

# 新型 1,2-二取代肼的 FAP $\alpha$ 酶靶向前药设计及 赋予的抗癌作用特征\*

张超<sup>1</sup>, 刘璐洁<sup>1</sup>, 王婵茜<sup>1</sup>, 朱文达<sup>1</sup>, 何业谱<sup>1</sup>, 刘志军<sup>1,2</sup>, 陈河如<sup>1,3,4</sup>

1. 中药及天然药物研究所 / 中药现代化与创新药物研究国际合作联合实验室 / 暨南大学药学院, 广东广州 510632
2. 广州药本君安医药科技股份有限公司, 广东广州 510663
3. 暨南大学广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室, 广东广州 510632
4. 暨南大学生物活性分子与成药性优化全国重点实验室, 广东广州 510632

**摘要:** 为探讨 1,2-二取代肼的 FAP $\alpha$  酶靶向前药及抗癌特征, 通过在 1,2-二取代肼的肼基上键合苄氧羰基甘氨酸脯氨酸基(Z-GP-), 合成了 2 个新型 1,2-二取代肼的 FAP $\alpha$  酶靶向前药化合物, 分别为 2-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸基-2-(4-甲氧基)苯基-1-(4-(N-异丙基)氨基)苄肼(**Z-GP-5a**)和 2-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸基-2-(6-甲氧基-2-)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基)苄肼(**Z-GP-5b**)。建立体外 FAP $\alpha$  酶切模型, 验证 Z-GP-被酶切的可能性。利用 NIH-3T3 及非原代肿瘤细胞株 C6、K1735、HepG-2、MDA-MB-231、B16 验证其减毒特性。体外酶解实验证实, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 能被 FAP $\alpha$  酶解, 释放出 2-(4-甲氧基)苯基-1-(4-(N-异丙基)氨基)苄肼(**5a**)和 2-(6-甲氧基-2-)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基)苄肼(**5b**), 具有 FAP $\alpha$  酶靶向性; 同时, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 对小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3 的细胞毒性相比于 **5a** 和 **5b** 有所降低, 初步验证其减毒效果。噻唑蓝法(MTT)检测发现, 在孵育时间为 48 h 的情况下, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 对 C6、K1735、HepG-2、MDA-MB-231、B16 五株常见非原代肿瘤细胞株均表现出比相应母药 **5a** 和 **5b** 低的细胞增殖抑制活性。与 **5a** 相比, **Z-GP-5a** 对 C6、K1735 和 B16 细胞株的增殖抑制活性有所降低, 其抑制活性分别降低 1.23、2.06 和 2.38 倍; 对于 HepG-2 和 MDA-MB-231 细胞株而言, 其增殖抑制活性分别降低 9.95 和 15.0 倍。另外, 与 **5b** 相比, **Z-GP-5b** 对 C6、MDA-MB-231 和 B16 细胞株的增殖抑制活性分别降低了 6.50、6.14 和 13.0 倍。缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 分别为 **5a** 和 **5b** 的 FAP $\alpha$  酶靶向前药化合物, 在细胞水平上达到一定的减毒增效效果。

**关键词:** FAP $\alpha$  酶靶向前药; 1,2-二取代肼; 抗肿瘤; 烷化剂; 药物设计合成

**中图分类号:** R961 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2025)04-0069-10

## FAP $\alpha$ targeting prodrug design of novel 1,2-disubstituted hydrazines and the endowed anti-cancer characteristic

ZHANG Chao<sup>1</sup>, LIU Lujie<sup>1</sup>, WANG Chanxi<sup>1</sup>, ZHU Wenda<sup>1</sup>, HE Yepu<sup>1</sup>, LIU Zhijun<sup>1,2</sup>, CHEN Heru<sup>1,3,4</sup>

1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products / International Cooperative Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization and Innovative Drug Development / College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China
2. Guangzhou PharmCherub Biological Technique Company Limited, Guangzhou 510663, China
3. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs

\* 收稿日期: 2025-01-13 录用日期: 2025-02-24 网络首发日期: 2025-03-24

基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515011238; 2020A1515010857)

作者简介: 张超(2000年生), 男; 研究方向: 药物化学; E-mail: zc42311@stu2022.jnu.edu.cn

通信作者: 陈河如(1967年生), 男; 研究方向: 药物化学; E-mail: thrchen@jnu.edu.cn

全文阅读



ZR20250012

Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China

4. State Key Laboratory of Bioactive Molecules and Druggability Assessment, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract:** The aim of this study is to investigate the FAP $\alpha$  targeting prodrugs and anti-cancer characteristic of 1,2-disubstituted hydrazines. By bonding carbobenzoxy glycylopropyl (Z-GP-) on the diaziny of 1,2-disubstituted hydrazines, two FAP $\alpha$  targeting prodrugs of novel 1,2-disubstituted hydrazines, including 2-carbobenzoxy glycylopropyl-2-(4-methoxy) phenyl-1-(4-(N-isopropyl) aminoformyl) benzyl hydrazine (**Z-GP-5a**) and 2-carbobenzoxy glycylopropyl-2-(6-methoxy-2-yl) naphth-1-(4-(N-isopropyl) aminoformyl) benzyl hydrazine (**Z-GP-5b**) have been designed and synthesized. *In vitro* enzymatic hydrolysis model was set up to verify the cleavage possibility of Z-GP group. Mouse embryonic cells (NIH-3T3) and five common non-primary tumor cell lines including rat glioma cells (C6), mouse melanoma cells (K1735), human liver cancer cells (HepG-2), human breast cancer cells (MDA-MB-231), and murine melanoma cells (B16) were applied to confirm the toxicity-attenuation of both prodrugs. *In vitro* enzymatic hydrolysis experiments showed that **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b** can be cleaved by recombinant human resource FAP $\alpha$  enzyme, releasing 2-(4-methoxy) phenyl-1-(4-(N-isopropyl) aminoformyl) benzyl hydrazine (**5a**) and 2-(6-methoxy-2-yl) naphth-1-(4-(N-isopropyl) aminoformyl) benzyl hydrazine (**5b**), respectively. This evidence preliminarily indicates the FAP $\alpha$  enzyme targeting characteristic of **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b**. The cytotoxicity of **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b** to NIH-3T3 showed less than that of **5a** and **5b**, respectively, implying the toxicity-attenuation of both prodrugs. By employing MTT assay, under the condition of 48-hour incubation, **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b** were shown with less anti-cancer activity against five common non-primary tumor cell lines, which are C6, K1735, HepG-2, MDA-MB-231, and B16 than their respective parent compounds **5a** and **5b**. The anti-growth inhibition activity of **Z-GP-5a** to C6, K1735, and B16 was 1.23-, 2.06-, and 2.38-fold less than that of **5a**, respectively; while to HepG-2 and MDA-MB-231, it was 9.95-, and 15.0-fold decrease, respectively. On the other hand, the anti-growth inhibition activity of **Z-GP-5b** to C6, MDA-MB-231, and B16 was 6.50-, 6.14-, and 13.0-fold less than that of **5b**, respectively. All data support that **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b** are the FAP $\alpha$  targeting prodrugs of their respective parent compounds **5a** and **5b**. It is expected to achieve the effect of reducing toxicity and increasing efficiency clinically.

