

N-环化小檗碱衍生物合成及抗SARS-CoV-2假病毒活性研究

范田运¹, 吴佳静², 李迎红¹, 黄维金², 郭茜茜¹, 赵丽萍¹, 汪燕翔¹, 王佑春², 宋丹青^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京市抗感染重点实验室, 北京 100050;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 目前临床尚无治疗 COVID-19 的特效药物。传统天然药物小檗碱 (BBR) 具有中度抗 SARS-CoV-2 假病毒活性。本研究以 BBR 为先导物, 设计合成了 18 个全新骨架 N-环化 BBR 衍生物, 评价了它们体外抗 SARS-CoV-2 假病毒活性。构效关系表明 9-位引入适当的杂环利于活性提高。其中, 化合物 **3m** 的 EC_{50} 为 $1.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SI 为 22.2, 明显优于 BBR。时间添加 (time-of-addition) 实验结果显示, 化合物 **3m** 作用于病毒入侵宿主细胞的多个阶段, 包括进入、吸附及膜融合过程, 提示此类化合物通过多靶点的协同作用抑制 SARS-CoV-2。研究结果为寻找抗 SARS-CoV-2 候选物提供了一类全新的先导物。

关键词: N-环化小檗碱; SARS-CoV-2; 构效关系; 时间添加实验

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)06-1663-07

Synthesis and evaluation of N-cycloberberine derivatives as a novel class of anti-SARS-CoV-2 pseudovirus agents

FAN Tian-yun¹, WU Jia-jing², LI Ying-hong¹, HUANG Wei-jin², GUO Xi-xi¹, ZHAO Li-ping¹,
WANG Yan-xiang¹, WANG You-chun², SONG Dan-qing^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: There is no specific drug against COVID-19, but berberine (BBR) has moderate anti-SARS-CoV-2 pseudovirus activity. Taking BBR as the lead, 18 novel N-cycloberberine derivatives were synthesized and evaluated for their anti-SARS-CoV-2 pseudovirus activities *in vitro*. Structure-activity relationship analysis revealed that introducing an appropriate heterocyclic group at position 9 might be beneficial for potency. Among the tested compounds, compound **3m** showed the most potent activity against SARS-CoV-2, with EC_{50} value of $1.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and SI value of 22.2, much better than that of BBR. Additional experiment indicated that **3m** had inhibitory activity on multiple processes in viral invasion, including adsorption and membrane fusion, suggesting a multi-target synergistic mechanism of action. These results provide a novel family of lead compounds for the discovery of anti-SARS-CoV-2 candidates.

Key words: N-cycloberberine; SARS-CoV-2; structure-activity relationship; time-of-addition

收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-03-10.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2020-I2M-2-010); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2019-I2M-1-005).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165268,

E-mail: songdanqingsdq@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0203

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 具有高传染性和高隐蔽性传播特征, 其引发的疾病 (COVID-19) 在 2019 年底爆发, 随即以惊人的速度席卷到全球 180 多个国家/地区, 导致全球性大流行^[1,2]。近期出现的 COVID-19 病毒新变种传染性更强, 使疫情防控更加复杂化和具有挑战性^[3]。虽然 RNA 聚合

酶抑制剂瑞德西韦 (remdesivir) 批准上市用于重症患者的治疗, 但其治疗 COVID-19 的安全性和有效性尚待进一步验证^[4-6]。因此, 寻找抗 SARS-CoV-2 候选物是全球性公益需求, 更是为应对我国突发性传染性疾病的防控提供充足的战略物资储备, 意义重大。

天然产物历来是抗病毒药物发现的重要源泉, 对具有广谱抗病毒活性的天然产物进行抗 SARS-CoV-2 活性筛选, 是发现全新抗 SARS-CoV-2 候选物的重要策略^[7,8]。小檗碱 (berberine, BBR) 是中药黄连的有效成分, 具有多种抗病毒活性, 如抗柯萨奇病毒、抗丙肝病毒、抗人巨细胞病毒、抗甲病毒及抗甲型流感病毒等^[9-16]。基于此, 利用已构建的 SARS-CoV-2 假病毒模型对我国传统天然药物小檗碱 (BBR) 及其 4 个主要代谢产物 (图 1), 包括 9-羟基小檗碱 (M1)、10-羟基小檗碱 (M2)、2,3-二羟基小檗碱 (M3) 和 3-羟基小檗碱 (M4) 进行了活性筛选^[17]。研究发现仅 BBR 显示中度抗 SARS-CoV-2 假病毒活性, 其 EC_{50} 值为 $27.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 选择性指数 (SI) 大于 9.9, 但 4 个代谢产物均没有活性, 该结果提示, 对 BBR 的 A 环和 D 环的传统结构修饰可能不利于活性的提高。为此, 本论文针对 BBR 及其类似物巴马汀 (palmatine, PMT) 的 8,9-位进行环合, 由此构建了一类全新骨架的 *N*-环化小檗碱衍生物 (图 1)。随后评价了它们抗 SARS-CoV-2 假病毒活性, 发现 BBR 8,9-位环合, 同时亚甲二氧环打开 (即 PMT 的 8,9-位环合) 的衍生物具有一定的抗 SARS-CoV-2 假病毒活性。在此总

