

# 吡咯烷类神经氨酸酶抑制剂的设计、合成与初步活性研究

张杰<sup>1</sup>, 王强<sup>1</sup>, 徐文方<sup>1\*</sup>, 刘艾林<sup>2</sup>, 杜冠华<sup>2</sup> (1. 山东大学药学院, 济南 250012; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 10050)

**摘要:**目的 合成新型吡咯烷类神经氨酸酶抑制剂, 并测定其抑制神经氨酸酶的活性。方法 以 L-羟脯氨酸为原料, 合成一系列神经氨酸酶抑制剂, 并用高通量活性筛选方法检测其对神经氨酸酶的抑制活性。结果 设计、合成了 18 个新型的吡咯烷类化合物, 其结构经核磁共振氢谱及质谱确定, 并发现了几个具有较好活性的化合物。结论 吡咯烷类化合物对神经氨酸酶有较高的抑制活性, 值得进一步研究。

**关键词:** 吡咯烷; 神经氨酸酶; 抑制剂; 流感病毒; 活性研究

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2008)04-0314-05

## Design, Synthesis, and Activity Study of Pyrrolidine Derivatives as Neuraminidase Inhibitors

ZHANG Jie<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>1</sup>, XU Wen-fang<sup>1\*</sup>, LU Ai-lin<sup>2</sup>, DU Guan-hua<sup>2</sup> (1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Institute of Materia, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 10050, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To synthesize a series of novel pyrrolidine derivatives as neuraminidase inhibitors and test their inhibitory activities against neuraminidase. **METHODS** A series of pyrrolidine derivatives were synthesized from L-hydroxyproline, and the

$$\ln K_2 / K_1 = H(1/t_1 - 1/t_2) / R \quad (2)$$

$$G = -RT \ln K \quad (3)$$

$$S = (H - G) / T \quad (4)$$

式中  $K_1$ ,  $K_2$  为不同温度时药物与蛋白的结合常数,  $G$  为 Gibbs 自由能,  $H$  为焓变,  $S$  为熵变。根据不同温度下测定的  $K$  值, 可求得  $H$ ,  $G$  和  $S$ 。本实验分别测定了 11, 37 下苯磺酸左旋氨氯地平与 HSA 的结合常数, 分别为 175 307.30 和 29 627.84 ( $n = 3$ ), 经计算得  $H = -50.07 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $G = -28.51 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $S = -75.92 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

根据 Ross 等<sup>[8]</sup>的观点:  $S > 0$ , 可能是疏水和静电作用力;  $H > 0$  或较小,  $S > 0$ , 为静电作用力;  $H < 0$  时静电作用力为主要作用力。由此推测苯磺酸氨氯地平与 HSA 的结合以静电作用为主。

### 3.6 苯磺酸氨氯地平对 HSA 荧光猝灭机制的讨论

人血清白蛋白由 585 个氨基酸残基组成, 分子中含 17 个二硫键。苯磺酸氨氯地平分子中含有  $-NH$  和  $-NH_2$ , 可以和血清白蛋白中氨基酸残基上的  $-NH$  或者  $-OH$  形成氢键。形成氢键后, 血清白蛋白的分子结构将发生一定的变化, 从而导致荧

光下降。

### REFERENCES

- [1] SHI W B, LAI Y S, ZHANG Y H. Synthesis of amlopidine besylate [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2006, 16 (3): 161-164.
- [2] LI N A H, FENG A R, TANG K, et al. Effect of pH on the interaction of adriamycin and human serum albumin [J]. *J Wuhan Univ* (武汉大学学报), 2005, 51 (6): 749-752.
- [3] ZHAO Y Y, YANG G L, LI H Y, et al. Study of protein binding of amlopidine and levamlodipine in human plasma albumin and bovine serum albumin solution by high performance capillary electrophoresis frontal analysis [J]. *Chin J*, 2003, 5 (1): 4-5.
- [4] YAN C N, TONG J Q, XING D, et al. Studies on the binding reaction features between pefloxacin and bovine serum albumin by fluorescence spectrophotometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2006, 34 (6): 796-800.
- [5] YU T Z, TAO Z Y. Fluorescence study on the interaction of salicylic acid and human serum albumin [J]. *Spectrosc Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 1999, 19 (3): 453-455.
- [6] XU W X, PANG Y H, SHUANG S M. Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with hydrochlorothiazide [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, 32 (12): 1571-1574.
- [7] LI N, WEI Y J. Developments of fluorescence study on the combination of drugs with serum albumin [J]. *J Hebei Norm Univ (Nat Sci Edition)* (河北师范大学学报·自然科学版), 2006, 27 (2): 176-180.
- [8] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamic of protein in association reaction: force contribution to stability [J]. *Biol Chem*, 1981, 20: 3096-3102.

