鲎素Ⅰ的合成新方法

高 龙[1]，卢盛鑫[2]，李姝玮[2]，吴 也[2]，张卫东[1,3]*

（1. 广东药科大学药学院，广东广州 510006；2. 上海中医药大学交叉科学研究院，上海市中药化学生物学前沿研究基地，上海 201203；3. 海军军医大学药学系天然药物化学教研室，上海 200433）

摘要：鲎素Ⅰ（tachyplesin I，**1**）是含有 2 对二硫键的 β- 发夹肽，具有显著的抗肿瘤和抗菌活性。文章报道了 **1** 的合成新方法。采用固相肽合成法，以 Fmoc- 氨基酸为原料，Rink Amide 树脂为载体，在树脂上合成并切割得直链肽前体 **3**，通过分 2 批向 **3** 的溶液中加入不同量的碘溶液，实现 2 对二硫键的分步氧化构建。所得粗品经制备型 HPLC 纯化，得到液相纯度大于 95%的目标产物 **1**。该方法的创新之处在于，通过“一锅法”实现 2 对二硫键的贯序氧化。与已报道工艺相比，收率由 16%提高至 36%（以 **3** 计），并大幅缩短了整个反应周期（由 9.5 d 缩至 4.5 d），具有良好的工业化应用前景。

关键词：鲎素Ⅰ；二硫键；合成；工艺改进；一锅法；贯序氧化

中图分类号：TQ460.6；R979.1；R978 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-8255(2025)05-0605-06

引用：高 龙，卢盛鑫，李姝玮，等. 鲎素Ⅰ的合成新方法[J]. 中国医药工业杂志，2025, 56(5): 605-610. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.006

Novel Synthetic Method of Tachyplesin Ⅰ

GAO Long[1], LU Shengxin[2], LI Shuwei[2], WU Ye[2], ZHANG Weidong[1,3]*

(*1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; 2. Shanghai Frontiers Science Center for Chinese Medicine Chemical Biology, Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; 3. Dept. of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433*)

ABSTRACT: Tachyplesin Ⅰ (**1**) is a β-hairpin peptide containing two disulfide bonds, known for its significant antineoplastic and antibacterial activities. Herein a novel synthetic method of **1** was reported. Solid-phase peptide synthesis (SPPS) was employed to assemble the linear peptide precursor **3** of **1**, with Fmoc-amino acids as raw materials and Rink Amide resin as the support. The cleaved **3** was subjected to sequential oxidative formation of the two disulfide bonds in solution by sequentially adding two different doses of iodine solution to give the crude product, which was purified by preparative HPLC to get the target product **1** with greater than 95% purity. The innovation of this method lies in the “one-pot” sequential oxidative formation of the two disulfide bonds. Compared with the reported process, this new process significantly increased the overall yield of **1** from 16% to 36% (based on **3**), and greatly shortened the whole reaction time from 9.5 d to 4.5 d, which demonstrated the excellent potential for industrial production.

Key Words: tachyplesin Ⅰ; disulfide bond; synthesis; process improvement; one-pot method; sequential oxidation

鲎素Ⅰ（tachyplesin Ⅰ，**1**）是一种源自中华鲎（*Tachypleus tridentatus*）血液淋巴细胞的两亲性多肽，包含 17 个氨基酸残基，呈现典型的 β- 发夹结构，其中 Cys3 与 Cys16 形成 1 对二硫键，Cys7 与 Cys12 形成另 1 对[1]。研究[2—4]表明，**1** 独特的阳离子特性、两亲性结构和 β- 发夹构象，使其表现出优异的蛋白

