

## 固相合成法制备环肽 Hymenistatin-1 及其含 statine 的类似物

李从岩<sup>1</sup> 徐琪<sup>2</sup> 颜炜群<sup>1\*</sup>

(1 吉林大学再生医学科学研究所, 长春 130021;

2 杭州中肽生化有限公司, 杭州 310018)

**摘要:** 目的 研究固相合成法制备 Hymenistatin-1 [HS-1, 序列为 cyclo-(-Pro-Pro-Tyr-Val-Pro-Leu-Ile-Ile-)] 及其 statine 类似物的工艺步骤和影响因素。方法 采用 Fmoc 或 Boc 保护  $\alpha$ -氨基, 以 HBTU/NMM 为缩合剂进行直链肽接肽反应, 以 BOP/HOBt/DIEA 为缩合剂进行环化固相合成 HS-1 及其类似物。用色谱仪和质谱仪对合成的环肽及其杂聚肽类似物进行纯化鉴定。结果 多肽合成收率可达 65%, 经反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 柱对合成的多肽进行纯化后纯度均达到 90% 以上, 通过基质辅助激光解吸电离飞行质谱仪 (MALDI-MS) 检测所合成的环肽及环肽类似物的分子质量与理论分子质量相符。结论 成功合成了较高纯度的目标多肽化合物。

**关键词:** 固相多肽合成; HS-1; Statine 类似物; 纯化

中图分类号: R978.1+6 文献标识码: A

## Preparation of cyclopeptide Hymenistatin-1 and its four statine analogues by solid-phase peptide synthesis method

Li Cong-yan<sup>1</sup>, Xu Qi<sup>2</sup> and Yan Wei-qun<sup>1</sup>

(1 Institute of Frontier Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021;

2 Chinese Peptide Co., Ltd, Hangzhou 310018)

**ABSTRACT Objective** Preparation of Hymenistatin-1 [HS-1, cyclo-(-Pro-Pro-Tyr-Val-Pro-Leu-Ile-Ile-)] and its four statine-analogues by solid-phase peptide synthesis method, and the synthesis process and influencing factors were investigated. **Methods** Using the Fmoc- or Boc- protected  $\alpha$ -amino acids, HBTU/NMM as coupling reagent (linear peptide synthesis) and BOP/HOBt/DIEA as cyclizing reagent, the cyclo-octapeptide HS-1 and its analogues were synthesized. The target peptides were purified by RP-HPLC and identified by MALDI-MS. **Results** The purity of the five peptides exceeded 90% and the yields up to 65%. The molecular weights of the synthesized peptides were identified by mass spectrogram. **Conclusion** The target peptide compounds with higher purity were synthesized.

**KEY WORDS** Solid-phase Peptide Synthesis; HS-1; Statine-analogues; Purification

Hymenistatin-1 (HS-1) 是由 Pettit 等<sup>[1]</sup> 从太平洋 *Hymeniacidon* 海绵中分离得到的一种环八肽。肽链序列为: cyclo-(-Pro-Pro-Tyr-Val-Pro-Leu-Ile-Ile-)。有报道称 HS-1 在小鼠成淋巴细胞白血病 P388 的研究中具有抑制细胞生长的作用, 但结果并没有在后续的研究中得到充分证实<sup>[2]</sup>。

Cebrat 等<sup>[3]</sup> 揭示了 H-1 具有抑制体液和细胞免疫反应的免疫抑制作用。Poojary 等<sup>[4]</sup> 合成的 HS-1 显

示出对细菌生长的抑制作用, 但对真菌的抑制作用不强; HS-1 的驱虫作用不大, 但表现出一定的抗炎作用。Zubrzak 等<sup>[5]</sup> 用 1,5-二取代四唑环修饰 HS-1 之后, 修饰物的免疫抑制活性变化不大。

Statine 是羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA, 胆固醇合成限速酶) 的竞争性抑制剂, 具有多种免疫调节作用和细胞效应, 且不依赖于血液胆固醇的降低。有研究表明, statine 不但可以抑制 IFN- $\gamma$  刺激

