基总量不得<0.006 $g \cdot g^{-1}$，含吲哚生物碱类成分含量不得<0.007 $g \cdot g^{-1}$。

3.3 体外溶出度

为了提高患者的顺应性，本实验将蟾酥缓释微丸装入胶囊，并对缓释微丸胶囊进行溶出试验。3 批蟾酥缓释微丸在 0.1%十二烷基硫酸钠(pH=7.0)的溶出介质中，溶出曲线基本一致。从溶出曲线看，蟾酥缓释微丸 2 h 累积释放量为 20%~30%，未表现出突释，6 h 时累积释放量达 50%，12 h 累积释放量>80%，表明该蟾酥缓释微丸在 12 h 内已基本释放完全。蟾酥缓释微丸可减少血药浓度的波动，避免不良反应，减少给药次数。

REFERENCES

[1] YANG S, MA X B, ZHANG B. Optimized compatibility of anticancer monomers from Venenum Bufonis by uniform design [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2014, 23(17): 2077-2080.

[2] GAO H, ZEHL M, LEITNER A, et al. Comparison of toad venoms from different Bufo species by HPLC and LC-DAD-MS/MS [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(2): 368-376.

[3] QU T, GAO H M, CHEN L M, et al. Content of indole alkaloids and bufadienolides contained in toad medicines [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(20): 3086-3091.

[4] XIA X, JIN H, YAN S, et al. Analysis of the bioactive constituents of Chansu in rat plasma by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(3): 646-654.

[5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 47.

[6] HU X Y, LI Y R, YUAN J, et al. Optimization of alcohol precipitation process of cinobufacini extract by multi-index comprehensive evaluation method [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2012, 23(4): 1016-1019.

[7] 霍雨佳, 孙萍, 李慧. 正交试验法优选蟾皮中吲哚类生物碱的提取工艺[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(6): 536-538.

[8] 黎美芬, 梁记芯, 陈增山. 高效液相色谱法测定小儿奇应丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(5): 245-247.

[9] JIANG S S, LI Y S, TU Y Q, et al. Preparation of Venenum Bufonis sustained-release pellets and its release mechanism *in vitro* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1103-1106.

收稿日期：2015-06-17

新型 β-肽环氧酮类蛋白酶体抑制剂的合成与活性评价

张建康[1]，庄让笑[1]，胡永洲[2](1.杭州市西溪医院，杭州 310023；2.浙江大学药学院，杭州 310012)

摘要：目的 设计合成新型的 β-肽类蛋白酶体抑制剂，并对其活性进行评价。**方法** 根据先导化合物 Carfilzomib 与蛋白酶体的作用方式，保留其与蛋白酶体结合的关键环氧酮片段，并结合 β-氨基酸的特点，采用氨基酸替换、生物电子等排等药物设计的方法，设计一类结构新颖的蛋白酶体抑制剂；采用缩合、氧化、还原等反应，合成系列目标化合物；通过体外酶抑制活性实验检验化合物活性。**结果** 合成了 8 个结构新颖的 β-肽环氧酮类衍生物，化合物结构经 ^{1}H-NMR、ESI-MS 确证，部分化合物体现了一定的蛋白酶体抑制活性。**结论** β-氨基酸作为一种重要的 α-氨基酸替换结构，有望能够丰富短肽类蛋白酶体抑制剂的结构类型。

关键词：蛋白酶体抑制剂；β-肽环氧酮；合成；活性评价

中图分类号：R914.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2015)11-1329-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.011

Synthesis, Biological Evaluation of Novel β-Peptidyl Epoxyketone Proteasome Inhibitors

ZHANG Jiankang[1], ZHUANG Rangxiao[1], HU Yongzhou[2](*1.Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discover novel β-peptidyl epoxyketone proteasome inhibitors, evaluate their enzymatic activities. **METHODS** According to the binding interactions of lead compound Carfilzomib with proteasome, the epoxyketone group of Carfilzomib was retained in the drug design. A series of novel proteasome inhibitors were designed by combining the retained epoxyketone group, β-amino acid using rational drug design strategies such as amino acid, bioisostere replacement.

作者简介：张建康，男，博士 Tel: (0571)85463955 E-mail: zjk0125@yeah.net

These compounds were synthesized through condensation, oxidation, reduction reactions, were tested for their enzymatic activities *in vitro*. **RESULTS** Totally 8 novel *β*-peptidyl epoxyketone analogues were synthesized, confirmed by ^{1}H-NMR, ESI-MS, which exhibited moderate proteasome inhibitory activities. **CONCLUSIONS** *β*-Amino acid, which is an important *α*-amino acid replacement, is anticipated to enrich the structure diversity of proteasome inhibitors.
KEY WORDS: proteasome inhibitors; *β*-peptidyl epoxyketone; synthesis; biological evaluation

蛋白酶体是在真核生物和古菌中普遍存在，在一些原核生物中也存在的一种巨型筒状蛋白质复合物，它的主要作用是降解细胞不需要的或受到损伤的蛋白质，是泛素-蛋白酶体蛋白质降解通路的重要一环。泛素-蛋白酶体通路作为一种重要的蛋白质降解途径，控制着细胞内 80%~90%蛋白质的降解，而这些被降解的靶蛋白在诸如细胞周期、凋亡、转录、DNA 修复及抗原呈递等多种生理功能中扮演了重要角色[1-4]。越来越多的研究证据表明，泛素-蛋白酶体通路功能正常与否和包括肿瘤在内的多种疾病密切相关[3,5-7]，通过影响蛋白酶体功能而干扰肿瘤的生长已成为一项重要的肿瘤治疗策略。

