3-芳基-2(5H)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体多靶点抗菌化合物的
设计、合成及其作用机理研究

王旭东 魏 伟 邓瑞成 周沙沙

张 蕾 林肖依 肖竹平*

(吉首大学化学化工学院 吉首 416000)

摘要 借助杂合体药物和多靶点药物的设计方法, 将含有 3-芳基-2(5H)-呋喃酮结构单元的酪氨酰 t-RNA 合成酶抑制剂与氟喹诺酮(DNA 促旋酶抑制剂)相融合, 设计合成了 7 个结构全新的 3-芳基-2(5H)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体化合物. 体外抗菌活性筛选发现, 大多数化合物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及真菌均具有较好抑制作用. 酶活性评价和分子模拟研究表明, 该类化合物是通过干扰蛋白质合成和 DNA 复制来发挥抑菌作用的双重抑制剂. 这些结果充分说明, 3-芳基-2(5H)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体化合物作为抗菌化合物有进一步研究的价值.

关键词 2(5H)-呋喃酮; 氟喹诺酮; 杂合体; 多靶点; 抑制剂

3-Arylfuran-2(5H)-one-fluoroquinolone Hybrids as Multi-target Anti-bacterial Agents: Design, Synthesis and Its Mechanistic Implication

Wang, Xudong Wei, Wei Deng, Ruicheng Zhou, Shasha Zhang, Lei

Lin, Xiaoyi Xiao, Zhuping*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000)

Abstract Based on the multi-target drug design and hybrid strategy for drug research and development, seven new 3-arylfuran-2(5H)-one-fluoroquinolone hybrids have been designed and synthesized, in which the 3-aryl-4-(2-morpholinoethoxy)furan-2(5H)-one (targeting tyrosyl-tRNA synthetase, TyrRS) and fluoroquinolone (targeting DNA gyrase) were merged. In the antibacterial assay, most of the tested compounds displayed a broad spectrum of activity against microorganisms including Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria and fungi. Furthermore, the enzyme assay and molecular docking revealed that 3-arylfuran-2(5H)-one-fluoroquinolone is a potent antibacterial agent by disturbing the processes of bacterial DNA replication and protein synthesis. These excellent results strongly suggest that 3-arylfuran-2(5H)-one-fluoroquinolone hybrid deserves to further research as a novel antibiotic.

Keywords 3-arylfuran-2(5H)-one; fluoroquinolone; hybrid; multi-target; inhibitor

20 世纪青霉素的发现, 使许多感染性疾病得到了有效的治疗, 从此开辟了抗生素治疗的新时代^[1]. 然而由于抗生素在临床中的使用不当, 病菌对其产生了广泛的耐药性, 甚至出现了同时对多种抗生素耐药的多重耐药菌^[2]. 例如“NDM-1 超级细菌”与具有超广谱 β -内酰胺酶和诱导性 β -内酰胺酶的革兰阴性杆菌的出现, 不仅加大了治疗难度, 而且增加了易感染人群的病死率^[3,4]. 耐药菌给人类的健康带来了严重的威胁, 因而引起了全

球范围内的高度重视. 世界各国纷纷对抗生素的管制和合理使用. 然而这些措施只能在一定程度上缓解耐药菌的产生, 却不能有效地对付已出现的耐药菌. 面对日益严重的抗生素耐药性问题, 我们亟需和重视开发新型抗菌药物. 令人遗憾的是, 自 20 世纪 80 年代以来, 针对耐药菌的药物研发一直没有较大进展^[5]. 为促进新抗菌药的研发, 世界卫生组织将“抵御抗生素耐药性”确定为 2011 年世界卫生日的主题; 英国抗菌化学治疗学

* E-mail: xiaozhuping2005@163.com

Received April 23, 2014; revised June 4, 2014; published online July 1, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21262013), the Hunan Provincial Natural Science Foundation (No. 13JJ2030), and the Science and Technology Innovative Research Team in Higher Educational Institutions of Hunan Province.

国家自然科学基金(No. 21262013)、湖南省自然科学基金(No. 13JJ2030)和湖南省高校科技创新团队支持计划资助项目.

