

氟离子敏感疏水标签辅助连续流动 绿色合成胸腺五肽

刘冬梅, 徐元强, 夏超, 郑晶晶, 苏贤斌
(南京工业大学化工学院, 南京 210009)

摘要 设计并合成了一种新型氟离子敏感的羧基保护基——2-苯基-2-三乙基硅乙醇(PTESE)作为疏水性标签,结合连续流动化学技术,在微反应器中实现了高效绿色的多肽药物合成.该策略采用绿色溶剂乙酸乙酯替代传统固相合成中使用的环境不友好溶剂*N,N*-二甲基甲酰胺,避免了潜在的生殖毒性风险.实验中使用Cbz保护的氨基酸进行偶联反应,并通过连续流钯碳填充柱加氢实现快速、清洁的脱保护,有效规避了Fmoc脱保护中对受控试剂哌啶的依赖.基于该方法快速高效地合成了高纯度的胸腺五肽(粗品纯度>98%),与传统固相合成方法相比,过程质量强度(PMI)大幅度降低.同时,正交保护基团PTESE可通过氟离子试剂有效脱除,为全保护肽链的合成提供一种新策略,并在绿色可持续多肽合成领域具有巨大的应用潜力.

关键词 氟离子敏感; 疏水标签; 胸腺五肽; 连续流动液相多肽合成

中图分类号 O629.72

文献标志码 A

doi: 10.7503/ejcu20240544

Continuous Flow Liquid Phase Synthesis of Thymopentin Using Fluoride-labile Hydrophobic Tag

LIU Dongmei, XU Yuanqiang, XIA Chao, ZHENG Jingjing, SU Xianbin*
(College of Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

Abstract A novel fluoride-sensitive carboxyl protecting group, 2-phenyl-2-triethylsilylethanol (PTESE), as a hydrophobic tag was designed and synthesized. By integrating it with continuous flow chemistry, an efficient and green synthesis of peptide drugs was achieved in a microreactor system. The proposed approach employed ethyl acetate, a green solvent, to replace the environmentally unfriendly solvent *N,N*-dimethylformamide, thereby avoiding its potential reproductive toxicity. Cbz-protected amino acids were used for coupling reactions, and rapid and clean deprotection *via* hydrogenation was accomplished through a continuous flow palladium-carbon packed column, effectively circumventing the dependence on piperidine, a controlled substance required in Fmoc deprotection. Using this approach, high-purity thymopentin (crude purity>98%) was synthesized rapidly and efficiently. Compared to traditional solid-phase synthesis methods, this strategy reduced the Process Mass Intensity (PMI). Additionally, the orthogonal protecting group PTESE can be removed with fluoride reagents, offering a new approach to synthesizing fully protected peptides, with significant potential in green, sustainable peptide synthesis.

Keywords Fluoride-labile; Hydrophobic tag; Thymopentin; Continuous flow liquid phase peptide synthesis

多肽药物因其具备与靶点亲和力强、特异性高、副作用小及稳定性好等优势,在生命科学多个领

收稿日期: 2024-12-18. 网络首发日期: 2025-01-18.

联系人简介: 苏贤斌,男,博士,教授,主要从事多肽合成和绿色化学方面的研究. E-mail: davidsu@njtech.edu.cn

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目资助.

Supported by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, China.

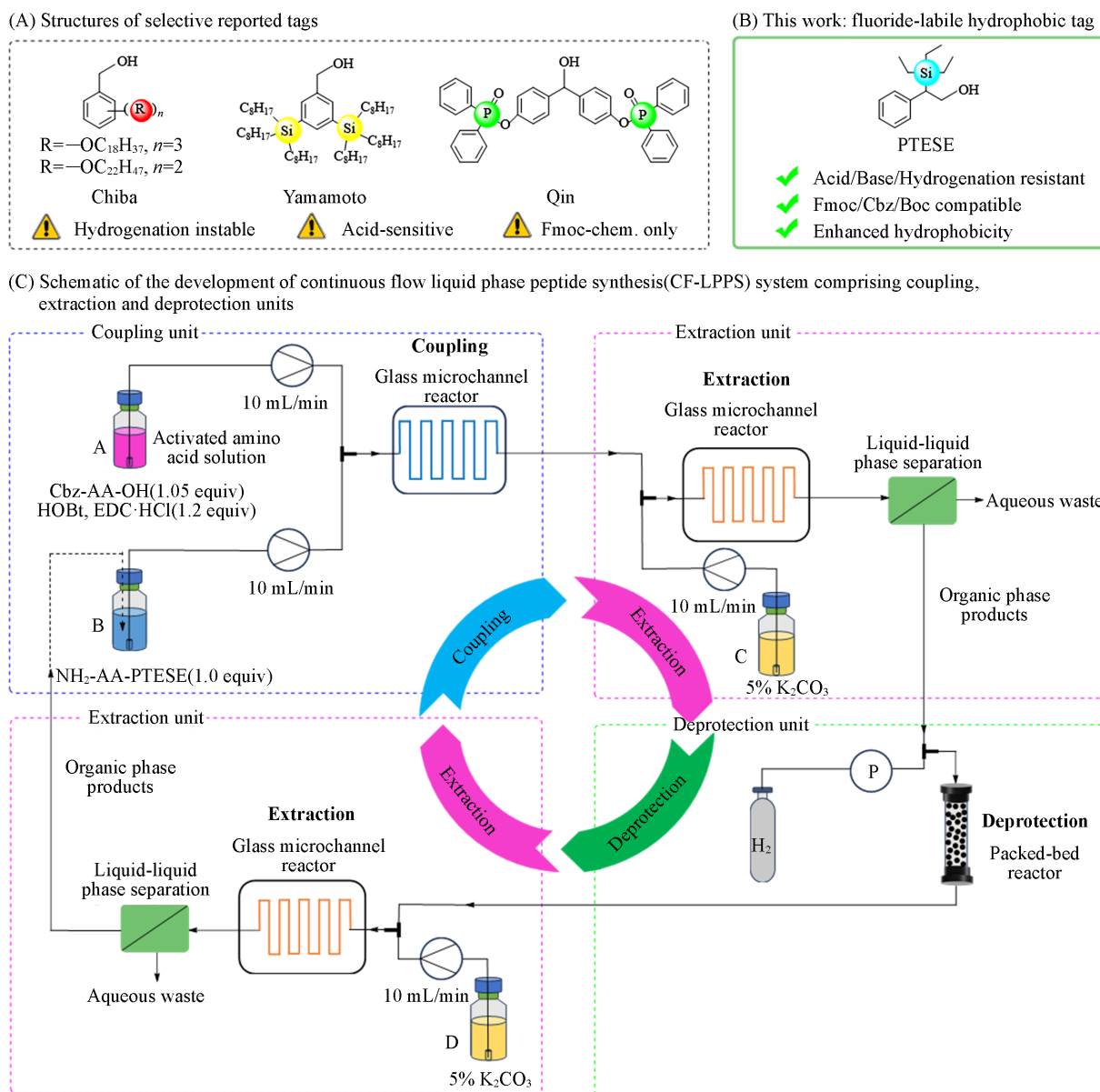
域,包括医药、化妆品、生物技术与研究、农业与食品和生物材料科学等方面,都具有广泛的应用^[1].尤其是在治疗心血管和代谢疾病领域中发挥了巨大的潜力^[2].目前已有近百种多肽药物投入市场,推动了多肽市场需求的快速增长.肽合成的方法主要分为生物合成法和化学合成法,相较于生物合成法操作复杂、纯化分离难度大等问题,化学合成法具有的高效、易规模化放大的优势更能满足现代工业化大规模生产的需求^[3].化学合成法分为固相多肽合成(SPPS)^[4]和液相多肽合成(LPPS)^[5].