结了 PMT 的 8,9-位环合衍生物的构效关系 (structure-activity relationship, SAR), 对代表性化合物开展了初步安全性与抗 SARS-CoV-2 假病毒作用机制研究。

结果和讨论

1 化合物的合成

目标化合物 **3a~3r** 均以市售 PMT 为起始原料, 经胺化保护、脱保护以及环合反应合成得到 (合成路线 1)。首先, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, PMT 与 2,4-二甲氧基苄胺经胺化反应, 得到关键中间体 **1**, 收率为 49%。然后将 **1** 置于盐酸甲醇溶液中, 脱去 2,4-二甲氧基苄基保护基, 以 83% 收率得到 9-氨基巴马汀 **2**^[18-20]。最后以不同于文献报道的全新合成方法, 将 **2** 与相应的 α -甲基酮在碱性条件下, 经曼尼希反应和分子内加成环合得到新型的 *N*-环化小檗碱衍生物 **3a~3r**^[21], 收率 31%~53%。所有目标化合物结构经 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 以及 HR-MS 分析确证。目标化合物的收率、理化参数和波谱数据见表 1。

2 抗 SARS-CoV-2 假病毒的 SAR 研究

采用已构建的含荧光素酶报告系统的 SARS-CoV-2 假病毒模型评价目标物活性^[17]。该模型首先在 293T 细胞中转染质粒 pcDNA3.1.S2, 24 h 后感染含荧光素酶报告系统的 G* Δ G-VSV 假病毒; 病毒感染 24 h 后通过检测荧光素酶信号值即可定量分析 SARS-CoV-2 假病毒的复制能力。同时评价了目标物对 G* Δ G-VSV 假病毒

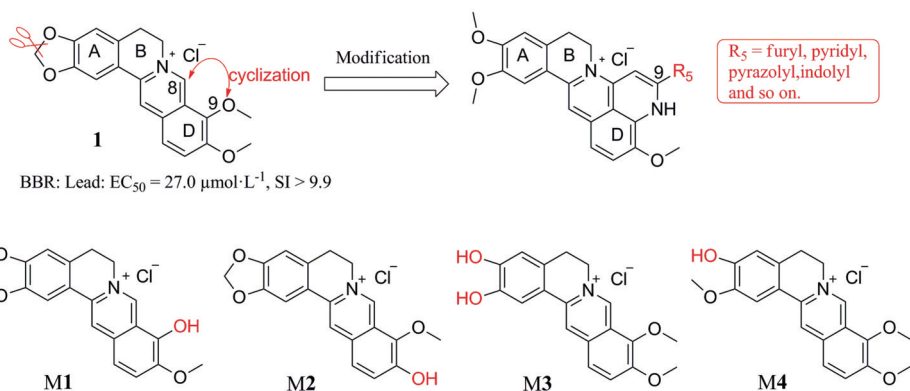
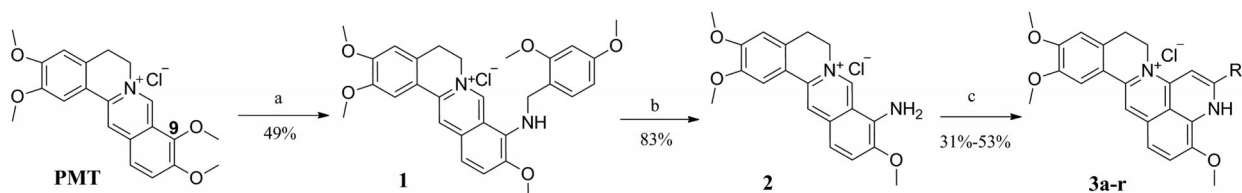


Figure 1 Chemical structures of BBR and M1, M2, M3, M4 and structure modification strategy



Scheme 1 Reagents and conditions: (a) 2,4-Dimethoxybenzylamine, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 h; (b) HCl, CH_3OH , 8 h; (c) RCOCH_3 , NaOCH_3 , CH_3OH , $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2–8 h

