抗结核环七肽 asperheptatides A 和 B 的化学全合成

姜亚楠[1,2]，李林吉[2]，李　翔[2]，莫金秋[2]，张卫东[1,2]*
（1. 广东药科大学中药学院，广东广州 510006；2. 海军军医大学药学系天然药物化学教研室，上海 200433）

摘要：通过 Fmoc 固相合成法，以 2- 氯三苯基氯（CTC）树脂为载体、Fmoc-Phe-OH 为起始原料、1- 羟基苯并三唑（HOBt）/*N*,*N*′- 二异丙基碳二亚胺（DIC）为缩合体系，在树脂上得到直链肽后，液相中实现环合，再利用三氟乙酸（TFA）脱去环肽侧链保护基，经制备型 HPLC 纯化。通过 HPLC、MS 及 ^{1}H NMR 进行表征分析，分别得到纯度为 97% 的抗结核药环七肽 asperheptatides A（总收率为 7.29%），以及纯度为 95% 的抗结核药环七肽 asperheptatides B（总收率为 6.57%）。

关键词：抗结核药；固相多肽合成；环肽；asperheptatides
中图分类号：R974　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)03-0317-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.03.006

Total Chemical Synthesis of Antituberculosis Cyclic Heptapeptides, Asperheptatides A and B

JIANG Yanan[1,2], LI Linji[2], LI Xiang[2], MO Jinqiu[2], ZHANG Weidong[1,2]*
(*1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006;*
2. Dept. of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT: With 2-chlorotriphenyl chloride(CTC) resin as the solid support, Fmoc-Phe-OH as the starting material, and 1-hydroxybenzotriazole(HOBt)/*N*,*N*′-diisopropylcarbodiimide(DIC) as the condensation reagent, the protected peptides were assembled through Fmoc-based solid-phase peptide synthesis(SPPS) and cyclized in liquid phase. Trifluoroacetic acid(TFA) was then used to remove the side chain protection to afford the title cyclic peptides. Then they were purified by preparative liquid chromatography. The HPLC, MS and ^{1}H NMR were used to characterize the pure products. The results showed that the purity of asperheptatides A was 97% with total yield of 7.29% and the purity of asperheptatides B was 95% with total yield of 6.57%.

Key Words: antituberculotic drug; solid phase peptide synthesis; cyclic peptide; asperheptatides

结核病（tuberculosis，TB）是一种慢性传染性致死类疾病，主要由结核分枝杆菌引起，2018 年全球约 120 万人死于 TB[1—2]。目前应用最广泛的一线药物为异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺，还有众多二线药物。2009 年首次报道了全耐药结核病（totally drug-resistant TB，TDR-TB）[3]，且该病患者在治疗期间由于免疫力下降，可能会感染人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）[4]。鉴于 TDR-TB 对人类社会的巨大危害，迫切需要研发具有特殊结构和独特作用方式的新药。

抗菌肽（antibiotic peptides，AMPs）是一种两亲性小肽，被认为是治疗 TB 的主要潜在药物之一[5]。AMPs 根据其二级结构可分为 4 类：α 螺旋、β 螺旋、扩展螺旋和环肽。近年来从天然产物中分离提取到多种新型抗结核多肽[6—7]，如从海洋生物中提取得到的香豆素[8]、青冈肽[9]、R4W4[10]、赖氨霉素[11]；此外也有人工合成的 AMPs，如含有（*Z*）-2,3- 二氨基丙烯酰胺桥联基序的抗结核环肽 callyaerin A[12]，均对结核分枝杆菌有良好的抑制效果。

收稿日期：2021-06-17
作者简介：姜亚楠(1997—)，女，硕士，从事抗结核环肽药物的研究。
通信作者：张卫东(1966—)，男，教授，从事中药及复方的药效物质和创新中药的研究、质量控制和体内代谢研究。
E-mail：wdzhangy@hotmail.com