**Key words:** FAP $\alpha$  targeting prodrug; 1,2-disubstituted hydrazines; anti-cancer; alkylation; drug design-synthesis

丙卡巴肼(procarbazine, Pcb, **1**, 图1)是一种烷基化抗癌药物,临床上广泛应用于治疗霍奇金病(Spivack, 1974),还作为联合化疗的成分之一用于治疗黑色素瘤、支气管癌和中枢神经系统(CNS)恶性肿瘤(Edwards et al., 1980; Fesler et al., 2010)。Swaffar et al.(1989)指出, Pcb抗肿瘤作用机制如图1所示。该过程起始于药物在细胞色素P-450及单胺氧化酶(MAO)催化下发生脱氢氧化反应,转化为偶氮化合物 azoprocabazine (**2**) (Dunn et al., 1979)。随后,化合物**2**经P-450介导的氧化反应生成氧化偶氮类代谢产物**3a**和**3b**(Prough et al., 1984)。在胞质酶作用下,**3a**与**3b**分别转化为重氮苄基烷化剂(**4a**)和重氮甲基烷化

剂(**4b**)。该转化途径与Fiala团队(1975)关于1,2-二甲基胍体内抗癌机制的研究结论具有相似性,均涉及氧化偶氮2-氮位上 $\alpha$ -碳烷基化及后续脱氢生成相应醛类与重氮烷基的过程。值得注意的是,通过实体合成获得的**3a**和**3b**代谢物中,实验数据显示,无论在离体还是活体条件下,**3b**均展现出显著优于**3a**的抗肿瘤活性(Swaffar et al., 1989),这证实丙卡巴肼的主要抗癌效能来源于**3b**代谢生成的重氮甲基烷化剂。这个过程最关键的步骤是Pcb的脱氢氧化,如果该步骤被阻断,则Pcb不能形成后续的烷基化试剂,因而可能丧失其抗癌活性。

临床实践发现, Pcb在联合化疗中存在非常常见的不良反应,包括食欲不振、恶心和呕吐,尤其

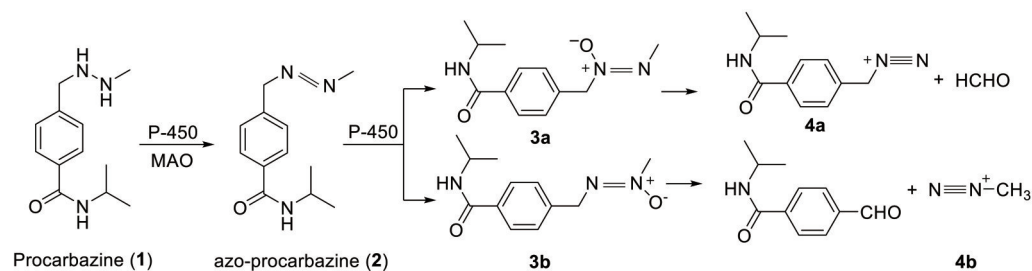


图1 烷化剂丙卡巴肼的化学结构及抗癌作用

Fig. 1 Structure of the alkylation agent Procarbazine and its anti-tumor mechanism

是对生殖系统的影响, 如精子数量减少和卵巢衰竭等(Parvinen, 1979; Chapman, 1982)。Pcb存在致癌性(Sieber et al., 1978)及对心血管的毒害作用(Herman et al., 1972), 对于存在肝转移的患者群体, 该药物仍存在中枢神经系统毒性风险(Chabner et al., 1973)。因此, 如何降低Pcb在癌症治疗过程中的毒性, 增加抗癌效果, 是本研究关注的科学问题。

前期工作中, 基于对重氮甲烷烷化剂所带来毒副作用的担忧(Chen et al., 2011), 本课题组设计合成系列1-芳甲基-2-芳基胍类和1,2-二芳甲基胍类化合物, 相较于Pcb, 2-(4-甲氧基苯基)-1-(4-(N-异丙基)氨基酰基)苄胍(**5a**)和2-(6-甲氧基萘基)-1-(4-(N-异丙基)氨基酰基)苄胍(**5b**)显示出更为优良的广谱抗肿瘤活性以及更合理的治疗指数(Hu et al., 2024)。本研究中, 我们进一步设想, 通过将成纤维细胞激活蛋白(FAP)响应性基因Z-GP(苄氧羰基甘氨酸脯氨酰基)(Aertgeerts et al., 2005)引入化合物**5a**和**5b**的胍基进行结构修饰, 形成缀合物Z-GP-**5a**和Z-GP-**5b**, 则由于正常细胞中FAP $\alpha$ 的表达水平很低甚至不表达(Ariga et al., 2001; Chen et al., 2003), 在正常组织或细胞环境中, Z-GP不被切开, 它将阻断**5a**和**5b**的脱氢氧化过程, 从而阻断其进一步形成烷化剂的途径; 相反, 由于FAP $\alpha$ 是大多数人类上皮肿瘤中反应性基质成纤维细胞独特表达的肿瘤相关抗原(Chen et al., 2003), 在肿瘤微环境中, FAP $\alpha$ 高表达, Z-GP-**5a**和Z-GP-**5b**将被切去Z-GP, 进而按图1的流程形成烷化剂, 产生抗癌作用。显然, Z-GP的引入将有可能赋予缀合物Z-GP-**5a**和Z-GP-**5b**独特的肿瘤靶向性, 达致减毒增效的目的。

本研究中, 将报道Z-GP-**5a**和Z-GP-**5b**的设计合成, 其FAP $\alpha$ 靶向性、减毒及抗肿瘤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株 C6大鼠神经胶质瘤细胞株、HepG-2

人肝癌细胞系、K1735与B16两种小鼠黑色素瘤细胞株、MDA-MB-231人乳腺癌细胞系以及NCI-3T3小鼠胚胎成纤维细胞, 上述细胞均从中国科学院上海细胞生物学资源中心(SCCB, CAS)购买。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

N-苄氧羰基甘氨酸、L-脯氨酸甲酯、HATU和HOAT购自吉尔生化(上海)有限公司; 对甲基苯甲酸(p-toluic acid)、二氯亚砷(SOCl<sub>2</sub>)、异丙胺(isopropylamine)、N-溴代丁二酰亚胺(NBS)、叔丁氧羰基胍(BocNHNH<sub>2</sub>)、碘化亚铜(CuI)、碳酸铯(Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)等基础合成原料, 以及4-甲氧基碘苯(4-methoxyiodobenzene)、6-甲氧基碘萘(6-methoxyiodonaphthalene)等芳基化试剂, 均通过上海阿拉丁生化科技股份有限公司(Aladdin)渠道采购。

