oxidative folding process of peptides of (A) GsMTx4-1, (B) GsMTx4-2, (C) GsMTx4-3, and (D) GsMTx4-4

(A) (a)~(b) The RP-HPLC spectra of the folding solution for GsMTx4-1 at 0 min and 12 h, (c) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified GsMTx4-5. (B) (d)~(e) The RP-HPLC spectra of the folding solution for GsMTx4-2 at 0 min and 12 h, (f) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified GsMTx4-6. (C) (g)~(h) The RP-HPLC spectra of the folding solution for GsMTx4-3 at 0 min and 12 h, (i) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified GsMTx4-7. (D) (j)~(k) The RP-HPLC spectra of the folding solution for GsMTx4-4 at 0 min and 12 h, (l) The RP-HPLC and ESI-MS spectra of purified GsMTx4-8. RP-HPLC conditions: a linear gradient of 5%~60% buffer B in buffer A over 30 min (5% for 2 min, then 5%~60% for 30 min) on a Vydac C18 column, $\lambda=214$ nm

表 2 GsMTx4 一次氧化折叠的色谱纯度、分离收率及 ESI-MS 数据
Table 2 HPLC purity, isolated yield and ESI-MS data of one-step oxidative folding strategy for GsMTx4

Linear peptide	Folding product	HPLC purity/%	Isolated yield/%	Yield/mg	Calculated mass	Observed mass
GsMTx4-1	GsMTx4-5	51	28	8.4	4095.90	4094.93
GsMTx4-2	GsMTx4-6	45	24	7.2	4095.90	4094.93
GsMTx4-3	GsMTx4-7	46	25	7.5	4095.90	4095.32
GsMTx4-4	GsMTx4-8	45	25	7.5	4095.90	4094.94

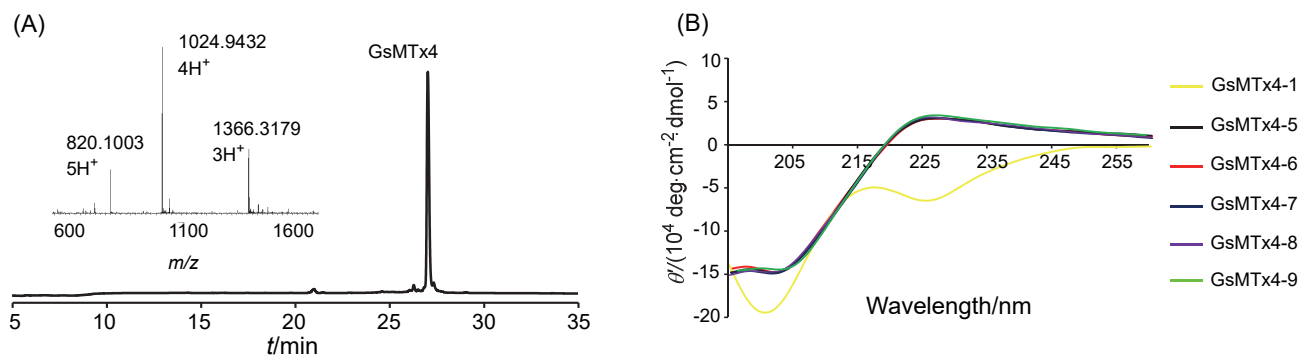


图7 (A) GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 和 GsMTx4-9 共进样的分析型 RP-HPLC 色谱图和高分辨 ESI-MS 质谱图、(B) GsMTx4-1, GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 和 GsMTx4-9 的圆二色谱图

Figure 7 (A) Analytical RP-HPLC and high resolution ESI-MS spectra of GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 and GsMTx4-9 co-injections, and (B) circular dichroism spectra of GsMTx4-1, GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 and GsMTx4-9

The high resolution ESI-MS spectrum gave an observed mass of 4095.7427 (calculated 4095.9020, average isotopes). RP-HPLC conditions: a linear gradient of 5%~60% buffer B in buffer A over 30 min (5% for 2 min, then 5%~60% for 30 min) on a Vydac C18 column, $\lambda=214$ nm

