

含两对二硫键多肽化合物的高效简便合成

张 滨^{1,2}, 代先东¹, 孟凡华¹, 李玉龙², 吕子睿¹

(1. 核生化灾害防护化学全国重点实验室, 北京 102205;

2. 四川轻化工大学化学与环境工程学院, 自贡 643000)

摘要 采用三苯甲基(Trt)和乙酰氨基(Acm)作为半胱氨酸巯基侧链的保护基团, 分别以 H_2O_2 和 I_2 为氧化剂或脱保护试剂, 通过优化反应条件实现了“一锅”分步精准合成含有两对二硫键的多肽化合物. 该反应策略在中间步骤无需提纯, 操作简便且反应速度较快, 两对二硫键的构建可在20 min内完成. 研究表明, 该反应策略具有广泛的底物适用性. 利用该策略制备了一系列具有生物活性的多肽化合物, 包括含有色氨酸和甲硫氨酸的多肽, 并均获得了较高的总产率.

关键词 二硫键; 一锅法; 精准; 高效; 合成

中图分类号 O629

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20250233

Efficient and Simple Synthesis of Polypeptide Compounds Containing Two Pairs of Disulfide Bonds

ZHANG Bin^{1,2}, DAI Xiandong¹, MENG Fanhua¹, LI Yulong^{2*}, LYU Zirui^{1*}

(1. State Key Laboratory of Chemistry for NBS Hazards Protection, Beijing 102205, China;

2. College of Chemical and Environmental Engineering,

Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract Using triphenylmethyl(Trt) and acetaminomethyl(Acm) as the protective groups of the cysteine thiol side chain, and H_2O_2 and I_2 as oxidants, respectively, through the optimization of reaction conditions, the "one-pot" step-by-step precise synthesis of polypeptide compounds containing two pairs of disulfide bonds was achieved. This reaction strategy does not require purification of the intermediate products, is easy to operate, and has a fast reaction rate. The two pairs of disulfide bonds in the polypeptide were completely constructed within 20 minutes. The research results show that this reaction strategy has wide substrate applicability. A series of biologically active peptide compounds, including those containing tryptophan and methionine, was obtained by adopting this strategy with high overall yields.

Keywords Disulfide bond; One-pot method; Precision; Efficient; Synthesis

二硫键作为一种重要的共价键, 广泛存在于多种功能性蛋白质和多肽中. 二硫键的形成限制了肽或蛋白质的构象, 并在其稳定性、结构完整性及折叠过程中发挥着关键作用^[1,2]. 其不仅增强了一些肽或蛋白质的抗水解能力, 还在某些细菌的生存与致病机制中起到了至关重要的作用. 因此, 二硫键在维持一些多肽或蛋白质的生物活性方面同样不可或缺^[3-5].

收稿日期: 2025-08-25. 网络首发日期: 2025-10-15.

联系人简介: 吕子睿, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事多肽药物发现及活性方面的研究. E-mail: lvzirui@sklnbpc.cn

李玉龙, 男, 博士, 教授, 主要从事活性化合物合成方法学方面的研究. E-mail: yu_longli@suse.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22373056)和四川轻化工大学652科研创新研究团队项目(批准号: SUSE652A014)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22373056) and the Scientific Research and Innovation Team Program of Sichuan University of Science and Engineering, China(No.SUSE652A014).

多肽化合物中二硫键的构建一直是多肽合成领域的研究热点和技术难点之一。尤其是在实现多对二硫键的精准构建时,不仅面临着构建过程中的困难,还需经过多步纯化,往往导致总产率不高。目前,合成一对二硫键的氧化方法包含经典的空气氧化法^[6]、过氧化氢氧化法^[7,8]、碘氧化法^[9]、铁氰化物氧化法^[10],以及最新报道的使用生物兼容性较好的二氰基钴啉醇酰胺作为氧化试剂的绿色氧化方法等^[11]。而对于含有两对二硫键的多肽化合物的氧化主要采用一步氧化^[12]和区域选择性氧化策略^[13]。由于一步氧化策略可能得到错配异构体,因此常采用区域选择策略构建正确二硫键配对的目标产物。如, Huo 等^[14]在合成 α -conotoxin SI 时使用了三苯甲基(Trt)和乙酰胺甲基(Acm)两个经典的半胱氨酸侧链的正交保护组合,利用区域选择性氧化策略,首先在 pH=7.0 的磷酸盐缓冲液中构建第一对二硫键,然后在 MetSeO 试剂(pH=2)作用下脱除 Acm 保护基团,氧化形成第二对二硫键,该方法还可用于含有蛋氨酸的多肽合成中。区域选择策略虽可避免二硫键错配产物的生成,但该策略通常操作较繁琐,需要多次分离纯化,会造成中间产物的损失,导致总产率降低。近年来,也有一些研究采用区域选择“一锅”的模式合成含两对二硫键的多肽化合物^[14-16],分别采用不同的半胱氨酸巯基保护基团,有对酸或碱敏感的半胱氨酸巯基保护基团^[17],也有光敏的半胱氨酸巯基保护基团^[18-21],通过控制反应条件,一锅分步区域选择性合成了含多对二硫键的多肽化合物。但是其中一些方法反应条件较为苛刻,有的需使用 Pd(II) 等金属作为脱保护试剂^[15],有的氧化剂过度氧化将多肽中的甲硫氨酸或色氨酸氧化,进而限制了一些多肽类化合物中二硫键的构建。

