

· 论著 ·

协同氟康唑抗耐药白念珠菌化合物的设计合成及活性研究

赵晶^{1,2a}, 李冉^{2a}, 代黎^{2a}, 蔡瞻^{2a}, 张大志^{1,2a}, 姜远英^{2b} (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 第二军医大学药学院, a. 有机化学教研室, b. 新药研究中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 基于前期研究的胡椒乙胺和咖啡酸类化合物分别具有协同氟康唑(FCZ)抗耐药真菌的作用,将两类化合物结构片段通过适当的连接子连接,设计合成新型化合物,研究其体外抗耐药真菌活性。方法 以胡椒乙胺为起始原料,与叔丁氧羰基保护的氨基酸缩合,随后脱保护基,再与咖啡酸缩合,形成目标化合物。对4个中间体和9个目标化合物进行体外协同FCZ抗耐药白念珠菌作用评价。结果 9个目标化合物均具有协同FCZ(8.0 μg/ml)抗耐药白念珠菌活性, MIC₈₀为0.5~2.0 μg/ml;其中,3b,3f,3g,3i等化合物的MIC₈₀均为0.5 μg/ml,与对照化合物7b和5相当。结论 将胡椒乙胺和咖啡酸通过4-哌啶甲酸(3b)、缬氨酸(3g)、亮氨酸(3f)、异亮氨酸(3i)连接,可以获得协同FCZ抗耐药真菌的高活性化合物。

[关键词] 抗真菌;耐药;协同;合成;白念珠菌

[中图分类号] R915

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)02-0129-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.009

Design, synthesis and evaluation of the compounds combined with fluconazole against drug resistant *Candida albicans*

ZHAO Jing^{1,2a}, LI Ran^{2a}, DAI Li^{2a}, CAI Zhan^{2a}, ZHANG Dazhi^{1,2a}, JIANG Yuanying^{2b} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350112, China; 2a. Department of Organic Chemistry, 2b. New Drug Research and Development Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** 3,4-Methylenedioxyphenethylamine and caffeic acid derivatives have been proven previously in our group to produce activity against drug resistant fungi synergistic with fluconazole (FCZ). The two pharmacophores were coupled by amino acids as linkers in this project in order to design and synthesize the novel compounds and investigate the activity against drug resistant fungi *in vitro*. **Methods** 3,4-Methylenedioxyphenethylamine initially reacted with Boc-protected amino acids, following deprotection and coupling reaction with caffeic acid, to get nine title compounds. All title compounds as well as four intermediates were subjected to antifungal activity screening for fluconazole resistant *Candida albicans in vitro*. **Results** Nine title compounds showed synergistic antifungal activity for drug resistant *Candida albicans* with fluconazole at a concentration range of 0.5-2.0 μg/ml. Among them, compounds 3b, 3f, 3g and 3i showed the higher activity with the same MIC₈₀ value of 0.5 μg/ml, which is comparable to those of the control compounds 7b and 5. **Conclusion** Linking 3,4-methylenedioxyphenethylamine and caffeic acid with piperidine-4-carboxylic acid (3b), valine (3g), leucine (3f) and isoleucine (3i) led to novel compounds with high synergistic antifungal activity against drug resistant *Candida albicans* combined with fluconazole.

[Key words] antifungal; drug resistant; synergism; synthesis; *Candida albicans*

近几十年来,随着真菌感染发病率逐年上升^[1],真菌耐药的发生率也在迅速攀升,其中氟康唑(fluconazole, FCZ)的耐药情况最为严重^[2]。虽然大量机

制研究表明,真菌产生耐药性与真菌细胞膜通透性改变、外排泵、靶点变异、生物被膜等因素有关^[3],但至今没有基于上述机制形成抗耐药真菌的有效策略。

近年来,在克服真菌耐药的新方法研究中,协同用药抗耐药真菌,尤其是非抗真菌药物与抗真菌药物的协同作用受到广泛关注,此类非抗真菌药物称为协同剂,又称为抗真菌药物增效剂,被认为是到目前为止最具潜在价值的研究策略^[3,4]。笔者所在研究团队前期发现小檗碱^[5]、黄芩素^[6,7]、光甘草定^[8]等,均能协同抗真菌药物发挥抗耐药真菌活性。

