

含氟或氯取代的马蹄金素衍生物的合成及其抗乙肝病毒活性研究*

况安香^{1,2,3**}, 曾晓萍^{2,3}, 曹 盼^{1,2,3}, 梁光义^{2,3***}, 徐必学^{2,3***}

(1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

[摘要] 目的: 探索含氟或氯取代马蹄金素[*N*-(*N*-苯甲酰基-*L*-苯丙氨酰基)-*O*-乙酰基-*L*-苯丙氨醇, MTS] 衍生物对其抗乙肝病毒(HBV)活性的影响。方法: 以化合物 MTS 为先导化合物, 通过引入氟或氯取代, 设计合成了系列 MTS 衍生物, 并对所得 MTS 衍生物进行体外抗 HBV 活性测试[药物半数有毒浓度(TC_{50})、半数抑制浓度(IC_{50})及选择性指数(SI)]。结果: 设计合成了含氟或氯取代的 MTS 衍生物 10 个(3a, 3b, 4a, 4b, 4c, 5a, 5b, 5c, 5d, 5e), 其中化合物 5a, 5c 以及 5d 表现出良好的抗 HBV 活性, 其 IC_{50} 分别为 12.61、10.53、6.46 $\mu\text{mol/L}$ 。结论: 含氟或氯原子取代的 MTS 衍生物具有进一步研究的价值。

[关键词] 马蹄金素; 结构修饰; 卤素取代; 合成; 抗乙肝病毒活性

[中图分类号] R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)04-0418-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.008

Synthesis and Anti-HBV Activity Evaluation of Fluorine or Chlorine-substituted Derivatives of Matijjin-Su

KUANG Anxiang^{1,2,3}, ZENG Xiaoping^{2,3}, CAO Pan^{1,2,3}, LIANG Guangyi^{2,3}, XU Bixue^{2,3}

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, Guizhou, China; 3. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of fluorine or chlorine-substituted derivatives of Matijjin-Su [*N*-(*N*-benzoyl-*L*-phenylalanyl) -*O*-acetyl-*L*-phenylalanol MTS] on the anti-hepatitis B virus (HBV) activity. **Methods:** By using MTS as a lead compound, a series of fluorine or chlorine-substituted derivatives of MTS were synthesized; The anti-HBV activity of target compounds were evaluated in 2.2.15 cells. **Results:** Seven new kinds of fluorine or chlorine-substituted derivatives of MTS were synthesized and their anti-HBV activity was evaluated. **Conclusion:** The compounds 5a, 5b and 5c, exhibited effective activities against the replication of HBV DNA with IC_{50} values of 12.61, 10.53 and 6.46 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The fluorine or chlorine-substituted derivatives of MTS possesses the value of further research.

[Key words] Matijjin-Su; structure modification; halogen substitution; synthesis; anti-HBV activity

乙型肝炎(乙肝)是由乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的、严重威胁人类健康的疾病

之一^[1], 目前治疗乙肝的药物主要有以 α -干扰素为代表的生物类免疫调节剂和恩替卡韦等为代表

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81760623); 贵阳中医学院研究生工作站创新项目[GNYL(2017)008号-7-Y]

** 贵州中医药大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: guangyi_liang@126.com; bixue_xu@126.com

网络出版时间: 2019-04-26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190425.2119.008.html>

的核苷(酸)类药物^[2-3],但这些药物均不能完全治愈乙肝^[4-5],因此,研究开发具有新化学结构类型的乙肝治疗药物具有重要意义。马蹄金素[*N*-(*N*-苯甲酰基-*L*-苯丙氨酰基)-*O*-乙酰基-*L*-苯丙氨醇,MTS,图1]是本课题组从苗药马蹄金中发现的一个具有抗乙肝病毒活性的先导化合物^[6-8],其衍生物 Y101 已经获得临床批件并完成了一期临床试验^[9-11]。鉴于 MTS 为二肽基本母核,与现在临床上的核苷类抗乙肝药物的基本骨架完全不同,值得广泛深入探讨 MTS 基本母核上不同取代基对其抗乙肝病毒的影响。对生物分子用卤素(Cl、Br、I 和 F)修饰是药物化学研究的热点,约 40% 的卤化药物进入市场或临床前试验阶段,约 25% 的有机卤化药物进入市场,而 34% 的卤化药物仍处于研发阶段^[12-13],这表明卤素在药物研发中起着重要的作用,其中又以含氟或氯取代的应用更为广泛^[14]。为探讨含氟或氯取代对 MTS 衍生物在抗 HBV 活性方面的影响,本研究设计合成了一系列含氟或氯取代的 MTS 衍生物,并对其进行了抗 HBV 的评价。