随着氧化试剂和巯基保护基团的不断发展,二硫键的构建策略得到了极大拓展。如, Wang 等^[22]开发了一种新型的基于喹啉的光不稳定保护基团 PPZQ[7-(Piperazin-1-yl)-2-(methyl)quinoliny],用于半胱氨酸(Cys)的保护与去保护,以促进蛋白质的高效组装,特别是在含有多个半胱氨酸或二硫键的复杂蛋白质合成中展现出重要应用价值。Liu 等^[23]开发了“可移除糖基化修饰策略”,用于化学合成具有正确二硫键结构的富含二硫键蛋白质。该方法通过引入临时的 *O*-GlcNAc 糖基化修饰促进蛋白质的正确折叠和二硫键形成,之后再移除糖基,得到了具有天然结构和活性的目标蛋白。Wu 等^[24-26]在二硫键的精准构建方面也进行了大量研究:从利用天然氨基酸基序(CXC 三肽基序)^[24],发展到引入非天然氨基酸(青霉胺 Pen)进行精细调控^[25],最终实现使用小分子交联剂进行高效、精确的多环锁定^[26],解决了稳定性(二硫键)和建库兼容性(非天然氨基酸)问题,产出的多环肽既稳定又适用于治疗开发。上述方法特别适用于多肽拓扑结构的开发,但也存在一些问题,如有些方法操作繁琐、引入非天然氨基酸、需要引入特定结构导致普适性差等。本文利用常用的反应试剂,构建了一种高效合成分子内两对二硫键的通用方法,通过优化反应条件,实现了“一锅”分步高效精准合成含两对二硫键的多肽化合物。该方法操作简便,普适性较强。采用该方法合成了多肽化合物 SI, Vc1.1, ImI, Apamin 及含甲硫氨酸的十六肽,均得到了良好的总产率。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 纯度 \geq 99.5%)和无水甲醇(MeOH, 纯度 \geq 99.5%),北京市津同乐泰化工产品有限公司;乙腈(ACN, 纯度 \geq 99.9%),北京伊诺凯科技有限公司;*N,N'*-二异丙基碳二酰亚胺(DIC, 纯度 \geq 98.5%)、二氯甲烷(DCM, 纯度 \geq 99.5%)、碘(I₂, 纯度 \geq 99.8%)、*L*-抗坏血酸(纯度 \geq 99.7%)、甲基叔丁基醚(纯度 \geq 98.0%)和碱2-胍氧乙酸乙酯(Oxyrna, 纯度 \geq 98%),上海阿拉丁生化科技有限公司;树脂 Rink Amide-AM Resin(取代度 0.74 mmol/g); Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-Arg(O^tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH 和 Fmoc-Gln(Trt)-OH, 纯度均 \geq 98.5%, 吉尔生化(上海)有限公司。

1100 Series 分析型高效液相色谱仪(HPLC)、ZORBAX 300SB-C₁₈ 半制备柱(9.4 mm \times 250 mm,

5 μm)、1260 Infinity 制备型高效液相色谱仪(RP-HPLC)、Agilent Prep C₁₈柱(30 mm×250 mm, 10 μm)，美国安捷伦科技有限公司；Vydac 218TP型分析柱(5 μm , 4.6×100 mm)，美国格雷斯公司；Liberty Blue型全自动微波多肽合成仪，美国培安有限公司。

1.2 实验过程

1.2.1 多肽化合物 SI 线型肽的合成 多肽化合物 SI 结构：H-Ile-²Cys-³Cys-Asn-Pro-Ala-⁷Cys-Gly-Pro-Lys-Tyr-Ser-¹³Cys-NH₂(Cys2-Cys7, Cys3-Cys13)。

多肽 SI 线型前体的合成. 采用 Fmoc 固相多肽合成法(Fmoc-SPPS)合成 SI 线型前体，以 Rink amide Resin(0.74 mmol/g, 0.337 g)为固相载体. 配制实验所需氨基酸/DMF 溶液(0.2 mmol/L)、DIC/DMF 溶液(1 mol/L)和 Oxyrna/DMF 溶液(1 mol/L)，设置多肽序列，在微波多肽合成仪中进行线型肽的合成. 反应结束后，依次用 DMF 和 DCM 洗涤多肽树脂，用 MeOH 收缩多肽树脂，过滤除去溶剂，对滤饼进行干燥. 将干燥后的多肽树脂加入 12 mL 裂解液($V_{\text{TFA}}:V_{\text{TIS}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=95:2.5:2.5$)中，常温下反应 1.5 h. 过滤反应液，将滤液除溶剂至剩余少量黏稠物，加入甲基叔丁基醚沉出粗肽，离心，用甲基叔丁基醚洗涤 2~3 次后经干燥得粗肽. 采用制备型液相色谱对线型肽进行分离纯化：将所得粗肽充分溶解，使用 Agilent Prep C₁₈ 色谱柱，流速为 20 mL/min，采用 15%~55% 流动相 B(乙腈/0.1%TFA)/0~40 min 的梯度洗脱，收集目标化合物，冻干得到 SI 线型肽 49 mg，色谱纯度为 97%。

多肽化合物 SI 中两对二硫键的“一锅法”快速构建. 将上述纯化后的 SI 线型肽(1.5 mg, 1 μmol)溶解于 1.0 mL 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 溶液中，配成浓度为 1 mmol/L 的溶液，室温下加入 10 μmol H₂O₂ 反应 4 min，得到含一对二硫键的中间体，HPLC 产率为 93%。随后，用体积分数为 10% 的 TFA 溶液将反应体系的 pH 值调节至 1，并加入 2 μmol (100 μL , 5 mg/mL) I₂/ACN 溶液反应 15 min，再加入 200 μL 5 mg/mL L-抗坏血酸溶液至反应溶液变为无色. 采用 ZORBAX 300SB-C₁₈ 半制备色谱柱进行 RP-HPLC 纯化，流速为 2 mL/min，采用 0~40% 流动相 B(乙腈/0.1%TFA)/0~40 min 的梯度洗脱，得 SI 纯品 0.84 mg，HPLC 纯度为 98%，总产率为 62%。

1.2.2 多肽化合物 ImI 的合成 多肽化合物 ImI 结构：H-Gly-²Cys-³Cys-Ser-Asp-Pro-Arg-⁸Cys-Ala-Trp-Arg-¹²Cys-NH₂(Cys2-Cys8, Cys3-Cys12)。

多肽化合物 ImI 线型前体的合成. 采用 Fmoc 固相多肽合成法，以 Rink amide Resin(0.74 mmol/g, 0.337 g)为固相载体，用微波多肽合成仪进行合成，然后再进行裂解、纯化及冻干. 实验条件同 SI 线型前体的合成，最终得到 ImI 线型肽 22 mg，色谱纯度为 99%。