2020年我国学者从珊瑚衍生真菌杂色曲霉（*Aspergillus versicolor*）中分离得到4种新型环七肽，其中2种已确定肽的平面结构和氨基酸残基的绝对构型，分别为asperheptatides A（**1**）和asperheptatides B（**2**）（图1）[13]。**1**结构为：环[D-Ser-D-Trp-L-Ser-Gly-D-Val-L-Phe-D-Val]，相对分子质量为762.37。2结构为：环[D-Ala-D-Trp-L-Ala-D-Ala-D-Val-L-Phe-D-Val]，相对分子质量为788.39。二者均具有一定的抗结核分枝杆菌H37Ra活性，最低抑菌浓度均为100 μmol/L；但由于来源于不易培养的海洋真菌且分离纯化难度大，无法深入研究其抗结核活性。目前国内外关于**1**和**2**的全合成未见文献报道，因此研究二者的全合成方法具有实际意义。

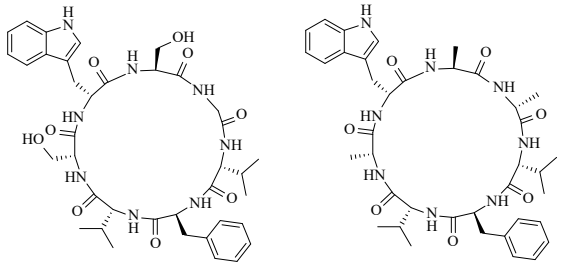


图1　1和2的结构

Fig.1　Structures of **1** and **2**

1　实验部分

1.1　仪器与试药

CHA-S型气浴恒温振荡器（常州国宇仪器制造有限公司）；VARIAN Pro Star型制备液相色谱仪（美国瓦里安技术中国有限公司）；Waters e2695型高效液相色谱仪[沃特世科技（上海）有限公司]；6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS质谱仪（美国安捷伦公司）。

2-氯三苯基氯（CTC）树脂（天津南开和成科技有限公司）；Fmoc-氨基酸[吉尔生化（上海）有限公司]；*N*,*N*-二异丙基乙胺（DIPEA）、1-羟基苯并三唑（HOBt）、*N*,*N*'-二异丙基碳二亚胺（DIC）、苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸（PyBOP）（上海泰坦科技股份有限公司）；三氟乙酸（TFA，北京百灵威科技有限公司）；三氟乙醇（TFE，萨恩化学技术有限公司）；乙腈为色谱纯，二氯甲烷（DCM）、*N*,*N*-二甲基甲酰胺（DMF）、茚三酮、哌啶、甲醇均为分析纯（国药集团化学试剂北京有限公司）。

1.2　方法

以**1**为例，按图2所示路线进行合成。

1.2.1　1和2直链肽的制备

取CTC树脂1 g（载样量为0.45 mmol/g）加至固相多肽合成（SPPS）反应管中，用DCM浸泡20 min使树脂充分溶胀，再用DMF冲洗3次，抽干待用。将Fmoc-Phe-OH（582 mg，1.5 mmol）用DMF（7 ml）溶解，加入DIPEA（550 μl），加至含树脂的反应管中，常温振荡2 h，依次用DMF、DCM、DMF各洗涤树脂3次，再加入甲醇（7 ml）常温振荡20 min以封闭未反应的树脂。洗涤后加入20%哌啶的DMF溶液（10 ml），常温振荡（10 min×2），脱去Phe的Fmoc保护基，再用DMF、DCM、DMF各洗涤树脂3次。随后根据直链肽序列，将Fmoc-氨基酸（Fmoc-AA-OH，1.5 mmol）、HOBt（202.7 mg，1.5 mmol）和DIC（300 μl）溶于DMF（7 ml）中，再加至反应管中，常温振荡1 h，通过脱保护-缩合-脱保护步骤重复操作。**1**依次偶联Fmoc-D-Val-OH、Fmoc-D-Ser-OH、Fmoc-D-Trp-OH、Fmoc-L-Ser-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-D-Val-OH；**2**依次偶联Fmoc-D-Val-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Trp-OH、Fmoc-L-Ala-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Val-OH，直到最后一个氨基酸连接完成。在缩合过程中，取少量树脂，通过茚三酮溶液显色反应监测反应是否完全。