近年来，研究者们发现了多种不同结构类型的小分子蛋白酶体抑制剂，大部分该类化合物均为短肽类化合物，按其与蛋白酶体的结合方式不同可以分为共价结合与非共价结合两大类。共价结合抑制剂根据其肽骨架羧基末端基团的不同又可以分为硼酸肽、环氧酮肽、乙烯基砜肽及醛基肽等[8-9]。这些羧基末端独特的亲电基团在蛋白酶体活性位点 *N*-端苏氨酸残基游离羟基的亲核进攻下，与其形成共价结合作用，对维持蛋白酶体抑制活性起到了关键作用。其中，环氧酮肽类抑制剂与蛋白酶体的作用模式见图 1[9]，代表性化合物 Carfilzomib 已被 FDA 批准用于多发性骨髓瘤患者的治疗。

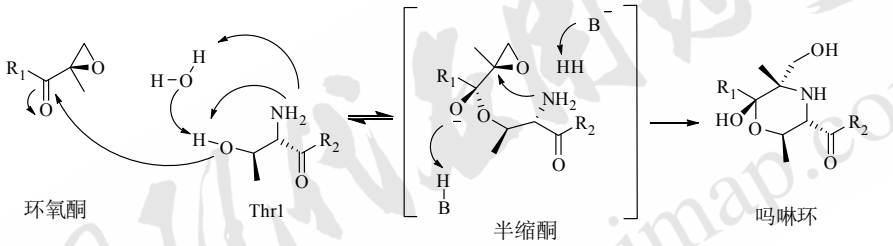


图 1 环氧酮肽类蛋白酶体抑制剂与蛋白酶体的不可逆共价结合模式

Fig. 1 The irreversible covalent interactions between epoxyketone group and proteasome

短肽类蛋白酶体抑制剂大多由 *α*-氨基酸连接而成，其在体内易被多种蛋白酶和肽酶降解，从而导致该类化合物存在体内稳定性差、半衰期短等缺点[10]，而在肽骨架中引入 *β*-氨基酸后形成的 *β*-肽能增强其对体内多种蛋白酶和肽酶的稳定性，至今仅发现 5 种 *β*-肽酶能降解蛋白质 *N*-端的 *β*-氨基酸[11-13]。此外，由于 *β*-氨基酸的引入使得肽骨架中多了一个碳原子，从而使得 *β*-肽有比 *α*-肽更高的构象可变性，可以形成多种稳定的二级结构[14]。Zhu 等报道了一系列含有 *β*-氨基酸的二肽硼酸类化合物，发现个别化合物不仅具有与硼替佐米相近的蛋白酶体抑制活性，还具有比硼替佐米更好的药动学性质[10,15]。因此，在上述研究的基础上，选取 Carfilzomib 结构中与蛋白酶体进行共价结合的关键环氧酮片段，并以不同取代的 *β*-氨基酸替换 *α*-氨基酸，设计合成了一系列含有 *β*-氨基酸的二肽环氧酮类衍生物，合成路线及目标化合物的结构见图 2 和图 3。为了提高效率、缩短筛选周期，首先采用消旋的 *β*-氨基酸来进行结构筛选。

1 仪器与试剂

Büchi B-540 熔点仪(瑞士 Büchi 公司，温度未经校正)；Brüker Avancenmx-500 型核磁仪(美国 Brüker 公司)；Esquire-LC-00075 型质谱仪(美国 Brüker 公司)；Nanodrop 1000 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)；人源蛋白酶体(加拿大魁北克蒙特利尔大学吴江平教授惠赠)；薄层色谱硅胶 GF254、硅胶 H 均为青岛海洋化工有限公司生产；其余试剂均为分析纯。

2 合成方法

2.1 *N*-Boc-*N'*-甲基-*N'*-甲氧基-(*L*)-亮氨酰胺(**2**)的合成

N-Boc-(*L*)-Leu(1，2.8 g，12 mmol)溶于 40 mL 无水二氯甲烷，加入 HOBt(1.6 g，12 mmol)和 EDCI(3.5 g，18 mmol)，室温反应 30 min。随即，

