

寨卡病毒抑制剂的虚拟筛选、设计、合成及生物活性研究

李彦忠 齐思佳 徐彦浩 夏成才 段桂运*

(泰山医学院药学院 泰安 271000)

摘要 由甲基转移酶和 RNA 聚合酶组成的多功能蛋白(NS5)是寨卡病毒复制过程中起主要作用的蛋白组分,其甲基转移酶(5M5B)部分是病毒复制和宿主固有免疫应答的中心参与者,因此被作为潜在抗寨卡病毒药物开发的首选靶标蛋白。将 5M5B 作为受体,利用其已知的结合位点与 200 多万个小分子化合物进行虚拟筛选,得到抗寨卡病毒的先导化合物 **2a**,并对该先导化合物进行结构优化、改造、活性预测、化学合成、药理活性研究。使用 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 对所有合成的化合物进行了表征,并进行了体外活性测试。结果表明化合物 **3a** [$\text{IC}_{50}=(7.69\pm0.36)\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]的体外活性优于广谱抗病毒药利巴韦林活性 [$\text{IC}_{50}=(8.15\pm0.42)\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$],本研究的方法与结果对寨卡病毒抑制剂的结构设计研究具有重要的指导作用。

关键词 寨卡病毒抑制剂; 虚拟筛选; 构效关系; 结构改造

Virtual Screening, Design, Synthesis and Biological Activity of Zika Virus Inhibitors

Li, Yanzhong Qi, Sijia Xu, Yanhao Xia, Chengcai Duan, Guiyun*

(School of Pharmacy, Taishan Medical University, Taian 271000)

Abstract NS5 is a protein component which plays a main role in replication of Zika virus, and its component part-methyltransferase (5M5B) is the central participants of virus replication and host innate immune response. So it is used as the preferred protein of potential antiviral drugs development. Using 5M5B as receptors and using its binding sites to screen with over 2 million small molecule compounds, the leading compounds of anti-Zika virus were obtained. The structural optimization, activity prediction, chemical synthesis and pharmacological activity of the leading compound were studied. All the synthesized compounds were characterized by ^1H NMR and ^{13}C NMR. The antiviral activity of compound **3a** is better than that of ribavirin ($\text{IC}_{50}=(7.69\pm0.36)\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for **3a** vs $\text{IC}_{50}=(8.15\pm0.42)\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for ribavirin).

Keywords ZIKV inhibitor; virtual screening; structure-activity relationship (SAR); structural transformation

自 1947 以来,寨卡病毒已有 70 多年的发展历史,但至今尚无特效药^[1~3]。由于早期较轻的临床表现,该病毒被人们渐渐忽视。直到 2016 年的巴西奥运会期间寨卡病毒的大规模爆发,该病毒再次引起人们的关注^[4,5]。寨卡病毒可通过血睾屏障导致男性生殖等问题^[6~8]。寨卡病毒主要传播途径为蚊虫传播,性传播和母婴传播^[9~11]。由于其广泛的传播途径以及对婴儿的危害,寨卡病毒引起了人们的恐慌^[12~14]。更加引人关注的是:被寨卡病毒感染的孕妇可导致胎儿问题,如流产、死产^[15]、小头畸形、胎儿和新生儿先天性畸形和视网膜病变等症状^[16,17]。经过几十年的发展,寨卡病毒正在潜

移默化地危害着人类的健康,且目前还没有特效药^[18]。因此,寨卡病毒特效药物的研发已迫在眉睫。

寨卡病毒属黄病毒属、黄病毒科^[19,20],是一种单链核糖核酸(RNA)虫媒病毒,并具有十二面体结构^[21,22]。由甲基转移酶和 RNA 聚合酶组成的多功能蛋白(NS5)是一种在寨卡病毒复制过程中起重要作用的蛋白组分,它由甲基转移酶(5M5B)和 C-末端 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RDRP)组成^[23]。5M5B 在参与病毒复制和宿主先天免疫应答过程中起重要作用,因此它被用作潜在抗病毒药物开发的靶蛋白^[23]。目前 5M5B 与 S-腺苷甲硫氨酸的复合体已经被报道,并确定了 5M5B 的结合位点^[24,25]。

* Corresponding author. E-mail: Duanguiyun@126.com

Received July 28, 2018; revised October 9, 2018; published online October 26, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81671395).