1.2.2　直链肽的游离与纯化

直链肽制备完成后，在树脂中加入无水乙醚抽干，加入TFE∶DCM（1∶4，10 ml）混合液，室温摇床振荡4 h，将肽链从树脂上游离出来，过滤，滤液加冰乙醚析晶、离心，重复3次，氮气吹干得粗品。用制备液相色谱纯化后备用。

1.2.3　肽链的液相环合与纯化

将HOBt（3倍摩尔量）、PyBOP（3倍摩尔量）和DIPEA（6倍摩尔量）溶解于DCM中，在0 ℃将直链肽的DCM溶液缓慢滴加到HOBt、PyBOP和

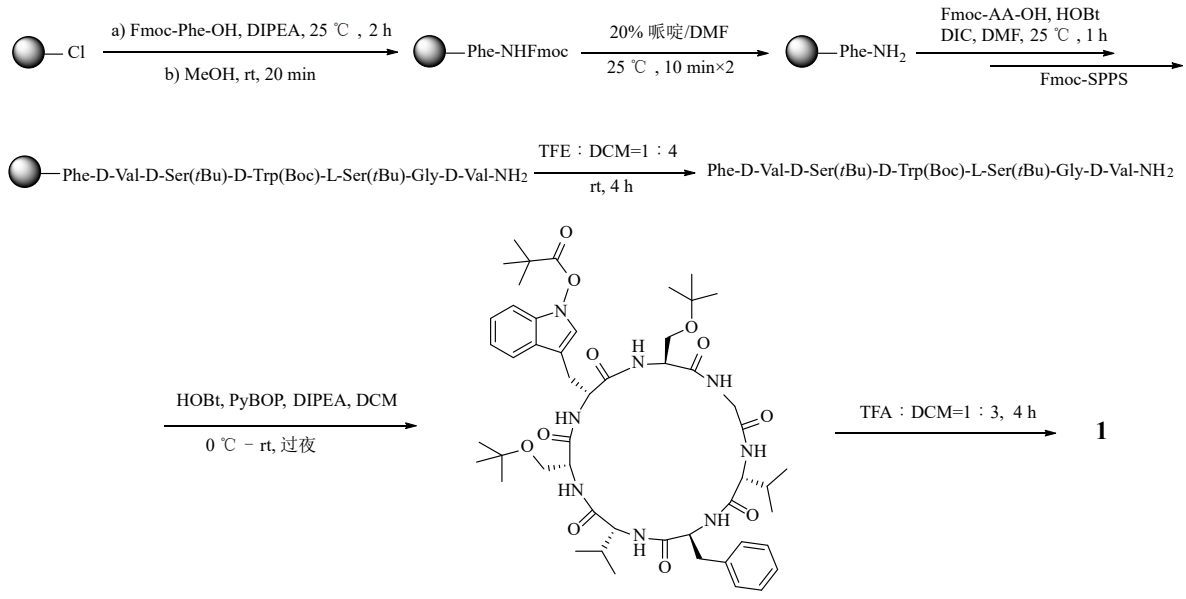


图 2　1 的合成路线

Fig.2　Synthetic Route of **1**

DIPEA 的混合溶液中。滴毕缓慢升至室温，搅拌 12 h，减压浓缩得环肽粗品。同样用制备液相色谱纯化。

1.2.4　环肽氨基酸侧链保护基的脱除

在环肽纯品中加入 TFA ∶ DCM(1 ∶ 3，8 ml)，室温搅拌 4 h 脱去氨基酸侧链保护基，减压浓缩，溶于 50%乙腈水溶液中，冻干即得［由于侧链保护基只有 Boc 和 *t*-Bu，而其酸解产物为异丁烯(bp －6.9 ℃)和 CO_2，直接冻干就可以除去，故不需要纯化］。

