

新型吡啶-2-酮酰胺类化合物的设计、合成及抗乙型肝炎病毒活性研究

张明峰, 吕志良, 李科 (第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 设计合成吡啶-2-酮酰胺类新型化合物并对其进行抗病毒活性研究。方法 以药效团模型为指导, 经 Heck 反应、选择性硝化反应、催化氢化反应、酰化反应以及开环重排反应等设计合成目标化合物。所合成化合物经 ^1H NMR 谱图进行确证, 并对其进行抗 HBV-DNA 复制活性筛选。结果 设计合成的新型-2-吡啶酮酰胺类化合物对 HBV-DNA 复制都有一定的抑制活性, 其中化合物 6h、6e 和 6a 抑制活性最好, 值得进一步关注。结论 吡啶环 N 原子上接有对乙氧基苯基时抑制 HBV-DNA 活性最好, 为活性必须基团。

[关键词] 2-吡啶酮酰胺类化合物; 化学合成; 抗乙型肝炎病毒

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)02-0102-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.02.006

Design, synthesis and anti-HBV activity of novel 2-pyridyl ketone derivatives

ZHANG Ming-Feng, LV Zhi-liang, LI Ke (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To design and synthesize the new 2-pyridyl ketone amide derivatives and test the antiviral activity. **Methods** According to the pharmacophore model, a new class of 2-pyridyl ketone amide derivatives was designed, which were synthesized by Heck reaction, selective nitration reaction, catalytic hydrogenation reaction, acylation reaction and the open-loop rearrangement reaction. All the synthesized compounds were confirmed by ^1H NMR, and their anti-HBV-DNA replication activity were determined. **Results** The designed novel 2-pyridyl ketone amide derivatives had inhibitory activity against HBV-DNA replication. Among them, compounds 6h, 6e and 6a showed the best inhibitory activity. **Conclusion** When the 4-ethoxyl phenyl group was attached on the N atom of the benzyl ring, the compounds revealed good inhibitory activity.

[Key words] 2-pyridyl ketone amide; chemical synthesis; anti-HBV activity

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染所导致的急、慢性疾病对人类的健康造成了很大的影响^[1]。世界卫生组织 (WHO) 最新统计数据显示, 近 20 亿人被 HBV 感染, 其中 3.6 亿人为慢性乙肝, 每年约有 50~70 万人死于肝硬化、肝癌等严重疾病^[2,3]。中国超过 2000 万的慢性乙型肝炎患者急需抗病毒药物治疗。慢性乙型肝炎不仅严重影响着人们身心健康, 而且给家庭、社会造成沉重的经济负担, 成为影响社会和谐发展的不容忽视因素, 因此, 乙型肝炎病毒治疗药物的研发已成为国内外药物研究的重要领域。

目前用于治疗慢性乙肝的药物主要有两类——免疫调节剂和核苷类 HBV-DNA 聚合酶抑制剂。前者包括干扰素- $\alpha 2\text{b}$ (Intron A[®]) 和聚乙二醇干扰素-

$\alpha 2\text{a}$ (Pegasys[®], 派罗欣); 后者包括拉米夫定 (Epi-vir-HBV[®], 贺普丁[®])、阿德福韦酯 (Hepsera[®], 维普力[®])、恩替卡韦 (Baraclude[®], 博路定[®]) 和替比夫定 (Sebivo[®], 素比伏[®]) 等。

干扰素体内长期效果存在免疫调节成功率较低、价格昂贵以及存在感冒样症状和失眠等问题, 临床应用受到很大限制。核苷类药物不能有效地清除细胞核内的 HBVcccDNA, 导致停药后反弹, 患者体内 ALT 和 HBV-DNA 水平急剧升高, 导致危及生命的暴发式肝炎, 另外恩替卡韦和替比夫定等耐药位点与拉米夫定基本相同^[4,5], 存在交叉耐药现象。核苷类药物的停药后反弹和长期应用导致的耐药性已成为不容忽视的问题, 因此, 寻找全新的非核苷类抗 HBV 药物成为研发的热点。

吕志良等发现了一类新型的具有抗乙型肝炎病毒活性的 2-吡啶酮类非核苷化合物, 其体外对 HBV-DNA 抑制活性超过对照药阿德福韦酯数倍, 并且构建药效团模型^[6]。对药效团模型的分析后, 发现化合物分子中芳环被确认为疏水性基团和分子平面中心,

[基金项目] 国家自然科学基金 (21172259); 全军特殊环境药物研究重点实验室资助项目。

[作者简介] 张明峰 (1985-), 男, 硕士研究生。E-mail: mingfeng0502@126.com.

