

自组装多功能反应器固相合成依非巴特

绳则翠^a 周成^a 张龄之^c 朱亮亮^a 姜波^a 陈英文^a 祝社民^b 沈树宝^{a*}
(^a南京工业大学生物与制药工程学院 南京 210009; ^b南京工业大学材料科学与工程学院 南京 210009;
^c徐州师范大学化学化工学院 徐州 221116)

摘要 采用集反应、搅拌、鼓泡、N₂气保护和过滤五重功能的自组装反应器,研究了树脂种类、溶剂、缩合试剂和反应时间对环肽依非巴特产率的影响。结果表明,以 Rink Amide AM 树脂为固相载体, HBTU/HOBt/DIEA 为肽键缩合剂, DMF 为溶剂, 反应 2 h, 粗肽得率高达 86.6%, 经液相色谱纯化后纯度达 98% 以上。

关键词 依非巴特, 固相合成反应器, Fmoc 法

中图分类号: O621.3

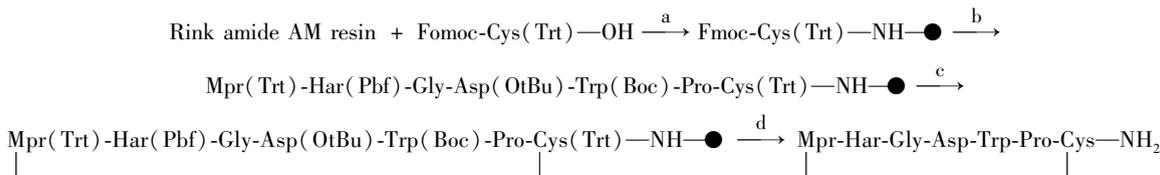
文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2012)03-0275-05

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2012.00228

依非巴特是美国 FDA 于 1998 年批准上市的多肽类药物, 为分子内含有 1 个巯基丙酰和 6 个氨基酸残基的环状七肽。它是一种多肽类血小板糖蛋白 II b/III a 受体拮抗剂^[1], 通过抑制血小板聚集的最后共同途径抑制血小板聚集和血栓形成, 主要用于防止心肌供养动脉闭塞、心脏病发作、不稳定性心绞痛、无 Q 波心肌梗塞和冠脉介入治疗引起的猝死, 是冠心病患者的理想药物^[2-3]。依非巴特在医用上良好的产业前景使得人们致力于寻找一条高效、经济的合成路线, 以满足日益增长的多肽市场需求。固相合成为多肽合成的主要方法^[4]。熊瑛等^[5]以 Rink-Am-Resin 树脂作为固相载体, TBTU/HOBt/DIEA 作为肽键缩合试剂, TFA/EDT/TIS/H₂O 作为切割试剂, 固相合成了依非巴特, 粗肽得率为 55%。周达明^[6]以 Rink Amide MBHA 树脂作为固相载体, TBTU/HOBt/NMM 作为肽键缩合试剂, TFA/HBr/HAc/EDT/TIS 作为切割试剂, 完成肽的固相合成, 粗肽纯化后产率为 23%。覃亮政等^[7]采用 Sieber 树脂以 Fmoc/tBu 策略固相合成依非巴特, 粗肽纯化后产率高达 62.3%, 但该树脂价格昂贵, 不适合工业化生产。

本研究采用集反应、搅拌、鼓泡、N₂气保护和过滤五重功能的自组装反应器, 以 Rink Amide AM 树脂为载体, 固相合成依非巴特(合成路线如 Scheme 1 所示), 探讨了树脂种类、溶剂、缩合试剂及反应时间对合成的影响, 反应装置简单, 操作方便, 成本低, 适合实验室科研及工业化生产。



Scheme 1 Synthetic route of Eptifibatide

Conditions: a. HBTU/HOBt/DIEA; b. Protected amino acids, HBTU/HOBt/DIEA; c. Iodine/DMF; d. TFA/TIS/H₂O

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

多肽合成反应器, 实验室自制; API2000 型质谱仪(美国 PE 公司); P680 型高效液相色谱仪(美国戴

2011-05-16 收稿, 2011-07-13 修回

国家 863 资助项目(2009AA05Z313, 2006AA02Z211), 国家自然科学基金资助项目(50872052, 20376034), 江苏省自然科学基金资助项目(BK2006181), 江苏省高校研究生创新计划资助项目(2007), 江苏省环保厅资助项目(2009002), 江苏省科技厅资助项目(BE2010196), 江苏高校优势学科建设工程资助项目