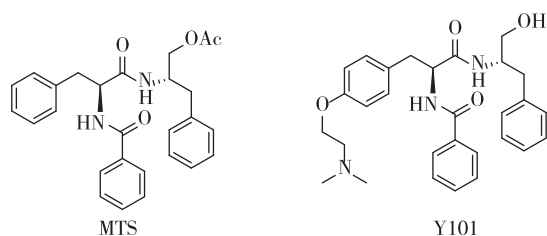


图1 化合物 MTS 和 Y101 的结构式

Fig.1 Chemical structure of MTS and Y101

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂

仪器有 XT-4 型熔点仪(温度未校正)、德国布鲁克公司 AVANCE NEO-600 MHz 型超导核磁共振仪、美国 Varian 公司 Inova-400 MHz 型超导核磁共振仪(以 TMS 为内标)、美国 Hewlett-Packard 公司 HP-5793 质谱仪、青岛海洋化工厂生产的柱色谱硅胶(300~400 目)及高效薄层板。试剂均为市售分析纯或化学纯产品,除特别说明外,未经处理直接使用。2.2.15 细胞为 HBV DNA 克隆转染人肝癌细胞。

1.2 试验方法

1.2.1 目标化合物 3a、3b 和 4a~4c 合成 参照

文献[8]的方法,取 *L*-酪氨酸甲酯盐酸盐 1.1 mmol 与 2-氯苯甲酸(4-氟苯甲酸或 4-氯苯甲酸) 1.0 mmol 于反应瓶中,加入无水二氯甲烷(DCM) 50 mL 和 *N*-甲基吗啉(NMM) 2.3 mmol 搅拌溶解完全,于 0 °C 氩气保护下滴加含氯甲酸异丁酯(IBCF) 126 μ L(1.0 mmol)和 DCM 2 mL 的混合溶液,0 °C 继续搅拌 5 h。减压回收 DCM,残留物用乙酸乙酯和水分散,萃取;所得有机层依次以蒸馏水、稀盐酸、饱和碳酸氢钠、饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸干;将所得固体物溶解于 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) 2 mL 中,加入 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 3 mL,室温搅拌 1 h,反应液以浓盐酸调至 pH 2~3,加入乙酸乙酯和水,萃取;所得有机层依次以蒸馏水、饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩至干即得中间体 *N*-(2-氯-苯甲酰基)-*L*-酪氨酸(2a)、*N*-(4-氟-苯甲酰基)-*L*-酪氨酸(2b)、*N*-(4-氯-苯甲酰基)-*L*-酪氨酸(2c);将前一步合成的中间体 2a 1.0 mmol 与 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐 1.1 mmol 于反应瓶内,加入无水 DCM 50 mL 和 NMM 2.3 mmol 搅拌溶解完全,于 0 °C 氩气保护下滴加含 IBCF 126 μ L(1.0 mmol)和 DCM 2 mL 的混合溶液,后 0 °C 继续搅拌 5 h,反应液减压回收 DCM,剩余物以乙酸乙酯和水分散,萃取,所得有机层依次用蒸馏水、稀盐酸、饱和碳酸氢钠以及饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸干,所得固体经硅胶柱层析纯化得目标化合物 3a。参照合成 3a 的方法可制备得 3b 和 4a~4c。合成路线见图 2。

