

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/55958> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Xin, Bo-Tao

Title: Discovery and development of inhibitors selective for human constitutive proteasome and immunoproteasome active sites

Date: 2017-09-27

Chinese summary

小结

Discovery and development of selective inhibitors for human constitutive proteasome and immunoproteasome active sites.

靶向人类蛋白酶体和免疫蛋白酶体活性位点的选择性抑制剂的发现和结构优化

本书描述了蛋白酶体和免疫蛋白酶体的亚基选择性抑制剂的设计与合成。目前已有的基于肽类的蛋白酶体抑制剂通常含有 2-4 个氨基酸, *N*-末端 cap 和 *C*-末端修饰的亲电性部分。本书中所报道的研究也是基于这类化合物, 然后用非天然氨基酸或者二肽类的类似物来替换已报道的抑制剂中的天然氨基酸 (第二章中综述了非天然氨基酸的不对称合成方法)。同时, 也尝试了对 *C*-末端修饰的亲电性部分 (环氧酮类亲电基团) 进行人工修饰。通过这些方法, 我们设计并合成了一系列化合物库, 并且从这些化合物库中筛选出了可以选择性抑制 $\beta 5c$, $\beta 2c$, 和 $\beta 2i$ 亚基的化合物。最后, 设计并合成了一系列两步基于活性的探针 (two-step activity-based probe)。这些探针可以在体外实验和细胞实验中选择性的标记蛋白酶体的不同亚基。

第一章简要介绍了蛋白酶体的一些性质和目前报道的一些重要的蛋白酶体抑制剂。本书中所介绍的研究结果都是基于这些已知的抑制剂。**第二章**是关于亲脂性非天然氨基酸的不对称合成方法的文献综述。在其它章节中介绍的亚基选择性蛋白酶体抑制剂中, 这些非天然氨基酸都是重要组成部分。

1922 年的 Epoxomicin 是一个选择性很强的广谱蛋白酶体抑制剂。这个天然产物的结构特点是含有一个 *C*-末端环氧酮的亲电性基团。Epoxomicin 的抑制机制被认为是可以和蛋白酶体活性位点的 *N*-末端苏氨酸残基反应。基于这个机理, 在**第三章**中我们设计并合成了一系列环氧酮的类似物, 并且测试了它们的生物活性。实验结果表明 1, 2-双羰基类的化合物是比较好的双亲电基团。但是含有两个相邻环氧亲电基团的化合物不能很好的抑制蛋白酶体。交换环氧基团和羰基的位置导致化合物对蛋白酶体失去了制剂效果。

第四章主要介绍用二肽类似物来取代已知肽类抑制剂中的两个氨基酸, 这种策略之前很少被用于多肽类的蛋白酶体抑制剂。二肽类似物在生理状态下比肽类化合物更加稳定。5-甲基-吡啶-2-酮可以作为一个氢键受体, 但是它的引入到时化合物失去了对蛋白酶体的抑制效果。

第五章报道了一系列活性和选择性都很强的 $\beta 5c$ 蛋白酶体抑制剂。该研究详细的阐述了已知的对 $\beta 5c$ 选择性抑制剂的设计原理: 在环氧酮肽类抑制剂中, 在 P3 位置需要一个

大的疏水性的氨基酸，在 P1 位置需要一个小的氨基酸。构效关系分析解释了在化合物的结构优化过程中如何不抑制 $\beta 1c$, $\beta 1i$, $\beta 2c$, $\beta 2i$ 和 $\beta 5i$ 亚基。活性最好的化合物中都含有二环己烷结构。但是该结构是一个 *cis*-和 *trans*-的混合物。通过手型合成，分别置备的纯的 *cis*-和 *trans* 的化合物。通过研究这些化合物和酵母的蛋白酶体的复合晶体结构进一步阐述了这些化合物具有选择性的原因。最后，通过用亲水性的基团来取代活性最好的化合物中的 N-末端，得到了可以穿过细胞膜的化合物。在细胞实验中，该化合物仍可以在表达免疫蛋白酶体的细胞株中选择性地抑制 $\beta 5c$ 亚基。

第六章介绍了如何发现一系列可以选择性 $\beta 2c$ 亚基的化合物。该类化合物的特征是在 P2 位置有一个小的氨基酸，从而使化合物对 $\beta 2c$ 的抑制活性强于 $\beta 2i$ 。把活性最好的化合物改造成基于活性的探针后，该探针失去了多 $\beta 2c$ 的选择性。相反，该探针对 $\beta 5c$ 和 $\beta 5i$ 表现出更强的活性。

第七章展介绍了如何通过筛选固定的化合物库来发现对 $\beta 2i$ 亚基具有选择性的抑制剂。基于活性的探针也是根据活性最好的化合物设计并合成的。该探针对 $\beta 2i$ 亚基有较强的活性和选择性。由于十氢萘的部分是一个含有多个立体异构体的混合物，本章中也介绍了尝试用不同的方法制备单一立体异构体并且最终制备了都是 *cis* 的化合物。该化合物很可能是 LU-002i 中的主要立体异构体。

第八章介绍了降冰片烯修饰的亚基 ($\beta 1c/i$, $\beta 2c/i$, $\beta 5c/i$) 选择性的蛋白酶体抑制剂。在这类抑制剂中，对于 $\beta 1i$, $\beta 2i$ 和 $\beta 5c/i$ 亚基的抑制剂可以通过两步 ABP 在细胞裂解液和活细胞中都可以标记处相应的蛋白酶体亚基。这种两步 ABP 是基于 IEDDA 反应。对 $\beta 1c$ 亚基的抑制剂由于不能穿过细胞膜，所以只能在细胞裂解液中标记出该亚基。对于 $\beta 2c$ 亚基的抑制剂完全失去了选择性，所以就用含有叠氮的类似物来代替。该类化合物是通过叠氮和炔烃的“click”反应来完成对 $\beta 2c$ 亚基的标记。在细胞裂解液和活细胞中都可以标记出该亚基。

第九章对本论文的实验工作进行了归纳和总结，并对未来的研究工作进行了展望。