

肝靶向阿德福韦混膦酯衍生物的合成及生物活性

张文政^{1,2,3}, 杨洋^{1,2,3}, 陈雅^{1,3,4}, 肖涛^{1,2,3}, 傅晓钟^{1,4*}, 董永喜^{1,4}(贵州医科大学¹药学院;²贵州省药物制剂重点实验室;³国家苗药工程技术研究中心;⁴民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

摘要 为获得具有肝靶向性的阿德福韦酯衍生物, 以阿德福韦双 L-氨基酸酯为先导化合物, 利用胆汁酸的肠肝循环特性, 采用耦合原理设计合成了 10 个阿德福韦单 L-(硫代)氨基酸酯, 单胆酸酯衍生物 (**6a~6j**), 其结构经过 ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS, ESI-HRMS 确证。采用 HepG 2. 2. 15 细胞株研究化合物的抗 HBV 活性, 挑选其中抗病毒活性好且选择性指数较高的化合物 **6c** (EC₅₀ 0. 92 μmol/L, SI 512. 63) 进行小鼠体内组织分布研究。结果表明, 从给药 15 min 到 12 h 的各个时间点上, 化合物 **6c** 在肝中的含量均比其他脏器中高, 在肾中含量均比其他脏器低, 且肝中含量在各时间点上均高于阳性对照阿德福韦, 肾中含量均低于阳性对照。以上结果提示化合物 **6c** 具有较高的抗病毒活性, 且具有良好的肝靶向性并降低了在肾中的蓄积, 具有进一步研究的价值。

关键词 阿德福韦; 衍生物; 肠肝循环; 组织分布; 肝靶向性; 合成

中图分类号 R914; R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2018)01-0039-09

doi:10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20180106

引用本文 张文政, 杨洋, 陈雅, 等. 肝靶向阿德福韦混膦酯衍生物的合成及生物活性[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 39–47.

Cite this article as: ZHANG Wenzheng, YANG Yang, CHEN Ya, et al. Synthesis and bioactivity of mixed phosphonate derivatives of adefovir with hepatic targeting property[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(1): 39–47.

Synthesis and bioactivity of mixed phosphonate derivatives of adefovir with hepatic targeting property

ZHANG Wenzheng^{1,2,3}, YANG Yang^{1,2,3}, CHEN Ya^{1,3,4}, XIAO Tao^{1,2,3}, FU Xiaozhong^{1,4*}, DONG Yongxi^{1,4}

¹School of Pharmacy; ²Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics; ³National Engineering Research Center of Miao's Medicines; ⁴Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract In order to search for new adefovir analogues as anti-HBV agents with enhanced antiviral activity and hepatotropic property, adefovir bis L-amino acid ester was used as lead compound to produce ten adefovir mono L-(thio) amino acid ester, mono bile acid ester derivatives (**6a-6j**). The design based on bile acid prodrug strategy, which can improve drug oral bioavailability and liver-targeted enrichment by using enterohepatic circulation of bile acid. Sub-structure combination method was adopted to introduce L-(thio) amino acid ester and bile acid ester fragments on the phosphonate functionality of adefovir. The structures of target compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS and ESI-HRMS. HepG 2. 2. 15 cell were used for *in vitro* anti-HBV activity assessment. Compound **6c** with high antiviral activity (EC₅₀ 0. 92 μmol/L, SI 512. 63) was further investigated for its tissue distribution in mice. The results showed that content of compound **6c** in liver was higher than that of adefovir dipivoxil, and in contrast its content in kidney was lower than that in positive control at all time points (0. 25-12 h). Compound **6c** exhibits higher antiviral activity, selective index and higher liver distribution,

收稿日期 2017-09-09 *通信作者 Tel:13984391667 E-mail:xiaozhong_fu@sohu.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81460523); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金(No. 2013-45); 贵州省社会发展攻关计划项目(No. 2013-3031)

making it a potential anti HBV agent for further investigation.

Key words adefovir; derivatives; enterohepatic circulation; tissue distribution; hepatotropic property; synthesis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460523); the Excellent Youth Scientific Talents Foundation of Guizhou Province (No. 2013-45) and the Projects of Guizhou Science and Technology Department (No. 2013-3031)

阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil, 图 1) 是由 Gilead Science 公司研制的第 1 个非环核苷磷酸酯类抗 HBV 药物, 2002 年被 FDA 批准上市。由于其能有效绕过病毒编码激酶催化的首次磷酸化过程, 因此, 对拉米呋啶 (lamivudine)、泛昔洛维 (famciclovir) 及恩曲他滨 (emtricitabine) 等核苷类似物产生耐药的变异 HBV 能产生较好的抑制效果^[1-2]。但是阿德福韦酯临床应用中发现其主要不足是释放原药过程中产生毒性载体片段, 临床应用中易产生剂量依赖性肾毒性^[3-4], 并且药物在肝细胞中富集能力差, 肝脏靶向定位能力较弱^[4-6]。因此设计、合成含有内源性载体, 能实现药物肝靶向性富集, 同时非靶器官毒性降低的阿德福韦前药对于研制、开发具有自主知识产权的新型抗 HBV 药物具有重要价值。

胆汁酸 (包括胆酸、去氧胆酸与熊去氧胆酸等) 是内源性的肝细胞特异性天然底物。其在肝细胞内生成后随胆汁流入小肠, 参与脂类物质吸收, 之后在回肠末端被迅速重吸收, 通过门静脉重

新进入肝脏, 形成肝肠循环 (enterohepatic circulation, EC)^[7], 该过程中其仅有少量胆汁酸 (<5%) 进入血液, 因此胆汁酸具有高度的器官特异性。成人体内肝肠循环每天重复 6 ~ 15 次, 参与循环的胆酸总量达到 17 ~ 40 g, 表明胆汁酸同时具有极高的转运能力。报道显示, 胆汁酸可以作为肝靶向性药物转运载体, 药物胆酸偶联物能够借助于肠肝循环中两种重要的胆汁酸转运载体, 回肠末端上皮细胞顶端刷状缘膜中的钠离子依赖性胆酸转运体 (human apical sodium-dependent bile acid transporter, hASBT) 与肝细胞表面的钠离子-牛磺胆酸转运多肽 (Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 转运并参与胆汁酸的肠肝循环^[6,8], 从而提高药物的吸收及在肝脏中的浓度, 赋予药物肝脏选择性。这种修饰策略被成功应用于胆酸-苯丁酸氮芥偶合物、硝基化阿魏酸与熊去氧胆酸偶联物 (NCX1000) 以及熊去氧胆酸载体偶联的加巴喷丁衍生物设计上 (图 1), 明显提高了药物的肝细胞靶向性及口服生物利用度^[4-6]。