1.2.1.1 *N*-[*N*-(2-氯苯甲酰基)-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸甲酯(3a) 白色粉末,收率 74.5%。EI-MS m/z : 480 (M^+), 325, 274, 180, 163, 139 (100), 120, 107, 91, 77; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.20 (s, 1H), 8.52 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.46~7.16 (m, 9H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.07~2.67 (m, 4H); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.8, 171.2, 165.9, 155.8, 137.0, 136.4, 130.8, 130.2, 130.0, 129.6, 129.2, 128.9, 128.3, 127.8, 126.9, 126.6, 114.8, 54.4, 53.8, 51.9, 36.7, 36.5。

1.2.1.2 *N*-[*N*-(4-氟苯甲酰基)-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸甲酯(3b) 白色粉末,收率 68.4%。EI-MS m/z : 464 (M^+), 325, 258, 180, 163, 147, 123

(100), 95; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.20 (s, 1H), 8.55 (m, 2H), 7.86 (m, 2H), 7.30 ~ 7.13 (m, 7H), 7.04 (d, $J = 8.4$, 2H), 7.02 (d, $J = 8.4$, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.09 ~ 2.79 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.8, 171.8, 165.1, 162.7, 155.7, 137.1, 130.6, 130.5, 130.2, 130.1, 130.0, 129.1, 128.3, 126.6, 115.2, 115.0, 114.8, 54.9, 53.7, 51.9, 36.6, 36.2。

1.2.1.3 *N*-[*N*-(2-氯苯甲酰基)-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**4a**) 淡黄色粉末, 收率 84.9%。EI-MS m/z : 452 (M^+), 434, 297, 274, 206, 139 (100), 120, 107, 91, 77; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.19 (s, 1H), 8.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.46 ~ 7.16 (m, 9H), 7.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.83 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.56 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.34 ~ 3.24 (m, 2H), 2.91 ~ 2.85 (m, 2H), 2.74 ~ 2.63 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.5, 165.8, 155.7, 139.0, 136.5, 130.8, 130.2, 130.0, 129.6, 129.2, 128.9, 128.1, 127.9, 126.9, 125.9, 114.5, 62.1, 54.8, 52.3, 36.8, 36.4。

1.2.1.4 *N*-[*N*-(4-氟苯甲酰基)-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**4b**) 白色粉末, 收率 66.9%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.18 (s, 1H), 8.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.90 ~ 7.87 (m, 3H), 7.31 ~ 7.00 (m, 6H), 6.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.83 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.60 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.38 ~ 3.23 (m, 2H), 2.95 ~ 2.56 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.3, 171.1, 165.0, 162.7, 155.7, 139.1, 130.1, 130.0, 129.2, 128.4, 128.1, 125.9, 115.2, 115.0, 114.8, 69.8, 55.2, 52.5, 36.5, 36.4。

1.2.1.5 *N*-[*N*-(4-氯苯甲酰基)-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**4c**) 白色粉末, 收率 55.3%。EI-MS m/z : 452 (M^+), 434, 297, 274, 206, 139 (100), 120, 107, 91, 77; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.15 (s, 1H), 8.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.25 ~ 7.12 (m, 5H), 7.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.80 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.57 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.35 ~ 3.24 (m, 2H), 2.95 ~ 2.60 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.9, 164.9,

155.7, 139.0, 136.1, 132.9, 130.1, 129.4, 129.2, 128.33, 128.28, 128.1, 125.9, 114.8, 62.2, 55.2, 52.5, 36.5, 36.4。

1.2.2 目标化合物 **5a** ~ **5e** 的合成通法 取化合物 **4c** 1.0 mmol 与碳酸钾 3.0 mmol 于反应瓶内, 加入 DMF 10 mL, 搅拌下加入碘甲烷 1.1 mmol, 室温搅拌至反应完全, 将反应液分散于乙酸乙酯和水中, 萃取, 所得有机层依次以水、饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干, 所得固体经硅胶柱层析纯化即得 **5a**。同法, 以碘代乙烷、碘代丙烷、碘代异丙烷或二甲氨基氯乙烷盐酸盐替换碘甲烷, 可分别制得 **5b** ~ **5e**。合成路线见图 2。