收稿日期：2025-02-17

基金项目：上海市大学生创新创业训练计划项目（202410268295）

作者简介：高 龙（1998—），男，硕士研究生，专业方向：药物研发与转化。

通信作者：张卫东（1966—），男，教授，博士生导师，从事中药及复方的药效物质基础与创新药物的研究。

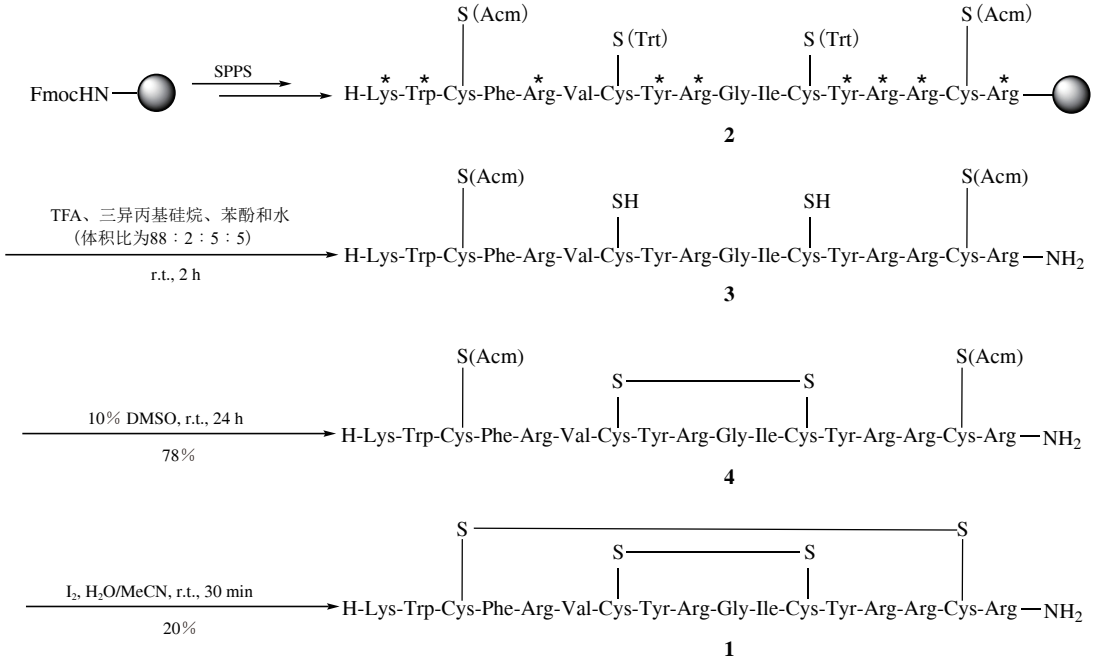
E-mail：wdzhangy@hotmail.com

酶稳定性，以及在抗菌和抗肿瘤方面显著的药理活性。具体而言，**1** 通过阳离子电荷与细菌或肿瘤细胞膜结合，在膜上形成孔洞结构，从而破坏细胞膜，导致细胞死亡[5]。此外，**1** 还能直接进入细胞，通过作用于胞内的靶点或细胞器，进一步介导细菌或肿瘤细胞的死亡[6]。值得注意的是，**1** 的这种多靶点、多途径作用机制使其具有广谱的抗菌和抗肿瘤活性，且不易产生耐药性，故有较高的研究价值和应用前景[7]。

然而，由于过度捕捞和环境污染等因素，中华鲎的数量急剧减少，已被列为濒危物种[8]。因此，采用化学合成方法大规模制备 **1** 以替代传统的分离提取方法，不仅对新型抗菌和抗肿瘤药物的研发具有重要意义，还能够确保持续供应。

目前，**1** 的文献合成路线[9]主要有 1 条，如图 1 所示。采用固相肽合成法（solid-phase peptide synthesis，SPPS），以 Fmoc- 氨基酸为原料，Rink Amide 树脂为载体，按从 C 端到 N 端的顺序依次偶联氨基酸，合成得到 **1** 的直链肽前体 **2**。在此过程中，Cys3 与 Cys16 的巯基采用乙酰胺甲基（acetamidomethyl，Acm）保护，Cys7 与 Cys12 的巯基则使用三苯甲基（trityl，Trt）进行保护。**2** 经切割试剂处理后，得到直链肽前体 **3**。**3** 在 DMSO 溶液中，其 Cys7 和 Cys12 的巯基发生分子内氧化，形成第 1 对二硫键连接的中间体 **4**，收率 78%（以 **3** 计）。在碘的作用下，**4** 分子中 Cys3 与 Cys16 的 Acm 保护基被去除，同时形成第 2 对二硫键，最终经制备型 HPLC 纯化，得目标产物 **1**，收率 20%（以 **4** 计）。该合成方法涉及 2 次氧化反应，第 1 次氧化反应需要 24 h，还需约 4 d 的冻干过程去除 DMSO，且冻干和转移的过程中易损失产物，**1** 的总收率约 16%（以 **3** 计）。中间体 **3**、中间体 **4** 和产物 **1** 的液质色谱图如图 2 所示；**1** 的合成总耗时约 9.54 d，工艺复杂且收率较低。因此，进一步优化 **1** 的合成工艺路线具有重要意义。