Table 1 Physical properties and spectra data of all synthesized compounds

No.	Yield /%	mp/°C (Dec.)	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS <i>m/z</i>
3a	33	125.3–126.9	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.29 (s, 1H), 8.09 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.52 (s, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.31 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.03 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 3.95 (s, 5H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.00 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 156.5, 150.3, 150.2, 148.6, 148.5, 135.8, 130.2, 128.9 (4), 128.1 (2), 127.7, 126.8, 121.9, 120.9, 114.5, 114.1, 111.2, 108.5, 106.7, 96.6, 56.5, 56.4, 56.1, 43.1, 27.5	C ₂₈ H ₂₅ N ₂ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 437.186 0, Found: 437.186 7
3b	47	180.7–183.2	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.14 (s, 1H), 7.82 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.74 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.52–7.32 (m, 4H), 7.01 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.24 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.04 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 153.6, 151.1, 150.4, 148.3, 143.4, 141.7, 135.8, 129.8, 129.2 (2), 128.9, 128.6 (2), 127.5, 126.6, 120.4, 119.5, 117.0 (2), 110.7, 109.4, 108.4, 98.4, 56.7, 56.0, 55.7, 44.5, 26.5, 21.0	C ₂₉ H ₂₇ N ₂ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 451.201 6, Found: 451.201 8
3c	45	186.9–189.0	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.61 (s, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.45 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.21 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.14 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.02 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 154.6, 151.1, 150.4, 148.3, 143.4, 140.0, 136.1, 135.7, 131.0, 130.9, 129.4, 128.9, 127.5, 126.7, 126.3, 120.4, 119.6, 116.9 (2), 110.7, 109.4, 108.4, 100.4, 56.6, 56.0, 55.7, 44.4, 26.5, 20.8, 19.5	C ₃₀ H ₂₉ N ₂ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 465.217 3, Found: 465.216 0
3d	36	183.1–185.3	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.09 (s, 1H), 7.74 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.67–7.62 (m, 2H), 7.44 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.24 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.06 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.36 (s, 3H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 153.7, 151.1, 150.4, 148.3, 143.4, 140.5, 136.7, 135.8, 130.0, 129.6, 129.3, 128.8, 127.5, 126.6, 126.1, 120.4, 119.4, 117.0 (2), 110.8, 109.3, 108.4, 98.3, 56.7, 55.97, 55.8, 44.4, 26.5, 19.4, 19.3	C ₃₀ H ₂₉ N ₂ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 465.217 3, Found: 465.217 7
3e	53	190.6–193.4	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.99 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.670 (s, 1H), 7.54–7.30 (m, 4H), 7.15 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 4.23 (s, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 3.82 (s, 3H), 3.04 (s, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 152.9, 151.2, 150.5, 149.8, 147.9, 147.7, 142.8, 135.2, 128.3, 126.9, 126.0, 124.3, 121.7, 119.9, 118.8, 116.6 (2), 111.7, 111.1, 110.4, 108.9, 107.9, 97.7, 56.7, 55.9, 55.9, 55.8, 55.6, 44.2, 26.2	C ₃₀ H ₂₉ N ₂ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 497.207 1, Found: 497.2071
3f	43	192.2–193.9	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.22 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.55 (dt, <i>J</i> = 7.8, 2.4 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.16 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.02–6.84 (m, 4H), 3.92 (s, 3H), 3.86 (s, 5H), 3.82 (s, 3H), 2.99 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 155.5, 149.6, 149.4, 149.2, 148.0, 140.1, 138.2, 135.1, 133.8, 128.8 (2), 128.2 (2), 127.0, 126.2, 121.7, 120.7, 113.1, 112.5, 110.8, 108.0, 105.1, 94.9, 55.9, 55.8, 55.6, 42.0, 27.2	C ₂₈ H ₂₄ N ₂ O ₃ Cl ₂ [M-Cl] ⁺ : 471.147 0, Found: 471.147 5
3g	34	207.3–209.4	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.34 (s, 1H), 7.90–7.81 (m, 4H), 7.76 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.46 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.01 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 2H), 4.24 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.05 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 152.7, 151.2, 150.5, 148.3, 143.4, 135.8, 131.9, 131.5 (2), 130.8 (2), 129.0, 127.5, 126.7, 125.1, 120.4, 119.6, 117.1 (2), 110.8, 109.7, 108.4, 99.0, 56.7, 56.0, 55.7, 44.6, 26.4	C ₂₈ H ₂₄ N ₂ O ₃ BrCl [M-Cl] ⁺ : 515.096 5, Found: 515.095 3
3h	39	174.9–177.1	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.46 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.20 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.10 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.80 (dt, <i>J</i> = 8.4, 3.0 Hz, 1H), 7.73 (dd, <i>J</i> = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.65 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, <i>J</i> = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 7.05 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 6.99 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 4.25 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.06 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.05 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.7, 151.1, 150.4, 148.3, 143.5, 135.7, 134.6, 133.7, 133.6, 132.7, 129.6, 129.1, 127.4, 126.7, 120.3, 119.7, 118.2, 117.1, 117.1, 111.5, 110.7, 109.8, 108.3, 99.4, 56.7, 56.0, 55.7, 44.6, 26.4	C ₂₉ H ₂₄ N ₃ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 462.181 2, Found: 462.181 4
3i	42	228.3–230.3	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.43–8.35 (m, 2H), 8.01–7.91 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.18 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.96 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 2H), 6.92 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.90–3.84 (m, 5H), 3.82 (s, 3H), 3.00 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 154.9, 149.7, 149.5, 149.3, 148.0, 143.9, 135.1, 132.3 (2), 129.6, 127.8 (2), 127.1, 126.2, 121.6, 121.0, 118.9, 113.3, 112.5, 111.3, 110.8, 108.0, 105.2, 95.4, 55.9, 55.8, 55.6, 42.0, 27.2	C ₂₉ H ₂₄ N ₃ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 462.181 2, Found: 462.181 5
3j	48	234.0–236.2	¹ H NMR (CDCl ₃ , CD ₃ OD) δ 7.90 (dd, <i>J</i> = 1.2, 0.6 Hz, 1H), 7.71 (dd, <i>J</i> = 3.6, 0.6 Hz, 1H), 7.63 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.80 (dd, <i>J</i> = 3.6, 1.8 Hz, 1H), 4.24 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.17 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.15 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H)	¹³ C NMR (CDCl ₃ , CD ₃ OD) δ 152.4, 152.0, 149.7, 147.8, 145.8, 144.2, 143.2, 137.2, 128.7, 128.2, 127.7, 121.5, 120.4, 118.6, 117.3, 116.3, 114.2, 111.1, 110.6, 109.0, 94.6, 57.1, 56.8, 56.5, 45.8, 27.9	C ₂₆ H ₂₃ N ₂ O ₄ Cl [M-Cl] ⁺ : 427.165 2, Found: 427.166 3