会发布了“Urgent Need”的倡议书;美国传染病学学会提出一项到2020年研发出10种新抗菌药的计划^[6]。

近年来虽然有几十种新的抗生素相继问世,但其远远滞后于耐药菌产生的速率^[7]。研发全新结构的药物以及对现有药物进行修饰是抗菌药物研发的常用方法。但基于单靶点药物研发模式存在不足,即使对于全新结构的药物,致病菌也容易通过靶点突变迅速对其产生耐药性,在很大程度上限制了单靶点新药在临床上的长期应用^[8]。对于多靶点药物,需要多个靶点同时突变,病菌才能通过这一途径获得耐药性,单一靶点的突变概率为 $10^{-7} \sim 10^{-9}$,因此,多个靶点同时突变的可能性几乎为零。基于这一认识,将作用机制不同的两类或多类药物融合而成的多靶点杂合体药物,已引起人们的广泛关注^[9~12]。

氟喹诺酮类抗菌药是一类抗菌谱广、抗菌作用强和耐受性好的抗菌药,其抗菌机理是通过抑制 DNA gyrase, 阻断 DNA 的复制来抑制病菌的生长和繁殖^[13]。从1962年进入临床以来,已成为临床上常用的抗菌药。令人遗憾的是,通过靶点突变、主动外排以及膜通透性改变等途径^[14~16],近来多种致病菌对氟喹诺酮类药物产生了不同程度的耐药性。

在前期研究工作中,我们以具有抗菌消炎作用的穿心莲内酯^[17]为先导化合物,基于电子等排和骨架跃迁原理,设计并得到了一系列具有高活性的3-芳基-2(5H)-呋喃酮类 TyrRS 抑制剂^[18~20]。在本文中,我们结合杂合体抗菌药的设计思路,尝试设计并合成一类对 DNA gyrase 和 TyrRS 具有双重抑制作用的新型多靶点2(5H)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体抗菌化合物。这一设想在酶活性测定和分子模拟研究中得到了证实。

1 结果与讨论

1.1 化合物合成

按照设计路线(Scheme 1),合成了7种3-芳基-

2(5H)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体化合物。本文对已报道的方法^[18,19]进行了改进,用苯乙酸钠和溴乙酸乙酯反应得到中间体 **a1~a4**。其余中间体 **b1~b4** 和 **c3~c4** 均参照上述文献报道方法合成。氟喹诺酮与 **c** 在4-二甲氨基吡啶(DMAP)的作用下反应即得到目标产物 **d1~d7**。

文献报道 **1a~1k** 的制备方法是以前无水甲醇作溶剂,在钠存在下甲醇首先与钠反应得到甲醇钠,然后甲醇钠与苯乙酸作用形成苯乙酸钠,苯乙酸钠再与溴乙酸乙酯反应得到化合物 **a**。反应过程中,由于钠和甲醇钠使反应体系具有较强的还原性和碱性,不仅容易将溴乙酸乙酯还原,而且还会导致溴乙酸乙酯发生分子间酯缩合副反应。参照文献方法合成目标化合物时,化合物 **a** 产率一般在50%以下,且反应产物不易纯化。对反应机理的分析表明,如果直接用苯乙酸钠与溴乙酸反应,反应体系中就不必加入钠,从而能够避免溴乙酸乙酯的还原以及自身酯缩合副反应的发生。此外,该反应在本质上属于亲核取代反应,而质子溶剂会使亲核试剂溶剂化,对反应不利,非质子极性溶剂会大大加快亲核取代反应的速率,为此我们将溶剂由甲醇改为 DMSO。试验表明,经过这些改进,反应条件更温和,产率也大大提高。

在 **d1~d7** 的合成过程中,参照4-胺-3-芳基-2(5H)-呋喃酮^[18,19]的合成路线时发现,氟喹诺酮的哌嗪基与中间体 **c** 反应收率远远低于文献报道的脂肪胺及芳香胺。其可能原因是氟喹诺酮较文献中胺的分子量大很多,分子量增大使分子构象变多,导致沙星的反应活性降低。最终我们通过改变底物的摩尔比,由原来的2:1改为1:2,使反应速率和产率得到较大提高。

1.2 抗菌活性

对合成的7种目标化合物进行了抗菌活性测定,结果如表1所示。受试菌涵盖革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌。所有化合物对受试菌都表现出了不同程度的抗菌活性,尤其是化合物 **d6**,其对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌都显现了良好的抗菌效果并且活性接

