

## • 实验研究 •

## 帕拉米韦巯基二肽前药的合成及其稳定性研究

陈晨晨, 张晨, 刘慧, 孙勇兵\*

江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

**摘要:** 目的 合成一系列帕拉米韦巯基二肽前药并考察其在不同介质中的稳定性。方法 以帕拉米韦结构中1位羧基为反应位点, 巯基二肽为载体, 通过酯化反应合成一系列帕拉米韦巯基二肽前药。采用高效液相色谱法测定帕拉米韦巯基二肽前药在不同pH值缓冲溶液、大鼠胃液、大鼠小肠液、人工胃液(含胃蛋白酶)、人工肠液(含胰酶)、大鼠血浆中的稳定性, 采用一级动力学方程计算降解速率常数。结果 合成了4个帕拉米韦巯基二肽前药, 它们在胃肠道中稳定性良好。结论 帕拉米韦巯基二肽前药具有良好的稳定性, 为帕拉米韦口服给药的开发可提供依据。

**关键词:** 帕拉米韦巯基二肽前药; 帕拉米韦; 前体药物; 稳定性; 高效液相色谱

**中图分类号:** R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)07-1341-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.07.001

## Synthesis and stability of peramivir mercapto dipeptide prodrugs

CHEN Chen-chen, ZHANG Chen, LIU Hui, SUN Yong-bing

National Engineering Research Center for Solid Preparation Technology of Chinese Medicines, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330006, China

**Abstract: Objective** To synthesize a series of peramivir mercapto dipeptide prodrugs and investigate their stability at the different medium. **Methods** A series of prodrugs of peramivir were synthesized by esterification with 1 carboxyl group in the structure of peramivir as the reaction site and phobic dipeptide as the carrier. The stability of peramivir mercapto dipeptide prodrug in different pH buffer solutions, rat gastric juice, rat small intestinal juice, artificial gastric juice (containing pepsin), artificial intestinal juice (containing pancreatin), and rat plasma were determined by HPLC method. First-order kinetic equations were used to calculate the degradation rate constant. **Results** Four peramivir mercapto dipeptide prodrugs were synthesized with good stability at the different medium. **Conclusion** Peramivir mercapto dipeptide prodrugs have good stability, which can provide a basis for the development of peramivir oral administration.

**Key words:** peramivir mercapto dipeptide prodrug; peramivir; prodrug; stability; HPLC

帕拉米韦是环戊烷类抗流感病毒药物, 在临床上主要用于甲型流感、乙型流感的治疗。帕拉米韦结构中极性基团胍基的存在使分子极性很大, 小肠膜渗透性差, 口服生物利用度低<sup>[1-2]</sup>。本课题组利用寡肽转运蛋白1(PEPT1)作为靶点, 在帕拉米韦1位羧基通过酯键引入氨基酸, 使其成为能够被PEPT1识别并主动转运的氨基酸酯类前药; 尽管该类前药提高了帕拉米韦的口服生物利用度, 但胃肠道中大量的酯酶会破坏酯键, 使得前药在胃肠道中

稳定性差, 限制了其作为口服给药方式的进一步开发<sup>[3]</sup>。巯基二肽分子中含有硫脲结构, 化学稳定性和代谢稳定性都非常好, 同时也能够被PEPT1识别和转运, 如巯基二肽 *L*-phenylalanyl-ψ[CS-NH]-*L*-alanine<sup>[4-6]</sup>。作为识别基团, 巯基二肽最大的优点是对酶降解的耐受性, 在增加母药与PEPT1亲和性的同时还能够大幅提高前药在胃肠道中的稳定性, 同时前药在进入循环系统后能被快速激活<sup>[7]</sup>。所以期望设计不同结构的帕拉米韦巯基二肽前药能够提

收稿日期: 2021-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860630; 81360485); 江西省研究生创新专项资金项目(YC2019-S363)

作者简介: 陈晨晨(1997—), 女, 陕西咸阳人, 硕士研究生。E-mail: 2241364204@qq.com

\*通信作者: 孙勇兵(1980—)男, 安徽池州人, 副教授, 博士, 主要从事生物药剂学和药物动力学的研究。E-mail: yongbing\_sun@hotmail.com

高母药与 PEPT1 的亲合性,同时提高药物在胃肠道中的稳定性。故本实验拟合成不同结构的帕拉米韦巯基二肽前药,并研究前药在不同 pH 值磷酸盐缓冲液、模拟胃液、小肠液等介质中的降解情况,以此来预测其稳定性。

## 1 仪器和试剂

ME204E/02 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);DHG-9050A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海姚氏仪器设备厂);S15L 超声清洗器(洁康超声波清洗设备有限公司);瑞士 BUCHI R-210 旋转蒸发器(上海沃佺仪器厂);ThermoFisher LCQ LS/MS (ThermoFisher 公司);Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Bruker ARX 600 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);PHS-2C 酸度计(上海理达仪器厂);纯水机(Thermo Fisher 公司);Sorvall ST8R 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司)。