(收稿日期: 2007-01-08)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (36072541)

作者简介: 张杰, 男, 硕士, 博士研究生 \* 通讯作者: 徐文方, 男, 博士生导师

TeL: (0531) 88380060

E-mail: sdzj@mail.sdu.edu.cn

neuraminidase inhibitory activities of these compounds were tested using high throughput screening. **RESULTS** 18 Pyrrolidine derivatives were designed and synthesized. The basic structures of these compounds were verified by  $^1\text{H-NMR}$  and MS. Several compounds exhibited potent neuraminidase inhibitory activities. **CONCLUSION** Pyrrolidine derivatives exhibited potent neuraminidase inhibitory activities, and is worth of further investigation.

**KEY WORDS:** pyrrolidine; neuraminidase; inhibitor; influenza virus; activity study

流感是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 传染性强、发病率高, 严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。流感病毒分为 A, B, C 3 型, 其中 A 型可以在鸟类和哺乳类宿主间传播, 是对人类危害最大的亚型, 目前正在流行的 H5N1 禽流感即属于这一亚型。在发现神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抑制剂之前, 流感的治疗及预防仅限于金刚烷胺/金刚乙胺和病毒疫苗等方法。但这些方法都有很大的局限: 金刚烷胺/金刚乙胺的作用靶点 M2 蛋白仅存在于 A 型流感中, 因而对 B 型流感无效, 而且这类药物有比较严重的中枢神经系统副作用并很快出现耐药病毒株; 而疫苗则因流感病毒的抗原易变性对新产生的流感病毒株无效。

NA<sup>[2]</sup>是存在于流感病毒 A 和 B 表面的糖蛋白, 在病毒的感染和复制过程中起关键酶的作用<sup>[3]</sup>。研究发现, NA 起催化作用的活性位点氨基酸序列是高度保守的, 而且 NA 对流感病毒的感染和复制过程是必需的, 抑制 NA 可以干扰和阻断病毒的复制, 从而达到治疗流感的目的。本实验在文献调研的基础上, 以 4 羟基-L 脯氨酸为原料, 设计、合成了一系列吡咯烷类 NA 抑制剂。并通过体外 NA 抑制活性筛选, 发现所有的化合物均具有 NA 抑制活性, 其中化合物 (3) 和 (9) 活性较好, 化合物 (3) 的  $\text{IC}_{50}$  为  $8.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 化合物 (9) 的  $\text{IC}_{50}$  为  $22.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器

Bruker Avance 600 型核磁共振波谱仪, API 4000 型质谱仪, X-6 型数字显微熔点测定仪。

### 1.2 试剂

实验所用试剂均为化学纯; 活性测试所用神经氨酸酶由粤防 72-432 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) 甲型流感病毒株、济防 90-15 甲型流感病毒株和四川 2000-38 乙型流感病毒株制备。

## 2 方法与结果

### 2.1 化学合成

本实验以 4 羟基-L 脯氨酸 (2) 为原料, 利用经典的二肽合成方法, 将 4 羟基-L 脯氨酸与含有疏水

侧链的氨基酸缩合得到二肽; 然后经过一系列甲磺酰化、叠氮化、氢化还原反应将 4 羟基-L 脯氨酸的羟基变为构型翻转的氨基; 而 4 羟基-L 脯氨酸的羧基则形成甲酯或羟肟酸从而得到目标化合物, 根据氨基酸侧链的不同, 目标化合物可分为 A, B, C 3 个系列。化合物的合成路线见图 1。