笔者前期对小檗碱进行结构优化和构效关系研

[基金项目] 国家自然科学基金(21272270)

[作者简介] 赵晶,硕士研究生,研究方向:药物设计与合成.E-mail: zhaojing09201427@163.com

[通讯作者] 张大志,博士,教授,研究方向:抗真菌药物的设计与合成.Tel: (021)81871226; E-mail: zdzhang_yjhx@smmu.edu.cn; 姜远英,博士,教授,研究方向:抗真菌药物作用机制及真菌耐药机制研究.Tel: (021)81871357; E-mail: 13761571578@163.com

究(图1),发现了新型的高效活性化合物:胡椒乙胺衍生物**7b**、**7d**、**7f**^[9];同时通过结构跃迁设计合成了新型结构的活性化合物:咖啡酸衍生物**3**、**5**^[10];最后,设想将两类化合物中的胡椒乙胺片段和咖啡酸片段通过适当的连接子连接,设计出以氨基酸为连接子的目标化合物。

1 化学合成路线

合成路线见图2。

2 化学实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器 Bruker SpectmSpin AC-P600 型核磁

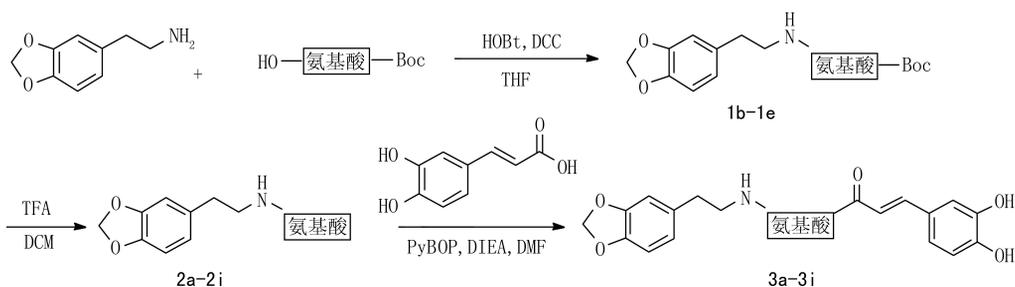


图2 中间体**1b-1e**和目标化合物**3a-3i**的合成路线

共振仪测定¹H-NMR;Agilent 6120型LC-MS测定样品纯度;芬兰Labsystems公司Multiskan MK3型酶标检测仪测定生物活性。宁波江南仪器厂MJX型智能霉菌培养箱、上海跃进医疗器械厂THZ-82A台式恒温振荡器、苏州安泰空气技术有限公司SW-CT-IF型超净化工作台。

2.1.2 试剂 FCZ注射液为大连辉瑞药业有限公司产品。原料和溶剂分别购于阿拉丁试剂(上海)公司、安耐吉试剂公司和中国医药集团上海化学试剂责任有限公司。所有试剂均为分析纯。

2.2 实验步骤

2.2.1 中间体**1b-1e**的合成

表1 中间体**1b-1e**的结构、产率、ESI-MS及¹H-NMR数据

编号	结构式 R=	收率(%)	ESI-MS	¹ H-NMR (CDCl ₃ , 600 MHz)
1b		76	377.3	δ 6.74-6.72 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.66-6.65 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.61-6.59 (dd, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.59 (s, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.47-3.44 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.73-2.70 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.17-2.13 (m, 1H), 1.75-1.72 (dd, J = 12.6, 1.8 Hz, 2H), 1.60-1.54 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

