

## 格尔德霉素衍生物 TC-GM 的合成及体外抗病毒活性研究

李春鑫<sup>†</sup>, 山广志<sup>†</sup>, 樊博, 陶佩珍, 赵立勋, 蒋建东, 李玉环\*, 李卓荣\*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要:** 本文以发现新型抗病毒结构化合物为目的, 将不同作用机制的抗病毒活性化合物格尔德霉素和拉米夫定化学偶联得到新结构化合物 TC-GM。分别采用 p24 抗原、斑点杂交法以及细胞病变法 (CPE) 测定了 TC-GM 对 HIV-1、HBV、HSV 和 CoxB 病毒的抑制活性。结果显示, TC-GM 具有与格尔德霉素相似的广谱抗病毒特性, 对 HIV-1、HBV、HSV 1 型和 2 型、CoxB6 等病毒的复制均具有抑制作用, 并且抗 HIV-1 和 HBV 的活性较强。

**关键词:** TC-GM; 合成; 抗病毒; 格尔德霉素; 拉米夫定

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0683-05

## Synthesis and antiviral activities of geldanamycin analog TC-GM *in vitro*

LI Chun-xin<sup>†</sup>, SHAN Guang-zhi<sup>†</sup>, FAN Bo, TAO Pei-zhen, ZHAO Li-xun,  
JIANG Jian-dong, LI Yu-huan\*, LI Zhuo-rong\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and  
Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** In order to find antiviral compounds with novel structures, geldanamycin and lamivudine with different antiviral mechanisms were conjunctively synthesized to acquire a new compound TC-GM, and the antiviral activity of TC-GM was measured. The antiviral activity against HIV-1 was examined by p24 antigen ELISA kit. The activity against HBV was examined by dotblot. The activity against HSV and CoxB virus was examined by CPE. TC-GM exhibited broad-spectrum antiviral activities similarly like geldanamycin. TC-GM inhibited the replication of different viruses, including HIV-1, HBV, HSV 1 and 2, CoxB6. TC-GM showed more potent inhibitory activity against HIV-1 and HBV than other detected virus.

**Key words:** TC-GM; synthesis; antiviral; geldanamycin; lamivudine

病毒性疾病已经跃居传染病之首, 给人类的健康带来极大的威胁。病毒性乙型肝炎 (HBV)<sup>[1]</sup>及由人免疫缺陷病毒 (HIV) 引起的艾滋病 (AIDS) 均为世界性严重传染病, 也是我国重点防治的病毒性疾病。我国为肝炎大国, 患者数约占世界的 1/3。虽然疫苗控制 HBV 感染发挥很大作用, 但现存大量患者需要有

效的治疗, 以控制传染源, 降低 HBV 相关疾病的死亡率, 改善患者的生活质量。

上世纪 90 年代以来, 抗病毒药物有了突飞猛进的发展, 尤其是抗艾滋病病毒药物, 其发展速度居抗病毒药物之首。抗艾滋病病毒药物的发展, 也带动了其他抗病毒药物的开发<sup>[2]</sup>。但抗肝炎病毒药物发展迟缓, 目前, 临床上应用的治疗 HBV 的药物品种有限, 迄今仅有干扰素、拉米夫定 (3TC)、阿德福韦二吡啶酯、恩替卡韦及长效干扰素 (peginterferon alfa-2a) 为国际公认的抗肝炎病毒药物。除干扰素外, 其他 3 个药物为核苷及核苷酸衍生物, 作用靶点均为 HBV 核酸聚合酶。这些化合物抑制病毒活性强, 对 HBV 治疗发挥了很大作用<sup>[3]</sup>。但由于长期用药所产生的耐药及

收稿日期: 2011-03-17.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09301-003); 国家自然科学基金资助项目 (30772600, 30472076).