Merrifield等^[6]开发的SPPS是目前工业上广泛使用的多肽合成方法,具有操作简便、自动化程度高及产物易于分离等优点,但也存在一些显著的弊端与局限性.如用于固相合成的树脂(Wang树脂、Rink树脂和CTC树脂等)成本较高,且合成结束后通常无法重复使用;SPPS在非均相体系中进行,为了使反应进行完全,通常需要投入过量的氨基酸、偶联试剂和脱保护试剂,原子经济性低;SPPS偶联、脱保护及清洗过程中需要消耗大量有机溶剂,对环境不友好,部分具有毒性,不符合绿色与可持续发展的社会需求^[7].针对这些局限性,研究人员也开发了微波^[8]和超声^[9]等多种辅助手段加快反应速度、减少投料量,以及利用免洗多肽合成新工艺^[10]和基于多通道微流控芯片的靶向多肽分子合成的新方法^[11],来缩短反应时间,减少试剂用量.然而,这些合成路线仍然是基于固-液非均相反应,存在传质效率低、大过量投料和使用有害溶剂等诸多问题有待解决.因此,只有引入更加绿色的溶剂和试剂,并采用易于回收/可重复使用的偶联和脱保护试剂的新路线,才有可能实现高效绿色的多肽合成工艺^[12].相比之下,液相多肽合成在均相体系中进行,仅需要等化学计量的反应底物,即可达到更高的转化效果,避免了过量试剂的浪费,原子经济性更高,反应溶剂更加绿色,过程也更易于监测^[13].

传统液相多肽合成需要频繁的纯化步骤以分离未反应的试剂和副产物,通常是费时且复杂的^[14].疏水性标签辅助液相多肽合成是一种改良的液相多肽合成技术,在引入疏水性标签后,反应产物可通过简单的溶解性差异或相分离进行纯化,从而简化了操作步骤^[15].疏水性标签辅助的液相多肽合成方法发展迅速,研究人员已开发了多种C端疏水标签[Scheme 1(A)]代替固相合成中的树脂用于多肽的液相合成.如,Chiba等^[16]设计了一种线性长碳链修饰的苯甲醇作为疏水性标签,在液相体系中合成多肽,通过沉降的方式实现了肽段与杂质的分离.Qin等^[17]开发了一种含磷标签作为氨基酸的C端保护基团.Yamamoto等^[18]开发的硅基疏水标签进一步提高了多肽在有机溶剂中的溶解性.然而,上述标签的裂解通常都是在三氟乙酸(TFA)体系下进行,对于酸敏感的氨基酸侧链十分不友好,限制了其在成全保护多肽中的应用.

连续流技术因具有精确控制反应时间和温度、过程安全性好以及易于放大等优势而在多肽合成领域中的应用受到关注^[19].Pentelute等^[20]报道了一种自动化快速流动固相合成多肽的方法(AFPS),将偶联形成酰胺键的时间缩短至7 s.与传统批次固相合成相比,反应效率显著提高,但在合成过程中,反应底物和溶剂的消耗量比传统SPPS过量更多(20~100倍),未能体现出绿色与可持续发展的优势.Fuse等^[21,22]报道了在微通道反应器中连续流动形成酰胺键的方法,并进一步应用到多肽合成中.但其也仅在偶联反应中应用了连续流动技术,后处理过程及脱保护步骤没有采用连续化.