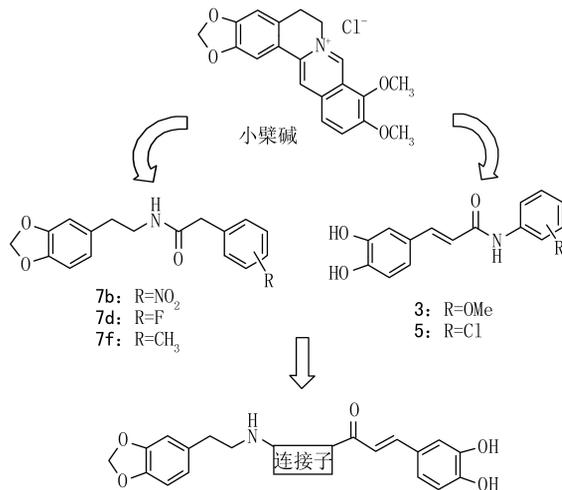
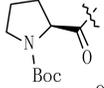
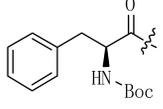
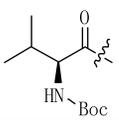


图1 目标化合物的设计

中依次加入叔丁氧羰基保护的氨基酸原料(10 mmol)、丁醇(HOBt, 1.35 g, 10 mmol)、二环己碳二亚胺(DCC, 2.06 g, 10 mmol)和四氢呋喃(THF, 30 ml),将胡椒乙胺(1.65 g, 10 mmol)的THF溶液缓慢滴加到反应液中,室温条件下反应5 h, TLC检测。待反应完毕,加水淬灭,乙酸乙酯(EA, 20 ml×3)萃取,合并有机相,饱和NaHCO₃溶液洗涤3次,饱和NaCl溶液洗涤3次,无水Na₂SO₄干燥。减压蒸馏后,经硅胶柱层析分离得到中间体**1b-1e**。LC-MS确定分子量与目标产物一致后,不再进行对**1a**、**1f-1i**等的结构表征研究,直接进行下一步反应^[11]。化合物波谱数据见表1。

(续表 1)

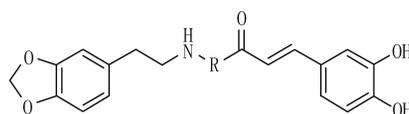
编号	结构式 R=	收率 (%)	ESI-MS	¹ H-NMR (CDCl ₃ , 600 MHz)
1c		82	363.4	δ 6.73-6.72 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.63-6.62 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.24 (s, 1H), 3.48-3.34 (m, 4H), 2.75-2.67 (m, 2H), 2.33 (s, 1H), 1.94-1.68 (m, 4H), 1.41 (s, 9H).
1d		87	413.1	δ 7.30-7.28 (t, <i>J</i> =6.6 Hz, 2H), 7.25-7.23 (t, <i>J</i> =7.2 Hz, 1H), 7.19-7.18 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 2H), 6.69-6.68 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.46-6.45 (d, <i>J</i> =7.2 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.77-5.75 (d, <i>J</i> =11.4 Hz, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.25-4.24 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 1H), 3.43-3.38 (m, 1H), 3.32 (s, 1H), 3.04-3.00 (q, <i>J</i> =7.8 Hz, 2H), 2.62-2.58 (q, <i>J</i> =6.6 Hz, 1H), 2.53 (s, 1H), 1.40 (s, 9H).
1e		83	365.2	δ 6.74 (t, <i>J</i> =17.8 Hz, 1H), 6.66 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 1H), 6.61 (dd, <i>J</i> =7.9, 1.7 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.91 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 2.71 (t, <i>J</i> =6.9 Hz, 2H), 2.07 (s, 1H), 1.42 (s, 9H), 0.91 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 3H), 0.87 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 3H).