[作者简介] 李科. Tel: (021) 81871237, E-mail: proflike@sina.com.

氧原子为氢键受体,酚羟基的氢原子为氢键供体。结合药效团模型的构效关系研究发现,母体结构上所有的氢键供体、受体和平面中心都是抗乙型肝炎病毒活性所必需的官能团,增加氢键供、受体对提高抗HBV-DNA活性至关重要。

在药效团模型和初步构效关系的指导下,笔者在2-吡啶酮类化合物的分子中引入胺基并进行酰化,增加原分子氢键供、受体,设计合成了16个未见文献报道的2-吡啶酮酰胺类化合物,并进行结构确证和体外抗乙型肝炎病毒活性研究。合成路线见图1。

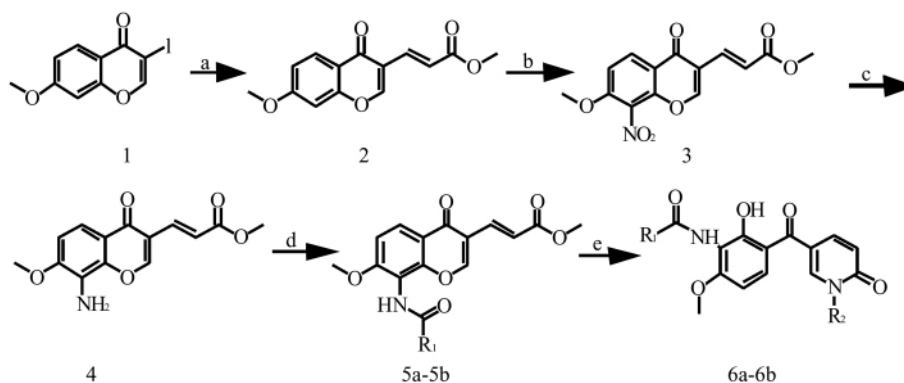


图1 目标化合物的合成路线

a-methyl acrylate, triethylamine, Pd(AcO)₂, M. W; b-H₂SO₄, HNO₃, -5 °C; c-H₂, Pd/C, ethanol, 50 °C; d-tetrahydrofuran, triethylamine, substituted acyl chloride 0 °C; e-methanol, triethylamine, substituted aniline, reflux.

1 实验部分

1.1 仪器和材料 熔点由 RY-2 型熔点仪进行测定;核磁共振谱由 Bruker AC-300P 型仪器测定,TMS 为内标;溶剂为 DMSO。层析柱采用硅胶 H(10~40 μM),薄层层析为青岛海洋化工厂生产的 HSGF254 型硅胶板。所用试剂均为分析纯试剂。

1.2 目标化合物的合成

1.2.1 化合物 1 根据报道文献合成,收率 73%^[7]。

1.2.2 (反式)-3-[7-甲氧基-苯并吡喃酮-3-]丙烯酸甲酯(2)的制备 化合物 1(30.1 g, 0.1 mol)、DMF(100 ml) 搅拌溶解,然后依次加入丙烯酸甲酯(12.9 g, 0.15 mol)、三乙胺(20.4 g, 0.2 mol)和醋酸钡(0.6 g)。于 400 W、100 °C 微波条件下反应 10 min。热过滤,滤液倒入冰水中,得粗品,干燥后乙醇重结晶,得浅黄色结晶化合物 2 24.8 g,收率 95%,mp: 176~178 °C; ¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz, δppm) 3.78(s, 3H), 3.86(s, 3H), 6.84(d, 1H, J=2.4 Hz), 6.99(dd, 1H, J₁=2.4 Hz, J₂=9.0 Hz), 7.24(d, 1H, J=15.9 Hz), 7.37(d, 1H, J=15.9 Hz), 8.04(s, 1H), 8.16(d, 1H, J=9.0 Hz)。