本文将疏水性标签辅助的液相多肽合成与连续流动化学技术相结合,实现了液相体系中多肽偶联、脱保护及萃取分离除杂的全连续操作.设计了一种新型氟离子敏感标签——2-苯基-2-三乙基硅乙醇(PTESE)作为氨基酸的C端保护基团[Scheme 1(B)].该标签具备优异的正交保护特性,对酸性、碱性及加氢条件具有较高耐受性,同时表现出更强的疏水性,后处理简单便捷.结合连续流技术,开发了一种基于疏水性标签的液相连续流多肽合成工艺[Scheme 1(C)].该工艺采用苄氧羰基(Cbz)保护的氨基酸,并利用可循环使用的Pd/C填充柱,实现了Cbz保护基的高效绿色氢解脱除,避免了Fmoc或Boc保护基脱除过程中对管制试剂(如哌啶)或强酸的依赖.总体而言,这种全连续流液相多肽合成工艺不仅极大地简化了操作流程,避免了使用过量的氨基酸、偶联试剂和溶剂,提高了原子经济性并降低了PMI值,而且通过精确控制反应时间和温度,显著提升了多肽合成的效率.



Scheme 1 Representative hydrophobic tags and instrumental flowchart of CF-LPPS

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

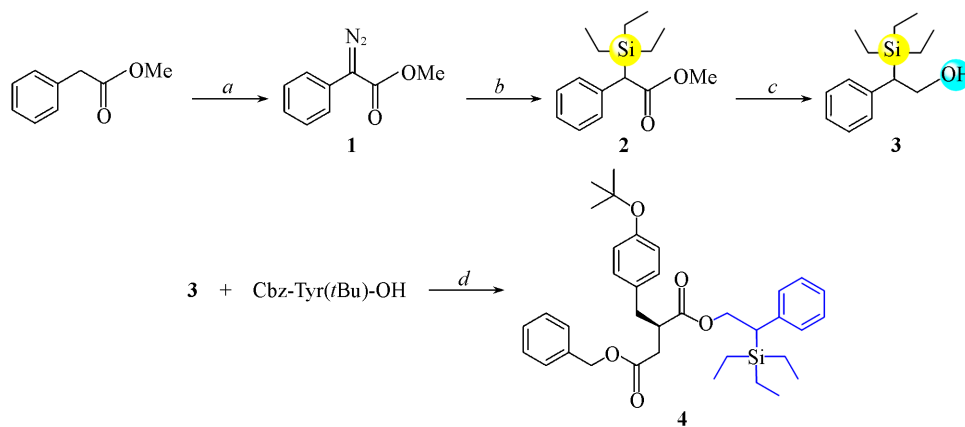
苯乙酸甲酯和1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一烯-7(DBU), 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 4-乙酰氨基苯磺酰叠氮、三乙基硅烷、六氟磷酸四乙腈($[(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{Cu}]\text{PF}_6$)和四正丁基氟化铵(TBAF), 分析纯, 上海笛铂生物科技有限公司; 5% (质量分数) 钨碳催化剂、三氟乙酸(TFA)、三异丙基硅烷(TIS)和2,2'-(1,2-乙二基双氧代)双乙硫醇(DODT), 分析纯, 上海阿拉丁试剂有限公司; 无水乙腈(MeCN)、无水二氯甲烷(DCM)、无水四氢呋喃(THF, H_2O 含量 $\leq 5 \times 10^{-5}$)和氢化铝锂(2.5 mol/L solution in THF), 上海迈瑞尔生化科技有限公司; 无水碳酸钾(K_2CO_3)、乙酸乙酯(EA)、乙醇、石油醚(PE)、*N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)和甲醇(MeOH), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; Cbz保护氨基酸、Fmoc保护氨基酸和4-二甲氨基吡啶(DMAP), 分析纯, 上海吉尔生化有限公司; 1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)、*N,N'*-二异丙基乙胺(DIEA)、*N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC)和1-羟基苯并三唑(HOBt), 分析纯, 苏州昊帆生物科技有限

公司.

DRX500 400 MHz 型核磁共振波谱仪(NMR), 德国 Bruker 公司; Agilent 6540 Q-TOF 型液质质谱联用仪(LC-MS)和 Agilent 1260 型高效液相色谱仪(HPLC), 美国安捷伦公司; Wooking K2025 型高效液相色谱仪(HPLC), 济南海能未来技术集团股份有限公司; RE-201D 型旋转蒸发器, 上海东玺制冷仪器有限公司; YZFLAB 系列流动合成仪, 上海岩征实验仪器有限公司; Zaiput SEP-10 型液-液分离器, 美国 Zaiput 公司.

1.2 实验过程

1.2.1 疏水标签 PTESE 的合成和第一个氨基酸的接入 硅基保护基团是有机合成中一类重要的保护基团, 硅原子的 Si—O 和 Si—C 键长度以及 *d* 轨道的特殊构型赋予了硅衍生物卓越的疏水性. 商业化的 2-(三甲基硅基)乙醇(TMSE)是一种常见的羧基保护基^[23]. 该基团的脱除通常使用四正丁基氟化铵(TBAF)在四氢呋喃中处理^[24]. 然而, TMSE 的分子量较小, 导致其疏水性较差. 本文通过引入苯基并改变硅原子的取代基, 合成了 2-苯基-2-(三乙基硅基)乙醇(PTESE). 与 TMSE 相比, PTESE 展现出卓越的稳定性和疏水性, 可以作为改良的羧基保护基团和理想的 C 端疏水标签. 以苯乙酸甲酯为起始原料, 合成了标签 PTESE, 并确立了其引入路线, 具体过程如 Scheme 2 所示.



Scheme 2 Synthesis of PTESE and attachment of the first amino acid

a. 4-Acetamidobenzenesulfonyl azide, DBU, MeCN, r. t., 4 h; b. $[(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{Cu}]\text{PF}_6$, Et_3SiH , DCM, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; c. LiAlH_4 , THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$; d. DCC, DMAP, EA, r. t., 1.5 h.