1.2.2.1 *N*-[*N*-(4-氯苯甲酰基)-*O*-甲基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**5a**) 白色粉末, 收率 76.5%。ESI-MS m/z : 955.5 [$2\text{M} + \text{Na}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.84 ~ 7.78 (m, 2H), 7.55 ~ 7.50 (m, 2H), 7.25 ~ 7.15 (m, 6H), 7.16 ~ 7.09 (m, 1H), 6.82 ~ 6.76 (m, 2H), 4.83 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.64 ~ 4.57 (m, 1H), 3.92 ~ 3.84 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.33 (dd, $J = 10.6, 5.1$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 10.8, 5.7$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H), 2.89 ~ 2.83 (m, 2H), 2.66 (dd, $J = 13.7, 8.0$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.01, 165.11, 157.78, 139.06, 136.18, 132.87, 130.23, 129.44, 129.27, 128.37, 128.14, 125.99, 113.51, 62.28, 55.22, 54.95, 52.54, 36.47。

1.2.2.2 *N*-[*N*-(4-氯苯甲酰基)-*O*-乙基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**5b**) 参考 **5a** 合成方法, 以碘乙烷替换碘甲烷合成目标化合物 **5b**, 白色粉末, 收率 60.6%。ESI-MS m/z : 503.2 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.85 ~ 7.79 (m, 2H), 7.57 ~ 7.50 (m, 2H), 7.25 ~ 7.16 (m, 6H), 7.16 ~ 7.09 (m, 1H), 6.81 ~ 6.75 (m, 2H), 4.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.66 ~ 4.59 (m, 1H), 3.96 ~ 3.87 (m, 3H), 3.38 ~ 3.31 (m, 1H), 3.31 ~ 3.26 (m, 1H), 2.96 (dd, $J = 13.8, 4.6$ Hz, 1H), 2.88 (dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz, 1H), 2.86 (dd, $J = 7.9, 2.1$ Hz, 2H), 2.67 (dd, $J = 13.6, 8.0$ Hz, 1H), 1.28 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.38, 165.48, 157.46, 139.48, 136.55, 133.32, 130.62, 130.51, 129.84, 129.66,

128.75, 128.53, 126.36, 114.38, 63.24, 62.68, 55.60, 52.94, 36.88, 15.15。

1.2.2.3 *N*-[*N*-(4-氯苯甲酰基)-*O*-丙基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**5c**)制备 参考**5a**合成方法,以碘丙烷替换碘甲烷合成目标化合物**5c**,白色粉末,收率71.1%。ESI-MS m/z : 517.2 $[M + Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.26 ~ 7.16 (m, 6H), 7.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.62 (td, $J = 9.4, 4.4$ Hz, 1H), 3.91 ~ 3.86 (m, 1H), 3.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.37 ~ 3.32 (m, 1H), 3.31 ~ 3.26 (m, 1H), 2.96 (dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 14.0, 8.0$ Hz, 2H), 2.67 (dd, $J = 13.8, 8.0$ Hz, 1H), 1.71 ~ 1.64 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.38, 165.50, 156.35, 139.48, 136.55, 133.33, 130.66, 130.40, 129.84, 129.66, 128.74, 128.52, 126.36, 115.62, 69.36, 62.68, 55.60, 52.95, 36.91, 36.88, 22.31。

1.2.2.4 *N*-[*N*-(4-氯苯甲酰基)-*O*-异丙基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**5d**)的制备 参考**5a**合成方法,以碘代异丙烷替换碘甲烷合成目标化合物**5d**,白色粉末,收率60.9%。ESI-MS m/z : 517.2 $[M + Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.85 ~ 7.81 (m, 2H), 7.56 ~ 7.50 (m, 2H), 7.25 ~ 7.17

(m, 6H), 7.16 ~ 7.10 (m, 1H), 6.80 ~ 6.74 (m, 2H), 4.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.66 ~ 4.59 (m, 1H), 4.56 ~ 4.48 (m, 1H), 3.96 ~ 3.86 (m, 1H), 3.38 ~ 3.32 (m, 1H), 3.31 ~ 3.26 (m, 1H), 2.96 (dd, $J = 13.9, 4.7$ Hz, 1H), 2.92 ~ 2.83 (m, 2H), 2.67 (dd, $J = 13.7, 8.0$ Hz, 1H), 1.21 (d, $J = 1.6$ Hz, 3H), 1.20 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.38, 165.50, 156.35, 139.48, 136.55, 133.33, 130.66, 130.40, 129.84, 129.66, 128.74, 128.52, 126.36, 115.62, 69.36, 62.68, 55.60, 52.95, 36.91, 36.88, 22.31。