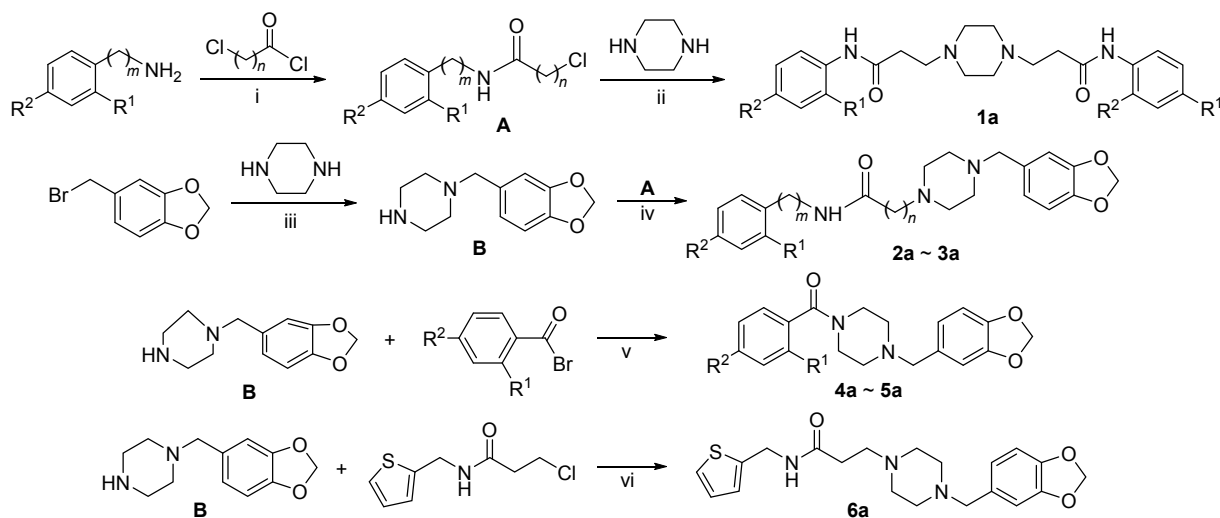
国家自然科学基金(No. 81671395)资助项目。

5M5B 位点的氨基酸序列是非常保守的, 这给寨卡病毒抑制剂的研 究带来了方便^[26,27]. 虽然许多药物被用作治疗寨卡病毒病, 如细胞因子(IFN- α , IFN- β 和 IFN- γ)^[28], 抗体, 多肽, 小分子化合物^[29,30], 索非布韦, 溴隐亭^[31] 和其他药物如氯硝柳胺、硼替佐米、麦考酚酸等^[31]. 但是这些药物的疗效并不令人满意, 并且目前没有针对寨卡病毒的特异性药物. 值得庆幸的是, 研究人员已经开发出了疫苗研发中心研发的一种抗寨卡病毒疫苗代号为 VRC523, 它显示了很强的中和抗体和 T 细胞应答能力, 目前正在进行 II 期临床试验^[32].

传统的药物研发将耗费大量的人力、物力和财力, 计算机辅助药物设计(CADD)将克服这些缺点^[32], 大大提高工作效率. 本实验采用 CADD 技术通过虚拟筛选

模块得到抗寨卡病毒的先导化合物. 最终, 我们根据先导化合物的结构进行改造, 合成了 6 个化合物并对其进行了药理测试. 目标化合物 **1a**~**6a** 的合成路线见 Scheme 1.

首先, 我们准备了受体蛋白与配体小分子, 如图 1 所示. 其次, 通过受体和配体的分子刚性对接, 我们得到了 5000 个具有高得分的化合物, 再对 5000 个小分子进行更加准确的全柔性对接, 最终筛选出 60 个打分较高的化合物. 第三步通过药物设计软件 Discovery Studio2017R2 预测了 60 个分子的药物的吸收、分配、代谢、排泄和毒性(ADMET)性质, 选择了其中一个化合物作为先导化合物. 然后, 通过对先导化合物的结构修饰改造设计了 50 个新化合物. 最后对 50 种新化合物的 ADM-



图式 1 目标化合物 **1a**~**6a** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic routes of desired products **1a**~**6a**