Scheme 1

近或超过阳性对照环丙沙星. 整体而言, 化合物对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性较好. 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性数据分析发现: 含有沙拉沙星结构的化合物活性好于含有诺氟沙星的(**d2** vs **d1**; **d4** vs **d3**; **d6** vs **d5**). 就 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮部分而言, 苯环上含有双取代基化合物的活性要好于单取代的(**d3** vs **d1**; **d4** vs **d1**); 双取代化合物活性顺序为 OMe>OEt>Cl, 造成这种结果的可能原因是苯环的 3-位和 4-位为 OMe 时, 配体分子在该位置与受体蛋白形成较强的氢键作用力; 当 OMe 被 OEt 取代时, 受空间位阻的影响, 氢键作用力会减弱, 不利于配体分子与受体蛋白的结合, 导致其活性下降; 当其进一步被 Cl 取代时, 由于氢键作用力遭到破坏, 导致活性进一步降低. 化合物 **d6** 恰好为沙拉沙星和 3-(3,4-二甲氧基苯基)-2(5*H*)-呋喃酮的杂合体, 故抗菌活性最好.

值得注意的是, 在对其它受试菌实验数据分析时发现, 大多数化合物对真菌也表现出了一定的抗菌活性, 如化合物 **d6** 对白色念珠菌的 MIC₅₀ 为 0.40 μg/mL, 约为阳性对照环丙沙星的 19 倍. 一般来讲, 氟喹诺酮是一类选择性作用于 II 型拓扑异构酶(DNA gyrase 和拓扑异构

酶 IV)的广谱抗菌药物^[21]. 但常见氟喹诺酮药物不具备抗真菌的活性, 因此他们对真菌拓扑异构酶也没有显著的抑制作用^[22]. 然而最近 Srinivasan 等^[23]报道 7-位修饰后的氟喹诺酮会对新型隐球菌有明显的抑制作用. 此外还有多项研究表明, 拓扑异构酶可以用来做研发抗真菌药物的靶点^[24]. 本文的研究结果在一定程度上也证实通过对 7-位的修饰来改善氟喹诺酮的抗真菌活性是可行的.

1.3 抗菌机理

对 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体机理研究结果表明(表 2 和图 1), 化合物 **d6** 对 DNA gyrase 和 TyrRS 均有不同程度的抑制作用. 数据分析表明, 受试杂合体对 DNA gyrase 活性与阳性对照环丙沙星基本持平, 这说明杂合体保留氟喹诺酮的原有作用靶点. 对 TyrRS 分析发现, 这些化合物对 TyrRS 也有很好的活性, 其活性接近于 3-(4-羟基苯基)-4-吗啉基乙氧基-2(5*H*)-呋喃酮(**1**)^[19]. 综上所述, 我们可以确认 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体是一类靶向 TyrRS 和 DNA gyrase 的多靶点抗菌化合物.

表 1 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体结构及抗菌活性(MIC₅₀)^a
Table 1 Structures and MIC₅₀s of the 3-aryl-furan-2(5*H*)-one-fluoroquinolone compounds

Compd.	R ¹	R ²	R ³	MIC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)			
				A	B	C	D
d1	H	Cl	CH ₂ CH ₃	11.3	8.6	5.2	2.8
d2	H	Cl	<i>p</i> -C ₆ H ₄ F	3.0	4.3	0.33	1.4
d3	Cl	Cl	CH ₂ CH ₃	>25	6.5	2.9	4.9
d4	Cl	Cl	<i>p</i> -C ₆ H ₄ F	13.9	2.8	2.0	5.9
d5	OMe	OMe	CH ₂ CH ₃	>25	2.6	5.5	3.6
d6	OMe	OMe	<i>p</i> -C ₆ H ₄ F	0.74	0.27	0.28	0.40
d7	OEt	OEt	<i>p</i> -C ₆ H ₄ F	2.5	0.59	0.71	0.71
环丙沙星	—	—	—	0.90	0.69	0.48	7.53

^a A: 大肠杆菌, ATCC 8739; B: 金黄色葡萄球菌, ATCC 5638; C: 铜绿假单胞菌, ATCC 9027; D: 白色念珠菌, ATCC 10231.