Continued

No.	Yield /%	mp/°C (Dec.)	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS <i>m/z</i>
3k	41	206.8–209.1	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.77 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.34–7.27 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.19 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.05 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 163.5, 151.0, 150.8, 148.7, 145.6, 136.2, 127.9, 126.8, 125.8, 121.1, 118.9 (2), 117.2, 117.0, 115.4, 111.2, 111.2, 108.7, 108.7, 108.5, 94.2, 57.1, 56.4, 56.1, 44.7, 27.0	C ₂₆ H ₂₄ N ₃ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 426.181 2, Found: 426.182 0
3l	35	167.1–169.3	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.23 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.40 (s, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.24 (s, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.06 (s, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.1, 150.3, 148.1, 146.9, 144.3, 135.9, 127.3, 126.7, 126.2, 126.1, 120.2, 120.0, 117.0, 116.8, 116.7, 110.6, 110.1, 108.2, 99.4, 97.4, 56.7, 55.9, 55.6, 44.7, 26.3	C ₂₅ H ₂₂ N ₃ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 444.137 6, Found: 444.137 7
3m	53	186.7–189.2	¹ H NMR (CD ₃ OD) δ 7.68 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.51–7.45 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 4.15–4.09 (m, 5H), 3.96 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.09 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.48 (s, 3H)	¹³ C NMR (CD ₃ OD) δ 153.2, 152.6, 150.3, 147.6, 147.0, 145.2, 144.4, 137.6, 130.5, 129.0, 128.5, 122.2, 121.3, 118.8, 117.6, 114.7, 111.7, 111.2, 109.7, 101.6, 57.4, 57.0, 56.5, 46.3, 36.4, 28.2, 11.6, 10.5	C ₂₈ H ₂₉ N ₄ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 469.223 4, Found: 469.223 8
3n	34	150.3–151.9	¹ H NMR (CD ₃ OD) δ 7.68 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.51–7.45 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 4.32 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.17–4.08 (s, 5H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.09 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 1.50 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 3H)	¹³ C NMR (CD ₃ OD) δ 153.2, 152.6, 150.3, 147.8, 147.4, 145.2, 143.3, 137.7, 130.5, 129.0, 128.5, 122.2, 121.3, 118.8, 117.6, 114.7, 111.7, 111.2, 109.7, 101.6, 57.4, 57.0, 56.6, 46.3, 45.4, 28.2, 15.3, 11.7, 10.4	C ₂₉ H ₃₁ N ₄ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 483.239 1, Found: 483.239 9
3o	31	188.7–191.2	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.55 (s, 1H), 8.33 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.82 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.34–7.21 (m, 3H), 7.14 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 4.18 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.05 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 153.5, 152.7, 151.3, 150.3, 148.9, 144.8, 144.4, 139.8, 139.4, 137.9, 128.9, 128.3, 123.0, 121.8, 121.4, 118.6, 117.6, 111.6, 111.3, 109.6, 101.4, 96.2, 57.5, 57.0, 56.6, 46.5, 28.1, 18.5	C ₂₈ H ₂₆ N ₃ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 452.196 9, Found: 452.194 8
3p	35	187.1–188.9	¹ H NMR (CDCl ₃ , CD ₃ OD) δ 9.71 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 8.95–8.90 (m, 2H), 7.73 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.39 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.22 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 3.20 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H)	¹³ C NMR (CDCl ₃ , CD ₃ OD) δ 153.1, 152.2, 149.9, 148.2, 146.6, 145.0, 144.1 (2), 143.5, 137.8, 128.8, 128.3, 128.0, 121.7, 121.4, 118.7, 117.7, 111.9, 111.2, 109.1, 97.2, 57.3, 56.9, 56.6, 46.3, 27.9	C ₂₆ H ₂₃ N ₄ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 439.176 5, Found: 439.176 7
3q	36	208.1–210.2	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.79 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 9.27 (s, 2H), 7.79 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.25 (s, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.06 (s, 2H)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 160.3, 157.3 (3), 151.6, 150.9, 149.2, 148.8, 143.9, 136.3, 129.7, 128.0, 127.7, 127.3, 120.8, 120.4, 117.7, 111.2, 110.6, 108.8, 100.6, 57.3, 56.5, 56.2, 45.2, 26.9	C ₂₆ H ₂₃ N ₄ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 439.176 5, Found: 439.176 9
3r	42	200.0–201.9	¹ H NMR (CDCl ₃ , CD ₃ OD) δ 8.20 (s, 1H), 7.95 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.39–7.33 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.18 (s, 5H), 4.00 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.18 (s, 2H)	¹³ C NMR (CDCl ₃ , CD ₃ OD) δ 152.2, 151.8, 150.9, 149.6, 144.2, 138.1, 137.1, 130.0, 129.2, 128.0, 127.4, 124.8, 124.1, 122.8, 121.8, 119.7, 119.0, 118.1, 116.5, 113.7, 111.1, 109.4, 109.3, 109.0, 96.1, 57.2, 56.9, 56.5, 45.5, 28.1	C ₃₀ H ₂₆ N ₃ O ₃ Cl [M-Cl] ⁺ : 476.196 9, Found: 476.197 3