次氧化折叠可以正确构建三对二硫键, 本工作制备的 GsMTx4 具有正确的二级结构。

1.4 GsMTx4 的活性测定

为了评价不同方法合成 GsMTx4 对 Piezo1 通道的抑制作用, 采用全细胞膜片钳技术对 GsMTx4-1, GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 和 GsMTx4-9 进行活性测定。线性肽 GsMTx4-1 作为阴性对照, 商业化的 GsMTx4-9 作为阳性对照。结果表明, 线性肽 GsMTx4-1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 Piezo1 通道电流无明显抑制作用, 说明二硫键对于维持 GsMTx4 的活性是必须的。GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7 和 GsMTx4-8 均能抑制约 60% 的 Piezo1 通道电流, 抑制率无统计学差异 (图 8)。此外, 本工作合成的 GsMTx4 和 GsMTx4-9 对 Piezo1 通道的抑制活性没有统计学差异。综上, 膜片钳活性测试说明, 通过不同方法合成的 GsMTx4 均能抑制 Piezo1 通道, 且活性没有统计学差异。

2 结论

以蜘蛛毒素多肽 GsMTx4 为模型, 探索了 DIC/Oxyrna 缩合体系在温和条件下的最佳反应比例。与常规 HCTU/DIEA 缩合体系相比, $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyrna}) = 4 : 8 : 4$ 的反应速率提高一倍以上, 一个线性肽合成周期所需时间约为 HCTU/DIEA 缩合体系的 40%。此外, 使用过量的 DIC 或 Oxyrna, 没有监测到明显的消旋等副反应, 说明 DIC/Oxyrna 缩合体系的稳健性。综合考虑制备成本、合成效率和分离收率等, $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyrna}) = 4 : 8 : 4$ 条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 下手动多肽合成的理想反应比例。

RP-HPLC, ESI-MS 和 CD 以及膜片钳等实验表明,

本文制备的 GsMTx4 与商业化的 GsMTx4-9 在二级结构和活性上没有显著差异。二硫键的断裂会导致 GsMTx4 结构的改变以及活性显著降低, 说明二硫键对于维持 GsMTx4 的结构和活性等发挥至关重要的作用。综上, 本文建立了基于 DIC/Oxyrna 缩合体系的快速、稳健、安全合成方法, 证明 DIC/Oxyrna 缩合体系作为一种高效的缩合系统, 能够较为成功地应用于长肽的固相合成中, 为固相多肽合成特别是手动固相多肽合成提供了重要方法参考。此外, 本文建立了 GsMTx4 的快速合成及复性折叠方法, 为研究 Piezo 等机械敏感通道提供关键分子工具。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 分析型和半制备型反相高效液相色谱; Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL 组合式高分辨液质联用仪; 佳司科(上海)贸易有限公司 J-815 圆二色谱仪; 培英 THZ-B 型气浴恒温振荡器; 青岛永合创信冷冻干燥机; 巩义市予华仪器有限责任公司 SHZ-D 循环水式真空泵; 昆山市超声仪器有限公司 KQ5200 DA 型数控超声波清洗器; 北京京立 LD5-2A 型低速离心机; 美国 Thermo 公司细胞培养箱; 德国 HEKA 公司 EPC-10 膜片钳放大器和数据采集软件 Patch Master; 美国 Sutter 公司 P-97 水平拉制仪; 德国 Physik 公司压电伺服控制器; 美国 ALA 公司重力给药系统。

Rink Amide AM 树脂购于天津南开合成科技有限公司; Fmoc 保护的氨基酸、6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)购于吉尔生化(上海)有限公司; DIC 购于毕得医药; Oxyrna、苯酚、三氟乙酸(TFA)、还

