

2-芳基-3-羰基喹诺酮: 新型 HCV NS5B 多聚酶抑制剂的设计、合成和活性评估

王沈丰^a 林建平^a 何佩岚^b 左建平^{*b} 龙亚秋^{*a}

(^a中国科学院受体结构与功能重点实验室 中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

(^b新药研究国家重点实验室 中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

摘要 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, 简称 HCV)编码的多聚酶 NS5B 是丙肝病毒 RNA 复制的必需酶, 已成为抗丙肝药物设计的有效靶标。基于 HCV NS5B 多聚酶的活性位点需要结合二价金属离子作为催化辅因子的机理, 含有金属螯合模段的喹诺酮酸骨架被合理用来发现新结构的非核苷 HCV 抑制剂。根据喹诺酮酸抑制剂与 NS5B 多聚酶的结合模式, 我们第一次设计在喹诺酮酸的 2-位引入疏水基团, 同时调节 N-1, C-3 和 C-7 位的取代基结构, 运用我们发展的一锅煮新方法合成了结构多样的喹诺酮酸衍生物, 并运用 HCV 体外感染实验系统进行抗病毒活性的评估, 我们开展了系统的构效关系研究, 发现了新结构类型的非核苷 HCV 抑制剂。这些 2-芳基-1-环丙基/烯丙基喹诺酮酸衍生物在低浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下能有效抑制 HCV 病毒在宿主细胞 Huh7.5.1 的复制, 并具有 2~6 倍的安全窗口, 有进一步优化成抗 HCV 候选药物的潜力。

关键词 HCV NS5B 聚合酶; 2-取代喹诺酮酸; 非核苷抑制剂; 直接作用抗病毒药物; 变构位点

2-Aryl-3-carbonylquinolones: Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel HCV NS5B Polymerase Inhibitors

Wang, Shenfeng^a Lin, Jianping^a He, Peilan^b Zuo, Jianping^{*b} Long, Yaqiu^{*a}

(^a CAS Key Laboratory of Receptor Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

(^b State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

Abstract Hepatitis C virus (HCV) infection is a global health problem that impacts approximately 180 million individuals. Until recently the current therapy for treating HCV infection has been regular injections of pegylated α -interferon (PEG-IFN) with daily oral administration of ribavirin (RBV). However, PEG-IFN/RBV treatment is only effective for only 50% of genotype 1 patients and associated with significant adverse effects including fatigue, hemolytic anemia, depression, and flu-like symptoms. Therefore, the search for direct acting antivirals (DAAs) that are safe and effective has become an urgent endeavor. HCV NS5B polymerase, an essential enzyme for the HCV RNA replication, has emerged as an attractive and validated target for the direct HCV therapeutic intervention. Since NS5B polymerase needs a divalent metal ion as a cofactor in the active site for its catalytic function, the metal chelation motif-containing quinolone-3-carboxylic scaffold has been explored as a new class of non-nucleoside NS5B inhibitors. Two groups have recently reported a preliminary structure-activity relationship (SAR) study on the 4-quinolone-3-carboxylic acids as HCV NS5B inhibitors, just focused on the N-1, C-3 and C-6/7 substitutions. Based on the binding mode revealed by the cocrystal structure of the quinolone inhibitor bound to the NS5B enzyme, for the first time we proposed to introduce a hydrophobic group at C-2 position on the quinolone ring to improve the anti-HCV potency. By making use of the new method to synthesize 2-substituted quinolone-3-carboxylic acid derivatives recently developed by our group, we conducted a comprehensive SAR study on the 2-aryl-3-carbonylquinolone-based non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. Starting from the readily accessible amides and 3-oxo-3-arylpropanoates, structurally diverse 2-substituted quinolone-3-carboxylic acid derivatives were efficiently furnished by a tandem addition-elimination reaction/nucleophilic aromatic substitution reaction via an imine-enamine intermediate. The anti-HCV potency and cytotoxicity were evaluated in the HCV-infected host cells Huh7.5.1 assay system. To our delight, the incorporation of a hydrophobic aryl group into 2-position of the quinolone core really enhanced the inhibitory activity against the HCV replication in the host cells with a 2-fold selectivity over the cytotoxicity. Meanwhile, a small size hydrophobic group at N-1 position was favored for the 2-arylquinolone-derived NS5B inhibitors. Further structural variation was investigated on the C-3 and C-7 substituents, with an aromatic ester and an *N*-methyl piperazine being an opti-

* E-mail: yqlong@mail.shnc.ac.cn; jpzuo@mail.shnc.ac.cn

Received June 3, 2014; published June 17, 2014.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81325020, 81361120410).

项目受国家自然科学基金(Nos. 81325020, 81361120410)资助。

mal moiety, respectively. The global structural optimization at positions N-1, C-2, C-3 and C-7 resulted in the discovery of novel 2-aryl substituted quinolone inhibitors with low micromolar EC_{50} values to inhibit the replication of the HCV RNA in the host cell Huh7.5.1 and therapeutic indices of 2~6, providing a new promising lead for the further development into anti-HCV drug candidates.

