

Exendin-4 的固相化学合成及鉴定*

刘延杰 季虹 林鲁霞 臧学章 宋长征 荣海钦**

(山东省内分泌与代谢病研究所 山东省医学科学院 济南 250062)

摘要 Exendin-4 是首个获准上市的肠促胰素类似物药物,可模拟人体自身激素 GLP-1 的功能,不仅改善血糖,还能促进胰岛 β 细胞新生、增殖,抑制 β 细胞凋亡,改善 β 细胞功能,促进胰岛素分泌,增加机体对胰岛素的敏感性。根据 Exendin-4 的潜在市场价值,以 Fmoc 固相合成策略为基础, NMP 为反应溶剂,以 HOBt/DIC 为缩合剂,添加盖帽程序,优化合成工艺条件。肽树脂裂解采用 TFA/Phenol/TIS 裂解液,并应用高效液相色谱和四级杆-飞行时间串联质谱对其进行分析鉴定和纯化,最终获得 Exendin-4,产率为 21%,纯度为 99.4%。活性测定结果显示,合成的 Exendin-4 显著提高胰岛瘤细胞的活性,并呈一定剂量依赖性。

关键词 Exendin-4 固相化学合成 2 型糖尿病

中图分类号 Q819

Exendin-4 是从分布于美国西南部和墨西哥北部地区的钝尾毒蛇唾液中分离得到的多肽,由 39 个氨基酸组成,与人体内调节血糖浓度的因子胰岛血糖素样肽-1 (GLP-1) 有 53% 的同源性,二者在体内发挥相同的生理功能,但 GLP-1 在体内半衰期短,而 Exendin-4 则不宜被降解,能更好地发挥降血糖和改善胰岛功能的作用^[1],因此越来越成为治疗糖尿病的研究热点。

根据 Exendin-4 的潜在市场价值,本实验室对长肽合成方法进行探索,以多肽固相合成方法为基础,采用 Fmoc(9-苄氧羰基)合成策略,以 Fmoc 基团保护 α -氨基,叔丁基保护侧链,先将第一个氨基酸的羧基连接到不溶性树脂上,随后将 Fmoc 基团用六氢吡啶脱去,露出氨基端,将第二个预先活化的 Fmoc 保护氨基酸与第一个氨基酸进行缩合反应,然后用溶剂 N-甲基吡啶烷酮洗脱掉未合成的氨基酸,照此方法按多肽序列依次将氨基酸连接到树脂上,最后三氟乙酸脱除叔丁基的保护,将肽从树脂上裂解下来最终得到 Exendin-4。合成中间采用茚三酮试验检测合成效率,产物经高效液相色谱(HPLC)分析和纯化、四级杆-飞行时间串联质谱(Q-TOF)鉴定,证实为目标产物,纯度达 99.4%,为

下一步临床应用提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

PSI 多肽合成仪 (Peptide Synthesizer Ins., 美国), Agilent 1100 高效液相色谱 (Agilent, 美国), Agilent 6520 四级杆-飞行时间串联质谱仪 (Agilent, 美国), 冷冻干燥仪 (LABCONCO, 美国)。氨基酸及 Rink Amide-MBHA 树脂购自吉尔生化(上海)有限公司, N-甲基吡啶烷酮 (N-methyl-2-pyrrolidone, NMP), 1-羟基苯并三唑 (1-hydroxybenzotriazole, HoBT)、N, N-二异丙基碳二亚胺 (N, N'-diisopropylcarbodiimide, DIC), 六氢吡啶 (piperidine, PIP), 1-乙酰咪唑 (1-acetylimidazole, AIM), 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA)、苯酚、三异丙基硅烷 (triisopropylsilane, TIS), 甲基叔丁基醚 (methyl tert-butyl ether, MTBE), 甲醇等购自美国 VWR 公司。

1.2 Exendin-4 的合成序列(由 N 端到 C 端)

结构式缩写: His- Gly- Glu- Gly- Thr- Phe- Thr- Ser- Asp- Leu- Ser- Lys- Gln- Met- Glu- Glu- Glu- Ala- Val- Arg- Leu- Phe- Ile- Glu- Trp- Leu- Lys- Asn- Gly- Gly- Pro- Ser- Ser- Gly- Ala- Pro- Pro- Pro- Ser- NH₂ 分子式: C₁₈₄H₂₈₂N₅₀O₆₀S 分子量: 4186.61 有 18 种需要保护的氨基酸, 分别是: Fmoc-Ala-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2010-11-29