收稿日期: 2008-05-07 修回日期: 2008-09-11

作者简介: 李从岩, 男, 生于 1972 年, 在读博士研究生, 讲师。

\* 通讯作者, E-mail: weiqunyan@jlu.edu.cn

诱导的人巨噬细胞、内皮细胞和平滑肌细胞的 MHC-II 抗原的表达<sup>[6]</sup>, 还可以选择性阻断整合素  $\beta 2$ 、白细胞功能抗原-1(LFA-1, 即 CD11a/CD18) 的表达<sup>[7]</sup>。这些功能与 statine 对 HMG-CoA 的抑制作用无关, 提示 statine 也是一种潜在的免疫抑制剂。天然 HS-1 的生物学活性较弱, 不能作为免疫抑制剂应用。本文研究拟采用 statine 对 HS-1 进行修饰, 以期能够有效提高 HS-1 的免疫抑制活性。

天然 HS-1 结构中的氨基酸残基都是疏水性氨基酸, 并且是环状结构, 致使化学合成极其困难。为此, 本文还希望通过修饰降低 HS-1 的疏水性, 提高 HS-1 在水溶液中的溶解性。下面报道 HS-1 及 4 个新化合物的设计、固相合成与分离纯化方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

多肽合成仪(CS536, 美国 CSBio 公司), 半制备型高效液相色谱仪(Waters Delta Prep4000, 美国 Waters 公司), 分析型高效液相色谱仪(Agilent 1100, 美国 Agilent 公司), 冷冻干燥机(Christ Alpha, 德国 Christ 公司), 激光解吸电离飞行时间质谱仪(LCQ Deca, 美国 Thermo-Finnigan 公司), 紫外分光光度计(Beckman DU7400, 美国 Beckman 公司),  $C_{18}$  反相分析柱(Sepax GP- $C_{18}$ ,  $5\mu\text{m}$ ,  $120\text{\AA}$ ,  $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$ )。

实验所用 Fmoc-Pro-Merrifield Resin (取代值 0.291mmol/g, 交联度 1%, 100~200 目)、Boc-Val-Wang Resin (取代值 0.523mmol/g, 交联度 1%, 100~200 目)、Fmoc-Pro-CTC Resin (取代值 0.42mmol/g, 交联度 1%, 100~200 目)、Boc-Tyr(tBu)-OH、Boc-Pro-OH、Boc-Ile-OH、Boc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Boc-statine(3s, 4s)-OH、HATU[O-(7-偶氮苯并三氮唑-1-氧)-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯]、HBTU(苯并三唑-1-四甲基六氟磷酸酯)、HOBt(N-羟基苯并三唑)、BOP(邻苯二甲酰丁辛酯)、DIEA(N,N-二异丙基乙胺; 二异丙基乙胺)、TFA(三氟乙酸)、DMF(二甲基甲酰胺)、DMSO(二甲亚砜)、DCM(二氯甲烷)、ACN(乙腈)、EDC[1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐]、NMM(N-甲基吗啉)和苯甲硫醚均由杭州中肽生化有限公司提供, 哌啶经重蒸后使用, 水为二次去离子水。

### 1.2 HS-1 及其类似物的化学合成

本文所合成的 5 种环肽序列分别为:

HS-1: cyclo(-Ile<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-);

A1HS1: cyclo(-Ile<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-statine<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-);

A2HS1: cyclo(-Ile<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-statine<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-);

A3HS1: cyclo(-Ile<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-statine<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-);

A4HS1: cyclo(-Ile<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-statine<sup>3</sup>-statine<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-)。

虽然这 5 种环肽或环肽类似物的序列如上面所表示的非常相似, 并且按照顺序给每个氨基酸残基做了编号, 但考虑到每个化合物的疏水性和空间位阻可能并不完全相同, 加之合成的线性肽链终究要环化成环肽, 因此, 为了方便、有效地合成目的产物, 我们选择接肽反应的第一个氨基酸也不尽相同。

#### (1) HS-1 的合成路线与纯化

树脂溶胀 调用自编程序 Method1, 树脂溶胀的具体方法是将 Fmoc-Pro-CTC Resin 4.76g (合成规模为 2.0mmol) 用 200ml DMF 浸泡 30min, 使之充分溶胀, 然后抽干。