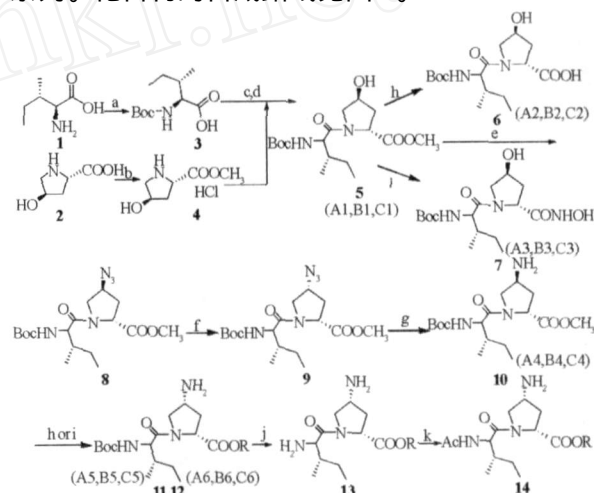


图 1 目标化合物的合成路线

试剂条件: a - (Boc)<sub>2</sub>O, NaOH/H<sub>2</sub>O, THF, 25 ; b - MeOH, HCl; c - DCC, HOBT, THF, 0 ; d - NMM, THF; e - MsCl, Et<sub>3</sub>N, DCM; f - NaN<sub>3</sub>, DMF, 65 ; g - 5% Pd-CaCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, MeOH; h - R = OH, MeOH, NaOH/H<sub>2</sub>O, 25 ; i - R = NHOH, NH<sub>2</sub>OK, MeOH; j - HCl/EtOAc, EtOAc, 25 ; k - Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM

Fig. 1 Synthetic routes of the target compounds

Reagents and conditions: a - (Boc)<sub>2</sub>O, NaOH/H<sub>2</sub>O, THF, 25 ; b - MeOH, HCl; c - DCC, HOBT, THF, 0 ; d - NMM, THF; e - MsCl, Et<sub>3</sub>N, DCM; f - NaN<sub>3</sub>, DMF, 65 ; g - 5% Pd-CaCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, MeOH; h - R = OH, MeOH, NaOH/H<sub>2</sub>O, 25 ; i - R = NHOH, NH<sub>2</sub>OK, MeOH; j - HCl/EtOAc, EtOAc, 25 ; k - Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM

**2.1.1 Boc-Ile (3) 的合成<sup>[3]</sup>** 将 7.86 g (60 mmol) L 异亮氨酸 (1) 溶于 60 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液中, 加入 60 mL 四氢呋喃, 于冰水浴中冷却, 搅拌条件下滴加含 Boc 酐 14.4 g (66 mmol) 的四氢呋喃溶液。在室温下搅拌直到反应完全 (TLC 监测), 真空抽去四氢呋喃, 冰水浴中加入 150 mL 乙酸乙酯, 柠檬酸酸化至 pH 2 ~ 3, 分液, 水相用乙酸乙酯 (50 mL × 3) 提取, 合并有机相, 饱和 NaCl 溶液洗涤 (40 mL × 3), 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 真空抽干, 残余物 (油状物) 用无水乙醚析晶, 乙酸乙酯和石油醚重结晶, 干燥, 得到产物 (产率 91.2%, mp 68 ~ 70

).

**2.1.2 Hyp-(OCH<sub>3</sub>)·HCl(4)的合成<sup>[4]</sup>** 将 20 g (0.15 mol) 4-羟基-L-脯氨酸(2)混悬于 150 mL 无水甲醇中,通 HCl 至溶液澄清,回流 3 h,旋转蒸除甲醇至析出白色沉淀,低温静置 2 h 后,抽滤得白色结晶,分别用丙酮、乙醚洗涤滤饼,真空干燥得白色结晶 25.0 g (产率 90%, mp 162~164 )。

**2.1.3 BH-OH(COOCH<sub>3</sub>)(5)的合成<sup>[5]</sup>** 将 Boc-Ile(3) 4.62 g (20 mmol) 溶于适量的无水四氢呋喃中,加入 *N*-羟基苯并三氮唑(HOBt) 2.92 g (21.6 mmol),冰盐浴条件下,滴加二环己基碳二亚胺(DCC) 4.48 g (21.6 mmol) 的四氢呋喃溶液,0 条件下反应 24 h (TLC 监测),滤除 DCU (二环己基脲),滤液直接用于下步反应。

将 Hyp-(OCH<sub>3</sub>)·HCl(4) 3.64 g (20 mmol) 混悬于 30 mL 无水四氢呋喃,加入 2.4 g *N*-甲基吗啡啉(NMM),室温反应 0.5 h,加入上述滤液,室温反应 24 h (TLC 监测)。停止反应,过滤,滤液减压浓缩后得淡黄色油状物,溶于 150 mL 乙酸乙酯,依次用 10% 枸橼酸、饱和 NaCl 溶液,饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤。取有机相,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,柱色谱分离,得 5.96 g 无色油状物 (产率 83.2%)。