2.2.2 中间体 2a-2i 的合成 于 100 ml 圆底烧瓶中依次加入中间体 **1a-1i** (2 mmol) 和二氯甲烷 (DCM, 16 ml), 取三氟乙酸溶液 (4 ml) 在冰浴条件下缓慢滴加到反应液中, 滴加完毕后继续反应 1 h, TLC 监测。待反应完毕, 减压蒸馏, 溶剂蒸干后加入适量饱和 NaHCO₃ 溶液搅拌 10 min, EA 萃取 (20 ml × 3), 合并有机相, 饱和 NaCl 溶液洗涤 3 次, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸馏得到黄色油状物。经 LC-MS 确定分子量与目标产物一致后, 不再进行其他结构表征研究, 直接进行下一步反应。

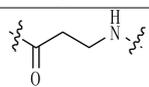
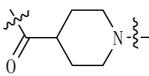
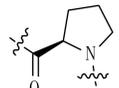
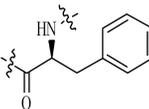
2.2.3 化合物 3a-3i 的合成 于 100 ml 圆底烧瓶

中依次加入咖啡酸 (900 mg, 5 mmol), 中间体 **2a-2i** (5 mmol), 二甲基甲酰胺 (DMF, 10 ml), 三乙胺 (0.7 ml, 5 mmol) 和 ¹H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐 (PyBOP, 2.21 g, 5 mmol), 冰浴条件下反应 30 min 后, 升至室温继续反应 2 h, TLC 监测。待反应完毕, 加水淬灭, EA 萃取 (30 ml × 3), 合并有机相, 分别用 1 mol/L HCl 水溶液、饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤^[12], 无水 Na₂SO₄ 干燥。减压蒸馏后, 经硅胶柱层析得到终产物 **3a-3i**。经 LC-MS 和 NMR 测定, 化合物纯度均 > 95.0%, 质谱、氢谱均与分子式一致。化合物 **3a-3i** 波谱数据见表 2。

表 2 目标化合物 3a-3i 的结构、产率、ESI-MS 及 ¹H-NMR 数据



3a-3i

编号	结构式 R=	收率 (%)	ESI-MS	¹ H-NMR (DMSO, 600 MHz)
3a		62	399.1	δ 9.25 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.99 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 7.90 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 7.20 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz, 1H), 6.92 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 6.82-6.80 (m, 1H), 6.77-6.76 (m, 2H), 6.72 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 6.63 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 6.32 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 3.34-3.30 (m, 2H), 3.23-3.20 (m, 2H), 2.62-2.59 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 2.26-2.24 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H).
3b		70	439.4	δ 7.82-7.81 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 7.31-7.28 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.07 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 6.97-6.95 (m, 1H), 6.91-6.89 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 6.80-6.79 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 6.75 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 6.73-6.72 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 6.63-6.61 (m, 1H), 5.94 (s, 2H), 4.40 (s, 1H), 4.21 (s, 1H), 3.22-3.19 (m, 3H), 2.61-2.59 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 3H), 2.36-2.32 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 4H), 1.50-1.42 (m, 2H).
3c		65	425.3	δ 9.28 (s, 2H), 7.96 (m, 1H), 7.32 (dd, <i>J</i> = 15.3, 3.8 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.99 (d, <i>J</i> = 4.7 Hz, 1H), 6.92-6.73 (m, 3H), 6.73-6.56 (m, 2H), 5.95 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 2H), 4.57-4.28 (m, 1H), 3.83-3.43 (m, 2H), 3.32-3.17 (m, 2H), 2.62 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 2.26-1.70 (m, 4H).
3d		67	475.4	δ 9.33 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.20-8.18 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.06-8.04 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz, 1H), 7.24-7.21 (m, 4H), 7.18-7.14 (m, 2H), 6.93-6.92 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 6.81-6.80 (dd, <i>J</i> = 6.0, 2.4 Hz, 1H), 6.77-6.76 (m, 2H), 6.73-6.72 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.63-6.61 (dd, <i>J</i> = 8.4, 1.21 Hz, 1H), 6.41-6.38 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.58-4.54 (m, 1H), 3.29-3.17 (m, 2H), 2.96-2.93 (q, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 2.78-2.74 (q, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 2.59-2.56 (m, 2H).