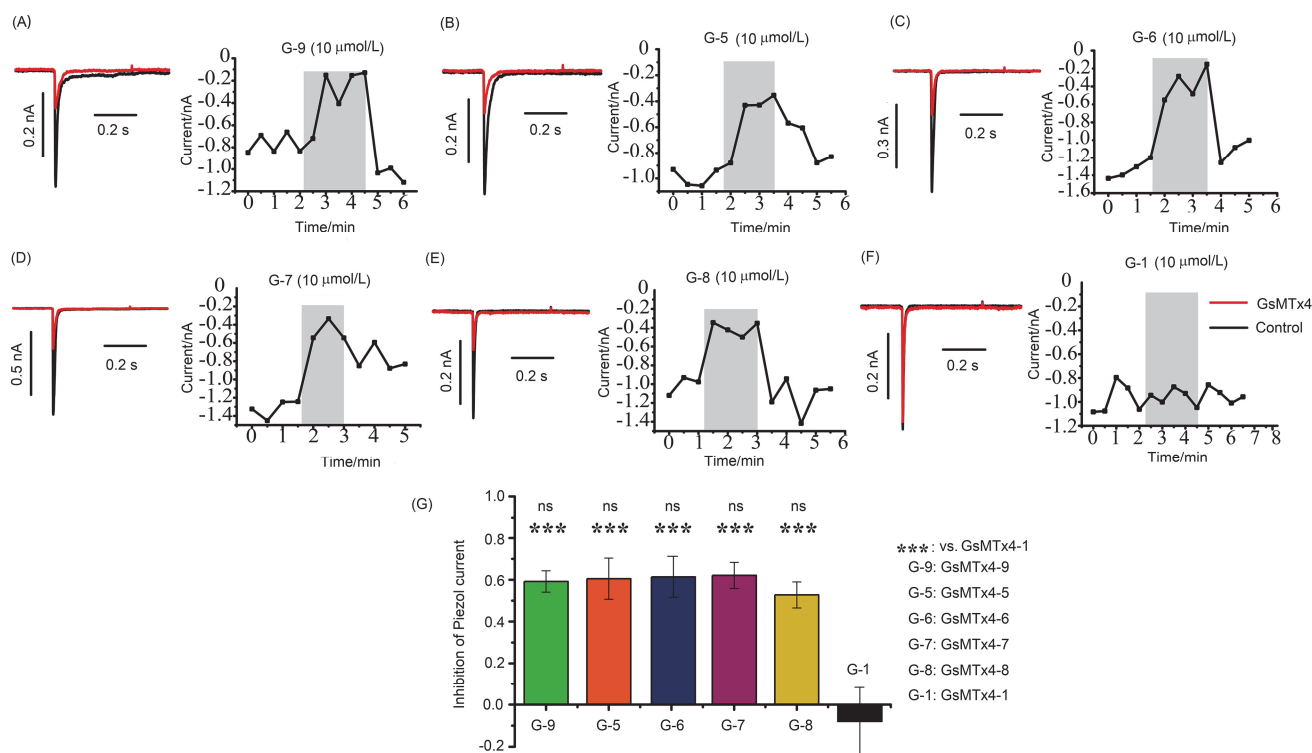


图8 多肽 GsMTx4-5、GsMTx4-6、GsMTx4-7、GsMTx4-8、GsMTx4-9 和 GsMTx4-1 对 Piezo1 通道的抑制作用

Figure 8 Inhibitory effect of peptides GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8, GsMTx4-9 and GsMTx4-1 on Piezo1 channel (A)~(F) The typical current traces (Left) and time courses (Right) of Piezo1 currents inhibited by GsMTx4-9, GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 and GsMTx4-1. (G) The normalized inhibition rate of Piezo1 currents by GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8, GsMTx4-9 and GsMTx4-1. $n=4\sim6$, each data point is represented as mean $\pm$ SEM, *** $p<0.001$ (compared with the GsMTx4-1 group), ns: no significance