化合物 1 的合成: 将苯乙酸甲酯(3.0 g, 20 mmol)溶解在 100 mL 无水乙腈中, 加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU, 4.56 g, 30 mmol)和 4-乙酰氨基苯磺酰叠氮(7.21 g, 30 mmol), 室温下避光反应 4 h. 反应完成后, 减压浓缩除去反应液中的乙腈, 加入 75 mL 乙酸乙酯稀释, 并用饱和氯化钠溶液萃取 3 次, 合并有机相, 用无水硫酸镁干燥. 滤液经减压蒸馏和柱层析纯化, 得到 3.25 g 橙红色液体化合物 1, 收率 92.2%.

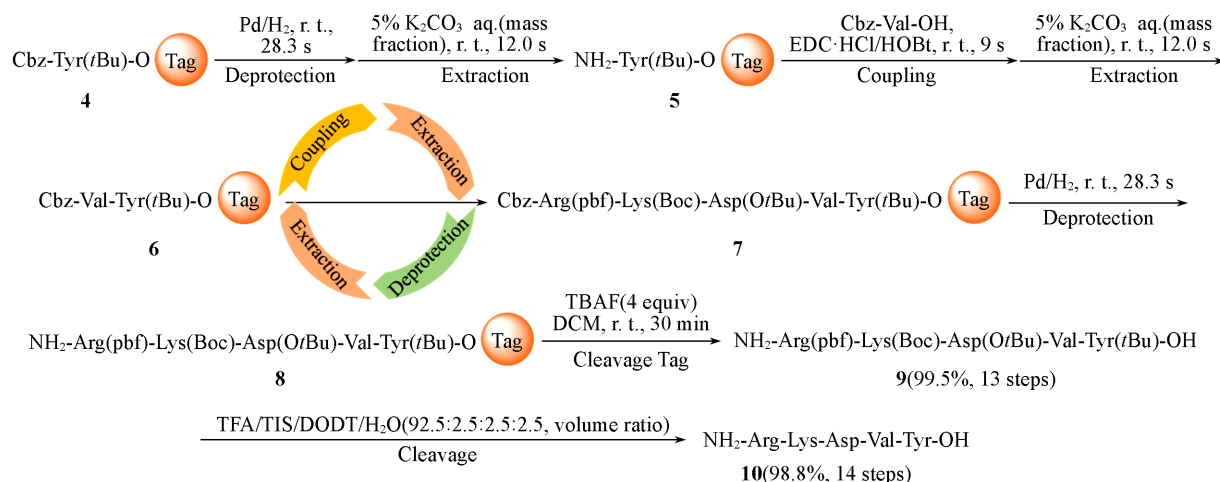
化合物 2 的合成: 室温下将六氟磷酸四乙腈铜($[(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{Cu}]\text{PF}_6$, 0.32 g, 0.85 mmol)溶解在 50 mL 无水二氯甲烷中, 加入三乙基硅烷(3.96 g, 34.06 mmol); 控制反应温度为 $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 将溶解在 30 mL 无水二氯甲烷中的化合物 1(3 g, 17.03 mmol)通过注射泵逐滴加入反应液中, 控制反应温度为 $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 4 h. 反应完成后, 反应液经减压蒸馏和柱层析纯化得到 3.98 g 无色液体化合物 2, 收率 88.4%.

化合物 3 的合成: 将化合物 2(3.82 g, 14.45 mmol)溶解在 50 mL 无水四氢呋喃中, 控制反应温度为 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 以下, 向反应液中缓慢滴加氢化铝锂(11.56 mL, 28.9 mmol), 滴毕反应 1.5 h. 待反应完成后, 加入 15 mL 饱和氯化铵溶液终止反应. 经减压浓缩除去四氢呋喃后, 用 50 mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用无水硫酸镁干燥. 滤液经减压蒸馏和柱层析纯化得到 2.98 g 无色液体化合物 3, 收率 87.2%.

化合物 4 的合成: 将 Cbz-Tyr(*t*Bu)-OH·DCHA(10.18 g, 18.42 mmol)溶解在 40 mL 乙酸乙酯中, 加入 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 0.09 g, 0.74 mmol)和 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC, 3.53 g, 18.42 mmol), 室温下搅拌 15 min 后, 加入溶解在 10 mL 乙酸乙酯中的化合物 3(2.9 g, 12.28 mmol), 继续反应

2 h. 反应完成后, 加入饱和氯化钠水溶液萃取3次, 合并有机相, 用无水硫酸镁干燥. 滤液经减压蒸馏和柱层析纯化得到6.58 g无色液体化合物4, 收率91%.

1.2.2 疏水标签PTESE辅助连续液相合成胸腺五肽 胸腺五肽又名胸腺素, 其氨基酸序列为NH₂-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH, 具有增强人体细胞免疫功能, 调节免疫细胞的作用^[25]. 目前已成功应用于治疗慢性乙型肝炎和自身免疫性疾病, 同时在抗肿瘤和心血管疾病中也具有良好的效果. 利用疏水标签PTESE辅助连续液相合成胸腺五肽的路线如Scheme 3所示.



Scheme 3 Continuous flow liquid-phase synthesis of Thymopentin

氨基酸预活化: 将胸腺五肽序列中后4个氨基酸分别溶解在20 mL乙酸乙酯中, 加入1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl, 4.8 mmol)和1-羟基苯并三唑(HOBt, 4.8 mmol), 室温下搅拌预活化30 min, 备用.