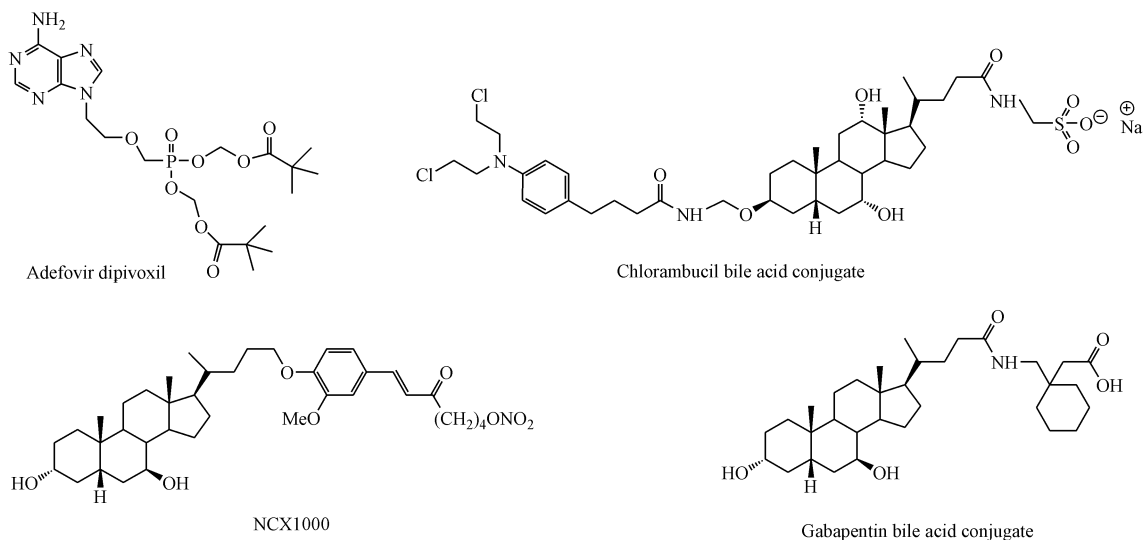


Figure 1 Structures of adefovir dipivoxil and bile acid conjugated prodrugs

为探索胆酸酯结构片段的引入能否适用于阿德福韦酯结构修饰, 以期发现具有较强抗病毒活性与较高肝脏分布特性的抗 HBV 阿德福韦前药, 本

研究以前期获得的具有较强抗病毒活性与较低毒性的阿德福韦双 L-氨基酸酯为先导化合物^[9-10], 结合胆酸酯前药具有的结构特征, 应用药物设计

上的亚结构拼合原理 (sub-structure combination method), 设计、合成了阿德福韦单 L-(硫代)氨基酸酯, 单胆酸酯衍生物 (**6a** ~ **6j**) (图 2)。通过对 HepG 2. 2. 15 细胞系分泌的 HBV-DNA 的抑制作

用考察目标化合物的抗 HBV 活性, 筛选出具有较强抗病毒活性及较高作用选择性指数的化合物进行小鼠体内组织分布实验。目标化合物的结构鉴定及药理活性结果见表 1 ~ 3。