培养基DMEM、培养基RPMI-1640、PBS磷酸缓冲液、FBS胎牛血清、双抗(青霉素-链霉素)及胰蛋白酶采购于美资Gibco公司; MTT(四甲基偶氮唑盐)来源于美国Millipore公司; 重组人源FAP $\alpha$ 酶(rhFAP $\alpha$ )购自美国RD公司。

DCM(二氯甲烷)经无水硫酸钠干燥处理, 搅拌过夜后静置, 取上清液, 添加适量氯化钙加热回流3~4 h, 蒸馏收集39~41 °C馏分备用; 二甲基亚砷(DMSO)、乙腈(ACN)、甲醇(MeOH)依次经无水硫酸钠干燥处理, 搅拌过夜后静置, 取上层澄清液与二氯化钙(CaH<sub>2</sub>)一起加热回流3~4 h, 蒸馏备用。

FA2104电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); CLJBQ-3磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); EYELA旋转蒸发器(东京理化器械独资工厂); DHG-9140A干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); DZF-150真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司); KQ3200E超声仪(昆山市超声仪器有限公司); TU-1810S紫外分光仪(北京普析通仪器有限公司); LGJ-12冻干机(巩义市英峪予华仪器有限公司); Bruker AV-400核磁共振仪(瑞士布鲁克); LC-UV100液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司); Cosmosil 5C18-MS-II反相色谱柱(日本

Nacalai Tesque 公司)。

CO<sub>2</sub>培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); 生物安全柜(新加坡 Esco 公司); Eppendorf 移液枪(德国 Eppendorf 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); 高压灭菌锅(日本 Hirrayama 公司); 多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司); 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司)。

## 1.2 目标化合物的合成

**1.2.1 苄氧羰基甘氨酸脯氨酸甲酯(Z-GP-OMe)的合成** 将苄氧羰基甘氨酸(390.0 mg, 2.0 mmol)置于 100 mL 圆底烧瓶中, 注入 10 mL 乙腈, 搅拌溶解, 随后加入脯氨酸甲酯 286.0 mg(2.2 mmol), N-甲基咪唑 492.0 mg(6.0 mmol), 搅拌均匀后, 迅速加入 TCFH 616.0 mg(2.2 mmol), 室温反应 2 h。反应体系终止后, 注入饱和氯化铵溶液进行淬灭, 以二氯甲烷为溶剂进行 3 次分步萃取(3×10 mL), 合并有机相, 减压去除溶剂。硅胶柱层析(二氯甲烷:甲醇 = 60:1, 体积比)分离纯化, 得白色黏稠油状液体 580.0 mg, 收率 94.7%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38~7.31 (m, 5H), 5.73 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.53 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 4.10~3.98 (m, 2H), 3.79~3.75 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.66~3.46 (m, 2H), 2.23~1.94 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.3, 167.0, 156.3, 136.5, 128.5, 128.1, 128.0, 127.9, 66.9, 58.9, 52.4, 45.9, 43.4, 29.0, 24.6。以上数据与 Lai et al.(2005)同。

**1.2.2 苄氧羰基甘氨酸脯氨酸(Z-GP-OH)的合成** 称取 640.0 mg(2.0 mmol)的 Z-GP-OMe 于 100 mL 的圆底烧瓶中, 加入 6 mL 的 1,4-二氧六环使其溶解, 采用逐滴加入方式向反应体系添加 10 mL 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液, 于室温环境持续搅拌进行 21 h 反应。终止反应后经减压浓缩去除溶剂, 复溶处理时加入 10 mL 去离子水, 随后缓慢加入 6 mol/L 盐酸溶液将体系 pH 值调至 3.0, 此时出现白色絮状沉淀, 经真空抽滤装置收集固形物并干燥处理, 最终获得 570.2 mg 白色结晶产物, 收率 93.2%。熔点 156~157 °C, Muftakhov et al.(2024)熔点为 155~157 °C。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.36 (q, *J* = 3.2 Hz, 5H), 5.05 (s, 2H), 4.25 (dd, *J* = 8.7, 3.2 Hz, 1H), 3.94~3.75 (m, 2H), 3.58~3.48 (m, 2H), 3.40 (dd, *J* = 8.4, 5.5 Hz, 1H), 2.16~1.79 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.8, 167.6, 156.9, 137.6, 128.8, 128.2, 128.1, 65.8, 59.1, 45.9, 43.1, 29.1, 24.8。数据与 Muftakhov et al.(2024)同。

**1.2.3 2-(4-甲氧基)苄基-1-(4-(N-异丙基)氨基羰基)苄胍(5a)的合成** 根据 Hu et al.(2024)方法, 经 6 步合成, 纯度 96.6%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H), 4.10 (dd, *J* = 13.2, 6.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164.9, 155.6, 136.2, 135.3, 133.4, 130.5 (2), 127.1 (2), 120.2 (2), 114.3 (2), 55.4, 50.7, 41.1, 22.4 (2); TOF-MS (*m/z*): calcd for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 314.186 9, found 314.187 3。结构数据与 Hu et al.(2024)同。

**1.2.4 2-(6-甲氧基-2-基)苄基-1-(4-(N-异丙基)氨基羰基)苄胍(5b)的合成** 根据 Hu et al.(2024)方法, 经 6 个反应步骤合成, 纯度 96.1%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.26 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.15 Hz, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.37~7.24 (m, 2H), 7.16 (dd, *J* = 8.94, 2.3 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.18~4.03 (m, 1H), 3.85 (d, *J* = 7.01 Hz, 3H), 1.18 (d, *J* = 6.69 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 165.3, 156.8, 140.7, 139.4, 132.5, 129.9, 129.6, 128.9(2), 128.5(2), 127.9(2), 119.8, 126.3, 118.9, 106.5, 55.4, 51.8, 41.6, 22.7 (2); TOF-MS (*m/z*): calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 364.202 5, found 364.201 7。结构数据与 Hu et al.(2024)同。

**1.2.5 2-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸羰基-2-(4-甲氧基)苄基-1-(4-(N-异丙基)氨基羰基)苄胍(Z-GP-5a)的合成** 称取 Z-GP-OH 367.6 mg(1.2 mmol)、HATU 450.0 mg(1.2 mmol)和 HOAT 163.3 mg(1.2 mmol)于 50 mL 圆底烧瓶, 向反应体系中添加 10 mL 二氯甲烷溶剂, 经磁力搅拌处理促使物质充分溶解, 冰浴冷却至 0 °C, 随后加入 1 mL 的 DIPEA, 活化 20 min 后, 加入化合物 5a 313.2 mg(1.0 mmol), 冰浴条件下继续反应 1 h 后升至常温过夜。反应完成后, 通过添加饱和氯化铵(NH<sub>4</sub>Cl)水溶液实施反应终止操作, 使用二氯甲烷(3×10 mL)萃取 3 次, 旋干浓缩后经过硅胶柱层析(DCM:MeOH = 30:1, 体积比)分离纯化, 得黄色黏稠液体 373.4 mg, 收率 62.1%, 纯度 97.2%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.16 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.37~7.29 (m, 3H), 6.78