图 1 化合物 **d6** (A) 和环丙沙星(B)对 DNA gyrase 活性抑制数据对比

Figure 1 Representative comparative data for the inhibition of DNA gyrase with compound **d6** (A) and Cipro (B)

(A) Lane 1: relaxed pBR322 DNA, lane 2: relaxed pBR322 DNA and 3U DNA gyrase, lanes 3~8: relaxed pBR322 DNA, 3U DNA gyrase and 0.025, 0.10, 0.40, 0.16, 6.4, 25.6 μg/mL compound **d6**; (B) lane 1: relaxed pBR322 DNA, lane 2: relaxed pBR322 DNA and 3U DNA gyrase, lanes 3~8: relaxed pBR322 DNA, 3U DNA gyrase and 0.025, 0.10, 0.40, 0.16, 6.4, 25.6 μg/mL Cipro

2 结论

本文报道 7 种结构全新的 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合化合物, 所有化合物均通过元素分析、EIMS 和 ^1H NMR 表征. 在该系列化合物中, 大多数化合物都表现出很好的抗菌活性, 包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌. 化合物 **d6** 为 3-(3,4-甲氧基苯基)-2(5*H*)-呋喃酮和沙拉沙星的杂合体, 抗菌活性最好, 对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的 MIC₅₀ 值分别为 0.28, 0.27, 0.74 和 0.40 $\mu\text{g/mL}$, 与阳性对照环丙沙星(0.48, 0.69, 0.90 和 7.53 $\mu\text{g/mL}$)相比, 抗菌活性更好. 机理和分子模拟研究进一步说明, 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮-氟喹诺酮靶向 TyrRS 和 DNA gyrase, 能同时阻断病菌蛋白质和 DNA 的复制, 能够有效地抑制病菌的生长和繁殖. 与传统抗菌药物相比, 不难发现该类杂合体型抗菌化合物将在应对耐药性病菌的问题上具有独特的优势.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

XT-4 显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司, 未校准); Mariner 5304 ESI 质谱仪(美国); Bruker AV-300 核磁共振仪(德国); 酶标仪(SpectraMax® Plus384 Molecular Devices, 美国); WD-9413B 型凝胶成像分析系统(北京市六一仪器厂). 所用化学试剂均购买于 Aldrich(美国)和国药集团化学试剂有限公司(上海); 层析柱硅胶(200~300 目)和薄层层析硅胶(GF254)为安徽良臣硅源材料有限公司生产.

3.2 实验方法

3.2.1 合成方法

2-(2-芳基乙酰氧基)乙酸乙酯(**a1**~**a2**)的合成: 将不同取代基的苯乙酸(40 mmol)溶解于 0.1 mol/L NaOH 水溶液中, 将 pH 调节到 9.0 到 10.0 之间, 减压除去水得到对应的苯乙酸钠. 将干燥后的苯乙酸钠(40 mmol)溶于 DMSO 中, 加入溴乙酸乙酯(44 mmol), 室温下反应 3~4 h, 反应完毕, 乙酸乙酯稀释, 水洗, 有机层用饱和食盐水洗至中性, 干燥, 浓缩, 用硅胶柱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯, 得到油状 **a1**~**a2**, 产率 90%~95%.

4-羟基-3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮(**b1**~**b2**)的合成: 在冰浴条件下, 将 24 mmol NaH 加入到 10 mL 无水四氢呋喃(THF)中, 滴入 20 mL 含有 10 mmol **a1**~**a2** 的无水四氢呋喃溶液, 滴加完毕继续反应 2~7 h, 反应完毕, 加入碎冰, 用乙醚萃取, 水层酸化, 析出沉淀, 抽滤, 得白色到淡黄色粉末状 **b1**~**b2**.

4-(2-溴乙氧基)-3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮(**c1**~**c2**)的合

成: 将 5 mmol **b1**~**b2** 溶解在 35 mL 无水丙酮中, 加入 4.3 mL (50 mmol) 1,2-二溴乙烷和 2.2 mL 三乙胺(50 mmol), 回流 3~5 h, 反应完毕, 减压除去丙酮, 加水并用乙酸乙酯萃取, 干燥, 浓缩, 用硅胶柱纯化[洗脱剂 $V(\text{乙酸乙酯}): V(\text{石油醚})=3:2\sim2:3$], 得白色粉末状 **c1**~**c2**.