Keywords HCV NS5B polymerase; 2-substituted quinolone-3-carboxylic acid; non-nucleoside inhibitor; direct acting anti-viral; allosteric site

1 引言

丙型肝炎病毒感染(hepatitis C virus, 简称 HCV)是威胁全球公共卫生安全的重大疾病, 全球有 1.7~2 亿丙肝病毒感染者, 并以每年 3 百万新增感染者的速率扩增, 而且每年有 30 万人死于丙肝导致的肝病^[1]. 大约 85% 的 HCV 感染者会发展成慢性肝炎^[2], 并有相当比例会进展成肝硬化, 其中 75% 的肝硬化患者最终发展为肝癌. 丙肝还是造成肝移植的最主要因素^[3].

目前, 临床上大多采用聚乙二醇化干扰素 α (pegylated interferon α) 和核苷类似物利巴韦林(ribavirin)联合用药治疗丙型肝炎, 但是只对 50% 的 HCV 基因 I 型病人有效^[4]. 而且, 干扰素和利巴韦林的联合治疗非常昂贵, 并有许多严重的副作用, 如疲倦发热、血液分析异常溶血性贫血和抑郁症等^[5]. 因此, 根据 HCV 的生命周期, 寻找特异性的、安全有效的直接作用抗病毒药物(Direct Acting Antivirals, 简称 DAA)是目前丙肝药物研发的迫切需求和重要方向.

最近几年, 由于病毒基因组学的发展, 以病毒复制周期的关键酶为靶标, 已有 4 个小分子抗丙肝药物被美国 FDA 批准上市, 结构见图 1^[6]. 其中, Boceprevir, Telaprevir 和 Simeprevir 是 HCV NS3/4A 蛋白酶抑制剂, Sofosbuvir 是第一个特异性针对 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂. 后者可以单独使用, 不需要与干扰素和利巴韦林构成联合用药方案, 而且临床疗效好^[6b,7], 因此受到抗病毒药物市场的追捧.

HCV NS5B 是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, 简称 RdRp), 催化丙肝病毒 RNA 的复制, 是当前抗丙肝药物研发的热点靶标^[8]. HCV NS5B 聚合酶抑制剂主要分为核苷/核苷酸类抑制剂和非核苷类抑制剂, 两者功能互补. 核苷/核苷酸类似物抑制剂结合于 NS5B 的活性位点, 竞争性地抑制 NS5B 聚合酶复制 RNA. 非核苷类抑制剂通过与 NS5B 的变构位点结合, 使 NS5B 蛋白构象改变, 从而阻止其复制 RNA. 目前, 两类抑制剂都有多个进入临床试验研究, 其中核苷酸类似物抑制剂 Sofosbuvir 于 2013 年 10 月获准用于丙肝患者的临床治疗, 展示了令人欣喜的疗