通讯联系人: 沈树宝, 教授; Tel: 025-58139922; Fax: 025-58139369; E-mail: zsbshen@njut.edu.cn; 研究方向: 多肽合成、酶工程及环境工程

安公司);GL-21M 型高速离心机(上海市离心机械研究所);UNICO UV-2102C 型紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);Buchi R-200 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司)。

树脂(天津南开和成科技有限公司);依非巴特标准品、保护氨基酸[Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Har(Pbf)-OH、Mpr(Trt)-OH]和缩合试剂[二异丙基乙胺(DIEA)、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)、苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)]均购自上海吉尔生化公司;乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司);二氯甲烷(DCM)、二甲基甲酰胺(DMF)、三氟乙酸(TFA)、三异丙基硅烷(TIS)等其它试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 Fmoc-Cys(Trt)-树脂的制备 将 0.13 g Rink Amide AM 树脂(0.07 mmol, 取代度为 0.58 mmol/g^[8])置于 10 mL 自组装反应器中,加入适量 DCM 溶胀并洗涤;滤干后加入 1 mL 20% 哌啶/DMF 溶液(体积比)^[9],脱除 Fmoc 保护基 2 次,依次为 5 和 15 min,然后用无水甲醇、DMF 与 DCM 交替洗涤 3 次。将 0.08 g(0.14 mmol)Fmoc-Cys(Trt)-OH 与 0.05 g(0.14 mmol)HBTU、0.02 g(0.14 mmol)HOBt 溶于 3 mL DMF,并加入 0.05 mL DIEA 活化,然后加入反应器中与树脂混合, N_2 气保护搅拌反应 2 h;反应结束后,滤去反应液,依次以无水甲醇、DMF 与 DCM 交替洗涤树脂 3 次。

1.2.2 肽链的延长 向 Fmoc-Cys(Trt)-树脂中加入 1 mL 20% 哌啶/DMF(体积比)溶液,脱除 Fmoc 保护基。按照 $n(\text{resin}):n(\text{氨基酸}):n(\text{HBTU}):n(\text{HOBt}):n(\text{DIEA}) = 1:2:2:2:4$,从碳端到氮端的顺序,依次连接余下 6 个氨基酸^[10],合成目标肽。缩合过程中采用四氯对苯醌定性显色(Chloranil 法)^[11]与 Fmoc 定量检测^[12]结合的方法,检测反应进度。

1.2.3 氧化环化 向树脂中加入 20 倍量的碘(DMF 作为溶剂),环化 3 h,然后用 DMF 洗涤树脂至无色,真空干燥后即得环肽粗品^[13]。

1.2.4 肽树脂的切割 向肽树脂中加入 $V(\text{TFA}):V(\text{TIS}):V(\text{H}_2\text{O}) = 95:2.5:2.5$ 切割液(10 mL/0.1 g resin),反应 2 h。结束后所得切割液进行减压浓缩,向其中加入约 10 倍量冰冷的无水乙醚,置冰箱中,析出白色固状物后离心,真空干燥得粗肽。

1.2.5 粗肽的分离纯化及鉴定 粗肽用反相高效液相进行分析纯化。HPLC 的色谱条件为:色谱柱 Kromasil C18 柱(4.6 mm × 250 mm);梯度洗脱的缓冲液 A:0.1% TFA/水溶液,B:0.1% TFA/乙腈溶液,线性梯度由 20% B 溶液递增至 60% B 溶液;时间 20 min;流速 0.8 mL/min;检测波长 220 nm;进样量为 20 μL 。

质谱鉴定条件为:喷雾电压 5 kV,毛细管温度 95 $^\circ\text{C}$,正离子检测。

2 结果与讨论

2.1 不同反应器对粗肽产率的影响

本实验室研制组装出一个简便固相合成反应装置(图 1),以市售固相萃取柱(直径 18 mm,柱高 80 mm,容量 10 mL)作为反应器主体(a),下接自制不锈钢三通,既可以通 N_2 (d),又可外接水泵以便抽滤(e)。在整个固相合成过程中均使用 N_2 气保护,可避免由空气引起的氧化等副反应的发生;同时 N_2 鼓泡与磁力搅拌(f)相结合,大大提高了反应的相间传质效果。出气口填入干燥剂无水 CaCl_2 以隔绝水(b),降低了副反应的发生几率。

