靶向抗肿瘤药 *N*-(*N'*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸)丙卡巴肼(Z-GP-Pcb)的环境友好合成及其透过血脑屏障活性评价

张 潮^a 刘志军^{a,b} 李艳冰^a 何业谱^a 林晓洪^b 陈河如^{*,a,c}

(^a 暨南大学药学院 中药及天然药物研究所 广州 510632)

(^b 广州药本君安医药科技股份有限公司 广州 510663)

(^c 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室 广州 510632)

摘要 利用靶向策略设计了抗肿瘤药物 *N*-(*N'*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸)丙卡巴肼(Z-GP-Pcb), 发展了 3 步法合成丙卡巴肼(Pcb). 首先以 4-甲基苯甲醛为原料, 经二溴异氰尿酸(DBI)转化为 *N*-异丙基-4-甲基苯酰胺. 该化合物经 2-碘酰基苯甲酸(IBX)直接氧化为 *N*-异丙基-4-甲酰基苯酰胺, 随后还原胺化得 Pcb. 最后与 *N*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸缩合得 Z-GP-Pcb, 总收率 49.9%. 另外, 本研究还建立了体外平行人造膜渗透测血脑屏障(PAMPA-BBB)方法评价 Z-GP-Pcb 透过血脑屏障(BBB)活性, 发现其透膜常数(P_e)为 $(19.22 \pm 4.25) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 大于母药 Pcb $[(11.14 \pm 1.34) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}]$, 具有较高的透过 BBB 活性.

关键词 药物合成; 丙卡巴肼; 药物设计; 靶向抗肿瘤; 成纤维细胞激活蛋白 α

Environment-Friendly Synthesis of Targeted Anticancer Drug *N*-(*N'*-Carbobenzoxycglycylprolyl)procarbazine (Z-GP-Pcb) and the Evaluation of Its Activity to Penetrate Blood-Brain Barrier

Zhang, Chao^a Liu, Zhijun^{a,b} Li, Yanbing^a He, Yepu^a

Lin, Xiaohong^b Chen, Heru^{*,a,c}

(^a Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)

(^b Guangzhou PharmCherub Medical Sci. & Tech. Incorporated Corporation, Guangzhou 510663)

(^c Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Anti-cancer drug *N*-(*N'*-carbobenzoxycglycylprolyl)procarbazine (Z-GP-Pcb) has been designed based on targeting strategy and a 3-step method has been developed for the synthesis of procarbazine (Pcb). Firstly, 4-methylbenzaldehyde, as starting material, was transformed into *N*-isopropyl-4-methylbenzamide using dibromoisocyanuric acid (DBI). This compound was then directly oxidized to *N*-isopropyl-4-formylbenzamide by 2-iodoxybenzoic acid (IBX). A reductive amination reaction was then followed leading to Pcb. At last, Pcb was condensed with *N*-carbobenzoxycglycylproline resulting in Z-GP-Pcb. The overall yield was 49.9%. Furthermore, an *in vitro* blood-brain barrier (BBB) permeation assay (PAMPA-BBB) was set up to evaluate the permeation activity of Z-GP-Pcb. It was found that the permeation constant (P_e) was $(19.22 \pm 4.25) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, which was more than that of the parent drug Pcb $[(11.14 \pm 1.34) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}]$. This evidence suggests that Z-GP-Pcb possesses high activity to penetrate BBB.

Keywords drug synthesis; procarbazine; drug design; targeted anti-cancer; fibroblast activation protein- α

丙卡巴肼(procarbazine, Pcb), 化学名为 *N*-异丙基-4-(2'-甲基胍基)甲基苯甲酰胺, 属于胍类衍生物, 在体

* Corresponding author. E-mail: thrchen@jnu.edu.cn

Received August 10, 2019; revised September 21, 2019; published online October 9, 2019.

Project supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2018B030311020).

广东省自然科学基金(No. 2018B030311020)资助项目.