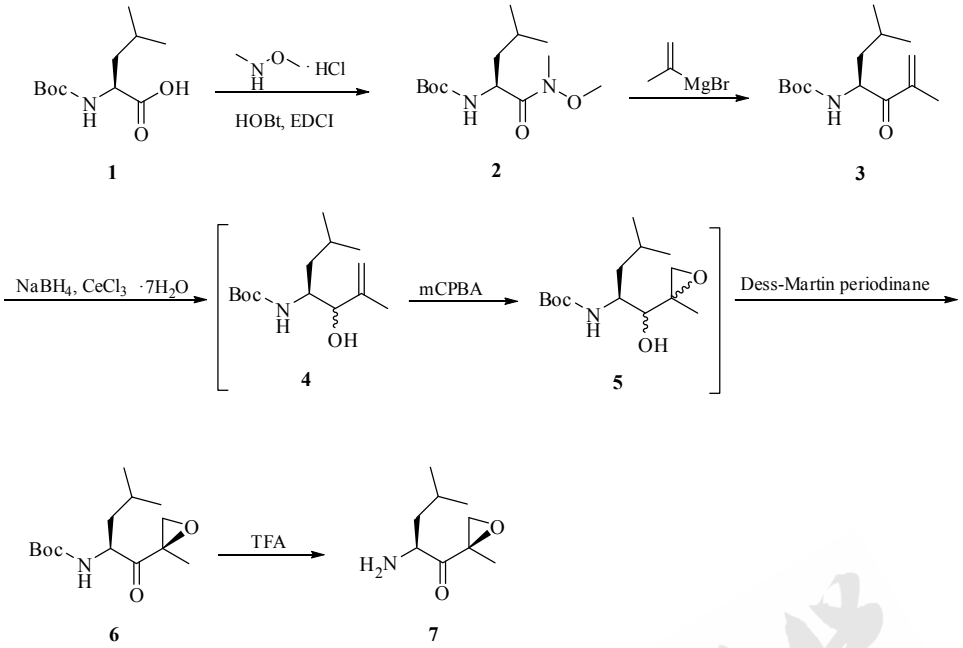
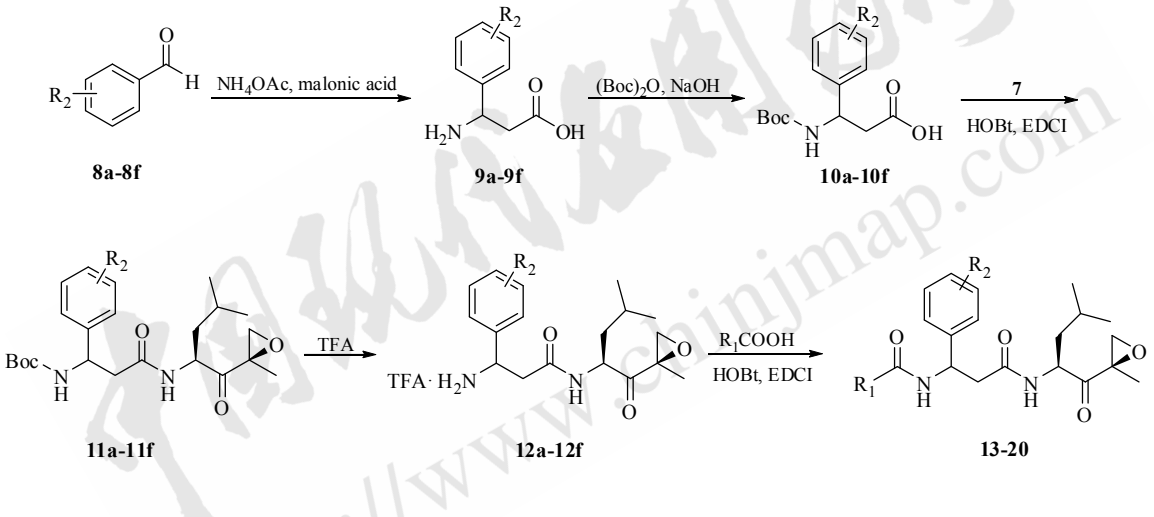


图 2 环氧酮片段的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of the epoxyketone fragment



a, R_2 = H; b, R_2 = 2-Cl; c, R_2 = 3-Cl; d, R_2 = 4-Cl; e, R_2 = 3-F; f, R_2 = 4-OMe

13: R_1 = Pyrazin-2-yl, R_2 = H　**14**: R_1 = 4-Cyanophenyl, R_2 = H　**15**: R_1 = 2-Naphthyl, R_2 = H

16: R_1 = Pyrazin-2-yl, R_2 = 2-Cl　**17**: R_1 = Pyrazin-2-yl, R_2 = 3-Cl　**18**: R_1 = Pyrazin-2-yl, R_2 = 4-Cl

19: R_1 = Pyrazin-2-yl, R_2 = 3-F　**20**: R_1 = Pyrazin-2-yl, R_2 = 4-OMe

图 3 目标化合物的合成路线及结构

Fig. 3 Synthetic route，structures of the target compounds

N,O-二甲基羟胺盐酸盐(0.98 g，10 mmol)和二异丙基乙胺(3.6 mL，20 mmol)加入反应液，室温反应 3 h。加入 30 mL 饱和碳酸氢钠稀释，分出有机层，饱和食盐水(30 mL×1)洗，无水硫酸钠干燥，减压回收溶剂，柱层析分离得 2.5 g 无色液体 2(石油醚∶乙酸乙酯=5∶1)。收率 92%；^{1}H-NMR (500 MHz，$CDCl_3$)：δ=5.04(d，1H，J=8.5 Hz，NH)，4.66~4.72(m，1H，CH)，3.76(s，3H，CH_3)，3.17(s，3H，CH_3)，1.65~1.71(m，1H，CH)，1.36~1.49(m，2H，CH_2)，1.40(s，9H，CH_3)，0.92(dd，6H，J=18.0，6.5 Hz，CH_3)；ESI-MS：m/z=275$[M+H]^+$。

2.2 (*S*)-2,6-二甲基-4-(*N*-Boc 氨基)-3-庚酮-1-烯(**3**)的合成

原料 **2**(1.7 g，6 mmol)溶于 25 mL 无水四氢呋

喃中，氮气保护，降温至 0 ℃，逐滴加入异丙烯基溴化镁的四氢呋喃溶液(0.5 N，9 mmol)，0 ℃反应 6 h。反应液加 40 mL 饱和氯化铵水溶液稀释，乙酸乙酯(20 mL×3)提取，无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂，柱层析分离得 1.1 g 无色油状物 3(石油醚：乙酸乙酯=20∶1)。收率 70%；^{1}H-NMR (500 MHz，$CDCl_3$)：δ=6.07(s，1H，=CH_2)，5.87(s，1H，=CH_2)，5.14(d，1H，J=8.0 Hz，NH)，5.01~5.07(m，1H，CH)，1.89(s，3H，CH_3)，1.63~1.76(m，1H，CH)，1.40~1.52(m，1H，CH_2)，1.42(s，9H，CH_3)，1.22~1.42(m，1H，CH_2)，0.98(d，3H，J=6.5 Hz，CH_3)，0.90(d，3H，J=6.5 Hz，CH_3)；ESI-MS：m/z=256[M+H]$^+$。