本研究将文献[10]中使用的 2 对 Cys 保护基分别替换为三甲氧基苯硫基（trimethoxyphenylthio，S-Tmp）和 4- 甲氧基三苯甲基（4-methoxytriphenylmethyl，Mmt），设计了直接在树脂上定向氧化，进而构建 2



注：*代表氨基酸侧链的保护基。

图 1　1 的文献[9]合成路线

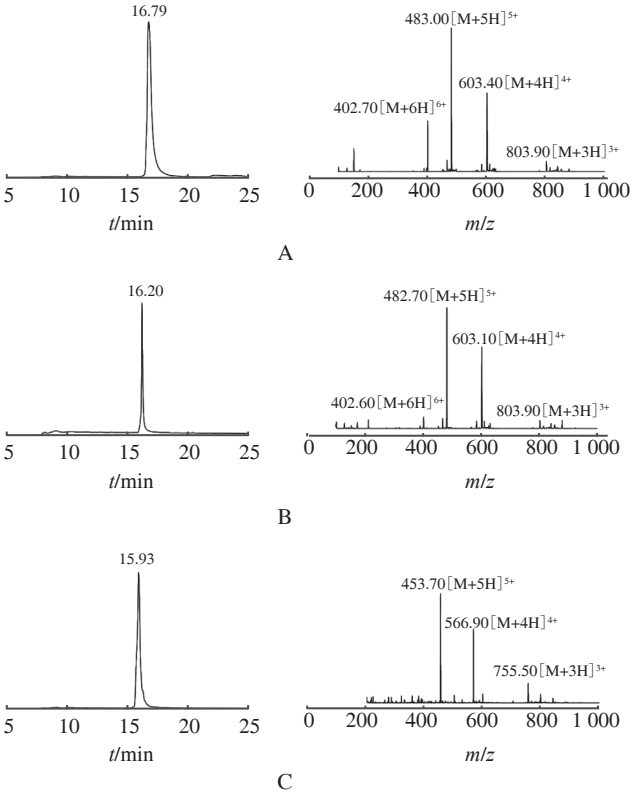
Fig.1　The Synthetic Route of **1** in the Literature[9]

对二硫键的合成路线（图 3）。首先用含 0.1 mol/L *N*-甲基吗啉（4-methylmorpholine，NMM）的二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）溶液脱除 S-Tmp，在 *N*- 氯代琥珀酰亚胺（*N*-chloro succinimide，NCS）存在下氧化，得第 1 对二硫键连接的产物；后用 2% TFA 脱除 Mmt，再次使用 NCS 氧化，形成第 2 对二硫键。

然而，无论是将 S-Tmp 保护的 Cys 置于序列内侧（图 4A），还是置于外侧（图 4B），NCS 氧化反应得到的第 1 对二硫键连接产物的纯度均较低。可能是因为固相上 **1** 的结构缺乏足够的柔性，阻碍 S-Tmp 的完全去除并顺利形成二硫键。

为尽可能减少 2 次氧化反应带来的时间成本和中间体损失，本研究在文献方法基础上，利用直链肽前体 **3** 中的游离巯基和 Acm 保护巯基对碘氧化的敏感性差异，通过分 2 批加入不同量的碘溶液，在一锅反应中贯序实现 2 个二硫键的氧化构建（图 5）。以直链肽前体 **3** 为原料，首先加入 0.5 倍当量的碘，形成第 1 对二硫键。通过分析型 HPLC 监控反应进程，当游离巯基完全氧化（反应时间约为 2 min）后，再加入 10 倍当量的碘，形成第 2 对二硫键（反应时间约为 0.5 h）。最终通过制备型 HPLC 纯化，得到纯度大于 95%的目标产物 **1**，收率 36%（以 **3** 计）。圆二色谱法检测结果表明，所得 **1** 的二级构象（图 6）和文献[11]报道的结果相符。