多肽化合物 ImI 中两对二硫键的“一锅法”快速构建. 将上述纯化后的 ImI 线型肽(1.5 mg, 1 μmol)溶解于 1.0 mL 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 溶液中，配成浓度为 1 mmol/L 的溶液，室温下加入 10 μmol H₂O₂ 反应 4 min，得到含一对二硫键的中间体，HPLC 产率为 81%。随后，用体积分数为 10% 的 TFA/水溶液将反应体系的 pH 值调节至 1，并加入 2 μmol (100 μL , 5 mg/mL) I₂/ACN 溶液反应 15 min，再加入 200 μL 5 mg/mL L-抗坏血酸溶液至反应溶液变为无色. 采用 ZORBAX 300SB-C₁₈ 半制备色谱柱进行 RP-HPLC 纯化，流速为 2 mL/min，采用 0~40% 流动相 B(乙腈/0.1%TFA)/0~40 min 的梯度洗脱，得到 ImI 纯品 0.81 mg，HPLC 纯度为 95%，总产率为 60%。

1.2.3 多肽化合物 Vc1.1 的合成 多肽化合物 Vc1.1 结构：H-Gly-²Cys-³Cys-Ser-Asp-Pro-Arg-⁸Cys-Asn-Tyr-Asp-His-Pro-Glu-Ile-¹⁶Cys-NH₂(Cys2-Cys8, Cys3-Cys16)。

多肽化合物 Vc1.1 线型前体的合成. 采用 Fmoc 固相多肽合成法，以 Rink amide Resin(0.74 mmol/g, 0.337 g)为固相载体，用微波多肽合成仪进行合成，然后再进行裂解、纯化及冻干. 实验条件同 SI 线型前体的合成，最终得到 Vc1.1 线型肽 33 mg，色谱纯度为 98%。

多肽化合物 Vc1.1 中两对二硫键的“一锅法”快速构建. 将上述纯化后的 Vc1.1 线型肽(1.9 mg, 1 μmol)溶解于 1.0 mL 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 溶液中，配成浓度为 1 mmol/L 的溶液，室温下加入 10 μmol H₂O₂ 反应 4 min，得到含一对二硫键的中间体，HPLC 产率为 83%。随后，用体积分数为 10% 的 TFA/水溶液将反应体系的 pH 值调节至 1，并加入 2 μmol (100 μL , 5 mg/mL) I₂/ACN 溶液反应 15 min，加入

200 μL 5 mg/mL *L*-抗坏血酸溶液至反应溶液变为无色。采用 ZORBAX 300SB- C_{18} 半制备色谱柱进行 RP-HPLC 纯化, 流速为 2 mL/min, 采用 0~40% 流动相 B(乙腈/0.1%TFA)/0~40 min 的梯度洗脱, 得到 Vc1.1 纯品 0.97 mg, HPLC 纯度为 99%, 总产率为 54%。

1.2.4 含甲硫氨酸十六肽的合成 含甲硫氨酸十六肽的结构: $\text{H-Gly-}^2\text{Cys-}^3\text{Cys-Ser-Asp-Pro-Phe-}^8\text{Cys-Asn-Met-Asn-Asn-Pro-Asp-Tyr-}^{16}\text{Cys-NH}_2$ (Cys2-Cys8, Cys3-Cys16)。

含甲硫氨酸十六肽线型前体的合成。采用 Fmoc 固相多肽, 以 Rink amide Resin (0.74 mmol/g, 0.337 g) 为固相载体, 用微波多肽合成仪进行合成, 然后再进行裂解、纯化及冻干。实验条件同 SI 线型前体的合成, 最终得到含甲硫氨酸十六肽的线型前体 27 mg, 色谱纯度为 96%。

含甲硫氨酸十六肽中两对二硫键的“一锅法”快速构建。将上述纯化后的含甲硫氨酸十六肽线型前体 (1.9 mg, 1 μmol) 溶解于 1.0 mL 0.1 mol/L NH_4HCO_3 溶液中, 配成浓度为 1 mmol/L 的溶液, 室温下加入 10 μmol H_2O_2 反应 4 min, 得到含一对二硫键的中间体, HPLC 产率为 90%。随后, 用体积分数为 10% 的 TFA/水溶液将反应体系的 pH 值调节至 1, 并加入 2 μmol (100 μL , 5 mg/mL) I_2/ACN 溶液反应 15 min, 再加入 200 μL 5 mg/mL *L*-抗坏血酸溶液至反应溶液变为无色。采用 ZORBAX 300SB- C_{18} 半制备色谱柱进行 RP-HPLC 纯化, 流速为 2 mL/min, 采用 0~40% B 流动相(乙腈/0.1%TFA)/0~40 min 的梯度洗脱, 得到含甲硫氨酸十六肽纯品 0.98 mg, HPLC 纯度为 99%, 总产率为 55%。

1.2.5 多肽化合物 Apamin 的合成 多肽化合物 Apamin 结构: $\text{H-Gly-}^2\text{Cys-}^3\text{Cys-Ser-Asp-Pro-Arg-}^8\text{Cys-Asn-Tyr-Asp-His-Pro-Glu-Ile-}^{16}\text{Cys-NH}_2$ (Cys2-Cys8, Cys3-Cys16)。

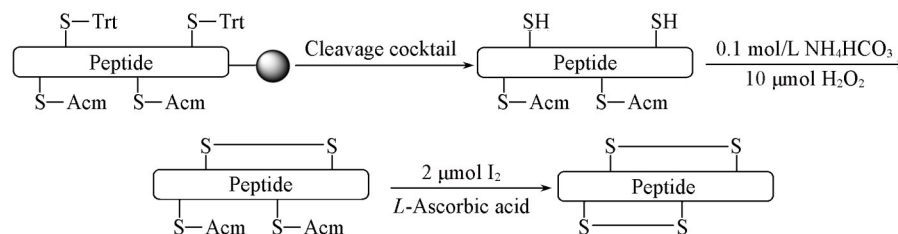
多肽化合物 Apamin 线型前体的合成。采用 Fmoc 固相多肽合成法, 以 Rink amide Resin (0.74 mmol/g, 0.337 g) 为固相载体, 采用微波多肽合成仪进行合成, 然后再进行裂解、纯化及冻干。实验条件同 SI 线型前体的合成, 最终得到 Apamin 线型肽 35 mg, 色谱纯度为 94%。