2.3 (*S*)-4-甲基-1-[(*R*)-2-甲基环氧-2-基]-2-(*N*-Boc 氨基)-1-戊酮(**6**)的合成

原料 3(1.3 g，5 mmol)溶于 10 mL 甲醇和 10 mL 四氢呋喃的混合溶剂中，氮气保护，降温至 0 ℃，随即加入三水合氯化铈(2.8 g，7.5 mmol)和硼氢化钠(0.3 g，7.5 mmol)，0 ℃反应 2 h。加入 3 mL 冰醋酸淬灭，减压蒸除溶剂，加 20 mL 水稀释，乙酸乙酯提取(20 mL×3)，无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂得粗产品 **4**。化合物 **4** 溶于 20 mL 二氯甲烷，降温至 0 ℃，加入间氯过氧苯甲酸(0.9 g，5.5 mmol)，0 ℃反应 3 h。反应液加饱和碳酸氢钠(15 mL×2)洗，分出有机层，无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂得粗产品 **5**。由于中间体 5 稳定性不强，粗品直接投入下步反应，将其溶于 15 mL 二氯甲烷，氮气保护，降温至 0 ℃，加入戴斯-马丁氧化剂(3.2 g，7.5 mmol)，0 ℃反应 10 h。反应液加入 15 mL 饱和碳酸氢钠，分出有机层，饱和食盐水(15 mL×1)洗，无水硫酸钠干燥后减压蒸除溶剂，柱层析分离得 0.7 g 无色油状物 **6**(石油醚：乙酸乙酯= 15∶1)。

三步总收率 52%；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$): δ=4.84(d，1H，J=8.5 Hz，NH)，4.25~4.37(m，1H，CH)，3.28(d，1H，J=4.5 Hz，OCH_2)，2.87(d，1H，J=4.5 Hz，OCH_2)，1.64~1.78(m，1H，CH)，1.51(s，3H，CH_3)，1.40~1.52(m，1H，CH_2)，1.40(s，9H，CH_3)，1.10~1.22(m，1H，CH_2)，0.94(dd，6H，J=16.5，6.5 Hz，CH_3)；ESI-MS: m/z=272[M+H]$^+$。

2.4 (*S*)-2-氨基-4-甲基-1-[(*R*)-2-甲基环氧-2-基]-1-戊酮(**7**)的合成

化合物 **6**(1.1 g，4 mmol)溶于 15 mL 二氯甲烷，逐滴加入三氟乙酸(3 mL)，室温反应 1 h。减压蒸除溶剂得无色油状物，粗产品直接用于下步反应。

2.5 (3-Boc 氨基)-3-(取代苯基)丙酸(**10a~10f**)的合成

以 **10a** 为例：苯甲醛(**8a**，10.0 mmol，1.1 g)，醋酸铵(15.0 mmol，1.2 g)和丙二酸(10.0 mmol，1.0 g)置于烧瓶中，加入 40 mL 乙醇，加热回流过夜。反应液降至室温，过滤，滤饼适量乙醇洗，减压干燥，粗产品 **9a** 直接用于下步反应。

化合物 **9a**(5.0 mmol，0.8 g)和氢氧化钠(10.0 mmol，0.4 g)溶于 10 mL 四氢呋喃和 10 mL 水的混合溶剂中，$(Boc)_2O$(6.0 mmol，1.3 g)溶于 10 mL 四氢呋喃后缓缓滴入上述溶液，室温反应过夜。减压蒸除四氢呋喃，水溶液以 1 N HCl 调 pH 至 2~3，乙酸乙酯(20 mL×3)提取，有机层合并后无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂得白色固体 **10a**。采用同样方法得 **10b~10f**。收率：66%(two steps)；熔点：144~146 ℃(文献：143~145 ℃[16])；^{1}H-NMR (500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.16~7.47(m，5H，Ar-H)，5.44(brs，1H，NH)，5.05~5.17(m，1H，CH)，2.74~2.94(m，2H，CH_2)，1.42(s，9H，CH_3)；ESI-MS：m/z=266[M+H]$^+$。

2.5.1 (3-Boc 氨基)-3-(2-氯苯基)丙酸(**10b**) 白色固体；收率：61%(two steps)；熔点：154~156 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.30~7.42(m，2H，Ar-H)，7.15~7.27(m，2H，Ar-H)，5.77(brs，1H，NH)，5.31~5.46(m，1H，CH)，2.80~2.96(m，2H，CH_2)，1.42(s，9H，CH_3)；ESI-MS：m/z=300[M+H]$^+$。

2.5.2 (3-Boc 氨基)-3-(3-氯苯基)丙酸(**10c**) 白色固体；收率：55%(two steps)；熔点：98~100 ℃(文献：98.5~100.7 ℃[15])；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.22~7.36(m，3H，Ar-H)，7.18(d，1H，J=7.0 Hz，Ar-H)，5.52(brs，1H，NH)，5.01~5.15(m，1H，CH)，2.77~2.91(m，2H，CH_2)，1.42(s，9H，CH_3)；ESI-MS：m/z=300[M+H]$^+$。

2.5.3 (3-Boc 氨基)-3-(4-氯苯基)丙酸(**10d**) 白色固体；收率：58%(two steps)；熔点：173~175 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.47(d，1H，J=8.5 Hz，Ar-H)，7.38(d，1H，J=8.5 Hz，Ar-H)，7.31(d，1H，J=8.5 Hz，Ar-H)，7.24(d，1H，J=8.0 Hz，Ar-H)，5.43(brs，1H，NH)，5.03~5.14(m，1H，CH)，2.81~2.97(m，2H，CH_2)，1.42(s，9H，CH_3)；ESI-MS：m/z=300[M+H]$^+$。

2.5.4 (3-Boc 氨基)-3-(3-氟苯基)丙酸(10e) 白色

固体；收率：67%(two steps)；熔点：119~121 ℃(文献：111.5~114.2 ℃[15])；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.30(q，1H，J=8.0 Hz，Ar-H)，7.07(d，1H，J=7.5 Hz，Ar-H)，7.01(d，1H，J=8.5 Hz，Ar-H)，6.96(t，1H，J=7.5 Hz，Ar-H)，5.48(brs，1H，NH)，5.03~5.17(m，1H，CH)，2.78~2.95(m，2H，CH_2)，1.42(s，9H，CH_3)；ESI-MS：m/z=284[M+H]$^+$。