Table 1 Yields, ¹H NMR, ¹³C NMR and MS data of target compounds **6a-6j**

Compd.	Total yield/%	¹ H NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) δ	¹³ C NMR (CDCl ₃ , 100 MHz) δ	ESI-MS (<i>m/z</i>)	ESI-HRMS(<i>m/z</i>) Calcd. (Found)
6a	17. 8	8. 29(1H, s, 2-H), 7. 92(1H, s, 8-H), 6. 08(2H, br. s, NH ₂), 4. 40(2H, t, <i>J</i> = 5. 6 Hz, NCH ₂), 4. 18-4. 05(9H, m, 2 × P(O)OCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO, CHNH ₂), 3. 91(2H, t, <i>J</i> = 4. 0 Hz, NCH ₂ CH ₂), 3. 78(2H, d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, OCH ₂ P), 3. 55-3. 45(2H, m, 2 × CHOH), 2. 39-2. 30(1H, m), 2. 23-2. 16(1H, m), 1. 97-0. 96(36H, m), 0. 93-0. 86(12H, m, 4 × CH ₃)	175. 01, 174. 16, 155. 47, 152. 92, 149. 76, 141. 34, 119. 12, 71. 33, 71. 16, 65. 77, 64. 10, 64. 06, 63. 11, 63. 04, 62. 86, 60. 59, 60. 11, 58. 91, 55. 73, 54. 69, 50. 73, 43. 68, 42. 41, 40. 08, 39. 15, 37. 25, 36. 89, 35. 17, 34. 90, 34. 02, 31. 01, 30. 29, 29. 75, 29. 34, 28. 63, 26. 82, 24. 77, 23. 55, 21. 12, 18. 35, 15. 65, 12. 09, 11. 63	863. 50 [M + H] ⁺	863. 504 2 (863. 505 2) C ₄₃ H ₇₂ N ₆ O ₁₀ P [M + H] ⁺
6b	19. 7	8. 25(1H, s, 2-H), 7. 96(1H, s, 8-H), 6. 07(2H, br. s, NH ₂), 4. 39(2H, t, <i>J</i> = 5. 6 Hz, NCH ₂), 4. 17-4. 07(9H, m, 2 × P(O)OCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO, CHNH ₂), 3. 90(2H, t, <i>J</i> = 4. 0 Hz, NCH ₂ CH ₂), 3. 77(2H, d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, OCH ₂ P), 3. 56-3. 45(2H, m, 2 × CHOH), 2. 40-2. 32(1H, m), 2. 24-2. 15(1H, m), 1. 99-0. 98(36H, m), 0. 93-0. 84(12H, m, 4 × CH ₃)	175. 03, 173. 97, 154. 86, 152. 46, 149. 74, 140. 97, 119. 29, 71. 56, 71. 12, 65. 75, 64. 01, 63. 97, 63. 05, 63. 01, 62. 85, 60. 57, 58. 89, 55. 68, 54. 68, 50. 72, 43. 66, 43. 34, 42. 41, 40. 07, 39. 14, 37. 23, 36. 66, 35. 15, 34. 89, 34. 02, 31. 01, 30. 29, 29. 75, 29. 67, 29. 34, 28. 62, 26. 81, 23. 54, 21. 11, 18. 33, 15. 46, 12. 07, 10. 99	863. 50 [M + H] ⁺	863. 504 2 (863. 504 3) C ₄₃ H ₇₂ N ₆ O ₁₀ P [M + H] ⁺
6c	23. 6	8. 22(1H, s, 2-H), 8. 01(1H, s, 8-H), 6. 98(2H, br. s, NH ₂), 4. 38(2H, m, NCH ₂), 4. 28(2H, m, NCH ₂ CH ₂), 4. 15-4. 06(6H, m, CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂), 3. 95(1H, m, CHNH ₂), 3. 89(2H, m, CH ₂ OCO), 3. 82(2H, d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, OCH ₂ P), 3. 58-3. 51(2H, m, 2 × CHOH), 2. 32-2. 27(1H, m), 2. 20-2. 17(1H, m), 1. 93-1. 89(2H, m, OCH ₂ CH ₂), 1. 77-1. 14(28H, m), 1. 06-1. 00(3H, m), 0. 95-0. 91(3H, m), 0. 85(3H, s, CH ₃), 0. 62(3H, s, CH ₃)	174. 50, 174. 50, 155. 81, 152. 64, 149. 80, 141. 71, 118. 97, 73. 01, 71. 61, 65. 59, 64. 46, 63. 98, 63. 33, 60. 09, 58. 35, 50. 72, 49. 27, 48. 33, 46. 77, 46. 63, 43. 52, 42. 13, 36. 33, 35. 99, 35. 32, 33. 63, 33. 59, 30. 82, 30. 78, 30. 41, 29. 79, 29. 62, 29. 55, 28. 64, 27. 66, 27. 17, 26. 24, 23. 78, 17. 71, 12. 73	821. 45 [M + H] ⁺	821. 456 0 (821. 453 3) C ₄₀ H ₆₆ N ₆ O ₁₀ P [M + H] ⁺
6d	25. 6	8. 23(1H, s, 2-H), 7. 91(1H, s, 8-H), 4. 48(2H, t, <i>J</i> = 5. 2 Hz, NCH ₂), 4. 33-4. 25(2H, m, NCH ₂ CH ₂), 4. 12-4. 03(6H, m, CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂), 3. 98-3. 86(5H, m, CH ₂ OCO, OCH ₂ P, CHNH ₂), 3. 54-3. 49(2H, m, 2 × CHOH), 2. 39-2. 33(1H, m), 2. 28-2. 20(1H, m), 2. 01-1. 23(29H, m), 1. 18-1. 12(6H, m), 1. 02-0. 96(9H, m, 3 × CH ₃), 0. 91(6H, s, 2 × CH ₃), 0. 87-0. 82(2H, m)	175. 85, 169. 85, 156. 52, 152. 64, 150. 67, 143. 72, 119. 81, 79. 51, 73. 95, 72. 49, 72. 20, 65. 83, 64. 81, 64. 26, 63. 37, 61. 46, 58. 27, 48. 35, 48. 00, 44. 56, 43. 58, 37. 73, 37. 40, 37. 15, 36. 68, 36. 40, 35. 27, 34. 78, 32. 17, 31. 96, 31. 04, 30. 77, 30. 72, 30. 46, 29. 88, 28. 66, 27. 45, 26. 73, 24. 83, 23. 69, 17. 56, 14. 99, 13. 18, 12. 04	877. 52 [M + H] ⁺	877. 519 9 (877. 519 2) C ₄₄ H ₇₄ N ₆ O ₁₀ P [M + H] ⁺
6e	22. 6	8. 22(1H, s, 2-H), 8. 01(1H, s, 8-H), 4. 40-4. 39(4H, m, NCH ₂ , NCH ₂ CH ₂), 4. 29-4. 27(2H, m, CH ₂ OCO), 4. 18-4. 05(6H, m, 2 × P(O)OCH ₂ , CH ₂ OCO), 3. 97(1H, m, CHNH ₂), 3. 89(2H, m, CH ₂ OCO), 3. 80(2H, d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, OCH ₂ P), 3. 70-3. 68(1H, m, CHOH), 3. 54-3. 50(1H, m, CHOH), 2. 35-2. 28(1H, m), 2. 24-2. 18(1H, m), 1. 94-1. 89(4H, m, OCH ₂ CH ₂ , CHCH ₂), 1. 80-1. 17(29H, m), 0. 97-0. 91(15H, m, 5 × CH ₃)	174. 54, 174. 48, 155. 47, 152. 13, 149. 49, 141. 74, 118. 74, 73. 15, 71. 57, 65. 71, 64. 06, 64. 01, 63. 28, 60. 11, 58. 05, 50. 57, 48. 33, 48. 30, 46. 81, 46. 74, 43. 55, 42. 13, 37. 84, 36. 39, 36. 01, 35. 44, 35. 39, 33. 67, 30. 96, 30. 85, 30. 47, 29. 68, 28. 57, 27. 66, 27. 17, 26. 25, 25. 31, 23. 76, 23. 20, 17. 28, 15. 20, 12. 73, 11. 76	863. 50 [M + H] ⁺	863. 500 3 (863. 497 6) C ₄₃ H ₇₂ N ₆ O ₁₀ P [M + H] ⁺

(Continued)