多肽化合物 Apamin 中两对二硫键的“一锅法”快速构建。将上述纯化后的 Apamin 线型肽 (2.2 mg, 1 μmol) 溶解于 1.0 mL 0.1 mol/L NH_4HCO_3 溶液中, 配成浓度为 1 mmol/L 的溶液, 室温下加入 10 μmol H_2O_2 反应 4 min, 得到含一对二硫键的中间体, HPLC 产率为 80%。随后, 用体积分数为 10% 的 TFA/水溶液将反应体系调节 pH 值至 1, 并加入 2 μmol (100 μL , 5 mg/mL) I_2/ACN 溶液反应 15 min, 再加入 200 μL 5 mg/mL *L*-抗坏血酸溶液至反应溶液变为无色。采用 ZORBAX 300SB- C_{18} 半制备色谱柱进行 RP-HPLC 纯化, 流速为 2 mL/min, 采用 0~40% 流动相 B(乙腈/0.1%TFA)/0~40 min 的梯度洗脱, 得到 Apamin 纯品 1.05 mg, HPLC 纯度为 99%, 总产率为 52%。

2 结果与讨论

多肽化合物中多二硫键的“一锅法”合成是近年来多肽药物合成研发领域的重要突破。主要通过优化保护基策略、氧化剂选择以及其它反应条件, 逐步实现“一锅”分步构建二硫键。与传统的区域选择性构建多对二硫键的方法相比, 该策略克服了中间产物提纯造成损失而导致总产率低的缺点, 在构建每对二硫键后无需提纯, 只需要改变反应条件即可直接进行下一对二硫键的构建。由于二硫键在碱性条件下容易发生交换反应, 为了维持已构建二硫键的稳定性, 后续二硫键的构建应在酸性条件下进行, 因此, 在构建第二对二硫键时需要选择合适的半胱氨酸巯基保护基团, 该保护基团在酸性条件下(如裂解液)不易脱除, 但在其它试剂的作用下可以被脱除, 且反应条件较为温和。三苯甲基(Trt)和乙酰氨基(Acm)是较为常用的半胱氨酸巯基保护基团, Trt 是酸敏感型半胱氨酸保护基团, 在多肽从树脂上裂解下来时即可被脱除, 并将需要氧化的巯基裸露出来。Acm 保护基团在碱性条件下稳定, 在酸性条件下需要在碘^[27]或钡(II)^[15]等试剂作用下脱除。Trt 和 Acm 两种半胱氨酸保护基团的脱除条件符合“一锅法”分步构建二硫键所需要的反应条件。此外, “一锅法”的反应策略对第一对二硫键构建的反应条件也有较高要求, 要尽量避免引入或产生较多的杂质而影响第二对二硫键的构建。 H_2O_2 是一种较为绿色的氧化试剂^[9], 反应后不会向体系中引入新的杂质, 且经实验证明, 在碱性条件下 H_2O_2 不会将 Met 侧链氧化。基于此, 本文以 Trt 和 Acm 作为半胱氨酸巯基的正交保护基团, 分别使用 H_2O_2 和 I_2 作为

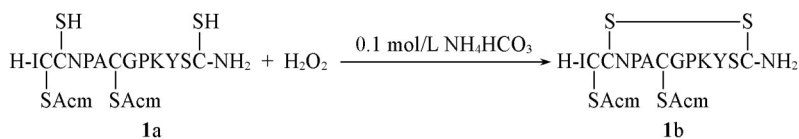
氧化试剂或脱保护试剂, 通过优化反应条件, 实现了“一锅”精准合成含两对二硫键的多肽化合物 (Scheme 1).



Scheme 1 Synthetic strategy of polypeptide compounds containing two pairs of disulfide bonds by the "one-pot method"

2.1 含两对二硫键的多肽化合物SI的“一锅”合成

为了探索最优反应条件, 选择含有13个氨基酸残基的SI肽作为合成方法学研究的模型化合物. 首先通过固相合成法(SPPS)制备线型SI肽, 其中Cys3和Cys13用Trt保护, Cys2和Cys7用AcM保护. Trt保护基团在裂解时便可脱除, 并形成游离的巯基(—SH), 得到中间体1a(HPLC及高分辨质谱图见本文支持信息图S1和S2); 再依次使用H₂O₂和I₂作为氧化试剂或脱保护试剂进行反应, 通过“一锅”合成策略得到正确配对的两对二硫键. 在构建第一对二硫键时, 首先考察反应时间的影响(Scheme 2). 参照文献[9]方法, 室温下将SI前体1a溶解于0.1 mol/L NH₄HCO₃水溶液中, 配成浓度为1 mmol/L的溶液, 加入10 μmol H₂O₂进行反应, 利用HPLC监测反应进程. 每间隔1 min取样, 并用TFA终止反应, 结果显示反应4 min时, 化合物1b的产率达到93%(表1中Entry 4, 化合物的HPLC及高分辨质谱图见本文支持信息图S3和S4), 但随着反应时间的增加, 化合物1b的产率略有下降. 最终确定该步的最优反应时间为4 min.



Scheme 2 Construction of the first pair of disulfide bonds in SI

Table 1 Influence of different reaction time on the construction of the first pair of disulfide bonds in SI

Entry	Buffer solution	Concentration/(mmol·L ⁻¹)	<i>n</i> (H ₂ O ₂)/μmol	Reaction time/min	HPLC yield of compound 1b(%)
1	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	1	80
2	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	2	84
3	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	3	85
4	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	4	93
5	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	5	91
6	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	6	89
7	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	1	10	10	81

实验考察了H₂O₂用量对反应的影响. 当H₂O₂用量从前期的10 μmol降到7 μmol时(表2中Entries 3和4), 反应4 min后, HPLC检测结果显示原料已反应完全, 化合物1b的产率为86%. 继续降低H₂O₂的用量(表2中Entries 1和2), 降到2 μmol时(表2中Entry 1), 反应4 min后, HPLC检测原料1a未反应完全, 说明随着H₂O₂用量的降低, 反应速度变慢. 但当H₂O₂的用量增加到20 μmol时(表2中Entry 5), 产物1b的产率仅有74%. 这有可能是因为大量过量的H₂O₂导致其它副反应发生, 最终选择过氧化氢的用量为10 μmol.