胸腺五肽的连续液相合成: 调节氢气压力为1.0 MPa, 将Cbz-Tyr(tBu)-PTESE(4, 1.18 g, 2 mmol)溶于20 mL乙酸乙酯, 以10 mL/min流速泵入气液混合器中与氢气混合, 再泵入装有钯碳催化剂的填充床反应器脱除Cbz基团, 得到NH₂-Tyr(tBu)-PTESE(5). 分别控制反应液流速为5 mL/min, 5% (质量分数)K₂CO₃水溶液流速为10 mL/min将其泵入到萃取单元, 经液-液分离器分离有机相和水相. 将有机相作为反应液B, 预活化的Cbz-Val-OH(0.53 g, 2.1 mmol)溶液作为反应液A, 分别以10 mL/min的流速将反应液A和反应液B泵入微通道反应器中进行偶联, 得到Cbz-Val-Tyr(tBu)-PTESE(6). 随后, 将反应混合溶液与碱水溶液再泵入萃取单元, 重复以上萃取过程. 经过多次偶联和脱保护, 合成了带有Cbz和PTESE标签的胸腺五肽Cbz-Arg(pbf)-Lys(Boc)-Asp(OtBu)-Val-Tyr(tBu)-PTESE(7). 将化合物7进行脱保护单元后得到化合物8. 使用四正丁基氟化铵(TBAF)在二氯甲烷溶液中将化合物8脱除液相标签PTESE得到化合物9. 加入裂解液TFA/TIS/DODT/H₂O(体积比92.5:2.5:2.5:2.5)对侧链保护基进行裂解, 裂解完成后, 在裂解液中加入冰乙醚, 然后置于离心机(转速为3600 r/min)中进行沉降离心, 最后用氮气吹干, 得到1.02 g白色固体胸腺五肽裸肽化合物10, 收率78%, HPLC纯度为98.8%. 化合物1~10的核磁共振波谱及质谱数据见本文支持信息图S7~S28.

2 结果与讨论

2.1 连续流合成单元条件的优化

连续流反应装置由3个核心单元构成: 偶联单元、脱保护单元和连续萃取单元. 偶联单元和连续萃取单元包括微通道反应器、高压恒流泵及液-液分离器. 脱保护单元由316 L不锈钢管路、高压恒流泵、钯碳填充柱和氢气钢瓶组成. 微反应器、钯碳填充柱和液-液分离器的具体参数如表1所示.

2.1.1 偶联单元条件的优化 以NH₂-Tyr(tBu)-PTESE(5)为底物, 合成Cbz-Val-Tyr(tBu)-PTESE(6)为模板反应考察了偶联反应过程中溶剂、反应温度和流速对偶联效果的影响. 表2结果表明, 在二氯甲

Table 1 Detailed parameters of microchannels, packed bed reactors and liquid-liquid separators

Entry	Glass microchannel reactor	Packed-bed reactor	Liquid-liquid Separator
Materials	Silicon glass	Stainless steel	OB-900 Hydrophobic PTFE membrane
External dimension/mm	152.4×152.4×11.0	Φ10×100	77×77×29
Volume/mL	3	7.85	0.45
Maximum pressure/MPa	2	—	2
Suitable temperature/°C	-25—200	—	< 90
Filling material	—	5% Pd/C catalyst; 6g	—

Table 2 Optimization of continuous flow coupling conditions

Entry	Cbz-AA-OH	Solvent	Temp./°C	Flow rate, X /(mL·min ⁻¹)	Residence time ^a /s	Conversion ^b (%)
1	Cbz-Val-OH	DCM	RT	5	18	>99
2	Cbz-Val-OH	THF	RT	5	18	>99
3	Cbz-Val-OH	2-MeTHF	RT	5	18	78
4	Cbz-Val-OH	EA	RT	5	18	>99
5	Cbz-Val-OH	EA	40	5	18	>99
6	Cbz-Val-OH	EA	60	5	18	>99
7	Cbz-Val-OH	EA	RT	8	11.3	>99
8	Cbz-Val-OH	EA	RT	10	9	>99

a. Residence time in microchannel reactor; *b.* determined by HPLC analysis.

烷(DCM)、四氢呋喃(THF)和乙酸乙酯(EA)中,偶联反应的转化率均大于99%,而在2-甲基四氢呋喃(2-MeTHF)中由于氨基酸溶解性不佳,转化率较低(表2中Entries 1~4)。尽管DCM具有较好的溶解性和高转化率,但萃取过程中容易出现乳化现象,并且DCM本身是一种非绿色溶剂,被归类为2A类致癌物质^[26]。THF与水具有一定的混溶性,导致连续萃取时产物损失较大。反应温度从室温到40和60 °C,偶联反应转化率均大于99%(表2中Entries 4~6)。在流速方面,5, 8和10 mL/min条件下反应转化率均达到99%(表2中Entries 6~8)。综上所述,优化后偶联反应的溶剂、反应温度、流速分别是乙酸乙酯、室温和10 mL/min(表2中Entry 8),偶联反应仅需9.0 s即可完成,且转化率大于99%。

2.1.2 脱保护单元条件优化 以Cbz-Tyr(*t*Bu)-PTESE(**4**)为底物,合成NH₂-Tyr(*t*Bu)-PTESE(**5**)作为模板反应考察了脱保护反应过程中流速、氢气压力、温度和溶剂的影响。表3结果表明,室温下,流速为2, 5, 10和15 mL/min时,反应转化率分别为99%, 99%, 99%和95%(表3中Entries 1~4)。可见,较长的停留时间有利于脱Cbz,而停留时间较短时,氢解反应不彻底。此外,反应温度从室温到40和60 °C,转化率均大于99%(表3中Entries 5和6)。氢气压力从1.0 MPa增加到1.5 MPa,对转化率无显著影响(表3中Entries 7和8)。在溶剂方面,当溶剂为甲醇和四氢呋喃时,反应转化率分别为99%和82%(表3