(dd,  $J=19.4, 9.2$  Hz, 2H), 5.03 (s, 1H), 4.66~4.51 (m, 1H), 4.24 (dd,  $J=8.5, 3.2$  Hz, 1H), 4.09 (dd,  $J=11.9, 6.0$  Hz, 1H), 3.93~3.77 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.57~3.41 (m, 1H), 2.01~1.63 (m, 2H), 1.16 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170.8, 167.5, 165.1, 156.5, 152.6, 143.2, 141.3, 137.1, 133.6, 128.4, 127.8, 127.7, 127.7, 127.2, 114.4, 114.1, 65.4, 58.6, 57.1, 55.2, 45.8, 42.8, 40.9, 29.0, 24.2, 22.4。TOF-MS ( $m/z$ ): calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_6$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 602.299 6, found 602.299 6。

**1.2.6 2-苄氧羰基甘氨酸脲基-2-(6-甲氧基-2-基)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(Z-GP-5b)的合成** 将313.2 mg(1.0 mmol)的化合物**5a**替换为363.5 mg(1.0 mmol)的化合物**5b**, 依照1.2.5合成方法, 硅胶柱层析(DCM: MeOH = 30: 1, 体积比)分离纯化, 得黄色黏稠液体490.1 mg, 收率75.2%, 纯度98.5%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.80 (d,  $J=25.7$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 7.69 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H), 7.65 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.38 (dd,  $J=10.5, 4.4$  Hz, 5H), 7.32 (dd,  $J=16.0, 4.9$  Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.17 (dd,  $J=8.9, 2.4$  Hz, 1H), 7.11 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.00 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 5.83 (d,  $J=17.2$  Hz, 1H), 5.32 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.31 (d,  $J=13.5, 6.8$  Hz, 1H), 4.11 (dd,  $J=23.4, 10.8$  Hz, 2H), 4.03~3.94 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.65 (dd,  $J=36.3, 29.1$  Hz, 2H), 2.08 (dd,  $J=49.1, 43.4$  Hz, 4H), 1.28 (s, 7H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.8, 156.2, 136.5, 129.7, 128.9, 128.7, 128.5, 128.1, 128.1, 127.6, 119.6, 106.1, 66.9, 55.4, 46.4, 43.5, 42.0, 29.7, 29.2, 22.8, 1.0; TOF-MS ( $m/z$ ): calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_6$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 652.312 9, found 652.312 9。

**1.2.7 2-叔丁氧羰基-2-(4-甲氧基)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(6a)的合成** 根据Hu et al.(2024)方法, 经6步合成。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.14 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 7.85~7.62 (m, 2H), 7.36 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 7.24 (d,  $J=8.62$  Hz, 2H), 6.86 (d,  $J=8.91$  Hz, 2H), 5.79 (d,  $J=19.8$  Hz, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.99 (d,  $J=12.7$  Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.17 (d,  $J=6.5$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165.4, 156.6, 154.5, 141.5, 135.8, 134.0, 128.8(2), 127.6(2), 126.12(2), 113.88(2), 80.5, 55.7, 53.5, 41.6, 28.5(3), 22.9(2)。结构数据与Hu et al.(2024)同。

**1.2.8 2-叔丁氧羰基-2-(6-甲氧基-2-基)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(6b)的合成** 根据Hu et al.(2024)方法, 经6步合成。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.77 (s, 1H), 7.74~7.65 (m, 4H), 7.57 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J=8.12$  Hz, 2H), 7.18~7.11 (m, 2H), 5.99 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.28 (dt,  $J=19.9, 6.7$  Hz, 1H), 4.13 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 1.52 (s, 9H), 1.27 (t,  $J=4.4$  Hz, 7H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  166.6, 157.7, 154.6, 140.7, 137.5, 134.5, 132.5, 129.3, 128.8(2), 126.9(2), 126.7, 124.3, 121.9, 119.0, 105.7, 81.7, 60.5, 55.4, 54.2, 41.9, 28.5(3), 22.9(2)。结构数据与Hu et al.(2024)同。

### 1.3 FAP $\alpha$ 酶解实验

首先, 利用RP-HPLC方法分别建立**Z-GP-5a**和**Z-GP-5b**的浓度检测标准曲线。

反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析条件设定如下: Agilent 1200型色谱系统, 色谱柱选用Cosmosil C18反相柱(规格: 250 mm $\times$ 4.6 mm, 粒径5  $\mu\text{m}$ ); 流动相梯度程序设置为, 0~10 min:  $\varphi$ (甲醇)由55%线性升至65%,  $\varphi$ (水相)(含2 mmol/L甲酸铵,下同)相应由45%降至35%; 10~15 min:  $\varphi$ (甲醇)增至75%,  $\varphi$ (水相)调整为25%; 15~30 min:  $\varphi$ (甲醇)继续升至85%,  $\varphi$ (水相)保持15%; 30~40 min: 维持 $\varphi$ (甲醇)85%,  $\varphi$ (水相)15%; 流速1 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量2  $\mu\text{L}$ 。

分别准确称取**Z-GP-5a**和**Z-GP-5b**并将样品分别溶于Tris酶解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mmol/L NaCl, pH 7.4), 将其配制为60.0 mmol/L母液。按梯度稀释法依次制备30.0、15.0、7.5、3.75和1.875 mmol/L 5个浓度点, 通过RP-HPLC检测分析。以药物浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标建立标准曲线, 所有实验均进行3次独立重复测定, 依次获得**Z-GP-5a**和**Z-GP-5b**的浓度检测标准曲线。

酶解实验: 称取适量的rhFAP $\alpha$ 酶, 用酶解缓冲液配制成10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酶溶液。分别将1.0 mL的底物溶液(60 mmol/L的**Z-GP-5a**和**Z-GP-5b**溶液)与等体积的酶溶液(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )混合均匀, 置于六孔板, 此时酶的质量浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将六孔板放置在37  $^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中温育。分别在0、4、8、12、16、24 h等6个时间点各取10  $\mu\text{L}$ 上层清液, 用RP-HPLC方法分别测定缀合物**Z-GP-5a**和**Z-GP-5b**的浓度, 由此可以分别计算在5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

浓度的 rhFAP $\alpha$  存在下缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 的时间-酶解率曲线。