**2.1.4 BH-OH(COOH)(6)的合成<sup>[8]</sup>** 将 7.16 g (20 mmol) 化合物(5)溶于 100 mL 甲醇中,加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液 20 mL,室温搅拌反应 24 h,用体积分数 80% 的醋酸水溶液酸化至 pH 5~6,减压蒸除溶剂。加入 50 mL 乙酸乙酯和 100 mL 体积分数 10% 的枸橼酸水溶液,充分振摇,分取乙酸乙酯层,酸水层再用 50 mL 乙酸乙酯提取 2 次,合并有机相,饱和 NaCl 溶液洗涤,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,减压蒸除溶剂,得 5.46 g 白色固体。(产率 79.3%, mp 79~80 )。

**2.1.5 BH-(OH)(CONHOH)(7)的合成<sup>[9]</sup>** 将 7.16 g (20 mmol) 化合物(5)溶于 100 mL 无水甲醇中,加入 15 mL NH<sub>2</sub>OK 的甲醇溶液(按 Fieser and Fieser, Vol 1, P 478 制备),室温搅拌,24 h 后加入 7.50 g 硅胶,旋转蒸除溶剂,所得干粉硅胶上减压硅胶柱,二氯甲烷-甲醇(10:1~5:1)洗脱,得白色固体 4.49 g,遇 FeCl<sub>3</sub> 溶液显红色(产率 62.5%, mp 94~95 )。NH<sub>2</sub>OK 的制备:14 mL KOH 的饱和无水甲醇溶液滴加到 24 mL 含有 4.67 g (67 mmol) 盐酸羟胺的无水甲醇溶液中,控制内温低于 40 ,滴加完毕,冷却反应液,滤除白色 KCl 沉淀,所得滤液密闭保存。

**2.1.6 BH-OSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(COOCH<sub>3</sub>)(8)的合成** 将 7.16 g (20 mmol) 化合物(5)溶于 40 mL 无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,冰浴条件下加入 5 mL 无水 Et<sub>3</sub>N,逐滴加入 10 mL 含有 1.5 mL 甲磺酰氯的无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液,撤去冷浴,室温搅拌 4 h 后,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 稀释反应液,分别用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液,蒸馏水,饱和食盐水洗涤有机相,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。蒸除有机相得浅黄色油状物,柱色谱分离,得 7.18 g 无色油状物(产率 82.3%)。

**2.1.7 BH-N<sub>3</sub>(COOCH<sub>3</sub>)(9)的合成<sup>[6]</sup>** 将 8.72 g (20 mmol) 化合物(8)溶于 30 mL 无水 DMF 中,加入 1.30 g (20 mmol) 研细的 NaN<sub>3</sub>,该混合体系于 55~60 反应 10 h。冷却反应液,倾入冰水中,振荡,析出白色沉淀,乙酸乙酯(30 mL ×4)提取,合并有机相,饱和食盐水洗涤,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。抽滤,旋转蒸除滤液,得黄褐色的泡状固体,柱色谱分离,得 4.86 g 淡黄色固体。产率 63.5%。

**2.1.8 BH-NH<sub>2</sub>(COOCH<sub>3</sub>)(10)的合成<sup>[7]</sup>** 将 7.66 g (20 mmol) 化合物(9)溶于 250 mL 无水甲醇中,加入 0.77 g 5% Pd/CaCO<sub>3</sub>,通氢气进行氢化还原,室温反应 24 h,间歇排除生成的 N<sub>2</sub>,滤液浓缩得淡黄色油状物,柱色谱分离,得 6.2 g 无色油状产品。产率 60.8%。

按“2.1.5”相同方法得到 BH-NH<sub>2</sub>(COOH)(11) (产率 76.3%, 160~161.8 ) 和 BH-NH<sub>2</sub>(CONHOH)(12) (产率 61.3%, mp 115.8~116.9 )。

本实验所合成的 18 个吡咯烷类神经氨酸酶抑制剂笔者均未见文献报道,其<sup>1</sup>H-NMR 数据见表 1。

## 2.2 初步活性实验结果

本实验所合成的 18 个化合物由中国医学科学院国家药物筛选中心杜冠华研究员的课题组进行了体外神经氨酸酶抑制活性筛选。所用的神经氨酸酶由粤防 72-432 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) 甲型流感病毒株、济防 90-15 甲型流感病毒株和四川 2000-38 乙型流感病毒株制备。2'-((4-methylumbelliferyl)-*α*-D-acetylneuraminic acid)MUNANA 是流感病毒 NA 的特异性底物,在 NA 的作用下产生的代谢产物在 355 nm 照射激发下,可以产生 460 nm 荧光,荧光强度的变化,可以灵敏地反应 NA 的活性。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{酶值} - \text{空白值}) - (\text{实验值} - \text{空白值})}{\text{酶值} - \text{空白值}} \times 100\%$$