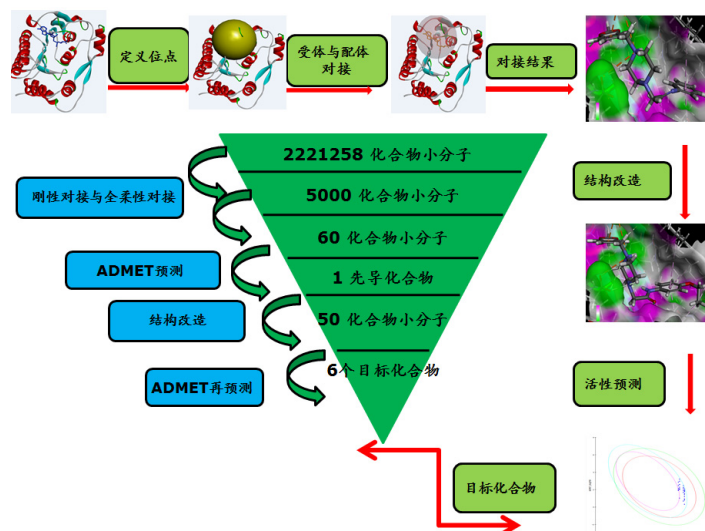


图 1 虚拟筛选过程
Figure 1 Virtual screening process

ET 性质进行了再预测, 最终确定并合成了 6 个目标化合物。

受体蛋白 5M5B 与先导化合物 **2a**(图 2)的三维对接图见图 3a, 从图 3a 可以看出, 先导化合物在受体蛋白位点空腔中未完全占据, 仍然有延伸片段的可能性。根据位点和配体的相对位置和侧链的结构, 合理地改变链的长度或增加片段, 以实现先导化合物的结构优化。受体蛋白 5M5B 与先导化合物 **2a** 的二维对接图见图 3b。从图 3b 可以看到先导化合物与受体蛋白氨基酸的结合情况。在理论上解释了寨卡病毒的抑制剂的机理。先导化合物与受体蛋白形成的作用键如下: 受体蛋白的氨基酸 GLY (A: 92)、LYS (A: 111)、GLY (A: 87)、CYS (A: 88)与先导化合物形成氢键, 氨基酸 VAL (A: 138)、ILE (A: 153)、ASP (A: 152)与先导化合物形成 π 烷基键。为获得更好的抗寨卡病毒的抑制剂, 我们可以根据受体蛋白与先导化合物的空间结构与成键关系合理地改造先导化合物化合物^[35,36]。

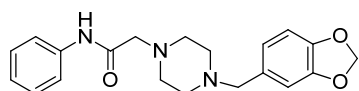


图 2 先导化合物 **2a**
Figure 2 Lead compound **2a**

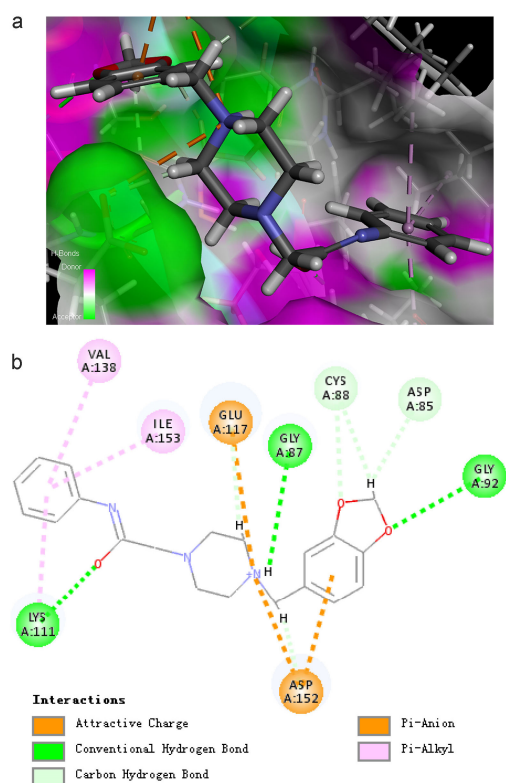


图 3 受体与先导化合物对接图

Figure 3 Docking of receptor protein and leading compound
(A) 3D docking, (B) 2D docking

受体蛋白 5M5B 与目标化合物 **3a** 的三维对接图见

图 4a, 受体蛋白 5M5B 与目标化合物 **3a** 的二维对接图见图 4b。对比图 3b 和图 4b 的对接结果, 发现结构优化的目标化合物 **3a** 在受体蛋白空腔中占据更多的空间, 并且由于链长和官能团的变化, **3a** 和受体蛋白的结合力也得到加强, 打分更高。由于乙氧基的增加, **3a** 与受体蛋白多形成了一个氢键 VAL (A: 138)和两个 π 烷基键 PHE (A: 139), LYS (A: 111), 使结合更加牢固。我们对先导化合物的结构不断地优化和改造, 最终确定并合成了 6 个目标化合物, 并进行了初步的体外活性测试, 结果符合预期。