3-芳基-4-氟喹诺酮乙氧基-2(5*H*)-呋喃酮(**d1**~**d7**)的合成: 将 2 mmol **c1**~**c2**, 488 mg DMAP (2 mmol), 332 mg KI (2 mmol)和 1 mmol 沙星溶于 DMSO 中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 48~72 h, 反应完毕, 加水, 析出固体, 用硅胶柱纯化, [洗脱剂 $V(\text{氯仿}): V(\text{甲醇})=15:1\sim10:1$, 0.3%醋酸], 得到目标化合物 **d1**~**d7**.

3-(4-氯苯基)-4-(2-(4-(1-乙基-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d1**): 白色固体, 产率 52.5%. m.p. 206~208 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ : 1.41 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, CH₃), 2.51~2.54 (m, 4H, CH₂), 2.70~2.78 (m, 4H, CH₂), 2.85~2.90 (m, 2H, CH₂), 4.44 (t, $J=5.2$ Hz, 2H, CH₂), 4.58 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, CH₂), 5.16 (s, 2H, CH₂), 7.19 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.94~7.98 (m, 3H, ArH), 8.96 (s, 1H, ArH), 15.37 (s, 1H); EIMS m/z : 554.1 ($\text{M}-\text{H}$)⁻. Anal. calcd for C₂₈H₂₇ClFN₃O₆: C 60.49, H 4.89, Cl 6.38, F 3.42, N 7.56; found C 60.41, H 4.82, Cl 6.31, F 3.40, N 7.59.

3-(4-氯苯基)-4-(2-(4-(1-(4-氟苯基)-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d2**): 白色固体, 产率 32.7%. m.p. 166~168 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 Hz) δ : 2.55~2.63 (m, 4H, CH₂), 2.76~2.81 (m, 2H, CH₂), 3.05~3.10 (m, 4H, CH₂), 4.35~4.39 (m, 2H, CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂), 6.38 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.31~7.55 (m, 5H, ArH), 7.78~7.88 (m, 2H, ArH), 7.91~8.03 (m, 2H, ArH), 8.64 (s, 1H, ArH), 15.10 (s, 1H); EIMS m/z : 620.6 ($\text{M}-\text{H}$)⁻. Anal. calcd for C₃₂H₂₆ClF₂N₃O₆: C 61.79, H 4.21, Cl 5.70, F 6.11, N 6.76; found C 61.62, H 4.25, Cl 5.68, F 6.14, N 6.73.

3-(3,4-二氯苯基)-4-(2-(4-(1-乙基-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d3**): 白色固体, 产率 63%. m.p. 165~168 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 Hz) δ : 1.41 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.51~2.58 (m, 4H, CH₂), 2.65~2.72 (m, 4H, CH₂), 2.73~2.75 (m, 2H, CH₂), 4.43~4.35 (m, 2H, CH₂), 4.55~4.62 (m, 2H, CH₂), 5.20 (s, 2H, CH₂), 7.17 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.65~6.71 (m, 1H, ArH), 7.90~7.94 (m, 2H, ArH), 8.31 (s, 1H, ArH), 8.95 (s, 1H, ArH), 15.35 (s, 1H); EIMS m/z : 589.1 ($\text{M}-\text{H}$)⁻. Anal. calcd for C₂₈H₂₆Cl₂FN₃O₆: C 56.96, H

4.44, Cl 12.01, F 3.22, N 7.12; found C 56.90, H 4.49, Cl 12.04, F 3.18, N 7.09.

3-(3,4-二氯苯基)-4-(2-(4-(1-(4-氟苯基)-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d4**): 白色固体, 产率 45%. m.p. 212~214 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ : 2.63~2.67 (m, 4H, CH₂), 2.77~2.83 (m, 2H, CH₂), 3.05~3.12 (m, 4H, CH₂), 4.38~4.42 (m, 2H, CH₂), 5.17 (s, 2H, CH₂), 6.39 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.50~7.60 (m, 2H, ArH), 7.67 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH), 7.75~7.82 (m, 2H, ArH), 7.93~8.05 (m, 2H, ArH), 8.15 (s, 1H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 15.14 (s, 1H, COOH); EIMS *m/z*: 654.4 [M-H]⁻. Anal. calcd for C₃₂H₂₅Cl₂F₂N₃O₆: C 58.55, H 3.84, Cl 10.80, F 5.79, N 6.40; found C 58.51, H 3.80, Cl 10.86, F 5.71, N 6.46.