其对神经氨酸酶的抑制活性结果见表 2。

表 1 化合物的<sup>1</sup>H-NMR、熔点、MS数据Tab. 1 <sup>1</sup>H-NMR, melting point and MS data of compounds

Compounds	<sup>1</sup> H-NMR ( ) (DMSO-d <sub>6</sub> )	ES/MS	mp/
1-A1	1.371 (s, 9H); 0.864 (d, J = 4.08 Hz, 3H); 0.813 6 (t, J = 7.24 Hz, 3H); 1.086 (m, 2H); 1.582 (m, 1H); 1.940 (m, 1H); 2.085 (m, 1H); 3.602 (s, 3H); 3.633 (d, J = 18.60 Hz, 1H); 4.042 (m, 2H); 5.203 (m, 1H); 4.344 (t, J = 7.50 Hz, 1H); 6.741 (d, J = 9.0 Hz, 1H)	M + 1 (174.2)	oil
2-A2	1.374 (s, 9H); 0.807 (t, 3H); 0.870 (d, J = 6.60 Hz, 3H); 1.043 (m, 2H); 1.686 (m, 1H); 1.886 (m, 1H); 2.089 (m, 1H); 3.641 (m, 1H); 4.057 (m, 2H); 5.173 (m, 1H); 4.230 (t, J = 8.10 Hz, 1H); 6.782 (d, J = 9.00 Hz, 1H)	M + 1 (345.5)	79 ~ 80
3-A3	1.369 (s, 9H); 0.801 (t, J = 7.28 Hz, 3H); 0.839 (d, J = 6.43 Hz, 3H); 1.056 (m, 2H); 1.683 (m, 1H); 1.918 (m, 1H); 2.075 (m, 1H); 3.616 (m, 1H); 3.999 (m, 1H); 4.197 (m, 1H); 5.075 (m, 1H); 4.338 (t, J = 7.32 Hz, 1H); 6.685 (d, J = 8.73 Hz, 1H)	M + 1 (360.6)	94 ~ 95
4-A4	1.365 (s, 9H); 0.822 (t, J = 7.50 Hz, 3H); 0.889 (d, J = 6.60 Hz, 3H); 1.097 (m, 2H); 1.565 (m, 1H); 1.716 (m, 1H); 2.336 (m, 2H); 3.175 (m, 2H); 3.424 (m, 1H); 4.011 (m, 1H); 4.259 (t, J = 8.10 Hz, 1H); 6.872 (d, J = 8.70 Hz, 1H)	M + 1 (358.5)	oil
5-A5	1.361 (s, 9H); 0.811 (t, J = 7.24 Hz, 3H); 0.864 (d, J = 6.54 Hz, 3H); 1.117 (m, 2H); 1.698 (m, 1H); 1.886 (m, 1H); 2.279 (m, 1H); 3.854 (m, 2H); 4.056 (m, 1H); 3.951 (t, J = 8.70 Hz, 1H); 5.763 (m, 1H); 6.933 (d, J = 8.70 Hz, 1H)	M - 1 (342.5)	160 ~ 161
6-A6	1.362 (s, 9H); 0.808 (t, J = 7.24 Hz, 3H); 0.868 (d, J = 6.69 Hz, 3H); 1.093 (m, 2H); 1.489 (m, 1H); 1.664 (m, 1H); 2.302 (m, 1H); 3.395 (m, 1H); 3.569 (m, 1H); 3.962 (m, 2H); 4.132 (t, J = 6.26 Hz, 1H); 6.875 (d, J = 8.22 Hz, 1H)	M + 1 (359.6)	115 ~ 116
7-B1	1.301 (s, 9H); 3.615 (s, 3H); 1.897 (m, 1H); 2.063 (m, 1H); 2.693 (m, 1H); 2.785 (m, 1H); 4.031 (d, J = 7.11 Hz, 1H); 4.057 (d, J = 5.68 Hz, 1H); 4.353 (m, 1H); 4.357 (m, 1H); 5.206 (t, J = 3.73 Hz, 1H); 6.918 (m, 1H); 7.184 (m, 2H); 7.282 (m, 2H); 6.917 (d, 1H, J = 7.56 Hz, 1H)	M + 1 (393.5)	oil
8-B2	1.295 (s, 9H); 1.916 (m, 1H); 2.109 (m, 1H); 2.754 (m, 1H); 2.874 (m, 1H); 3.562 (d, J = 3.64 Hz, 1H); 3.624 (d, J = 4.52 Hz, 1H); 4.293 (m, 1H); 4.343 (m, 1H); 5.167 (t, J = 3.72 Hz, 1H); 6.948 (m, 1H); 7.194 (m, 2H); 7.279 (m, 2H); 12.423 (s, 1H); 6.948 (d, J = 8.52 Hz, 1H)	M + 1 (379.6)	96 ~ 97