(续表 2)

编号	结构式 R=	收率 (%)	ESI-MS	¹ H-NMR(DMSO, 600 MHz)
3e		59	385.2	δ 9.39 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.24 (t, <i>J</i> =5.7 Hz, 1H), 7.95 (t, <i>J</i> =5.5 Hz, 1H), 7.27 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 6.98 (d, <i>J</i> =1.7 Hz, 1H), 6.92-6.73 (m, 4H), 6.67 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 6.44 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 3.77 (d, <i>J</i> =5.7 Hz, 2H), 3.26 (dd, <i>J</i> =13.3, 6.8 Hz, 2H), 2.64 (t, <i>J</i> =7.3 Hz, 2H).
3f		58	427.3	δ 9.33 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.02 (t, <i>J</i> =5.6 Hz, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> =15.6 Hz, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> =2.0 Hz, 1H), 6.82 (dd, <i>J</i> =8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.80-6.71 (m, 3H), 6.64 (dd, <i>J</i> =7.9, 1.6 Hz, 1H), 6.56 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.19 (dd, <i>J</i> =8.9, 7.1 Hz, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 2.61 (t, <i>J</i> =7.5 Hz, 2H), 1.92 (m, 1H), 0.83-0.76 (m, 6H).
3g		63	441.2	δ 9.36 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.22 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> =1.6 Hz, 1H), 6.88-6.69 (m, 4H), 6.63 (dd, <i>J</i> =8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.43 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.34 (dd, <i>J</i> =15.1, 7.7 Hz, 1H), 3.29-3.08 (m, 2H), 2.61 (t, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H), 1.49 (dd, <i>J</i> =12.8, 6.3 Hz, 1H), 1.44-1.34 (m, 2H), 0.84 (m, 6H).
3h		67	459.1	δ 9.25 (s, 2H), 8.13 (d, <i>J</i> =8.2 Hz, 1H), 7.98 (t, <i>J</i> =4.9 Hz, 1H), 7.23 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> =1.8 Hz, 1H), 6.89-6.69 (m, 4H), 6.63 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 6.44 (d, <i>J</i> =15.7 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.38 (dd, <i>J</i> =13.8, 8.4 Hz, 1H), 3.29-3.17 (m, 2H), 2.62 (t, <i>J</i> =6.8 Hz, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.79 (m, 2H).
3i		65	441.4	δ 9.21 (s, 1H), 8.05 (t, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 7.95 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> =15.6 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.86-6.69 (m, 4H), 6.64 (d, <i>J</i> =6.8 Hz, 1H), 6.54 (d, <i>J</i> =15.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.22 (t, <i>J</i> =8.3 Hz, 1H), 3.31-3.13 (m, 2H), 2.62 (t, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H), 1.67 (m, 1H), 1.37-1.06 (m, 3H), 0.77 (m, 6H).

3 体外协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性测试

临床分离耐药白念珠球菌 103 由第二军医大学附属长海医院菌种保存中心赠送。测试方法参考文献[5-8]方法。

3.1 实验方法 取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加入 100 μl RPMI 1640 液体培养基作为空白对照; 3~12 号孔各加入新鲜配制的菌液 100 μl,菌液浓度范围为(1~5)×10³ cfu/ml。2 号孔加入菌液 160 μl 和受试化合物溶液 40 μl;12 号孔不含药物,只加入菌液 100 μl 作为阳性生长对照。2~11 号孔进行倍比稀释,使各孔的化合物最终浓度分别为 64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 和 0.125 μg/ml,各孔中 DMSO 含量均低于 1%,FCZ 溶液的终浓度为 8.0 μg/ml。获得受试药物与 FCZ (8.0 μg/ml)合用时的 MIC₈₀ 值。

3.2 活性测试结果 目前理论上用于评价联合用药的两种药物相互作用方式的一种表示方法为抑菌浓度分数(fractional inhibitory concentration, FIC)^[13]。FIC 为该药物联合其他药物抑菌时所需最低抑菌浓度(MIC)与单用这种药物抑菌时所需 MIC 的比值。抑菌浓度分数指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)则为两种药物的 FIC 之和。本研究选用目前国外期刊采用的最新评价联合用药效果的标