#### 1.4 细胞增殖抑制实验

选取对数生长期的大鼠 C6 神经胶质瘤细胞、人源 HepG-2 肝癌细胞、小鼠 K1735 及 B16 黑色素瘤细胞、人源 MDA-MB-231 乳腺癌细胞以及 NIH-3T3 小鼠胚胎成纤维细胞, 分别接种于含  $\varphi=10\%$  胎牛血清及 100 U/mL 青霉素的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基(培养基根据不同细胞株而定), 调节细胞悬液浓度至  $5 \times 10^5$  cells/mL。采用无菌操作将 100  $\mu$ L 细胞悬液分装至 96 孔板, 置于  $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(37  $^{\circ}$ C)中进行 24 h 贴壁培养。

移除培养液后, 实验组加入梯度浓度待测药物(对照组维持基础培养基), 继续培养 48 h。每孔精准添加 30  $\mu$ L MTT 工作液(5 mg/mL), 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h。终止反应后移除培养液, 加入 100  $\mu$ L DMSO 进行甲贍晶体溶解(微量振荡器震荡 15 min), 使用 Thermo Scientific Multiskan 酶标仪于 570 nm 波长测定吸光度值  $A$ 。

细胞生长抑制率  $I$  按如下公式计算

$$I = [1 - (A_{\text{加药组}} / A_{\text{对照组}})] \times 100\%$$

采用剂量-效应关系建模方法, 以药物浓度梯度为自变量, 对应细胞增殖抑制率百分比为因变量, 构建剂量-响应曲线数学模型。基于所得剂量响应关系, 运用 SPSS 26.0 统计分析软件(IBM, USA)的四参数 Logistic 模型进行非线性回归分析, 最终确定抑制半数细胞群体增殖所需的化合物浓度(IC<sub>50</sub>)。

#### 1.5 图像和统计学处理

本研究统计处理采用 SPSS 13.0 软件完成, 实验数据的可视化呈现通过 GraphPad Prism 6 软件实现。应用单因素方差分析(one-way ANOVA)对实验数据进行统计学解析, 定量结果以平均值 $\pm$ 标准偏差( $\bar{x} \pm SD$ )形式表征, 组间差异性评估采用独立样本  $t$  检验。显著性判定标准为:  $P > 0.05$  表示无显著性差异;  $0.01 < P < 0.05$  表示显著性差异;  $P < 0.01$  表示极显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 的设计合成

由于胍基脱氢氧化是胍类化合物形成活泼烷化剂的关键步骤, 本研究将在化合物 **5a** 和 **5b** 的胍基上缀合苄氧羰基甘氨酸酰肼基(Z-GP-), 阻断其被 P450 脱氧化的过程。其合成途径如图 2 所示。

由图 2 可以看到, 目标化合物的合成包括

**Z-GP-OH** 和化合物 **5a/5b** 的合成以及两者之间的缀合 3 个部分。**Z-GP-OH** 的合成包括 2 个步骤, 首先是 *N*-苄氧羰基甘氨酸(Z-Gly-OH)与脯氨酸甲酯(H-Pro-OMe)缩合生成 *N*-苄氧羰基甘氨酸酰肼甲酯(Z-GP-OMe), 缩合剂采用 *N,N,N',N'*-四甲基氯甲脒六氟磷酸盐(TCFH), 收率 94.7%。由于羧基是甘氨酸,  $\alpha$ -位不含手性中心, 因此无需添加 1-羟基-7-氮杂苯并三氮唑(HOAT), 以减少反应过程中可能发生的消旋。**Z-GP-OMe** 甲酯的水解采用皂化反应, 在 1.0 mol/L 氢氧化钠的 1,4-二氧六环溶液中进行, 以 93.2% 的收率得到苄氧羰基甘氨酸酰肼甲酯(**Z-GP-OH**)。

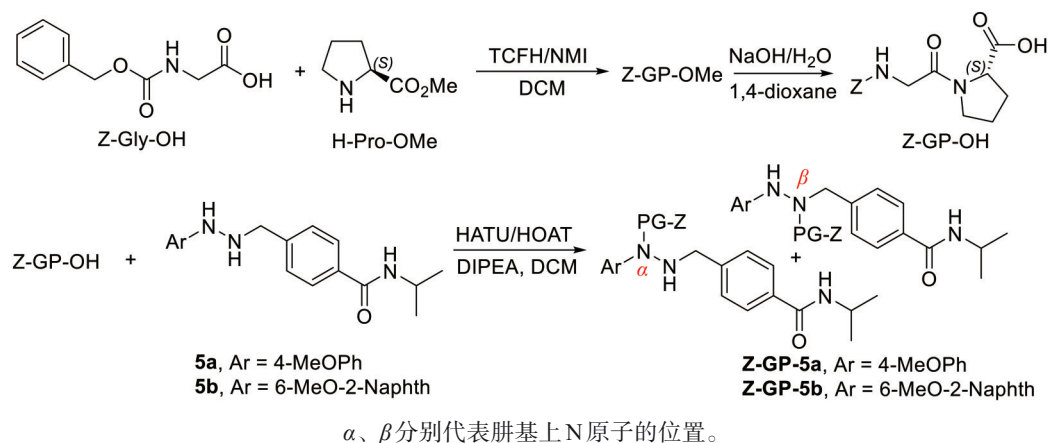
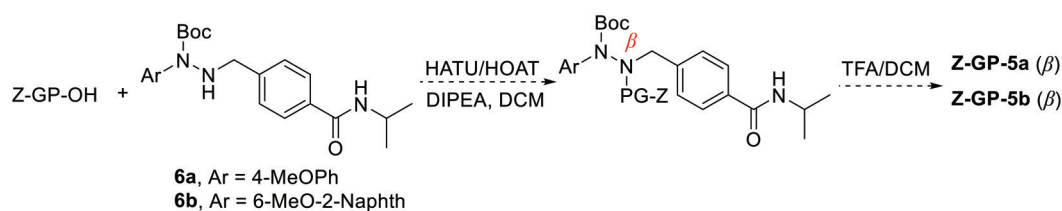
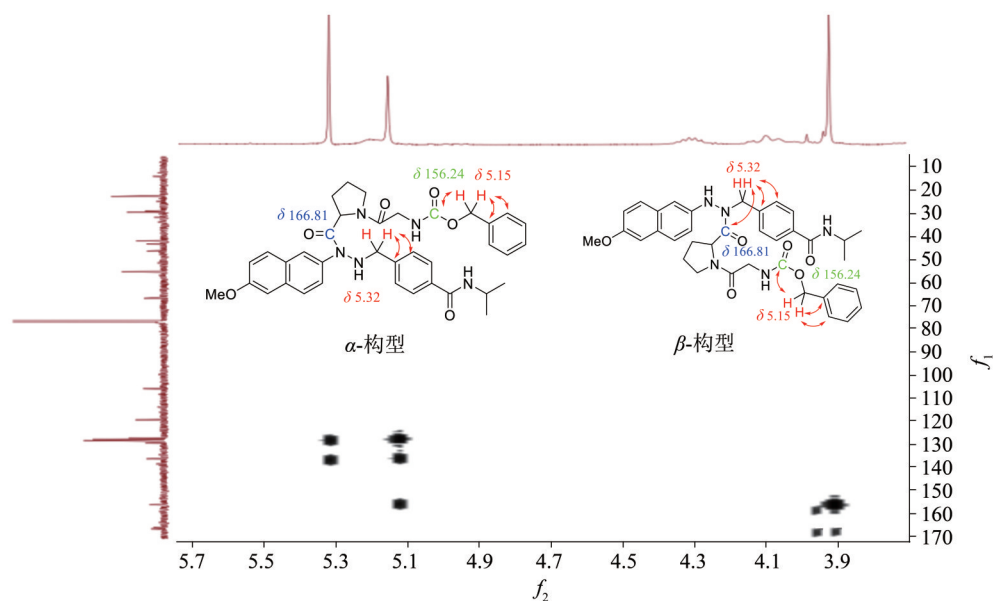
参照 Hu et al.(2024)方法, 经 6 个步骤合成了 2-(4-甲氧基苯基)-1-(4-(*N*-异丙基)氨基酰基)苄胍(**5a**)和 2-(6-甲氧基萘基)-1-(4-(*N*-异丙基)氨基酰基)苄胍(**5b**)。**Z-GP-OH** 与化合物 **5a/5b** 的缩合采用 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)作为缩合试剂, 同时加入 HOAT, 其目的是将 **Z-GP-OH** 首先转化为活泼酯 Z-GP-OAT, 尽量减少脯氨酸的消旋; 活泼酯再分别与 **5a** 和 **5b** 进行反应, 收率分别为 62.1% 和 80.4% (图 3)。