原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、Tris、1,2-乙二硫醇、苯甲硫醚、茚三酮购于上海泰坦科技有限公司; N,N -二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、乙醇购于国药集团化学试剂有限公司; HPLC 色谱级乙腈购于美国 J.T. Baker 公司; HPLC 色谱级三氟乙酸购于阿拉丁; PBS、青霉素、四环素、胰蛋白酶等购于美国 Sigma 公司。

3.2 固相多肽合成

3.2.1 基于 HCTU/DIEA 体系的线性 GsMTx4 的合成及分离纯化

基于 HCTU/DIEA 体系的反应温度为 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 树脂活化、固相缩合以及 Fmoc 脱保护、切肽等过程均在气浴振荡器($28\text{ }^{\circ}\text{C}$)中进行. 称取 170 mg 的 Rink Amide AM 树脂(取代度: 0.32 mmol/g, 0.05 mmol, 1 equiv.), 使用 DMF 和 DCM 交替清洗, 然后用 8 mL 的 DMF/DCM 混合溶液($V:V=1:1$)在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浸泡树脂 3 h. 脱除 Fmoc 的反应时间为第一次反应 5 min, 第二次反应 10 min. 固相缩合的反应比例为 $n(\text{Fmoc-氨基酸}):n(\text{HCTU}):n(\text{DIEA})=4:3.8:8$, 单次缩合反应时间为 60 min. 对于一些较难连接的疏水性氨基酸、空间位阻较大的氨基酸, 如 Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH、最后 15 个氨基酸等, 使用两次

缩合方法, 第一次反应 40 min、第二次反应 60 min. GsMTx4 分子中含有三对二硫键, 在合成的过程中 Cys 的偶联均使用 Fmoc-Cys(Trt)-OH.

完成所有氨基酸的缩合以后, 进行切肽操作. 使用的切肽试剂为 $V(\text{三氟乙酸}):V(\text{苯酚}):V(\text{水}):V(\text{苯甲硫醚}):V(\text{乙二硫醇})=82.5:5:5:5:2.5$, 反应时间为 2.5 h. 收集切肽溶液, 使用高纯氮鼓泡浓缩. 然后用提前预冷的无水乙醚沉淀多肽, 通过离心机离心得到粗肽沉淀, 再用预冷的无水乙醚反复清洗粗肽两次. 得到的粗肽固体用乙腈/水混合溶剂(含有 0.1% TFA)溶解, 通过半制备型 RP-HPLC 分离纯化, 得到纯的线性肽 GsMTx4-1. 通过分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 检测 GsMTx4-1 的纯度和分子量. GsMTx4-1 的理论分子量为 4101.95, 计算分子量为 4101.05. 固体多肽放置在一 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内密封冻存, 备用.

3.2.2 基于 DIC/Oxyma 体系的线性 GsMTx4 的合成及分离纯化

基于 DIC/Oxyma 体系的反应温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 树脂活化、固相缩合以及 Fmoc 脱保护等过程均在气浴振荡器($50\text{ }^{\circ}\text{C}$)中进行. 称取 170 mg 的 Rink Amide AM 树脂(取代度: 0.32 mmol/g, 0.05 mmol, 1 equiv.), 树脂活化过程

与 HCTU/DIEA 体系相同. 固相缩合的反应比例为 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 8 : 4$, $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 12 : 4$ 或 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 4 : 8$. 采用两次缩合方法: 第一次缩合反应 10 min, 第二次根据氨基酸连接的难易程度反应 15~30 min. 脱除 Fmoc 的反应时间为第一次反应 3 min, 第二次反应 6 min. 在合成过程中, Fmoc-Arg(Pbf)-OH 不能在高温的条件下进行缩合, 使用 $n(\text{Fmoc-Arg(Pbf)-OH}) : n(\text{HCTU}) : n(\text{DIEA}) = 4 : 3.7 : 8$ 的缩合体系, 在 28 °C 恒温振荡的条件下缩合反应两次, 第一次反应 40 min、第二次反应 60 min.