(1*S*,2*S*,3*R*,4*R*)-3-((*R*)-1-乙酰氨基-2-乙基丁基)-4-(叔丁氧基羰基氨基)-2-羟基环戊烷羧酸甲酯(化合物 **1**,南京友杰化工有限公司);*N*-(9-芴甲氧羰酰基)-*O*-苄基-*L*-丝氨酸、*N*-(9-芴甲氧羰酰基)-*O*-苄基-*L*-酪氨酸、*N*-(9-芴甲氧羰酰基)-*O*-苄基-*L*-门冬氨酸、*N*-(9-芴甲氧羰酰基)-*O*-苄基-*L*-谷氨酸(质量分数高于 98%,吉尔生化有限公司);4*M*-盐酸二氧六环、乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(上海迈瑞尔化学技术有限公司);*N,N*-二-*BOC*-*S*-甲基异硫脲(上海馨远医药科技有限公司);4-二甲氨基吡啶、二环己基碳二亚胺、*N,N*-二异丙基乙胺、*N,N*-二甲基甲酰胺(山东西亚化学股份有限公司);叔丁醇(萨恩化学技术有限公司);硅胶(青岛海洋化工有限公司);胃蛋白酶 1:10 000、胰酶 1:250,牛血清白蛋白均购自北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为色谱纯或分析纯。

雌性 SD 大鼠,体质量 200~210 g,江西中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2018-0003。

## 2 方法和结果

### 2.1 Boc 保护的帕拉米韦的合成

0.1 mol 化合物 **1** 溶解于 20 mL 乙醚中,冰水浴条件下加入 0.4 mol 4*M*-盐酸二氧六环 10 mL,并另加乙醚至 40 mL,室温搅拌直到生成白色固体后继续常温搅拌 24 h。然后加热回流 2 h,冷至常温,抽滤,用乙醚洗涤,真空干燥,得白色固体化合物 **2**。将 0.1 mol 化合物 **2** 溶于 30 mL 干燥 DMF 中,

冰浴条件下缓慢加入 0.3 mol 三乙胺,混浊,放热,再加入 0.11 mol BocTU、0.011 mol HgCl<sub>2</sub> 继续降温 20 min。常温搅拌 2 h,生成大量白色固体化合物 **3**。在冰水浴条件下将 0.1 mol 化合物 **3** 溶于 30 mL 乙醇和 30 mL 四氢呋喃的混合溶液中,加入 0.1 mol 5% NaOH 溶液,常温搅拌 3 h,减压浓缩得白色糊状物。加入 30 mL 水使溶解,加入 0.11 mol 冰乙酸搅拌析出白色固体。抽滤,水洗,烘干,得白色固体。收率 85.9%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 11.48 (s, 1H), 8.33 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J=10.1$  Hz, 1H), 4.36 (dt,  $J=16.7, 8.5$  Hz, 1H), 4.20 (td,  $J=9.8, 2.8$  Hz, 1H), 4.12 (d,  $J=4.4$  Hz, 1H), 2.60 (dd,  $J=12.2, 7.8$  Hz, 1H), 2.41 (dt,  $J=12.7, 8.5$  Hz, 1H), 2.00 (td,  $J=9.4, 4.5$  Hz, 1H), 1.89 (s, 1H), 1.70 (s, 2H), 1.58~1.52 (m, 1H), 1.50~1.42 (m, 10H), 1.38 (d,  $J=14.5$  Hz, 9H), 1.27 (ddd,  $J=14.3, 11.9, 6.7$  Hz, 2H), 1.11 (s, 1H), 1.05 (dd,  $J=14.2, 7.2$  Hz, 1H), 1.01~0.95 (m, 1H), 0.85 (dt,  $J=14.4, 7.2$  Hz, 6H)。  $m/z$  528.65 [M+H]<sup>+</sup>。合成路线见图 1。

### 2.2 巯基二肽载体的合成

**2.2.1 L-氨基酸-苄酯-叔丁酯盐酸盐的合成** 0.1 mol *N*-(9-芴甲氧羰酰基)-*O*-苄基-*L*-氨基酸溶解于干燥二氯甲烷溶液中,在冰浴条件下依次加入 0.3 mol 叔丁醇、0.08 mol DMAP,并在 5 min 之内加入 0.11 mol DCC,在此条件下继续反应 5 min,室温搅拌过夜。薄层色谱监测反应进程,待反应结束后,滤过除去白色固体二环己基脲,滤液分别用 0.5 mol/L HCl 溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液各洗涤 2 次,收集有机层,用无水硫酸镁干燥,滤过,滤液减压浓缩,硅胶拌样,醋酸乙酯-石油醚(1:6→1:4→1:2)为洗脱剂经柱色谱分离纯化得化合物 **6a**~**6d**。将其溶解于 20%哌啶的 DMF 溶液中,室温搅拌 40 min, Fmoc 基团完全脱除。反应液减压浓缩,醋酸乙酯复溶,用饱和 NaCl 溶液洗涤 2 次,收集有机层,减压浓缩,得 *L*-氨基酸苄酯叔丁酯化合物 **7a**~**7d**。

化合物 **7a** (H-Asp-(OBZl)-OtBu): 收率 89%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.63 (s, 2H), 7.48~7.29 (m, 5H), 5.16 (q,  $J=12.4$  Hz, 2H), 4.21 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 3.35 (s, 2H), 1.50~1.30 (m, 9H)。  $m/z$  279.1 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **7b** (H-Glu-(OBZl)-OtBu): 收率 75%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.58 (s, 2H),