内可以被氧化酶如细胞色素 P450 单氧化酶和过氧化酶等转化为偶氮丙卡巴肼(azoprocarbazine)和 *N*-氧偶氮丙卡巴肼(azoxyprocarbazine), 并进一步转化为甲基和芳基自由基^[1]. Pcb 的抗肿瘤机制主要是通过烷化作用来实现, 因此, 它没有靶向作用, 导致了诸多副作用, 包括胃肠道紊乱(如恶心和呕吐)、骨髓抑制毒性(如白细胞和血小板减少)和中枢神经系统的影响(如头痛、抑郁、神经质和失眠). 它对人体生殖系统也会造成影响, 比如损伤精子和导致卵巢衰竭等^[2,3]. 虽然如此, 因 Pcb 不与其他烷化剂、长春新碱(VCR)和皮质激素等交叉耐药, 它又重新进入人们的视野. 近年来, 通过与阿霉素(Dox)、环磷酰胺(CTX)和 VCR 等联合用药, 在治疗霍奇金淋巴瘤和神经胶质瘤等肿瘤时取得了相当不错的治疗效果, 成为治疗黑色素瘤、肺癌和神经胶质瘤等联合用药中的一部分^[4,5].

针对 Pcb 的临床毒副作用, 本课题组^[6]利用靶向药物设计的策略, 设计合成了靶向成纤维细胞激活蛋白酶 α (FAP α) 的新型抗肿瘤药物 *N*-(*N'*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸)丙卡巴肼(Z-GP-Pcb), 并通过体外和体内实验证明了该化合物能够靶向 FAP α , 酶切后释放抗癌活性成分 Pcb, 在保持抗癌药效的同时降低了 Pcb 的生殖毒性以及骨髓抑制毒性, 是一个很有前景的候选广谱抗肿瘤新药.

该工作通过 5 步合成 Z-GP-Pcb. 首先是 Pcb 的 4 步法合成, 然后直接用 *N*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸(Z-GP-OH)与 Pcb 缩合得到终产物, 总收率 32.2%. 但在 Pcb 的合成中, 第一步采用 SOCl₂ 将对甲基苯甲酸转化为对甲基苯甲酰氯, 这步反应对环境不友好. 因为 SOCl₂ 本身是低沸点的腐蚀性液体, 反应过程释放出 SO₂ 和 HCl, 对环境造成严重污染. 另外, 第三步在 100 °C 下利用 Ce(NH₄)₂(NO₃)₆/HNO₃ 将 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺转化为 *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺, 该反应采用了强氧化性、强腐蚀性试剂, 对环境不友好. 另外需要在 100 °C 下长时间反应, 比较耗能. 因此, 有必要对 Pcb 的合成方法进一步优化, 探索一条环境更友好、更高效的合成途径.

鉴于此, 本课题组在 Z-GP-Pcb 合成方面进行进一步探索, 实现了 Pcb 的三步合成(Scheme 1). 另外, 考虑到 Z-GP-Pcb 有可能成为治疗脑瘤及神经胶质瘤的候选新药, 测试了 Pcb 和 Z-GP-Pcb 透过血脑屏障(BBB)的活性.

1 结果与讨论

Z-GP-Pcb 的合成路线如 Scheme 1 所示. 首先是 Pcb 的合成. 第一步采用将醛直接氧化酰胺化策略, 将起始

原料 4-甲基苯甲醛直接转化为 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺, 所用试剂为二溴异氰尿酸(DBI). 反应条件温和, 只需在室温下搅拌反应 3~4 h, 收率高达 92.1%. 该方法是目前报道的直接将醛转化为酰胺的较好方法之一^[7]. 该反应的机理是, DBI 首先将醛氧化为酰溴, 再与胺发生酰化反应得酰胺. 第二步反应采用将 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺上的甲基直接氧化为甲酰基的策略. 关于将芳甲基直接氧化为芳醛的反应, 迄今已经报道了许多方法, 包括我们已经使用过的 Ce(NH₄)₂(NO₃)₆/HNO₃ 氧化法^[6]、Na₂S₂O₈/AgNO₃ 或 Ag(Py)₄S₂O₈ 氧化法^[8,9]、Cu²⁺ 催化的 Na₂S₂O₈ 氧化法^[10,11]、(PhSeO)₂O 在 130 °C 下的氧化法^[12,13]、H₂O₂/HBr 在 85 °C 下的氧化法^[14]和 Br₂/二甲亚砜(DMSO)在 120 °C 下的氧化法^[15]. 这些氧化法存在需要使用强酸、有毒金属和反应条件难以控制等缺陷. 为此, Togo 等^[16]提出一锅法转化芳甲基成芳醛的策略, 但该方法需要将芳甲基溴化, 再用 *N*-甲基吗啡啉氧化物氧化为芳醛.