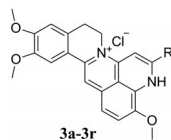
的抑制活性,用以排除化合物是通过抑制G*ΔG-VSV假病毒的活性而导致的假阳性结果。所有目标物的结构、细胞毒、抗SARS-CoV-2假病毒(EC₅₀-SARS-CoV-2)和抗G*ΔG-VSV假病毒(EC₅₀-G*ΔG-VSV)的活性见表2。

SAR主要考察衍生物9-位不同取代基对抗SARS-CoV-2假病毒活性的影响。首先,对9-位引入苯基,所得化合物**3a**对SARS-CoV-2假病毒的EC₅₀为4.06 μmol·L⁻¹,活性优于BBR,SI值与BBR相当。随后,在9-位苯基上分别引入供电子甲基(**3b**~**3d**)、甲氧基(**3e**)、氯(**3f**)和溴(**3g**)和吸电子基氰基(**3h**~**3i**),结果显示,除化合物**3i**的活性弱于先导物外,其他目标物的活性均强于

BBR,但其SI值均小于先导物。以上结果提示:在9-位引入含不同取代的苯基不利于衍生物SI值提高。

接下来在9-位引入不同杂环取代基(**3j**~**3r**),结果显示,当9-位取代基为吡咯基、噻唑基和嘧啶基时,衍生物**3k**、**3l**和**3q**的EC₅₀均大于13.0 μmol·L⁻¹;当9-位取代基为咪唑基、取代的吡啶基、吡嗪基和呋喃基时,虽然化合物**3j**、**3o**、**3p**和**3r**的抗SARS-CoV-2假病毒活性明显强于BBR,EC₅₀介于4.63和6.97 μmol·L⁻¹之间,但是细胞毒性明显增大,SI低于先导物;当9-位取代基为含不同取代的吡唑基时,化合物**3n**活性强于BBR,EC₅₀为10.2 μmol·L⁻¹,SI值和BBR相当,特别是化合物

Table 2 Structures and antiviral activities of all the target compounds against SARS-CoV-2 pseudovirus. ^aCC₅₀, the concentration of 50% cellular toxicity in Huh 7 cell; ^bEC₅₀, the concentration required to achieve 50% protection against virus-induced cytopathic effect; ^cSI, the selectivity index-the ratio of CC₅₀ to EC₅₀