1.2.3 (反式)-3-[3-(7-甲氧基-8-硝基)苯并吡喃酮基]丙烯酸甲酯(3)的制备 化合物 2(13 g, 0.05 mol) 分批投入冷至 0 °C 的浓硫酸(50 ml)中并迅速搅拌使其溶解。另取 65% 浓硝酸 3.8 ml(0.055 mol) 滴入 5 ml 浓硫酸中搅拌混合均匀后降温

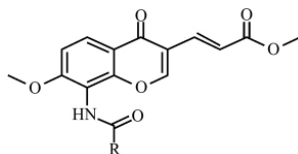
至 5 °C 以下,并将其缓慢滴入化合物 2 的浓硫酸溶液中。滴毕继续反应 10 min, TLC 监控至反应结束。将反应液缓慢倒入冰水(300 ml)中,剧烈搅拌。滤出固体,水冲洗至中性,真空干燥,得化合物 3 14.5 g,收率 95%。mp: 202.7~204.1 °C; ¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ 3.783(s, 3H), 3.852(s, 3H), 6.784(d, 1H, J=9.6 Hz), 6.965(d, 1H, J=9.6 Hz), 7.243(d, 1H, J=15.9 Hz), 7.373(d, 1H, J=15.9 Hz), 8.046(s, 1H)。

1.2.4 (反式)-3-[3-(7-甲氧基-8-氨基)苯并吡喃酮基]丙烯酸甲酯(4)的制备 化合物 3(15.2 g, 0.05 mol) 置于反应瓶中,乙醇(700 ml) 溶解,加入新鲜 Pd/C(1.5 g),于 50 °C 条件下通氢反应 24 h。过滤,滤液浓缩后结晶,得黄色化合物 4 10.1 g,收率 73%。mp: 186.2~187.1 °C; ¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.709(s, 3H), 3.801(s, 3H), 5.012(s, 2H), 6.831(d, 1H, J=8.7 Hz), 7.286(d, 1H, J=9.3 Hz), 7.339(d, 1H, J=8.7 Hz), 7.513(d, 1H, J=9.0 Hz), 8.867(s, 1H)。

1.2.5 (反式)-3-[3-(7-甲氧基-8-丙酰氨基)苯并吡喃酮基]丙烯酸甲酯(5a)的制备 化合物 4(2.8 g, 0.01 mol)、无水 THF(10 ml)和适量三乙胺依次加入反应瓶,搅拌,冰浴下滴加丙酰氯(0.05 ml, 0.02 mol)。滴毕继续搅拌 1 h, TLC 检测,反应完毕后倒入冰水中,过滤,滤饼水洗 3 次,乙酸乙酯重结晶,得黄色晶体化合物 5a 3.0 g,收率 92%。

同法制得化合物 5b-5d。化合物 5a-5e 的结构、物理常数及¹H NMR 见表 1。

表 1 化合物 5a-5e 的结构、物理常数及¹H NMR



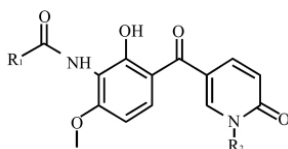
化合物	R	mp(°C)	收率(%)	¹ H NMR(300 MHz , DMSO-d ₆ δ)
5a	ethyl	198.2-199.1	92	1.031 (t , 3H , J = 7.5 Hz) , 2.324 (m , 2H , J = 7.5 Hz) , 3.712 (s , 3H) , 3.813 (s , 3H) , 6.837 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.291 (d , 1H , J = 9.3 Hz) , 7.332 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.567 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 8.874 (s , 1H) , 9.148 (s , 1H)
5b	phenyl	209.1-210.1	82	3.711 (s , 3H) , 3.815 (s , 3H) , 6.835 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.289 (d , 1H , J = 9.3 Hz) , 7.334 (m , 2H) , 7.566 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 7.523 (m , 4H) , 8.873 (s , 1H) , 9.145 (s , 1H)
5c	p-methoxyphenyl	213.4-214.5	89	3.712 (s , 3H) , 3.813 (s , 3H) , 3.821 (s , 3H) , 6.834 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.024 (d , 2H , J = 8.7 Hz) , 7.290 (d , 1H , J = 9.3 Hz) , 7.336 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.565 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 7.969 (d , 2H , J = 8.7 Hz) , 8.872 (s , 1H) , 9.148 (s , 1H)
5d	4-NO ₂ phenyl	207.2-208.1	82	3.712 (s , 3H) , 3.813 (s , 3H) , 6.836 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.291 (d , 1H , J = 9.3 Hz) , 7.336 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.567 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 8.197 (d , 2H , J = 8.4 Hz) , 8.344 (d , 2H , J = 8.7 Hz) , 8.874 (s , 1H) , 9.152 (s , 1H)

