

丙氨酰-谷氨酰胺二肽合成工艺研究进展[△]

石昌荣^{1*}, 唐果², 庄荣强^{1#a}, 赵玉芬^{2#b} (1. 厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361102; 2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361102)

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1999-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.28

摘要 目的: 为丙氨酰-谷氨酰胺二肽(Ala-Gln)类药物的进一步研究和生产提供参考。方法: 以“丙氨酰-谷氨酰胺二肽”“合成工艺”“谷氨酸水解法”“D-氯(溴)代丙酸法”“N-羧基内酰胺法”“活化酯法”“三苯基膦/六氯乙烷缩合法”“Ala-Gln peptides drugs”“Synthetic process”“Appel condensation method”等为关键词, 组合查询在中国知网、Web of Science等数据库中收录的1987年1月—2017年12月发表的相关研究文献, 进行归纳和总结。结果与结论: 共检索到相关研究文献678篇, 其中有效文献25篇。Ala-Gln以往的合成方法主要有谷氨酸水解法、D-氯(溴)代丙酸法、N-羧基内酰胺法、活化酯法、酶催化合成法等, 这些方法存在步骤烦琐、反应成本高、带有毒性、合成路线长、大批量生产的产率难以控制等缺点, 严重制约了其推广应用。三苯基膦/六氯乙烷缩合法具有合成成本低、可行性好、稳定性高、合成周期短等突出优点, 为推动Ala-Gln类药物大规模的生产和应用提供了可能。

关键词 丙氨酰-谷氨酰胺二肽; 合成工艺; 三苯基膦/六氯乙烷缩合法

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)是人体的非必需氨基酸, 是合成核酸和谷胱甘肽等的前体物质, 其生理功能具有多样性。研究发现, Gln在保护肝脏功能、治疗胃肠疾病、改善患者营养状况等方面起着重要的作用^[1-3]。其主要机制为: (1) Gln作为氧化应激的调节剂, 可逆转脂质过氧化过程, 恢复谷胱甘肽含量, 通过过氧化氢诱导的谷胱甘肽过氧化物酶以增强超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶的活性, 增加细胞膜的稳定性, 从而对抗氧自由基对肝脏的氧化损伤^[4-5]; (2) 手术、创伤、严重感染等应激状态下会导致患者营养不良, 提高Gln在血液中的浓度, 可促进蛋白质的合成、降低其分解, 改善患者营养状况^[6]。大量研究表明, 在人类肿瘤(如三阴性乳腺癌、肺癌、前列腺癌、神经胶质瘤、淋巴瘤等)中, Gln的代谢途径处于异常激活状态, 其机体需要量大大超过了机体自身合成Gln的能力^[7-8]。Lieberman BP等^[9]利用18F-(2S, 4R)-4-氟代谷氨酰胺探针针对肿瘤内Gln分解途径进行监测, 实现了活体层面的肿瘤正电子发射断层扫描(PET)成像, 发现Gln作为代谢的关键营养因子具有用作示踪代谢指示剂的可能, 为Gln的研究开辟了新的思路。另有研究发现, Gln可以调控巨噬细胞炎症反应通路, 而巨噬细胞在肿瘤的发展和免疫抑制等方面起着重要的作用, 也预示着Gln在介导肿瘤的免疫治疗中有着巨大的潜力^[10]。然而有关Gln理化性质的研究发现, 其水溶性小(溶解度只有36 g/L), 以水溶液形式长期储存