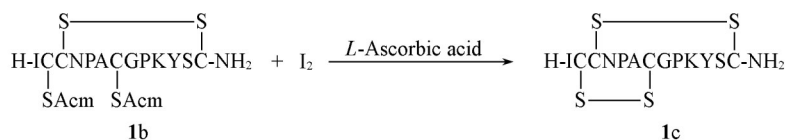
实验还考察了缓冲溶剂NH₄HCO₃浓度对反应的影响. 结果表明, 增加NH₄HCO₃溶液的浓度对化合物1b产率的影响不大(表2中Entries 4, 6~8). 因此从经济、环保的角度选择0.1 mol/L NH₄HCO₃作为缓冲溶液的最佳浓度. 综上所述, 选择在0.1 mol/L NH₄HCO₃的缓冲体系中, 以10 μmol H₂O₂作为氧化试

Table 2 Effect of the dosage of H₂O₂ and the concentration of NH₄HCO₃ solution on the construction of the first pair of disulfide bonds in SI

Entry	Buffer solution	$n(\text{H}_2\text{O}_2)/\mu\text{mol}$	Reaction time/min	HPLC yield of compound 1b (%)
1	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	2	4	61
2	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	4	4	83
3	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	7	4	86
4	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	10	4	93
5	0.1 mol/L NH ₄ HCO ₃	20	4	74
6	0.2 mol/L NH ₄ HCO ₃	10	4	90
7	0.5 mol/L NH ₄ HCO ₃	10	4	93
8	1.0 mol/L NH ₄ HCO ₃	10	4	89

剂, 反应4 min, 最终以93%的产率构建了第一对二硫键。

在第一对二硫键形成后, 用TFA调节反应体系pH值为1(Scheme 3), 分别考察了反应时间(表3中Entries 2~7)和碘的用量(表3中Entries 1, 3, 8和9)对反应的影响, 利用HPLC监测反应情况. 实验结果表明, 当碘的用量为2 μmol 且反应15 min时, 反应效果最好, 两步氧化反应得到产物SI的总产率达到62%(图1). 化合物的HPLC及高分辨质谱图见本文支持信息图S5和S6.



Scheme 3 Construction of the second disulfide bond in SI

Table 3 Effect of iodine dosage and reaction time on total SI yield

Entry	$n(\text{I}_2)/\mu\text{mol}$	Reaction time/min	Isolated yield of compound 1c (%)	Entry	$n(\text{I}_2)/\mu\text{mol}$	Reaction time/min	Isolated yield of compound 1c (%)
1	1	15	48	6	2	60	59
2	2	10	53	7	2	90	60
3	2	15	62	8	3	15	56
4	2	20	59	9	5	15	44
5	2	30	54				

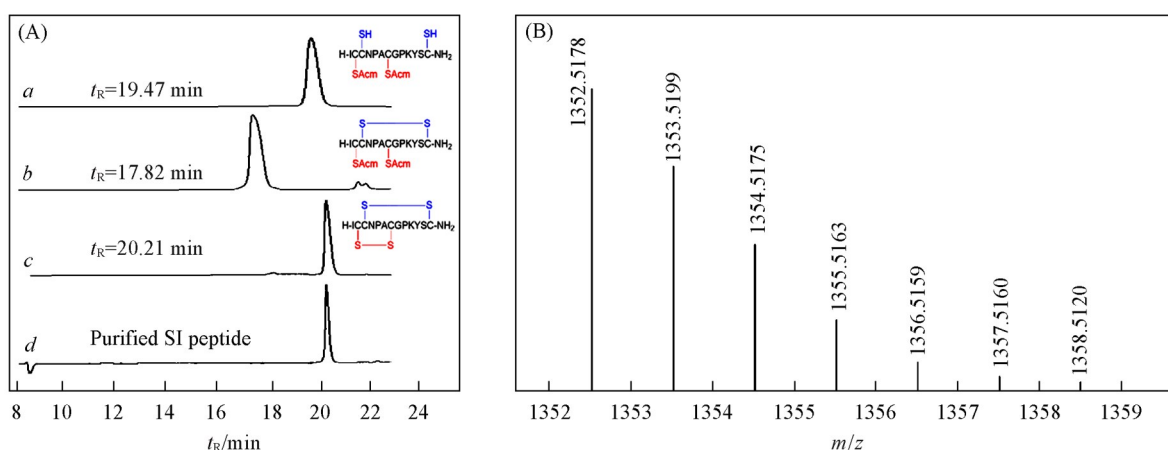
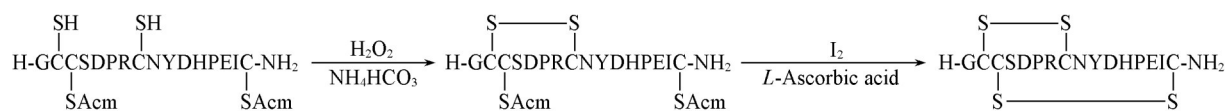


Fig. 1 HPLC chromatograms(A) of linear SI with two free thiol groups(Cys3 and Cys13) and two cysteine residues protected by AcM (Cys2 and Cys7)(a), reaction of linear SI with H₂O₂ to construct the first disulfide bond in SI(b), reaction mixture of treated with I₂ to construct the second disulfide bond in SI(c), purified SI(d), and the deconvoluted HRMS spectrum of SI (m/z 1352. 5178, calcd. m/z 1352. 5207)(B)

HRMS spectrum of SI is shown in Fig.S6 of SI.

2.2 “一锅”策略合成含两对二硫键的多肽化合物

为了考察该方法的底物适用性,用其合成了一系列具有生物活性的含两对二硫键的多肽化合物(Scheme 4).首先选择从维多利亚芋螺中提取的多肽化合物Vc1.1,研究显示Vc1.1具有镇痛活性^[28],其中含有16个氨基酸残基和两对二硫键(Cys2和Cys8, Cys3和Cys16).先通过固相合成法制备了该肽的线型前体,其中Cys2和Cys8巯基使用Trt保护,Cys3和Cys16巯基使用Acm保护基团.通过“一锅”区域选择性方法在20 min内合成了Vc1.1,且总产率达到54%(图2).相关中间体及化合物Vc1.1的HPLC及高分辨质谱图见本文支持信息图S7~图S12.