1.2.6 N-[3-(1-(4-乙氧苯基)-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-羰基)-2-羟基-6-甲氧基]丙酰胺 (6a) 的制备 化合物 5a(3.3 g 0.01 mol)、甲醇(10 ml)、对乙氧基苯胺(0.1 ml 0.011 mol) 和三乙胺(1 ml) , 搅拌回流过夜 , TLC 检测 , 反应完毕后倒入冰水 , 调节 pH 值至中

性 过滤 柱层析(PE : EA = 8 : 1 ; v/v) 分离得黄色晶体化合物 6a 3.3 g 收率 76%。

同法制得目标化合物 6b-6p。化合物 6a-6p 的结构、物理常数及¹H NMR 见表 2。

表 2 目标化合物的结构、物理常数及¹H NMR



化合物	R ₁	R ₂	mp(°C)	HPLC(%)	收率(%)	¹ H NMR(300 MHz , DMSO-d ₆ δppm)
6a	ethyl	p-ethoxyphenyl	158.2-159.0	96.32	76	1.050 (t , 3H , J = 7.5 Hz) , 1.325 (t , 3H , J = 6.9 Hz) , 2.320 (m , 2H , J = 7.5 Hz) , 3.360 (s , 3H) , 4.041 (m , 2H , J = 6.9 Hz) , 6.580 (d , 1H , J = 9.6 Hz) , 6.690 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.011 (d , 2H , J = 9.0 Hz) , 7.383 (d , 2H , J = 9.0 Hz) , 7.522 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.840 (dd , 1H , J ₁ = 9.6 Hz , J ₂ = 2.7 Hz) , 7.956 (d , 1H , J = 2.7 Hz) , 9.148 (s , 1H) , 10.742 (s , 1H)
6b	ethyl	iso-propyl	197.4-198.6	95.23	71	1.037 (t , 3H , J = 7.5 Hz) , 1.296 (d , 6H , J = 6.6 Hz) , 2.315 (m , 2H , J = 7.5 Hz) , 3.844 (s , 3H) , 4.987 (m , 1H , J = 6.6 Hz) , 6.452 (d , 1H , J = 9.6 Hz) , 6.712 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 7.420 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 7.691 (dd , 1H , J ₁ = 9.6 Hz , J ₂ = 2.4 Hz) , 8.112 (d , 1H , J = 2.4 Hz) , 9.167 (s , 1H) , 10.718 (s , 1H)
6c	ethyl	n-butyl	185.9-186.8	94.15	69	0.892 (t , 3H , J = 7.8 Hz) , 1.035 (t , 3H , J = 7.2 Hz) , 1.235 (m , 2H , J = 7.8 Hz) , 1.589 (m , 2H) , 2.341 (m , 2H , J = 7.2 Hz) , 3.840 (s , 3H) , 3.919 (t , 2H) , 6.444 (d , 1H , J = 9.6 Hz) , 6.701 (d , 1H , J = 8.7 Hz) , 7.424 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 7.706 (dd , 1H , J ₁ = 9.6 Hz , J ₂ = 2.7 Hz) , 8.216 (d , 1H , J = 2.7 Hz) , 9.177 (s , 1H) , 10.738 (s , 1H)