Reagent and conditions: (a) dibromocyanuric acid/DCM, r.t., 3~4 h; then (CH₃)₂CHNH₂/Et₃N, r.t., 10 min, 92.1%; (b) IBX/DMSO, 80 °C, 8~12 h, 88.6%; (c) methylhydrazinium sulfate/EtOH/Et₃N, r.t., 20 min, 60 °C, 6 h; then NaBH₃CN/DMF, r.t., overnight, 75.2%; (d) Z-GP-OH, EDCI/HOBt/DIPEA, DCM, r.t., 3~4 h, 81.3%.

图式 1 Z-GP-Pcb 的 4 步法合成
Scheme 1 Four-step synthesis of Z-GP-Pcb

考虑到所合成的终产物为 Z-GP-Pcb, 若需要先将来 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺转化为 *N*-异丙基-4-溴甲基苯甲酰胺后再氧化, 没有采用曾经报道过的另一条合成路线^[17]方便. 该路线是将 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺在 *N*-溴代琥珀酰亚胺(NBS)/(PhCOO)₂ 作用下生成 *N*-异丙基-4-溴甲基苯甲酰胺, 再与 *N,N'*-二甲酰基甲肼反应, 随后在浓盐酸的作用下脱去 N 上的甲酰基得到产物. 最终, 采用 2-碘酰基苯甲酸(IBX)在二甲亚砜(DMSO)中的氧化法^[18]将 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺上的甲基直接氧化为 *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺, 收率 88.6%. 该反应的机制已经被证实为单电子转移(SET)历程^[19].

第三步反应采用传统的还原胺化方法, 收率 75.2%.

最后一步反应是 Pcb 与 Z-GP-OH 的缩合反应, 采用的缩合剂为 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)/1-羟基苯并三氮唑(HOBt), 收率为 81.3%. EDCI 首先将 Z-GP-OH 的羧基活化成为混合酸酐, 在 HOBt 存在下转化为活泼酯, 然后与 Pcb 的胍基反应. 文献[6, 20]采用的缩合剂为 2-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)/HOBt, 所报道的收率分别为 69% 和 65%. 显然, 用 EDCI/HOBt 作为缩合剂, 反应收率有很大程度提高, 我们认为这与 EDCI 的碳二亚胺结构对羧基具有较高的活化能力有关.

近年来, Pcb 已经作为联合用药的一部分用于脑瘤和神经胶质瘤的治疗^[21,22]. 作为治疗脑瘤和神经胶质瘤的药物, 首要条件是它们能够透过血脑屏障(BBB), Pcb 无疑能够透过血脑屏障^[23]. 考虑到我们有意向将 Z-GP-Pcb 发展成为治疗脑瘤和神经胶质瘤的潜在候选药物, 因此, 在本研究中采用 PAMPA-BBB 体外测定法^[24,25]评价了 Z-GP-Pcb 的透过血脑屏障活性.

首先测试了 7 个上市药物的透膜常数(P_e), 并与文献[24]报道的数据对比, 验证方法的可靠性, 结果如表 1 所示. 将测试得到的上市药物的透膜常数(P_e)与文献数据对比, 得到的线性方程为: $P_e(\text{exp.}) = 1.1719P_e(\text{bibl.}) - 0.0221$ ($R^2 = 0.9404$), 可以看出, 实测数据与文献报道的数据具有较好的线性关系(图 1A), 证实测试条件可行.

表 1 7 个上市药物实测的透膜常数与文献报道数据比较
Table 1 Permeability in the PAMPA-BBB assay for 7 commercial drugs used in the experiment validation

Commercial drug	Bibl./($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)	P_e^a /($10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
Testosterone	17	21.33 ± 4.57
Progesterone	9.3	7.71 ± 0.33
Piroxicam	2.5	5.60 ± 0.82
Hydrocortisone	1.9	1.35 ± 0.54
Atenolol	0.8	1.13 ± 0.16
Ofloxacin	0.8	0.29 ± 0.22
Theophylline	0.1	0.38 ± 0.31

^a [*V*(PBS) : *V*(EtOH) = 70 : 30].