完成所有氨基酸的缩合以后, 按照 HCTU/DIEA 体系相同的操作, 进行切肽和分离纯化等操作. 通过分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 检测线性肽的纯度和分子量. 使用 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 8 : 4$ 条件, 制备得到线性肽 GsMTx4-2(色谱纯度为 46%, 分离收率为 16%). GsMTx4-2 的理论分子量为 4101.95, 测定分子量为 4100.99. 使用 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 12 : 4$, 制备得到线性肽 GsMTx4-3(色谱纯度为 41%, 分离收率为 14%). GsMTx4-3 的理论分子量为 4101.95, 测定分子量为 4101.19. 使用 $n(\text{Fmoc-氨基酸}) : n(\text{DIC}) : n(\text{Oxyma}) = 4 : 4 : 8$, 制备得到线性肽 GsMTx4-4(色谱纯度为 37%, 分离收率为 12%). GsMTx4-3 的理论分子量为 4101.95, 测定分子量为 4101.00.

3.3 GsMTx4 的氧化折叠

采用一次氧化折叠策略对线性肽 GsMTx4-1, GsMTx4-2, GsMTx4-3 和 GsMTx4-4 进行复性折叠. 称取线性肽 GsMTx4-1 (30 mg, 7.3 μmol) 进行一步氧化折叠. 复性体系为 0.1 mol/L Tris 缓冲溶液(pH=7.8)、GsMTx4-1 (10 $\mu\text{mol/L}$)、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 恒温振荡条件下进行复性折叠, 使用分析型 RP-HPLC 和 ESI-MS 对复性过程进行监测, 12 h 内复性折叠完成. 复性完成后, 在搅拌下逐滴加入 TFA, 调节 pH 至大约 3, 冷冻干燥, 得到粗肽固体. 使用水(含有 0.1% TFA)溶解粗肽固体, 使用半制备型 RP-HPLC 进行分离纯化, 冷冻干燥得到纯的 GsMTx4. 通过一次氧化折叠, 得到 GsMTx4-5 (8.4 mg, 2.1 μmol). 采用同样的方法, GsMTx4-2 通过氧化折叠得到 GsMTx4-6 (7.2 mg, 1.8 μmol), GsMTx4-3 通过氧化折叠得到 GsMTx4-7 (7.5 mg, 1.8 μmol), GsMTx4-4 通过氧化折叠得到 GsMTx4-8 (7.5 mg, 1.8 μmol). 在复性过程中, 我们发现通过上述 pH 调节-冷冻干燥-色谱分离纯化操作得到 GsMTx4 的分离收率要高于直接进行色谱分离纯化得到 GsMTx4

的分离收率.

3.4 圆二色谱测试

圆二色谱使用的仪器是 J-815 CD 光谱仪. 多肽(GsMTx4-1, GsMTx4-5, GsMTx4-6, GsMTx4-7, GsMTx4-8 和 GsMTx4-9)分别溶解于 dd H₂O 中, 肽的浓度为 0.5 mg/mL. 使用 1 mm 路径长度的石英比色皿, 扫描带宽为 1 nm, 扫描速度为 100 nm/min, 扫描波长为 260~195 nm, 每条肽的 CD 光谱测量三次并取平均值.

3.5 活性测试

细胞培养. HEK293 细胞于 37 °C, 5% CO₂ 浓度的培养箱(Thermo, USA)中培养. 培养基为 DMEM (dulbecco's modified eagle medium)+10% FBS (fatal bovine serum). 待细胞密度达到 90% 融合度时, 0.05% 胰酶(Sigma, USA)消化, 细胞悬液接种于 8 mm 玻片(Warnner, USA)上, 培养过夜后使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)瞬时转染人源 Piezo1 质粒, 转染 24 h 后用于膜片钳实验.

