

用于研究病毒唑作用机理的光敏探针的设计与合成

朱 洵^{1,2}, 曲凡歧³

(1. 北京大学天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083;

2. 武汉化工学院材料科学与工程学院, 武汉 430074;

3. 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072)

摘要 对用于研究病毒唑作用机理的光敏探针进行了设计, 并以四乙酰核糖化合物和 3-溴-1,2,4-三唑-5-酰甲酯化合物为原料进行合成实验, 得到光敏探针化合物——5-叠氮基-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-3-酰胺和 3-叠氮基-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺. 采用 IR, MS 和 ¹H NMR 等技术对化合物的结构进行了表征, 同时对探针分子的设计和结构判定进行了探讨.

关键词 病毒唑; 光敏探针; 三唑叠氮化合物; 设计; 合成

中图分类号 O627.27

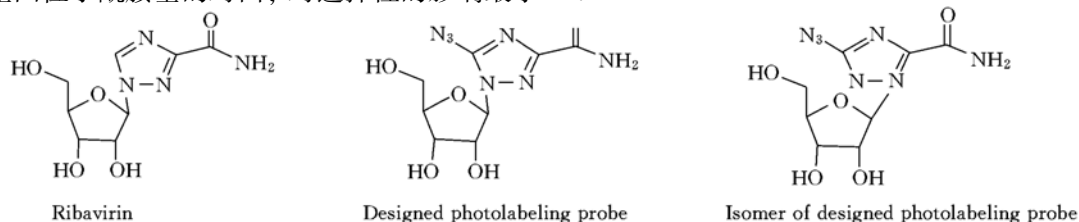
文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)06-1062-04

光标记方法^[1,2] (Photoaffinity Labeling, PAL) 是 20 世纪 70 年代开始发展起来的一种实验方法. 该方法主要是采用一个光敏的探针分子, 让这个分子在无光时与被标记的物质进行超分子结合, 经过适当的光辐射后, 光敏探针将产生高活性的中间体, 在配体-受体间形成共价键. 这样就可以借用光引发 (远程控制), 使探针在作用位点附近与被研究分子产生交联, 通过对该交联点的分析和表征, 可得到探针与生物大分子相互作用位点结构组成及大致空间结构, 从而为研究小分子与生物大分子 (如底物-酶、配体-受体、抗原-抗体) 之间的相互作用提供了直接可靠的有效手段.

病毒唑(1- β -D-呋喃核糖基-1,2,4-三氮唑-3 羧酰胺, 利巴韦林, Ribavirin, Virazole) 是在 20 世纪 70 年代开发出来的一种广谱抗病毒药物. 1972 年由美国加州核酸研究所合成, 它是第一个被发现的广谱的抗病毒药物, 对相当种类的 DNA 和 RNA 病毒均有显著效果, 但不是针对某种特定病毒的特效药^[3,4]. 因此, 病毒唑的应用范围相当广泛^[5-8]. 其主要缺点是毒性相对较大, 特别是在动物试验中发现它可能引起畸形一类的遗传性损坏. 文献^[9,10]对病毒唑可能的作用机理进行了报道, 但缺乏决定性的证据, 迄今为止, 病毒唑的作用机理仍不十分清楚^[11,12]. 因此, 我们希望能应用光标记的病毒唑来进行病毒唑的机理研究, 从而可直观地得到病毒唑所作用的蛋白质或酶的生物过程, 找到其作用靶标和作用机理, 从而有可能设计更高效、低毒的抗病毒药物.

本研究的目的是根据病毒唑的结构和可能的机理, 设计、筛选并合成出来的光敏基团是叠氮基的光敏探针^[13], 其结构见 Scheme 1. 该探针分子及其异构体不仅保持了被模拟分子的完整结构, 而且被修饰的基团位于酰胺基的对面, 对选择性的影响最小^[14].



Scheme 1 Ribavirin, the designed photolabeling probe and its isomer

收稿日期: 2005-06-02.