综合文献报道的 P_e 临界值和实测值与文献值之间的线性关系, 得出两个临界 P_e 值: 当化合物实测的 $P_e > 4.67 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 该化合物能透过 BBB; 当化合物实测的 $P_e < 2.32 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 则不能透过 BBB; 当化合物实测的 P_e 介于两者之间时, 不能判定该化合物是否能透过 BBB.

从图 1B 的实验结果来看, Z-GP-Pcb 的透膜常数为 $(19.22 \pm 4.25) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 大于母药 Pcb 的透膜常数 $[(11.14 \pm 1.34) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}]$. 可见, 引入了 Z-GP 结构模块后, Z-GP-Pcb 透过 BBB 的活泼性比 Pcb 要高, 证明该化合物有可能发展成为靶向抗脑瘤和神经胶质瘤的

图 1 PAMPA-BBB 法实验结果

Figure 1 Experimental results of PAMPA-BBB assay (A) Lineal correlation between experimental and reported permeability of commercial drugs using the PAMPA-BBB assay; (B) experimental P_e values of Pcb and Z-GP-Pcb. * $p < 0.05$ vs Pcb group ($n = 3$).

临床药物. 当然, 这方面还需要有大量的在体药效实验进一步验证.

2 结论

开发了 3 步法合成丙卡巴肼方法, 并以此为基础 4 步合成 Z-GP-Pcb. 首先以 4-甲基苯甲醛为原料, 经 DBI 转化为 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺. 该化合物经 IBX 直接转化为 *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺, 随后还原胺化为 Pcb, Pcb 与 Z-GP-OH 缩合得总产物, 总收率 49.9%. 同时, 建立了体外 PAMPA-BBB 法评价 Z-GP-Pcb 透过 BBB 活性, 发现其透膜常数(P_e)为 $(19.22 \pm 4.25) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 大于母药 Pcb $[(11.14 \pm 1.34) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}]$, 推测 Z-GP-Pcb 可以很好透过血脑屏障.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker-AV 300 MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); DHG-9140A 型恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); CLJBQ-3 型恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); EYELA 型旋转蒸发器(东京理化器械独资工厂); LGJ-12 冷冻干燥机(巩义市英峪予华仪器有限公司); FA2104 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); TU-1810S 紫外分光光度计(北京普析通仪器有限公司); LC-UV100 液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司); Cosmosil 5C18-MS-II 色谱柱(Nacalai Tesque Inc., 日

本); DZF-150 型小型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); RS-232 熔点仪(美国 SRS 公司).

4-甲基苯甲醛、异丙胺、二溴异氰脲酸、甲基胍硫酸盐、氰基硼氢化钠和 2-碘酰基苯甲酸均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; HOBt, HATU, EDCI 和 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)均购自上海吉尔生化有限公司.

7 个上市药物 Testosterone、Progesterone、Piroxicam、Hydrocortisone、Atenolol、Ofloxacin 和 Theophylline 均购自 Sigma 和 Alfa Aesar 公司; 猪脑膜(PBL)购自 Avanti Polar Lipids 公司; 供体微版 MAIPN4550 和受体微版 MATRNPS50 均购自 Millipore 公司; 96-孔 UV 微版(Costar)购自 Corning 有限公司.

二氯甲烷(DCM)加 P_2O_5 回流 3~4 h, 蒸馏备用; 四氢呋喃(THF)加钠丝回流 3~4 h, 蒸馏备用; 氟苯加无水硫酸镁回流 4~6 h, 蒸馏备用; DMSO 加 CaH_2 回流 3~4 h, 减压蒸馏备用.