3-(3,4-二甲氧基苯基)-4-(2-(4-(1-乙基-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d5**): 白色固体, 产率 58%. m.p. 179~181 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 Hz) δ : 1.41 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.53~2.61 (m, 4H, CH₂), 2.69~2.73 (m, 4H, CH₂), 2.83~2.87 (m, 2H, CH₂), 3.77 (s, 6H, CH₃), 4.32~4.37 (m, 2H, CH₂), 4.60 (t, *J*=6.7 Hz, 2H, CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂), 6.99 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, ArH), 7.92 (d, *J*=13.5 Hz, 1H, ArH), 8.96 (s, 1H, ArH), 15.35 (s, 1H, COOH); EIMS *m/z*: 580.6 [M-H]⁻. Anal. calcd for C₃₀H₃₂FN₃O₈: C 61.95, H 5.55, F 3.27, N 7.23; found C 61.91, H 5.58, F 3.26, N 7.25.

3-(3,4-二甲氧基苯基)-4-(2-(4-(1-(4-氟苯基)-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d6**): 白色固体, 产率 70%. m.p. 196~198 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ : 2.72~2.80 (m, 2H, CH₂), 3.04~3.16 (m, 4H, CH₂), 3.79 (s, 6H, CH₃), 3.94~4.03 (m, 4H, CH₂), 4.35~4.38 (m, 2H, CH₂), 5.13 (s, 2H, CH₂), 6.37 (d, *J*=6.9 Hz, 1H, ArH), 6.93 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, ArH), 7.48~7.56 (m, 4H, ArH), 7.75~7.82 (m, 2H, ArH), 7.93 (d, *J*=12.9 Hz, 1H, ArH), 8.76 (s, 1H, ArH), 15.19 (s, 1H, COOH); EIMS *m/z*: 646.3 [M-H]⁻. Anal. calcd for C₃₄H₃₁F₂N₃O₈: C 63.06, H 4.82, F 5.87, N 6.49; found C 63.04, H 4.86, F 5.85, N 6.53.

3-(3,4-二乙氧基苯基)-4-(2-(4-(1-(4-氟苯基)-3-羧基-6-氟-4-喹啉酮-7-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2(5*H*)-呋喃酮(**d7**): 白色固体, 产率 61%. m.p. 172~174 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ : 1.27 (t, *J*=6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.32 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.55~2.65 (m, 4H, CH₂), 2.75~2.81 (m, 2H, CH₂), 3.02~3.10 (m, 4H, CH₂), 3.96~4.03 (m, 4H, CH₂), 4.32~4.38 (m, 2H, CH₂), 5.11 (s, 2H, CH₂),

6.38 (d, *J*=6.8 Hz, 1H, ArH), 6.95 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH), 7.48~7.56 (m, 4H, ArH), 7.75~7.82 (m, 2H, ArH), 8.00 (d, *J*=12.8 Hz, 1H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 15.15 (s, 1H, COOH); EIMS *m/z*: 674.3 [M-H]⁻. Anal. calcd for C₃₆H₃₅F₂N₃O₈: C 63.99, H 5.22, F 5.62, N 6.22; found C 63.92, H 5.30, F 5.59, N 6.28.

3.2.2 抗菌活性的测定

将受试菌悬浮在 Luria-Bertani (LB)液体培养基中, 并稀释成分散浓度约为 10⁵ cfu/mL(当浓度为 10⁶ cfu/mL 时 OD_{600nm} 约为 0.1, 1 cm 比色皿)的菌液. 将菌液加到 96 孔板上(每孔加菌液 100 μ L), 以培养基为空白对照, 以 50% 二甲基亚砜(DMSO)代替受试化合物作为阴性对照, 以环丙沙星为阳性对照. 将不同浓度的受试化合物[以 50% DMSO 和 50% 磷酸盐缓冲液(PBS)为溶剂], 以每孔 11 μ L 的量加入到 96 孔板上, 每个浓度梯度做四个平行实验. 摇匀后, 将 96 孔板放入 37 °C 的恒温培养箱中培养适当时间(真菌在 28 °C 培养), 每孔加入 25 μ L 含有 4 mg/mL 噻唑蓝(MTT)的 PBS 溶液, 再在同样条件下培养 4 h, 每孔加入 100 μ L 十二烷基磺酸钠(SDS)裂解液(10% SDS, 5% 异丙醇, pH 为 3.5 左右)后培养 8~12 h. 用酶标仪在 570 和 630 nm 双波长下测定吸光值(OD)值, 百分抑制率按下式计算:

$$I\% = 100 - \frac{OD_{\text{测试}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100$$

MIC₅₀ 是指当受试化合物对受试菌被抑制为 50% 时的最小浓度, 结果见表 1.