脱除氨基保护基 调用自编程序 Method2, 具体方法为加入含 20% 哌啶的 DMF 溶液 20ml, 搅拌反应 30min, 再抽干。然后用 DMF 洗涤 5 次, 以除去残留的脱保护试剂。手工取样, 茚三酮检测, 若树脂呈深蓝色, 则表明 Fmoc 保护基已经脱除。

接肽反应 调用自编程序 Method3, 具体方法是在反应器中加入溶解有 3.33g Fmoc-Val-OH 的 200ml DMF 溶液, 机械搅拌 2min, 然后加入 HBTU 3.57g, 最后加入 NMM 2.02g [AA : HBTU : NMM (mol/mol) = 3 : 2.85 : 6], 反应 30min。抽干, 用 DMF 洗涤 3 次, 然后用甲醇洗涤树脂, 以除去氨基酸溶液和 DMF, 以便手工进行茚三酮检测, 检测结果若树脂呈现无色, 则说明反应比较完全。依次调用程序 Method2 和 Method3, 按肽链的氨基酸序列依次用 Fmoc-Tyr(2-Br-Z)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Pro-OH 等重复以上接肽反应, 直至最终合成出所需肽链。合成顺序为: Pro, Val, Tyr, Pro, Pro, Ile, Ile, Leu。各氨基酸的投料比、接肽反应时间和脱保护基时间如表 1 所示。

后续类似物的合成中, 表 1 所列参数基本不变。Boc-statine-OH 的投料比为 2, 接肽反应时间为 40min, 脱保护基时间为 30min。

肽链的切割 将合成肽链用切割液 [TFA : TIS (triisopropylsilane) : H<sub>2</sub>O = 95.0 : 2.5 : 2.5] 在低于 20℃ 的条件下切割, 反应时间为 2.5h, 然后减压过滤, 收集滤液, 用冷乙醚沉淀溶解在切割液中的多肽, 4000

表 1 HS-1 合成中各氨基酸投料比、接肽反应时间及脱保护基时间

氨基酸名称	氨基酸投料比	接肽反应时间 (min)	脱保护基时间 (min)
Fmoc-Val-OH	3	30	30
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3	30	30
Fmoc-Pro-OH	3	30	30
Fmoc-Ile-OH	3	40	30
Fmoc-Leu-OH	3	40	30

r/min 离心 3min, 真空干燥 12h, 得线性肽链的粗品约 1.5g。

**肽链的环化** 将线性多肽粗品 1.4g 用 200ml DMF 溶解, 依次加入 EDC (2eq, 0.6g)、BOP (1eq, 0.7g)、HOBt (2eq, 0.42g) 和 DIEA (5eq, 1.1g), 过夜环化。加入 EDC 可以加速缩合反应。蒸干 DMF, 得环肽粗品 1.35g, 粗品用 MALDI-TOF 质谱仪进行分析鉴定。

**环肽粗品的纯化** 将上述环化粗品肽溶于适量 DMSO 中 (由于此肽的水溶性不好, 上样浓度要严格控制小于 1mg/ml), 上样样品用 5 $\mu$ m 的滤纸过滤。制备色谱柱为 Waters X-Bridge C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m 反相柱; 洗脱液: A 液为 0.1% TFA 的水溶液, B 液为含 0.1% TFA 的乙腈水溶液; 检测波长 220nm。采用 60min 内 B 液由 30%~65% 的线性梯度洗脱方式, 流速为 38ml/min。收集纯度高于 95% 的馏分。最后冷冻干燥, 得 100mg 纯度大于 90% 的最终产品。

**分析型 HPLC 检测纯度** 色谱柱为 SepaxGP-C<sub>18</sub> 反相柱 (4.6mm  $\times$  150mm, 5 $\mu$ m, 120  $\text{\AA}$ ); 洗脱液: A 液为 0.1% TFA 的水溶液, B 液为含 0.1% TFA 的乙腈水溶液; 检测波长 220nm。采用 20min 内 B 液由 60%~80% 的线性梯度洗脱方式, 流速为 1.0ml/min。