2.5.5 (3-Boc 氨基)-3-(4-甲氧基苯基)丙酸(**10f**) 白色固体；收率：48%(two steps)；熔点：153~155 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.21(d，2H，J=8.5 Hz，Ar-H)，6.85(d，2H，J=8.5 Hz，Ar-H)，5.32(brs，1H，NH)，5.01~5.10(m，1H，CH)，3.79(s，3H，CH_3)，2.81~3.01(m，2H，CH_2)，1.41(s，9H，CH_3)；ESI-MS：m/z=296[M+H]$^+$。

2.6 *N*-Boc-二肽(取代 *β*-Phe-Leu)环氧酮(**11a-11f**)的合成

以 **11a** 为例：化合物 **10a**(3.2 g，12 mmol)溶于 40 mL 无水二氯甲烷，加入 HOBt(1.6 g，12 mmol)和 EDCI(3.5 g，18 mmol)，室温反应 30 min。随即，化合物 **7**(10 mmol)和二异丙基乙胺(3.6 mL，20 mmol)加入反应液，室温反应 3 h。加入 30 mL 饱和碳酸氢钠稀释，分出有机层，饱和食盐水(30 mL×1)洗，无水硫酸钠干燥，减压回收溶剂，柱层析分离得 3.9 g **11a**(石油醚：乙酸乙酯=2：1)。采用同样方法得化合物 **11b~11f**。白色固体；收率：92%；熔点：62~64 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.16~7.38(m，5H，Ar-H)，6.14~6.23，5.78~5.83(m，60/40，1H，NH)，5.72~5.77(m，1H，NH)，5.01~5.11(m，1H，CH)，4.50~4.60(m，1H，CH)，3.25，3.20(d，60/40，1H，J=5.0 Hz，OCH_2)，2.89，2.87(d，60/40，1H，J=5.0 Hz，OCH_2)，2.64~2.76(m，2H，CH_2)，1.49，1.48(s，60/40，3H，CH_3)，1.43，1.41(s，60/40，9H，CH_3)，1.35~1.40(m，1H，CH_2)，1.04~1.18(m，2H，CH+CH_2)，0.86~0.92，0.78~0.84(m，60/40，6H，CH_3)；ESI-MS：m/z=419[M+H]$^+$。

2.6.1 *N*-Boc-二肽(2-Cl-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**11b**) 白色固体；收率：71%；熔点：124-126 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.27~7.39(m，2H，Ar-H)，7.13~7.25(m，2H，Ar~H)，6.55~6.61，6.22~6.30(m，50/50，1H，NH)，5.85~5.93(m，1H，NH)，5.30~5.38(m，1H，CH)，4.49~4.59(m，1H，CH)，3.23，2.86(d，50/50，1H，J=5.0 Hz，OCH_2)，2.64~2.78(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.48，1.45(s，50/50，3H，CH_3)，1.41(s，9H，CH_3)，1.35~1.39(m，1H，CH_2)，1.07~1.19(m，2H，CH+CH_2)，0.86~0.92，0.71~0.77(m，50/50，6H，CH_3)；ESI-MS：m/z=453[M+H]$^+$.

2.6.2 *N*-Boc-二肽(3-Cl-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**11c**) 无色油状物；收率：79%；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.17~7.25(m，3H，Ar-H)，7.10~7.14(m，1H，Ar-H)，6.28~6.34，5.98~6.06(m，50/50，1H，NH)，5.88~5.94，5.50~5.58(m，50/50，1H，NH)，5.01~5.07(m，1H，CH)，4.51~4.59(m，1H，CH)，3.21，2.87(d，50/50，1H，J=5.0 Hz，OCH_2)，2.55~2.67(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.48，1.46(s，50/50，3H，CH_3)，1.41(s，9H，CH_3)，1.32~1.38(m，1H，CH_2)，1.04~1.20(m，2H，CH+CH_2)，0.83~0.89，0.76~0.81(m，50/50，6H，CH_3)；ESI-MS：m/z=453[M+H]$^+$.

2.6.3 *N*-Boc-二肽(4-Cl-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**11d**) 白色固体；收率：59%；熔点：129~131 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.23~7.31(m，2H，Ar-H)，7.18~7.22(m，2H，Ar-H)，6.24~6.30(m，1H，NH)，5.82~5.92(m，1H，NH)，4.96~5.00(m，1H，CH)，4.47~4.55(m，1H，CH)，3.22，2.92(d，50/50，1H，J=5.0 Hz，OCH_2)，2.83~2.89(m，1H，OCH_2)，2.59~2.69(m，2H，CH_2)，1.48，1.47(s，50/50，3H，CH_3)，1.41(s，9H，CH_3)，1.36~1.40(m，1H，CH_2)，1.09~1.19(m，2H，CH+CH_2)，0.85~0.89，0.79~0.83(m，50/50，6H，CH_3)；ESI-MS：m/z=453[M+H]$^+$。

2.6.4 *N*-Boc-二肽(3-F-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**11e**) 无色油状物；收率：62%；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.22~7.28(m，1H，Ar-H)，6.86~6.98(m，3H，Ar-H)，6.30~6.34，5.95~5.99(m，50/50，1H，NH)，5.87(d，1H，J=7.0 Hz，NH)，4.99~5.05(m，1H，CH)，4.51~4.57(m，1H，CH)，3.23，2.95(d，50/50，1H，J=5.0 Hz，OCH_2)，2.61~2.75(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.48，1.46(s，50/50，3H，CH_3)，1.42(s，9H，CH_3)，1.29~1.37(m，1H，CH_2)，1.11~1.21(m，2H，CH+CH_2)，0.86~0.90，0.78~0.82(m，50/50，6H，CH_3)；ESI-MS：m/z=437[M+H]$^+$。