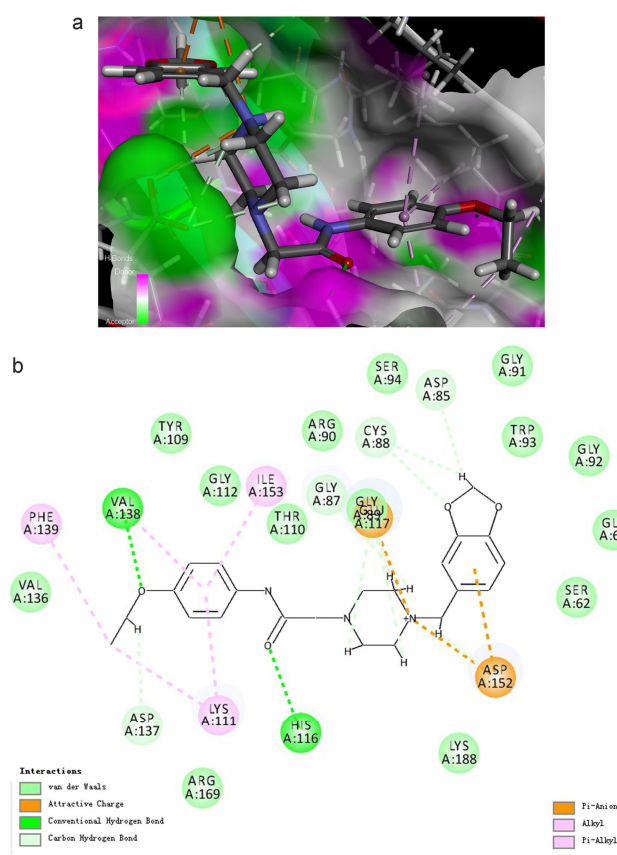


图 4 受体蛋白与结构优化后的目标化合物 **3a** 对接图

Figure 4 Docking of receptor protein and target compound **3a**
(A) 3D docking, (B) 2D docking

先导化合物 **2a** 和优化目标化合物 **3a** 与受体蛋白结合的叠合图见图 5。图 5 中红色的为先导化合物 **2a**, 蓝色化合物为经结构优化的化合物 **3a**。由图 5 可以看出, 化合物 **3a** 较先导化合物 **2a** 多一个官能团乙氧基, 且由于乙氧基的增加, **3a** 与受体蛋白多形成了一个氢键 VAL (A: 138)和两个 π 烷基键 PHE (A: 139), LYS (A: 111), 使位点的空腔更加充实。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

氯乙酰氯与苯胺经过酰化反应合成中间体 **A**, 再经

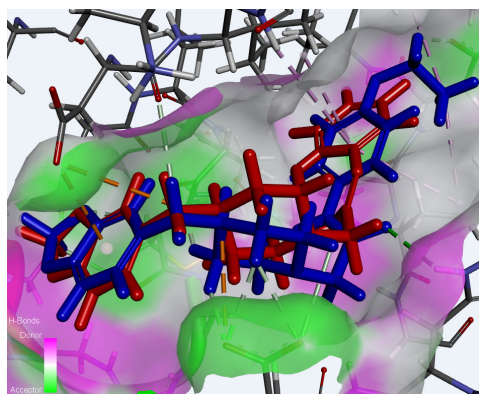


图5 先导化合物 **2a** 和优化目标化合物 **3a** 与受体蛋白结合的叠合图

Figure 5 Superimposed figure of lead compound **2a** and target compound **3a** binding to receptor protein

过取代反应制得目标化合物 **1a**, 产率 76%; 胡椒环溴化苄与无水哌嗪单取代反应制得中间体 **B**, 再与中间体 **A** 发生取代反应得到目标化合物 **2a~3a**, 产率为 80%, 76%; 中间体 **B** 与酰溴反生取代反应制得目标化合物 **4a~5a**, 产率为 70%, 71%; 中间体 **B** 与 3-氯-*N*-(噻吩-2-基甲基)丙酰胺反应得目标化合物 **6a**, 产率为 65%。

1.2 体外活性测试

化合物 **1a~6a** 与对照抗病毒广谱药利巴韦林(图6)对寨卡病毒的体外抑制活性测试结果见表1。由表1的活性数据分析可以看出, 通过对先导化合物的结构改造, 化合物 **1a** 和 **3a** 对寨卡病毒的抑制活性较 2-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-甲基)哌嗪-1-基)-*N*-苯基乙酰胺有所增强, 而化合物 **4a**, **5a**, **6a** 抑制活性有所下降。进一步分析发现, 当链的长度一样时, **3a** 较先导化合物 **2a** 多了取代基乙氧基, **3a** 抑制寨卡病毒的活性要稍好于 **2a**, 实验结果与计算结果相一致。当链增长, 同时增加甲基时, **1a** 的体外活性较先导化合物 **2a** 也有所增强, 但较 **3a** 的活性差。而当链减少, 同时增加硝基(**4a**)、氯(**5a**)等官能团时, 体外活性急剧下降。最后当增加链长, 并将苯基换成噻吩时, 活性较 **4a**, **5a** 有所好转, 但较化合物 **1a**, **2a**, **3a** 的活性差。综上所述, 当链长与先导化合物相同且取代基为甲氧基(**1a**)或乙氧基(**3a**)时, 活性较好。当链减少或增加硝基(**4a**)、氯基(**5a**)、噻吩(**6a**)官能团时活性较先导化合物差。值得说明的是化合物 **3a** 的体外活性较抗病毒广谱药利巴韦林稍好。