Compd.	R	CC ₅₀ /μmol·L ⁻¹ ^a	EC ₅₀ -SARS-CoV-2/μmol·L ⁻¹ ^b	SI ^c	EC ₅₀ ·G*ΔG-VSV/μmol·L ⁻¹
BBR	/	>266	27.0	>9.89	142
3a	C ₆ H ₅	44.8	4.06	11.0	17.5
3b	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	33.7	12.1	2.8	16.8
3c	<i>o,p</i> -(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃	15.2	13.0	1.2	16.2
3d	<i>m,p</i> -(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃	5.1	4.5	1.1	4.2
3e	<i>m,p</i> -(OCH ₃) ₂ C ₆ H ₃	5.1	5.2	0.99	7.33
3f	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	14.8	15.7	0.94	19.4
3g	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	13.7	16.5	0.83	15.0
3h	<i>m</i> -CNC ₆ H ₄	5.51	2.96	1.86	12.0
3i	<i>p</i> -CNC ₆ H ₄	25.8	29.3	0.87	34.0
3j	2'-Furyl	5.46	4.63	1.18	4.23
3k	2'-Pyrryl	13.1	13.1	1.00	11.1
3l	2'-Thiazolyl	25.2	46.7	0.54	22.4
3m		36.0	1.61	22.2	31.7
3n		94.3	10.2	9.27	35.3
3o		5.93	6.18	0.86	6.88
3p	2'-Pyrazinyl	8.96	4.79	1.87	5.46
3q	5'-Pyrimidyl	58.2	71.2	0.82	24.7
3r	3'-Indolyl	6.00	6.97	0.86	6.80

3m, 其 EC₅₀ 仅为 1.61 μmol·L⁻¹, SI 为 22.2, 抗病毒活性和 SI 均明显优于 BBR, 并且 **3m** 对 G*ΔG-VSV 假病毒的 EC₅₀ 为 31.7 μmol·L⁻¹, 低于 BBR 的 EC₅₀ 17.5 μmol·L⁻¹. 因此, 选择 **3m** 为代表性化合物进行下一步研究。

3 时间添加实验

为初步探讨 BBR 与 **3m** 抗病毒机制, 设计了在不同的温度条件和时间点将 **3m** 或者 BBR 和病毒单独或同时加入宿主细胞的药物-病毒-宿主相互作用的时间添加实验^[17,22]。如图 2A 所示: 若病毒荧光降低, 提示 a: 抑制病毒的入侵; b: 阻碍病毒对细胞膜表面的吸附; c: 阻断病毒与细胞膜表面受体结合; d: 抑制膜融合过程。结果如图 2B 和 2C 所示: BBR 对 a、b 和 c 过程的抑制率分别为 60%、57%、69%, 提示 BBR 通过抑制病毒对宿主细胞的进入、吸附以及阻断病毒与受体的结合多个过程; **3m** 对 a、b 和 d 过程的抑制率分别为 62%、76%、73%, 提示 **3m** 对病毒对宿主细胞的进入、吸附和膜融合阶段均有较好的抑制作用。上述结果提示, **3m** 和 BBR 均可能通过多靶点的协同作用机制产生抗病毒作用, 而母核骨架结构改变使两者作用机制不完全相同, 值得进一步深入研究。

4 成药性初步评价

4.1 化合物 3m 成药性预测 鉴于目标化合物具有新结构骨架, 使用 ADMET Predictor 9.5 软件对代表性化合物 **3m** 进行初步的成药性预测, 包括吸收、代谢和毒理性质进行打分, 了解其部分成药性质^[23] (表 3)。结果显示, **3m** 的预测分值均在软件设定的合理范围内, 提示化合物 **3m** 成药性良好。

Table 3 ADMET prediction results of **3m**. ^aDruglike risk about absorption, suggested values: Absn risk ≤ 3.5; ^bDruglike risk about metabolism, suggested values: CYP risk ≤ 2.5; ^cRat-TD₅₀, suggested values: ≥ 6.5; ^dDruglike risk about ADMET, suggested values: ADMET risk ≤ 7.5

Code	Absn risk ^a	CYP risk ^b	Rat-TD ₅₀ ^c /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	ADMET risk ^d
3m	0.83	1	12.1	4.83

4.2 化合物 3m 急性毒性 选用昆明小鼠, 以灌胃给药方式, 按照 0、250、500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量, 将化合物 **3m** 一次性给药, 密切观察 7 天。结果显示, 不同剂量组小鼠生存状态均良好, 说明 **3m** 半数致死量 (LD₅₀) 大于 1 000 mg·kg⁻¹。