1.2.5　**1** 和 **2** 的分析与表征

1 和 **2** 纯度用 HPLC 峰面积归一化法检测：色谱柱 XBridge C_{18} 柱 (4.6 mm×150 mm，5 μm)；检测波长　214 nm；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—30 min，B 5%—65%)；流速　1.0 ml/min；柱温　30 ℃。

1 和 **2** 的结构经 Q-TOF-MS 和 ^{1}H NMR 确证。

2　结果与讨论

2.1　HPLC 分析和 MS 分析

2.1.1　**1** 的 HPLC 分析和 MS 分析

将直链肽从树脂上切割纯化后得到纯品 100 mg，此步收率为：(实际值 100 mg)/(理论值 992×0.45 mmol)×100% =22.4%，通过图 3 可知，**1** 直链肽的保留时间为 28.865 min，经峰面积归一化法计算得其纯度为 97%。分子离子峰 993.563 3[M+H]$^+$，与 **1** 直链肽相对分子质量相符。

将直链肽在液相中环合纯化后得到纯品 32 mg，此步收率为：(实际值 32 mg)/(理论值 974×0.45 mmol)×100% =7.3%，通过图 4 可知，**1** 直链肽环合后的保留时间为 33.534 min，经峰面积归一化法计算得其纯度为 98%。分子离子峰 975.560 7[M+H]$^+$，与 **1** 直链肽环合后相对分子质量相符。

将环合后纯品脱除侧链保护基得到纯品 25 mg，此步收率为：(实际值 25 mg)/(理论值 762×0.45 mmol)×100% =7.29%，通过图 5 可知，**1** 环肽脱保护基后的保留时间为 21.456 min，经峰面积归一化法计算得其纯度为 97%。分子离子峰 763.373 5[M+H]$^+$、785.359 1[M+Na]$^+$，与 **1** 环肽脱保护基后相对分子质量相符。

2.1.2　**2** 的 HPLC 分析和 MS 分析

将直链肽从树脂上切割纯化后得到纯品 100 mg，此步收率为：(实际值 100 mg)/(理论值 863×0.45 mmol)×100% =25.75%，通过图 6 可知，**2** 直链肽的保留时间为 24.786 min，经峰面积归一化

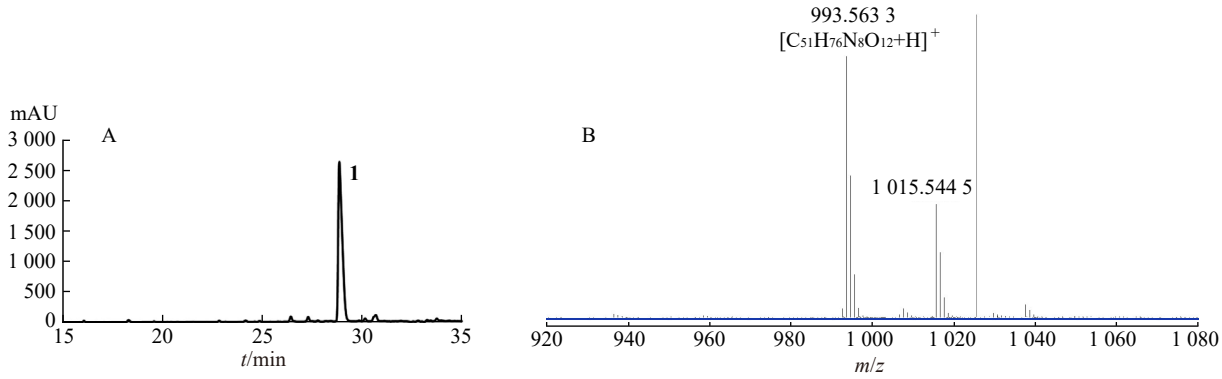


图 3　1 全保护直链肽的 HPLC（A）和 MS（B）谱图

Fig.3　HPLC Chromatogram (A) and MS Spectrum (B) of Protected Linear Peptide **1**