**MS 鉴定** 激光解吸电离飞行时间质谱仪检测目标产物的分子量。

(2)A1HS1 的合成路线与纯化 与 HS-1 的合成略有不同, 在 A1HS1 的合成中, 合成方法主要有以下几点变化: ①树脂改为 Fmoc-Pro-Merrifield Resin; ②氨基酸为 Boc 保护; ③每连接一个氨基酸残基, 要用 50% TFA/DCM 将肽链切割下来, 然后脱保护、洗涤、活化树脂, 再连下一个氨基酸残基, 最后从树脂上将肽链切割下来的切割液为 HF, 时间 1.2h; ④纯化时梯度洗脱条件为 B 液: 70%~100%; ⑤HPLC 分析时 B 液: 61%~81%; ⑥合成顺序为: Pro, Val, Tyr, Pro, statine, Ile, Ile, Leu。其余同 HS-1 合成。冷冻干燥后得 250mg 纯度大于 93% 的最终产品。由于溶解度比 HS-

1 好, 故收率较高。

(3)A2HS1 的合成路线与纯化 类似于 A1HS1 的合成, 同 HS-1 的合成相比较, 在 A2HS1 合成中: ①树脂为 Fmoc-Pro-CTC Resin; ②氨基酸为 Fmoc 保护; ③最后切割液为 F 液, 时间 2.5h; ④纯化时梯度洗脱条件为 B 液: 65%~90%; ⑤HPLC 分析时 B 液: 60%~80%; ⑥合成顺序为: Pro, Ile, Ile, Leu, Pro, Val, Tyr, statine; ⑦因 statine 是用 Boc 保护, 因此在连接 statine 后, 要将肽链片段先从树脂上切割下来, 然后脱保护、洗涤、树脂活化, 再连下一个残基。其余同 HS-1 合成。冷冻干燥后得 268mg 纯度大于 92% 的最终产品。由于溶解度比 HS-1 好, 故收率较高。

(4)A3HS1 的合成路线与纯化 类似于 A1HS1 的合成, 同 HS-1 的合成相比较, 在 A3HS1 合成中: ①树脂为 Fmoc-Val-Wang Resin; ②氨基酸为 Fmoc 保护; ③切割液为 F 液, 时间 2.5h; ④纯化时梯度洗脱条件为 B 液: 43%~85%; ⑤HPLC 分析时 B 液: 50%~70%; ⑥合成顺序为: Val, Tyr, Pro, Pro, Ile, Ile, Leu, statine; ⑦因 statine 是用 Boc 保护, 因此在连接 statine 后, 要将肽链片段先从树脂上切割下来, 然后脱保护、洗涤、树脂活化, 再连下一个残基。其余同 HS-1 合成。冷冻干燥后得 245mg 纯度大于 98% 的最终产品。由于溶解度比 HS-1 好, 故收率较高。

(5)A4HS1 的合成路线与纯化 类似于 A1HS1 的合成, 同 HS-1 的合成相比较, 在 A4HS1 合成中: ①树脂为 Fmoc-Pro-Merrifield Resin; ②氨基酸为 Boc 保护; ③每连接一个氨基酸残基, 要用 50% TFA/DCM 切割, 然后洗涤, 再连下一个氨基酸残基, 最后从树脂上将肽链切割下来, 切割液为 HF, 时间 1.2h; ④纯化时梯度洗脱条件为 B 液: 62%~80%; ⑤HPLC 分析时 B 液: 62%~82%; ⑥合成顺序为: Pro, Val, Tyr, statine, statine, Ile, Ile, Leu; ⑦因 statine 是用 Boc 保护, 因此在连接 statine 后, 要将肽链片段先从树脂上切割下来, 然后脱保护、洗涤、树脂活化, 再连下一个残基。其余同 HS-1 合成。冷冻干燥后得 215mg 纯度大于 90% 的最终产品。由于溶解度比 HS-1 好, 故收率较高。

## 2 结果与讨论

### 2.1 目标产物的合成

(1)环肽的代谢稳定性和生物利用度一般远高于直链肽<sup>[8]</sup>, 但环肽的化学合成往往比较困难, 尤其是首尾相连的环肽合成难度更大。本试验研究的 5 种肽或杂聚肽都是首尾相接的环肽, 而且 8 个氨基酸残基都是疏水性氨基酸, 给合成造成困难, 也使得纯化更加不