2.6.4 *N*-Boc-二肽(4-OMe-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**11f**) 白色泡沫状物；收率：68%；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：δ=7.16(t，2H，J=7.0 Hz，Ar-H)，6.78~6.86(m，2H，Ar-H)，6.04~6.06(m，1H，NH)，6.02~6.04，5.64~5.68(m，50/50，1H，NH)，4.93~5.01(m，1H，

CH)，4.48~4.54(m，1H，CH)，3.77，3.75(s，50/50，3H，CH_3)，3.25，2.92(d，50/50，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.81~2.87(m，1H，OCH_2)，2.59~2.69(m，2H，CH_2)，1.47，1.46(s，50/50，3H，CH_3)，1.40(s，9H，CH_3)，1.33~1.37(m，1H，CH_2)，1.10~1.18(m，2H，CH+CH_2)，0.79~0.89(m，6H，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=449[M+H]$^+$。

2.7 二肽(取代 *β*-Phe-Leu)环氧酮三氟乙酸盐(**12a~12f**)的合成

化合物 **11a~11f**(10 mmol)溶于 40 mL 二氯甲烷，逐滴加入 20 mL 三氟乙酸。室温反应 1 h，减压蒸除溶剂，加入 50 mL 乙醚，析出白色固体，过滤、干燥得粗品 **12a~12f**。该粗品不经进一步纯化直接用于下步反应。

2.8 (*N*-芳甲酰基)二肽(取代 *β*-Phe-Leu)环氧酮(**13~20**)的合成

以 **13** 为例：吡嗪-2-甲酸(1.5 g，12 mmol)溶于 40 mL 无水二氯甲烷，加入 HOBt(1.6 g，12 mmol)和 EDCI(3.5 g，18 mmol)，室温反应 30 min。随即，化合物 **12a**(10 mmol)和二异丙基乙胺(3.6 mL，20 mmol)加入反应液，室温反应 3 h。加入 30 mL 饱和碳酸氢钠稀释，分出有机层，饱和食盐水(30 mL×1)洗，无水硫酸钠干燥，减压回收溶剂，柱层析分离得 2.8 g 化合物 **13**(石油醚：乙酸乙酯=1：1)。采用同样方法得化合物 **14~20**。白色固体；收率：66%；熔点：182~184 ℃；1H-NMR(500 MHz，CDCl3)：*δ*=9.39，8.94(d，61/39，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，9.37~9.39，9.35~9.37(m，61/39，1H，pyrazine-H)，8.73~8.75(m，1H，pyrazine-H)，8.60~8.62，8.56~8.58(m，61/39，1H，pyrazine-H)，7.22~7.42(m，5H，Ar-H)，6.01，5.96(d，39/61，1H，*J*=8.5 Hz，NH)，5.51~5.61(m，1H，CH)，4.54~4.62(m，1H，CH)，3.26，3.19(d，61/39，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.80~2.86(m，3H，CH2+OCH_2)，1.46，1.44(s，61/39，3H，CH3)，1.34~1.42(m，1H，CH_2)，1.07~1.15(m，2H，CH+CH2)，0.83，0.74(dd，39/61，6H，*J*=10.0，6.0 Hz，CH3)；ESI-MS：*m/z*=425[M+H]$^+$。纯度：99.0%；液相条件：Waters COSMOSIL 4.6×250 mm，5C18-PAQ；波长：270 nm；流速：1.0 mL·min^{-1}；流动相：乙腈-水(58：42)。

2.8.1 [*N*-(4-氰基)苯甲酰基]二肽(*β*-Phe-Leu)环氧酮(**14**) 白色固体；收率：63%；熔点：165-167 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=8.85，8.40(d，55/45，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，7.93~8.03(m，2H，Ar-H)，7.70~7.78(m，2H，Ar-H)，7.24~7.36(m，5H，Ar-H)，5.88(d，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，5.50~5.56(m，1H，CH)，4.52~4.58(m，1H，CH)，3.22，3.14(d，55/45，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.80~2.92(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.49，1.47(s，3H，CH_3)，1.36~1.44(m，1H，CH_2)，1.01~1.07(m，2H，CH+CH_2)，0.88，0.77(dd，45/55，6H，*J*=16.0，6.0 Hz，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=448[M+H]$^+$。纯度：99.2%。

2.8.2 [*N*-(2-萘甲酰基)]二肽(*β*-Phe-Leu)环氧酮(**15**) 白色固体；收率：55%；熔点：169~171 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=8.61，8.12(d，50/50，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，8.38~8.47(m，1H，Ar-H)，7.83~8.03(m，4H，Ar-H)，7.50~7.60(m，2H，Ar-H)，7.21~7.43(m，5H，Ar-H)，5.99，5.93(d，50/50，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，5.59~5.65(m，1H，CH)，4.54~5.62(m，1H，CH)，3.26，3.17(d，50/50，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.78~2.90(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.49，1.47(s，3H，CH_3)，1.37~1.43(m，1H，CH_2)，1.03~1.11(m，2H，CH+CH_2)，0.85，0.75(dd，50/50，6H，*J*=18.5，6.0 Hz，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=473[M+H]$^+$。纯度：98.7%。

2.8.3 (*N*-吡嗪-2-甲酰基)二肽(2-Cl-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**16**) 白色固体；收率：63%；熔点：173~175 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=9.70，9.32(d，55/45，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，9.34~9.36(m，1H，pyrazine-H)，8.75~8.78(m，1H，pyrazine-H)，8.63~8.65，8.60~8.62(m，55/45，1H，pyrazine-H)，7.35-7.39(m，2H，Ar-H)，7.18~7.22(m，2H，Ar-H)，5.81~5.89(m，2H，NH+CH)，4.54~4.62(m，1H，CH)，3.25，3.17(d，55/45，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.83~2.93(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.47，1.43(s，3H，CH_3)，1.35~1.41(m，1H，CH_2)，1.01~1.09(m，2H，CH+CH_2)，0.85，0.73(dd，45/55，6H，*J*=16.5，6.0 Hz，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=459[M+H]$^+$。纯度：98.9%。