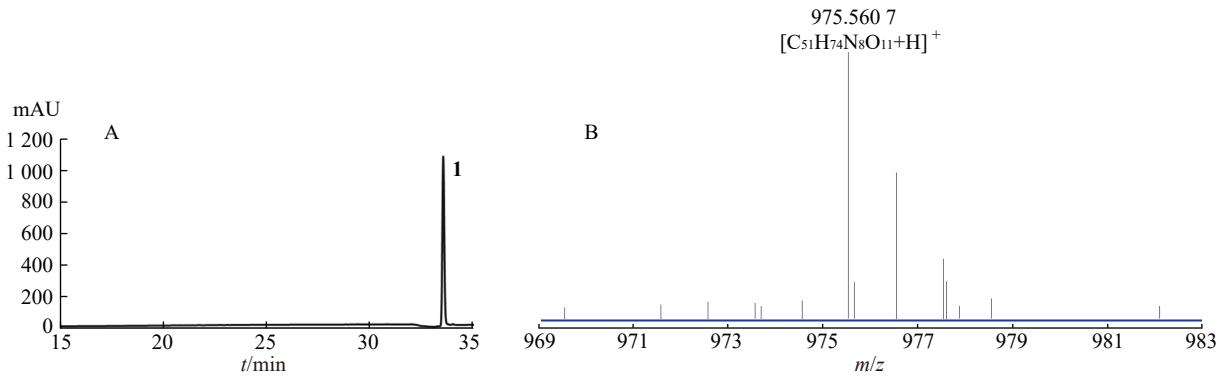


图 4　1 直链肽环合后的 HPLC（A）和 MS（B）谱图

Fig.4　HPLC Chromatogram (A) and MS Spectrum (B) of the Cyclic Peptide from Linear Peptide **1**

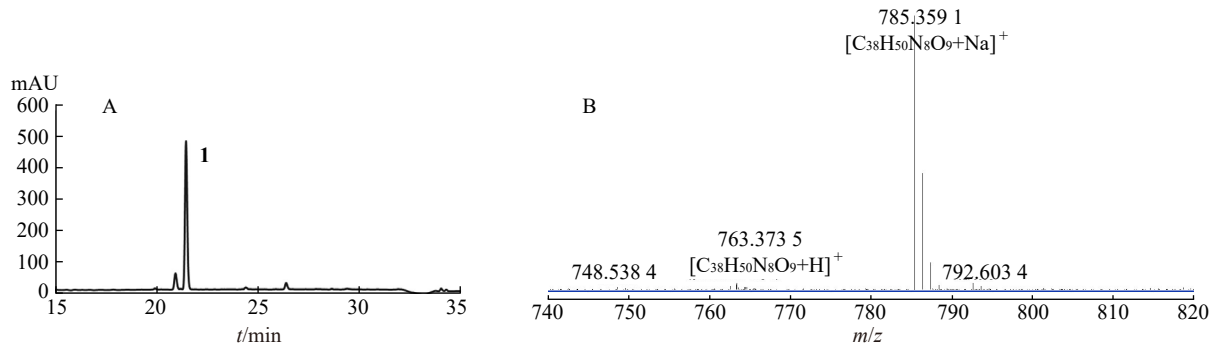


图 5　1 纯品的 HPLC（A）和 MS（B）谱图

Fig.5　HPLC Chromatogram (A) and MS Spectrum (B) of Purified **1**

法计算得其纯度为 94%。分子离子峰 863.465 3 [M+H]$^+$、885.446 0[M+Na]$^+$，与 **2** 直链肽相对分子质量相符。

将直链肽在液相中环合纯化后得到纯品 28 mg，此步收率为：(实际值 28 mg)/(理论值 844×0.45 mmol)×100% =7.37%，通过图 7 可知，**2** 直链

肽环合后的保留时间为 29.605 min，经峰面积归一化法计算得其纯度为 98%。分子离子峰 867.436 8 [M+Na]$^+$，与 **2** 直链肽环合后相对分子质量相符。