Compd.	Total yield/%	¹ H NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) δ	¹³ C NMR (CDCl ₃ , 100 MHz) δ	ESI-MS (<i>m/z</i>)	ESI-HRMS(<i>m/z</i>) Calcd. (Found)
6f	15.4	8.29(1H, s, 2-H), 7.95(1H, s, 8-H), 6.41(2H, br. s, NH ₂), 4.40(2H, t, <i>J</i> = 5.6 Hz, NCH ₂), 4.19-4.07(7H, m, 2 × P(O)OCH ₂ , CH ₂ OCO, CHNH ₂), 3.93(2H, t, <i>J</i> = 4.0 Hz, NCH ₂ CH ₂), 3.78(2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, OCH ₂ P), 3.57-3.47(2H, m, 2 × CHOH), 2.95-2.92(2H, m, CH ₂ SCO), 2.38-2.31(1H, m), 2.24-2.18(1H, m), 1.98-0.93(36H, m), 0.89-0.82(12H, m, 4 × CH ₃)	175.03, 174.18, 155.49, 152.94, 149.78, 141.36, 119.14, 71.35, 71.18, 65.79, 64.12, 64.08, 63.13, 63.06, 62.88, 60.61, 60.13, 58.93, 55.75, 54.71, 50.75, 43.70, 42.43, 40.10, 39.17, 37.27, 36.91, 35.19, 34.92, 34.04, 31.03, 30.31, 29.77, 29.36, 28.65, 26.84, 24.79, 23.57, 21.17, 18.37, 15.67, 12.11, 11.65	879.47 [M + H] ⁺	879.477 4 (879.475 0) C ₄₃ H ₇₂ N ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺
6g	18.1	8.27(1H, s, 2-H), 7.95(1H, s, 8-H), 6.48(2H, br. s, NH ₂), 4.39(2H, t, <i>J</i> = 5.6 Hz, NCH ₂), 4.17-4.03(7H, m, 2 × P(O)OCH ₂ , CH ₂ OCO, CHNH ₂), 3.89(2H, t, <i>J</i> = 4.0 Hz, NCH ₂ CH ₂), 3.76(2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, OCH ₂ P), 3.54-3.43(2H, m, 2 × CHOH), 2.98-2.94(2H, m, CH ₂ SCO), 2.37-2.30(1H, m), 2.22-2.15(1H, m), 1.96-0.94(36H, m), 0.92-0.85(12H, m, 4 × CH ₃)	204.44, 174.26, 155.75, 152.93, 149.76, 141.32, 119.18, 71.37, 71.19, 71.11, 67.20, 65.85, 64.94, 64.19, 63.12, 60.48, 60.26, 55.86, 54.84, 43.74, 43.47, 42.53, 40.18, 39.26, 37.37, 37.15, 35.29, 35.03, 34.12, 32.11, 31.16, 30.36, 29.78, 28.72, 26.95, 24.65, 23.49, 21.22, 19.76, 18.46, 16.63, 14.26, 12.20	879.47 [M + H] ⁺	879.477 4 (879.476 7) C ₄₃ H ₇₂ N ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺
6h	11.6	8.21(1H, s, 2-H), 8.01(1H, s, 8-H), 6.31(2H, br. s, NH ₂), 4.37(2H, m, NCH ₂), 4.27(2H, m, NCH ₂ CH ₂), 4.14-4.05(6H, m, CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂), 3.93(1H, m, CHNH ₂), 3.81(2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, OCH ₂ P), 3.57-3.51(2H, m, 2 × CHOH), 2.99-2.95(2H, m, CH ₂ SCO), 2.31-2.27(1H, m), 2.20-2.16(1H, m), 1.92-1.89(2H, m, OCH ₂ CH ₂), 1.76-1.12(28H, m), 1.06-1.00(3H, m), 0.94-0.91(3H, m), 0.85(3H, s, CH ₃), 0.62(3H, s, CH ₃)	203.81, 174.28, 155.61, 152.90, 149.81, 141.46, 119.21, 71.43, 71.35, 71.22, 67.07, 65.87, 64.79, 64.21, 63.18, 60.26, 55.85, 54.82, 43.76, 43.49, 42.53, 40.20, 39.27, 37.38, 37.06, 35.29, 35.03, 34.14, 31.99, 31.16, 30.39, 29.77, 28.74, 26.95, 23.48, 21.23, 19.71, 18.47, 16.62, 12.21	837.43 [M + H] ⁺	837.430 5 (837.433 1) C ₄₀ H ₆₆ N ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺
6i	14.7	8.23(1H, s, 2-H), 7.91(1H, s, 8-H), 6.30(2H, br. s, NH ₂), 4.48(2H, t, <i>J</i> = 5.2 Hz, NCH ₂), 4.33-4.25(2H, m, NCH ₂ CH ₂), 4.12-4.03(6H, m, CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂), 3.98-3.86(3H, m, OCH ₂ P, CHNH ₂), 3.54-3.49(2H, m, 2 × CHOH), 2.99-2.95(2H, m, CH ₂ SCO), 2.39-2.33(1H, m), 2.28-2.20(1H, m), 2.01-1.23(29H, m), 1.18-1.12(6H, m), 1.02-0.96(9H, m, 3 × CH ₃), 0.91(6H, s, 2 × CH ₃), 0.87-0.82(2H, m)	204.45, 174.47, 155.73, 153.02, 149.80, 141.37, 119.18, 73.06, 71.59, 71.23, 65.79, 64.25, 63.21, 60.21, 52.75, 52.09, 48.35, 46.97, 46.84, 46.61, 43.89, 43.55, 42.08, 36.37, 36.02, 35.39, 34.25, 34.15, 33.68, 31.06, 30.48, 29.73, 28.60, 27.63, 27.14, 26.22, 24.79, 23.74, 23.17, 23.00, 21.90, 20.55, 18.52, 17.32	893.49 [M + H] ⁺	893.493 1 (893.499 9) C ₄₀ H ₇₄ N ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺
6j	16.9	8.29(1H, s, 2-H), 7.99(1H, s, 8-H), 6.49(2H, br. s, NH ₂), 4.42(2H, t, <i>J</i> = 4.4 Hz, NCH ₂), 4.18-4.08(6H, m, CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂), 4.02-3.98(1H, m, CHNH ₂), 3.94-3.91(2H, m, NCH ₂ CH ₂), 3.80(2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, OCH ₂ P), 3.64-3.57(2H, m, 2 × CHOH), 2.95-2.91(2H, m, CH ₂ SCO), 2.34-2.30(1H, m), 2.26-2.22(1H, m), 2.04-1.83(6H, m), 1.83-1.02(27H, m), 1.01-0.94(9H, m, 3 × CH ₃), 0.90-0.87(6H, m, 2 × CH ₃)	204.45, 174.28, 155.68, 152.99, 149.82, 141.28, 119.23, 71.40, 71.31, 71.20, 66.70, 65.87, 65.03, 64.20, 63.13, 60.27, 55.85, 54.82, 43.77, 43.48, 42.53, 40.17, 39.25, 38.95, 37.28, 37.08, 35.30, 35.04, 34.13, 31.15, 31.08, 30.57, 30.38, 29.86, 29.80, 26.95, 24.71, 24.09, 23.48, 21.23, 18.48, 16.13, 12.20, 11.78	879.47 [M + H] ⁺	879.477 4 (879.474 2) C ₄₃ H ₇₂ N ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺

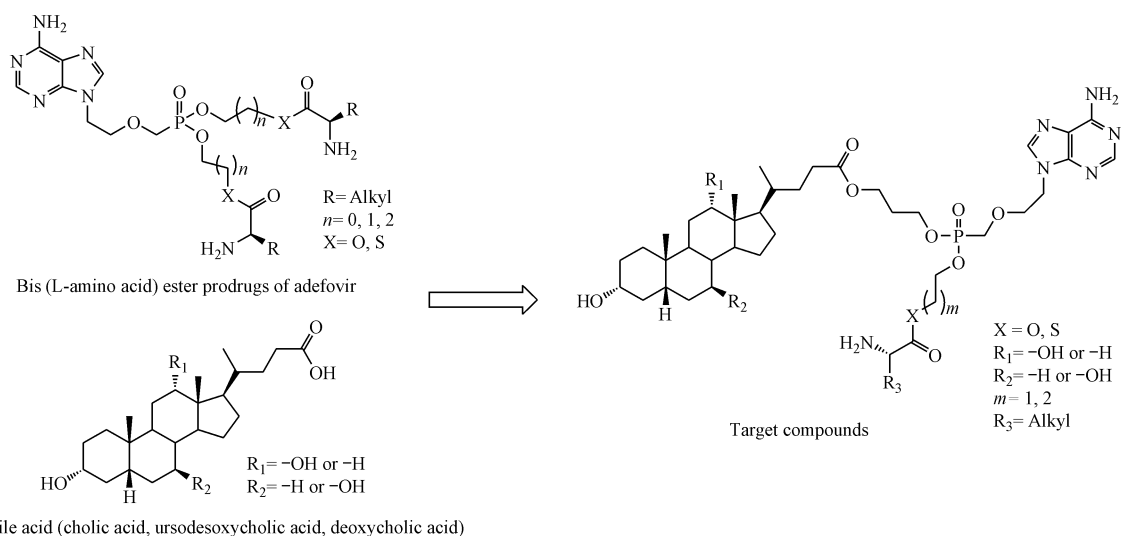
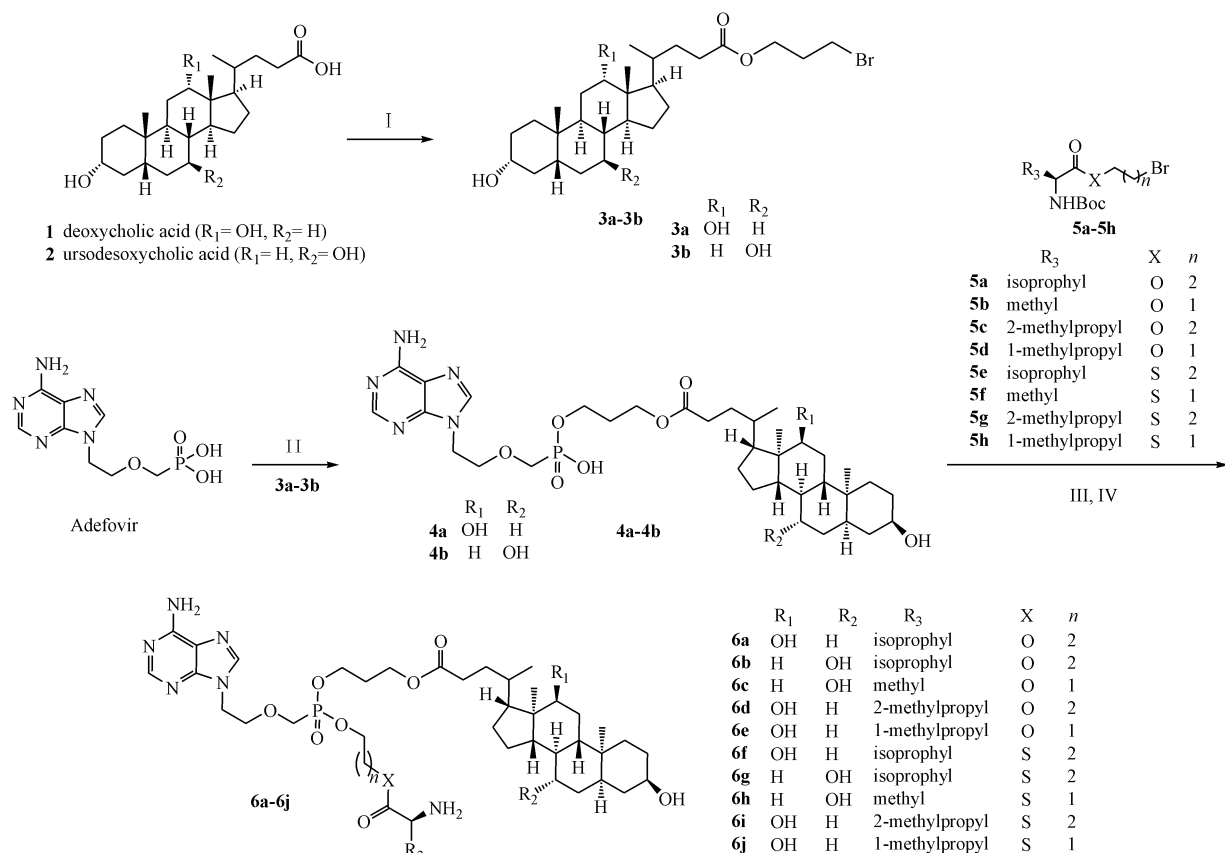


Figure 2 Design of the target compounds as anti HBV agents

1 目标化合物合成路线

方法,合成路线见路线1。

目标化合物的合成参考文献[11-12]的报道



Scheme 1 Synthetic route of the target compounds **6a-6j**

Reagents and conditions: (I) 3-bromo-1-propanol, THF, DCC, DMAP, 0 °C-r. t., 24 h; (II) anhydrous DMF, DCMC, 40 °C, 48 h; (III) anhydrous DMF, DCMC, 80 °C, 48 h; (IV) 85% H₃PO₄/CHCl₃, 0 °C, 4 h