化合物	R ₁	R ₂	mp (°C)	HPLC (%)	收率 (%)	¹ H NMR(300 MHz, DMSO-d ₆ , δppm)
6d	ethyl	p-methoxyl phenyl	175.9-177.9	91.26	52	1.034 (t, 3H, J=7.8 Hz), 2.327 (m, 2H, J=7.8 Hz), 3.791 (s, 3H), 3.815 (s, 3H), 6.567 (d, 1H, J=9.3 Hz), 6.674 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.017 (d, 2H, J=9.0 Hz), 7.387 (d, 2H, J=9.0 Hz), 7.507 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.827 (dd, 1H, J ₁ =9.6 Hz, J ₂ =2.7 Hz), 7.944 (d, 1H, J=2.7 Hz), 9.120 (s, 1H), 10.723 (s, 1H).
6e	phenyl	p-ethoxy phenyl	216.7-217.1	94.56	71	1.341 (t, 3H, J=7.2 Hz), 3.817 (s, 3H), 4.036 (m, 2H, J=7.2 Hz), 6.586 (d, 1H, J=9.6 Hz), 6.722 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.013 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.426 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.523 (m, 4H), 7.855 (dd, 1H, J ₁ =9.3 Hz, J ₂ =1.8 Hz), 7.979 (d, 3H), 9.524 (s, 1H), 11.049 (s, 1H).
6f	phenyl	p-methoxyl phenyl	197.5-198.3	98.17	54	3.814 (s, 3H), 3.830 (s, 3H), 6.601 (d, 1H, J=9.6 Hz), 6.734 (d, 1H, J=9 Hz), 7.075 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.429 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.511 (m, 3H), 7.868 (dd, 1H, J ₁ =9.6 Hz, J ₂ =2.7 Hz), 7.900 (d, 3H), 9.537 (s, 1H), 11.064 (s, 1H).
6g	phenyl	n-butyl	205.7-206.0	99.86	62	0.882 (t, 3H, J=7.5 Hz), 1.271 (m, 2H, J=7.2 Hz), 1.627 (t, 2H, J=6.3 Hz), 3.963 (t, 2H, J=6.6 Hz), 6.483 (d, 1H, J=9.3 Hz), 6.765 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.494 (m, 4H), 7.753 (d, 1H, J=9.6 Hz), 8.022 (d, 2H), 8.303 (s, 1H), 9.975 (s, 1H), 11.148 (s, 1H).
6h	p-methoxyl phenyl	p-ethoxy phenyl	180.9-181.9	97.26	68	1.138 (t, 3H, J=7.2 Hz), 3.812 (d, 6H), 4.004 (m, 2H, J=7.2 Hz), 6.584 (d, 1H, J=9.6 Hz), 6.715 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.011 (m, 4H), 7.385 (m, 2H), 7.609 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.851 (dd, 1H, J ₁ =9.6 Hz, J ₂ =2.4 Hz), 7.957 (m, 3H), 9.391 (s, 1H), 11.024 (s, 1H).
6i	p-methoxyl phenyl	p-methoxyl phenyl	171.1-177.9	93.68	35	3.807 (t, 9H), 6.593 (d, 1H, J=9.6 Hz), 6.721 (d, 1H, J=9.3 Hz), 7.023 (m, 4H), 7.422 (m, 2H), 7.618 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.861 (dd, 1H, J ₁ =9.6 Hz, J ₂ =2.4 Hz), 7.964 (m, 3H), 9.398 (s, 1H), 11.033 (s, 1H).
6j	p-methoxyl phenyl	n-hexyl	172.4-172.9	95.49	49	0.822 (t, 3H, J=6.9 Hz), 1.274 (m, 6H), 1.647 (s, 2H), 3.832 (d, 6H), 3.940 (t, 2H, J=7.8 Hz), 6.470 (d, 1H, J=9.6 Hz), 6.740 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.025 (d, 2H, J=9.0 Hz), 7.532 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.740 (dd, 1H, J ₁ =9.3 Hz, J ₂ =2.4 Hz), 7.972 (d, 2H, J=8.7 Hz), 8.288 (d, 1H, J=2.7 Hz), 9.433 (s, 1H), 11.092 (s, 1H).
6k	p-methoxyl phenyl	iso-propyl	152.9-153.7	99.98	64	1.329 (d, 6H, J=6.6 Hz), 3.832 (d, 6H), 5.012 (m, 1H, J=6.9 Hz), 6.480 (d, 1H, J=9.3 Hz), 6.760 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.027 (m, 2H), 7.516 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.729 (dd, 1H, J ₁ =9.6 Hz, J ₂ =2.4 Hz), 7.973 (m, 2H), 8.175 (d, 1H, J=2.4 Hz), 9.430 (s, 1H), 11.061 (s, 1H).
6l	4-NO ₂ phenyl	p-ethoxy phenyl	199.4-199.9	96.38	80	1.323 (t, 3H, J=7.2 Hz), 3.829 (s, 3H), 4.045 (m, 2H, J=6.9 Hz), 6.593 (d, 1H, J=9.3 Hz), 6.739 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.021 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.402 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.644 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.861 (dd, 1H, J ₁ =9.6 Hz, J ₂ =2.4 Hz), 8.008 (d, 1H, J=2.4 Hz), 8.198 (d, 2H, J=8.4 Hz), 8.352 (d, 2H, J=8.4 Hz), 9.895 (s, 1H), 11.065 (s, 1H).
6m	4-NO ₂ phenyl	o-methy phenyl	231.0-231.9	94.82	67	1.976 (s, 3H), 4.002 (s, 3H), 6.625 (d, 2H, J=9.0 Hz), 6.738 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.327 (m, 3H), 7.595 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.906 (m, 2H), 8.185 (d, 2H, J=8.4 Hz), 8.344 (d, 2H, J=8.7 Hz), 9.871 (s, 1H), 11.006 (s, 1H).
6n	4-NO ₂ phenyl	n-butyl	191.2-192.0	96.49	74	0.932 (m, 3H), 1.582 (m, 2H), 3.349 (m, 2H), 3.169 (s, 3H), 3.887 (m, 2H), 6.478 (m, 2H), 6.980 (d, 1H, J=9.3 Hz), 7.411 (dd, 1H, J ₁ =9.3 Hz, J ₂ =2.4 Hz), 7.952 (d, 1H, J=2.4 Hz), 8.197 (d, 2H, J=8.4 Hz), 8.344 (d, 2H, J=8.7 Hz), 9.694 (s, 1H), 16.742 (s, 1H).