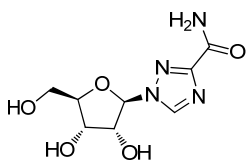


图6 利巴韦林结构式
Figure 6 Structure of ribavirin

表1 目标化合物 **1a~6a** 的结构式及 IC_{50} 值

Table 1 Structures of **1a~6a** and their IC_{50} data

化合物	R ¹	R ²	n ₁	n ₂	IC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)
Ribavirin	—	—	—	—	8.15 ± 0.42
1a	OCH ₃	H	0	2	8.98 ± 1.52
2a	H	H	0	1	10.45 ± 0.46
3a	H	OCH ₂ CH ₃	0	1	7.69 ± 0.36
4a	H	NO ₂	0	0	41.13 ± 5.23
5a	Cl	H	0	0	38.25 ± 3.43
6a		H	1	2	17.51 ± 1.43

2 结论

综上所述, 本研究试图通过计算机药物辅助设计(CADD)和化学合成的方法寻找特异性抗寨卡病毒药物。通过药物筛选软件, 我们可观察到小分子化合物与受体蛋白 5M5B 的氨基酸 GIU (A: 117) ASP (A: 152) VAL (A: 138) PHE (A: 139) LYS (A: 111) GLY (A: 111) 特异性结合。在理论指导的基础上, 今后开发抗寨卡病毒特异性药物时, 根据官能团与上述氨基酸相结合情况, 可设计出更具针对性的化合物。在节省人力、物力、财力的基础上, 找到更加有效的抗寨卡病毒药物。

初步药理显示, 化合物 **1a** ($8.98 \pm 1.52 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), **2a** ($10.45 \pm 0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), **3a** ($7.69 \pm 0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抗寨卡病毒的抑制活性与抗病毒广谱药利巴韦林的活性基本持平, 甚至更好, 满足我们的实验预期。结果证明, 我们的设计思路是正确的。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱在 Bruker 皇冠 400 (400 MHz) 光谱仪上测量, DMSO-*d*₆ 为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标; MS 谱使用 5800 矩阵辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(AB SICEX, U.S.A); 红外光谱在 Tensor II 光谱仪(Bruker, 德国)利用 ATR 红外采样技术测定, 光谱范围在 4000~400 cm⁻¹。所有溶剂和试剂购买自供应商(阿拉丁), 并直接用于实验。使用硅胶 60 预涂覆铝板(厚度 0.20 mm)从阿拉丁通过 UV 光(254 nm)的可视化进行薄层色谱(TLC)。

3.2 化合物合成

3.2.1 中间体 A 的合成

将氯代酰氯类化合物(1 mmol)缓慢滴加到苯胺衍生物(1 mmol)中, 在干燥的四氢呋喃溶液中加入三乙胺(5 滴), 低温反应 2 h。反应完成后, 减压除去溶剂, 在硅胶

柱上进行纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=20:1$]得中间体氯代苯酰胺类化合物 **A**, 产率 85%.

3-氯-*N*-(2-甲氧基苯基)丙酰胺: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.36 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.04 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 3.88~3.84 (m, 3H), 2.83 (t, $J=6.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 167.55, 147.86, 127.30, 124.07, 121.00, 119.90, 110.02, 55.72, 40.66, 39.96.

2-氯-*N*-苯基乙酰胺: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H), 7.54 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 4.17 (s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.97, 136.70, 129.17, 125.30, 120.21, 42.95.

2-氯-*N*-(4-乙氧基苯基)乙酰胺: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.19 (s, 1H), 7.43 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 4.01 (q, $J=6.9$ Hz, 2H), 1.41 (t, $J=6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.76, 156.45, 129.55, 122.09, 114.82, 63.70, 42.90, 14.85.

3-氯-*N*-(噻吩-2-基甲基)丙酰胺: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.21 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.60 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J=6.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 169.40, 140.58, 126.95, 126.15, 125.32, 40.10, 39.34, 38.40.

3.2.2 中间体 **B** 的合成

将溴代的胡椒环化合物(1 mmol)与无水哌嗪(1 mmol)在无水四氢呋喃溶液中混合, 加入三乙胺(5 滴)回流反应 4 h, TLC 跟踪反应, 直至反应结束, 经硅胶柱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=10:1$]得 1-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基甲基)哌嗪(**B**), 产率 60%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.85 (s, 1H), 6.74 (s, 2H), 5.93 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.40 (s, 2H), 2.90 (s, 2H), 2.42 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 147.60, 146.60, 131.71, 122.32, 109.54, 107.85, 100.90, 63.21, 53.54, 45.46.