时化学稳定性不足, 且高温消毒时易生成有毒的焦谷氨酸和氨等^[11], 这些缺点限制了Gln在临床上的使用。因此, 合成既不改变Gln原有功能、又能克服单体Gln已知缺点的Gln类似物成为推动Gln应用的关键。有研究通过合成的丙氨酰-谷氨酰胺二肽(Ala-Gln)作为Gln的替代品, 以弥补Gln的不足: Ala-Gln具有高热稳定性, 水溶性达到586 g/L, 其在体内可以快速地代谢成Ala和Gln, 具有很好的生物利用度, 口服后仅有1%~2%的二肽从尿液中被排出体外, 因此其在临床上被广泛用作Gln的替代品^[11]。周燕萍等^[12]在对64例临床病例的研究中发现, 在胃肠道术后应用Ala-Gln是安全和有效的。目前, 文献中报道的Ala-Gln合成方法主要有酸酐法、酰卤法和活化酯法^[13-14]。为利于该类药物的后续研究和生产, 笔者以“丙氨酰-谷氨酰胺二肽”“合成工艺”“谷氨酸水解法”“D-氯(溴)代丙酸法”“N-羧基内酰胺法”“活化酯法”“三苯基膦/六氯乙烷缩合法”“Ala-Gln peptides drugs”“Synthetic process”“Appel condensation method”等为关键词, 组合查询在中国知网、Web of Science等数据库中收录的1987年1月—2017年12月发表的相关研究文献(共检索到相关研究文献678篇, 其中有效文献25篇), 进行了归纳和总结。

1 Ala-Gln合成方法

1.1 谷氨酸水解法

由于谷氨酸比较稳定, Yasutsugu S等^[15]利用苄氧羰基保护的Ala(Cbz-Ala)和谷氨酸甲酯通过二环己基碳二亚胺(DCC)缩合反应合成二肽, 可用催化氢解脱去氨基的Cbz保护基, 得到丙氨酸谷氨酸 γ -羧基甲酯, 该甲酯经浓氨水水解后, 即可得到Ala-Gln(见图1)。

该方法采用了价格便宜的谷氨酸替代Gln, 实现了Ala-Gln的合成, 但反应过程中需要对氨基酸进行保护和脱保护, 步骤较为烦琐, 同时也增加了反应成本。另外, 贵金属钯的高成本和残留以及反应生成难除尽的二

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.21778042); 福建省自然科学基金资助项目(No.2016J05200)

* 硕士研究生。研究方向: 肿瘤早期诊断及抗肿瘤药物。电话: 0592-2880644

a 通信作者: 工程师, 博士。研究方向: 有机磷化学、放射药物化学。电话: 0592-2880644。E-mail: zhrq@xmu.edu.cn

b 通信作者: 院士, 教授。研究方向: 生命有机化学、有机磷化学、生命起源、药物化学、化学生物学。电话: 0592-2185610。E-mail: zhaoyf@xmu.edu.cn

环己基脲(DCU)带来的毒性制约了该方法的应用,故不适于规模化生产²²。

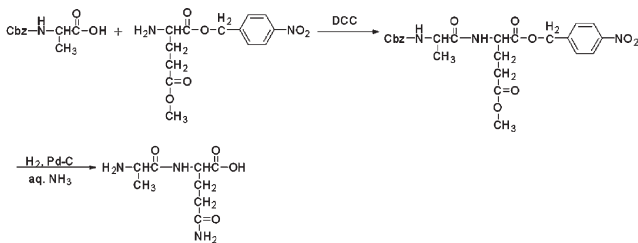


图1 谷氨酸水解法合成 Ala-Gln

1.2 D-氯(溴)代丙酸法

Yasutsugu S等^[15]利用手性的D-氯(溴)代丙酸经二氯亚砷活化,形成酰氯,然后滴加到Gln的氢氧化钠水溶液中,保持pH在10左右,反应中间体经氨解后生成Ala-Gln(见图2)。

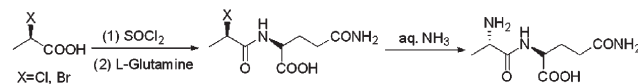


图2 D-氯(溴)代丙酸法合成 Ala-Gln

该合成方法操作较简便、步骤短,但手性原料贵,大大增加了合成成本。该合成过程使用水作为溶剂,而反应物酰氯又容易水解,因此该方法会产生较多的副产物从而导致偶联产率较低。此外,D-2-溴丙酰基-L-Gln的氨解需要升高温度,亦导致副产物的增加,尤其是导致氨基酸的消旋化,最终得到的Ala-Gln的光学纯度较低,比如产物中可能混有D-Ala-L-Gln、D-Ala-D-Gln、L-Ala-D-Gln等消旋体。产率低问题成为限制该合成工艺发展的主要因素。肖湘等^[16]报道,将2-(氯代)丙酰基氯与Gln反应,然后再氨解,通过两步反应能简便而有效地获得Ala-Gln,且保持溶液在碱性条件(pH为9~10.5)时,产品收率可达到52%,但其纯化水平距离大规模生产要求还有很长一段路。