9-B3	1.288 (s, 9H); 1.905 (m, 1H); 1.966 (m, 1H); 2.701 (m, 1H); 2.878 (m, 1H); 3.528 (d, J = 4.64 Hz, 1H); 3.638 (d, J = 4.52 Hz, 1H); 4.245 (t, J = 7.54 Hz, 1H); 4.366 (m, 1H); 5.114 (m, 1H); 6.931 (m, 1H); 7.217 (m, 2H); 7.281 (m, 2H); 8.805 (s, 1H); 10.535 (s, 1H); 6.931 (d, J = 8.48 Hz, 1H)	M + 1 (394.5)	104 ~ 105
10-B4	1.289 (s, 9H); 3.611 (s, 3H); 1.593 (m, 1H); 2.404 (m, 1H); 2.756 (m, 1H); 2.912 (m, 1H); 3.763 (d, J = 5.88 Hz, 1H); 3.849 (d, J = 4.44 Hz, 1H); 4.300 (t, J = 7.84 Hz, 1H); 4.101 (m, 1H); 4.373 (m, 1H); 7.082 (m, 1H); 7.192 (m, 2H); 7.298 (m, 2H); 6.991 (d, J = 8.32 Hz, 1H)	M + 1 (392.5)	oil
11-B5	1.295 (s, 9H); 1.977 (m, 1H); 2.235 (m, 1H); 2.749 (m, 1H); 2.916 (m, 1H); 3.515 (d, J = 5.52 Hz, 1H); 3.859 (d, J = 5.12 Hz, 1H); 3.791 (m, 1H); 4.099 (m, 1H); 4.543 (t, J = 7.78 Hz, 1H); 7.040 (m, 1H); 7.193 (m, 2H); 7.265 (m, 2H); 8.902 (br, 2H); 7.040 (d, J = 8.52 Hz, 1H)	M - 1 (376.4)	175 ~ 176
12-B6	1.289 (s, 9H); 1.727 (m, 1H); 2.379 (m, 1H); 2.752 (m, 1H); 2.858 (m, 1H); 3.521 (d, J = 3.56 Hz, 1H); 3.856 (d, J = 5.68 Hz, 1H); 3.658 (m, 1H); 4.216 (m, 1H); 4.295 (t, J = 7.68 Hz, 1H); 7.091 (m, 1H); 7.193 (m, 2H); 7.259 (m, 2H); 7.091 (d, J = 8.24 Hz, 1H)	M - 1 (391.0)	119 ~ 120
13-C1	1.375 (s, 9H); 0.837 (d, J = 6.51 Hz, 3H); 0.895 (d, J = 6.63 Hz, 3H); 1.908 (m, 2H); 2.098 (m, 1H); 3.599 (s, 3H); 3.647 (m, 2H); 4.338 (t, J = 7.81 Hz, 1H); 4.031 (m, 1H); 6.681 (d, J = 8.74 Hz, 1H)	M + 1 (345.5)	oil
14-C2	1.375 (s, 9H); 0.834 (d, J = 6.64 Hz, 3H); 0.896 (d, J = 6.72 Hz, 3H); 1.908 (m, 2H); 2.086 (m, 1H); 3.616 (m, 2H); 4.035 (m, 1H); 4.260 (t, J = 8.12 Hz, 1H); 5.139 (m, 1H); 6.648 (d, J = 8.76 Hz, 1H); 12.358 (s, 1H)	M + 1 (331.5)	171 ~ 176
15-C3	1.374 (s, 9H); 0.822 (d, J = 6.52 Hz, 3H); 0.890 (d, J = 6.56 Hz, 3H); 1.867 (m, 2H); 1.914 (m, 1H); 3.606 (m, 2H); 3.997 (m, 1H); 4.202 (t, J = 7.84 Hz, 1H); 5.076 (m, 1H); 6.600 (d, J = 8.64 Hz, 1H); 8.768 (s, 1H); 10.523 (s, 1H)	M + 1 (346.4)	90 ~ 91
16-C4	1.367 (s, 9H); 0.863 (d, J = 6.57 Hz, 3H); 0.921 (d, J = 6.62 Hz, 3H); 3.602 (s, 3H); 1.546 (m, 1H); 1.940 (m, 1H); 2.351 (m, 1H); 3.165 (m, 1H); 3.432 (m, 1H); 3.992 (m, 2H); 4.266 (t, J = 8.16 Hz, 1H); 6.753 (d, J = 8.46 Hz, 1H)	M + 1 (344.6)	oil
17-C5	1.364 (s, 9H); 0.876 (d, J = 4.72 Hz, 3H); 0.911 (d, J = 6.64 Hz, 3H); 1.912 (m, 2H); 2.219 (m, 1H); 3.616 (m, 1H); 3.778 (m, 2H); 4.058 (m, 1H); 3.906 (t, J = 8.32 Hz, 1H); 6.801 (d, J = 8.44 Hz, 1H); 8.743 (br, 2H)	M + 1 (330.5)	235 ~ 236
18-C6	1.362 (s, 9H); 0.853 (d, J = 6.56 Hz, 3H); 0.910 (d, J = 6.60 Hz, 3H); 1.894 (m, 2H); 2.230 (m, 1H); 3.236 (m, 1H); 3.372 (m, 1H); 3.926 (m, 2H); 4.079 (t, J = 7.40 Hz, 1H); 6.737 (d, J = 8.20 Hz, 1H)	M + 1 (345.6)	108 ~ 109