* 山东省科技攻关计划(2009GG20002046, 2009GG20002049)资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: hqrong@live.cn

Val-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(BOC)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH, 其中缩写表示: Fmoc: 9-芴基甲氧羰基, Boc: 叔丁氧羰基(tert-butyloxycarbonyl), Trt: 三苯甲基(trityl), OtBu: 叔丁基酯, tBu: 叔丁基(tert-butyl), Pbf: 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-苯磺酰基。

1.3 缩合反应

称取 500mg Rink Amide-MBHA 树脂(取代率 0.4mmol/g), 装入 40ml 反应器中, NMP 洗涤树脂两次后加适量溶胀过夜。按照树脂:氨基酸 = 1:4 的反应比例称取称氨基酸(mmol), 其它试剂均用 NMP 配制, 分别为 0.3mol/L HoBT/NMP、0.27mol/L DIC/NMP、25% PIP/NMP、2% AIM/NMP 及 100% 甲醇。氨基酸用 HoBT/NMP 溶解后按从 C-端到 N-端依次排列在氨基酸瓶中, 其它试剂分别装入各溶剂瓶, 反应温度 25℃, 反应程序: 脱保护 10min → NMP 洗涤树脂 2 次, 每次 1.5min → 脱保护 20min → NMP 洗涤树脂 8 次, 每次 1.5min → 加入活化氨基酸 → 缩合反应 3h → NMP 洗涤树脂 2 次, 每次 1.5min → AIM 盖帽 20min → NMP 洗涤树脂 8 次, 每次 1.5min → 下一个氨基酸脱保护开始, 如此自动进行脱保护-活化-缩合-盖帽的循环, 最后一个氨基酸缩合结束直接脱掉 Fmoc, 用甲醇洗涤 6 次, 最后吹氮气干燥 50min, 称重, 合成完成, 得到带保护基侧链的多肽树脂。

1.4 脱保护及缩合反应的检测

利用茚三酮遇游离氨基显色的原理, 在每次脱保护和缩合反应结束后, 取数粒树脂检测反应是否完全。检测时分别取 3 滴 5% 茚三酮无水乙醇溶液和 3 滴 80% 苯酚无水乙醇溶液与待检测树脂颗粒充分混匀, 105℃ 加热 5min, 观察颜色变化, 若变蓝色, 则说明游离氨基存在, 脱保护完全; 若不变色, 则缩合完全, 可进行下一个缩合反应。

1.5 肽树脂的裂解

采用 TIS 裂解法进行, 配适量裂解液(TFA: 80% Phenol: TIS = 95: 5: 5), -20℃ 预冷 20min 后使用, 取合成的肽树脂, 加适量裂解液通风橱中室温搅拌裂解 4h, 砂芯漏斗过滤除去树脂, 收集滤液, 加 -20℃ 预冷 MTBE 冷冻 30min, 使多肽沉淀, 砂芯漏斗过滤留取沉淀, 并用 MTBE 洗涤沉淀数次, 将沉淀室温干燥则得

粗肽。

1.6 粗肽的检测及纯化

利用 HPLC 检测合成产物是否有主峰, 收集分离产物峰, 再经质谱检测收集样品的分子量是否正确, 以确定目标产物峰。在 Agilent 1100 高效液相色谱仪上, 选用 C18 半分析型制备柱(ZORBAX 300SB-C18, 5μm, 9.4 × 250mm) 进行 HPLC。流动相: A 相: 水, 0.1% TFA, B 相: 90% 乙腈溶液, 0.1% TFA; 洗脱梯度: B 的浓度从 5% 到 95%; 流速: 4ml/min; 洗脱时间 40min; 检测波长 226nm。质谱分析采用 ESI 正离子模式, 毛细管电压 4000V, 脱溶剂气温度 350℃, 干燥器流速 10L/min, 喷雾气压 45psi。