将环合后纯品脱除侧链保护基后得到纯品 22 mg，此步收率为：(实际值 22 mg)/(理论值 744×0.45 mmol)×100% =6.57%，通过图 8 可知，**2** 环肽脱保护基后的保留时间为 24.101 min，经峰面积归一化法计算得其纯度为 95%。分子离子峰 745.403 0[M+H]$^+$、767.385 0[M+Na]$^+$，与 **2** 环肽脱保护基后相对分子质量相符。

2.2 ^{1}H NMR 鉴定

1 的 ^{1}H NMR 数据如下。^{1}H NMR (500 MHz, 吡啶 -d_5) δ: 11.84 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.79 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.41 (dd, *J*=15.3、7.8 Hz, 3H), 7.26 (t, *J*=7.8 Hz, 3H), 7.11 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.09 ～ 4.34 (m, 3H), 4.02 (s, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.50 (d, *J*=13.4 Hz, 1H), 3.10 (d, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.55 (s, 1H), 1.09 (d, *J*=5.9 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H)。与文献报道一致[13]。

2 的 ^{1}H NMR 数据如下。^{1}H NMR (500 MHz, 吡啶 -d_5) δ: 11.90 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.72 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.21 (s, 5H), 7.09 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 7.01 ～ 7.07 (m, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.59 ～ 3.63 (m, 2H), 2.78 (s, 1H), 2.51 (d, *J*=6.7 Hz, 1H), 2.01 ～ 2.16 (m, 3H), 1.56 (d, *J*=4.3 Hz, 3H), 1.42 ～ 1.47 (m, 3H), 1.06 ～ 1.12 (m, 3H), 0.27 ～ 0.31 (m,

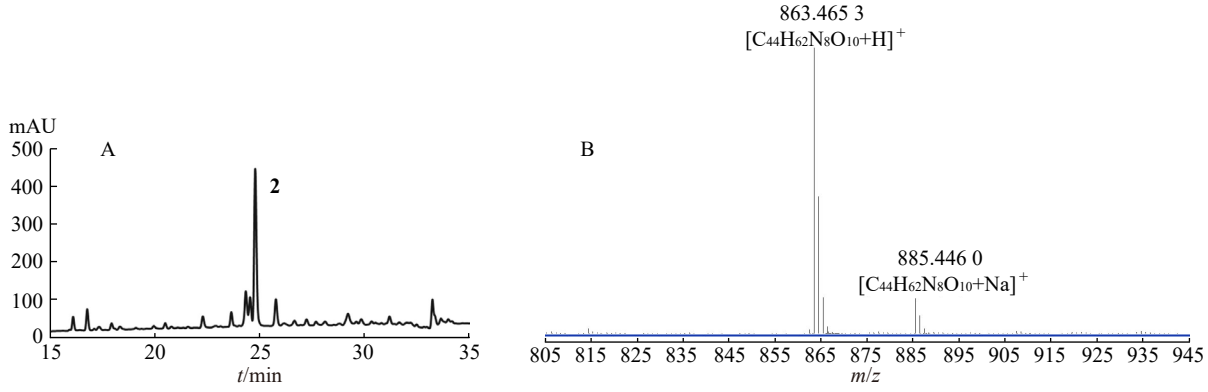


图 6　2 全保护直链肽的 HPLC (A) 和 MS (B) 谱图

Fig.6　HPLC Chromatogram (A) and MS Spectrum (B) of Protected Linear Peptide **2**