3.2 实验方法

3.2.1 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺的合成

称取 240.2 mg (2.0 mmol) 4-甲基苯甲醛于 25 mL 的圆底烧瓶中, 加入 5.0 mL 干燥 DCM 中, 称取 343.2 mg (1.2 mmol) 二溴异氰脲酸加入到体系中, 在室温下反应 4 h, 称取 303.3 mg (3.0 mmol) 三乙胺和 178.2 mg (3.0 mmol) 异丙胺, 用 2 mL DCM 溶解后, 缓慢加入到反应体系中, 随后反应 10 min, 薄层色谱(TLC)监测反应, 待反应毕, 加入 50 mL 水, 用 DCM 萃取三次(50 mL $\times$ 3), 合并有机相, 再用水洗两次, 无水硫酸钠干燥后, 旋干有机溶剂得无色油状液体. 硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/石油醚, $V:V=1:3$), 得 313.3 mg 白色固体化合物 *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺, 收率 92.1%. m.p. 133~134 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.64 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 4.31~4.19 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.22 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.7, 141.5, 132.2, 129.1, 129.1, 126.9, 126.9, 41.8, 22.8, 21.4; ESI-HRMS calcd. for $C_{11}H_{16}NO$ $[M+H]^+$ 178.1226, found 178.1226. 以上数据与文献[6]同.

3.2.2 *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺的合成

称取 342.2 mg (2.0 mmol) *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺, 10 mL 的氟苯/DMSO 混合溶剂(体积比为 2:1), 室温下分批加入 1.68 g (6.0 mmol) 2-碘酰基苯甲酸, 搅拌下升温至 85 °C, 在此温度下反应 8~10 h. 停止反应, 混合物降至室温后, 搅拌下慢慢倒入加了碎冰的 100 mL 饱和 NaCl 水溶液, 用 DCM 萃取(100 mL $\times$ 3), 合并有机相, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干有机溶剂得粗品,

用硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/石油醚, $V:V=1:5$), 得白色固体 *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺 191.1 mg, 收率 88.6%. m.p. 151~152 °C; 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 10.01 (s, 1H), 8.02 (d, $J=1.6$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.10~4.30 (m, 1H), 1.31 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 193.5, 168.3, 130.6, 130.6, 129.0, 129.0, 128.1, 127.2, 43.4, 22.5, 22.5; ESI-HRMS calcd for $C_{11}H_{14}NO_2$ $[M+H]^+$ 192.1019, found 192.1018. 以上数据与文献[6]相同.

3.2.3 丙卡巴肼(Pcb)的合成

称取 191.1 mg (1.0 mmol) *N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺和 504.5 mg (3.5 mmol) 甲基胍硫酸盐于 25 mL 反应瓶中, 加入 20.0 mL 无水乙醇, 搅拌 20 min 后, 加入 1.0 mL 三乙胺, 于 60 °C 条件下搅拌反应 6 h. 反应结束, 旋干溶剂, 加入 10.0 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)将其重新溶解, 在 0 °C 条件下分批加入 125.6 mg (2.0 mmol) 氰基硼氢化钠. 加完后, 将反应体系逐渐升至室温, 反应过夜. 反应结束后, 加水淬灭反应. 加入 200 mL 的饱和 NaCl 水溶液, 用乙酸乙酯萃取(200 mL $\times$ 3), 合并有机相, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得粗品. 粗品经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/石油醚, $V:V=1:3$), 得丙卡巴肼 164.5 mg, 收率 75.2%. m.p. 144~145 °C; 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.86 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 4.24~4.19 (m, 3H), 2.87 (s, 3H), 1.27 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 168.8, 136.1, 130.1, 130.1, 129.0, 128.8, 128.8, 52.9, 43.1, 35.5, 22.5, 22.5; ESI-HRMS calcd for $C_{12}H_{20}N_3O$ $[M+H]^+$ 222.1601, found 222.1602. 以上数据与文献[6]相同.