Scheme 4 "One-pot" precise synthesis of polypeptide compound Vc 1.1

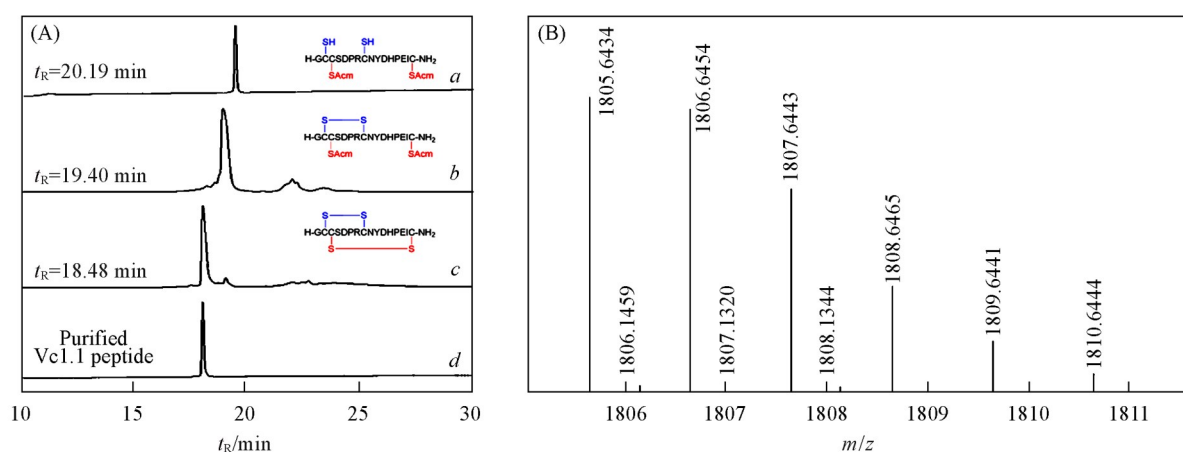
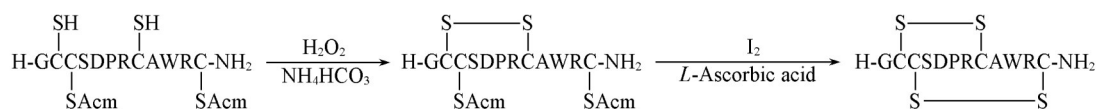


Fig. 2 HPLC chromatograms(A) of linear Vc 1.1 with two free thiol groups(Cys2 and Cys8) and two cysteine residues protected by Acm(Cys3 and Cys16)(a), reaction of linear Vc 1.1 with H_2O_2 to construct the first disulfide bond in Vc 1.1(b), reaction mixture of treated with I_2 to construct the second disulfide bond in Vc 1.1(c), purified Vc 1.1(d), and the deconvoluted HRMS spectrum of Vc 1.1(m/z 1805.6434, calcd. m/z 1805.6451)(B)

HRMS spectrum of Vc 1.1 is shown in Fig. S12 of SI.

为了探究该方法是否适用于含色氨酸残基多肽化合物的合成,实验选择合成多肽化合物ImI(Scheme 5),该肽对青蛙的神经肌肉受体具有较高活性^[29].ImI由12个氨基酸残基组成,含有两对二硫键(Cys2和Cys8, Cys3和Cys12),且10位为色氨酸(Trp).首先通过固相合成法制备了该多肽的线型前体,其中2位和8位的半胱氨酸用Trt保护,3位和12位用Acm进行修饰,利用“一锅”反应策略在20 min内合成了ImI,且总产率达到60%,且未发现Trp被氧化产物(图3).相关中间体及化合物ImI的HPLC及高分辨质谱图见本文支持信息图S13~图S18.



Scheme 5 "One-pot" precise synthesis of polypeptide compound ImI

为了进一步验证该方法对含甲硫氨酸多肽的适用性,选择文献[14]报道的含甲硫氨酸的多肽化合物作为目标物,该肽含有16个氨基酸残基,在2位和8位的半胱氨酸之间以及3位和16位的半胱氨酸之间形成两对二硫键,其中2位和8位的半胱氨酸用Trt保护,3位和16位用Acm保护.在20 min内合成了正确配对的目标多肽(Scheme 6),反应总产率达到55%,且未见甲硫氨酸被氧化产物(图4).相关中间体及目标多肽的HPLC及高分辨质谱图见本文支持信息图S19~图S24.

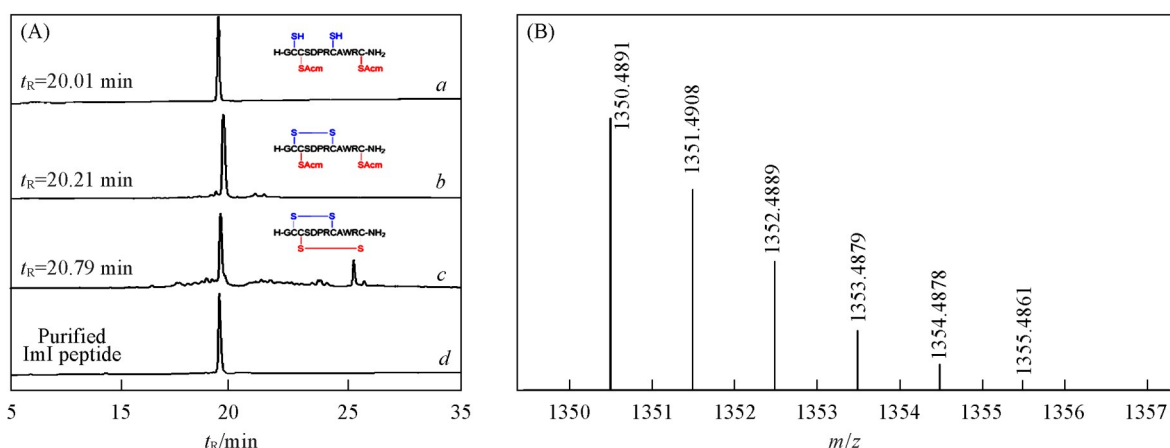


Fig. 3 HPLC chromatograms(A) of linear ImI with two free thiol groups(Cys2 and Cys8) and two cysteine residues protected by AcM(Cys3 and Cys12) (a), reaction of linear ImI with H_2O_2 to construct the first disulfide bond in ImI(b), reaction mixture of treated with I_2 to construct the second disulfide bond in ImI(c), purified ImI(d), and the deconvoluted HRMS spectrum of ImI(m/z 1350. 4891, calcd. m/z 1350. 4911)(B)

HRMS spectrum of ImI is shown in Fig.S18 of SI.