化合物	R ₁	R ₂	mp (°C)	HPLC (%)	收率 (%)	¹ H NMR(300 MHz , DMSO-d ₆ , δppm)
6o	4-NO ₂ phenyl	p-methoxyl phenyl	184.3-185.2	97.56	75	3.800 (s , 3H) , 3.829 (s , 3H) , 6.595 (d , 1H , J = 9.6 Hz) , 6.752 (d , 1H , J = 9.0 Hz) , 7.055 (t , 1H , J = 7.5 Hz) , 7.222 (d , 1H , J = 8.4 Hz) , 7.401 (m , 2H) , 7.584 (d , 1H , J = 2.7 Hz) , 7.856 (dd , 1H , J ₁ = 9.6 Hz , J ₂ = 2.7 Hz) , 7.948 (d , 1H , J = 2.7 Hz) , 8.189 (d , 2H , J = 8.7 Hz) , 8.350 (d , 2H , J = 8.7 Hz) , 9.887 (s , 1H) , 11.120 (s , 1H) .
6p	4-NO ₂ phenyl	iso-propyl	271.2-272.1	86.90	46	1.329 (d , 6H , J = 6.6 Hz) , 3.889 (s , 3H) , 5.012 (m , 1H , J = 6.9 Hz) , 6.475 (m , 2H) , 6.982 (d , 1H , J = 9.3 Hz) , 7.413 (dd , 1H , J ₁ = 9.3 Hz , J ₂ = 2.4 Hz) , 7.954 (d , 1H , J = 2.4 Hz) , 8.195 (d , 2H , J = 8.4 Hz) , 8.348 (d , 2H , J = 8.7 Hz) , 9.684 (s , 1H) , 10.742 (s , 1H) .