准:当 FICI≤0.5 时,两种药物的相互作用效果可被定义为具有协同作用;当 0.5<FICI≤4 时,认为两种药物无相互作用;当 FICI>4 时,认为两种药物产生拮抗作用^[14]。受试的目标化合物的协同 FCZ 抗耐药白念珠菌的活性测试结果见表 3。

表 3 受试化合物单用及其与氟康唑联用对耐药白念珠菌的活性测试结果

化合物	单用	联用		抑菌浓度分数	作用
	MIC ₈₀ (μg/ml)	MIC ₈₀ (μg/ml)	化合物		
1b	>64.0	8.0	>64.0	1.063	无关
1c	>64.0	8.0	>64.0	1.063	无关
1d	>64.0	8.0	>64.0	1.063	无关
1e	>64.0	8.0	>64.0	1.063	无关
3a	>64.0	8.0	1.0	0.070	协同
3b	32.0	8.0	0.5	0.078	协同
3c	>64.0	8.0	1.0	0.070	协同
3d	64.0	8.0	2.0	0.094	协同
3e	64.0	8.0	2.0	0.094	协同
3f	64.0	8.0	0.5	0.070	协同
3g	>64.0	8.0	0.5	0.066	协同
3h	>64.0	8.0	1.0	0.070	协同
3i	>64.0	8.0	0.5	0.066	协同
氟康唑	128.0	—	—	—	—

4 结果与讨论

由表3可见,临床分离的耐药白念珠菌对FCZ的MIC₈₀为128.0 μg/ml,显示该菌株对FCZ具有耐药性。目标化合物**3a-3i**及对照药咖啡酸和化合物**7b**^[9]、**5**^[10]单用时,**3b**的MIC₈₀为32.0 μg/ml,表现出很微弱的抗真菌活性,其余化合物的MIC₈₀均不低于64.0 μg/ml,因此,所有受试化合物单用时的MIC₈₀均较高。

各化合物分别与FCZ合用,当固定FCZ浓度为8.0 μg/ml时,目标化合物**3a-3i**的MIC₈₀降低至0.5~2 μg/ml,各化合物的FICI均<0.5,显示各目标化合物与FCZ对耐药白念珠菌有协同作用。其中,化合物**3b**、**3f**、**3g**、**3i**等化合物的MIC₈₀均为0.5 μg/ml,与对照化合物**7b**和**5**相当。

中间体**1b**、**1c**、**1d**、**1f**以及对照化合物咖啡酸,无论单用还是与FCZ合用,其MIC₈₀均>64.0 μg/ml,证实这些化合物均无协同FCZ抗耐药真菌活性。

5 结论

笔者团队的前期研究表明,胡椒乙胺衍生物和咖啡酸衍生物具有协同FCZ抗耐药真菌的活性,这些化合物作为增效剂,能恢复FCZ对耐药真菌的敏感性。与抗真菌药物联用不同的是,这些增效剂本身没有抗真菌活性或者活性很低,但与FCZ合用,却会大大提高药物抗真菌活性的敏感性。

而通过对胡椒乙胺^[12]和咖啡酸^[15]两类衍生物的构效关系研究表明,胡椒乙胺和咖啡酸的结构片段虽然是重要的药效基团,但并非所有的衍生物均有效,其他取代部分对活性也有至关重要的作用。将咖啡酸与胡椒乙胺直接缩合的产物具有一定的协同FCZ抗耐药真菌活性。本实验研究了通过不同的氨基酸连接子将胡椒乙胺和咖啡酸连接,获得了活性更高的化合物,尤其是当连接子是4-哌啶甲酸(**3b**)、缬氨酸(**3g**)、亮氨酸(**3f**)和异亮氨酸(**3i**)时,目标化合物的活性最强。以苯丙氨酸(**3d**)和甘氨酸(**3e**)为连接子的化合物与FCZ合用的MIC₈₀为2.0 μg/ml,活性相对低一些。由两类化合物的比较可以看出,连接子中有脂肪链的化合物活性较好;连接子中含有芳香基或者没有取代基的化合物活性稍弱。