18个化合物经神经氨酸酶抑制活性初步评价,从中选出10个活性较高的化合物进行复筛,根据检测结果,4个化合物的活性具有浓度依赖性,可计算IC<sub>50</sub>值,其中化合物(3)和(9)活性较好,化合物(3)的IC<sub>50</sub>为8.67 mg · L<sup>-1</sup>,化合物(9)的IC<sub>50</sub>为22.22 mg · L<sup>-1</sup>。下面是我们利用SYBYL软件将自行设计、合成的目标化合物与神经氨酸酶对接的效果图,结果见图2,采用的是神经氨酸酶与化合物扎那米韦(Zanamivir)形成的晶体复合物结构(PDB ID: 1NNC)。

首先,通过摸索我们找到一个可以较好地还原原晶体复合物中Zanamivir的结合构象的参数条件,然后在相同的条件下对我们的化合物进行对接。从

图2(b)中可以看出,化合物3-A3与NA的ARG152, ASP151, ARG156, ARG118, TYR406, ARG371都具有潜在的氢键作用,氢键键长(1.84 ~ 2.64 Å)。

### 3 讨论

通过对活性结果的分析可以看出,利用4羟基-L脯氨酸的吡咯烷母环,通过对其结构进行修饰,可以得到能够与流感病毒NA相互作用,从而抑制NA在病毒复制和感染过程中作用的化合物。活性比较显示,这些化合物的1位羧基基团能够增强化合物的NA抑制活性,而4位的羟基变为氨基的过程中,构型发生了翻转,而活性结果显示,氨基类化合物的活性弱于羟基化合物,这可能与其4位C的构

表 2 化合物的结构及对神经氨酸酶的抑制活性

Tab. 2 Structure and NA inhibitory activity of compounds

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Inhibition ratio	
				/mg · L <sup>-1</sup>	/%
1-A1	Boc-Ile	OMe	OH	10	51.0
2-A2	Boc-Ile	OH	OH	10	50.1
3-A3	Boc-Ile	NHOH	OH	10	91.8
4-A4	Boc-Ile	OMe	NH <sub>2</sub>	10	35.1
5-A5	Boc-Ile	OH	NH <sub>2</sub>	10	45.7
6-A6	Boc-Ile	NHOH	NH <sub>2</sub>	10	39.3
7-B1	Boc-Phe	OMe	OH	10	46.2
8-B2	Boc-Phe	OH	OH	10	47.2
9-B3	Boc-Phe	NHOH	OH	10	88.0
10-B4	Boc-Phe	OMe	NH <sub>2</sub>	10	39.8
11-B5	Boc-Phe	OH	NH <sub>2</sub>	10	39.6
12-B6	Boc-Phe	NHOH	NH <sub>2</sub>	10	34.2
13-C1	Boc-Val	OMe	OH	10	51.8
14-C2	Boc-Val	OH	OH	10	54.0
15-C3	Boc-Val	NHOH	OH	10	57.1
16-C4	Boc-Val	OMe	NH <sub>2</sub>	10	33.8
17-C5	Boc-Val	OH	NH <sub>2</sub>	10	36.6
18-C6	Boc-Val	NHOH	NH <sub>2</sub>	10	47.1
Defeiaudio				5	94.4