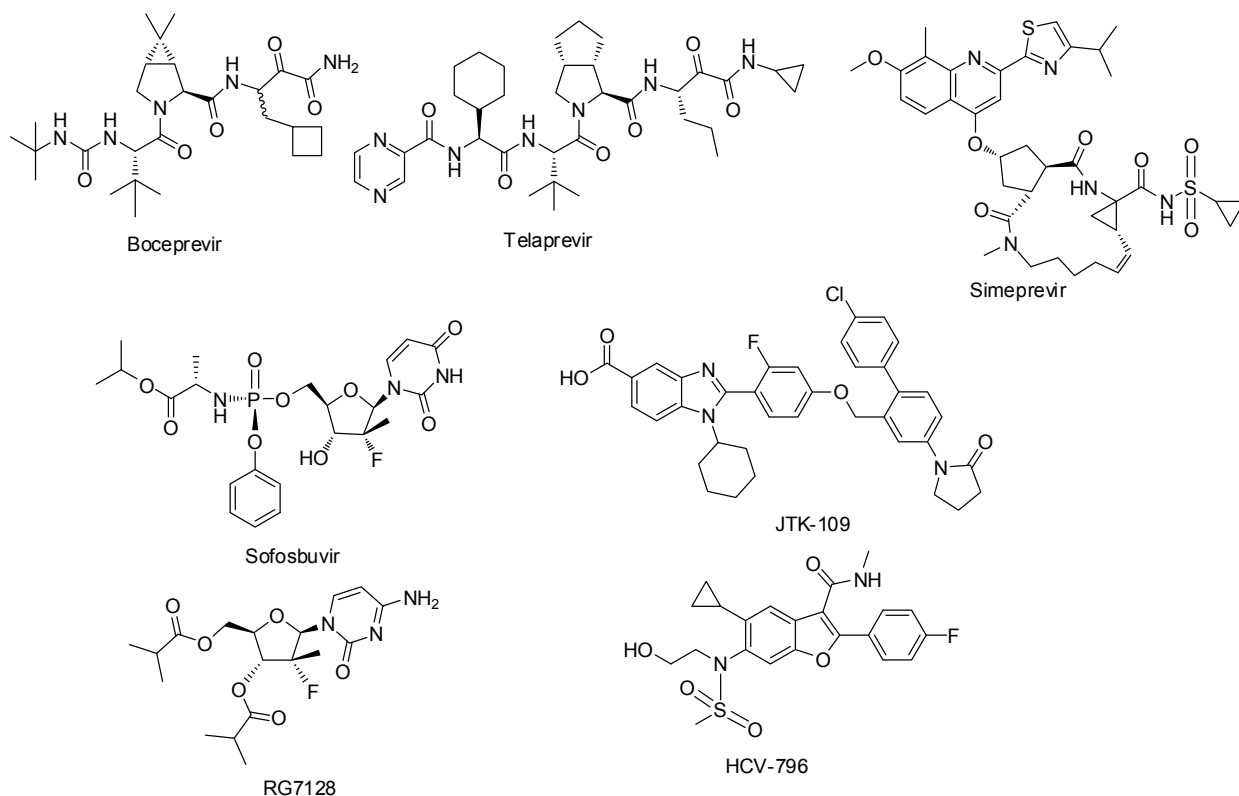


图 1 已上市的小分子抗丙肝药物以及临床在研的代表性 HCV NS5B 聚合酶抑制剂

Figure 1 Small molecule HCV NS3/4A protease and NS5B polymerase inhibitors launched and under clinical trials

效和广阔的应用前景^[7,9], 但一片 1000 美元的定价也令人咋舌。

我们课题组一直从事 HIV-1 整合酶抑制剂的发现和结构优化研究^[10]。令我们感兴趣的是, HCV NS5B 多聚酶与 HIV-1 整合酶拥有类似的氨基酸排列的催化活性位点, 并且都需要二价金属离子作为酶催化功能的金属辅因子^[7,11], 因此, 含有金属螯合模段(metal chelation motif)的化合物将可能同时抑制 HIV-1 整合酶和 HCV NS5B 多聚酶。以此为切入点, 我们可以从 HIV-1 整合酶抑制剂出发, 发现新结构的 HCV NS5B 多聚酶非核苷抑制剂。

这一设想在喹诺酮酸优势骨架上得以实现。喹诺酮酸结构广泛存在于药物和生物活性分子中, 如喹诺酮抗菌药物和抗艾滋病药物; 而且, 不同结构取代的喹诺酮衍生物表现出多种不同的生物活性, 如抗肿瘤、抗病毒(HIV, HSV)、抗焦虑以及作为 CB2 激动剂等, 因此, 喹诺酮骨架成为最具成药潜力的母核之一^[12]。上市的

HIV-1 整合酶抑制剂药物 Elvitegravir 含有喹诺酮酸核心骨架, 被认为是二价金属离子的结合模段。最近有文献报道, 通过适当的取代基结构修饰, 喹诺酮酸衍生物表现出有效的 HCV NS5B 多聚酶抑制活性以及对病毒 RNA 复制的抑制效果, 代表性结构见图 2^[13]。这些结构修饰主要是在 N-1, C-3 和 C-6/7 位引入取代基。根据抑制剂 **3** 与 NS5B 多聚酶结合的蛋白共晶体结构(PDB ID code: 3UDL, 图 2)^[13b], 这类喹诺酮抑制剂是作用于 NS5B 多聚酶大拇指区域的 NNI-2 变构结合位点, 喹诺酮环上 C-3 和 N-1 位上的芳香性取代基分别占据在 Leu419, Arg422, Met 423 和 Trp 528 组成的疏水口袋及 Leu 419, Val 485, Ala 486, Leu 489, Leu 497 和 Met 423 构成的次级疏水口袋。而喹诺酮 C-2 位处于两个疏水口袋之间的空腔, 尚未被占据。鉴于此, 我们首次设计在 C-2 位引入疏水基团, 并调节 N-1 和 C-3 位的取代基, 以期发现新结构的 HCV NS5B 聚合酶抑制剂, 进一步提升这类喹诺酮酸抑制剂的 HCV 抑制活性。