1.3 N-羧基内酸酐法

丙氨酸与光气反应生成N-羧基内酸酐,随后将N-羧基内酸酐缓慢滴加到Gln的水溶液中,通过添加氢氧化钠使溶液的pH保持在10.2,反应完成后酸化,即可得到Ala-Gln^[17](见图3)。

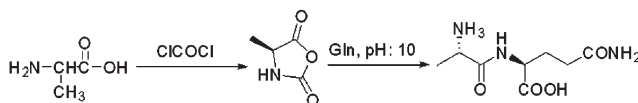


图3 N-羧基内酸酐法合成 Ala-Gln

该方法合成步骤短,避免了使用保护基,合成成本较低。但该方法缺点也非常明显:一方面由于N-羧基内酸酐活性非常高,无法保存;另一方面,N-羧基内酸酐与Gln反应时,容易生成三肽、四肽等副产物,其副产物的总量很大,导致该方法的产率较低,且对目标产物的纯化较为困难。同时,光气为有毒物质,当反应不完全时可能对人体产生毒性。陈然等^[18]报道用邻苯二甲酰基作为保护基,采用混合酸酐法将邻苯二甲酰基保护的丙

氨酸与L-Gln缩合成邻苯二甲酰基保护的Ala-L-Gln,最后采用水合肼脱除邻苯二甲酰基,并按中试规模制备了目标产物L-Ala-L-Gln,以L-Ala计总摩尔收率为34.4%。较高的收率在一定程度上推动了该方法用于大规模生产的进程。但由于水合肼腐蚀性强,在大规模生产过程中需要特殊设备,也增加了生产成本,且目前产物的收率和杂质不稳定等缺点也限制了其工业化应用。

1.4 活化酯法

潘和平等^[19]利用叔丁氧羰基保护的丙氨酸,与N-羧基琥珀酰亚胺在DCC缩合下,形成稳定的活化酯,再将活化酯滴加到谷氨酸甲酯饱和的碳酸氢钠溶液中,反应完成后酸化,得到叔丁氧羰基保护的丙氨酸-谷氨酸甲酯二肽,产物经不饱和脂肪酸脱去叔丁氧羰基保护基,再经浓氨水氨解后,即可得到Ala-Gln(见图4)。

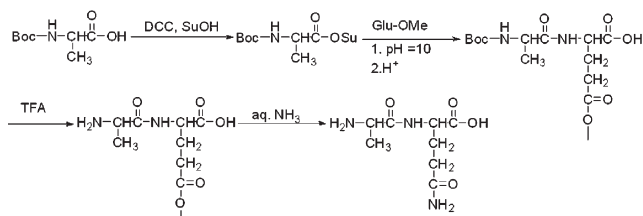


图4 活化酯法合成 Ala-Gln

该合成方法操作较简便,且随着其工艺的成熟,合成过程中的杂质也更易于控制,因此是目前各厂家合成Ala-Gln的主要工艺。但其不足之处是合成路线长,导致最后一步无法获得较多的合格产品,且其副产物DCU很难完全除去,加之原料N-羧基琥珀酰亚胺价格贵,也限制了其进一步大规模推广应用。

1.5 三苯基膦/六氯乙烷(Appel)缩合法

本课题组采用亚磷酸酯保护的丙氨酸与三苯基膦和六氯乙烷先在有机溶剂中反应生成活化酯,再与Gln于有机溶剂中进行反应,而后在酸溶液中脱去N端保护基团,最终得到Ala-Gln(见图5)。

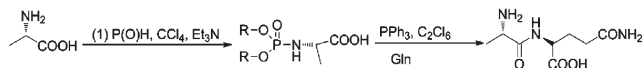


图5 Appel缩合法合成 Ala-Gln

该合成方法具有操作较简便、用时短、产率高、合成成本低等优点,适宜大规模生产,获得了中国专利:CN1683391^[20],国际专利公开号:WO03/106481A1。该方法优化了Ala-Gln合成反应条件,通过了中试,验证了小试工艺技术的可行性、稳定性,为Ala-Gln合成的国产化推广奠定了基础。本课题组利用中试产品已申报3类原料药,并获受理(闽新药受理号:20030021)。