2 合成实验

N-Boc L-(硫代)氨基酸-2-溴-乙基酯, *N*-Boc L-(硫代)氨基酸-3-溴-丙基酯参考文献[12-13]报道的方法合成;其余试剂均为市售分析纯。

核磁共振光谱采用日本 JEOL JNM-ECS 400 型核磁共振仪测定, TMS 内标;质谱用 Acquity 系统超高液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国 Waters 公司)测定;高分辨质谱采用液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪(美国 Bruker Daltonics 公司)测定。小型台式冷冻高速离心机(美国 Thermo scientific 公司);EL-204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

分布实验动物采用 SPF 级雄性 KM 小鼠(20~30 g), 由长沙市天勤生物技术有限公司提供, 动物合格证号: SCXK 黔 2016-0021。

2.1 去氧胆酸-3-溴-1-丙基酯(3a)

在 250 mL 反应瓶中加入去氧胆酸(7.84 g, 20 mmol)、干燥四氢呋喃(THF)100 mL、3-溴-1-丙醇(3.35 g, 24 mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP, 0.25 g, 0.2 mmol), 于 0 °C 条件下搅拌溶解, 缓慢滴加干燥四氢呋喃溶解的二环己基碳二亚胺(DCC, 5 g, 25 mmol)40 mL, 0 °C 反应 0.5 h 自然升至室温后再反应 20 h, 过滤沉淀, 收集滤液减压旋干, 残余物硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯, 1.5:1), 得到无色油状物 8.76 g, 收率 85.3%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 4.17(2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.92~3.94(1H, m), 3.51~3.61(1H, m), 3.42(2H, t, *J* = 6.0 Hz), 2.29~2.37(1H, m), 2.10~2.23(3H, m), 0.98~1.85(26H, m), 0.93(3H, d, *J* = 8.0 Hz), 0.85(3H, s), 0.62(3H, s)。ESI-MS (*m/z*): 513.51[*M* + *H*]⁺。

2.2 阿德福韦单 L-(硫代)氨基酸酯, 单胆酸酯衍生物的合成通法

称取阿德福韦(1.09 g, 4 mmol)、*N,N*-二乙基基-4-吗啉脒(DCMC, 2.05 g, 7 mmol)加入 100 mL 反应瓶中, 加入干燥的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)30 mL, 氮气保护, 于 80 °C 条件下搅拌溶解, 自然降温至 40 °C 后, 加入中间体 **3a~3b**(8 mmol), 40 °C 恒温反应 48 h, TLC(展开剂: 乙酸乙酯-甲醇, 1:2)显示生成的单酯点最多(**4a, 4b**)时, 加入中间体 **5a~5h**(10 mmol)升温至 85 °C 继续反应 48 h 后

停止反应。将 *N,N*-二甲基甲酰胺蒸干, 得到淡黄色物, 加入乙酸乙酯溶解, 于 4 °C 条件下静置 8 h, 过滤收集滤液, 用 4 × 40 mL 的 0.1% 稀盐酸, 饱和食盐水洗涤(4 × 40 mL), 收集有机相, 加入无水硫酸钠干燥, 抽滤后减压旋干, 得到淡黄色油状液体, 硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂: 氯仿-甲醇, 25:1)得到淡黄色油状液体, 再将产物放入冰浴中, 加入氯仿-磷酸(3:1)脱保护 4 h, 加入蒸馏水 40 mL 和氯仿 40 mL 淬灭, 用 5% 碳酸氢钠溶液调节 pH 至 7 左右, 用氯仿萃取(4 × 50 mL), 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 滤液减压蒸干, 硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂: 氯仿-甲醇, 25:1)得到淡黄色油状产物。总共合成了 10 个目标化合物, 收率、核磁共振氢谱和碳谱及质谱数据见表 1。

3 活性评价实验

参照文献[13]方法, 采用 HepG2. 2. 15 细胞系评价 **6a~6j** 对 HBV-DNA 复制的抑制效果及细胞毒性。受试化合物经 HPLC 检测, 纯度在 96% 以上, 符合实验要求。

3.1 细胞毒性试验

HepG2. 2. 15 单细胞悬液 100 μL 加入 96 孔培养板中, 放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h。次日吸弃上清液, 加入含不同受试化合物浓度(1 000, 100, 10 和 0 mol/L)的 DMEM 培养基, 每组 3 复孔, 加毕置于培养箱中继续培养 48 h 后弃上清液, 各孔加入 100 μL(含 CCK-8 试剂 10 μL)的培养液, 继续培养 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸收度, 以阿德福韦酯作为阳性对照, 用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各受试化合物的半数毒性浓度(CC₅₀)。结果见表 2。

3.2 细胞上清液 HBV DNA 的抑制试验

取浓度为每毫升 5 × 10⁴ 个 HepG2. 2. 15 单细胞悬液 100 μL 加入 96 孔培养板中, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h, 次日吸弃上清液, 加入含不同受试化合物浓度(10, 1, 0.1 和 0 mol/L)的 DMEM 培养基中, 每组 3 复孔。每次作用 2 d 后换同样药物浓度的细胞培养液, 并于第 10 天收集各孔上清液至 1.5 mL 离心管中, -20 °C 冻存备用。取待测样品 100 μL, 用 HBV 荧光定量 PCR 试剂盒测定其 HBV 的 DNA 含量。以 GraphPad Prism 5.0 软件计算各受试化合物的 EC₅₀, 以及作用选择

性指数 $SI = CC_{50}/EC_{50}$,以阿德福韦酯作为阳性对照。结果见表 2。

Table 2 Anti-HBV evaluation result of target compounds 6a-6j

Compd.	$EC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	$CC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	SI
6a	11.25	865.70	76.95
6b	3.34	406.68	121.8
6c	0.92	471.62	512.63
6d	—	1286.79	—
6e	3.52	485.02	137.79
6f	96.96	1 843.38	19.01
6g	7.15	821.31	114.87
6h	14.79	2 071.61	140.07
6i	32.38	967.02	29.86
6j	8.81	788.53	89.50
Adefovir dipivoxil	3.09	438.92	142.04

$SI = CC_{50}/EC_{50}$

4 动物体内分布实验

课题组先前研究显示,该类化合物在稳定转染 NTCP 的 HEK293 细胞中摄取率的增加可能是由于结构中存在能够被 NTCP 蛋白特异性识别和转运的底物而参与的主动转运过程^[14]。为了进一步考察该类药物在体内是否有肝靶向性,本研究筛选出一个抗病毒活性好且作用选择性指数高的化合物 6c,进行小鼠体内分布实验。