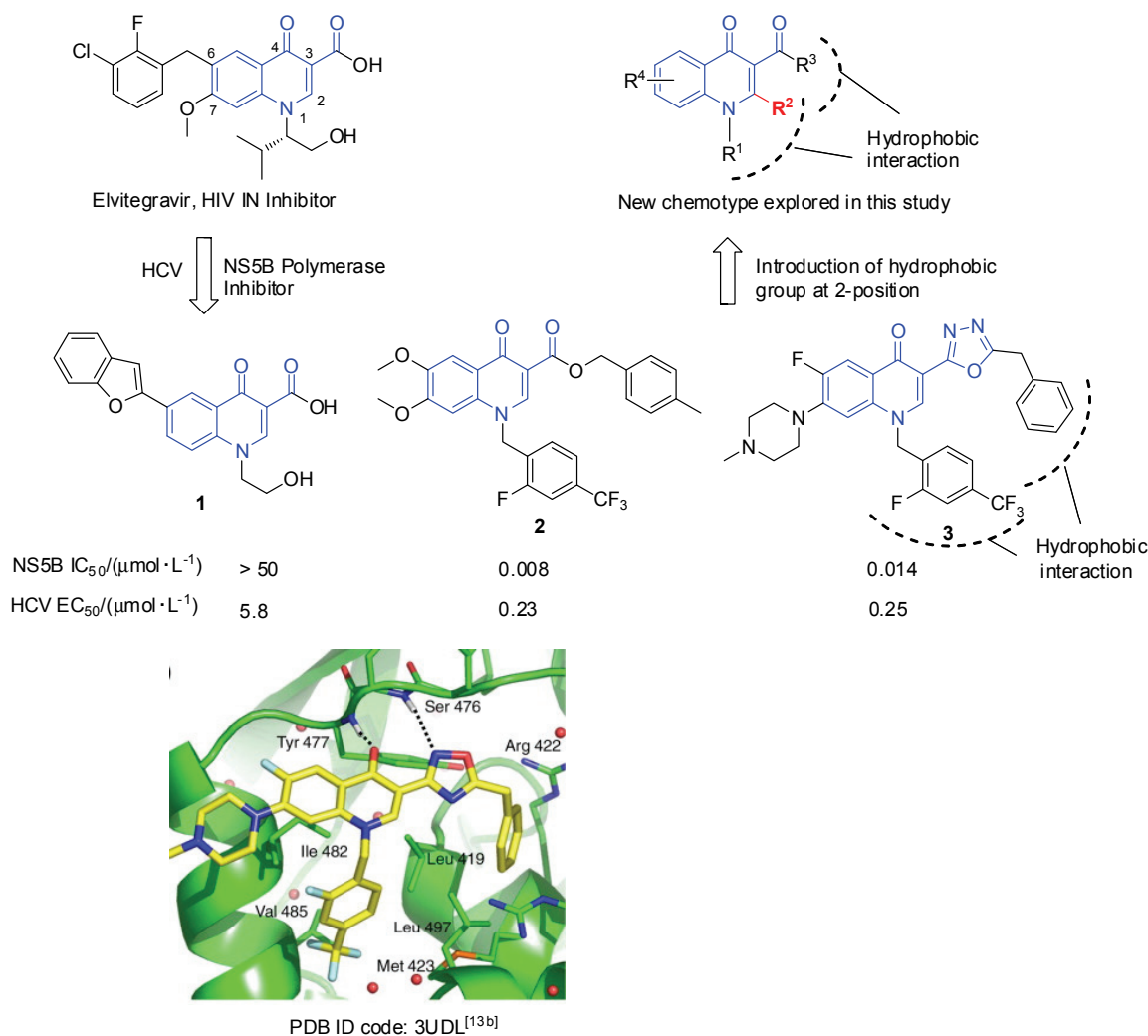


图 2 基于 4-羰基喹诺酮母核结构的 HCV NS5B 多聚酶抑制剂代表性结构以及我们基于抑制剂-NS5B 复合物晶体结构所设计的 2-取代喹诺酮-3-羧酸新结构类型

Figure 2 Some representative structures of quinolone-based HCV NS5B polymerase inhibitors and our design of 2-substituted quinolone-3-carboxylic acid chemotype based on the X-ray crystal structure of the NS5B-quinolone inhibitor complex^[13b]