Table 3 Optimization of continuous flow Cbz-deprotection conditions

Entry	Flow rate, X /(mL·min ⁻¹)	H ₂ pressure/MPa	Temp./°C	Solvent	Residence time ^a /s	Conversion ^b (%)
1	2	1.0	RT	EA	141.3	>99
2	5	1.0	RT	EA	56.5	>99
3	10	1.0	RT	EA	28.3	>99
4	15	1.0	RT	EA	18.8	95
5	10	1.0	40	EA	28.3	>99
6	10	1.0	60	EA	28.3	>99
7	10	0.5	RT	EA	28.3	91
8	10	1.0	RT	MeOH	28.3	>99
9	10	1.0	RT	THF	28.3	82

a. According to the weighing method, the porosity of the filled packed-bed reactor is 40%, and the reaction space volume is 4.71 mL^[27];

Residence time was calculated from the following equation: $T_{r/s} = \frac{4.71 \text{ mL (reaction space volume in the packed-bed reactor)}}{\text{flow rate (mL} \cdot \text{min}^{-1})} \times 60$.

b. Determined by HPLC analysis.

中 Entries 9 和 10)。综上所述,为保证偶联和脱保护单元的连续性,优化后脱保护反应的流速、氢气压力、温度和溶剂分别为 10 mL/min, 1.0 MPa, 室温和乙酸乙酯(表 3 中 Entry 3),脱保护反应仅需 28.3 s 即可完成,且转化率大于 99%。

2.1.3 连续萃取单元条件的优化 萃取除杂效率对合成多肽的纯度的影响较大,这一单元主要是除去过量未反应的氨基酸和偶联试剂。其中,偶联试剂 1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和 1-羟基苯并三唑(HOBt)的水溶性较好,洗涤过程中较易除去,因此,实验中主要测试氨基酸在室温下的萃取洗涤效果。分别选取不同侧链保护基的 Cbz 保护的氨基酸,通过传统分液漏斗萃取和连续流萃取得到的有机相进行分析对比,检测了有机相中氨基酸的残留。

表 4 结果表明,微通道反应器中连续流洗涤效果明显优于传统分液漏斗,对于侧链无保护基的氨基酸,用分液漏斗洗涤 3 次才能完全除去,而采用连续流萃取[水相/有机相(体积比 1:1)]即可完全洗涤干净(表 4 中 Entry 1)。对于带侧链保护基的氨基酸的洗涤除杂较为困难,通过分液漏斗洗涤 3 次难以完全除去,而采用连续萃取通过增大水相流速,调节有机相与水相(体积比 1:2)即可完全除去有机相中的氨基酸(表 4 中 Entries 2~4);其中,苄氧羰基保护的精氨酸和组氨酸由于侧链保护基的分子结构较大,具有一定的疏水性,无论是用分液漏斗还是连续萃取都较难除去(表 4 中 Entries 5 和 6)。幸运的是,脱保护后的氨基酸洗涤效果显著提高(表 4 中 Entries 7 和 8)。因此,脱保护后的萃取过程可以有效避免未完全去除的过量氨基酸和偶联试剂对合成纯度的影响。综上所述,连续流萃取不仅操作简单,而且洗涤效果远高于分液漏斗,采用有机相:相体积比 1:2,在微通道反应器内仅需 12 s 即可完成除杂过程。

Table 4 Comparison of washing effect

Entry	Amino acid	Residues of amino acids in the organic phase ^a (%)					
		Washing times of separating funnel ^b			Microchannel washing flow rate ratio (reaction liquid vs. washing liquid)		
		1	2	3	2:1	1:1	1:2
1	Cbz-Val-OH	3.4	1.3	0	1.1	0	0
2	Cbz-Tyr(tBu)-OH	8.9	3.1	0.7	7.1	0.2	0
3	Cbz-Asp(OtBu)-OH	10.2	3.9	1.3	8.0	0.3	0
4	Cbz-Lys(Boc)-OH	10.1	4.2	1.4	6.5	0.2	0
5	Cbz-Arg(Pbf)-OH	17.4	10.5	4.2	22.5	11.3	3.7
6	Cbz-His(Trt)-OH	18.5	11.4	5.4	19.4	10.1	2.4
7	NH ₂ -Arg(Pbf)-OH	6.7	1.7	0	2.5	0	0
8	NH ₂ -His(Trt)-OH	8.5	2.1	0	2.1	0	0

a. Determined by HPLC analysis; b. entries 1—4: EA: 5%K₂CO₃ = 1:1(molar ratio); entries 5—8: EA: 3%HCl = 1:1(molar ratio).

2.2 固相、连续流液相合成胸腺五肽的效率对比

分别通过固相多肽合成(SPPS)和连续流动液相多肽合成(CF-LPPS)方法合成了 2 mmol 胸腺五肽,产物的纯度和收率列于表 5。通常, SPPS 完成一个偶联、洗涤、脱保护和再洗涤的过程需要 1~1.5 h;而经过连续流单元条件优化后, CF-LPPS 仅需要 1~2 min,显著提高了多肽合成的效率。此外,相较于 SPPS 氨基酸和偶联试剂过量 3~5 倍的投料, CF-LPPS 的等当量投料不仅减少了生产成本,提高了原子经济性,还降低了副反应,提高了产品纯度。从收率来看, SPPS 和 CF-LPPS 二者相当。从规模化生产的角度来看, CF-LPPS 与疏水性标签的结合使后处理纯化过程更简洁,放大生产更容易,为商业化生产提供了便利。