1.6 酶催化合成法

Tabata K等^[21]报道了通过大肠杆菌来生产Ala-Gln的发酵工艺,该大肠杆菌上表达有L-氨基酸α-连接酶,可三磷酸腺苷依赖性地合并Ala和Gln,从而催化Ala-Gln的形成。Yokozeki K等^[22]筛选了能够催化Ala-Gln合成反应的971种微生物菌株,发现短稳杆菌

(ATCC 14234)具有非常好的效能,并从该菌中纯化出了可用于生产Ala-Gln的酶。Miyazawa T等^[23]报道了一种动力学控制酶催化合成Ala-Gln的前体Z-Ala-Gln的方法:利用低廉的木瓜蛋白酶作为催化剂,可以在35℃、pH 9.5的条件下合成Z-Ala-Gln,Ala-Gln的产率可以达到35.5%。Hernández JG等^[24]利用机械研磨的方法,使酶催化生产Ala-Gln的产率提高至45%。洪翔等^[25]利用重组枯草芽孢杆菌L-氨基酸连接酶成功地生物合成出Ala-Gln,为Ala-Gln的生物制造奠定了理论基础。利用酶催化的方法反应不需要使用保护基,没有用到化学试剂,可以得到手性单一的产物,小批量生产的产率较高;但同时亦有发酵产酶纯化过程复杂、酶在使用一段时间后容易失活、大批量生产的产率较难控制等不足。

2 结语

综上所述,多种合成Ala-Gln的方法和工艺推动了其在临床进一步推广应用。目前的合成方法主要存在水解时氨基酸存在手性异构等问题,这些问题都限制了其工业化应用并给产品的安全性带来了隐患。与其他方法相比,谷氨酸水解法烦琐的反应步骤、高额的合成成本以及毒性问题使其具有一定的局限性。D-氯(溴)代丙酸法相比谷氨酸水解法在合成步骤上更为简易,成本相对低廉,但其产物的纯度是限制其发展的主要因素。N-羟基丙酸酐法较之前两种方法,合成步骤更为简易,合成周期短,因避免了使用保护基使其合成成本更加低廉,但该方法存在反应副产物过多导致其目标产物产率不够高的问题,使其用于大规模生产受到限制。目前活化酯法是应用最广泛的合成方法,较之以上方法其具有较高的产率、较短的合成周期等优点,但高成本是限制其大规模生产的主要原因。Appel缩合法的出现以其合成成本更加低廉、可行性好、稳定性高、合成周期短等突出的优点为推动Ala-Gln的大规模生产和应用提供了可能。相对于化学合成的方法,酶催化合成法可以得到手性单一的产物,小批量产率较高、毒性小,但其生产条件要求极为严格,生产中的酶极易失活。

参考文献

[1] 周健,司继刚. 丙氨酰谷氨酰胺的临床应用进展[J]. 中国药房,2016,27(26): 3739-3741.

[2] HARTMANN R, LICKS F, SCHEMITT E G, et al. Effect of glutamine on liver injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. *Nutri Hosp*, 2017, 34 (3): 548-554.

[3] NEWSHOLME EA, CALDER PC. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal[J]. *Nutrition*, 1997, 13(13): 728-730.

[4] ZHAI Y, SUN Z, ZHANG J, et al. Activation of the TOR signalling pathway by glutamine regulates insect fecundity [J]. *Sci Rep*, 2015. DOI: 10.1038/SREP/0694.

[5] AMORES-S NCHEZ MI, MEDINA MA. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress[J]. *Mol Genet Metab*, 1999, 67(2): 100-108.

[6] COSTER J, MCCAULEY R, HALL J. Glutamine: metabolism and application in nutrition support[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2004, 13(1): 25-31.

[7] TIAN Y, DU W, CAO S, et al. Systematic analyses of glutamine and glutamate metabolisms across different cancer types[J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 88-96.