将 Exendin-4 粗品制成水溶液, 每次进样 100μl。流动相 B 从 5% 到 95% 梯度洗脱 40min, 分段收集产物峰, 所有收集样品经质谱检测, 根据特征分子离子峰确定包含 Exendin-4 的产物峰。将收集的 Exendin-4 样品溶液倒入样品杯中, -70℃ 冷冻过夜, 次日冷冻干燥, 最后获得的白色冻干粉即为纯品 Exendin-4。

1.7 Exendin-4 活性的测定

采用 SRB 法检测纯化的 Exendin-4 对大鼠胰岛瘤细胞 INS-1 活性的影响。INS-1 胰岛瘤细胞用 1640 培养基在 37℃ 和 5% CO₂ 下培养, 细胞生长至 80% 时汇集传代。富集所有细胞, 按 10⁴/孔接种 96 孔板, 在相同条件下培养 12h, 使细胞贴壁, 分别加入 0, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200nmol/L 的纯化 Exendin-4, 每种浓度设 6 个重复, 培养 24h 后弃培养基, 每孔加入 100 μl 10% 三氯乙酸, 4℃ 固定 1h, 弃上清, 去离子水洗 5 遍, 空气中干燥。每孔加 50μl 0.4% SRB 溶液(用 1% 乙酸配制), 震荡 5min, 用 1% 乙酸洗涤 5 遍, 空气中干燥, 最后每孔加入 100μl Tris(100mmol/L, pH 10.5), 轻轻震荡 5min, 于 490nm 处测定吸光值, 根据吸光值检测细胞活性。

2 结果

2.1 Exendin-4 产率计算

产率计算公式:

$$Y = W3/W4 \times 100\%$$

$$W3 = W1 - W2 + 222 \times S \times W2/1000,$$

$$W4 = S \times W2 \times 6105.6/1000$$

其中 W1: 合成结束后树脂的质量, W2: 合成前树脂的质量, S: 树脂取代率, W3: 带保护基团的合成肽的

实际量, W4:带保护基团的肽的理论量, 6105.6:带保护基团的合成肽的分子量

本实验合成前称取树脂 500mg, 结束后吹干肽树脂为 1661mg, 产率 98.7%。

2.2 脱保护及缩合反应的检测

除个别氨基酸如酪氨酸外(由于酪氨酸本身特性, 遇茚三酮不显色或显色极浅), 其余氨基酸脱保护后取样品进行茚三酮显色反应呈蓝色或紫色, 证实脱保护完全; 缩合后样品进行茚三酮显色反应呈亮黄色, 未变色, 缩合反应完全。

2.3 肽树脂的裂解

取合成肽树脂于 20ml TIS 裂解液中裂解, 最后制

得粗肽 766mg, 粗肽收率为 91.6%。

2.4 粗肽的检测及纯化

将粗品制成水溶液, HPLC 分析, 图谱如下(图 1), 含一个主峰(Peak 2), 4 个次峰和多个微量成分, 收集主峰和次峰的产物进一步质谱检测, 经鉴定, 仅主峰产物检测出待测物的 $[M + 3H]^{3+}$ 和 $[M + 4H]^{4+}$ 准分子离子峰, 且 $[M + 3H]^{3+}$ 和 $[M + 4H]^{4+}$ 的质荷比分别为 1396.3408 和 1047.5093, 与分子量的理论值 4186.61 相符, 认为应该是目标产物 Exendin-4, 主峰产物的质谱检测图谱如下(图 2)。将 HPLC 图谱按峰面积归一化法计算, 粗品纯度约 41%。