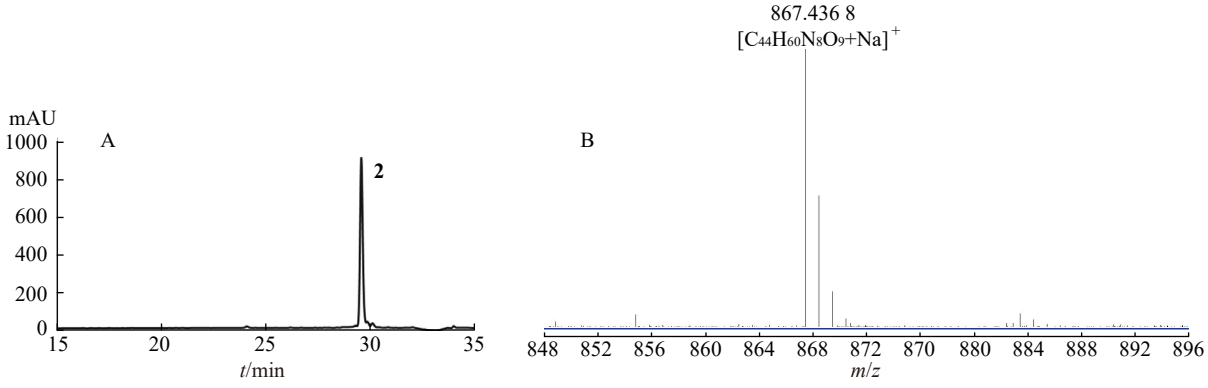


图 7　2 直链肽环合后的 HPLC (A) 和 MS (B) 谱图

Fig.7　HPLC Chromatogram (A) and MS Spectrum (B) of the Cyclic Peptide from Linear Peptide **2**

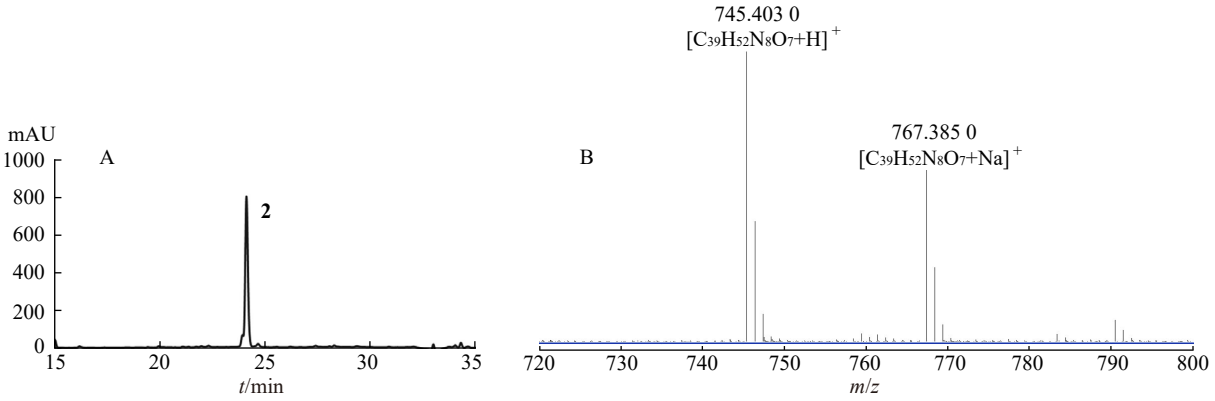


图 8　2 纯品的 HPLC（A）和 MS（B）谱图

Fig.8　HPLC Chromatogram（A）and MS Spectrum（B）of Purified **2**

9H）。与文献报道一致[13]。

3　结论

本研究以 CTC 树脂为载体，以 Fmoc-Phe-OH 为起始氨基酸、HOBt/DIC 为缩合体系，通过 Fmoc 标准固相合成法合成直链七肽。利用切割试剂 TFE ∶ DCM（1 ∶ 4）将肽链从树脂上游离出来，在含 HOBt/PyBOP/DIPEA 的 DCM 溶液中进行液相环合，经制备液相色谱纯化后得到带侧链保护基的环肽，脱保护基后即得 **1** 和 **2**。