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的合成

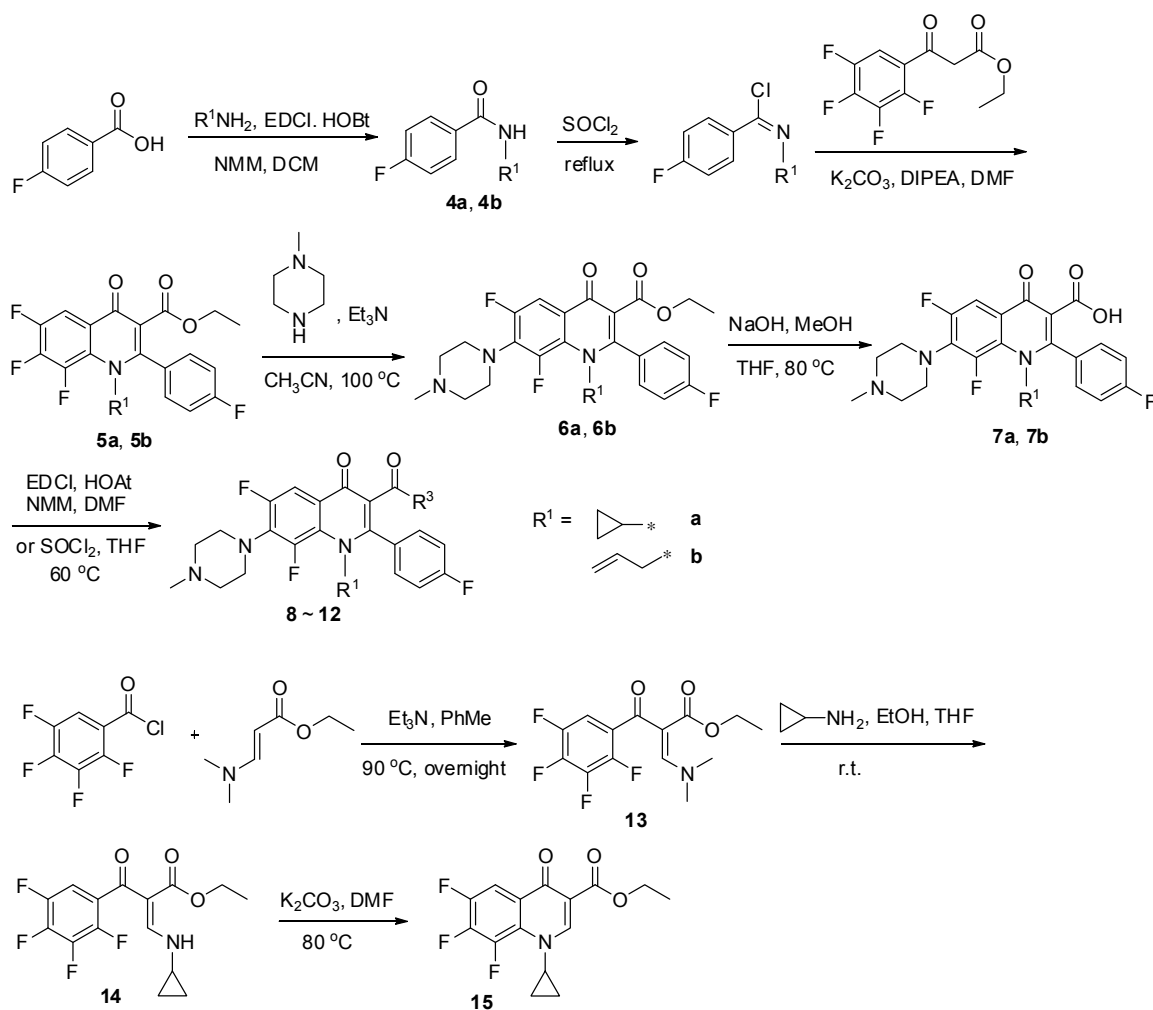
经典的 4-喹诺酮-3-羧酸的合成方法, 由于 3-位羧酸的位阻效应, C-2 位很难引入可变的取代基, 因而限制了 2-取代喹诺酮酸化合物的制备及其生物活性研究. 最近, 我们课题组从方便易得的芳基 β -酮酸酯和酰胺出发, 利用中间体亚胺-烯胺的互变异构, 发展了“一锅煮”方法, 高效便捷地合成 2-位取代 4-喹诺酮-3-酸衍生物^[14], 从而使得我们的这一研究设想得以实现. 我们主要针对 2-取代喹诺酮骨架, 考察喹诺酮环上 N-1, C-3 和 C-7 位取代基的变化对 HCV RNA 复制的抑制效果. 从合成角度分, 我们所设计的目标分子包括喹诺酮的苯环上为卤素或烷氧基等自带取代基以及引入的 *N*-甲基哌嗪取代基两类. 前一类化合物的合成及其结构鉴定数据请参考本组发表的工作^[14], 后一类的合成见图式 1.

从简单易得的原料环丙胺/烯丙胺与对氟苯甲酸出发, 通过缩合反应生成酰胺化合物 **4a**, **4b**, 然后在氯化

亚砷的作用下转换成活性较高的酰亚胺氯中间体, 随即在碱的作用下与 2,3,4,5-四氟取代苯基 β -酮酸酯发生亲核加成/消除- S_NAr 环化串联反应, 一锅煮得到喹诺酮酸酯衍生物 **5a**, **5b**^[14]. 然后, 氟代喹诺酮酸酯进一步与 *N*-甲基哌嗪发生亲核取代反应, 得到 7-*N*-甲基哌嗪取代的喹诺酮酸酯 **6a**, **6b**, 碱水解生成相应的喹诺酮酸 **7a**, **7b**, 随后通过一系列酰胺化或酯化反应获得目标化合物 **8**~**12**. 作为对照物的 2-位无取代喹诺酮酸酯 **15**, 是按照经典的 Grohe-Heitzer 合成法, 通过烯胺与芳卤进行分子内环合形成 N(1)-C(9)键从而得到喹诺酮酸酯^[15].

2.2 2-取代-3-羧基-4-喹诺酮衍生物对 HCV 复制的抑制活性评估

基于相似的药效团模式, 喹诺酮酸类 HIV-1 整合酶抑制剂被用于非核苷类 HCV NS5B 聚合酶抑制剂的发现. 最近有两个研究小组报道了 2-位无取代的喹诺酮衍生物在酶水平和细胞水平呈现良好的 NS5B 聚合酶抑制活性, 并针对喹诺酮母核的 N-1, C-3 和 C-6/7 位进行了初步的结构修饰^[13](图 2, 代表性化合物 **1** 和 **2**), 但其生



图式 1 具有 1,3,7-位可变取代基的 2-芳基-4-喹诺酮-3-酸衍生物的合成

Scheme 1 Synthesis of 2-aryl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives bearing variable 1,3,7-substituents


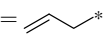
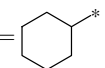

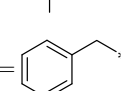
物活性和安全窗口有待进一步提升,而且这类新型的 HCV NS5B 聚合酶非核苷抑制剂的构效关系研究尚不全面. 根据喹诺酮抑制剂与酶的结合模式^[13a,13b],我们发现 C-2 位结构衍生是可提高活性但尚未被探索的化学空间,于是设计了 2-取代喹诺酮酸衍生物作为新型 HCV NS5B 聚合酶抑制剂. 通过运用我们课题组发展的一锅煮法合成了结构多样的 2-取代喹诺酮酸衍生物^[14],我们进行了全面的构效关系研究,旨在揭示其优势结构组合,以提高其活性和治疗指数(therapeutic index).