相较于文献[9]工艺，**1** 的新合成工艺路线具有以下重要改进。通过使用碘代替 DMSO 作为构建第 1 对二硫键的氧化剂，将反应时间由 24 h 显著缩短至 2 min，从源头规避了冻干去除 DMSO 所花费的时间（4 d），以及转移过程中的产物损失；通过“一锅法”贯序完成 2 次氧化反应，简化了操作。**1** 的新合成工艺路线，溶剂使用量减少 50%，收率由 16%提高至 36%（以 **3** 计），并将整个反应周期从 9.5 d 大幅缩短至 4.5 d，展现出良好的工业化应用前景。



A—中间体 **3** 的液质色谱图；B—中间体 **4** 的液质色谱图；C—产物 **1** 的液质色谱图。

图 2 文献[9]合成路线中的中间体和产物的液质色谱图

Fig.2 LC-MS Chromatograms of the Intermediates and the Target Product in the Literature[9]

实验部分

分析型 1260 Infinity 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Auto Purification 型紫外引导自动纯化制备型高效液相色谱系统（美国 Waters 公司）；6410 型 Triple Quad LC/

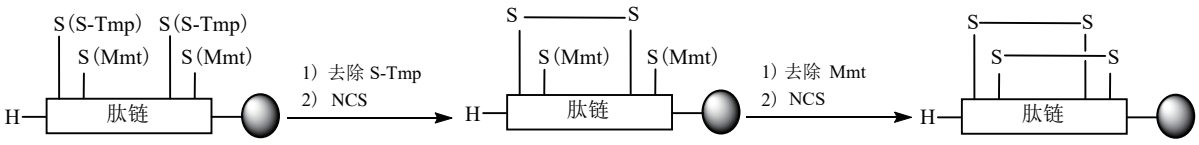
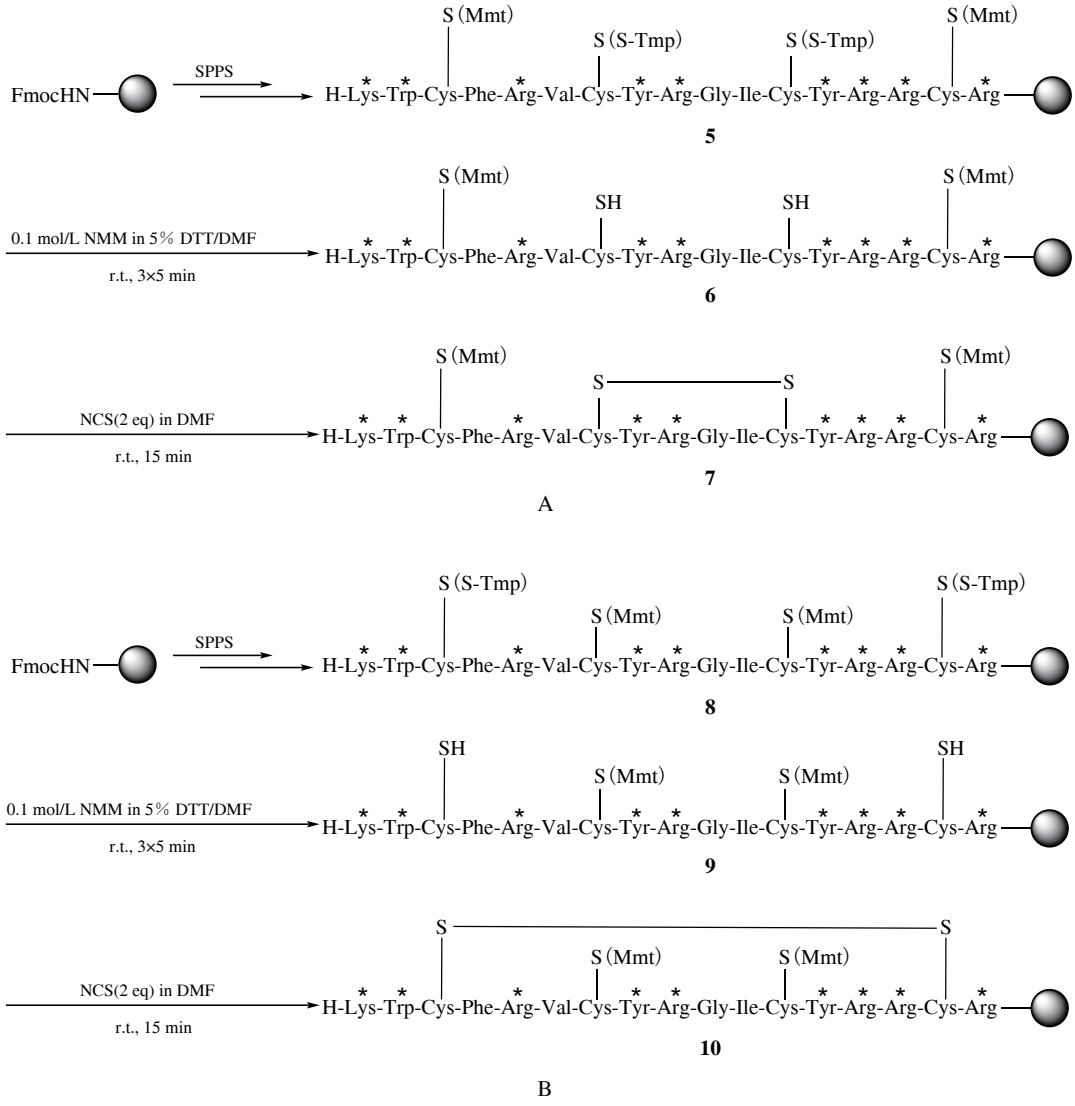