环肽 **1** 和 **2** 的收率分别为 7.29%和 6.57%，收率低的可能原因如下。①环合后使用制备型 HPLC 仪纯化，在 C_{18} 反相柱脱盐的同时会带走部分产物。②该环肽由 *D*- 型和 *L*- 型氨基酸交替组成，影响了其空间构型。③环肽的序列（结构）也会影响合成收率。④经历了固相合成和液相环合以及 2 次 HPLC 纯化，收率进一步降低。但与天然产物中的提取率（从 100 g 珊瑚衍生真菌杂色曲霉 *Aspergillus versicolor* 有机提取物中仅分离得到 **1** 和 **2** 各 5 mg，提取率仅为 0.005%）相比，本方法的收率已得到显著提高。本方法采用切割后液相环合、再脱保护的合成方式，避免了在环合过程中侧链保护基的干扰，提高了环合效率；操作简单、原料易得，为 **1** 和 **2** 及其同系列其他环肽的合成提供了参考，并为其下一步的药理学、药效学研究提供了原料。

参考文献：

[1] HUANG H, DING N, YANG T, *et al*. Cross-sectional whole-genome sequencing and epidemiological study of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, **69**(3): 405-413.

[2] DALBERTO P F, DE SOUZA E V, ABBADI B L, *et al*. Handling the hurdles on the way to anti-tuberculosis drug development [J]. *Front Chem*, 2020, **8**: 586294.

[3] RODE H B, LADE D M, GREE R, *et al*. Strategies towards the synthesis of anti-tuberculosis drugs [J]. *Org Biomol Chem*, 2019, **17**(22): 5428-5459.

[4] BISSON G P, BASTOS M, CAMPBELL J R, *et al*. Mortality in adults with multidrug-resistant tuberculosis and HIV by antiretroviral therapy and tuberculosis drug use: an individual patient data meta-analysis [J]. *Lancet*, 2020, **396**(10248): 402-411.

[5] DHEDA K, GUMBO T, MAARTENS G, *et al*. The Lancet Respiratory Medicine Commission: 2019 update: epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant and incurable tuberculosis [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, **7**(9): 820-826.

[6] WANG J, WANG J, LI L, *et al*. RA-Ⅻ, a bicyclic hexapeptidic glucoside isolated from *Rubia yunnanensis* Diels, exerts antitumor activity by inhibiting protective autophagy and activating Akt-mTOR pathway in colorectal cancer cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, **266**: 113438.

[7] LAQUA K, KLEMM M, RICHARD-GREENBLATT M, *et al*. Synthesis, antimycobacterial activity and influence

on mycobacterial InhA and PknB of 12-membered cyclodepsipeptides [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2018, **26**(12): 3166-3190.

[8] BARBIE P, KAZMAIER U. Total synthesis of cyclomarins A, C and D, marine cyclic peptides with interesting anti-tuberculosis and anti-malaria activities [J]. *Org Biomol Chem*, 2016, **14**(25): 6036-6054.

[9] DALETOS G, KALSCHEUER R, KOLIWER-BRANDL H, *et al*. Callyaerins from the marine sponge *Callyspongia aerizusa*: cyclic peptides with antitubercular activity [J]. *J Nat Prod*, 2015, **78**(8): 1910-1925.

[10] HERNANDEZ J, ASHLEY D, CAO R, *et al*. Cyclic peptide [R_4W_4] in improving the ability of first-line antibiotics to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* inside *in vitro* human granulomas [J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 1677.

[11] GAVRISH E, SIT C S, CAO S, *et al*. Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2 [J]. *Chem Biol*, 2014, **21**(4): 509-518.

[12] BRIMBLE M A, ZHANG S, DE LEON RODRIGUEZ L M, *et al*. Total synthesis and conformational study of callyaerin A: anti-tubercular cyclic peptide bearing a rare rigidifying (*Z*)-2,3-diaminoacrylamide moiety [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(14): 3631-3635.

[13] CHAO R, HOU X, XU W, *et al*. Targeted isolation of asperheptatides from a coral-derived fungus using LC-MS/MS-based molecular networking and antitubercular activities of modified cinnamate derivatives [J]. *J Nat Prod*, 2021, **84**(1): 11-19.