<sup>†</sup>对论文贡献一致

\*通讯作者 Tel: 86-10-63010984, Fax: 86-10-63017302,

E-mail: yuhuanlibj@126.com

Tel: 86-10-63027185, Fax: 86-10-63017302,

E-mail: L-Z-R@263.net

毒性,使得疗效降低病情反复,不能根除病毒<sup>[4-6]</sup>。耐药问题是目前临床上应用的所有核苷类抗病毒药物所面临的共性问题,并且上述抗 HBV 及 HIV 药物均为国外开发,我国患者依赖进口,不仅给患者造成额外经济负担,且受国外制药公司的制约。积极开发具有自主知识产权的新作用机制的抗病毒药物是对我国医药工作者的严峻挑战。

本实验室在进行格尔德霉素 (geldanamycin, GDM) 抗病毒作用的研究中发现,其对多种 DNA 和 RNA 病毒均有抑制活性<sup>[7, 8]</sup>。与临床使用药物不同,格尔德霉素通过抑制宿主热休克蛋白 90 (Hsp90) 发挥抗病毒作用。由于毒性较大特别是肝毒性及理化性质的缺陷,格尔德霉素本身很难成为临床药物。近年来对格尔德霉素的改造主要是对其 17 位甲氧基进行胺基取代<sup>[9, 10]</sup>。为了改善格尔德霉素的药代性质,增强靶向性,在格尔德霉素 17 位引入雌二醇<sup>[11]</sup>或单克隆抗体<sup>[12]</sup>后,衍生物均保留了一定的活性,且在体内表现出一定的靶向性。

本论文借鉴前药设计理念,将两种作用机制的抗病毒活性结构拼合在一起(图 1),在格尔德霉素 17 位引入含有拉米夫定酯的结构片段,设计合成了目标化合物 TC-GM,期望在保留抗病毒活性的同时能够增加水溶性,改善其分布以降低因肝脏局部聚集导致的毒性。

## 结果与讨论

### 1 TC-GM 的合成

以拉米夫定 (3TC) 为原料,在 *N, N'*-二异丙基

碳二亚胺 (DIC) 和 1-羟基苯并三氮唑 (HOBt) 的催化下,其活泼羟基与 Boc 保护的  $\gamma$ -氨基丁酸 (2) 缩合成酯 (3), 3 在干燥的盐酸甲醇溶液中脱保护得到拉米夫定- $\gamma$ -氨基丁酸酯盐酸盐 (4), 4 在三乙胺存在下与格尔德霉素在避光条件下发生迈克尔反应,得到 17 位为  $\gamma$ -氨基丁酸拉米夫定酯取代的格尔德霉素衍生物 TC-GM (1), 总收率约 30%。见合成路线 1。

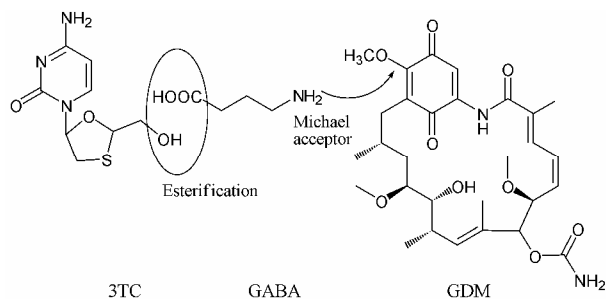


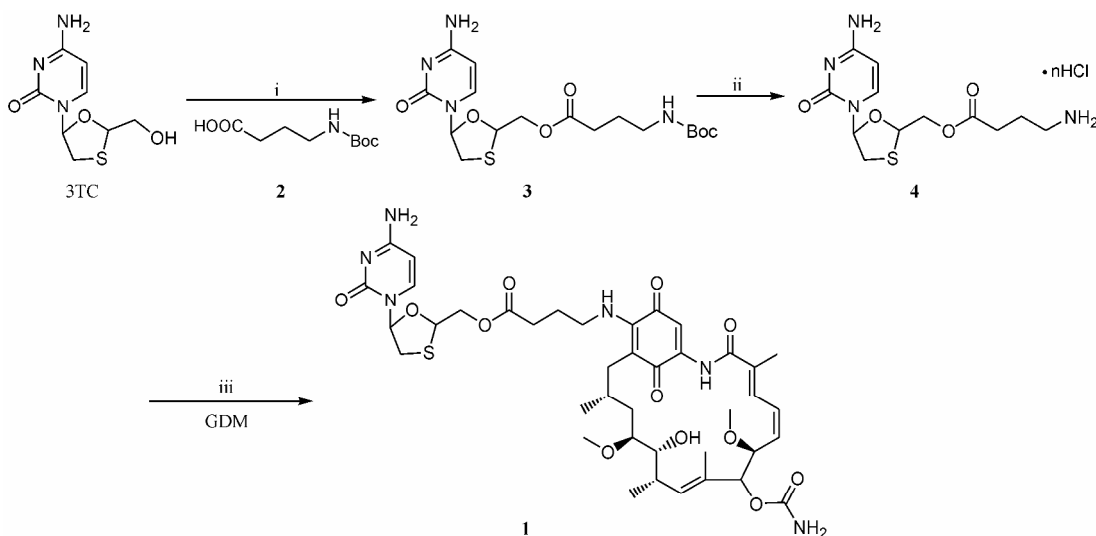
Figure 1 Structures and strategy for hybridization of 3TC and GDM