3.2.4 *N*-(*N'*-苄氧羰基甘氨酸酰肼)丙卡巴肼(Z-GP-Pcb)的合成

称取 612.2 mg (2.0 mmol) *N*-苄氧羰基甘氨酸酰肼, 283.2 mg (2.1 mmol) HOBt 和 402.2 mg (2.1 mmol) EDCI 溶于 10 mL 干燥 DCM, 将其倒入 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 0.3 mL DIPEA, 将反应瓶置于 0 °C 条件下搅拌活化 30 min, 得活化液 A. 随后, 称取 442.1 mg (2.0 mmol) 丙卡巴肼溶于 5 mL 干燥 DCM, 将其倒入 10 mL 圆底烧瓶中, 加入 DIPEA 0.5 mL, 反应 30 min 后, 将活化液 A 缓慢滴加到反应瓶中, 随后将反应瓶移至室温反应 3~4 h. 待反应毕, 加入 50.0 mL 饱和 NaCl 水溶液, 用 DCM 萃取(50 mL $\times$ 3), 合并有机相, 依次用水、饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 旋干得粗品. 粗品经硅胶柱层析纯化($CHCl_3$ /MeOH, $V:V=10:1$)和 RP-HPLC 分离纯化(淋洗剂为 MeOH/水, $V:V=50:50$, V/V), 得 863.1 mg 白色固体, 收率 81.3%, m.p. 102~103 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.77~7.68 (m,

2H), 7.42~7.31 (m, 7H), 5.08 (s, 2H), 4.31~4.20 (m, 1H), 4.15~4.01 (m, 2H), 3.96~3.93 (m, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.60~3.40 (m, 2H), 3.14 (s, 3H), 2.10~1.67 (m, 4H), 1.24 (d, $J=6.5$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 174.1, 166.8, 166.5, 156.3, 139.9, 136.5, 134.5, 129.5, 129.2, 129.0, 129.0, 128.6, 128.5, 127.3, 127.3, 127.1, 66.9, 56.8, 52.7, 46.4, 43.4, 42.1, 33.2, 29.0, 24.7, 22.8, 22.8; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 510.2711, found 510.2713. 以上数据与文献[6]一致。

3.3 体外透过血脑屏障活性评价(PAMPA-BBB 法)

3.3.1 试剂配制

(1) 质量分数为 2% 的猪脑组织提取物(PBL)溶液(现配现用): 称取 20 mg PBL, 加入 1.0 mL 十二烷, 超声溶解。

(2) 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲盐溶液(PBS): 称取 41.36 g K_2HPO_4 , 加入 200 mL 去离子水, 用少量 KOH 水溶液调节溶液 pH 值至 7.4。

(3) 5 mg/mL 对照药物储备液: 精密称定对照药物 5.0 mg, 加 DMSO 溶解配制成浓度 5 mg/mL 的对照药物储备液。

(4) 5 mg/mL 测试药物储备液: 精密称取测试一定量化合物, 用 DMSO 配制成 10 mmol·L⁻¹ 的储备液, 再根据不同化合物的分子量换算稀释成浓度为 5 mg/mL。

(5) 25 $\mu\text{g/mL}$ 对照药物、测试化合物测试液: 取 5 μL 储备液, 加 995 μL pH=7.4 的 PBS/乙醇($V:V=70:30$)溶液稀释制备而成, 化合物应不析出。

3.3.2 PAMPA-BBB 法实验步骤

取 4 μL 质量分数为 2% 的猪脑组织提取物(PBL)溶液加于 MAIPN4550 的 96 孔板的疏水膜上, 沿壁轻轻滴入, 避免枪头直接接触疏水膜; 吸取 200 μL 待测样品液(100 $\mu\text{g/mL}$)加入到 96 孔板中的膜上方作为给药池, 膜的另一侧底部为 MATRNPS50 的接收板, 加入 300 μL 缓冲溶液(pH 7.4 的 PBS/乙醇, $V:V=70:30$)为接受池, 注意保持接受液与膜平行放置, 充分接触, 室温静置 10 h 后, 小心移除给药池, 用紫外光谱仪测试接受池内化合物吸光度值(250~500 nm)。将 200 μL 待测样品液与 300 μL 缓冲溶液(pH 7.4 的 PBS/乙醇, $V:V=70:30$)充分混匀, 作为理论平衡溶液, 测试其吸光度值(250~500 nm), 选取化合物最大吸收波长进行检测。根据如下公式计算 P_c 值:

$$P_c = \left\{ \frac{V_d \times V_a}{(V_d \times V_a) \times t} \right\} \times \ln \left\{ 1 - \frac{[\text{drug}]_{\text{acceptor}}}{[\text{drug}]_{\text{equilibrium}}} \right\} \quad (1)$$