1.2.2.5 *N*-[*N*-(4-氯苯甲酰基)-*O*-二甲氨基乙基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(**5e**) 白色结晶,收率46.6%。ESI-MS m/z : 525.2 $[M + H]^+$; 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.85 ~ 7.80 (m, 2H), 7.57 ~ 7.51 (m, 2H), 7.26 ~ 7.16 (m, 6H), 7.16 ~ 7.11 (m, 1H), 6.84 ~ 6.77 (m, 2H), 4.80 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.66 ~ 4.59 (m, 1H), 3.96 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.94 ~ 3.87 (m, 1H), 3.38 ~ 3.31 (m, 1H), 3.31 ~ 3.27 (m, 1H), 2.97 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H), 2.91 ~ 2.84 (m, 2H), 2.67 (dd, $J = 13.7, 8.0$ Hz, 1H), 2.56 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 2.18 (s, 6H); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.38, 165.49, 157.44, 139.47, 136.56, 133.31, 130.63, 129.84, 129.66, 128.75, 128.53, 126.36, 114.47, 66.09, 62.68, 58.21, 55.60, 52.95, 46.02, 36.89。

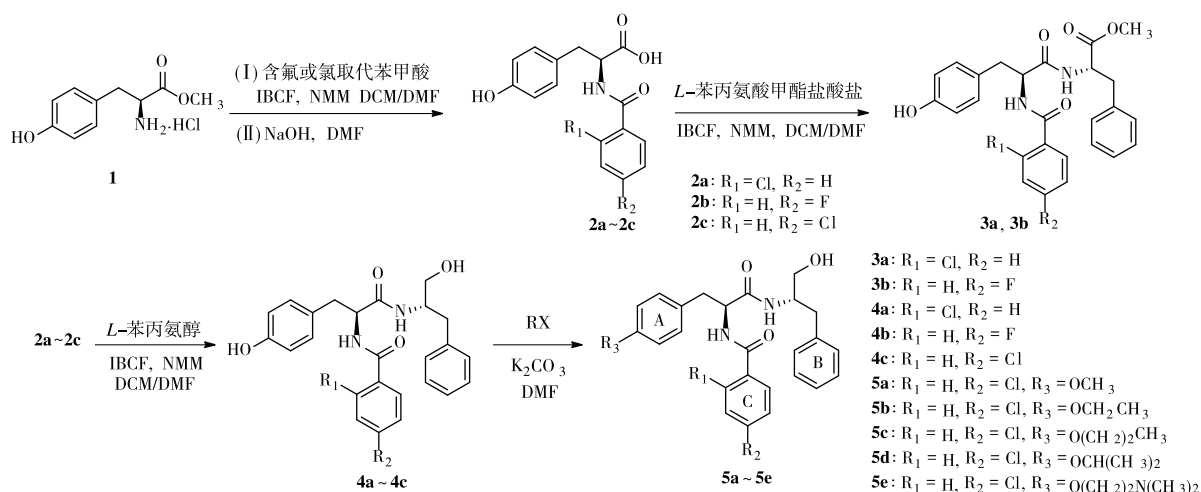


图2 目标化合物的合成路线图

Fig.2 Synthetic route for target compounds

1.3 马蹄金素衍生物体外抗 HBV 活性研究

取 2.2.15 细胞接种 96 孔培养板,24 h 后加入不同浓度的样品液(3a、3b、4a、4b、4c、5a、5b、5c、5d、5e、MTS)、空白对照液或拉米夫定(lamivudine)阳性对照液。培养 3 d 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL,继续培养 6 h,1 000 r/min 离心 10 min,吸去孔内培养液,每孔加入 DMSO 200 μL,振荡 10 min,形成的结晶充分溶解后、用酶联免疫检测仪测定其吸光度值(OD 值),采用改良寇氏法计算药物的半数有毒浓度。另取 2.2.15 细胞接种 96 孔培养板,24 h 后分别加入不同浓度的样品(3a、3b、4a、4b、4c、5a、5b、5c、5d、5e、MTS)及阳性对照药拉米夫定,同时设细胞对照孔,加药后每 72 h 分别更换含不同稀释浓度样品的培养液,于加药后第 8 日分别收集 2.2.15 细胞,采用斑点杂交的方法检测细胞中 HBV DNA 的复制程度,分别计算 IC₅₀ 及药物选择性指数(SI)^[15]。