Table 5 Results of thymopentin synthesis via SPPS and CF-LPPS

Method	SPPS	CF-LPPS
Purity(HPLC)	92.5%	98.8%
Yield	80%	78%

2.3 固相、连续液相合成胸腺五肽的物料对比

以合成 1 mol 胸腺五肽为例, 分析对比了 SPPS 和 CF-LPPS 的物料消耗(表 6). CF-LPPS 采用小分子疏水标签 PTESE 替代了 SPPS 中使用的聚合物树脂, 反应在液-液均相体系中进行, 减少了对过量氨基酸和偶联试剂的需求, 更加符合绿色化学的可持续发展理念. 此外, CF-LPPS 使用更加绿色环保的乙酸乙酯作为溶剂, 代替了固相合成中具有生殖毒性的 DMF. PTESE 在酸性、碱性和加氢条件下均表现出稳定性, 通过 Cbz 方案结合连续流技术, 使用可循环的钯碳填充柱进行氢解脱保护反应, 避免了 SPPS 中 Fmoc 方案所需的管制化学品哌啶的使用. 综上所述, 在多肽合成中, 利用这种小分子疏水标签的 CF-LPPS 比 SPPS 展现出更高的合成效率和原子经济性, 不仅减少了原料的使用量, 还使用了更加绿色和安全的溶剂与试剂, 体现了绿色化学的可持续发展原则, 为多肽合成提供了一种更为环保和经济的替代方法.

Table 6 Materials consumption for thymopentin synthesis(unit: kg)

SPPS		CF-LPPS	
CTC Resin (1 mmol·g ⁻¹)	1.00	PTESE	0.24
Fmoc-AA-OH	8.09	Cbz-AA-OH	2.76
Coupling reagent	4.23	Coupling reagent	1.82
DMF	269.18	EA	1.80
Piperidine	4.91	Pd/C	0.006

2.4 过程质量强度数据对比

过程质量强度(Process mass intensity, PMI)是衡量生产工艺绿色化程度的重要指标, 定义为整个生产过程中所消耗的材料(包括原材料、反应物和溶剂)的总质量与目标产物总质量的比值^[28]. PMI 值越低, 表明该合成路线越绿色环保, 更符合可持续发展要求.

以合成 1 mol 胸腺五肽为例, 分别核算了 SPPS 和 CF-LPPS 在合成阶段的 PMI 值(图 1), 同时与小分子化合物合成的 PMI 值^[27]进行了对比. 结果表明, CF-LPPS 的 PMI 值远低于 SPPS 和小分子化合物合成. 溶剂的使用是影响 PMI 的关键因素之一^[29]. 在固相合成中, 由于 DMF 具有优异的树脂溶胀性和溶解能力, 成为首选溶剂与洗涤液, 然而固相合成每接入一个氨基酸均需要 8~10 次的洗涤, 耗费了大量的溶剂, 约占整个合成阶段 PMI 值的 70%, 且 DMF 已被欧洲化学品管理局(ECHA)列为高度关注物质(Substances of very high concern, SVHC), 具有潜在致癌性^[30], 对环境影响显著. 此外, SPPS 非均相反应中使用过量的氨基酸和偶联试剂也是其 PMI 值远高于 CF-LPPS 的主要原因之一.

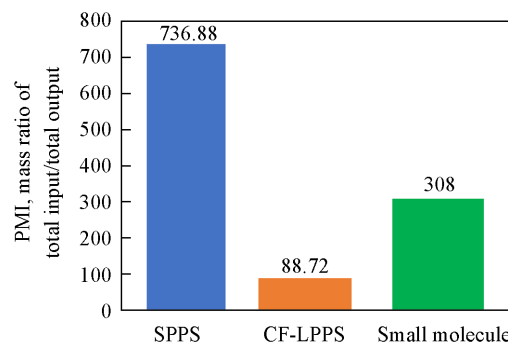


Fig. 1 PMI comparison of SPPS vs. CF-LPPS vs. small molecule synthesis

相比之下, CF-LPPS 结合疏水性标签和连续流动化学技术, 显著降低了溶剂和试剂的消耗, 展现出更高的环境友好性和可持续性, 提升了多肽合成的绿色化水平.

3 结论

设计了一种氟离子敏感的疏水性标签 PTESE, 并结合连续流动化学技术, 开发了新的连续流动多肽合成系统, 包括微通道偶联单元、钯碳柱脱保护单元、微通道萃取单元和液液分离器. 高效绿色地实现了胸腺五肽的连续液相合成, 粗肽纯度达 >98.8%. 与传统固相多肽合成(SPPS)相比, PTESE 标签的使用有效避免了对树脂的依赖, 反应在均相体系中进行, 显著减少了生态毒性较高的 DMF 及受控试剂哌啶的使用, 从而降低了环境污染. 采用四丁基氟化铵(TBAF)高效脱除疏水性标签 PTESE, 同时不

影响肽链中侧链保护基, 可以获得全保护肽链, 拓展了此正交保护疏水性标签的应用空间. 此外, 通过优化连续流偶联、脱保护和萃取单元的反应条件, 使偶联反应时间缩短至 9.0 s, 脱保护反应时间 28.3 s, 连续萃取除杂时间 12.0 s, 平均每个氨基酸的接入时间仅需 1~2 min, 极大地提升了多肽合成的效率. 本文方法不仅为大规模绿色多肽药物的合成提供了一种新思路, 同时为全保护肽段的合成提供了一种新策略, 对多肽药物工业化和可持续发展具有重要意义.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240544>.