Scheme 6 "One-pot" precise synthesis of polypeptide compound containing Met

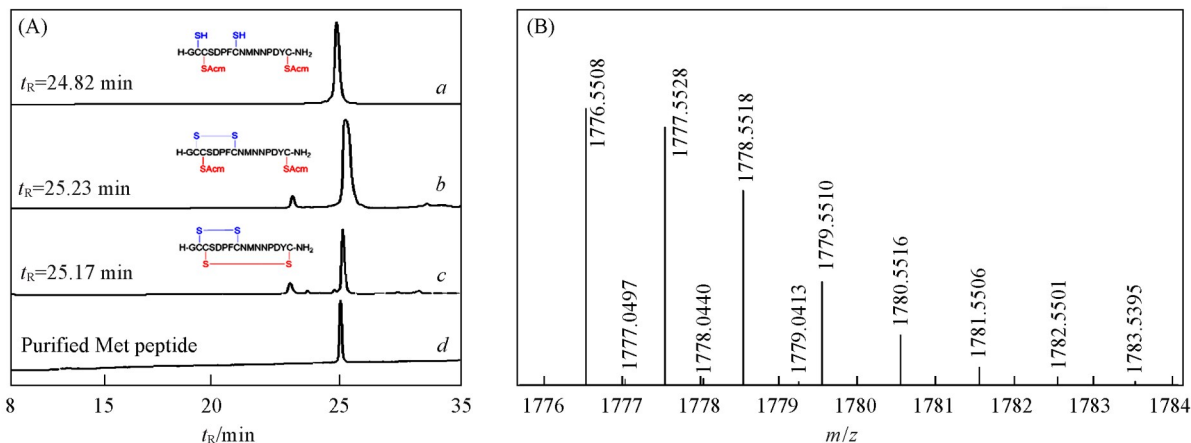
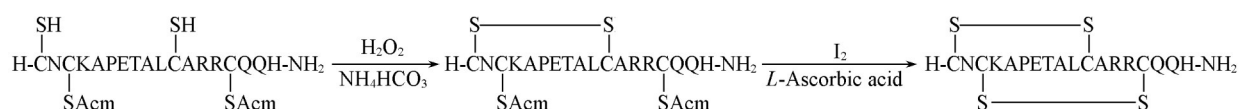


Fig. 4 HPLC chromatograms(A) of linear polypeptide compound containing Met with two free thiol groups (Cys2 and Cys8) and two cysteine residues protected by AcM(Cys3 and Cys16) (a), reaction of linear polypeptide compound containing Met with H_2O_2 to construct the first disulfide bond in polypeptide(b), reaction mixture of treated with I_2 to construct the second disulfide bond in polypeptide(c), purified polypeptide compound containing Met(d), and the deconvoluted HRMS spectrum of polypeptide compound containing Met (m/z 1776. 5508, calcd. m/z 1776. 5532)(B)

HRMS spectrum of polypeptide compound containing Met is shown in Fig. S24 of SI.

上述合成的多肽化合物均基于CC—C—C骨架, 为验证该方法能否适用于非CC—C—C骨架的多肽, 选择非CC—C—C骨架的活性多肽蜂毒明肽(Apamin)进行了验证(Scheme 7). Apamin是由蜜蜂(Apis mellifera)毒液中纯化得到的多肽化合物, 该肽由18个氨基酸残基组成, 是 K^+ 通道的特异性选择性阻断剂, 具有抗炎和抗纤维化作用^[30,31]. 在其分子结构中, Cys1与Cys11以及Cys3与Cys15之间形成了两对二硫键. 将1位和11位的半胱氨酸用Trt保护, 而3位和15位的半胱氨酸则用AcM保护. 采用



Scheme 7 "One-pot" precise synthesis of polypeptide compound Apamin

“一锅”法可以快速构建两对二硫键，总产率可达52%(图5)。相关中间体及目标多肽 Apamin 的 HPLC 及高分辨质谱图见本文支持信息图 S25~图 S30。这表明所建立的方法也适用于不同半胱氨酸骨架的多肽化合物，进一步验证了该方法的通用性。

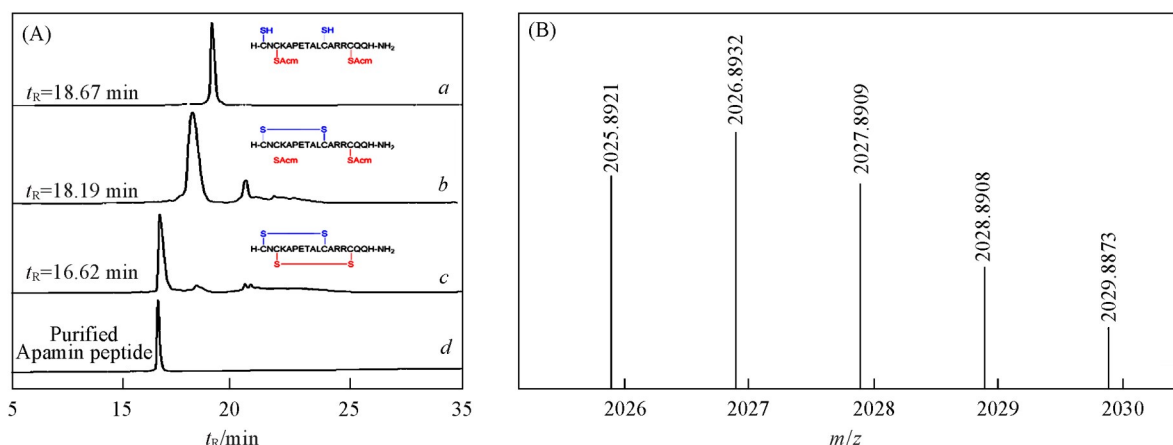


Fig. 5 HPLC chromatograms(A) of linear Apamin with two free thiol groups(Cys1 and Cys11) and two cysteine residues protected by AcM(Cys3 and Cys15)(a), reaction of linear Apamin with H_2O_2 to construct the first disulfide bond in Apamin(b), reaction mixture of treated with I_2 to construct the second disulfide bond in Apamin(c), purified Apamin(d), and the deconvoluted HRMS spectrum of Apamin(m/z 2025. 8921, calcd. m/z 2025. 8939)(B)

HRMS spectrum of Apamin is shown in Fig. S30 of SI.