2 结果

通过化学方法合成了 10 个含氟或氯取代的 MTS 衍生物,并对所合成的目标产物进行体外抗 HBV 活性测试,结果显示其中有 8 个目标产物对 HBV DNA 的复制有不同程度的抑制活性。化合物 5a、5c、5d 表现出良好的抗 HBV 活性,其 IC₅₀ 为 12.61、10.53、6.46 μmol/L。见表 1。

表 1 目标化合物对 2.2.15 细胞 DNA 复制的抑制活性

Tab. 1 Inhibitory effect of the target compounds on HBV DNA in 2.2.15 cell			
目标化合物	TC ₅₀ (μmol/L)	2.2.15 细胞 DNA 复制	
		IC ₅₀ (μmol/L)	SI (TC ₅₀ /IC ₅₀)
3a	240.4	52.0	4.6
3b	574.8	68.7	8.4
4a	346.7	105.9	3.3
4b	396.8	96.0	4.1
4c	587.1	103.3	5.7
5a	668.2	12.6	53.0
5b		—	
5c	216.4	10.5	20.6
5d	99.1	6.46	15.3
5e		—	
MTS	120.2	11.3	10.6
拉米夫定	786.00	18.90	41.6

注:“—”表示样品在测试浓度范围内无活性

3 讨论

本文以具有抗 HBV 活性的 MTS 为先导化合物,通过在其 B 环引入氟或氯取代,设计合成了 10 个衍生物,由表 1 中目标化合物的抗 HBV 活性测试结果可以看出,A 环为 4-羟基取代的化合物活性相对较低;对化合物 4c 中 A 环 4-位酚羟基进行甲基化、丙基化或异丙基化取代后所得化合物 5a、5c、5d 的抗 HBV 活性显著提高,特别是其中甲基化取代的化合物 5a,其细胞毒性还略有降低,SI 达到 53.0,说明含氟或氯原子取代的 MTS 衍生物具有进一步研究的价值。

4 参考文献

[1] OTT J J,STEVENS G A,GROEGER J,et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine, 2012,30(12):2212-2219.

[2] ZOULIM F,LEBOSSÉ F,LEVRERO M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections[J]. Curr Opin Virol, 2016,18:109-116.

[3] DUSHEIKO G. Treatment of HBeAg positive chronic hepatitis B: Interferon or nucleoside analogues[J]. Liver Int, 2013,11(33):137-150.

[4] ZHANG Y,ZHONG H,LV Z,et al. Anti-hepatitis B virus and anti-cancer activities of novel isoflavone analogs[J]. Eur J Med Chem, 2013,62:158-167.

[5] ZEISEL M B,LUCIFORA J,MASON W S,et al. Towards an HBV cure: State-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure[J]. Gut, 2015,64(8):1314-1326.

[6] 刘玉明,梁光义,徐必学. 苗族药马蹄金化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003,15(1):15-17.

[7] XU B X,HUANG Z M,LIU C X,et al. Synthesis and anti-hepatitis B virus activities of Matijing-Su derivatives[J]. Bioorg Med Chem, 2009,17(8):3118-3125.

[8] QIU J Y,XU B X,HUANG Z M,et al. Synthesis and biological evaluation of Matijing-Su derivatives as potent anti-HBV agents[J]. Bioorg Med Chem, 2011,19(18):5352-5360.

[9] HU Z X,AN Q,LI K F,et al. Identification, Synthesis, and strategy for minimization of potential impurities in the preclinical Anti-HBV drug Y101[J]. Org Process Res Dev, 2013,17(9):1156-1167.

(下转第 452 页)