中间体**1b**、**1c**、**1d**、**1e**的结构中,没有引入咖啡酸结构,其与FCZ合用后,对耐药菌株的MIC₈₀均>64.0 μg/ml,提示这4个中间体没有协同活性。

本研究进一步支持了前期研究,胡椒乙胺的取代基对活性影响较大。

自从发现小檗碱等天然产物具有协同FCZ抗耐药真菌的作用以来,笔者一直致力于其作用机制^[6,7]和作用靶点研究,但至今尚未明确其靶点。研究此类化合物的构效关系对其靶点研究具有指导意义。

【参考文献】

- [1] Lai CC, Tan CK, Huang YT, et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections [J]. J Infect Chemother, 2008, 14(2): 77-85.
- [2] Czaika V, Nenoff P, Glöckner A, et al. Detection of azole susceptibility patterns in clinical yeast strains isolated from 1998 to 2008[J]. New Microbiol, 2014, 37(4): 465-494.
- [3] Liu SY, Hou YL, Chen X, et al. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 43(5): 395-402.
- [4] 谭善伦, 张大志, 姜远英. 具有协同抗耐药真菌活性的天然小分子化合物研究进展[J]. 药学学报, 2014, 49(8): 1097-1104.
- [5] Quan H, Cao YY, Xu Z, et al. Potent *in vitro* synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3): 1096-1099.
- [6] Cao YY, Dai BD, Wang Y, et al. *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(1): 73-77.
- [7] Huang S, Cao YY, Dai BD, et al. *In vitro* synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(12): 2234-2236.
- [8] Liu W, Li LP, Zhang JD, et al. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole [J]. PLoS One, 2014, 9: e103442.
- [9] Liu H, Wang L, Li Y, et al. Structural optimization of berberine as a synergist to restore antifungal activity of fluconazole against drug-resistant *Candida albicans*[J]. ChemMedChem, 2014, 9(1): 207-216.
- [10] Dai L, Zang CX, Tian SJ, et al. Design, synthesis, and evaluation of caffeic acid amides as synergists to sensitize fluconazole-resistant *Candida albicans* to fluconazole[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(1): 34-37.
- [11] Zhao X, Jia MX, Jiang XK, et al. Zipper-featured δ-peptide foldamers driven by donor-acceptor interaction. Design, synthesis, and characterization[J]. J Org Chem, 2004, 69(2): 270-279.
- [12] Fu J, Cheng K, Zhang ZM, et al. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials[J]. Eur J Med Chem, 2010, 45

(6); 2638-2643.

[13] Cappelletty DM, Rybak MJ. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(3): 677-683.

[14] Segatore B, Bellio P, Setacci D, et al. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates

determined by FICI and ΔE model methods [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3-4): 341-347.

[15] Hung CC, Tsai WJ, Kuo LMY, et al. Evaluation of caffeic acid amide analogues as anti-platelet aggregation and anti-oxidative agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(5): 1791-1797.

[收稿日期] 2016-01-04 [修回日期] 2016-01-25
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 115 页)

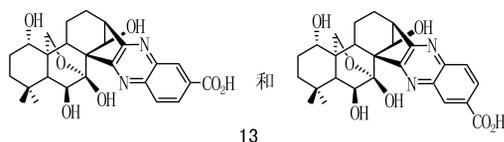


图 5 冬凌草甲素衍生物 13

构,徐进宜等^[13,14]在其公开的专利中采用 HIO₄ 将其氧化开环后得到一类 6,7 开环的冬凌草甲素衍生物(图 6),并做进一步修饰,公开了 3 类化合物,其中第Ⅲ类化合物是将第Ⅰ和Ⅱ类化合物的羟基进行酯化反应得到的。专利中还公开了其中少数化合物对 K562、MCF-7、CaEs-17、BEL7402、HeLa 和 A549 细胞株的抑制活性,结果表明,不同化合物对不同肿瘤细胞株的活性不尽相同,但均优于冬凌草甲素。