[8] ZHANG J, PAVLOVA N N, THOMPSON C B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine[J]. *EMBO J*, 2017, 36(10): 1302-1315.

[9] LIEBERMAN BP, PLOESSL K, WANG L, et al. PET imaging of glutaminolysis in tumors by 18F-(2S, 4R) 4-fluoroglutamine[J]. *J Nucl Med*, 2011, 52(12): 1947-1955.

[10] SARTORI T, GALVAO DOS SANTOS G, NOGUEIRA-PEDRO A, et al. Effects of glutamine, taurine and their association on inflammatory pathway markers in macrophages[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(3): 829-838.

[11] YAGASAKI M, HASHIMOTO S. Synthesis and application of dipeptides: current status and perspectives[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(1): 13-22.

[12] 周燕萍, 龚茜芬, 王自强. 丙氨酰谷氨酰胺双肽在胃肠道术后应用的安全性和有效性观察[J]. 中国药房, 2005, 16(17): 1321-1323.

[13] 杨琪. 丙氨酰谷氨酰胺的制备工艺改进[J]. 科技展望, 2015(8): 77.

[14] 柯远. 丙谷二肽合成工艺改进[D]. 济南: 济南大学, 2013.

[15] YASUTSUGU S, SHUMPEI S, SHIRO A. Studies on the synthesis of peptides containing glutamine as the c-terminal. 1. protection of amide-nitrogen with xanthy group during peptide synthesis[J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 2006, 35(12): 1966-1970.

[16] 肖湘, 覃军, 王祥智. 丙氨酰-谷氨酰胺的简便有效合成[J]. 化学研究与应用, 2002(3): 332-333.

[17] DJA ERICKSON RA, FROEN DE, et al. The synthesis of the high-potency sweetener, nc-00637. part 2: preparation of the pyridine moiety[J]. *Org Process Res Dev*, 2004, 8(1): 62-71.

[18] 陈然, 钱绍松, 吴晓燕, 等. 10 t/a 中试规模制备二肽L-丙氨酰-L-谷氨酰胺[J]. 精细化工, 2005(12): 958-960.

[19] 潘和平, 王良友, 徐琪寿, 等. 液相合成含谷氨酰胺、天门冬酰胺肽链的方法及其中间体: 中国, CN1295079 [P]. 2001-05-16.

[20] 唐果, 赵玉芬, 许鹏翔, 等. N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽合成方法: 中国, CN1683391 [P]. 2005-10-19.

[21] TABATA K, HASHIMOTO S. Fermentative production of L-alanyl-L-glutamine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain expressing L-amino acid alpha-ligase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(20): 6378-6385.

[22] YOKOZEKI K, HARA S. A novel and efficient enzymatic

藏药诃子的化学成分与药理活性研究进展^Δ

张媛媛*, 曾慧婷, 袁源见, 李 雪*(江西省中医药研究院, 南昌 330046)

中图分类号 R282;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-2002-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.29

摘要 目的:了解藏药诃子化学成分和药理活性的研究进展,为开发利用诃子植物资源提供参考。方法:以“诃子”“化学成分”“药理作用”“生物活性”“*Terminalia chebula*”“Chemical constituents”“Pharmacological activity”“Biological activities”等为关键词,组合查询PubMed、中国知网、Sci-Hub等数据库中收录的1984—2017年发表的相关文献,对诃子化学成分与药理活性的研究进展进行总结与归纳。结果与结论:共检索到相关文献195篇,其中有效文献47篇。诃子的主要化学成分包括鞣质类、酚酸类、三萜类、黄酮类等。诃子具有多种药理活性,其提取物及活性成分主要通过清除自由基、影响氧化酶活性、抗氧化应激反应等机制发挥抗氧化作用;通过影响神经组织中的超氧化物歧化酶、脑源性神经营养因子、丙二醛、总氧化状态、氧化应激指标、一氧化氮等水平,发挥神经保护作用;通过影响肿瘤细胞凋亡信号转导途径、影响肿瘤细胞蛋白质合成与功能、影响肿瘤细胞核酸生物合成、与抗肿瘤药物产生协同药效等机制发挥抗肿瘤作用;通过抑制病毒对宿主细胞的吸附及渗透能力、抑制病毒蛋白酶活性、降低病毒体外传染性等机制发挥抗病毒作用;通过抑制细菌细胞蛋白酶活性、抑制细胞膜外排功能、抑制核酸合成等机制发挥抗菌作用。