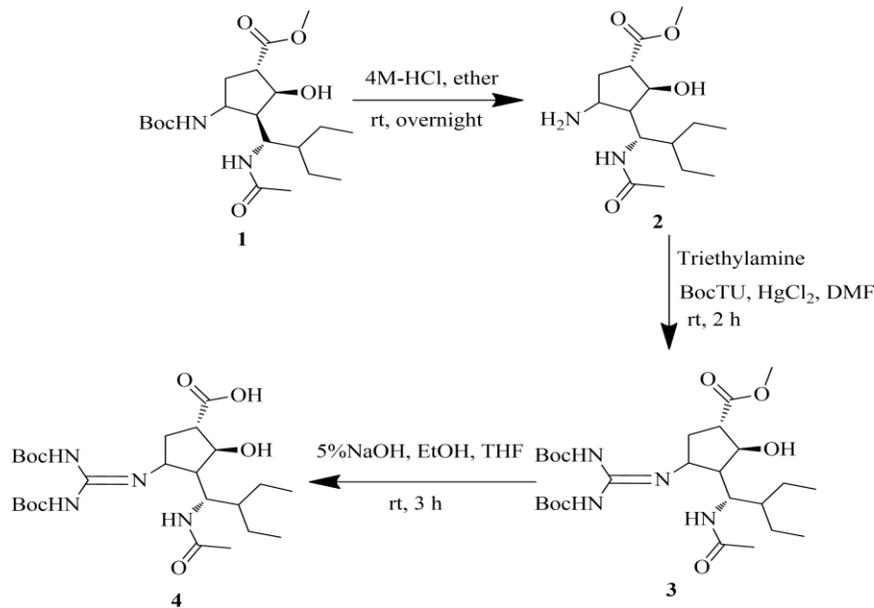


图1 Boc保护的帕拉米韦的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of *N*-Boc-protected peramivir

7.46~7.28 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.91 (t,  $J=6.6$  Hz, 1H), 3.34 (s, 1H), 2.75~2.59 (m, 1H), 2.07 (dd,  $J=14.4, 7.4$  Hz, 2H), 1.45 (s, 9H)。  $m/z$  293.1  $[M+H]^+$ 。

化合物 **7c** (H-Ser-(OBZI)-OtBu): 收率 81%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.59 (s, 2H), 7.42~7.29 (m, 5H), 4.55 (dd,  $J=73.4, 12.2$  Hz, 2H), 4.29~4.13 (m, 1H), 3.34 (s, 2H), 1.43 (s, 9H)。  $m/z$  251.3  $[M+H]^+$ 。

化合物 **7d** (H-Tyr-(OBZI)-OtBu): 收率 80%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.71 (s, 2H), 7.49~7.35 (m, 5H), 6.84 (m, 2H), 6.03 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.14 (m, 1H), 3.34~3.25 (s, 2H), 1.46 (s, 9H)。  $m/z$  327.1  $[M+H]^+$ 。

**2.2.2 巯基二肽的合成** 0.11 mol Boc保护的丙氨酸、0.1 mol HBTU、0.3 mol DIEA溶解于干燥的DMF中, Ar<sub>2</sub>保护, 活化 15 min; 同时用干燥DMF溶解化合物 **7a**~**7d**, 加入到上述反应液中, 常温搅拌 12 h。薄层色谱监测反应进程, 待反应结束后, 80 °C蒸掉DMF溶剂, 残余物用醋酸乙酯复溶, 依次用 10%柠檬酸、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、饱和 NaCl 溶液洗涤。收集有机层并用无水硫酸镁干燥, 滤过, 滤液减压浓缩, 硅胶拌样, 醋酸乙酯-石油醚 (1:8→1:6→1:4) 经柱色谱分离纯化得到化合物 **8a**~**8d**。0.1 mol 化合物 **8a**~**8d** 溶解于无水甲苯中,

加入 0.11 mol 劳森试剂, Ar<sub>2</sub> 保护条件, 80 °C加热回流 4 h, 待反应结束后滤过, 除去析出的固体, 滤液减压浓缩, 硅胶拌样经柱色谱分离纯化得到化合物 **9a**~**9d**。向三口烧瓶中加入 0.1 mol 化合物 **9a**~**9d**, 并灌入液氨, 用干冰浴冷却, 在搅拌条件下加入 0.1~0.2 mol 金属钠块, 分多次加入, 大约 1.5 h 加完。薄层色谱监测反应直至苄基完全脱除, 得到化合物 **10a**~**10d**。合成路线见图 2。

化合物 **10a** (Boc-Ala $\psi$ [CS-NH]Asp-OtBu)。收率 79%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.99 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 5.76 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 5.46 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 5.06 (d,  $J=14.8$  Hz, 1H), 3.19 (d,  $J=18.0$  Hz, 1H), 2.96 (d,  $J=20.6$  Hz, 1H), 1.58~1.34 (m, 21H)。  $m/z$  399.0  $[M+Na]^+$ 。

化合物 **10b** (Boc-Ala $\psi$ [CS-NH]Glu-OtBu)。收率 75%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.57 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.60 (s, 2H), 2.46~2.16 (m, 2H), 2.08 (d,  $J=15.4$  Hz, 2H), 1.62~1.04 (m, 21H)。  $m/z$  389.3  $[M-H]^-$ 。

化合物 **10c** (Boc-Ala $\psi$ [CS-NH]Ser-OtBu)。收率 88%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.69 (s, 1H), 7.37~7.23 (m, 1H), 5.09~5.01 (m, 1H), 4.62~4.44 (m, 2H), 4.23~4.15 (m, 1H), 2.36~2.19 (m, 1H), 1.52~1.45 (m, 21H)。  $m/z$  347.3.3