4.1 检测条件与样品处理方法

4.1.1 色谱条件 色谱柱: Waters BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 保护柱: Waters Van Guard BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm × 5 mm, 1.7 μm); 流动相: A: 乙腈 (含 0.1% 甲酸), B: 水 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱: 5% A (0 ~ 1 min), 5% ~ 100% A (1 ~ 3 min), 5% A (3 ~ 4 min); 流速: 0.30 mL/min; 柱温: 45 ℃; 进样体积: 2.0 μL。

4.1.2 质谱条件 离子监测 (NIM), 选择离子监测 (SIR) 模式, 选择正离子模式 (ESI⁺), 碰撞气流量: 0.16 mL/min; 毛细管电压: 3 kV, 离子源温度: 120 ℃; 喷雾气与反吹气: 氮气, 去溶剂气流速: 650 L/h, 去溶剂气温度: 350 ℃, 反吹气流速为 50 L/h, 确定母离子 (m/z): 501.48 (阿德福韦酯)、821.45 (6c); 锥孔电压分别为 30 和 35 V。

4.1.3 内标液的制备 称取格列脲苯 5.0 mg, 置 100 mL 量瓶甲醇超声定容, 得浓度为 2.0 μg/mL 内标液, -20 ℃ 保存。

4.1.4 生物样品处理 分别取小鼠心、肝、脾、肺、肾各器官, 用生理盐水漂洗残留血, 滤纸吸干, 再取

各器官 100 mg, 加生理盐水 900 μL 手动匀浆, 5 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 取上清液。取 10% 组织匀浆液 500 μL, 加内标溶液 2 μL, 涡旋混合 30 s, 加乙酸乙酯 1.0 mL 涡旋 1 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 取上清液氮气吹干, 加甲醇 500 μL 复溶, 涡旋 1 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 20 min, 取上清液 240 μL 待测。

4.1.5 标准曲线的绘制^[15] 精密量取 10% 组织匀浆液 500 μL 分别加入等物质的量浓度的阿德福韦酯、化合物 6c, 配制成 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/g 的样品, 取 240 μL 置进样瓶中, 进样量 2 μL。以浓度 c 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标做线性回归图, 得到血液及组织中受试化合物含量测定的标准曲线。结果表明 ADV 和化合物 6c 浓度在 0.5 ~ 20.0 μg/g 线性良好。

4.1.6 精密度、回收率、稳定性 精密量取 10% 组织匀浆液 500 μL 分别加入等物质的量浓度的阿德福韦酯、化合物 6c, 配制成 1.0, 5.0, 20.0 μg/g 的样品, 根据“4.1.4”项方法处理样品, 参考文献 [15 - 17] 进行方法学验证, 结果显示, ADV、化合物 6c 在心、肝、脾、肺、肾 1 ~ 20 μg/g 测定范围内 RSD 小于 5%, 其精密度、回收率、稳定性均符合实验要求。

4.2 给药及组织样品采集方案

取 SPF 级雄性昆明种小鼠 80 只, 随机分为阿德福韦酯、受试化合物 6c 两组, 每组 40 只小鼠。禁食不禁水 12 h 后, 均按 82.3 mg/kg 灌胃阿德福韦酯或等物质的量浓度受试化合物 6c。给药后 15, 30, 45 min 以及 1, 2, 6, 8, 12 h 各取 5 只小鼠颈椎脱臼处死、解剖, 取心、肝、脾、肺、肾各器官, 用生理盐水漂洗残留血, 滤纸吸干, 再取各器官 100 mg, 加生理盐水 900 μL 手动匀浆, 5 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 取上清液。取 10% 组织匀浆液 500 μL, 加内标溶液 2 μL, 涡旋混合 30 s, 加乙酸乙酯 1.0 mL 涡旋 1 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 取上清液氮气吹干, 加甲醇 500 μL 复溶, 涡旋 1 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 20 min, 取上清液 240 μL 待测。

4.3 数据分析

数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 统计数据, 并采用 Dunnett 法进行组间比较, 以 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

4.4 结果

实验结果显示,两种药物灌胃给药后在各组织内浓度分布呈现先增后减趋势,且达峰时间均为 2 h,化合物 **6c** 给药后的 15 min 到 12 h 之间,每个时间点上,在肝中的含量均最高,其次是肺、脾、心,在肾中含量最低,阿德福韦酯在每个时间点上在肾中的含量高,其次是肝、心、肺,在脾中含量最低。见图 3、图 4。

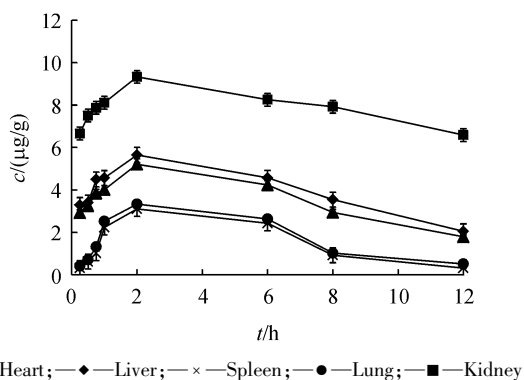


Figure 3 Concentration of adefovir dipivoxil in the organs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

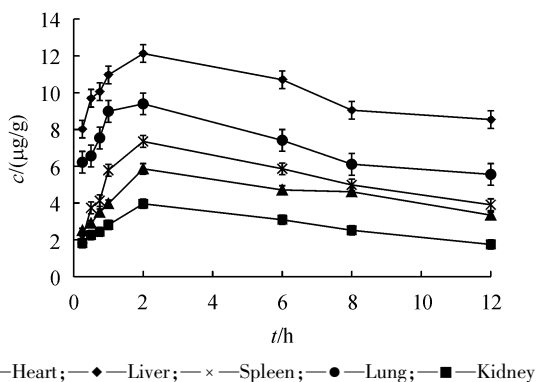


Figure 4 Concentration of compound **6c** in the organs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