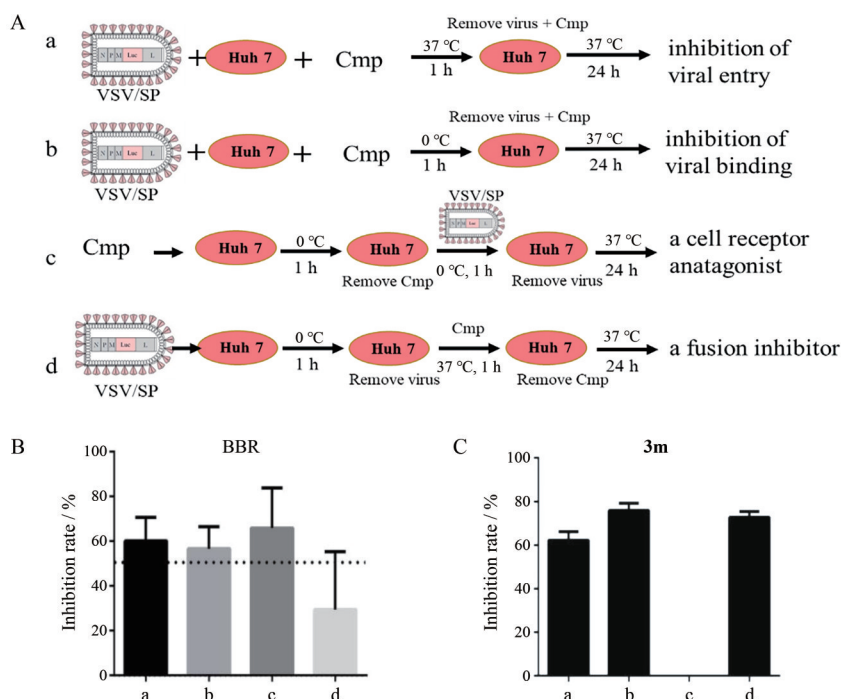


Figure 2 (A) Cartoon diagram of a single-cycle time-of-addition at different time and temperature. (B) BBR and (C) compound **3m** block SARS-CoV-2 pseudovirus infection at different entry stage. Error bars indicate standard deviations

小结

本研究以 BBR 为先导物, 以抗 SARS-CoV-2 假病毒活性为导向, 共设计合成了 18 个全新结构骨架的 *N*-环化 BBR 衍生物, 构效关系表明在 9-位引入适当的杂环基团可以提高抗病毒活性。其中, 化合物 **3m** 显示出最优的抗病毒活性, 其 EC_{50} 仅为 $1.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SI 为 22.2, 明显优于 BBR。时间添加实验提示 BBR 与 **3m** 均通过多靶点协同作用机制发挥抗病毒作用, 但因母核骨架结构改变使其作用机制发生变化。本研究结果为 *N*-环化 BBR 衍生物发展成一类新颖的抗 SARS-CoV-2 候选物提供了重要科学数据。

实验部分

CXM-300 型精密熔点仪测定目标物熔点, 温度未校正; 所有目标物的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 用 Bruker Avance III 600MHz 核磁共振仪测定, 溶剂为 $\text{DMSO-}d_6$ 、 CD_3OD 或者 CD_3OD 和 CDCl_3 混合溶剂; HR-ESI-MS 用 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪测定; Flash 柱分离纯化用 Combiflash Rf 200 快速制备液相, 试剂均为分析纯。

1 化合物合成

将 PMT (5 g, 12.9 mmol) 加入到 2,4-二甲氧基苄胺 25 mL 中, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 7 h。体系冷却至室温, 随后加入丙酮 100 mL, 搅拌, 抽滤, 丙酮 $2\times 100\text{ mL}$ 洗

涤。滤渣经硅胶柱, 以二氯甲烷/甲醇为流动相分离纯化得红色化合物 **1**。化合物 **1** (3 g, 5.74 mmol) 溶于 10 mL 甲醇中, 加入浓盐酸 3 mL, 室温搅拌 8 h, 抽滤, 沉淀以 80% 乙醇洗涤, 得红色化合物 **2**。将化合物 **2** (300 mg, 0.81 mmol) 和相应的 α -甲基酮 (1.47 mmol) 置于无水甲醇 (10 mL) 中, 加入甲醇钠调节反应体系始终为碱性, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 2~8 h, 将反应体系充分冷却, 用盐酸酸化, 减压旋干反应体系, 固体经硅胶柱以二氯甲烷/甲醇为流动相分离纯化得目标物 **3a**~**3r**。

2 生物实验

2.1 体外细胞水平抗 SARS-CoV-2 假病毒活性评价 将每种化合物 (终浓度 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的系列稀释液与 1.3×10^4 TCID₅₀ SARS-CoV-2 假病毒混合于 96 孔 Costar 板中 (Corning, Inc., 康宁, 纽约), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 1 h, 然后加入 Huh 7 细胞 (每孔 2×10^4 细胞), 孵育 24 h。通过测量生物发光值来确定病毒感染性。根据剂量-反应曲线确定化合物抗病毒的 EC_{50} 值。同时, 在没有假病毒的情况下, 进行细胞毒性测试以确定每种测试化合物的 CC_{50} 值。

2.2 体外细胞水平抗 G* Δ G-VSV 假病毒活性评价 将每种化合物 (终浓度 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的系列稀释液与 1.3×10^4 TCID₅₀ G* Δ G-VSV 假病毒混合于 96 孔 Costar 板 (Corning, Inc., 康宁, 纽约), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 1 h, 然后加入 Huh 7 细胞 (每孔 2×10^4 细胞), 孵育 24 h。通过测量生物发光值来确定病毒的感染性, EC_{50} 由剂量反应曲线确定。