图 3 固相定向氧化 2 对二硫键的合成示意图

Fig.3 Schematic Diagram of Synthesis of Two Pairs of Disulfide Bond by Solid-phase Directed Oxidation



A—先氧化内部二硫键来构建 **1**；B—先氧化外侧二硫键来构建 **1**。

图 4　固相定向氧化构建 2 对二硫键合成 1 的尝试

Fig.4　Attempted Synthesis of **1** by Solid-phase Directed Oxidative Formation of Two Pairs of Disulfide Bond

MS 质谱仪（美国 Agilent 公司）；SCIENTZ-12N 型冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；JASCO-1700 型圆二色谱仪（日本分光株式会社）。

肽段 2

将 Rink Amide 树脂（0.588 g，0.2 mmol，天津南开和成科技有限公司）加至 100 mL 多肽合成管中，加入 DCM（7 mL）静置 20 min 使树脂溶胀。抽干 DCM 后加入 20％哌啶的 DMF 溶液（7 mL），于 37 ℃下振摇 5 min，反应完成后重复 1 次。依次用 DCM（10 mL×3）和 DMF（10 mL×3）洗涤树脂并抽干。将 Fmoc-Arg（Pbf）-OH［649 mg，1 mmol，吉尔生化（上海）有限公司］、Oxyma Pure（142 mg，1 mmol，上海泰坦科技股份有限公司）和 *N*- 甲基吡咯烷酮（6 mL）加至 15 mL 离心管中，溶清，再加入 *N*,*N*'-二异丙基碳二亚胺（155 μL，1 mmol）进行活化，然后将活化后的氨基酸溶液加至树脂中，于 60 ℃振荡