3.2.3 抗菌机理的测定

TyrRS 的提取以及化合物对 TyrRS 活性的测定: 将金黄色葡萄球菌 TyrRS 在大肠杆菌内表达, 参照文献报道方法^[25]用 SDS-PAGE 凝胶色谱予以纯化. 对 TyrRS 活性测定方法^[26]做了改进. 选取抗菌活性最好的 3-芳基-2(5*H*)-呋喃酮-氟喹诺酮杂合体 **d6** 作为受试化合物, 对其进行 TyrRS 抑制活性的测定. 在 TyrRS 存在的情况下, 通过 tRNA 与 [³H]甲硫氨酸的连接量来定量检测酶的活性. 反应在 96 孔过滤板中进行, 将不同浓度的受试物和 TyrRS (0.2 nmol/L)在室温下混合培养 10 min, 然后在 37 °C 条件下加入到含有反应底物的缓冲液中反应. 反应体系为: 100 mmol/L TrisHCl pH 7.9, 16 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 3 mmol/L 二硫苏糖醇, 5 mmol/L ATP, 10 μ mol/L [³H]酪氨酸以及 4 mg/mL 大肠杆菌 MRE600 tRNA. 反应适当时间后, 加入等体积的 7% 冰三氯乙酸来终止反应. 真空抽滤反应液中的 tRNA. 采用闪烁计数器检测滤饼中的闪烁量. 每个样品重复 4 次, 抑制剂的平均活性与没有加入抑制剂的对照孔做比较.

IC₅₀是指当受试化合物对酶活性抑制为50%时的最小药物浓度,结果见表2。

化合物对 DNA gyrase 活性的测定: 参照 DNA gyrase (NEW ENGLAND BioLabs 公司)使用说明,在 DNA 超螺旋实验中,测定化合物 **d6** 对 DNA gyrase 活性的影响。具体如下: 4 μL 的 5×DNA gyrase 反应缓冲溶液(35 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L MgCl₂, 24 mmol/L KCl, 1.75 mmol/L ATP, 2 mmol/L DTT, 0.1 mg/mL BSA, 5 mmol/L spermidine 和 6.5%甘油 pH 7.5, 25 °C)稀释到 11.3 μL 的水中,加入 2 μL 松弛型 DNA,再加入 2 μL 不同浓度的受试化合物和 0.7 μL DNA gyrase (5 U/μL), 37 °C 条件下反应 1 h。加 20 μL 氯仿-异戊醇(V/V=24/1)和 20 μL 终止缓冲液[STEB: 40%蔗糖, 100 mmol/L Tris•HCl (pH 7.5), 0.5 mg/mL 溴酚蓝和 1 mmol/L EDTA]终止反应。然后用 1%的琼脂糖电泳, 50 V 电压, 电泳 3 h, 溴化乙锭(EB)染色, 凝胶成像仪成像(图 1)。IC₅₀是指当受试化合物对酶活性抑制为 50%时的最小浓度,结果见表 2。

3.2.4 分子模拟研究

我们使用 AutoGrid 4.2 程序将 **d6** 分子分别与 DNA gyrase 和 TyrRS 进行分子对接,分子对接结果如图 3~6。首先使用 AMBER 力场对大分子靶点进行自动网格划分,依据天然配体作用于靶点的活性催化位置构建立方形对接区,受体格点盒子大小为 65 Å×65 Å×65 Å,盒子中心位于活性腔中心,间隔为 0.375 Å,用 AutoDock 算法对抑制剂与大分子的结合自由能进行优化,采用 Lamarckian 遗传算法计算其最优构象,计算参数来源于软件 ADT (Auto Dock Tools 组件, 1.5.4 版本),使用其默认参数: 50 组随机原始个体、能量优化数值最大值为 2.5×10⁴,遗传最大代次数为 2.7×10⁴次、突变率选择 0.02,转型率选择为 0.8。进行 100 次 GA 运算,经打分函数结果和簇分析,选取构象最优的复合物。