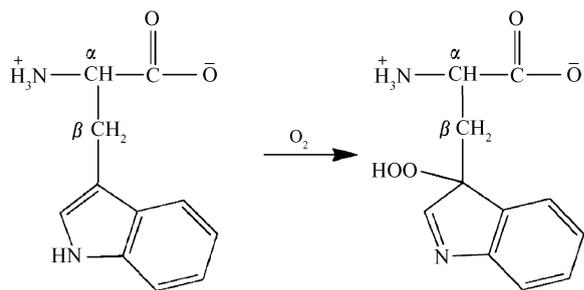
实验分别以固相合成柱(如图 1 中 a)、自制反应器(图 1)作为反应装置,进行合成依非巴特,其它条件一致,结果如表 1 所示。

表 1 不同反应器对依非巴特产率的影响

Table 1 Effect of different reactors on the yield of Eptifibatide

Reactors	Anchoring yield/%	Yield/%	N_2 protecting
Self-assembled reactor	100.0	86.6	Yes
Commercially available reactor for SPSS	82.0	28.4	No

从实验数据可知,在 N_2 气保护下,肽合成产率及第一个氨基酸与树脂的连接率均远高于无 N_2 气保护的。这是因为依非巴特肽链中含有半胱氨酸、色氨酸 2 个极易被氧化的氨基酸:半胱氨酸经氧化会形成胱氨酸;色氨酸经氧化结构遭到破坏,其吲哚环上形成 $O-O-H$ 键,如 Scheme 2 所示。而在 N_2 气保护下可防止反应溶液中空气、过氧化物等氧化剂的影响,减少副反应的发生,从而提高产物得率。



Scheme 2 Oxidation of Trp

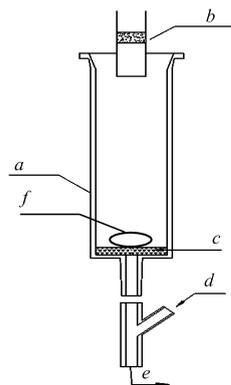


图1 自组装固相合成反应器

Fig.1 The schematic diagram of home-made reactor for solid-phase peptide synthesis

a. solid-phase peptide synthesis reactor; b. outlet tube filled with drier; c. core plate; d. nitrogen inlet; e. filtrate outlet; f. magnetic stirring bar

与市售反应器相比,自组装反应器不仅可获得较高产率,且操作简便、成本低,适合实验室科研用途,同时通过多个此种反应器的并联操作,可实现工业化生产。

2.2 Fmoc-Cys(Trt)-树脂的制备

氨基酸与树脂的连接反应作为合成肽的第一步,其连接效率的高低直接决定了树脂的利用率及产物的产率。本实验分别考察了不同的树脂、反应溶剂、缩合试剂及反应时间对其产率的影响,以优化反应条件。

2.2.1 树脂的选择 固相多肽合成过程中对固相载体的选择非常关键,它不仅关系到肽合成反应速度,对合成目标肽的纯度、目标肽的收率和工业化生产多肽的成本均有重要的影响,正确选择载体是固相合成法成功的关键^[14]。本实验选用 Rink Amide AM 树脂、Rink Amide MBHA 树脂及 Sieber 树脂进行了对比,结果如表 2 所示。

表2 不同树脂与第一个氨基酸连接率对比

Table 2 Comparison of anchoring yield in AA-resin synthesis by different kinds of resin

Type of resin	Rink amide AM resin	Rink amide MBHA resin	Sieber resin
Substitution/(mmol·g ⁻¹)	0.58	0.57	0.69
Anchoring yield/%	97.6	94.8	60.0

由表 2 可知,Rink Amide AM 树脂的连接率明显高于其它 2 种树脂,这是由树脂接肽位点、Linker 基团、合成化学环境等因素所决定的。Rink Amide AM/MBHA 树脂接肽位点比 Sieber 树脂较为均一,相邻位点间接肽时空间阻力小,连接反应容易进行;从树脂 Liner 结构来看,Rink Amide AM/MBHA 树脂是用 Rink Amide Liner 分别在 AM、MBHA 树脂上结合而成,MBHA 树脂上多的甲基,使得空间位阻加大、切割副产物增加;实验在溶剂 DMF 中进行,Rink Amide AM/MBHA/Sieber 树脂溶胀度分别为 6.4、5.5 和 5.3 mL/g,溶胀度越高树脂肽收率越高,这是因为溶胀度越大,树脂内部的网格空间越大,树脂表面和树脂内部反应基与溶液中的活性基团的碰撞机会越多,反应越接近均相状态,越有利于反应的进行,同时高溶胀时便于洗涤排除球内所含副产物和过剩的溶剂,有利于提高目标肽的纯度和收率。