2.3 急性毒性实验 本部分动物实验遵循中国医学

科学院药物研究所动物实验中心标准操作规程。以昆明种小鼠 (18~20 g) 为动物模型, 称重后按照每组 10 只、雌雄各半随机分组。将化合物 **3m** 在研钵中充分研磨, 分别配制成 0、25、50 和 100 mg·mL⁻¹ 混悬液, 给药前充分震荡, 使药物混悬均匀, 每只小鼠按照 0、250、500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 的剂量灌胃给药 0.2 mL, 密切观察动物 7 天内的死亡情况, 计算 LD₅₀。

2.4 时间添加实验 将 Huh 7 细胞在 96 孔板中培养 24 h, 随后将化合物 (终浓度 25 μmol·L⁻¹) 在 SARS-CoV-2 假病毒感染前 1 h (-1 h), 病毒感染中 (0 h) 及病毒感染后 (+1 h) 的不同时间段进行孵育。病毒感染后 24 h 检测生物发光值, 对化合物抗假病毒的效果进行分析^[14]。

作者贡献: 范田运负责所有目标物的合成、文献的调研整理及初稿的撰写; 吴佳静负责抗 SARS-CoV-2 假病毒活性筛选; 李迎红、黄维金、汪燕翔和王佑春教授负责实验把关及稿件修改等工作; 郭茜茜和赵丽萍帮助目标物的分离; 本文的通讯作者宋丹青教授负责实验设计和把关、稿件修改等工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395: 565-574.
- [2] World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>.
- [3] Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus [J]. *Cell*, 2020, 182: 812-827.
- [4] Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varAppNo=214787>.
- [5] Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19 — final report [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1813-1826.
- [6] Grein J, Ohmagari N, Shin D, et al. Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 2327-2336.
- [7] Adhikari B, Marasini BP, Rayamajhee B, et al. Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: a review [J]. *Phytother Res*, 2020. DOI: 10.1002/ptr.6893.
- [8] Faheem, Kumar BK, Sekhar KVG, et al. Druggable targets of SARS-CoV-2 and treatment opportunities for COVID-19 [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 104: 104269.
- [9] Zeng QX, Wang HQ, Wei W, et al. Synthesis and biological evaluation of berberine derivatives as a new class of broad-spectrum antiviral agents against Coxsackievirus B [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 95: 103490.
- [10] Liu L, You LM, Wu J, et al. Berberine suppresses influenza virus-triggered NLRP3 inflammasome activation in macrophages by inducing mitophagy and decreasing mitochondrial ROS [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108: 253-266.
- [11] Wan JJ, Brown RS, Kielian M. Berberine chloride is an alphavirus inhibitor that targets nucleocapsid assembly [J]. *mBio*, 2020, 11: e01382-20.
- [12] Warowicka A, Nawrot R, Goździcka-Józefiak A. Antiviral activity of berberine [J]. *Arch Virol*, 2020, 165: 1935-1945.
- [13] Luganini A, Mercorelli B, Messa L, et al. The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral immediate early-2 (IE2) protein transactivating activity [J]. *Antiviral Res*, 2019, 164: 52-60.
- [14] Hung TC, Jassey A, Liu CH, et al. Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein [J]. *Phyto-medicine*, 2019, 53: 62-69.
- [15] Zhang Y, Chen T, Huang HY, et al. Study on anti-viral effect and mechanism of berberine against herpes simplex virus type 1 *in vitro* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2017, 33: 33-37.
- [16] Varghese FS, Kaukinen P, Gläsker S, et al. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses [J]. *Antiviral Res*, 2016, 126: 117-124.
- [17] Nie JH, Li QQ, Wu JJ, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 680-686.
- [18] Fiona MA, Gerwyn B, Frederick C, et al. Development of a practical synthesis of toll-like receptor agonist PF-4171455: 4-amino-1-benzyl-6-trifluoromethyl-1,3-dihydroimidazo [4,5-c]pyridin-2-one [J]. *Org Proc Res Dev*, 2011, 15: 788-796.
- [19] Fan TY, Hu XX, Tang S, et al. Discovery and development of 8-substituted cycloberberine derivatives as novel antibacterial agents against MRSA [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 484-489.
- [20] Fan TY, Pang J, Zeng QX, et al. Anti-helicobacter pylori activities of palmatine derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1237-1244.
- [21] Ma Y, Ou TM, Tan JH, et al. Quinolono-benzo-[5,6]-dihydroisoquinolium compounds derived from berberine: a new class of highly selective ligands for G-quadruplex DNA in c-myc oncogene [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 1906-1913.
- [22] Basu A, Li B, Mills DM, et al. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses [J]. *J Virol*, 2011, 85: 3106-3119.
- [23] Fan TY, Ge MX, Guo ZH, et al. Discovery of 9-O-substituted palmatine derivatives as a new class of anti-COL1A1 agents *via* repressing TGF-β1/Smads and JAK1/STAT3 pathways [J]. *Molecules*, 2020, 25: 773.