2.8.4 (*N*-吡嗪-2-甲酰基)二肽(3-Cl-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**17**) 白色固体；收率：43%；熔点：178~180 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=9.51，9.15(d，60/40，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，9.35~9.37(m，1H，pyrazine-H)，8.75~8.77(m，1H，pyrazine-H)，8.61~8.63，8.59~8.61(m，60/40，1H，pyrazine-H)，

7.18~7.32(m，4H，Ar-H)，5.96~6.00(m，1H，NH)，5.51~5.57(m，1H，CH)，4.57~4.63(m，1H，CH)，3.24，3.20(d，60/40，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.77~2.85(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.47，1.45(s，3H，CH_3)，1.38~1.42(m，1H，CH_2)，1.10~1.16(m，2H，CH+CH_2)，0.86，0.77(dd，40/60，6H，*J*=11.5，6.0 Hz，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=459[M+H]$^+$。纯度：99.3%。

2.8.5 (*N*-吡嗪-2-甲酰基)二肽(4-Cl-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**18**) 白色固体；收率：48%；熔点：166~168 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=9.45，9.02(d，50/50，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，9.35~9.37(m，1H，pyrazine-H)，8.75~8.77(m，1H，pyrazine-H)，8.60~8.62，8.59~8.60(m，50/50，1H，pyrazine-H)，7.20~7.36(m，4H，Ar-H)，5.93，5.87(d，50/50，1H，*J*=9.0 Hz，NH)，5.50~5.58(m，1H，CH)，4.53~4.63(m，1H，CH)，3.24，3.17(d，50/50，1H，*J*=4.5 Hz，OCH_2)，2.81~2.87(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.47，1.46(s，3H，CH_3)，1.38~1.45(m，1H，CH_2)，1.05~1.13(m，2H，CH+CH_2)，0.72~0.88(m，6H，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=459[M+H]$^+$。纯度：98.6%。

2.8.6 (*N*-吡嗪-2-甲酰基)二肽(3-F-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**19**) 白色固体；收率：59%；熔点：154-156 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=9.53，9.14(d，60/40，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，9.36-9.38(m，1H，pyrazine-H)，8.75~8.77(m，1H，pyrazine-H)，8.62~8.64，8.59~8.61(m，60/40，1H，pyrazine-H)，7.26~7.32(m，1H，Ar-H)，7.09~7.15(m，1H，Ar-H)，7.00~7.04(m，1H，Ar-H)，6.90~6.96(m，1H，Ar-H)，5.88~5.92(m，1H，NH)，5.53~5.59(m，1H，CH)，4.59~4.63(m，1H，CH)，3.25，3.19(d，60/40，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.80~2.88(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.48，1.45(s，3H，CH_3)，1.36~1.42(m，1H，CH_2)，1.08~1.14(m，2H，CH+CH_2)，0.86，0.76(dd，40/60，6H，*J*=15.0，6.5 Hz，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=443[M+H]$^+$。纯度：98.4%。

2.8.7 (*N*-吡嗪-2-甲酰基)二肽(4-OMe-*β*-Phe-Leu)环氧酮(**20**) 白色固体；收率：81%；熔点：165~167 ℃；^{1}H-NMR(500 MHz，$CDCl_3$)：*δ*=9.37，9.36(d，52/48，1H，*J*=1.5 Hz，pyrazine-H)，9.26，8.80(d，52/48，1H，*J*=8.0 Hz，NH)，8.73~8.75(m，1H，pyrazine-H)，8.58~8.60，8.55~8.57(m，52/48，1H，pyrazine-H)，7.23~7.29(m，2H，Ar-H)，6.81~6.89(m，2H，Ar-H)，6.01，5.95(d，48/52，1H，*J*=8.5 Hz，NH)，5.48~5.54(m，1H，CH)，4.57~4.61(m，1H，CH)，3.78，3.77(s，3H，CH_3)，3.26，3.21(d，52/48，1H，*J*=5.0 Hz，OCH_2)，2.80~2.88(m，3H，CH_2+OCH_2)，1.47，1.45(s，3H，CH_3)，1.40~1.44(m，1H，CH_2)，1.10~1.16(m，2H，CH+CH_2)，0.83，0.77(dd，48/52，6H，*J*=12.5，6.0 Hz，CH_3)；ESI-MS：*m/z*=455[M+H]$^+$。纯度：99.1%。

3 体外蛋白酶体抑制活性测试

将 1 μL 蛋白酶体抑制剂(Carfilzomib 作为阳性对照药)加入 10 μL 纯化的蛋白酶体(5 μg·mL^{-1}，LY4)中，孵育 15 min。再加入 39 μL 蛋白酶体底物：37.5 μmol·L^{-1} Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC(LY4，chymotrypsin-like)。蛋白酶体水解底物中的 Tyr-AMC 序列，释放出 AMC，在激发光 355 nm 和发射光 460 nm 的条件下可以检测到水解后产物 AMC 的荧光吸收值，观察化合物对酶活性的抑制情况[17]。所有实验在相同条件下均重复进行 3 次，取平均值为最终结果。化合物在浓度为 10 μg·mL^{-1} 时抑制率的测试结果见表 1。

表 1 目标化合物在浓度为 10 μg·mL^{-1} 时的蛋白酶体抑制率

Tab. 1 The proteasome inhibitory rates of the target compounds at the concentration of 10 μg·mL^{-1}

化合物	抑制率/%
13	6.07±0.06
14	12.25±0.14
15	9.86±0.25
16	0.83±0.62
17	21.37±0.70
18	5.68±0.46
19	26.83±0.64
20	8.32±1.29
Carfilzomib	8.60±1.40(nmol·L^{-1}, IC_{50})