5 结果与讨论

抗 HBV 活性研究发现,除了化合物 **6d** 外目标化合物均具有抗病毒活性 (EC_{50} 0.92 ~ 96.96 $\mu\text{mol/L}$),其中化合物 **6c** 的抗 HBV 活性最强,作用选择性指数最高 (EC_{50} 0.92 $\mu\text{mol/L}$, SI 512.63),其体外抗病毒效果明显优于阳性对照阿德福韦酯 (EC_{50} 3.09 $\mu\text{mol/L}$, SI 142.04)。初步构效关系分析发现,目标化合物结构中含有硫酯结构的化合物(**6f** ~ **6j**)抗病毒活性与作用选择性指数 (EC_{50} 7.15 ~ 96.96 $\mu\text{mol/L}$, SI 19.01 ~ 140.07)均

低于氧酯结构的化合物 (**6a** ~ **6e**) (EC_{50} 0.92 ~ 11.25 $\mu\text{mol/L}$, SI 76.95 ~ 512.63);目标化合物结构中引入熊去氧胆酸片段的化合物活性 (EC_{50} 0.92 ~ 17.79 $\mu\text{mol/L}$) 抗病毒活性强于引入去氧胆酸片段化合物活性 (EC_{50} 3.52 ~ 96.96 $\mu\text{mol/L}$);当胆酸片段相同时,L-氨基酸酯片段中的烃基部分为 1-甲基丙基时,其氧酯和硫酯化合物的抗病毒活性 (EC_{50} 3.52 ~ 8.81 $\mu\text{mol/L}$) 比烃基部分为其他基团活性 (EC_{50} 11.25 ~ 96.96 $\mu\text{mol/L}$) 要强;另外,L-氨基酸与阿德福韦磷酸间的连接链长对抗病毒活性也有影响,当其为 L-氨基酸乙酯时 ($n = 1$),化合物 (**6c**, **6e**, **6h**, **6j**) 抗病毒活性 (EC_{50} 0.92 ~ 14.79 $\mu\text{mol/L}$) 强于其为 L-氨基酸丙酯 ($n = 2$) 的化合物 (**6a**, **6b**, **6d**, **6f**, **6g**) (EC_{50} 3.34 ~ 96.96 $\mu\text{mol/L}$)。

小鼠体内分布实验结果显示,化合物 **6c** 和阳性对照药物阿德福韦酯在小鼠体内分布广泛,在心、肝、脾、肺、肾中均能检测到。药物在各器官中的达峰时间均为 2 h,并且各器官中的药物含量不同。在给药 0.25 ~ 2 h 每个检测时间点,化合物 **6c** 在肝中的含量均为最高,肾中含量均最低;阿德福韦酯在上述各时间点在肾中的含量均为最高,在脾中均最低。在给药 15 min ~ 2 h 的每个检测时间点上,化合物 **6c** 在肝中的含量 [$(8.02 \pm 0.48) \sim (12.13 \pm 1.09) \mu\text{g/g}$] 均高于阿德福韦酯的含量 [$(2.05 \pm 0.12) \sim (5.65 \pm 0.42) \mu\text{g/g}$],同时上述各时间点上化合物 **6c** 在肾中的含量 [$(1.75 \pm 0.11) \sim (3.96 \pm 0.10) \mu\text{g/g}$] 均低于阿德福韦酯的含量 [$(6.59 \pm 0.41) \sim (9.33 \pm 0.82) \mu\text{g/g}$],该结果表明,化合物 **6c** 在肝中分布效率明显高于阳性对照阿德福韦酯,而在肾中分布效率明显低于阿德福韦酯。以上研究结果提示采用单 L-氨基酸酯,单胆酸酯前药修饰策略能够赋予目标化合物肝靶向性分布特征并降低其肾分布。

鉴于化合物 **6c** 的抗病毒活性、作用选择性指数均优于阿德福韦酯,并且提示其具有较高肝分布特性、较低的肾分布特性,因此,其具有进一步研究的价值。

参考文献

- [1] Tanji N, Tanji K, Kambham N, et al. Adefovir nephrotoxicity: Possible role of mitochondrial DNA depletion[J]. *Hum Pathol*,

- 2001, **32**(7):734–740.
- [2] Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation[J]. *Physiol Rev*, 2003, **83**(2): 633–671.
- [3] Enhnen A, Kramer W, Wess G. Bile acids in drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 1998, **3**(9):409–418.
- [4] Kullak-Ublick GA, Glasa J, Böker C, et al. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas[J]. *Gastroenterology*, 1997, **113**(4): 1295–1305.
- [5] Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, et al. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver[J]. *J Hepatol*, 2003, **39**(6):932–939.
- [6] Balakrishnan A, Polli JE. Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): a potential prodrug target[J]. *Mol Pharm*, 2006, **3**(3):223–230.
- [7] Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters[J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, **64**:635–661.
- [8] Schaap FG, Trauner M, Jansen PLM. Bile acid receptors as targets for drug development[J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2014, **11**(1):55–67.
- [9] Fu X, Jiang S, Li C, et al. Design and synthesis of novel bis (L-amino acid) ester prodrugs of 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA) with improved anti-HBV activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**(2):465–470.
- [10] Fu XZ, Jiang SH, Yang YS, et al. Design, synthesis and anti-HBV activity of L-amino acid ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2008, **43**(5): 495–503.
- [11] Su H, Chen Y, Fu XZ, et al. Synthesis, antiviral activity and primary hepatocyte uptake evaluation of adefovir L-amino acid and bile acid ester derivatives[J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2016, (03):264–268.
- [12] Pei JY, Liu Y, Fu XZ, et al. Design and synthesis of phosphonates derivatives of adefovir with reduced nephrotoxicity[J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2012, **27**(05):478–482.
- [13] Honkoop P, de Man RA, Zondervan PE, et al. Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lamivudine[J]. *Liver Int*, 2010, **17**(2):103–106.
- [14] Chen Y, Li J, Zhang WZ, et al. Establishment and identification of HEK293 cell lines with stable and high expression of NTCP[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2016, **32**(12): 1767–1772.
- [15] Xu ZR, Jiang Y, Zhang XQ, et al. Study on pharmacokinetics and tissue distribution of adefovir dipivoxil in rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2005, **22**(7):617–620.
- [16] Gu XH, Qiu ZW, Xu H, et al. Study on the distribution and liver targeting of OA-PLGA-TPGS-NPs in mice[J]. *J China Pharm* (中国药房), 2012, **23**(33):3086–3088.
- [17] Juling S, Bachler G, Von GN, et al. In vivo distribution of nanosilver in the rat: The role of ions and de novo-formed secondary particles[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, **97**:327–335.