### 2 抗病毒活性研究结果

细胞培养抗病毒试验结果显示,格尔德霉素与拉米夫定的偶联物 TC-GM 对 HIV-1、HBV、HSV-1、HSV-2 及 CoxB6 病毒具有抑制活性,对 CoxB3 病毒没有抑制作用。格尔德霉素对所有试验病毒均显示较强的抑制活性 ( $IC_{50}$  在  $0.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以下), TC-GM 保留了相对较宽的抗病毒谱,但抗病毒活性较格尔德霉素和 3TC 均有明显降低(表 1)。

### 3 讨论

目前,临床上应用的抗病毒药物作用靶点单一



Reagents and conditions: (i) DIC, HOBt, DMF; (ii) HCl/MeOH; (iii)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CHCl}_3$

Scheme 1 Synthetic route of TC-GM

**Table 1** The antiviral activity of TC-GM against different viruses *in vitro*. TC<sub>50</sub><sup>a</sup>: TC<sub>50</sub> is the concentration of the 50% cytotoxic effect by MTT assay; IC<sub>50</sub><sup>b</sup>: IC<sub>50</sub> is the concentration of the sample required to inhibit virus replication 50% by p24 ELISA assay; TC<sub>50</sub><sup>c</sup>: TC<sub>50</sub> is the concentration of the 50% cytotoxic effect with CPE assay; IC<sub>50</sub><sup>d</sup>: IC<sub>50</sub> is the concentration of the sample required to inhibit virus replication 50% by CPE assay; ND: Not detected; Unit: μmol·L<sup>-1</sup>

Compd.	HIV-1		HBV		HSV-1		HSV-2		CoxB3		CoxB6	
	TC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	TC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	TC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	TC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	TC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	TC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>
TC-GM	67.1	0.054 7	8.8	0.66	183.8	19.35	183.8	18.26	183.8	NA	183.8	3.79
GDM	5.0	0.054 4	0.385	0.066	5.6	0.12	5.6	0.17	5.6	0.32	5.6	0.11
3TC	>24.8	0.001	>100	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

导致耐药性非常严重。本论文将基于宿主细胞 Hsp90 的广谱抗病毒活性化合物格尔德霉素与核苷类药物 3TC 通过  $\gamma$ -氨基丁酸连接, 合成连接产物 TC-GM, 试图在维持或提高抗病毒活性的同时改善格尔德霉素的毒性, 改善成药性。结果, 目标化合物 TC-GM 保留了部分广谱抗病毒特性和对 HIV-1、HBV 的较强抑制活性。TC-GM 的抗病毒作用机制及体内抗病毒作用还有待进一步研究。

## 实验部分

### 1 仪器与试剂

熔点采用北京泰克仪器有限公司的 X-4 数字显示显微熔点测定仪, 温度未经校正, <sup>1</sup>H NMR 采用美国 Varian 公司 MERCURY-400 及 UNITY INOVA-500 型核磁共振谱仪测定 (TMS 为内标); MS 谱采用英国 Micromass 公司 AutoSpec Ultima-Tof 串联质谱仪测定。除特殊说明, 所用试剂均为市售分析纯产品, 不经处理直接使用。