3 结 论

建立了一种用于制备含有两对二硫键的多肽化合物的高效、简便且精准的合成策略。该方法采用常见的 Trt 和 AcM 作为半胱氨酸巯基侧链保护基团，分别使用 H_2O_2 和 I_2 作为氧化和脱保护试剂，分步构建第一对和第二对二硫键。这一策略有效避免了中间产物的提纯过程，实现了两对二硫键的“一锅”区域选择性合成。该方法不仅反应速度快(可在 20 min 内完成)、操作简便，而且显著提高了反应的总产率。此外，该方法适用范围广泛，能够高效地合成含有敏感色氨酸和甲硫氨酸残基的多肽化合物，并未观察到色氨酸和甲硫氨酸被氧化的副产物生成；还适用于含有两对二硫键的不同半胱氨酸骨架多肽化合物的合成。因此，该方法可作为一种通用、高效且精准合成含两对二硫键多肽化合物的新策略。

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20250233>.

参 考 文 献

- [1] Chakraborty K., Thakurela S., Prajapati R. S., Indu S., Ali P. S. S., Ramakrishnan C., Varadarajan R. *Biochemistry*, **2005**, *44*(44), 14638—14646
- [2] Bogdanowich-Knipp S. J., Chakrabarti S., Williams T. D., Dillman R. K., Siahaan T. J., *J. Pept. Res.*, **1999**, *53*(5), 530—541
- [3] Bulaj G., *Biotechnol. Adv.*, **2005**, *23*(1), 87—92
- [4] Landeta C., Boyd D., Beckwith J., *Nat. Microbiol.*, **2018**, *3*(3), 270—280
- [5] He R. J., Pan J., Mayer J. P., Liu F., *ChemBioChem*, **2020**, *21*(8), 1101—1111
- [6] Góngora-Benítez M., Tulla-Puche J., Albericio F., *Chem. Rev.*, **2014**, *114*(2), 901—926
- [7] Sidorova M. V., Molokoedov A. S., Az'muko A. A., Kudryavtseva E. V., Krause E., Ovchinnikov M. V., Bespalova Z. D., *Russ. J.*

- Bioorg. Chem.*, **2004**, *30*(2), 101—110
- [8] Machado L. E. S. F., Shen T. L., Page R., Peti W., *J. Biol. Chem.*, **2017**, *292*(21), 8786—8796
- [9] Kudryavtseva E. V., Sidorova M. V., Ovchinnikov M. V., Bespalova Z. D., Bushuev V. N., *J. Pept. Res.*, **1997**, *49*(1), 52—58
- [10] Hope D. B., Murti V., Vigneaud V. D., *J. Biol. Chem.*, **1962**, *337*(5), 1563—1566
- [11] Annis I., Hargittai B., Barany G., *Methods in Enzymology*, Academic Press, London, **1997**, *289*, 198—221
- [12] Postma T. M., Albericio F., *RSC Adv.*, **2013**, *3*(34), 14277—14280
- [13] Schroll A. L., Hondal R. J., Flemer S., *J. Pept. Sci.*, **2012**, *18*(1), 1—9
- [14] Wang Y. F., Song C. Y., Xing Y. Y., Shen S. G., Bo T. Y., Zhang N., Wang J. X., Shi T. S., Huo S. Y., *J. Org. Chem.*, **2023**, *88*(13), 8123—8132
- [15] Laps S., Atamleh F., Kamnesky G., Sun H., Brik A., *Nat. Commun.*, **2021**, *12*(1), 870
- [16] Qiu Z. H., Dai X. D., Fan C. X., Cao Y., Lv Z. R., Liang X. Y., Meng F. H., *Molecules*, **2023**, *28*(3), 1007
- [17] Spears R. J., McMahon C., Chudasama V., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*(19), 11098—11155
- [18] Dubois L., Pietrancosta N., Cabaye A., Fanget I., Debacker C., Gilormini P. A., Dansette P. M., Dairou J., Biot C., Froissart R., Goupil-Lamy A., Bertrand H. O., Acher F. C., McCort-Tranchepain I., Gasnier B., Anne C., *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*(15), 8231—8249
- [19] Hagen V., Dekowski B., Kotzur N., Lechler R., Wiesner B., Briand B., Beyermann M., *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*(5), 1621—1627
- [20] Sexton M. E., Okazaki A., Yu Z. W., van Venrooy A., Schmink J. R., Malachowski W. P., *Tetrahedron Lett.*, **2019**, *60*(38), 151057
- [21] Kotzur N., Briand B., Beyermann M., Hagen V., *Chem. Commun.*, **2009**, (22), 3255—3257
- [22] Wang S. Y., Zhou Q. Q., Li Y. X., Wei B. C., Liu X. L., Zhao J., Ye F. R., Zhou Z. N., Ding B., Wang P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(3), 1232—1242
- [23] Shi W. W., Shi C. W., Wang T. Y., Li Y. L., Zhou Y. K., Zhang X. H., Bierer D., Zheng J. S., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(1), 349—357
- [24] Wu C. L., Leroux J. C., Gauthier M. A., *Nat. Chem.*, **2012**, *4*(12), 1045—1050
- [25] Zheng Y. W., Zhai L. X., Zhao Y. B., Wu C. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*(48), 15094—15097
- [26] Liu W. D., Zheng Y. W., Kong X. D., Heinis C., Zhao Y. B., Wu C. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(16), 4458—4463
- [27] Kudryavtseva E. V., Sidorova M. V., Ovchinnikov M. V., Bespalova Z. D., *J. Pept. Sci.*, **2000**, *6*(5), 208—216
- [28] Frøsig-Jørgensen M., Gorman D. M., Kan M. W., Craik D. J., *Aust. J. Chem.*, **2023**, *76*(10), 655—670
- [29] McIntosh J. M., Yoshikami D., Mahe E., Nielsen D. B., Rivier J. E., Gray W. R., Olivera B. M., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*(24), 16733—16739
- [30] Santos R. A. T., Kottwitz L. B. M., *Res. Soc. Dev.*, **2023**, *12*(4), e5912440897
- [31] Kuzmenkov A. I., Peigneur S., Nasburg J. A., Mineev K. S., Nikolaev M. V., Pinheiro-Junior E. L., Arseniev A. S., Wulff H., Tytgat J., Vassilevski A. A., *Front. Pharmacol.*, **2022**, *13*, 977440

(Ed.: L, V, K)