实验结果表明，阳性药物 Carfilzomib 的 IC_{50} 值为 8.60 nmol·L^{-1}，而所有目标化合物在浓度为 10 μg·mL^{-1} 时对蛋白酶体的抑制活性均不是非常理想，与阳性药物相比还有一定差距。比较化合物 **13**~**15** 可以发现，不同的 R_1 取代基对活性影响不是很大，化合物的活性相差不大；而比较化合物 **16**~**18** 可知，R_2 取代基在苯环的间位时活性最优，而在邻位时活性最差，间位为氟原子取代的化合物 **19** 的抑制率达到了(26.83±0.64)%，同样

体现了这一特点。虽然目标化合物的活性不是很强，还有进一步改造的空间，但是这仍可以作为蛋白酶体抑制剂研究工作的探索，为发现具有更高活性及类药性的蛋白酶体抑制剂奠定基础。

REFERENCES

[1] SHANG F, TAYLOR A. Ubiquitin-proteasome pathway, cellular responses to oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(1): 5-16.

[2] PORTBURY A L, RONNEBAUM S M, ZUNGU M, et al. Back to your heart: ubiquitin proteasome system-regulated signal transduction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(3): 526-537.

[3] FRANKLAND S S, BHAUMIK S R. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1): 64-76.

[4] ADAMS J. The proteasome: A suitable antineoplastic target [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(5): 349-360.

[5] RIEDERER B M, LEUBA G, VERNAY A. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease [J]. Exp Biol Med, 2011, 236(3): 268-276.

[6] XIE W, LI X, LI C. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease [J]. J Neurochem, 2010, 115(1): 188-199.

[7] RIEDERER B M, LEUBA G, VERNAY A, et al. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease [J]. Exp Biol Med, 2011, 236(3): 268-276.

[8] ZHANG J, WU P, HU Y. Clinical, marketed proteasome inhibitors for cancer treatment [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(20): 2537-2551.

[9] BORISSENKO L, GROLL M. 20S proteasome, its inhibitors: Crystallographic knowledge for drug development [J]. Chem Rev, 2007, 107(3): 687-717.

[10] ZHU Y, ZHU X, WU G, et al. Synthesis, *in vitro*, *in vivo* biological evaluation, docking studies, structure-activity relationship (SAR) discussion of dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitors composed of beta-amino acids [J]. J Med Chem, 2010, 53(5): 1990-1999.

[11] SHINAGAWA S, KANAMARU T, HARADA S, et al. Chemistry, inhibitory activity of long-chain fatty-acid oxidation of emeriamine, its analogs [J]. J Med Chem, 1987, 30(8): 1458-1463.

[12] FRACKENPOHL J, ARVIDSSON P I, SCHREIBER J V, et al. The outstanding biological stability of beta-，gamma-peptides toward proteolytic enzymes: An *in vitro* investigation with fifteen peptidases [J]. Chembiochem, 2001, 2(6): 445-455.

[13] FUCHS V, JAEGER K E, WILHELM S, et al. The BapF protein from *Pseudomonas aeruginosa* is a beta-peptidyl aminopeptidase [J]. World J Microb Biot, 2011, 27(3): 713-718.

[14] CHENG R P, GELLMAN S H, DEGRADO W F. Beta-peptides: From structure to function [J]. Chem Rev, 2001, 101(10): 3219-3232.

[15] ZHU Y, WU G, ZHU X, et al. Synthesis, *in vitro*, *in vivo* biological evaluation, comprehensive understanding of structure-activity relationships of dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitors constructed from beta-amino acids [J]. J Med Chem, 2010, 53(24): 8619-8626.

[16] KUMAR V, JAGGI M, SINGH A T, et al. 1,8-Naphthyridine-3-carboxamide derivatives with anticancer, anti-inflammatory activity [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(8): 3356-3362.

[17] ADAMS J, PALOMBELLA V J, SAUSVILLE E A. et al. Proteasome inhibitors: A novel class of potent, effective antitumor agents [J]. Cancer Res, 1999, 59(11): 2615-2622.

收稿日期：2015-06-05

氧化苦参碱凝胶体外经皮渗透及大鼠药动学研究

何治芬[1,2]，汤湛[1]，尹丽娜[1]，王胜浩[1]，金志敏[2]，王俏[1*]（1.浙江省医学科学院药物研究所，杭州 310013；2.浙江工业大学药学院，杭州 310014）

摘要：目的 研究氧化苦参碱凝胶的体外经皮渗透影响因素，并对其在大鼠体内的药动学进行研究。**方法** 采用 Valia-Chien 双室扩散池，以大鼠离体皮肤为渗透屏障，HPLC 测定氧化苦参碱浓度，以药物累积渗透量为指标，对药物及渗透促进剂的浓度进行筛选。**结果** 氧化苦参碱经皮凝胶的最优处方 12 h 累积渗透量为(18.094±1.253)mg·cm^{-2}，大鼠静注与经皮给药的血浆药动学研究表明，经皮给药的 $AUC_{(0-t)}$是注射给药的 1.9 倍(P<0.01)。**结论** 氧化苦参碱凝胶的经皮吸收能力良好，能长时间持续释放药物，有望成为新的给药剂型。

关键词：氧化苦参碱；凝胶；水溶性氮酮；经皮渗透；药动学

中图分类号：R969.1；R944.15　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2015)11-1336-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.012

基金项目：浙江省医学重点学科群项目(XKQ-010-001)；2010 年浙江省“新世纪 151 人才工程”二层次

作者简介：何治芬，女，硕士生　Tel: (0571)88215623　E-mail: 314771348@qq.com　***通信作者：**王俏，女，博士，研究员，硕导　Tel: (0571)88215623　E-mail: wangqiao-1@163.com