### 2 目标化合物的合成

**2.1** ( $\gamma$ -叔丁氧羰基胺基)丁酸拉米夫定-5-酯 (**3**) *N*-叔丁氧羰基- $\gamma$ -氨基丁酸 (**2**) 3.5 g (17.2 mmol) 溶于 18 mL 三氯甲烷, 加入 DIC 6.2 g (49.1 mmol) 和 HOBt 6.5 g (48.1 mmol) 反应 4 h。拉米夫定 3.5 g (15.2 mmol) 加入 15 mL DMF, 外浴 50 °C 搅拌溶解后加入 **2** 的反应液, 50 °C 下搅拌 36 h。冷却至室温, 过滤, 滤液减压浓缩, 得油状淡黄色液体。经硅胶柱色谱分离, 以三氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 得 5.05 g 化合物 **3**, 白色固体, 收率 79.8%, mp 112~114 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.44 (s, 9H), 1.84~1.93 (m, 2H), 2.43 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.16~3.21 (m, 3H), 3.57 (s, 1H), 4.41~4.61 (m, 2H), 4.70 (br, 1H), 5.37 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz), 5.99 (s, 1H), 6.33 (t, 1H, *J* = 4.4 Hz), 6.60~6.88 (br, 2H), 7.84 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz); FAB-MS *m/z*: 415 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.2**  $\gamma$ -氨基丁酸拉米夫定-5-酯盐酸盐 (**4**) 无水甲醇 8 mL, 冰浴下搅拌, 缓慢滴加乙酰氯 4 mL。滴加完毕后室温反应 30 min。2.0 g 化合物 **3** (4.8 mmol) 溶于 7 mL 甲醇后, 滴加到上述溶液中, 搅拌 40 min, 过滤, 用少量甲醇洗, 得 0.87 g 化合物 **4**, 白色固体, 收率 51.4%, mp 101~103 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.77~1.83 (m, 2H), 2.42~2.58 (m, 2H), 2.79~2.83 (m, 2H), 3.51~3.59 (m, 2H), 4.39~4.49 (m, 2H), 5.40 (t, 1H, *J* = 4.4 Hz), 6.04~6.06 (m, 1H), 6.22 (t, 1H, *J* = 4.4 Hz), 7.78 (br, 2H), 7.94 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz); FAB-MS *m/z*: 315 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.3** 17-(拉米夫定丁酸酯- $\gamma$ -胺基)-17-去甲氧基格尔德霉素 (**1**) 格尔德霉素 1.0 g (1.78 mmol), 加入 0.7 g 化合物 **4** (1.99 mmol)、三氯甲烷 30 mL、DMF 2 mL、无水甲醇 5 mL 及三乙胺 2 mL, 室温避光搅拌。TLC 跟踪至格尔德霉素反应完全, 减压浓缩后经硅胶柱分离, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 得到 1.1 g 目标产物 **1**, 紫色固体, 收率 73.2%, mp 144~147 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.95~1.10 (m, 6H), 1.25~1.27 (m, 2H), 1.51 (s, 2H), 1.62~1.65 (m, 1H), 1.71~1.75 (m, 2H), 1.75 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.03~2.05 (m, 2H), 2.35~2.39 (m, 1H), 2.50~2.54 (m, 2H), 2.65~2.73 (m, 2H), 3.07~3.13 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.44~3.55 (m, 2H), 4.32 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz), 4.41~4.65 (m, 1H), 4.81 (br, 1H), 5.19 (s, 1H), 5.37~5.41 (m, 1H), 5.84~5.89 (m, 2H), 6.26~6.30 (m, 1H), 6.38~6.39 (m, 1H), 6.56 (t, 1H, *J* = 11.6 Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz), 7.23 (s, 1H), 7.81 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 12.09 (br, 1H); HR-MS (ESI) *m/z*: 843.360 3 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. 843.359 3)。