辅助材料(Supporting Information) 部分化合物的 ¹H NMR, ¹³C NMR 及 EIMS 谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Philip, H. *EMBO Reports* **2012**, *13*, 680.
- [2] Yang, J. Q.; Hu, Y. W.; Gu, Q.; Li, M. G.; Li, M. Q.; Song, B. A. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 829 (in Chinese). (杨家强, 胡月维, 谷晴, 李明刚, 李明强, 宋宝安, 有机化学, **2014**, *34*, 829.)
- [3] Zhang, C. F.; Wu, X. G.; Li, Y.; Liang, C. R.; Che, Y. Z.; Gu, L. L.; Ren, J.; H. K.; Sun, X. Q.; Yang, C. H.; Cheng, X. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1309 (in Chinese). (张成芳, 吴小刚, 李燕, 梁翠荣, 车亦舟, 顾玲玲, 任杰, 胡昆, 孙小强, Ching-Hong Yang, 陈新, 有机化学, **2013**, *33*, 1309.)
- [4] Zhang, L.; Huang, L. Y. *Chin. J. Nosocomiol.* **2008**, *18*, 897 (in Chinese). (张玲, 黄留玉, 中华医院感染学杂志, **2008**, *18*, 897.)
- [5] Karen, B.; Michael, J. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1528.
- [6] *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 836.
- [7] Laxminarayan, R.; Powers, J. H. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 727.
- [8] Wang, J. Y.; Zheng, W. *Chin. J. Antibiotic.* **2011**, *36*(3) 165 (in Chinese). (王娇艳, 郑卫, 中国抗生素杂志, **2011**, *36*(3) 165.)
- [9] Aminake, M. N.; Mahajan, A.; Kumar, V.; Hans, R.; Wiesner, L.; Taylor, D.; de Kock, C.; Grobler, A.; Smith, P. J.; Kirschner, M.; Rethwilm, A.; Pradel, G.; Chibale, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5277.
- [10] Aziz, M. A.; Park, S. E.; Rahma, G. E. D. A. A. A.; Sayed, M. A.; Kwon, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 427.
- [11] Plech, T.; Wujec, M.; Kosikowska, U.; Malm, A.; Rajtar, B.; Dacewicz, M. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *60*, 128.
- [12] Garudachari, B.; Isloor, A. M.; Satyanarayana, M. N.; Fun, H. K.; Pavithra, N.; Kulal, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 422.
- [13] Chai, Y.; Wan, Z. L.; Wang, B.; Guo, H. Y.; Liu, M. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4063.
- [14] Parcej, D.; Tampé, R. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 572.
- [15] Kumar, S.; Varela, M. F. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 4484.
- [16] Poirel, L.; Bonnin, R. A.; Nordmann, P. *IUBMB Life* **2011**, *63*, 1061.
- [17] Liu, G. Z.; Xu, H. W.; Sun, K.; Wang, J.; Liu, H. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 201 (in Chinese). (徐海伟, 孙凯, 王君, 刘宏民, 有机化学, **2008**, *28*, 201.)
- [18] Xiao, Z. P.; Ouyang, H.; Wang, X. D.; Lv, P. C.; Huang, Z. J.; Yu, S. R.; Yi, T. F.; Yang, Y. L.; Zhu, H. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3884.
- [19] Xiao, Z. P.; Ma, T. W.; Liao, M. L.; Feng, Y. T.; Peng, X. C.; Li, J. L.; Li, Z. P.; Wu, Y.; Luo, Q.; Deng, Y.; Liang, X.; Zhu, H. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4904.
- [20] Xiao, Z. P.; He, X. B.; Peng, Z. Y.; Xiong, T. J.; Peng, J.; Chen, L. H.; Zhu, H. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1571.
- [21] Fostel, M. J.; Montgomery, D. A.; Shen, L. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2131.
- [22] Sugar, A. M.; Liu, X. P.; Chen, R. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2518.
- [23] Srinivasan, S.; Beema, S. R. M.; Nithyanand, P.; Manisankar, P.; Pandian, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 6101.
- [24] Shen, L. L.; Baranowski, J.; Fostel, J.; Montgomery, D. A.; Lartey, P. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2778.
- [25] Park, S. G.; Schimmel, P.; Kim, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11043.
- [26] Van de Vijver, P.; Vondenhoff, G. H.; Kazako, T. S.; Semenova, E.; Kuznedelov, K.; Metlitskaya, A.; Van Aerschot, A.; Severinov, K. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 6273.

(Li, L.; Lu, Z.)