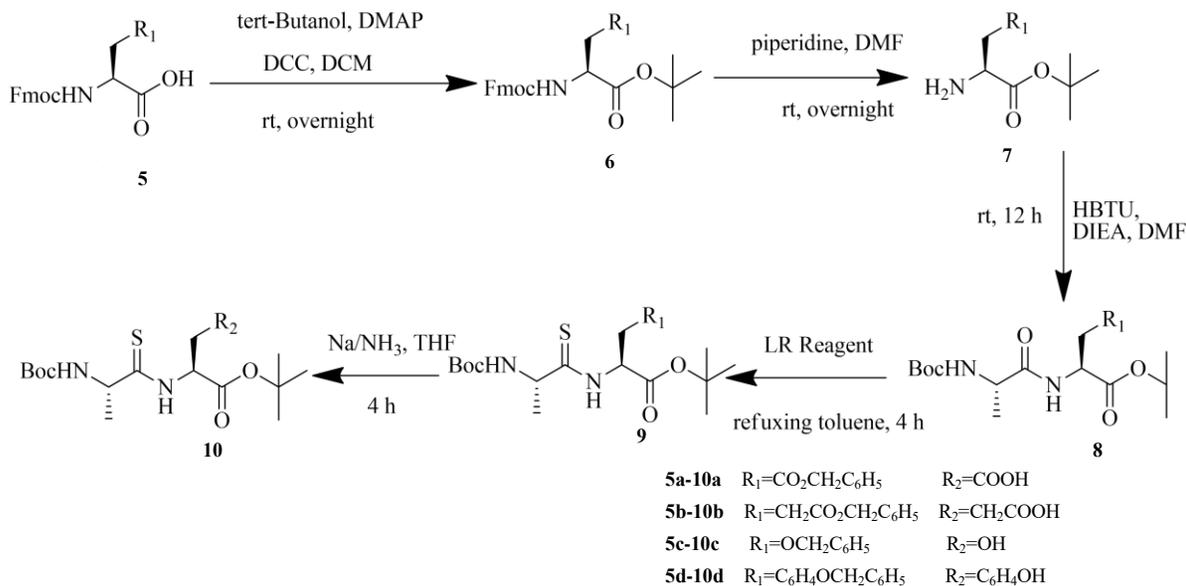


图 2 巯基二肽载体的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of mercapto dipeptide carrier

[M-H]<sup>-</sup>。

化合物 10d (Boc-Ala<sub>ψ</sub>[CS-NH]Tyr-OtBu)。收率 94%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.63 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.95 (t, *J*=27.3 Hz, 2H), 6.71 (d, *J*=58.3 Hz, 2H), 5.19 (s, 1H), 4.50 (s, 1H), 3.36 (dd, *J*=14.1, 6.1 Hz, 1H), 3.22~3.03 (m, 1H), 2.29 (s, 1H), 1.54~1.40 (m, 21H)。 *m/z* 423.4 [M-H]<sup>-</sup>。

### 2.3 目标化合物帕拉米韦巯基二肽前药的合成

0.1 mol 化合物 10a (10b)、0.5 mol 乙二醇、0.02 mol DMAP 溶解于干燥二氯甲烷溶液中, Ar<sub>2</sub> 保护, 在冰水浴条件下搅拌 10 min 之后加入 0.13 mol EDC·HCl, 继续搅拌 10 min, 常温搅拌 20 h。薄层色谱监测反应进程, 待反应结束后反应液依次用蒸馏水、饱和 NaCl 溶液洗涤, 收集有机层。用无水硫酸镁干燥有机层, 滤过, 滤液减压浓缩, 硅胶拌样, 醋酸乙酯-石油醚 (1:8→1:4→1:1) 经柱色谱分离纯化得到一系列化合物 11a (11b) (对于部分基团受保护的巯基二肽载体末端是羧基时, 需要进行该步骤)。0.15 mol 化合物 10c、10d 或化合物 11a、11b, 0.03 mol DMAP 溶解于干燥二氯甲烷溶液中, Ar<sub>2</sub> 保护, 搅拌 20 min, 加入 0.15 mol EDC·HCl, 常温搅拌过夜。薄层色谱监测反应进程, 反应结束后依次用蒸馏水、饱和 NaCl 溶液洗涤, 收集有机层。用无水硫酸镁干燥有机层, 滤过, 滤液减压浓缩, 硅胶拌样, 以醋酸乙酯-石油醚 (1:

5→1:1) 经柱色谱分离纯化得到化合物 12a~12d。将其溶解于 15% 三氟乙酸的二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 5 h, 质谱监测反应进程, 直至叔丁氧羰基与叔丁基完全脱除。反应液减压浓缩, 加入冷乙醚, 析出沉淀, 得到目标化合物帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯 (化合物 13a)、帕拉米韦的巯基丙氨酰谷氨酸酯 (化合物 13b)、帕拉米韦巯基丙氨酰丝氨酸酯 (化合物 13c)、帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯 (化合物 13d)。合成路线见图 3。

化合物 13a: 收率 82.76%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.25 (s, 3H), 7.80 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.32 (s, 2H), 6.90~6.83 (m, 2H), 5.20 (q, *J*=6.3 Hz, 1H), 4.39 (td, *J*=10.5, 2.5 Hz, 1H), 4.18 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 3.86 (qd, *J*=8.6, 6.2 Hz, 2H), 3.17 (s, 1H), 2.94~2.91 (m, 2H), 2.76 (ddd, *J*=9.0, 4.4, 1.5 Hz, 1H), 2.61 (dt, *J*=13.6, 8.9 Hz, 1H), 2.06 (td, *J*=9.9, 4.7 Hz, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.54 (dt, *J*=13.4, 5.2 Hz, 1H), 1.44 (ddq, *J*=14.9, 7.4, 4.4 Hz, 1H), 1.39 (d, *J*=6.7 Hz, 3H), 1.36~1.28 (m, 2H), 1.00 (ddt, *J*=16.0, 8.8, 4.6 Hz, 2H), 0.87 (dt, *J*=18.5, 7.3 Hz, 6H)。<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, DMSO) δ: 201.34, 174.09, 170.57, 170.05, 169.59, 156.38, 73.72, 63.00, 62.72, 54.80, 54.53, 53.49, 51.00, 49.63, 49.05, 48.72, 43.40, 34.90, 34.53, 23.10, 21.35, 20.60, 13.07, 12.35。 *m/z* 575.3 [M+H]<sup>+</sup>。