### 3 抗病毒活性实验

**3.1** 仪器与材料 2.2.15 细胞: 乙型肝炎病毒 (HBV) 基因转染人肝癌细胞 (Hep G2) 的 2.2.15 细胞系, 美国 Mount Sinai 医学中心构建, 引进后自行传代培养。Vero、MDCK 和 MT-4 细胞: 本室传代保存。病毒:

HIV-1 IIIB, Mount Sinai 医学中心惠赠, 本室传代保存。HSV-1、HSV-2、CoxB3 和 CoxB6: 本室传代保存。MEM、新生牛血清、L-谷氨酰胺、G-418 (geneticin)、酵母 *t*-RNA 均购自 Invitrogen 公司; 蛋白酶 K, Merck 公司产品; 聚乙二醇, 瑞典 Fluka 产品; 二甲基亚砜, Sigma 公司产品; d-<sup>32</sup>P-dCTP, 美国 PE 公司产品; 探针标记用随机引物试剂盒购自 Promerger 公司; HIV-1 P24 抗原检测试剂盒为荷兰 BioMerieux 公司产品。培养瓶、培养板, 美国 Corning 公司产品; 二氧化碳孵箱, 美国 Thermo 公司产品; 倒置显微镜, 奥林巴斯公司产品; 斑点印迹微量过滤器, 美国 Bio-Rad 公司产品;  $\gamma$ -计数器, 德国 Beckman 产品; 扫描仪, Microtek 产品; gel-pro analyzer 软件, MEDIA Cybemetice<sup>®</sup> 产品。

### 3.2 实验方法

**细胞培养液及试剂配制** MEM 培养液 100 mL: 含胎牛血清 10%、谷氨酰胺 0.03%、G418 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和卡那霉素 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**细胞毒性测定** 处于指数生长期的 Vero、MDCK 和 MT-4 细胞铺在 96 孔板上, 每孔  $2\times 10^4$  细胞。然后给予受试药物, 浓度在 0~250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, MT-4 细胞为 72 h。MT-4 细胞的毒性试验采用 MTT 法, Vero、MDCK 细胞的毒性试验采用 CPE 法。受试物对细胞半数有毒浓度 (TD<sub>50</sub>) 采用 Reed & Muench 方法计算。

**抗人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 活性实验** MT-4 细胞感染 100 TCID<sub>50</sub> 的 HIV-1 (IIIB), 吸附 2 h 后接种 96 孔板 ( $2\times 10^5/\text{mL}$ ), 加上不同浓度受试物培养液, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 3 天。收集上清液, 用 ELISA 试剂盒测定 p24 抗原含量, 用 Reed & Muench 法计算药物抗 HIV-1 活性。

**抗人乙型肝炎病毒 (HBV) 活性实验** 受试药物对 2.2.15 细胞上清的 HBV DNA 抑制实验采用斑点杂交方法。2.2.15 细胞每毫升 20 万个接种到 24 孔细胞培养板, 每孔 1 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养, 接种后 24 h 加入含有不同浓度药物的培养液, 4 天后换原浓度药液继续培养, 加药培养 8 天后收取细胞上清液, 上清液经聚乙二醇沉淀过夜后离心, 沉淀经含有蛋白酶 K 的裂解缓冲液裂解, 然后以苯酚/三氯甲烷/异戊醇抽提、无水乙醇沉淀 DNA, 真空抽干后 DNA 重溶于 TE 缓冲液中, -20  $^{\circ}\text{C}$  中保存。

**斑点杂交:** 取 20  $\mu\text{L}$  (DNA 含量 25  $\mu\text{g}$ ), 经变性、中和后点膜, 硝酸纤维素膜从微孔过滤器上取下经

干烤、预杂交、杂交、洗膜、放射自显影, 以常规方法冲洗 X 光片。X 光片经扫描仪扫描后, 用 gel-pro 软件测定密度, 计算抑制率。以 Reed-Muench 法计算 IC<sub>50</sub>。

**受试药物抗其他病毒活性实验** 细胞接种 96 孔板 ( $2\times 10^5/\text{mL}$ ), 待细胞长成单层后感染 100 TCID<sub>50</sub> 的病毒。37  $^{\circ}\text{C}$  吸附 1 h 后, 单细胞层用 PBS 冲洗, 加上不同浓度受试物的细胞培养维持液 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育, 同时设不含受试物的病毒对照组。当病毒组的细胞病变 (CPE) 达到 4+ 时, 观察并记录各组的 CPE 结果。抗病毒的活性采用 Reed & Muench 方法进行计算。