2 药理实验

2.1 材料与amp;方法 体外细胞模型: HepG2 2.2.15 细胞; 药物毒性试验: MTT 法检测样品对细胞的毒性; 阳性药物对照: 阿德福韦。

2.2 试验过程

2.2.1 药液配制 药物先用 DMSO 溶解为 20 mg/ml 的母液, 临用前用细胞培养液将母液稀释为 50、25、12.5、6.25、3.125 μg/ml 5 个工作浓度。

2.2.2 药物的细胞毒性检测 HepG2 2.2.15 细胞在 96 孔细胞培养板中培养 48 h 后, 加入上述所配不同浓度含药培养液, 继续培养 9 d(每 3 天换液 1 次), 用 MTT 法检测细胞存活率, 确定药物对 HepG2 2.2.15 细胞的毒性。

2.2.3 药物对 HBV 病毒 DNA 抑制作用检测 HepG2 2.2.15 细胞在 24 孔细胞培养板中培养 48 h 后, 加入所配不同浓度含药培养液, 继续培养 9 d(每 3 天换液 1 次), 收集上清液, 用探针法进行 PCR 检测。HBV 引物: HBV 上游引物: 5'-TgT CCT ggT TAT CgC Tgg-3'。HBV 下游引物: 5'-CAA ACg ggC AAC ATA CCT T-3'。HBV 荧光探针序列: 5'(FAM) -TgT gTC TgC ggC gTT TTA TCA T-(TAMRA) 3'。PCR: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s 60 °C 退火和延伸共 30 s 40 个循环。

2.3 实验结果 见表 3。

3 讨论

初步的体外抗乙肝病毒活性表明: ①所设计合成的化合物对乙肝病毒的 DNA 复制都有一定的抑制作用。②当吡啶环 N 原子上接有对乙氧基苯基时表现出最好的抗乙肝病毒活性, 其中化合物 6h、6e 和 6a 显示出最好的抑制病毒 DNA 复制作用, 值得进一步关注。当以其他基团取代苯环 N 原子上的对乙氧基苯基时, 抗乙肝病毒活性有所下降, 而且毒性有所增加, 其中以烷基取代毒性增加最为显著。

由此可以看出 N 原子上的供电子基团对化合物的活性非常重要, 而烷烃对活性不利。③当 R₁ 为对供电子基团的取代苯基时(6e 和 6h) 表现出最好的抗病毒活性, 而以吸电子基团(硝基) 取代时抗病毒活性下降甚至消失, 由此可见 R₁ 取吸电子基团时对抗病毒活性不利, 而供电子基团有利于化合物活性的提高。

表 3 目标化合物的抗 HBV 活性

化合物	CC ₅₀ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)	SI ^c
6a	384.54	16.16	23.79
6b	234.14	134.26	1.74
6c	78.18	—	—
6d	198.69	51.12	3.89
6e	346.42	3.59	96.40
6f	536.05	38.97	13.41
6g	42.28	—	—
6h	326.21	2.35	138.63
6i	308.55	67.40	4.57
6j	111.96	—	—
6k	61.19	74.22	0.82
6l	476.28	73.16	6.51
6m	504.90	59.80	8.44
6n	62.55	—	—
6o	325.64	—	—
6p	64.50	—	—
Adefovir	1 059.40	1.2	882.84

a-CC₅₀ is 50% cytotoxicity concentration in HepG2 2.2.15 cells; b-IC₅₀ is 50% inhibitory concentration; c-selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀).

【参考文献】

[1] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures[J]. J Viral Hepatit, 2004, 11 (2), 97.
 [2] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
 [3] Dienstag JL. Hepatitis B Virus Infection[J]. New Eng J Med, 2008, 359 (14), 1486.
 [4] Lui YYN, Chan HLY. Treatment of chronic hepatitis B: focus on telbivudine[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7 (3),

259.

- [5] Cheng PN ,Chang TT. Entecavir: a potent antiviral with minimal long-term resistance in nucleoside-naive chronic hepatitis B patients[J]. Expert Rev Anti Infect Ther ,2008 ,6 (5) ,569.
- [6] Lv Z ,Sheng C ,Wang T *et al.* Design ,synthesis ,and antihepatitis B virus activities of novel 2-pyridone derivatives [J]. J Med

Chem ,2009 ,53 ,660.