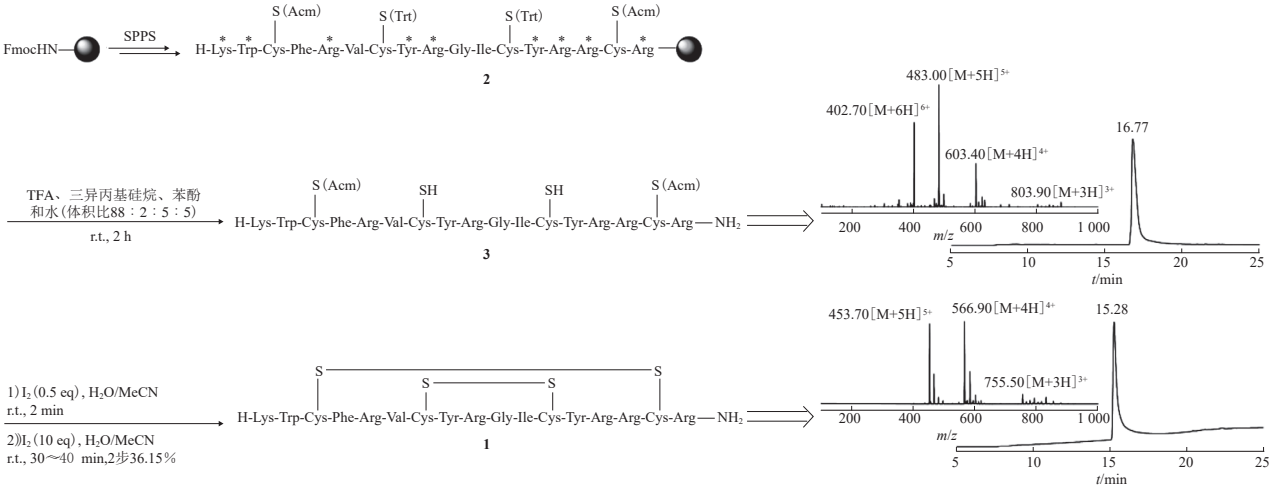


图 5　通过氧化构建 2 对二硫键合成 1 的新方法及其中间体和产物的液质图谱

Fig.5　New Synthesis of **1** Featuring Sequential Oxidative Formation of Two Pairs of Disulfide Bond and LC-MS Chromatograms of the Intermediates and the Target Product

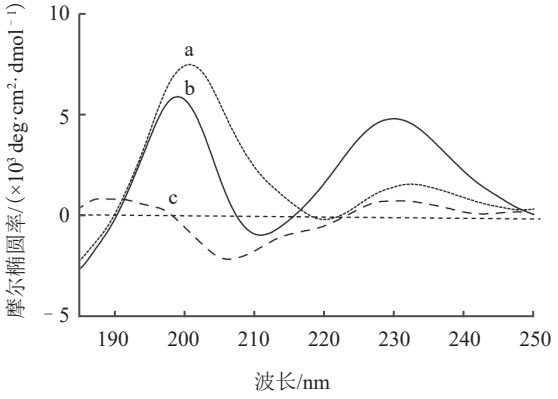


图 6　中间体 4(a)、**目标产物 1**(b) **和中间体 3**(c) **的圆二色谱图**

Fig.6　Circular Dichroism Spectra of the Intermediate **4**(a), Target Product **1**(b), and Intermediate **3**(c)

反应 20 min。反应结束后，依次用 DCM(10 mL×3)和 DMF(10 mL×3) 洗涤树脂。

重复上述步骤：脱保护、洗涤、偶联和洗涤，直至完成肽链序列的合成，得到固定在 Rink Amide 树脂上的肽段 **2**。

肽段 3

使用甲基叔丁基醚对 Rink Amide 树脂进行润洗，随后用切割试剂，即 TFA、三异丙基硅烷、苯酚和水(体积比 88 ∶ 2 ∶ 5 ∶ 5) 的混合溶液 (20 mL)，将肽段 **2** 从树脂上解离下来。在室温下切割 2 h 后，滤除树脂，向滤液中加入 0 ℃的甲基叔丁基醚 (100 mL)，促使多肽析出并通过离心收集粗肽。弃去上清液后，使用氮气干燥粗肽，分析型 HPLC 测得其纯度为 71 % [HPLC 归一化法：色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB C_{18} 柱 (4.6 mm×150 mm，3.5 μm)；流动相 A 为 0.1 % TFA 水溶液，B 为 0.1 % TFA 乙腈溶液，梯度洗脱 (0—45 min：B 5 % —65 %)；柱温 25 ℃；检测波长 214 nm；流速 1.0 mL/min]。采用制备型 HPLC 纯化粗肽 [色谱柱 XBridge Prep C_{18} 半制备色谱柱 (19 mm×250 mm，10 μm)；流动相 A 为 0.1 % TFA 水溶液，B 为 0.1 % TFA 乙腈溶液，梯度洗脱 (0—5 min，B 20 %；5—30 min，B 20 % —40 %；30—40 min，B 40 % —95 %)；柱温 25 ℃；检测波长 214 nm；流速 15 mL/min]，收集主峰，冷冻干燥，得 HPLC 纯度为 97 % 的白色粉末肽段 **3**(120 mg，30 %)。ESI-MS(*m*/*z*): 483.00 $[M+5H]^{5+}$。