值得一提的是,在抗 HCV 生物活性评估中,由于我们没有直接的 HCV NS5B 聚合酶检测方法,所以我们运用了 HCV 活病毒感染宿主细胞(人肝肿瘤细胞 Huh7.5.1)的实验系统,检测了化合物在细胞水平上抑制 HCV 感染和复制的活性,明确了化合物具有抗 HCV 活性. 对于同一结构类型的化合物而言,它们对 HCV NS5B 的抑制活性与其抗 HCV 的活性有正相关性,因此可以作为构效关系讨论的依据,同时考虑影响透膜性的结构因素.

首先,我们考察了 N-1 取代基结构对 2-取代喹诺酮酸衍生物的 HCV 抑制活性的影响,如表 1 所示. 令我们高兴的是,在喹诺酮酸的 2-位引入疏水且体积大的 4-氟苯基后, N-1 位为小型疏水基团如环丙基(**5a**)或烯丙基(**5b**)时,2-芳基喹诺酮酸乙酯衍生物确实表现出良好的抑制 HCV 病毒复制的活性,并具有 2 倍以上的选择性. 但 N-1 位引入大体积疏水基团(**5c~5e**)或没有取代基(**5f**),都将导致活性丧失. 前者可能是 N-1 与 C-2 位的取代基有交叉重叠作用导致拥挤,后者表明 N-1 位必需有亲脂性基团存在,这与晶体结构所揭示的结合模式相一致. 另一方面,作为对照,当活性化合物 **5a** 去掉 2-位的芳基取代基(**15**),或 **5b** 水解为相应的酸(**7c**),所得到的喹诺酮衍生物均失去了对 HCV 病毒复制的抑制活性. 这一方面说明了 2 位芳基取代对于喹诺酮酸抗丙肝活性确实起着重要的作用. 另一方面,本工作是在细胞水平上评估化合物对于 HCV 病毒复制的抑制活性及其细胞毒性,因此,喹诺酮酸相对于喹诺酮酸酯的活性大幅降低,有可能是其细胞膜穿透性降低的缘故.

表 1 N-1 不同取代的 2-芳基喹诺酮酸衍生物对 HCV 病毒复制的抑制活性和细胞毒性^{a,b}

Table 1 The inhibitory activity against the HCV replication and cytotoxicity of the 2-arylquinolones bearing various substituents at N-1 position

Compd.	HCV-flu		MTT assay	
	Inhibition rate (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/%	EC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cell viability (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/%	CC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
5a R ¹ = 	69.1	4.1	69	11.02
5b R ¹ = 	69.4	9.47	72	>20
5c R ¹ = 	0		94	
5d R ¹ = 	0		91	
5e R ¹ = 	0		97	
5f R ¹ = H	0		99	
7c	3.7		94	
15	20.2		98	
MPA (霉酚酸) ^c	97.0	0.79	61.0	77

^a 在 HCV 病毒感染宿主细胞 Huh7.5.1 的系统上,将样品进行单浓度,即在 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下检测其对 HCV 病毒复制的抑制活性及其细胞毒性,进行抗 HCV 活性作用的初筛试验. ^b 在 HCV 病毒感染宿主细胞 Huh7.5.1 的系统上,将上述样品中对 HCV 病毒复制的抑制活性 >60% 以上的样品,进行浓度梯度上检测其抗 HCV 活性作用,即 20, 5, 1.25, 0.31, 0.08, 0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并计算出细胞毒性 CC₅₀ 和 HCV 抑制活性 EC₅₀. ^c MPA 为试验阳性参照物,用于观察试验稳定性.

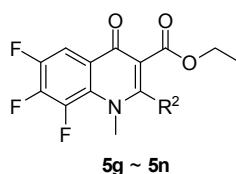
接下来, 我们考察了 C-2 位的优势取代基结构(化合物 **5g**~**5n**), 如表 2 所示. 当 C-2 位的苯基上有 4-卤素(**5k**)或吸电子基团取代时(**5h**, **5n**), 2-芳基喹诺酮酸衍生物的 HCV 抑制活性显著提高. 但供电子基团(**5l**)或位阻效应(**5m**)的存在, 则减弱了这些化合物抑制 HCV 病毒复制的能力. 当 2-位苯环被呋喃环取代时, 化合物的抗 HCV 活性也略有降低.