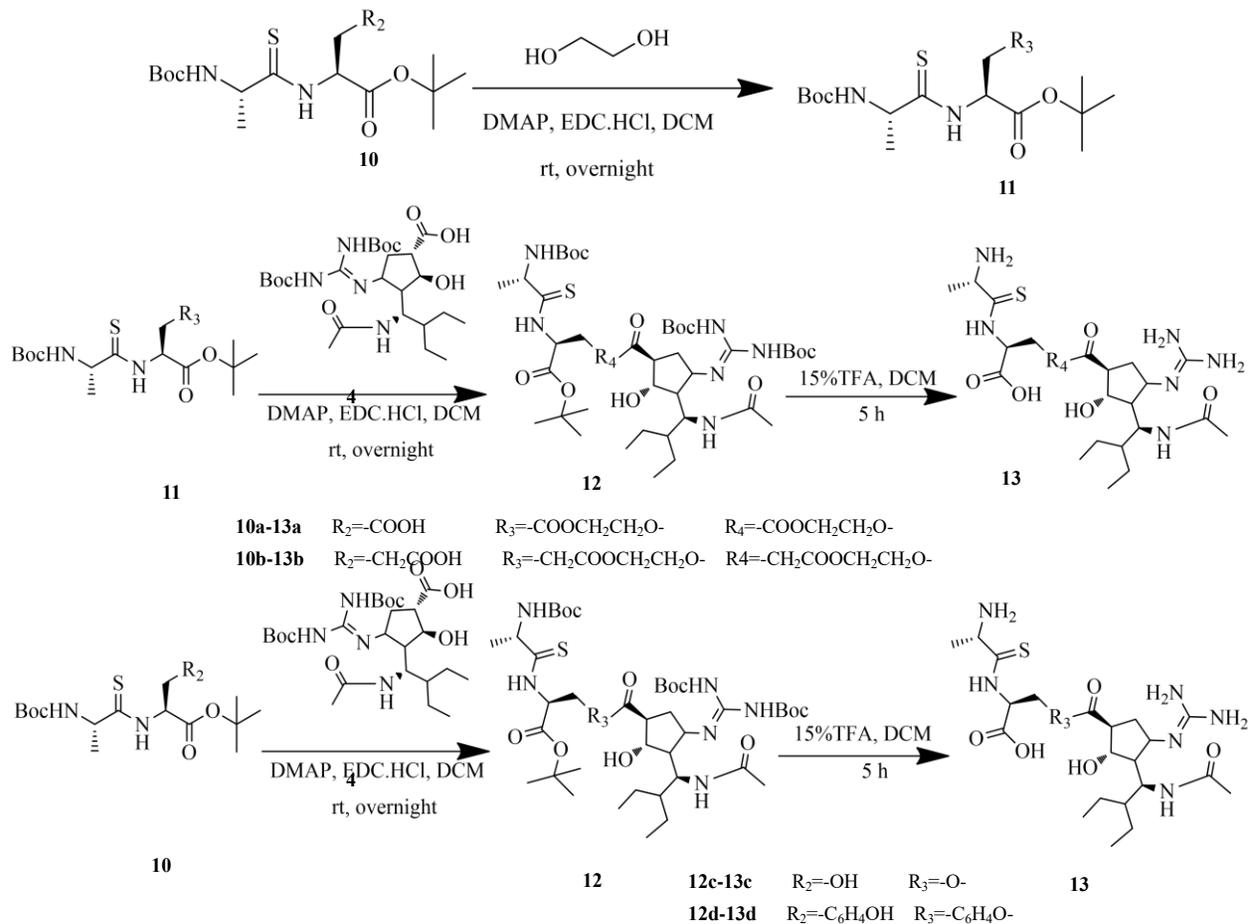


图3 帕拉米韦巯基二肽前药的合成路线

Fig. 3 Synthesis route of peramivir merapto dipeptide prodrug

化合物 **13b**: 收率 89.19%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.21 (d, *J*=5.4 Hz, 3H), 7.66 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.84 (d, *J*=10.4 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.87 (d, *J*=6.9 Hz, 1H), 4.39 (td, *J*=10.5, 2.4 Hz, 2H), 4.24 (p, *J*=8.4, 7.4 Hz, 5H), 4.18 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 3.86 (qd, *J*=8.6, 5.9 Hz, 2H), 2.77~2.74 (m, 1H), 2.62~2.55 (m, 2H), 2.46 (dt, *J*=6.8, 3.7 Hz, 2H), 2.18 (tt, *J*=13.7, 6.0 Hz, 2H), 2.03 (ddd, *J*=19.3, 14.2, 7.8 Hz, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.53 (dt, *J*=13.5, 5.1 Hz, 2H), 1.44 (dddd, *J*=14.3, 10.2, 7.1, 3.6 Hz, 2H), 1.38 (d, *J*=6.7 Hz, 3H), 1.28~1.15 (m, 4H), 1.05~0.97 (m, 3H), 0.87 (dt, *J*=20.2, 7.2 Hz, 8H)。<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, DMSO) δ: 174.12, 172.31, 171.78, 169.59, 56.29, 73.71, 63.47, 62.80, 62.54, 57.59, 54.75, 53.38, 50.81, 49.61, 48.61, 43.22, 34.31, 30.01, 26.04, 23.20, 23.17, 21.26, 20.48, 13.01, 12.36。 *m/z* 589.3