- [7] Dong H ,Li K ,Zheng C *et al.* Synthesis and antitumor activity of novel 3-(substituted amino)-chromone derivatives [J]. Acta Chim Sin ,2009 ,67(8) ,819.

[收稿日期]2012-04-06

[修回日期]2012-07-07

(上接第 101 页)

释放制剂组合系统的释药行为是可以预测的,从而更加有效地表征脉冲释放制剂组合系统的释药行为。

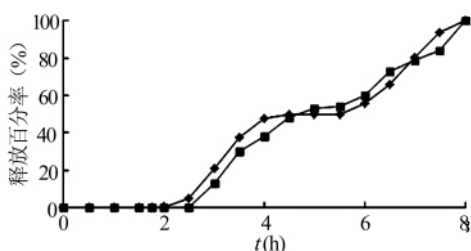


图 8 两种脉冲释放制剂按 1 : 1 组合后理论拟合和实际测定的释放曲线
—◆—理论拟合; —■—实测值

3 讨论

本研究采用数学手段对两种脉冲释放制剂的释药行为进行解析,得到两种脉冲释放制剂的较佳组合比例,然后根据两种制剂释药速率经时方程迭加的原理,构建组合系统的释药速率经时方程,按照最小偏差平方和 SS 原则,采用非线性最小二乘法模型嵌合通用程序,对组合系统进行模型嵌合,得到最适模型的释药速率经时方程,并据方程绘制释药速率经时曲线。结果表明,模型嵌合情况的最小偏差平方和 SS 分别为 142.14(对乙酰氨基酚)、234.87(盐酸伪麻黄碱),嵌合效果较好,说明组合系统的释药行为可以得到较准确的表征,也显示出这类组合系统的释药行为可以用数学手段进行理论预测,对于该类系统的设计具有一定的指导意义。

表 3 脉冲释放制剂组合后两种成分速率时间曲线的数学方程参数

参数	A_1	k_1	L_1	T_1	A_2	k_2	L_2	T_2	SS
对乙酰氨基酚	20.60	0.11	2.00	3.00	72.37	0.01	5.50	8.50	142.14
盐酸伪麻黄碱	20.61	0.13	2.44	3.32	72.67	0.02	5.58	8.70	234.87

采用模型嵌合通用程序分别对两种脉冲释放制剂的释药速率经时过程进行方程拟合,得到两种脉冲释放制剂的释药方程,然后按照一定的比例对释药方程进行迭加,得到组合系统的释药速率经时理论曲线,选择组合系统释药初始阶段释药速率较稳定的比例初步定为较佳比例。结果表明,以两种脉冲释放制剂的配比为 1 : 1 的组合系统释药较平缓,而此时两次脉冲的释放速度比较接近。因此,可以得出以下结论:设计组合型缓释制剂,必须维持释放速度的平稳。

【参考文献】

- [1] 阳长明. 浅谈中药缓释制剂的研究[J]. 中国新药与临床药理 2003 ,14(4) :282.
- [2] 马建民,李宏,王东风. 中药缓释制剂的研究[J]. 中成药,

2003 25(7) :581.

- [3] 薛燕. 中药复方霰弹理论——论中药复方现代化研究方法[J]. 北京: 中国医药出版社,1998.
- [4] 周俊. 中药复方——天然组合化学库与多靶点作用机理[J]. 中成药,1997 ,19(8) :67.
- [5] Bussemer T ,Bodmeier R. Formulation parameters affecting the performance of coated gelatin capsules with pulsatile release profiles[J]. Int J Pharmaceut 2003 ,(267) : 59.
- [6] Bussemer T ,Peppas NA ,Bodmeier R. Evaluation of the swelling ,hydration and rupturing properties of the swelling layer of a rupturable pulsatile drug delivery system[J]. Eur J Pharm Biopharm 2003 ,(56) :261.
- [7] Li YH ,Zhu JB. Modulation of combined-release behaviors from a novel “tablets-in-capsule system” [J]. J Control Release ,2004 ,(95) :120.

[收稿日期]2012-07-05

[修回日期]2012-10-29