由于喹诺酮母核的 6,7-位取代基是伸向溶剂区, 因此亲水基团有利于抑制剂与 HCV NS5B 聚合酶的结合. 而且, 从药物代谢角度考虑, *N*-甲基哌嗪基团有助于改善化合物的水溶性和药代稳定性. 接下来, 我们设计合成了 C-7 位引入 *N*-甲基哌嗪基的 2-芳基-喹诺酮酸衍生

物, 并对其 C-3 位的取代基进行了优势结构探索, 将乙酯基换成了多种结构片段, 如位阻较大的叔丁酯、芳基酯, 以及酰胺结构的芳基酰胺、苄基酰胺、烷基酰胺等(如表 3 所示). 出乎意料的是, 当活性化合物 **5a**, **5b** 的 7 位引入 *N*-甲基哌嗪基时, 其抑制 HCV 复制的活性大幅下降. 但 C-3 位引入大体积的疏水基团时(**9a**~**12a**), 活性得到不同程度的恢复和提升, 其中以酯键连接的芳香性基团最适宜(**11a**, $EC_{50}=2.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50}=13.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 由此产生了本系列 2-取代喹诺酮酸衍生物作为新型 HCV 抑制剂的先导化合物, 可用于进一步的结构优化研究.

表 2 C-2 位不同取代的 2-芳基喹诺酮酸衍生物对 HCV 病毒复制的抑制活性及其细胞毒性^{a,b}

Table 2 The inhibitory activity against the HCV replication and cytotoxicity of the 2-arylquinolones bearing various substituents at C-2 position

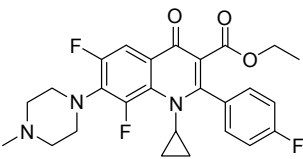
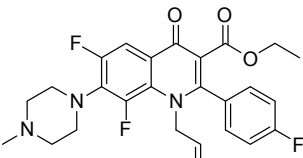
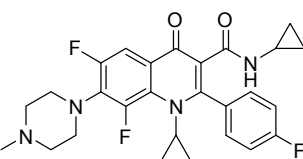
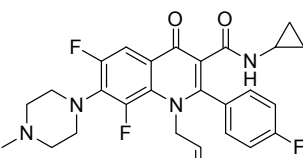
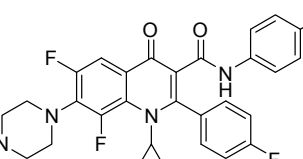
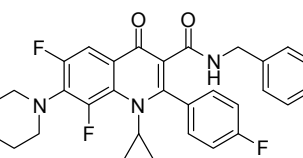
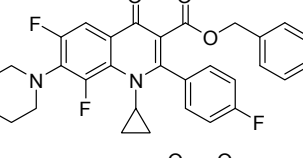
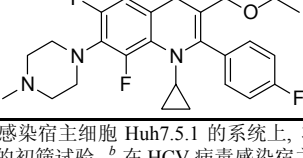


Compd.	R ²	HCV-flu		MTT assay	
		Inhibition rate (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/%	$EC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Cell viability (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/%	$CC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
5g		30.1		75.7	
5h		100	2.71	54.5	4.19
5i		51.5		74.5	
5j		26.5		86.7	
5k		91.7	8.31	67.2	17.41
5l		37.0		79.7	
5m		19.1		93.9	
5n		94.7	11.26	78.7	10.49

^a 在 HCV 病毒感染宿主细胞 Huh7.5.1 的系统上, 将样品进行单浓度, 即在 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下检测其对 HCV 病毒复制的抑制活性及其细胞毒性, 进行抗 HCV 活性作用的初筛试验. ^b 在 HCV 病毒感染宿主细胞 Huh7.5.1 的系统上, 将上述样品中对 HCV 病毒复制的抑制活性 >60% 以上的样品, 进行浓度梯度上检测其抗 HCV 活性作用, 即 20, 5, 1.25, 0.31, 0.08, 0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并计算出细胞毒性 CC_{50} 和 HCV 抑制活性 EC_{50} .

表3 C-3位不同取代的2-芳基-7-(4-甲基哌嗪-1-基)喹诺酮酸衍生物对HCV病毒复制的抑制活性及其细胞毒性^{a,b}

Table 3 Inhibitory activity against the HCV replication and cytotoxicity of the 2-aryl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)quinolones bearing various substituents at C-3 position

Compd.	Structure	HCV-flu		MTT assay	
		Inhibition rate (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/%	EC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cell viability (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)/%	CC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
6a		0		99.9	
6b		18.9		100.0	
8a		0		100	
8b		0		100	
9a		55.4		100	
10a		36.5		100	
11a		80.5	2.02	87.3	13.2
12a		34.9		100	

^a 在 HCV 病毒感染宿主细胞 Huh7.5.1 的系统上, 将样品进行单浓度, 即在 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下检测其对 HCV 病毒复制的抑制活性及其细胞毒性, 进行抗 HCV 活性作用的初筛试验。^b 在 HCV 病毒感染宿主细胞 Huh7.5.1 的系统上, 将上述样品中对 HCV 病毒复制的抑制活性 >60% 以上的样品, 进行浓度梯度上检测其抗 HCV 活性作用, 即 20, 5, 1.25, 0.31, 0.08, 0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并计算出细胞毒性 CC₅₀ 和 HCV 抑制活性 EC₅₀。