[M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **13c**: 收率 80.31%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 10.82 (s, 1H), 8.25 (s, 2H), 8.06 (d, *J*=7.4 Hz, 1H), 7.44~7.40 (m, 1H), 7.33 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.94 (d, *J*=10.4 Hz, 1H), 5.10~5.03 (m, 1H), 4.44 (td, *J*=10.5, 2.5 Hz, 1H), 4.38~4.34 (m, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.07~3.99 (m, 2H), 3.94~3.89 (m, 1H), 3.24 (dd, *J*=14.4, 4.7 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J*=14.3, 8.9 Hz, 1H), 3.02 (ddd, *J*=9.1, 4.5, 1.5 Hz, 1H), 2.73 (dt, *J*=13.6, 8.8 Hz, 1H), 2.14 (td, *J*=9.8, 4.6 Hz, 1H), 1.99 (s, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.70 (dt, *J*=13.5, 5.1 Hz, 1H), 1.48 (dtd, *J*=13.8, 7.5, 2.9 Hz, 1H), 1.38 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 1.32 (dtd, *J*=14.0, 7.2, 4.1 Hz, 1H), 1.17 (t, *J*=7.1 Hz, 2H), 1.07~0.97 (m, 2H), 0.88 (dt, *J*=11.9, 7.3 Hz, 6H)。<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, DMSO) δ: 202.01, 174.00, 169.60,

169.06, 156.35, 73.18, 63.05, 57.43, 54.77, 53.53, 50.59, 49.62, 48.64, 43.31, 34.89, 23.13, 21.35, 20.64, 14.54, 13.04, 12.31。  $m/z$  503.2  $[M+H]^+$ 。

化合物 **13d**: 收率 80.80%。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.90 (s, 1H), 8.27 (d,  $J=5.1$  Hz, 3H), 7.71 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.85 (d,  $J=10.4$  Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.21 (td,  $J=6.2, 4.0$  Hz, 1H), 4.49~4.37 (m, 4H), 4.31~4.27 (m, 1H), 4.21 (dd,  $J=4.7, 1.6$  Hz, 1H), 3.88~3.83 (m, 4H), 2.73 (ddd,  $J=9.2, 5.0, 1.5$  Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J=8.9, 4.7$  Hz, 1H), 2.09 (td,  $J=9.9, 4.8$  Hz, 1H), 1.99 (s, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.49~1.44 (m, 2H), 1.40 (d,  $J=6.7$  Hz, 3H), 1.34 (dddd,  $J=23.9, 10.3, 6.4, 3.4$  Hz, 3H), 1.24 (s, 1H), 1.00 (dddd,  $J=20.7, 13.9, 9.3, 7.2$  Hz, 3H), 0.88 (dt,  $J=27.3, 7.3$  Hz, 7H)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 201.69, 172.96, 171.23, 170.80, 169.59, 156.54, 149.68, 135.09, 130.59, 121.96, 73.76, 60.21, 59.86, 54.73, 53.46, 51.11, 49.65, 48.75, 43.43, 35.50, 34.48, 23.02, 21.18, 20.68, 14.51, 13.08, 12.34。  $m/z$  579.4  $[M+H]^+$ 。

## 2.4 帕拉米韦巯基二肽前药稳定性研究

**2.4.1 色谱条件** Agilent  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 体积流量 1 mL/min, 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 甲醇-0.1% TFA 水 (45:55) 作流动相, 检测波长 267 nm (帕拉米韦巯基二肽前药); 甲醇-0.1% TFA 水 (40:60) 作流动相, 检测波长 220 nm ( $L$ -缬氨酸帕拉米韦)。

**2.4.2 专属性试验** 称取帕拉米韦巯基二肽前药和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦适量, 用纯水溶解, 分别在不同介质条件下孵育, 进样分析, 记录色谱图。结果在不同介质条件下杂质均不干扰前药的测定。

**2.4.3 线性关系考察** 称取帕拉米韦巯基二肽前药和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦 50 mg, 用纯水溶解, 定容至 10 mL, 得 5 mg/mL 的储备液。分别精密吸取储备液 0.1、0.4、0.8、1.0、2.0、4.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用纯水加至刻度, 得到系列质量浓度的前药溶液。进样测定峰面积值, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 制备标准曲线, 得回归方程。帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯回归方程为:  $Y=4.332\times 10^6 X+3.909\times 10^4$ ,  $r=0.9935$ ; 帕拉米韦巯基丙氨酰谷氨酸酯回归方程为:  $Y=3.81\times 10^6 X+4.071\times 10^4$ ,  $r=0.9908$ ; 帕拉米韦巯基丙氨酰丝

氨酸酯回归方程为:  $Y=4.396\times 10^6 X+4.238\times 10^4$ ,  $r=0.9913$ ; 帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯回归方程为:  $Y=4.019\times 10^6 X+2.996\times 10^4$ ,  $r=0.9960$ ;  $L$ -缬氨酸帕拉米韦回归方程为:  $Y=2.935\times 10^6 X+3.764\times 10^4$ ,  $r=0.9992$ 。结果表明前药在 0.05~2 mg/mL 线性关系良好。

**2.4.4 精密度试验** 精密吸取帕拉米韦巯基二肽前药和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦储备液 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 记录帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰谷氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰丝氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦色谱图峰面积并计算 RSD 值。结果显示 RSD 值分别为 0.28%、0.69%、0.44%、0.71%、0.35%。

**2.4.5 重复性试验** 称取同一批帕拉米韦巯基二肽前药和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦 6 份, 制备 5 mg/mL 的溶液, 进样分析, 记录帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰谷氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰丝氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦的色谱峰面积并计算 RSD 值, 结果显示 RSD 值分别为 0.41%、0.80%、0.59%、0.83%、0.52%。