其中, V_d : 给药池体积(上层); V_a : 接受池体积(下层); A : 疏水膜表面积; t : 作用时间; $[\text{drug}]_{\text{acceptor}}$: 接收池中化合物吸光度; $[\text{drug}]_{\text{equilibrium}}$: 理论上接收池中化合物吸光度。

辅助材料(Supporting Information) *N*-异丙基-4-甲基苯甲酰胺、*N*-异丙基-4-甲酰基苯甲酰胺、丙卡巴肼(Pcb)和 *N*-(*N'*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸)丙卡巴肼(Z-GP-Pcb)的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 以及 HRMS 谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Sinha, B. K. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 2777.
- [2] Horstman, M. G.; Meadows, G. G.; Yost, G. S. *Cancer Res.* **1987**, 47, 1547.
- [3] Champman, R. M. *Semin. Oncol.* **1982**, 9, 84.
- [4] Armand, J.-P.; Ribrag, V.; Harrousseau, J.-L.; Abrey, L. *Ther. Clin. Risk Manage.* **2007**, 3, 213.
- [5] Fesler, M. J.; Becker-Koepke, S.; Di Bisceglie, A. M.; Petruska, P. *J. Pharmacotherapy* **2012**, 30, 540.
- [6] Wang, R.; Zhang, C.; Zheng, C.; Li, H.; Xie, X.; Jin, Y.; Liu, Z.; Chen, H. *Bioorg. Chem.* **2019**, 83, 461.
- [7] Kang, S.; La, M. T.; Kim, H.-K. *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59, 3541.
- [8] Bacon, R. G. R.; Doggart, J. R. *J. Chem. Soc.* **1960**, 1332.
- [9] Firouzabadi, H.; Salehi, P. *Synth. Commun.* **1991**, 21, 1121.
- [10] Bhatt, M. V.; Perumal, P. T. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2605.
- [11] Gore, M. P.; Gould, S. J.; Weller, D. D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2774.
- [12] Barton, D. H. R.; Hui, R. A. H. F.; Lester, D. J.; Ley, S. V. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3331.
- [13] Barton, D. H. R.; Wang, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5149.
- [14] Ghaffarzadeh, M.; Bolourtchian, M.; Tabar-Heydar, K.; Daryaei, I.; Mohsenzaheh, F. *J. Chem. Sci.* **2009**, 121, 177.
- [15] Ghaffarzadeh, M.; Bolourtchian, M.; Gholamhosseni, M.; Mohsenzaheh, F. *Appl. Catal. A* **2007**, 333, 131.
- [16] Tabata, M.; Moriyama, K.; Togo, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3402.
- [17] Liu, Z.; Chen, H. *Chin. J. Med. Chem.* **2012**, 22, 499 (in Chinese). (刘志军, 陈河如, 中国药物化学杂志, **2012**, 22, 499.)
- [18] Nicolaou, K. C.; Baran, P. S.; Zhong, Y.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3183.
- [19] Nicolaou, K. C.; Baran, P. S.; Kranich, R.; Zhong, Y.-L.; Sugita, K.; Zou, N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 202.
- [20] Wang, R.; Chen, H.; Zhang, L.; Zhang, C. *CN 20161118043*, **2016**.
- [21] Hafazalla, K.; Sahgal, A.; Jaja, B.; Perry, J. R.; Das, S. *Oncotarget* **2018**, 9, 33623.
- [22] Jutras, G.; Bélanger, K.; Letarte, N.; Adam, J.-P.; Roberge, D.; Lemieux, B.; Lemieux-Blanchard, É.; Masucci, L.; Ménard, C.; Bahary, J. P.; Moumdjian, R.; Berthelet, F.; Florescu, M. *Curr. Oncol.* **2018**, 25, e33.
- [23] Weiss, H. D.; Walker, M. D.; Wiernik, P. H. *New Engl. J. Med.* **1974**, 291, 128.
- [24] Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 223.
- [25] Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Munoz-Torrero, D.; Ramírez, L.; Gomez, E.; Isambert, N. S.; Lavilla, R.; Badia, A.; Clos, M. V. R.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Arce, M. P.; Rodríguez-Franco, M. L.; Huertas, O. S.; Dafni, T.; Luque, F. J. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5365.

(Zhao, C.)