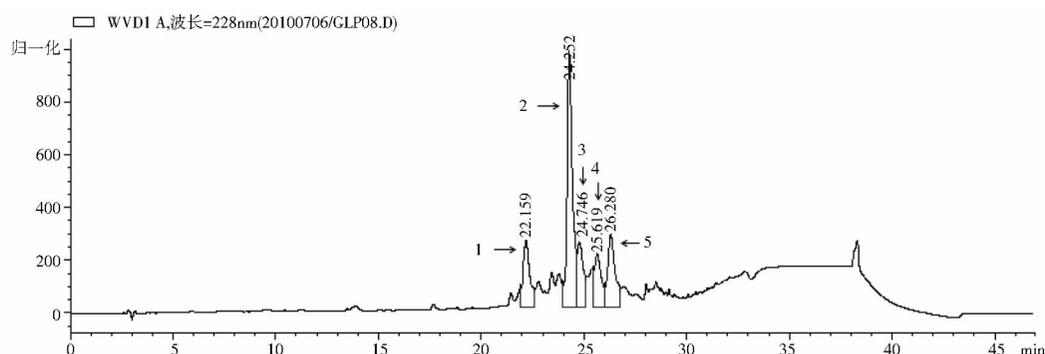


图 1 粗品 Exendin-4 的 HPLC 检测图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of the crude Exendin-4

收集所有主峰产物, 冷冻干燥, 即得纯品, 共约 162mg, 收率约 21%。经 HPLC 检测, 峰面积归一化法计算纯度约 99.4% (图 3)。

2.5 Exendin-4 活性的测定

SRB 实验结果显示, 本实验制备的 Exendin-4 能够增加 INS-1 细胞增殖活性, 且呈剂量依赖性(图 4)。

3 讨论

随着人们生活水平的提高, 糖尿病患者逐年增多, 新型抗糖尿病药物临床需求增大。目前的治疗方案往往侧重于对血糖的控制, 而忽略了对胰岛功能的保护, 所以多数患者最终会出现 β 细胞功能严重衰退而需要胰岛素治疗。Exendin-4 不仅能很好地控制血糖, 还可促进胰岛 β 细胞新生和增殖, 减少 β 细胞凋亡, 改善 β 细胞功能, 具有非常明显的临床应用优势^[2,4]。利用基因工程技术合成 Exendin-4, 质粒构建繁琐, 操作复杂, 周期长, 后期纯化成本高。现今, 多种化学合成的多肽

药物已经应用于临床, 并取得良好的治疗效果^[5], 因此本实验目的是利用化学合成的方法顺序合成 39 肽的 Exendin-4, 并优化合成条件, 减少成本, 满足后序的实验需要。

自 1963 年固相化学合成多肽成功后, 经不断完善和改进, 目前化学合成主要采用 Boc 固相合成和 Fmoc 固相合成^[6-7]。Boc 策略是将叔丁氧羰基用于保护 α -氨基并在固相多肽合成上使用, 其可以在酸性条件下定量脱除, 反应也非常迅速, 但是反复地用酸来脱保护, 容易造成肽从树脂上脱落, 而且合成的肽链越长, 损失就越严重, 此外, 酸处理还会引起侧链的一些副反应, 并不适合于所有肽类的合成。Fmoc 策略是将 9-芴甲氧羰基用于保护 α -氨基, 其在碱性条件下可以迅速脱除, 侧链采用 TFA 可脱除, 肽树脂采用 90% TFA 即可将肽从树脂上切除, 最终的脱保护避免了强酸处理, 考虑到 Fmoc 合成法反应条件温和, 故本实验采用 Fmoc 策略合成 Exendin-4。