关键词 诃子;化学成分;药理活性;研究进展

藏药诃子为使君子科植物诃子(*Terminalia chebula* Retz.)或绒毛诃子(*Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt.)的干燥成熟果实,别称为诃黎勒、诃黎、随风子,原产于印度、缅甸等国,在我国西藏、云南、广东、广西等地均有分布^[1-3]。诃子具有涩肠敛肺、降火利咽之功效,现代药理研究证实它具有抗氧化、神经保护、抗肿瘤、抗病毒、抗菌等多种药理作用^[4],其所含有的主要化学成分包括鞣质类、酚酸类、三萜类、黄酮类等^[5]。在藏医药和蒙医药中,诃子最为常用,其使用频率几乎与汉医方剂中甘草相等,被视为“藏药之王”^[6]。诃子作用多样、临床应用广、药用价值高,但目前对其研究较少且比较零散,其药效成分和作用机制尚不够明确,因此迫切需要对其化学成分和药理活性进行系统研究。基于此,笔者以“诃子”“化学成分”“药理作用”“生物活性”“*Terminalia chebula*”“Chemical constituents”“Pharmacological activity”“Biological activities”等为关键词,组合查询中国知网、PubMed、Sci-Hub等数据库中收录的1984—

2017年发表的相关文献。结果共检索到相关文献195篇,其中有效文献47篇,据此对诃子化学成分与药理活性的研究进展进行了归纳、总结,为进一步深入开发利用诃子植物资源提供参考。

1 化学成分研究

1.1 鞣质类成分

诃子果实的主要活性成分为鞣质类,该类成分在干燥果实中约占23.60%~37.36%^[7]。丁岗等^[8]从诃子果实中分离得到3,6-二-O-没食子酰基-D-葡萄糖(3,6-di-O-galloyl-D-glucose)、6-O-没食子酰基-D-葡萄糖(6-O-galloyl-D-glucose)、1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖(1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose)、(-)莽草酸盐4-O-没食子酸酯[(-)-shikimide 4-O-gallate]、(-)莽草酸3-O-没食子酸酯[(-)-莽草酸5-O-没食子酸酯[(-)-shikimide acid 3-O-gallate(-)-shikimide acid 5-O-gallate]、2,3-(S)-六羟基联苯二甲酰基-D-葡萄糖[2,3-(S)-HHDp-D-glucose]。Lin T等^[9]从诃子中分离得到鞣花酸(Ellagic ac-

method for the production of peptides from unprotected starting materials[J]. *J Biotechnol*, 2005, 115(2): 211-220.

[23] MIYAZAWA T, HORIMOTO T, TANAKA K. Kinetically

Δ 基金项目:江西省自然科学基金资助项目(No.20161BAB205222);江西省青年科学基金资助项目(No.20171BAB215075);江西省卫生计生委中医药科研课题(No.2017A320)

* 研究实习生,硕士。研究方向:中药分析。电话:0791-8501404。E-mail:1261115822@qq.com

通信作者:助理研究员,博士。研究方向:药物化学。电话:0791-8501404。E-mail:742914798@qq.com

controlled peptide synthesis mediated by papain using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor[J]. *Int J Pept Res Ther*, 2014, 20(3): 371-376.

[24] HERNÁNDEZ JG, ARDILA-FIERRO KJ, CRAWFORD D, et al. Mechanoenzymatic peptide and amide bond formation [J]. *Green Chem*, 2017, 19(11): 2620-2625.

[25] 洪翔,朱新雅,贾子樊,等.利用重组枯草芽孢杆菌L-氨基酸连接酶合成丙谷二肽[J]. *发酵科技通讯*, 2017, 46(2): 83-87.

(收稿日期:2018-02-06 修回日期:2018-04-08)

(编辑:张 静)