联系人简介: 朱 洵 (1978 年出生), 男, 博士研究生, 主要从事化学生物学研究. E-mail: xbwhy@public.wh.hb.cn

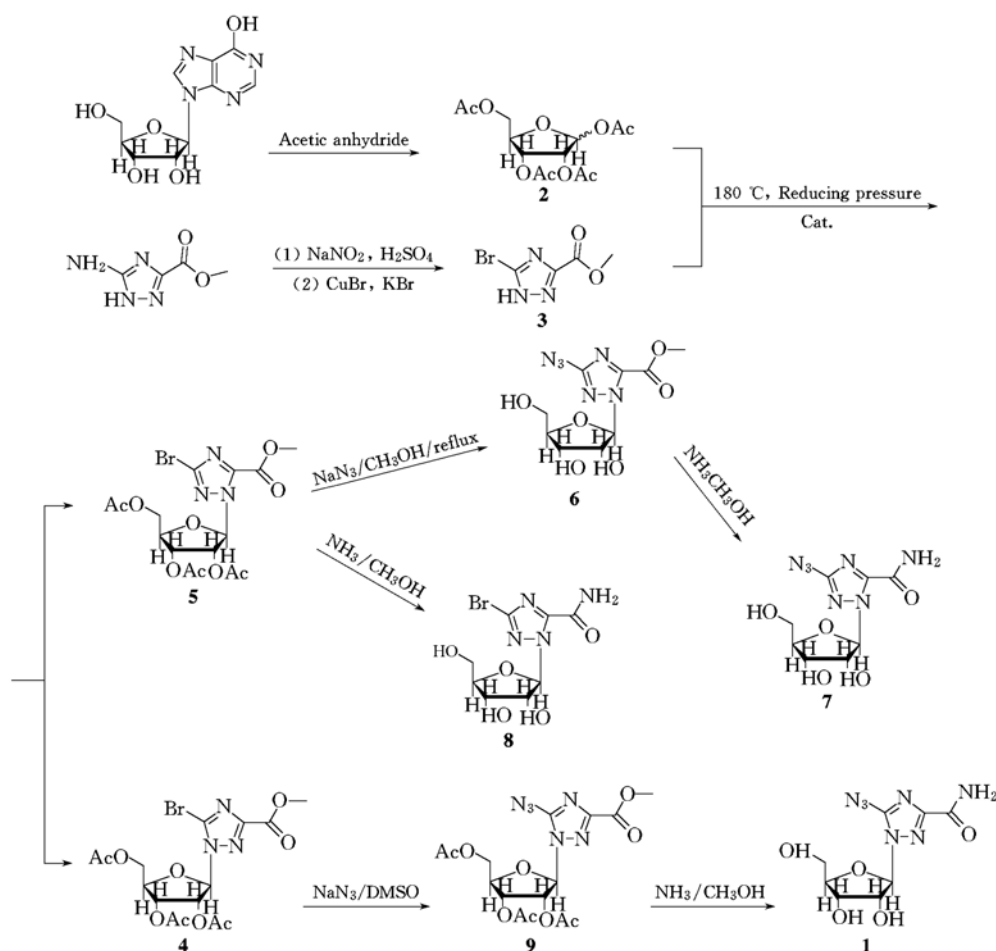
1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Nicolet 170SX FTIR 红外光谱仪(美国); ZAB 3F-HF 型质谱仪(英国 VG 公司); Varian Mercury-VX300 核磁共振仪(美国). 5-氨基-1,2,4-三唑-3-酰甲酯(工业品); 叠氮化钠(北京试剂公司), 分析纯; 肌苷(工业品); 双对硝基苯基磷酸酯和氨-甲醇溶液(2 mol/L)(Aldrich 公司); 乙酸酐和对甲基苯磺酸(上海试剂公司), 分析纯; 柱层析所用硅胶(200~300 目)在 108 °C 下活化 1 h.

1.2 光敏探针的合成与表征

合成光敏探针 5-叠氮基-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-3-酰胺和 3-叠氮基-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺的设计路线见 Scheme 2^[14,15]. 其中, 化合物四乙酰核糖(2)、5-溴-1,2,4-三唑-3-酰甲酯(3)、5-溴-1(2,3,5-三乙酰基- β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-3-酰甲酯(4)、3-溴-1(2,3,5-三乙酰基- β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰甲酯(5)、3-叠氮-1-(5-乙酰基- β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰甲酯(6)和 5-叠氮基-1-(2,3,5-三乙酰基- β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-3-酰甲酯(9)按文献[16]方法合成.



Scheme 2 Syntheses of 5-azido-1-(β -ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-3-carboxamide and 3-azido-1-(β -ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-5-carboxamide

1.2.1 化合物 3-叠氮基-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺(7)的合成 将 97.6 mg 化合物 6 溶于 2 mL 甲醇中, 在冷冻下通入氨气至饱和, 在室温下静置过夜. 反应液以 V (二氯甲烷): V (甲醇) = 10:1 展开, 得到 29.9 mg 产物. 产率 34%; TLC: R_f = 0.2 [V (二氯甲烷): V (甲醇) = 10:1]; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ : 3.50(m, 2H), 3.88(d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.15(d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.35(d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.77(t, J = 5.1 Hz, 1H), 5.20(d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.10(d, J = 4.5 Hz, 1H), 6.673(s, 1H), 8.174(s, 1H), 8.443(s, 1H). IR (KBr, 液膜), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3 398, 2 958, 2 163, 1 689,

1 612, 1 518, 1 460, 1 384, 1 291, 1 107, 1 049, 880, 669, 467.