### 3.3 数据处理

抑制率和 IC<sub>50</sub> 按下式计算:

$$\text{IC}_{50} = \text{Anti log}\left(A + \frac{50 - B}{C - B} \times D\right)$$

其中, A: log (<50% 累加抑制率的药物浓度), B: <50% 累加抑制率, C: >50% 累加抑制率, D: log 稀释倍数

### References

- [1] Ocama P, Opio CK, Lee WM. Hepatitis B virus infection: current status [J]. Am J Med, 2005, 118: 1413.
- [2] De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33: 307-320.
- [3] Lau DTY, Bleibel W. Review: current status of antiviral therapy for hepatitis B [J]. Ther Adv Gastroenterol, 2008, 1: 61-75.
- [4] Zoulim F, Poynard T, Degos F, et al. A prospective study of the evolution of lamivudine resistance mutations in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine [J]. J Viral Hepat, 2006, 13: 278-288.
- [5] Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, et al. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir [J]. Hepatology, 2005, 41: 1391-1398.
- [6] Tenney DJ, Langley DR, Oliver AJ, et al. Hepatitis B virus resistance to entecavir involves novel changes in the viral polymerase [J]. Hepatology, 2004, 40: 245A.
- [7] Li YH, Tao PZ, Liu YZ, et al. Geldanamycin, a ligand of heat shock protein 90, inhibits the replication of Herpes Simplex Virus type 1 *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 867-872.
- [8] Li YP, Shan GZ, Peng ZG, et al. Synthesis and biological evaluation of heat-shock protein 90 inhibitors: geldanamycin

- derivatives with broad antiviral activities [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2010, 20: 259–268.
- [9] Shan GZ, Peng ZG, Li YH, et al. A novel class of geldanamycin derivatives as HCV replication inhibitors targeting on Hsp90: synthesis, structure-activity relationships and anti-HCV activity in GS4.3 replicon cells [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2011, 64: 177–182.
- [10] Schnur RC, Corman ML, Gallaschun RJ, et al. Inhibition of oncogene product p185erbB-2 *in vitro* and *in vivo* by geldanamycin and dihydrogeldanamycin derivatives [J]. *J Med Chem*, 1995, 38: 3806–3812.
- [11] Kuduk SD, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, et al. Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 1233–1238.
- [12] Mandler R, Kobayashi H, Hinson ER, et al. Herceptin-geldanamycin immunoconjugates: pharmacokinetics, biodistribution, and enhanced antitumor activity [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1460–1467.

---

### 热烈祝贺《药学报》荣获第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖

中国出版政府奖是国家设立的新闻出版行业的最高奖, 2007 年首次开评, 每三年评选一次, 在业界和大众中的影响越来越大, 已成为出版行业繁荣发展的一个风向标。第二届中国出版政府奖首次设立期刊奖。自 2010 年 9 月开始评选, 经过自下而上、基层推荐、逐级审核、专家评审和公示征求意见等环节, 在报送的 3325 份推荐材料中, 共 478 种图书、期刊、音像制品、电子出版物、网络出版物等获出版政府奖及提名奖, 评选结果已于 3 月 10 日正式对外公布。在本次获奖项目中, 20 本期刊 (科技、社科期刊各 10 本) 获得出版政府奖, 39 本期刊 (科技期刊 19 本、社科期刊 20 本) 获得出版政府奖提名奖。29 本获奖科技期刊代表了中国 5000 多本科技期刊的最高水平, 《药学报》更是药学领域唯一获得出版政府奖提名奖的期刊。《药学报》荣誉的取得, 感谢全国药学工作者多年的支持, 感谢主办单位中国药学会和中国医学科学院药物研究所多年来的大力支持。《药学报》编辑部有信心在各级领导、药学同仁的大力支持下, 永葆《药学报》在药学期刊中的领先地位。

《药学报》编辑部