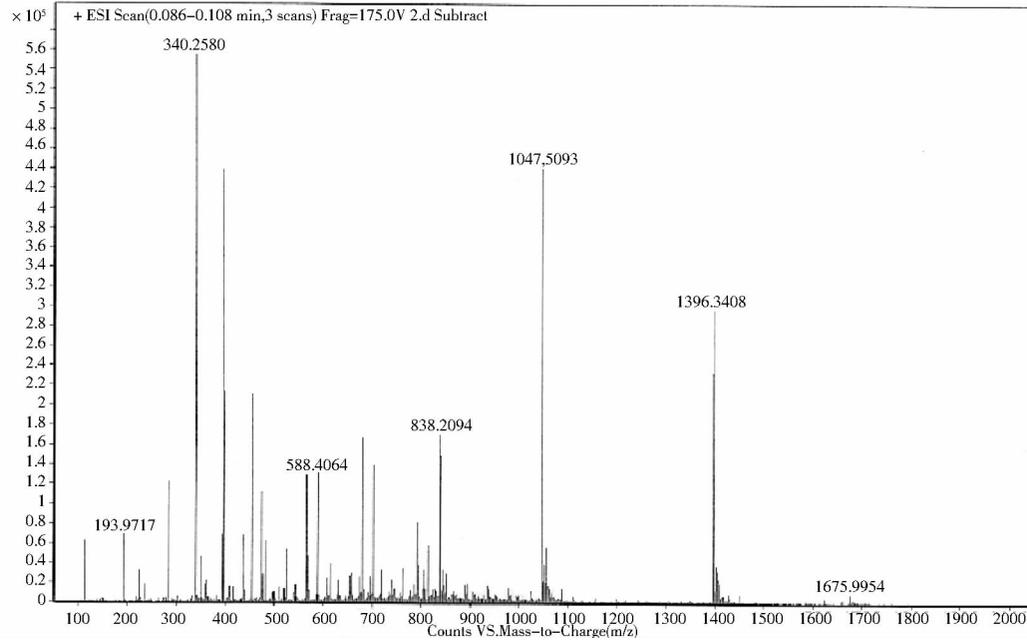


图2 Exendin-4 的质谱检测图谱

Fig.2 LC/MS mass spectrogram of Exendin-4

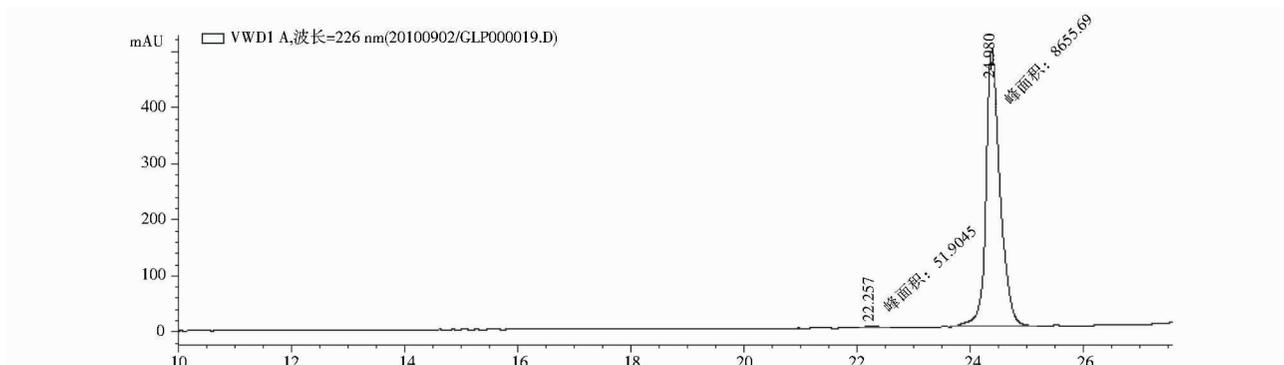


图3 纯品 Exendin-4 的 HPLC 检测图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of the purified Exendin-4

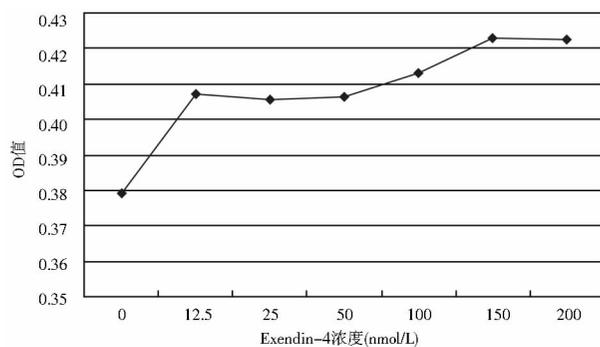


图4 不同浓度 Exendin-4 对 INS-1 细胞的作用

Fig.4 Effect of Exendin-4 on INS-1 cell

Fmoc 合成法工艺条件为:以 Rink Amide-MBHA 树脂为固相载体;NMP 为反应溶剂;HOBt/DIC 为缩合剂;TFA/Phenol/TIS(90/5/5, V/V) 为切割条件,保护氨基酸 4 倍过量进行缩合反应,并在每一个缩合反应结束后增加 AIM 盖帽程序,将树脂上未缩合的氨基酸羧基端乙酰化而封闭,大大减少了杂肽的合成,保证了多肽合成序列的正确性,提高目标产物产量,减少了成本的支出。该条件下合成的 Exendin-4,粗品收率达 91.6%,纯度达 41%。