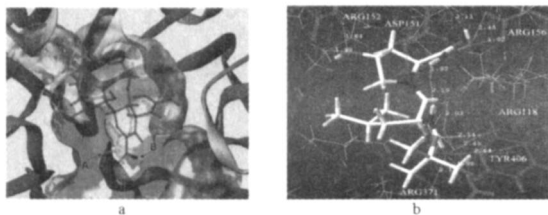


图 2 化合物 3-A3 与 NA 的对接模式图

a - 化合物扎那米韦 (A) 和 3-A3 的结合模式的比较; b - 化合物 3-A3 与 NA 的氢键结合

Fig. 2 Superposition of compound 3-A3 bound to NA

a - superposition of compound Zanamivir (A) and 3-A3 (B) -bound to NA; b - binding model of 3-A3 with NA

### 型相关。

本实验以 4 羟基-L-脯氨酸为原料,采用经典的二肽合成的方法设计、合成一系列二肽类小分子神经氨酸酶抑制剂。与国外研究中所采用的唾液酸、莽草酸、奎宁酸等原料相比,具有廉价、易得的优点。同时 4 羟基-L-脯氨酸本身的手性构型适合神经氨酸酶的作用模式,这也避免了手性合成与手性拆分的问题。

本实验结果显示,以 4 羟基-L-脯氨酸为起始原料得到的一系列吡咯烷类二肽化合物具有不同程度的流感病毒神经氨酸酶抑制活性,且发现 2 个具有较低的 IC<sub>50</sub> 值的化合物 (3) 和 (9)。这为抗流感的研究开辟了一条新的道路,同时也为进一步基于结构的、合理的药物设计,寻找高效的对流感病毒特异选择性强的神经氨酸酶抑制剂提供了有力的理论依据。

根据活性结果与化合物的构型,我们会进行进一步的构效关系研究,在合成和评价了这些化合物的工作基础上,借助计算机辅助药物设计方法建立起 NA 与其抑制剂的 3D-QSAR 模型用于先导化合物的结构优化,并对化合物进行进一步的结构修饰,再通过体内活性筛选发现能够作为抗流感病毒的创新药物。

### REFERENCES

- [1] OXFORD J S, NOVELL I P, SEFTON A. New millennium antivirals against pandemic and epidemic influenza: the neuraminidase inhibitors[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2002, 13(4): 205-217.
- [2] SMITH B J, COLMAN P M, VON HILTEN M, et al. Analysis of inhibitor binding in influenza virus neuraminidase [J]. *Protein Sci*, 2001, 10(4): 689-696.
- [3] HAA NA G, LOHSE A, BUCHARDT O, et al. Peptide nucleic acids containing thymine monomers derived from chiral amino acids: hybridization and solubility properties of D-lysine[J]. *Angew Chem Int Ed Engl Comm*, 1995, 35(17): 1939-1945.
- [4] JORDIS (1S, 4S) -2-thia-5-azabicyclo[2.2.1]heptane[J]. *Indian J Chem Sec B April*, 1989, 42(2): 294-297.
- [5] ISHIDA H, QIZ, SOKABE M, et al. Molecular design and synthesis of artificial ion channels based on cyclic peptides containing unnatural amino acids [J]. *J Org Chem*, 2001, 66(9): 2978-2989.
- [6] RANER H D. Synthesis of the hydroxyamino sugar of calicheamicins[J]. *Liebigs Ann Chem*, 1993, 32(9): 2117-2124.
- [7] BOSCH I, COSTA A M, MARTIN M, et al. Reduction of azides to amines mediated by tin bis-(1, 2-benzenedithiolate) [J]. *Org Lett*, 2000, 2(3): 3397-3399.
- [8] WEBB T R, EIGENBROT C. Conformationally restricted arginine analogues[J]. *J Org Chem*, 1991, 56(9): 3009-3016.
- [9] LUZYAN N K V, KUKUSHKIN V Y, KUZNETSOV M L, et al. Novel reactivity mode of hydroxamic acids: a metallapinner reaction[J]. *Inorg Chem*, 2002, 41(11): 2981-2986.

(收稿日期: 2006-12-21)

## 《中国药学杂志》获 2006 年“百种中国杰出学术期刊”称号

根据 2006 年度中国科技论文与引文数据库 (CSTPCD 2006) 统计结果, 本刊荣获 2006 年“百种中国杰出学术期刊”称号。