Mechano-clamp 电生理实验. 膜片钳放大器采用 EPC-10 (HEKA, Germany), 数据采集软件使用 PatchMaster (HEKA, Germany). 记录电极采用水平拉制仪(P-97, Sutter instrument, USA)多步程序拉制而成, 充灌内液后电阻 2~4 M Ω . 细胞外液(mmol/L): 137 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L Glucose, NaOH 调节 pH 至 7.3. 电极内液: 65 mmol/L CsCl, 75 mmol/L CsF, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EGTA, CsOH 调节 pH 至 7.3. 膜片钳记录使用全细胞吸破的记录方式, 细胞钳制于 -60 mV, 机械针刺激诱发电流.

机械刺激针的制备. 记录电极拉制完成后进行高温抛光封口操作, 使其尖端圆钝且光滑, 直径约为 3~4 μm . 机械刺激针安装于压电伺服控制器(Physik Instrument, Germany)终端, 并与水平面呈 70°角. 压电伺服控制器可将电压命令转化为机械移动(3 $\mu\text{m/mV}$), 刺激细胞产生形变, 通过记录电极记录机械敏感性电流. 显示器实时观测机械刺激针相对细胞的位移情况. 实验时先将机械刺激针放置在距离细胞约 1~2 μm 的位置, 当探针尖端位移 2~3 μm 时, 可观察到细胞产生形变, 位移 4~5 μm 时可记录到电流, 选择 6 μm 时位移作为最终刺激位移. 探针位移程序如下: 机械刺激探针从 0 μm 以爬坡的形式向下移动至 6 μm 后再以爬坡的形式向上移动恢复至 0 μm , 爬坡速度为 0.5 $\mu\text{m/ms}$, 刺激持续时间为 600 ms, 每次刺激间隔为 30 s. 电流稳定后通过重力给药系统(ALA Instrument, USA)给予药物, 观察药物对机械敏感电流的作用.