**2.4.6 提取回收率试验** 制备 0.05、0.5、2 mg/mL 帕拉米韦巯基二肽前药和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦质控样品。吸取上述质控样品 100  $\mu\text{L}$ , 置于 1.5 mL EP 管中, 加入 50  $\mu\text{L}$  空白血浆、150  $\mu\text{L}$  乙腈溶液, 涡旋 5 min, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 滤过, 每一个样品进行 3 个样本分析, 记录峰面积, 同时吸取上述样品 100  $\mu\text{L}$ , 加入 50  $\mu\text{L}$  水、150  $\mu\text{L}$  乙腈作为标准溶液进行分析。以同一个质量浓度下两种样品处理方法下的峰面积之比计算提取回收率, 结果帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰谷氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰丝氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦的平均回收率分别为 93.5%、92.7%、103.1%、93.1%、101.6%, RSD 值分别为 4.3%、3.2%、1.0%、3.4%、3.8%。

**2.4.7 测定方法** 精密称取帕拉米韦巯基二肽前药和  $L$ -缬氨酸帕拉米韦适量, 用纯水溶解, 制得 5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。另取不同孵育介质中不同时间点的样品作为待测溶液。分别精密吸取对照品溶液和待测溶液各 10  $\mu\text{L}$  分析, 记录色谱图峰面积。利用 HPLC 中同一个物质的峰面积和浓度呈正比, 计算对应时间点的药物浓度。

**2.4.8 前药的化学稳定性** 按照《中国药典》2015年版<sup>[8]</sup>配制 pH 1.2 盐酸溶液, pH 4.5、6.8、7.4 磷酸盐缓冲溶液。精密称取化合物适量, 用去离子水溶解得 2.0 mg/mL 的储备液。精密吸取储备液 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 分别用 pH 1.2 盐酸溶液和不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液稀释至刻度, 使最终质量浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$ 。采用经典恒温法于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育, 定时取样, HPLC 法进样分析。以药物质量浓度的自然对数对时间作图, 利用一级动力学模型计算降解速率常数<sup>[9]</sup>。

**2.4.9 前药在人工胃液(含胃蛋白酶)和人工肠液(含胰酶)中的稳定性** 按照《中国药典》2015年版<sup>[8]</sup>取稀盐酸 1.64 mL, 胃蛋白酶 1 g, 加水稀释至 100 mL, 即得人工胃液(含胃蛋白酶)。按照《中国药典》2015年版<sup>[8]</sup>称取 1.36 g 磷酸二氢钾, 加水 100 mL 使其溶解, 并用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 6.8; 另外称取胰蛋白酶 2 g, 加水溶解, 将两液混合, 加水至 200 mL, 即得人工肠液(含胰酶)。精密称取化合物 10 mg, 2 份, 置于 10 mL 量瓶中, 得 1 mg/mL 储备液。吸取 5 mL 储备液分别加入 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的人工胃液和人工肠液, 使最终质量浓度为 0.25 mg/mL。在人工胃液中 0.5、1.25、2、4、6、9 h 取样, 人工肠液中 1、2、4、6、8、12、24 h 取样, HPLC 法进样分析。利用一级动力学模型计算降解速率常数<sup>[9]</sup>。

**2.4.10 前药在大鼠胃液和小肠液中的稳定性** 取禁食过夜、自由饮水的 SD 大鼠断颈椎处死, 沿腹中线剪开, 分别用适量冰冷的 pH 1.2 盐酸溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液冲洗胃和小肠, 收集内容物。将胃内容物、小肠内容物在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 即得大鼠胃液、小肠液<sup>[10]</sup>。

通过紫外分光光度法测定蛋白质浓度。精密称取牛血清白蛋白适量, 用生理盐水溶解, 得质量浓度为 0.1 mg/mL 储备液。精密吸取储备液适量, 配制 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL 牛血清白蛋白溶液。在紫外分光光度计上将待测蛋白质溶液加入比色皿中, 以生理盐水为对照, 测定 280 nm 波长处吸光度值, 利用一定波长下蛋白质溶液的吸光度与蛋白质浓度呈正比关系进行蛋白质含量的测定, 制备一条标准曲线<sup>[11]</sup>。

采用上述蛋白质浓度测定方法测定所取上清液中蛋白溶液的吸光度, 利用标准曲线计算浓度, 并分别用相应的缓冲溶液调节蛋白质浓度至同一

水平。精密称取化合物 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 得 1 mg/mL 储备液。吸取 0.5 mL 储备液, 分别加入 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的大鼠胃液、小肠液中, 使得药物和蛋白浓度均为 50  $\mu\text{g/mL}$ 。在 0.5、1.25、2、4、6、9 h 取样 50  $\mu\text{L}$ , 加入 150  $\mu\text{L}$  冷乙腈, 涡旋 2 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液过滤进样分析, 计算降解速率常数。

**2.4.11 前药在大鼠血浆中的稳定性** 取 SD 大鼠空白血浆 2.5 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$  预热后加入 300  $\mu\text{g/mL}$  化合物溶液 500  $\mu\text{L}$ , 在 0、0.5、1、2 h 取样 50  $\mu\text{L}$ , 加入 150  $\mu\text{L}$  冰冷的乙腈, 涡旋 2 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液过滤进样分析, 计算降解速率常数。