理论上, **Z-GP-OH** 与化合物 **5a/5b** 的缩合应当得到  $\alpha$ -和  $\beta$ -构型的混合产物。但本实验发现, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 均以  $\alpha$ -构型的产物为主。以 **Z-GP-5b** 为例, <sup>1</sup>H 的异核多碳相关谱(HMBC, <sup>1</sup>H detected heteronuclear multiple bond correlation)显示,  $\delta$  5.32 处的苄基氢与  $\delta$  166.81 处的脯氨酸羰基之间并没有存在异核相关(图 4), 证实该化合物为  $\alpha$ -构型。本实验通过硅胶柱层析无法分离得到  $\beta$ -构型的产物; 利用反相高效液相(RP-HPLC)定量分析方法发现, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 中  $\beta$ -构型产物含量仅分别为 5.0% 和 3.0%。

本实验也尝试通过 2-Boc-2-芳基-1-(4-(*N*-异丙基)氨基酰基)苄胍(化合物 **6a/6b**)与 **Z-GP-OH** 的缩合, 在  $\beta$ -位上选择性引入 Z-GP 基团。但非常遗憾的是, 缩合反应未能获得成功。可能的原因是胍 2-位上的 Boc 基团比较大, 而 Z-GP 也是大基团, 活化的 Z-GP 靠近 1-位 N 的空间位阻非常大, 难以发生有效碰撞, 因而使缩合反应难以进行。

### 2.2 FAP $\alpha$ 酶与 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 的相互作用

**Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 中的 Z-GP 能否被 FAP $\alpha$  酶切开, 是该两个化合物是否具有酶靶向性的关键。本实验首先利用 RP-HPLC 方法分别建立 **Z-GP-5a**

图2 缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 的设计合成Fig. 2 Design syntheses of the conjugates **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b**图3  $\beta$ -构型 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 的尝试合成Fig. 3 Trial syntheses of  $\beta$ -type **Z-GP-5a** and **Z-GP-5b** $f_1$ : 表示碳原子的维度, 记录与氢原子远程相关的碳原子的信号;  $f_2$ : 表示氢原子的维度, 通常记录氢原子的信号。图4 缀合物 **Z-GP-5b** 的HMBC谱Fig. 4 HMBC profile of the conjugate **Z-GP-5b**

和 **Z-GP-5b** 的浓度检测工作曲线, 将 60 mmol/L 的 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 分别与不同浓度的人源 FAP $\alpha$  (rhFAP $\alpha$ ) 酶等体积混合, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育, 监测不同时间点底物浓度变化情况, 实验结果见图 5。

从图 5 可以看到, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 能够被 FAP $\alpha$  酶有效酶解。经过 24 h 的孵育, 当 rhFAP $\alpha$  的浓度为 5  $\mu$ g/mL 时, 81.9% 的 **Z-GP-5a** 被酶解, **Z-GP-5b** 的酶解率则为 53.5%; 当 rhFAP $\alpha$  的浓度

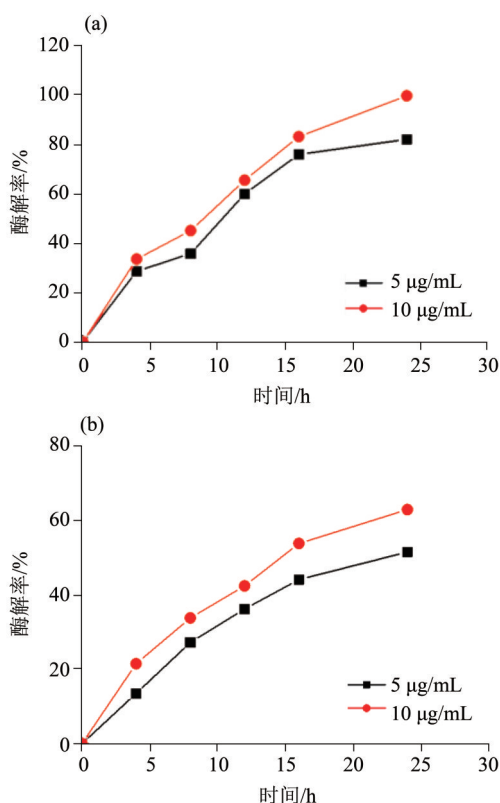


图5 Z-GP-5a(a)和Z-GP-5b(b)被rhFAP $\alpha$ 酶解的酶解率-时间关系曲线

Fig. 5 Relationship curve of cleavage rate with time for Z-GP-5a (a) and Z-GP-5b (b) cleaved by rhFAP $\alpha$

为 10  $\mu\text{g/mL}$  时, Z-GP-5a 的酶解率为 88.5%, 而 Z-GP-5b 的酶解率为 62.9%。显而易见, 酶解率与酶的浓度呈正相关关系。当酶浓度变大时, 同样的底物其酶解率增加。另外, 底物的结构也影响酶解率。当酶解部位周边的基团变大时(Z-GP-5a: Ar = 4-MeOPh < Z-GP-5b: Ar = 6-MeO-2-Naphth), 其酶解率减少(Z-GP-5a > Z-GP-5b)。