3 结论

根据喹诺酮类 HCV NS5B 聚合酶抑制剂与酶的复

合物的晶体结构, 我们第一次设计在喹诺酮的 C-2 位引入疏水基团以提高其活性。利用本课题组发展的一锅煮

合成新方法, 我们合成了一系列 2-取代喹诺酮酸衍生物作为新型 HCV NS5B 聚合酶非核苷抑制剂, 全面考察了喹诺酮环上 N-1, C-3 和 C-7 位取代基的变化对 HCV RNA 复制的抑制效果. 基于 HCV 感染宿主细胞 Huh7.5.1 体系的活性评估表明, 2-位疏水性基团的引入, 有助于 HCV 抑制活性的提高; N-1 位小体积的疏水烷基、C-3 位大体积的芳基酯基都是有利的优势结构; 喹诺酮环 C-7 位 *N*-甲基哌嗪基团的引入, 有利于改善抑制剂的成药性. 所获得的最好的 2-取代喹诺酮酸衍生物表现出对 HCV 复制的抑制活性为 $EC_{50}=2.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞毒性为 $CC_{50}=13.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 具有进一步开发的前景.

References

- [1] Negro, F.; Alberti, A. *Liver Int.* **2011**, *31* (Suppl 2), 1.
- [2] Bartosch, B.; Thimme, R.; Blum, H. E.; Zoulim, F. *J. Hepatol.* **2009**, *51*, 810.
- [3] Younossi, Z.; Kallman, J.; Kincaid, J. *Hepatology* **2007**, *45*, 806.
- [4] Zeuzem, S.; Berg, T.; Moeller, B.; Hinrichsen, H.; Mauss, S.; Wedemeyer, H.; Sarrazin, C.; Hueppe, D.; Zehnter, E.; Manns, M. P. *J. Viral Hepatitis* **2009**, *16*, 75.
- [5] Feld, J. J.; Hoofnagle, J. H. *Nature* **2005**, *436*, 967.
- [6] (a) Pawlotsky, J. M. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1176. (b) Delemos, A. S.; Chung, R. T. *Trends Mol. Med.* **2014**, *20*, 315.
- [7] Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Wang, P.; Zhang, H. R.; Bansal, S.; Espiritu, C.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Steuer, H. M.; Niu, C.; Otto, M. J.; Furman, P. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7202.
- [8] Sofia, M. J.; Chang, W.; Furman, P. A.; Mosley, R. T.; Ross, B. S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2481.
- [9] (a) Herbst, D. A., Jr.; Reddy, K. R. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2013**, *22*, 527. (b) Rodriguez-Torres, M. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2013**, *11*, 1269.
- [10] (a) Li, B.-W.; Zhang, F.-H.; Serrao, E.; Chen, H.; Sanchez, T. W.; Yang, L.-M.; Neamati, N.; Zheng, Y.-T.; Wang, H.; Long, Y.-Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3146. (b) Zeng, L. F.; Wang, Y.; Kazemi, R.; Xu, S. L.; Xu, Z. L.; Sanchez, T. W.; Yang, L. M.; Debnath, B.; Odde, S.; Xie, H.; Zheng, Y. T.; Ding, J.; Neamati, N.; Long, Y. Q. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9492. (c) Fan, X.; Zhang, F. H.; Al-Safi, R. I.; Zeng, L. F.; Shabaik, Y.; Debnath, B.; Sanchez, T. W.; Odde, S.; Neamati, N.; Long, Y. Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4935. (d) Zeng, L. F.; Zhang, H. S.; Wang, Y. H.; Sanchez, T.; Zheng, Y. T.; Neamati, N.; Long, Y. Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4521.
- [11] Nowotny, M. *EMBO Reports* **2009**, *10*, 144.
- [12] Mugnaini, C.; Pasquini, S.; Corelli, F. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1746.
- [13] (a) Kumar, D. V.; Rai, R.; Brameld, K. A.; Somoza, J. R.; Rajagopalan, R.; Janc, J. W.; Xia, Y. M.; Ton, T. L.; Shaghafi, M. B.; Hu, H. Y.; Lehoux, I.; To, N.; Young, W. B.; Green, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 82. (b) Kumar, D. V.; Rai, R.; Brameld, K. A.; Riggs, J.; Somoza, J. R.; Rajagopalan, R.; Janc, J. W.; Xia, Y. M.; Ton, T. L.; Hu, H. Y.; Lehoux, I.; Ho, J. D.; Young, W. B.; Hart, B.; Green, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 300; (c) Chen, Y. L.; Zacharias, J.; Vince, R.; Geraghty, R. J.; Wang, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4790.
- [14] Lin, J. P.; Long, Y. Q. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5313.
- [15] (a) Grohe, K.; Heitzer, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, *109*, 871. (b) Grohe, K.; Heitzer, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, *109*, 29.

(Zhao, C.)