通过一级动力学模型计算降解速率常数, 研究前药、*L*-缬氨酸帕拉米韦化学稳定性以及模拟胃液、小肠液中的稳定性<sup>[12]</sup>, 结果见表 1。由表 1 可知, 前药在 pH 1.2 盐酸溶液和系列 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中半衰期远大于 *L*-缬氨酸帕拉米韦, 说明其化学稳定性优于 *L*-缬氨酸帕拉米韦; 相同 pH 值条件下, 帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰谷氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯在人工胃液和人工肠液中半衰期分别明显低于在 pH 1.2 盐酸溶液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液, 因此推测胃肠道中的酶会对巯基二肽前药有进一步的降解作用, 而酶对帕拉米韦巯基丙氨酰丝氨酸酯的稳定性影响很小。前药在大鼠胃液和小肠液中稳定性研究发现, 帕拉米韦巯基丙氨酰丝氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰酪氨酸酯在大鼠胃液中降解速率慢于在小肠液中。帕拉米韦巯基丙氨酰门冬氨酸酯、帕拉米韦巯基丙氨酰谷氨酸酯在大鼠胃液中降解过快, 降解速率大于在大鼠小肠液中, 这种差异可能与前药的不同结构有关系。

### 3 讨论

帕拉米韦巯基二肽前药是将帕拉米韦的 1 位羧基与巯基二肽的羟基通过酯键相连接得到的前体药物。巯基二肽特征在于与丙氨酸通过肽键相连的另外一个氨基酸必须含有 1 个羧基和 1 个羟基或羧基, 这就限制了巯基二肽载体的个数, 对氨基酸结构进行筛选之后, 门冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸满足以上条件。但是在合成实验阶段发现巯基丙氨酰苏氨酸载体在脱除苄基的同时叔丁基也会被脱掉, 可能是氨基酸结构的问题, 故后期选择其他 4 个氨基酸进行巯基二肽载体的合成。

表 1 帕拉米韦巯基二肽前药在不同介质中的稳定性

Table 1 Stability of Peramivir mercapto dipeptide prodrug in different medium

介质	pH 值	$t_{1/2}/h$				
		帕拉米韦巯基丙 氨酰门冬氨酸酯	帕拉米韦巯基丙 氨酰谷氨酸酯	帕拉米韦巯基丙 氨酰丝氨酸酯	帕拉米韦巯基丙氨 酰酪氨酸酯	L-缬氨酸帕 拉米韦
盐酸溶液	1.2	192.5	223.5	866.2	288.7	36.6
	4.5	364.7	693.0	301.3	187.2	29.7
磷酸盐缓冲液	6.8	288.7	577.5	61.8	33.6	17.3
	7.4	144.3	198.0	32.8	17.4	12.3
人工胃液(含胃蛋白酶)	1.3	135.8	36.0	46.8	22.3	< 0.5
人工肠液(含胰酶)	6.8	216.5	165.0	84.5	4.0	13.0
大鼠胃液	1.3	25.4	47.4	59.7	182.3	< 0.5
大鼠小肠液	6.8	115.5	144.3	48.1	18.0	3.7
大鼠血浆		18.0	2.8	32.2	4.3	1.1

本实验在研究帕拉米韦巯基二肽前药稳定性时,发现在相同 pH 值条件下,帕拉米韦巯基二肽前药在有酶参与的环境中,半衰期明显降低,说明胃肠道内酯酶对该类前药的水解起作用,但半衰期变化远小于帕拉米韦氨基酸酯类前药 L-缬氨酸帕拉米韦;同时在不同介质中,帕拉米韦巯基二肽前药的半衰期均大于 L-缬氨酸帕拉米韦,表明以巯基二肽为载体修饰得到的帕拉米韦前药能够明显提高药物在胃肠道中的稳定性。实验结果为开展体内药动学评价提供了指导。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Bantia S, Arnold C S, Parker C D, *et al.* Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection [J]. *Antivir Res*, 2006, 69(1): 39-45.
- [2] Barroso L, Treanor J, Gubareva L, *et al.* Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment [J]. *Antivir Ther*, 2005, 10(8): 901-910.
- [3] Sun Y, Gan W, Lei M, *et al.* PEPT1-mediated prodrug strategy for oral delivery of peramivir [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2018, 13(6): 555-565.

- [4] Arakawa H, Saito S, Kanagawa M, *et al.* Evaluation of a thiodipeptide, L-phenylalanyl-Ψ[CS-N]-L-alanine, as a novel probe for peptide transporter 1 [J]. *Drug Metab Pharmacokin*, 2014, 29(6): 470-474.
- [5] Foley D, Pieri M, Pettecrew R, *et al.* The in vitro transport of model thiodipeptide prodrugs designed to target the intestinal oligopeptide transporter, PepT1 [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(18): 3652-3556.
- [6] Foley D W, Pathak R B, Phillips T R, *et al.* Thiodipeptides targeting the intestinal oligopeptide transporter as a general approach to improving oral drug delivery [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 156: 180-189.
- [7] Wozniak K M, Vornov J J, Mistry B M, *et al.* Gastrointestinal delivery of propofol from fospropofol: its bioavailability and activity in rodents and human volunteers [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 170.
- [8] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 325-326.
- [9] 侯新朴. 物理化学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 126-131.
- [10] 宫灿仪, 萧伟, 王振中, 等. 木通皂苷 D 在大鼠胃肠道内容物中的稳定性考察 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(12): 2311-2313.
- [11] 郭颖娜, 孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较 [J]. *煤炭与化工*, 2008, 31(4): 36-37.
- [12] 刘川, 赵颖颖, 尹秋响, 等. 头孢呋辛钠在水溶液中的降解动力学 [J]. *化学工业与工程*, 2013, 30(1): 8-13.

[责任编辑 解学星]