1.2.2 化合物 3-溴-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺(**8**)的合成 将 4.621 7 g 化合物 **5** 溶于 13 mL 甲醇中, 在冰盐浴冷却下, 持续通入氨气, 反应体系中随即有白色沉淀析出. 在室温下放置过夜, 沉淀消失. 蒸去甲醇, 以乙酸乙酯洗脱硅胶柱(2 cm \times 35 cm), 分离得到产品 1.110 4 g, 收率 42%; TLC: $R_f=0.3$ (乙酸乙酯); $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ : 8.43(s, 1H), 8.16(s, 1H), 6.682(s, 1H), 5.49(d, $J=5$ Hz, 1H), 5.17(d, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.75(t, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.35(d, $J=3.6$ Hz, 1H), 4.15(d, $J=5.1$ Hz, 1H), 3.87(d, $J=2.1$ Hz, 1H), 3.51(m, 1H), 3.43(m, 1H).

1.2.3 化合物 5-叠氮-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-3-酰胺(**1**)的合成 将 51 mg 化合物 **9** 溶于 5 mL 2 mol/L 氨甲醇溶液中, 放置过夜. 将溶液蒸干, 以 V (二氯甲烷): V (甲醇)=10:1 为展开剂, 用硅胶柱(2 cm \times 15 cm)层析分离, 得到 20 mg 白色固体化合物 **1**. 产率 58%; TLC: $R_f=0.2$ [V (二氯甲烷): V (甲醇)=10:1]; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ : 7.84(s, 1H), 7.68(s, 1H), 5.53(d, $J=5.4$ Hz, 1H), 5.45(d, $J=4.2$ Hz, 1H), 5.20(d, $J=5.7$ Hz, 1H), 4.76(t, $J=5.7$ Hz, 1H), 4.40(q, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.14(q, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.87(q, $J=5.1$ Hz, 1H), 3.53(m, 1H), 3.44(m, 1H); $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 - D_2O , 300 MHz), δ : 7.87(s, <1H), 7.66(s, <1H), 5.61(d, $J=5.4$ Hz, <1H), 5.45(d, $J=3.6$ Hz, 1H), 5.27(d, $J=5.4$ Hz, <1H), 4.89(t, $J=5.7$ Hz, <1H), 4.38(t, $J=4.2$ Hz, 1H), 4.13(t, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.87(t, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.41(m, 1H), 3.37(m, 1H). IR(KBr), $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3 401, 2 925, 2 167, 1 690, 1 617, 1 515, 1 470, 1 296, 1 236, 1 132, 1 076, 1 049, 1 017, 976, 635.

2 结论与讨论

2.1 探针分子的设计

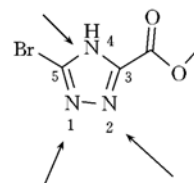
对于探针分子的设计考虑到的是修饰被模拟的分子, 在其适当位置添加一个光敏基团. 一方面, 借助于主体的被模拟分子, 保持其选择性; 另一方面, 借助于接在其上的光敏基团将其改性为光探针而达到光标记的目的.

在设计病毒唑的光敏探针时, 希望引入的光敏基团是叠氮基. 一方面由于叠氮基是应用最广的光标记光敏基团, 在这个基团上积累的实验数据和文献最多; 另一方面, 叠氮基是一个体积相对较小的基团, 可能对原分子的性质影响较小, 从而保持探针的选择性.

2.2 探针分子的结构判定

探针分子合成的关键是反应生成的糖苷异构体的形式, 如 Scheme 3 所示. 三唑环上有 3 个氮原子, 其中 4 位的氮原子活性较弱, 而相连的 2 个氮原子均有可能接上糖基团. 依照工业上制备病毒唑的实践经验, 在此条件下, 绝大部分是取代在 1 位氮原子上的生成物. 不同取代基对缩合反应异构体分布有很大差异^[14,17], 也导致不同异构体上糖环 1 位氢化学位移的变化^[18].