3.2.3 化合物 **1a** 的合成

将中间体氯代苯酰胺类化合物 **A** (1 mmol)和三乙胺(5 滴)、哌嗪(0.5 mmol)在干燥的四氢呋喃(THF)(30 mL)中混合, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌回流反应, 薄层色谱(TLC)跟踪分析直到反应完成(通常在 4 h 内反应完成). 反应混合物在减压下蒸出溶剂, 在硅胶柱上纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=20:1$]得到 3,3'-(哌嗪-1,4-二)双(*N*-(2-甲氧基苯基)丙酰胺)(**1a**), 产率为 76%. 白色固体, m.p. 197.3~198.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.27 (s, 2H), 8.48~8.35 (m, 2H), 7.09~7.02 (m, 2H), 6.97 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.90 (s,

6H), 2.98~2.71 (m, 8H), 2.71~2.46 (m, 8H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.56, 148.43, 127.91, 123.64, 121.00, 120.92, 110.04, 55.53, 53.98, 52.44, 33.64; IR ν_{max} : 3321 (NH), 2810 (CH_2), 1668 (C=O), 1598 (C=C), 1540 (C=C), 1489 (CH_2), 1458 (CH_2), 1231 (C—N), 1115 (C—N), 1050 (C—O—C), 1027 (C—O—C) cm^{-1} ; HRMS (ESI+) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 441.2497, found 441.2496.

3.2.4 化合物 **2a~3a** 的合成

氯代苯酰胺类化合物 **A** (1 mmol)与中间体胡椒哌嗪 **B** (1 mmol)在无水四氢呋喃溶液中混合加入三乙胺(5 滴)回流反应, TLC 跟踪反应, 直至反应完全(大约反应 4 h). 硅胶柱洗脱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=10:1$]得纯品 **2a~3a**, 产率分别为 80%与 76%.

2-(4-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)哌嗪-1-基)-*N*-苯基乙酰胺(**2a**): 白色固体, 收率 80%. m.p. 113.8~115 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.15 (s, 1H), 7.57 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.11 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.75 (s, 2H), 5.95 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.13 (s, 2H), 2.64 (s, 4H), 2.52 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 168.40, 147.67, 146.66, 137.58, 131.79, 129.02, 124.16, 122.15, 119.39, 109.39, 107.88, 100.92, 62.63, 61.92, 53.51, 53.10; IR ν_{max} : 3321 (NH), 2809 (CH_2), 1673 (C=O), 1518 (C=C), 1234 (C—N), 1040 (C—O—C), 932 (C—O—C) cm^{-1} ; HRMS (ESI+) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354.4293, found 354.4291.

2-(4-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)哌嗪-1-基)-*N*-(4-乙氧基苯基)乙酰胺(**3a**): 白色固体, 收率 76%. m.p. 197.3~198.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.27 (s, 2H), 8.48~8.35 (m, 2H), 7.09~7.02 (m, 2H), 6.97 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.90 (s, 6H), 2.98~2.71 (m, 8H), 2.71~2.46 (m, 8H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.56, 148.43, 127.91, 123.64, 121.00, 120.92, 110.04, 55.53, 53.98, 52.44, 33.64; IR ν_{max} : 3321 (NH), 2810 (CH_2), 1668 (C=O), 1598 (C=C), 1540 (C=C), 1489 (CH_2), 1458 (CH_2), 1231 (C—N), 1115 (C—N), 1050 (C—O—C), 1027 (C—O—C) cm^{-1} ; HRMS (ESI+) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 441.2497, found 441.2496.

3.2.5 化合物 **4a~5a** 的合成

苯酰溴类化合物(1 mmol)缓慢滴加到胡椒哌嗪 **B** (1 mmol)的干燥四氢呋喃溶液中, 加入三乙胺(5 滴)反应 2 h, 经硅胶柱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=10:1$]得纯品化合物 **4a~5a**, 产率分别为 70%与 71%.

(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-甲基)哌嗪-1-基)-(4-硝基苯基)甲酮(**4a**): 白色固体, 收率 70%. m.p. 138.2~139.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.28 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.79~6.69 (m, 2H), 5.96 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 2.54 (s, 2H), 2.39 (s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 167.85, 148.26, 147.73, 146.83, 141.96, 131.07, 128.06, 123.89, 122.24, 109.32, 107.95, 100.99, 62.48, 52.99, 47.60; IR ν_{max} : 1626 (C=O), 1516 (NO_2), 1489 (CH_2), 1439 (CH_2), 1287 (C—N), 1252 (C—N), 1036 (C—O—C), 939 (C—O—C) cm^{-1} ; HRMS (ESI+) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 370.1398, found 370.1396.

(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-甲基)哌嗪-1-基)-(2-氯苯基)甲酮(**5a**): 白色固体, 收率 71%. m.p. 240~241.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.52~7.35 (m, 4H), 7.27 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J=13.0$, 8.2 Hz, 1H), 6.90 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.28 (d, $J=19.8$ Hz, 2H), 3.83~3.39 (m, 4H), 3.40~2.88 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.09, 148.71, 147.91, 134.95, 131.16, 130.56, 129.73, 128.42, 127.90, 125.94, 122.80, 111.73, 108.61, 101.78, 59.28, 50.30, 43.47; IR ν_{max} : 1639 (C=O), 1494 (C=C), 1432 (CH_2), 1292 (C—N), 1253 (C—N), 1033 (C—O—C), 958 (C—O—C), 742 (C—Cl) cm^{-1} ; HRMS (ESI+) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 359.1157, found 359.1155.