### 2.3 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 对 NIH-3T3 的细胞毒性

NIH-3T3 细胞作为广泛使用的小鼠胚胎成纤维细胞系, 因其具备某些干细胞特征, 在药物筛选和组织工程研究中常被用于观察增殖、迁移及分化等生物学过程(Rozengurt et al., 1976; Acharya et al., 2006)。基于该细胞系可用于评估药物毒理作用的特性, 本研究采用 MTT 法测定了 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 对 NIH-3T3 细胞的毒性效应, 该方法在细胞活性检测中已有成熟应用(Lawley et al., 1968; Kupcsik, 2011; Yao et al., 2023)。本研究采用 MTT 法检测 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 对 NIH-3T3 细胞的细胞毒性, 结果见图 6。

从图 6 可以看到, 在与 3T3 细胞孵育 48 h 后, 缀合物 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 均表现出比相应的母

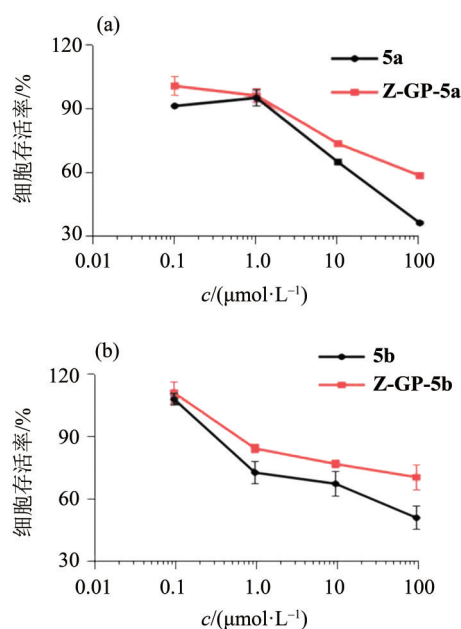


图6 Z-GP-5a (a)和Z-GP-5b (b)对NIH-3T3的细胞毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of Z-GP-5a (a) and Z-GP-5b (b) against NIH-3T3 cells

药 5a 和 5b 低的细胞毒性。显然, 缀合了 Z-GP 之后, 一定程度降低了母药对正常细胞的毒性。Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 之所以没有完全消除 5a 和 5b 的细胞毒性, 原因可能有二。其一, 缀合物 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 自身也有一定的细胞毒性; 其二, 3T3 细胞中可能含有低表达水平的 FAP $\alpha$  酶, 或其他酶, 比如某些类型的内肽酶、外肽酶、羧肽酶, 这些酶虽然没有 FAP $\alpha$  酶的特异性, 但也可以缓慢切除 Z-GP, 释放出 5a 和 5b, 产生细胞毒性。

### 2.4 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 对非原代肿瘤细胞的细胞毒性

本研究采用 MTT 比色法评估 5a、Z-GP-5a、5b、Z-GP-5b 对 5 种肿瘤细胞系的增殖抑制作用, 测试对象包括 C6 大鼠胶质瘤细胞、K1735 小鼠黑色素瘤细胞、HepG-2 人肝癌细胞、MDA-MB-231 人乳腺癌细胞及 B16 小鼠黑色素瘤细胞, 实验结果见表 1。

表 1 数据揭示, 缀合物 Z-GP-5a 和 Z-GP-5b 均表现出比相应母药 5a 和 5b 低的细胞增殖抑制活性。但随化合物以及所作用细胞株的不同, 相应的活性改变情况也有所不同。与 5a 相比, Z-GP-5a 对 C6、K1735 和 B16 细胞株的增殖抑制活性有所降低, 其抑制活性分别降低 1.23、2.06 和 2.38 倍; 对于 HepG-2 和 MDA-MB-231 细胞株而言, 其增殖抑制活性分别降低 9.95 和 15.0 倍。另外, 与 5b 相比, Z-GP-5b 对 C6、MDA-MB-231 和 B16 细胞株的增殖抑制活性分别降低了 6.50、6.14 和 13.0 倍。

表1 目标化合物对5种肿瘤细胞的增殖抑制效果(48 h孵育)<sup>1)</sup>  
Table 1 Growth inhibitory effects of target compounds on five cancer cell lines (48 h incubation)

化合物	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
	C6	K1735	HepG-2	MDA-MB-231	B16
<b>Pcb</b>	>500*	>500*	>500*	>500*	65.3 $\pm$ 1.1
<b>5a</b>	19.5 $\pm$ 0.6	15.9 $\pm$ 1.4	21.2 $\pm$ 0.7	10.7 $\pm$ 0.8	71.2 $\pm$ 1.3
<b>Z-GP-5a</b>	23.9 $\pm$ 0.8	32.7 $\pm$ 0.7	211.0 $\pm$ 1.2	160.5 $\pm$ 1.3	169.2 $\pm$ 1.5
<b>5b</b>	63.2 $\pm$ 2.3	—	—	70.2 $\pm$ 2.1	30.6 $\pm$ 2.1
<b>Z-GP-5b</b>	410.5 $\pm$ 3.2	—	—	431.3 $\pm$ 1.9	396.7 $\pm$ 2.1

1) 数据为4个独立实验的平均值; “\*”表示最高检测浓度; “—”表示无数据。

本实验所使用的肿瘤细胞系均为非原代肿瘤细胞, 缺乏体内肿瘤微环境和原发肿瘤异质性。这些细胞中, FAP $\alpha$ 酶没有表达或表达水平很低。实验结果揭示, 缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 降低对所考察肿瘤细胞的增殖抑制活性, 说明这些肿瘤细胞系中表达的、能酶切 Z-GP 的酶, 尤其是 FAP $\alpha$  酶的活性水平低, 观测结果与所选用肿瘤细胞模型的生物学表征相吻合。可见, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 可能跟文献(Huang et al., 2011; Chen, 2017; Wang et al., 2019)所报道的 Z-GP 缀合物一样, 具有 FAP $\alpha$  酶靶向性, 在原代肿瘤细胞、肿瘤微环境中 Z-GP 能够被切除, 释放出抗癌活性物质 **5a** 和 **5b**; 由于 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 靶向肿瘤微环境, 因此预期具有减毒增效的效果。这方面还需要在科研条件许可的情况下进一步深入研究。

### 3 结论

本文设计合成了2个新型1,2-二取代胍的FAP $\alpha$ 酶靶向前药化合物, 分别为2-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸-2-(4-甲氧基)苯基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(**Z-GP-5a**)和2-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸-2-(6-甲氧基-2-)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(**Z-GP-5b**)。

#### 参考文献:

ACHARYA P S, ZUKAS A, CHANDAN V, et al, 2006. Fibroblast activation protein: A serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Hum Pathol, 37(3): 352–360.  
AERTGEERTS K, LEVIN I, SHI L, et al, 2005. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein  $\alpha$  [J]. J Biol Chem, 280(20): 19441–19444.