在该反应条件下, 生成物主要是其中一种异构体. 对照文献^[18], 从其 1 位糖环氢的核磁共振数据来看, 它可能是取代于 2 位的异构体, 即 3-溴-1-(2,3,5-三乙酰基- β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺. 其结构通过对它的衍生物 3-溴-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺(化合物 **8**)的单晶结构测定(图 1)得到证实^[13]. 表明该化合物的核糖基是接在三唑酰胺基的邻位, 其构象是 β 式. 但在将溴基



Scheme 3 Structure of glucosidic isomer

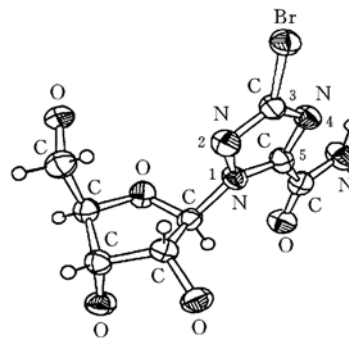


Fig. 1 Single crystal structure of 3-bromo-1-(β -ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-5-carboxamide

团取代为叠氮基时, 使用不同的溶剂使产物有不同的结果. 在乙醇介质中取代, 生成物的 1 位糖环氢仍然位于 δ 6.8 附近, 显示出反应物并未异构化; 但是, 在二甲亚砜溶剂中, 产物的 1 位糖环氢是位于 δ 5.8 处, 对照文献[18], 这个产物很有可能在溶剂中已经异构化, 在叠氮基取代的同时, 异构化为 1 位取代的产物. 这个化合物的具体构型尚未得到单晶结构的最终证实. 但是其结构参照相应的文献[17]中的类似物的核磁数据以及以化合物 3-溴-1-(β -呋喃核糖基)-1,2,4-三唑-5-酰胺的单晶结构作旁证, 可以得到推定.

参 考 文 献

- [1] Gyorgy Dorman, Glenn D. . Trends in Biotechnology[J], 2000, **18**: 64—67
- [2] Steven A. . Tetrahedron[J], 1995, **51**: 12479—12502
- [3] ZHOU Tao(周 涛). Chinese Journal of Medicinal Chemistry(中国医药化学杂志)[J], 1996, **6**(2): 133—135
- [4] Sidwell R. W. , Huffman J. H. , Khare G. P. *et al.* . Science[J], 1972, **177**: 705—706
- [5] ZHANG Jian-Min(张建民). Tianjin Pharmacy(天津医药)[J], 2005, **17**(2): 38—39
- [6] ZHENG Ke-Wen(郑柯文), YU Qing-Sen(俞庆森), JIANG Yong-Jun(蒋勇军) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(1): 55—60
- [7] So L. K. Y. , Lau A. C. W. , Yam L. Y. C. *et al.* . Lancet[J], 2003, **361**: 1615—1617
- [8] Koren G. , King S. S. , Knowles E. P. . Canadian Medical Association or Its Licenses[J], 2003, **168**: 1289—1291
- [9] Jason D. G. , Craig E. . Virology[J], 2002, **298**: 176—180
- [10] Shane C. , David M. , Jamie J. A. *et al.* . Nature Medicine[J], 2000, (6): 1375—1379
- [11] Hong Z. , Cameron C. E. . Progress in Drug Research[J], 2002, **59**: 41—44
- [12] Dorman G. , Prestwich G. D. . Trends in Biotech. [J], 2000, **18**: 64—66
- [13] Wu Q. Y. , Zhu X. , Wan J. Q. *et al.* . Chinese Chemical Letters[J], 2004, **15**(8): 907—910
- [14] Joseph T. Witkowski, Roland K. Robins, Gyaneshwar P. Khare *et al.* . J. Med. Chem. [J], 1973, **16**: 935—937
- [15] LI Qing-Han(李清寒), LI Zi-Cheng(李子成), CHEN Shu-Hua(陈淑华) *et al.* . Chinese Journal of Organic Chemistry(有机化学)[J], 2004, **24**(11): 3231—3238
- [16] ZHU Xun(朱 洵). Master Dissertation[D], College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, 2003
- [17] Naik S. R. , Witkowski J. T. , Robins R. K. . J. Heterocycl. Chem. [J], 1974, **11**: 57—61
- [18] Yogesh S. S. , Naeem B. H. , Steven B. L. *et al.* . J. Med. Chem. [J], 1988, **31**: 330—335

Design and Synthesis of Photolabeling Probes for the Study of Antiviral Mechanism of Ribavirin

ZHU Xun^{1,2*}, QU Fan-Qi³

- (1. The State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100083, China;
2. School of Material Science and Engineering, Wuhan Institute of Chemical Technology, Wuhan 430074, China;
3. College of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract The photolabeling probes for the study of antiviral mechanism of ribavirin were designed, and the synthesis experiments were carried out by using 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-ribofuranose and methyl 3-bromo-1,2,4-triazole-5-carboxylate as the raw materials. Two photolabeling probes for the study of antiviral mechanism of ribavirin, 5-azido-1-(β -ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-3-carboxamide and 3-azido-1-(β -ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-5-carboxamide were synthesized, and characterized by IR, MS and ¹H NMR, *etc.* . The design of the photolabeling probes and their structures were discussed.

Keywords Ribavirin; Photolabeling probe; Aizdo-triazoles; Design; Synthesis

(Ed. : H, J, Z)