同时考虑到 AM 树脂成本也较低,故实验选用 Rink Amide AM 树脂作为固相载体。

2.2.2 溶剂的选择 反应溶剂不仅与树脂的溶胀程度相关,还关系到反应物质在体系中的溶解程度,因此应选择合适的溶剂。分别用 DMF、NMP、DCM/DMF 和 THF/DMF 作为溶剂,连接 Fmoc-Cys(Trt)-OH 与 AM 树脂,结果见表 3。

表 3 溶剂对氨基酸与树脂连接率的影响

Table 3 Effect of solvent on the anchoring yield

Solvent	DMF	NMP	DCM/DMF	THF/DMF
Anchoring yield/%	100.0	98.1	97.1	98.5

由表 3 可见,以纯 DMF 作为溶剂连接率最高。DCM、THF 作为弱极性溶剂,对树脂溶胀性能好,沸点较低,易于蒸去,但是溶解能力不强。

2.2.3 缩合试剂的选择 实验考察了 HBTU、TBTU、HATU、DIC 4 种缩合试剂对连接率的影响,结果见表 4。

表 4 缩合试剂对氨基酸与树脂连接率的影响

Table 4 Effect of coupling reagent on the anchoring yield

Coupling reagent	HBTU	TBTU	HATU	DIC
Anchoring yield/%	97.3	95.4	95.5	83.3

从表 4 数据可知,使用 HBTU 为缩合试剂,树脂与氨基酸连接率最高。

2.2.4 反应时间对产率的影响 以 DMF 为溶剂,延长反应时间,其它反应条件不变,连接 Fmoc-Cys (Trt)-OH 与 AM 树脂,结果见图 2。由图 2 可知,反应时间对连接率影响较大,连接率随时间增加而增加,2 h 时即达到最高值,此后随时间增加,连接率有所下降,这是因为随反应时间的延长,分子间发生缩合反应副产物增加。因此,选择 2 h 为最适的缩合反应时间。

2.3 依非巴特的分析鉴定

运用 Fmoc 固相法合成依非巴特,得粗肽的产率为 86.6%,明显高于文献报道结果^[7-9]。HPLC 分析得目标肽纯度为 80%,经 RP-HPLC 纯化后,其纯度大于 98%。将纯化前后依非巴特图谱与其标准品图谱进行对比,可知合成产物与标准品的出峰时间吻合,即合成粗肽可初步确定为目标产物依非巴特。经质谱鉴定,分析结果 $[M + H]^+ = 832.5$,与理论值相符。

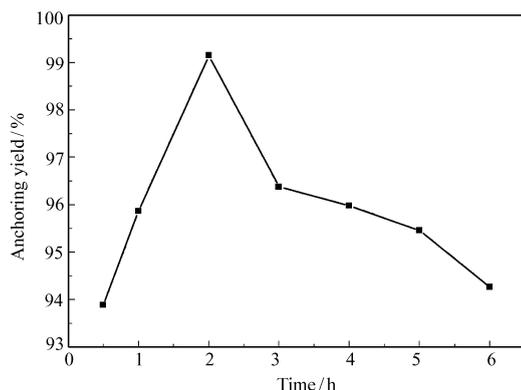


图 2 反应时间对树脂与氨基酸连接率的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on the anchoring yield

3 结论

1) 自行设计组装了适用于固相肽合成的反应器。该反应器集反应、搅拌、鼓泡、 N_2 气保护和过滤五重功能,整个合成过程通入 N_2 气,减少了副反应发生的几率, N_2 气鼓泡加上磁力搅拌大大提高了反应的相间传质效果,可用于实验室及工业化生产。

2) 成功提供了一条高产率、低成本的依非巴特合成路线。采用 Fmoc 法固相合成策略,HBTU/HOBt/DIEA 作为肽键缩合试剂,DMF 为溶剂,反应 2 h,粗肽得率高达 86.6%,经 HPLC 纯化后纯度达 98% 以上,此合成路线具有快捷、简便、高效的特点,适合于工业化生产。

参 考 文 献

- [1] Scarborough R M. Development of Eptifibatide[J]. *Am Heart J*,1999,**13**:1093-1104.
- [2] Monique P C,Gillian M K. Eptifibatide;A Review of Its Use in Patients with Acute Coronary Syndromes and/or Undergoing Percutaneous Coronary Intervention[J]. *Drugs*,2005,**65**(14):2009-2035.
- [3] Tang J J,Wang L S,Wang H,*et al.* Comparison of Efficacy and Safety of Native Eptifibatide vs Tirofiban in Patients with Acute Coronary Syndrome Undergoing Percutaneous Coronary Intervention[J]. *Nanjing Med Univ*,2008,**22**(4):238-242.
- [4] Carpino L A,Han G Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-sensitive Ammo-protecting Group[J]. *Am*

Chem Soc,1970,**92**:5748-5750.