通过建立体外酶解反应体系, 证实 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 能被 FAP $\alpha$  酶解, 释放出 2-(4-甲氧基)苯基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(**5a**)和 2-(6-甲氧基-2-)萘基-1-(4-(N-异丙基)氨基甲酰基)苄胍(**5b**), 具有 FAP $\alpha$  酶靶向性; 同时, **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 对 NIH-3T3 的细胞毒性相比于 **5a** 和 **5b** 有所降低, 初步证实其减毒效果。

进一步利用 MTT 法测定了目标化合物对 MDA-MB-231、K1735、C6、HepG-2、B16 共5种常见肿瘤细胞系的增殖抑制活性, 发现在体外孵育时间为48 h的条件下, 缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 均表现出比相应母药 **5a** 和 **5b** 低的细胞增殖抑制活性。与 **5a** 相比, **Z-GP-5a** 对 C6、K1735 和 B16 细胞株的增殖抑制活性有所降低, 其抑制活性分别降低 1.23、2.06 和 2.38 倍; 对于 HepG-2 和 MDA-MB-231 细胞株而言, 其增殖抑制活性分别降低 9.95 和 15.0 倍。另外, 与 **5b** 相比, **Z-GP-5b** 对 C6、MDA-MB-231 和 B16 细胞株的增殖抑制活性分别降低了 6.50、6.14 和 13.0 倍。

本研究所有数据显示, 缀合物 **Z-GP-5a** 和 **Z-GP-5b** 分别为 **5a** 和 **5b** 的 FAP $\alpha$  酶靶向前药化合物, 在细胞水平上显示了一定程度的减毒增效效果。

ARIGA N, SATO E, OHUCHI N, et al, 2001. Stromal expression of fibroblast activation protein/seprase, a cell membrane serine proteinase and gelatinase, is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast[J]. Int J Cancer, 95(1): 67–72.  
CHABNER B A, SPONZO R, HUBBARD S, et al, 1973. High-dose intermittent intravenous infusion of procarbazine (NSC-77213)[J]. Cancer Chemother Rep, 57(3):

- 361-363.
- CHAPMAN R M, 1982. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function[J]. *Semin Oncol*, 9(1): 84-94.
- CHEN M, LEI X, SHI C, et al, 2017. Pericyte-targeting prodrug overcomes tumor resistance to vascular disrupting agents[J]. *J Clin Invest*, 127(10): 3689-3701.
- CHEN W T, KELLY T, 2003. Seprase complexes in cellular invasiveness [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 22 (2/3) : 259-269.
- CHEN Z X , RIGGS A D , 2011. DNA methylation and demethylation in mammals [J]. *J Biol Chem*, 286(21) : 18347-18353.
- DUNN D L, LUBET R A, PROUGH R A, 1979. Oxidative metabolism of N-isopropyl- $\alpha$ -(2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride (procarbazine) by rat liver microsomes[J]. *Cancer Res*, 39(11): 4555-4563.
- EDWARDS M S, LEVIN V A, WILSON C B, 1980. Brain tumor chemotherapy: An evaluation of agents in current use for phase II and III trials [J]. *Cancer Treat Rep*, 64 (12): 1179-1205.
- FESLER M J, BECKER-KOEPKE S, di BISCEGLIE A M, et al, 2010. Procarbazine-induced hepatotoxicity: Case report and review of the literature [J]. *Pharmacotherapy*, 30(5): 540.
- FIALA E, 1975. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine [J]. *Cancer*, 36(6 suppl): 2407-2412.
- HERMAN E H, LEE I, 1972. Cardiovascular and central nervous system effects of parenterally administered single doses of procarbazine (NSC-77, 213) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 22(3): 484-496.
- HU J, ZHANG C, ZHU W, et al, 2024. Design, synthesis, and preliminary anti-tumor activity studies of novel 1,2-disubstituted hydrazines [J]. *Chin J Org Chem*, 44(6): 1870.
- HUANG S, FANG R, XU J, et al, 2011. Evaluation of the tumor targeting of a FAP $\alpha$ -based doxorubicin prodrug [J]. *J Drug Target*, 19(7): 487-496.
- KUPCSIK L, 2011. Estimation of cell number based on metabolic activity: The MTT reduction assay [J]. *Methods Mol Biol*, 740: 13-19.
- LAI M Y H, BRIMBLE M A, CALLIS D J, et al, 2005. Synthesis and pharmacological evaluation of Glycinemodified analogues of the neuroprotective agent glycyl-l-prolyl-l-glutamic acid (GPE) [J]. *Bioorg Med Chem*, 13(2): 533-548.
- LAWLEY P D, BROOKES P , 1968. Cytotoxicity of alkylating agents towards sensitive and resistant strains of *Escherichia coli* in relation to extent and mode of alkylation of cellular macromolecules and repair of alkylation lesions in deoxyribonucleic acids [J]. *Biochem J*, 109(3): 433-447.
- MUFTAKHOV M V, SHCHUKIN P V, TUKTAROV R F, 2024. Resonant electron capture by N-benzoyloxycarbonylglycyl-L-proline molecules [J]. *Russ J Phys Chem A*, 98(7): 1510-1517.
- PARVINEN L M , 1979. Early effects of procarbazine (N-isopropyl-l-(2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride) on rat spermatogenesis [J]. *Exp Mol Pathol*, 30(1): 1-11.
- PROUGH R A, BROWN M I, DANNAN G A, et al, 1984. Major isozymes of rat liver microsomal cytochrome P-450 involved in the N-oxidation of N-isopropyl- $\alpha$ -(2-methylazo)-p-toluamide, the azo derivative of procarbazine [J]. *Cancer Res*, 44(2): 543-548.
- ROZENGURT E, PO C C, 1976. Selective cytotoxicity for transformed 3T3 cells [J]. *Nature*, 261(5562): 701-702.
- SIEBER S M, CORREA P, DALGARD D W, et al, 1978. Carcinogenic and other adverse effects of procarbazine in nonhuman Primates [J]. *Cancer Res*, 38(7): 2125-2134.
- SPIVACK S D, 1974. Drugs 5 years later: Procarbazine [J]. *Ann Intern Med*, 81(6): 795-800.
- SWAFFAR D S, HORSTMAN M G, JAW J Y, et al, 1989. Methylazoxyprocarbazine, the active metabolite responsible for the anticancer activity of procarbazine against L1210 leukemia [J]. *Cancer Res*, 49(9): 2442-2447.
- WANG R, ZHANG C, ZHENG C, et al, 2019. Introduction of Z-GP scaffold into procarbazine reduces spermatotoxicity and myelosuppression [J]. *Bioorg Chem*, 83: 461-467.
- YAO M, WALKER G, GAMCSIK M P, 2023. Assessing MTT and sulforhodamine B cell proliferation assays under multiple oxygen environments [J]. *Cytotechnology*, 75(5): 381-390.