3.2.6 化合物 **6a** 的合成

氯代的噻吩酰胺化合物(1 mmol)与胡椒哌嗪 **B** (1 mmol)在干燥的四氢呋喃的溶液中混合, 加入三乙胺(5 滴), 70 °C回流反应 4 h, 经硅胶柱纯化[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=10:1]得 3-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-甲基)哌嗪-1-基)- N -(2-噻吩基甲基)丙酰胺(**6a**), 产率 65%, 白色固体, 109.4~112.1 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.08 (s, 1H), 7.25~7.21 (m, 1H), 6.97 (d, $J=3.6$ Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.74 (t, $J=8.7$ Hz, 2H), 5.95 (s, 2H), 4.59 (d, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.64~2.57 (m, 4H), 2.46~2.23 (m, 8H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 172.09, 147.59, 146.60, 141.27, 131.67, 126.87, 125.67, 124.75, 122.20, 109.44, 107.85, 100.90, 62.58, 53.52, 52.68, 52.19, 37.93, 31.67; IR ν_{max} : 13321 (NH), 2801 (CH_2), 1646 (C=O), 1542 (C=C), 1241 (C—N), 1035 (C—O—C), 1008 (C—S—C), 931 (C—O—C) cm^{-1} ; HRMS (ESI+) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 392.2036, found 392.2034.

3.3 体外活性测试

采用 CCK8 法用待测化合物 **1a**~**6a** 进行了对寨卡病毒(SMGC-1)的体外活性测试, 利用广谱抗病毒药利巴韦林作为阳性对照. 待测化合物对寨卡病毒的抑制强度以半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})来表示

辅助材料(Supporting Information) 本文合成的所有最终产物和在本文讨论中涉及到的部分中间体的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Miner, J. J.; Diamond, M. S. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 134.
- [2] Petersen, L. R.; Jamieson, D. J.; Powers, A. M. *New Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1552.
- [3] Ye, Q.; Liu, Z. Y.; Han, J. F.; Jiang, T.; Li, X. F.; Qin, C. F. *Infect., Genet. Evol.* **2016**, *43*, 43.
- [4] Emanuele, N.; Pisapia, R.; Angela, C.; Fusco, F. M.; Stefania, C.; Paola, S.; Vincenzo, P. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 669.
- [5] Armstrong, N.; Wang, H. H.; Tang, Q. Y. *World J. Virol.* **2017**, *6*, 1.
- [6] Li, F.; Wang, P. R.; Qu, L. B.; Yi, C. H.; Zhang, F. C.; Tang, X. P.; Zhang, L. G.; Chen, L. *Emerging Microbes Infect.* **2017**, *6*, e16.
- [7] Richard, A. S.; Shim, B. S.; Kwon, Y. C.; Zhang, R.; Otsuka, Y.; Schmitt, K.; Berri, F.; Diamond, M. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 2024.
- [8] Wells, M. F.; Max, S. R.; Ole, W.; Ho, D. J.; Kathleen, A. W.; Robert, J. I.; Hill, E. J.; Kane, L. T.; Ye, C.; Kaykas, A.; Eqqan, K. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 703.
- [9] Matthew, T. A.; Leda, B.; Cox, B.; Garcia-Blanco, M. A.; Friedrich, T. C.; Golos, T. G.; Griffin, D. E.; Haddow, A. D.; Kallas, E. G.; Kitron, U.; Lecuit, M.; Magnani, D. M.; Marrs, C.; Mercer, N.; McSweeney, E.; Ng, L. F. P.; O'Connor, D. H.; Osorio, J. E.; Ribeiro, G. S.; Ricciardi, M.; Rossi, S. L.; Saade, G.; Schinazi, R. F.; Schott-Lerner, G. O.; Shan, C.; Shi, P. Y.; Watkins, D. I.; Vasilakis, N.; Weaver, S. C. *Antiviral Res.* **2017**, *144*, 223.
- [10] Hassan, H.; Kamal, N.; Faheem, M. *Infect. Disord.: Drug Targets* **2017**, *17*, 3.
- [11] Franca, G.; Milo, P.; Christoph, H.; Patricia, S. *Travel Med. Infect. Dis.* **2016**, *14*, 313.
- [12] Mustafa, M. S.; Brig, R. R. *Med. J., Armed Forces India* **2018**, *74*, 61.
- [13] Michael, W. *Nature* **2017**, *546*, 355.
- [14] Friedrich, M. J. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **2016**, *316*, 1956.
- [15] Cao, R. Y.; Xu, Y. F.; Zhang, T. H.; Yang, J. J.; Yuan, Y.; Shi, Y. *Open Forum Infect. Dis.* **2017**, *4*, ofx009/1.
- [16] Kellie, A. J.; Laura, J. Y.; Patrick, W. W.; Sarah, L.; Anita, J. H. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 141.
- [17] Aft, A.; Nik, I.; Ana, F.; Shahn, A. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *91*, 1152.
- [18] Bhattacharjee, A. K.; Basak, S. C. *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* **2016**, *12*, 251.
- [19] Lin, H. H.; Yip, B. S.; Huang, L. M.; Wu, S. C. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 47.
- [20] Xin, Q. L.; Deng, C. L.; Chen, X.; Wang, J.; Wang, S.-B.; Wang, W.; Deng, F.; Zhang, B.; Xiao, G. F.; Zhang, L. K. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00554-17/1.
- [21] Irigoyen, N.; Meredith, L. W.; Brierley, I.; Firth, A. E. *BioRxiv, Microbiol.* **2017**, 1.
- [22] Cristina, J.; Fajardo, A.; Sonora, M. *Virus Res.* **2016**, *223*, 147.