- [5] XIONG Ying, WANG Yu, CHEN Liang. Fmoc Solid-phase Synthesis and Purification of Eptifibatide[J]. *J Xiamen Univ (Nat Sci)*,2007,**46**(1):100-103 (in Chinese).
熊瑛,王宇,陈亮. Eptifibatide 的固相合成及分离纯化[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2007,**46**(1):100-103.
- [6] ZHOU Daming. Solid-phase Synthesis of Eptifibatide;CN,200510025683.7[P],2010-09-29 (in Chinese).
周达明. 固相多肽合成依非巴特的制备方法:中国,200510025683.7[P],2010-09-29.
- [7] QIN Liangzheng, LI Hongling, MA Yaping, *et al.* Solid Phase-method for Preparing Eptifibatide;CN,200910104994.0[P],2009-09-23 (in Chinese).
覃亮政,李红玲,马亚平,等. 一种固相法制备 Eptifibatide 的方法:中国,200910104994.0[P],2009-09-23.
- [8] ZHENG Yanhui, ZHANG Yanping, ZHANG Hao, *et al.* The Influence of the Structure of Rink Amide Resin to Peptide Synthesis[J]. *Ion Exchange Adsorpt*,2008,**24**(6):563-569 (in Chinese).
郑彦慧,张艳平,张浩,等. Rink Amide 树脂结构对多肽合成的影响研究[J]. 离子交换与吸附,2008,**24**(6):563-569.
- [9] SHI Weihua, TIAN Sumei, XIANG Guangya, *et al.* Solid Phase Synthesis of Cetrorelix[J]. *Chinese J Med Chem*,2010,**20**(1):40-43 (in Chinese).
石卫华,田素梅,项光亚,等. 西曲瑞克的固相合成[J]. 中国药物化学杂志,2010,**20**(1):40-43.
- [10] Qian H, Chen W, Zhou J P, *et al.* Total Synthesis of Endothelin 1 by Microwave-assisted Solid Phase Method[J]. *J Chinese Chem Lett*,2010,**21**:388-390.
- [11] Vojkovsky T. Detection of Secondary Amines on Solid Phase[J]. *Pept Res*,1995,**8**(4):236-237.
- [12] Green J, Bradley K. Studies on the Acylation of Hydroxy-functionalized Resins Using Fmoc Amino Acids Activated Using Diisopropylcarbodiimide/hobt or as Acid Fluorides[J]. *Tetrahedron*,1993,**49**(20):4141-4146.
- [13] Turpin E R, Bonev B B, Hirst J D. Stereoselective Disulfide Formation Stabilizes the Local Peptide Conformation in Nisin Mimics[J]. *Biochemistry*,2010,**49**:9594-9603.
- [14] ZHANG Zhigang, CAI Haobin, BAI Ling, *et al.* A Comparison Between the Yield of the Attachment of Boc-AA-O-CS + to Merrifield Resin and of Fmoc-AA-OH to Wang Resin[J]. *Chinese J Org Chem*,2000,**20**(3):419-423 (in Chinese).
张志刚,蔡豪斌,白玲,等. Boc 和 Fmoc 保护氨基酸与 M 树脂和王氏树脂结合率的比较[J]. 有机化学,2000,**20**(3):419-423.

Solid-phase Synthesis of Eptifibatide in a Multifunctional Reactor

SHENG Zecui^a, ZHOU Cheng^a, ZHANG Lingzhi^c, ZHU Liangliang^a, JIANG Bo^a,
CHEN Yingwen^a, ZHU Shemin^b, SHEN Shubao^{a*}

(^aCollege of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering,
Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

^bCollege of Material Science and Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

^cChemistry and Chemical Engineering Department, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract A home-made reactor possessing functions including reaction, blending, bubbling, protecting with N₂ and filtration was fabricated. The effects of the type of resin, solvent, coupling reagent and reaction time on the yield of cyclic eptifibatide were investigated. The results showed the overall yield was up to 86.6%, using Rink Amide AM resin as solid supporter, HBTU/HOBT/DIEA as the coupling reagent, DMF as the solvent and reaction 2 hours in the reactor. The purity of the product as revealed by HPLC could reach 98%.

Keywords Eptifibatide, solid-phase synthesis reactor, Fmoc method