鉴于 HPLC 和质谱检测手段的成熟,本实验采用 HPLC 和质谱检测相结合的方法鉴定纯化合成肽^[8]。先用 HPLC 进行初步分析,得到主峰,再对 HPLC 获得

的肽样品进行质谱分析,最后确定仅主峰的准分子离子峰 $[M + 3H]^{3+}$ 和 $[M + 4H]^{4+}$ 的质荷比分别为 1396.3408 和 1047.5093,与分子量的理论值 4186.61 相符,认为应该是目标产物。最后收集主峰,真空冷冻干燥,得到纯品 Exendin-4,产率 21%,纯度 99.4%,并通过 SRB 实验验证了 Exendin-4 的活性。本实验成功合成了 Exendin-4,为以后市场化开发生产治疗糖尿病的药物奠定了基础。

参考文献

- [1] Kolterman O G, Kim D D, Shen L, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am Health Syst Pharm*, 2005, 62 : 173-181.
- [2] Kwon D Y, Kim Y S, Ahn I S, et al. Exendin-4 potentiates insulinotropic action partly via increasing beta-cell proliferation and neogenesis and decreasing apoptosis in association with the attenuation of endoplasmic reticulum stress in islets of diabetic rats. *J Pharmacol Sci*, 2009, 111 (4) : 361-371.
- [3] Derosa G, Maffioli P, Salvadeo S A T, et al. Exenatide versus glibenclamide in patients with diabetes. *Diabetes Technology and Therapeutics*, 2010, 12 (3) : 233-240.
- [4] Bunck M C, Diamant M, Corner A, et al. One-year treatment with Exenatide improves cell function, compared with insulin glargine, in metformin-treated type 2 diabetic patients: a randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, 2009, 32 : 762-768.
- [5] 孙玉昆,伍登熙,朱志勇,等. 促胰岛素分泌肽衍生物. 中国, 1363559,2002-08-14.
Sun Y K, Wu D X, Zhu Z Y, et al. Insulinotropic hormone secretion peptide derivative. China, 1363559, 2002-08-14.
- [6] Kent S B, Merrifield R B. Chemical mechanism to account for artifactual formation of shortened peptides with free alpha-amino groups in solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Res*, 1983, 22 (1) :57-65.
- [7] Louis A C, Grace Y H. 9-Fluoenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem*, 1972,37(22) :3404-3409.
- [8] 周国华, 罗国安, 朱敏生. 基体辅助激光解吸质谱法在生物大分子质量研究中的应用. *药学报*, 1998,33(4) :290-295.
Zhou G H, Luo G A, Zhu M S. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1998,33(4) :290-295.

Solid Phase Peptide Synthesis and Analysis for Exendin-4

LIU Yan-jie JI Hong LIN Lu-xia ZANG Xue-zhang SONG Chang-zheng RONG Hai-qin

(Shandong Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, China)

Abstract Exendin-4 is the first-approved drug of the incretin mimetic family, which acts like the naturally occurring hormone GLP-1 *in vivo*. Exendin-4 decreases fasting and postprandial plasma glucose levels. Exendin-4 may play a role in enhancing glucose-dependent stimulation of insulin secretion, and maintaining of β -cell mass by promotion of β -cell proliferation and neogenesis, and inhibiting of β -cell apoptosis. This experiment studied the standard Fmoc strategy solid phase synthesis of Exendin-4. Using NMP as the coupling solvent, HOBt/DIC as the coupling reagent, AIM as the containing reagent. Synthesized peptides were cleaved by TFA/Phenol/TIS, and identified by high performance liquid chromatography and quadrupole time of flight LC/MS. The yield of pure Exendin-4 was 21% with a purity of 99.4%. Using the SRB method to measure the bioassay of Exendin-4 cell regeneration experiment. It is an influential research into the therapy of type 2 diabetes mellitus.

Key words Exendin-4 Solid phase peptide synthesis Type 2 diabetes mellitus