- [23] Wang, B. X.; Thurmond, S.; Hai, R.; Song, J. K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, Ahead of Print.
- [24] Issur, M.; Geiss, B. J.; Bougie, I.; Picard-Jean, F.; Despins, S.; Mayette, J.; Hobdey, S. E.; Bisailon, M. *Ribonucleic Acids* **2009**, *15*, 2340.
- [25] Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Bernard, K. A.; Shi, P. Y.; Li, H. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3891.
- [26] Keasey, S. L.; Pugh, C. L.; Jensen, S. M. R.; Smith, J. L.; Durbin, A. P.; Dudley, D. M.; O'Connor, D. H.; Ulrich, R. G. *Clin. Vaccine Immunol.* **2017**, *24*, e00036-17/1.
- [27] Duan, W. Q.; Song, H.; Wang, H.-Y.; Chai, Y.; Su, C.; Qi, J.-X.; Shi, Y.; Gao, G. F. *EMBO J.* **2017**, *36*, 919.
- [28] Contreras, D. J. *Visualized Exp.* **2016**, *114*, e54767/1.
- [29] Eyer, L.; Nencka, R.; Huvarova, I.; Alves, M. J.; Gould, E. A. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, 707.
- [30] Lee, H.; Ren, J. H.; Nocadello, S.; Rice, A. J.; Ojeda, I.; Light, S.; Vargas, J.; Nagarathnam, D.; Anderson, W. F.; Johnson, M. *Antiviral Res.* **2017**, *139*, 49.
- [31] Li, Z.; Brecher, M.; Deng, Y. Q.; Zhang, J.; Sakamuru, S.; Liu, B.; Huang, R. L.; Allen, C. A.; Jones, S. A.; Chen, H.; Zhang, N. N.; Tian, M.; Gao, F. S.; Lin, Q. S.; Banavali, N.; Zhou, J.; Boles, N.; Xia, M. H. G.; Kramer, L. D.; Qin, C. F.; Li, H. M. *Cell Res.* **2017**, *27*, 1046.
- [32] Gaudinski, M. R.; Houser, K. V.; Morabito, K. M.; Hu, Z.; Yamshchikov, G.; Rothwell, R. S.; Berkowitz, N.; Mendoza, F.; Saunders, J. G.; Novik, L.; Hendel, C. S.; Holman, L. A.; Gordon, I. J.; Cox, J. H.; Edupuganti, S.; McArthur, M. A.; Roupael, N. G.; Lyke, K. E.; Cummings, G. E.; Sitar, S.; Bailer, R. T.; Foreman, B. M.; Burgomaster, K.; Pelc, R. S.; Gordon, D. N.; DeMaso, C. R.; Dowd, K. A.; Laurencot, C.; Schwartz, R. M.; Mascola, J. R.; Graham, B. S.; Pierson, T. C.; Ledgerwood, J. E.; Chen, G. L. *Lancet* (London, England) **2018**, *391*, 552.
- [33] Yu, W.; Mac, K. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, United States, **2017**, *1520*(Antibiotics), 85.
- [34] Singh, A.; Jana, N. K. *Comput. Biol. Chem.* **2017**, *71*, 144.
- [35] Xiong, L.; Li, H.; Jiang, L. N.; Ge, J. M.; Yang, W. C.; Zhu, X. L.; Yang, G. F. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1021.
- [36] Zhu, X. L.; Xiong, L.; Li, H.; Song, X. Y.; Liu, J. J.; Yang, G. F. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1512.

(Li, L.; Fan, Y.)