“一锅法”合成肽段 1

将肽段 **3**(20.0 mg，8.31 mmol) 溶解于水和乙腈 (体积比 1 ∶ 1) 的混合溶液 (20 mL) 中，得到质量

浓度为 1 mg/mL 的反应液。向反应体系中加入 0.5 倍当量碘（1.06 mg，4.16 mmol）的乙腈（50 μL）溶液，溶液变为淡黄色时，表明构建第 1 对二双硫键的氧化反应开始。约 2 min 后，再向反应体系中加入 10 倍当量碘（21.09 mg，83.1 mmol）的乙腈（1 mL）溶液，以去除 Acm 保护基并促进第 2 对二硫键的形成。30 min 后，加入抗坏血酸（29.27 mg，166.2 mmol）终止反应。随后，使用制备型 HPLC 进行纯化（条件同上），再于 －80 ℃冻干，得到白色粉末肽段 **1**（7.23 mg，36％）。经分析型 HPLC 检测（条件同上），肽段 **1** 的纯度为 98％。ESI-MS（*m/z*）：453.70 $[M+5H]^{5+}$。

圆二色谱检测：将多肽配制为 100 μmol/L 的水溶液，置圆二色谱仪中检测其二级构象。仪器参数如下：扫描波长范围 185 ～ 250 nm，步长 0.5 nm，带宽 1 nm，扫描速度 10 nm/min，温度 25 ℃。所有光谱数据在背景扣除后转换为摩尔椭圆率的统一尺度，并使用标准参数对曲线进行平滑处理。最后对测试得到的圆二色谱数据进行归一化处理，得到相应的圆二色谱图（图 6）。

参考文献：

[1] NAKAMURA T, FURUNAKA H, MIYATA T, *et al*. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure [J]. *J Biol Chem*, 1988, **263**(32): 16709-16713.

[2] ALAM A, LEVANDUSKI E, DENZ P, *et al*. Fungal mycobiome drives IL-33 secretion and type 2 immunity in pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2022, **40**(2): 153-167.

[3] HONG J, Li X Y, JIANG M Y, *et al*. Co-expression mechanism analysis of different tachyplesin Ⅰ -resistant strains in pseudomonas aeruginosa based on transcriptome sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2022, **13**: 871290.

[4] VERNEN F, HARVEY P J, DIAS S A, *et al*. Characterization of tachyplesin peptides and their cyclized analogues to improve antimicrobial and anticancer properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(17): 4184.

[5] WU J, CHEN X, ZHANG J X, *et al*. Tachyplesin induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells and enhances the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by activating Fas and necroptosis pathway [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, **97**(4): 809-820.

[6] JANA A, NARULA P, CHUGH A, *et al*. Efficient delivery of anti-miR-210 using tachyplesin, a cell penetrating peptide, for glioblastoma treatment [J]. *Int J Pharm*, 2019, **572**: 118789.

[7] LU S X, LIN J Y, JIN J M, *et al*. Tachyplesin Ⅰ and its derivatives: a pharmaco-chemical perspective on their antimicrobial and antitumor potential [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2022, **17**(12): 1407-1423.

[8] 朱俊华, 吴　宙, 冯炳斌, 等. 全球中华鲎资源保护现状及对策建议 [J]. 生物多样性, 2020, **28**(5): 621-629.

[9] YU R L, WANG J Y, SO L Y, *et al*. Enhanced activity against multi-drug resistant bacteria through coapplication of an analogue of tachyplesin I and an inhibitor of the QseC/B signaling pathway [J]. *J Med Chem*, 2020, **63**(7): 3475-3484.

[10] POSTMA T M, ALBERICIO F. *N*-Chlorosuccinimide, an efficient reagent for on-resin disulfide formation in solid-phase peptide synthesis [J]. *Org Lett*, 2013, **15**(3): 616-619.

[11] CUI H K, GUO Y, HE Y, *et al*. Diaminodiacid-based solid-phase synthesis of peptide disulfide bond mimics [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, **52**(36): 9558-9562.