易。

(2)常规的固相合成中需要特殊的固相支持物。当用普通的 Fmoc 固相支持物时,在二肽阶段,由于环化引起的损失非常高,有些情况甚至导致所有肽链从固相支持物上损失,特别是若 C 端为氨基化 Pro 时。但 Boc 法则可以避免这类副反应。因此本研究中所采用的几种不同的树脂,即当 C 端为氨基化 Pro 时,采用 Merrifield Resin, C 端为其它氨基化氨基酸时,采用 Wang Resin 和 CTC Resin。选择具有稳定的理化性质、足够多的反应位点及副反应少等优点的树脂,可以提高产物收率,降低纯化成本。

(3)本研究以 HBTU/NMM(合成线性肽链)和 BOP/HOBt/DIEA(环化时)作为复合型缩合试剂, NMH 或 DIEA 提供反应所需碱性环境(后者碱性强于前者)。加入 5 倍量的 DIEA 目的是加快缩合速率,并提高产品收率。

### 2.2 合成肽的纯化及纯化后的色谱分析

纯化时以 TFA 为交换离子对、以含 0.1% TFA 的乙腈水溶液为洗脱液、采用线性梯度洗脱方式对目标肽进行纯化。纯化后的色谱分析结果显示,主峰面积较大,主峰旁无相似的峰,其它杂质峰面积相比于主峰面积要小得多,表明合成的粗品经反相高效液相色谱纯化后,目标肽的纯度得到了很大地提高(图略)。

### 2.3 合成肽纯化后的质谱鉴定

MALDI-MS 分析的结果显示,HS-1、A4HS-1 的实际分子质量与理论分子质量相一致。A1HS1、A2HS1 和 A3HS1 的实际分子量数值比理论计算值高一个单位,可能由于纯化过程中使用了 TFA,肽能与 TFA 成盐造成。另外,质谱图中峰数较少,且主峰明显,说明合成的目标肽经色谱柱纯化后,可以除去大部分的杂质,从而得到较纯的目标肽(图略)。本研究中合成的 5 种肽分子量及纯度见表 2。

## 3 结论

本实验采用固相合成法制备 HS-1 及含 statine 的 4 种类似物,经质谱仪分析检测,验证了合成产物的正确性。产物经 RP-HPLC 纯化,纯度均达到 90% 以上,

表 2 本文合成的 HS-1 及其类似物 MS 检测的分子量及纯度(%)

产物	MS(Calc/found)	纯度(%)
HS-1	894.2/894.2	95.1
A1HS1	953.0/954.0	92.9
A2HS1	953.0/954.1	92.3
A3HS1	953.0/954.0	98.8
A4HS1	1111.0/1111.0	90.1

产品理化性质稳定,为下一步生物活性检测奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Pettit G R, Clewlow P W, Dufresne C, *et al.* Isolation and structure of the cyclic peptide hymenistatin I [J]. *Can J Chem*, 1990, 68(5): 708~711.
- [2] Konat R K, Mierke D F, Kessler H, *et al.* Synthesis and solvent effects on the conformation of hymenistatin I [J]. *Helv Chim Acta*, 1993, 76(4): 1649~1666.
- [3] Cebrat M, Wiczorek Z, Siemion I Z. Immunosuppressive activity of hymenistatin I [J]. *Peptides*, 1996, 17(2): 191~196.
- [4] Poojary B, Belagali S L. Synthetic studies on cyclic octapeptides, Yunnanin F and Hymenistatin [J]. *Eur J Med Chem*, 2005, 40(4): 407~412.
- [5] Zubrzak P, Kociolek K, Smoluch M, *et al.* Search for new synthetic immunosuppressants I. Tetrazole analogues of hymenistatin I [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48(4): 1151~1154.
- [6] Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, *et al.* Statins as a newly recognized type of immunomodulator [J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1399~1402.
- [7] Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, *et al.* Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site [J]. *Nat Med*, 2001, 7(6): 687~692.
- [8] Cox D, Aoki T, Seki J, *et al.* The pharmacology of the integrins [J]. *Med Res Rev*, 1994, 14(2): 195~228.