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) Luan, X.; Wu, Y.; Shen, Y. W.; Zhang, H.; Zhou, Y. D.; Chen, H. Z.; Nagle, D. G.; Zhang, W. D. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38*, 7.
(c) Zhai, C.; Schreiber, C. L.; Padilla-Coley, S.; Oliver, A. G.; Smith, B. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 23740.
(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) 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.
(f) Vinogradov, A. A.; Yin, Y.; Suga, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4167.
(g) Uppalapati, M.; Lee, D. J.; Mandal, K.; Li, H.; Miranda, L. P.; Lowitz, J.; Kenney, J.; Adams, J. J.; Ault-Riche, D.; Kent, S. B.; Sidhu, S. S. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1058.
(h) Silva, O. N.; Torres, M. D. T.; Cao, J.; Alves, E. S. F.; Rodrigues, L. V.; Resende, J. M.; Liao, L. M.; Porto, W. F.; Fensterseifer, I. C. M.; Lu, T. K.; Franco, O. L.; de la Fuente-Nunez, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 26936.
- [2] (a) Zheng, J. S.; Tang, S.; Qi, Y. K.; Wang, Z. P.; Liu, L. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2483.
(b) Sgorbati, C.; Lo Presti, E.; Bergamaschi, G.; Sani, M.; Volonterio, A. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 9225.
(c) Kim, H. S.; Lee, Y.; Shin, M. H.; Lim, H. S. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 6800.
(d) Suzuki, R.; Konno, H. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 3309.
(e) Kent, S. B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338.
(f) Akondi, K. B.; Muttenthaler, M.; Dutertre, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5815.
(g) Cui, H. K.; Guo, Y.; He, Y.; Wang, F. L.; Chang, H. N.; Wang, Y. J.; Wu, F. M.; Tian, C. L.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 9558.
- [3] (a) Muramatsu, W.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6792.
(b) Muramatsu, W.; Hattori, T.; Yamamoto, H. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 6346.
(c) Albericio, F.; El-Faham, A. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 760.
- [4] (a) Wang, Z.; Wang, X.; Wang, P.; Zhao, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10374.
(b) Hu, L.; Xu, S.; Zhao, Z.; Yang, Y.; Peng, Z.; Yang, M.; Wang, C.; Zhao, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13135.
- [5] 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.
- [6] Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394.
- [7] 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.)
- [8] (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.; Bierter, D.; Tian, C. L.; Zheng, J. S.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 6037.
(c) Guan, C. J.; Wang, T.; Wang, J.; Li, Y. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 2763 (in Chinese).
(管超建, 王涛, 王君, 李宜明, 有机化学, **2016**, *36*, 2763.)
(d) Huang, Y. C.; Guan, C. J.; Tan, X. L.; Chen, C. C.; Guo, Q. X.; Li, Y. M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1500.
(e) 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.
(f) Zuo, C.; Shi, W.-W.; Chen, X.-X.; Glatz, M.; Riedl, B.; Flamme, I.; Pook, E.; Wang, J.; Fang, G.-M.; Bierter, D.; Liu, L. *Sci. China Chem.* **2019**, *62*, 1371.
- [9] (a) Coste, B.; Mathur, J.; Schmidt, M.; Earley, T. J.; Ranade, S.; Petrus, M. J.; Dubin, A. E.; Patapoutian, A. *Science* **2010**, *330*, 55.
(b) Coste, B.; Xiao, B.; Santos, J. S.; Syeda, R.; Grandl, J.; Spencer, K. S.; Kim, S. E.; Schmidt, M.; Mathur, J.; Dubin, A. E.; Montal, M.; Patapoutian, A. *Nature* **2012**, *483*, 176.
- [10] (a) Bae, C.; Gnanasambandam, R.; Nicolai, C.; Sachs, F.; Gottlieb, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, E1162.
(b) Albuissou, J.; Murthy, S. E.; Bandell, M.; Coste, B.; Louis-Dit-Picard, H.; Mathur, J.; Feneant-Thibault, M.; Tertian, G.; de Jaureguiberry, J. P.; Syfuss, P. Y.; Cahalan, S.; Garcon, L.; Toutain, F.; Simon Rohrlisch, P.; Delaunay, J.; Picard, V.; Jeunemaitre, X.; Patapoutian, A. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1884.
- [11] (a) Suchyna, T. M.; Johnson, J. H.; Hamer, K.; Leykam, J. F.; Gage, D. A.; Clemon, H. F.; Baumgarten, C. M.; Sachs, F. *J. Gen. Physiol.* **2000**, *115*, 583.
(b) Ostrow, K. L.; Mammoser, A.; Suchyna, T.; Sachs, F.; Oswald, R.; Kubo, S.; Chino, N.; Gottlieb, P. A. *Toxicon* **2003**, *42*, 263.
- [12] (a) Qu, Q.; Gao, S.; Li, Y. M. *J. Pept. Sci.* **2018**, *24*, e3112.
(b) Zhu, W.; Hou, F.; Fang, J.; Bahrani Fard, M. R.; Liu, Y.; Ren, S.; Wu, S.; Qi, Y.; Sui, S.; Read, A. T.; Sherwood, J. M.; Zou, W.; Yu, H.; Zhang, J.; Overby, D. R.; Wang, N.; Ethier, C. R.; Wang, K. *iScience* **2021**, *24*, 102042.
- [13] (a) Fang, G. M.; Wang, J. X.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10347.
(b) 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.
(c) Huang, Y. C.; Li, Y. M.; Chen, Y.; Pan, M.; Li, Y. T.; Yu, L.; Guo, Q. X.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 4858.
- [14] (a) 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.
(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.* **2021**, e3368.
- [15] (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, 齐均坤, 王克威, 有机化学, **2021**, *41*, 2800.)
(b) Tang, S.; Zuo, C.; Huang, D. L.; Cai, X. Y.; Zhang, L. H.; Tian, C. L.; Zheng, J. S.; Liu, L. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 2554.
(c) 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. *Cell Res.* **2018**, *28*, 257.

(Lu, Y.)