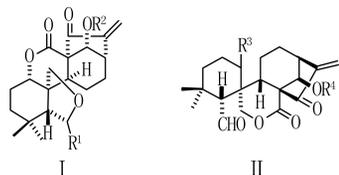


图 6 6,7 开环的冬凌草甲素衍生物

综述以上研究表明,对冬凌草甲素的羟基进行修饰,引入不同的基团或侧链,可以提高其抗肿瘤活性,而且可以改善生物利用度,是一种有效的修饰方法。对冬凌草甲素的 α, β -不饱和酮结构修饰的研究较少,无法从目前的文献中得出结论。另外,对于开环的冬凌草甲素的研究,可以作为一种新的研究策略,做进一步深入研究。总之,作为一种疗效确切的抗肿瘤化合物冬凌草甲素,对其进行适当的结构修饰,可提高其活性,扩大抗癌谱,并改善其物理性质,提高成药性,值得进一步的深入研究。

【参考文献】

[1] 中国科学院.中国植物志[M].北京:科学出版社,2005,66: 457-458.

[2] Zhu Y, Xie L, Chen G, et al. Effects of oridonin on proliferation of HT29 human colon carcinoma cell lines both *in vitro* and *in vivo* in mice [J]. *Pharmazie*, 2007, 62(6): 439-444.

[3] Guo Y, Shan Q, Gong Y P, et al. Anti-leukemia effect of oridonin on Ph+ acute lymphoblastic leukemia cell SUP-B15 [J]. *Zhonghua Xueyexue Zazhi*, 2012, 33(6): 439-443.

[4] Li X, Guo J M, Xu K, et al. Inhibitory mechanism of down-regulation expression of pp-GalNAc-T14 by oridonin on human renal carcinoma cells *in vitro* [J]. *Fudan Xuebao, Yixueban*. 2012, 39(3): 273-276, 292.

[5] Xu W, Sun J Z, et al. Pharmacokinetic behaviors and oral bio-availability of oridonin in rat plasma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(12): 1642-1646.

[6] Nagao Y, Fujita E, Kohno T, et al. An efficient method for selective acetylation of alcoholic hydroxyl groups. *Chem Pharm Bull* [J]. 1981, 29: 3202-3207.

[7] Xu J Y, Yang J Y, Ran Q, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 1-O- and 14-O-derivatives of oridonin as potential anticancer drug candidates [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 4741-4744.

[8] Wang L, Ran Q, Li D H, et al. Synthesis and anti-tumor activity of 14-O-Derivatives of natural oridonin [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(3): 194-198.

[9] 徐星星,刘舒畅,王琴荣,等.冬凌草甲素衍生物的合成及其抗白血病活性研究[J]. *中国药物化学杂志*, 2011, 21(1): 1-6.

[10] 阎学斌,雷萌,张建业,等.冬凌草甲素葡萄糖苷的合成[J]. *有机化学*, 2005, 25(2): 222-224.

[11] 阎学斌,张建业,可钰,等.冬凌草甲素芳胺类衍生物的合成及其抗肿瘤活性[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2007, 42(1): 39-41.

[12] 南发俊,张仰明,刘桦南,等.一种对映-贝壳杉烷型二萜及其衍生物和制备方法:中国,102584760[P]. 2012-07-18.

[13] 徐进宜,王磊,张奕华,等.具有抗肿瘤活性的 ent-6,7-开环贝壳杉烯型冬凌草甲素衍生物、其制备方法及应用:中国,102002051B[P]. 2013-06-19.

[14] 徐进宜,李达翔,蔡浩,等.具有抗肿瘤活性的冬凌草甲素及 6,7-开环冬凌草甲素含氟衍生物、制备方法及应用:中国,102295649A[P]. 2011-12-28.

[收稿日期] 2014-07-24 [修回日期] 2014-12-09
[本文编辑] 李睿旻