参 考 文 献

- [1] Wang L., Wang N. X., Zhang W. P., Cheng X. R., Yan Z. B., Shao G., Wang X., Wang R., Fu C. Y., *Signal Transduct. Tar.*, **2022**, 7(1), 48
- [2] Cabri W., Cantelmi P., Corbisiero D., Fantoni T., Ferrazzano L., Martelli G., Mattellone A., Tolomelli A., *Front. Mol. Biosci.*, **2021**, 8, 697586
- [3] Rasmussen J. H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26(10), 2914—2918
- [4] Al Musaimi O., de la Torre B. G., Albericio F., *Green Chem.*, **2020**, 22(4), 996—1018
- [5] Liu H., Liu D. M., Sun H. T., Xia C., Su X. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2024**, 45(7), 20240024(刘豪, 刘冬梅, 孙浩田, 夏超, 苏贤斌. 高等学校化学学报, **2024**, 45(7), 20240024)
- [6] Martin V., Egelund P. H. G., Johansson H., Le Quement S. T., Wojcik F., Pedersen D. S., *RSC Adv.*, **2020**, 10(69), 42457—42492
- [7] Clapperton A. M., Vera K. N. M., Babi J., Tran H., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2023**, 11(35), 13024—13032
- [8] Meroni D., Djellabi R., Ashokkumar M., Bianchi C. L., Boffito D. C., *Chem. Rev.*, **2022**, 122(3), 3219—3258
- [9] Raheem S. J., Schmidt B. W., Solomon V. R., Salih A. K., Price E. W., *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32(7), 1204—1213
- [10] Collins J. M., Singh S. K., White T. A., Cesta D. J., Simpson C. L., Tubb L. J., Houser C. L., *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 8168
- [11] Zhang L. M., Jiang Z. Q., Yang X., Qian Y. X., Wang M. X., Wu S., Li L. Y., Jia F., Wang Z. H., Hu Z. Y., Zhao M. Z., Tang X. Y., Li G., Shang H. B., Chen X. Y., Wang W. Z., *Adv. Mater.*, **2023**, 35(2), 2207330
- [12] Martelli G., Cantelmi P., Palladino C., Mattellone A., Corbisiero D., Fantoni T., Tolomelli A., Macis M., Ricci A., Cabri W., Ferrazzano L., *Green Chem.*, **2021**, 23(20), 8096—8107
- [13] Yano S., Mori T., Kubota H., *Molecules*, **2021**, 26(12), 3497
- [14] Li H. D., Wang L. J., Zhang L. Y., Yang Y. X., Jin Y. K., Zhang J., Liang T. G., *Sustain. Chem. Pharm.*, **2024**, 41, 101684
- [15] Sharma A., Kumar A., de la Torre B. G., Albericio F., *Chem. Rev.*, **2022**, 122(16), 13516—13546
- [16] Okada Y., Takasawa R., Kubo D., Iwanaga N., Fujita S., Suzuki K., Suzuki H., Kamiya H., Chiba K., *Org. Process Res. Dev.*, **2019**, 23(11), 2576—2581
- [17] Li H. D., Chao J., Zhang Z. X., Tian G., Li J., Chang N. H., Qin C. G., *Org. Lett.*, **2020**, 22(9), 3323—3328
- [18] Wu A., Ramakrishna I., Hattori T., Yamamoto H., *Org. Biomol. Chem.*, **2022**, 20(44), 8685—8692
- [19] Masui H., Fuse S., *Org. Process Res. Dev.*, **2022**, 26(6), 1751—1765
- [20] Hartrampf N., Saebi A., Poskus M., Gates Z. P., Callahan A. J., Cowfer A. E., Hanna S., Antilla S., Schissel C. K., Quartararo A. J., Ye X., Mijalis A. J., Simon M. D., Loas A., Liu S., Jessen C., Nielsen T. E., Pentelute B. L., *Science*, **2020**, 368(6494), 980—987
- [21] Fuse S., Mifune Y., Nakamura H., Tanaka H., *Nat. Commun.*, **2016**, 7, 13491
- [22] Otake Y., Adachi K., Yamashita Y., Iwanaga N., Sunakawa H., Shamoto T., Ogawa J. I., Ito A., Kobayashi Y., Masuya K., Fuse S., Kuboa D., Itoh H., *React. Chem. Eng.*, **2023**, 8(4), 863—870
- [23] Sieber P., *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60(8), 2711—2716
- [24] Wagner M., Kunz H., *Synlett*, **2000**, 2000(3), 400—402
- [25] Seifert C. W., Paniagua A., White G. A., Cai L., Li G. G., *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 2016(9), 1714—1719
- [26] Egelund P. H. G., Jadhav S., Martin V., Castro H. J., Richner F., Le Quement S. T., Dettner F., Lechner C., Schoenleber R., Pedersen D. S., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2021**, 9(42), 14202—14215
- [27] Osako T., Torii K., Tazawaa A., Uozumi Y., *RSC Adv.*, **2015**, 5(57), 45760—45766
- [28] Kekessie I., Wegner K., Martinez I., Kopach M. E., White T. D., Tom J. K., Kenworthy M. N., Gallou F., Lopez J., Koenig S. G., Payne P. R., Eissler S., Arumugam B., Li C. F., Mukherjee S., Isidro-Llobet A., Ludemann-Hombourger O., Richardson P., Kittelmann J., Pedersen D. S., van den Bos L. J., *J. Org. Chem.*, **2024**, 89(7), 4261—4282
- [29] Constable D. J. C., Jimenez-Gonzalez C., Henderson R. K., *Org. Process Res. Dev.*, **2007**, 11(1), 133—137
- [30] Martin V., Jadhav S., Egelund P. H. G., Liffert R., Castro H. J., Krüger T., Haselmann K. F., Le Quement S. T., Albericio F., Dettner F., Lechner C., Schönleber R., Pedersen D. S., *Green Chem.*, **2021**, 23(9), 3295—3311

(Ed.: L, V, K)