

全新骨架环化小檗碱衍生物抗 MRSA 活性研究

范田运, 杨元帅, 胡辛欣, 汪燕翔, 游雪甫, 宋丹青*

(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)

摘要: 本研究基于课题组前期工作, 以自主构建的环化小檗碱为母核, 继续延伸设计合成了 15 个不同结构类型的全新环化小檗碱衍生物, 并通过革兰氏阳性菌的测定, 丰富了此类化合物的构效关系: ① C 环为必需片段; ② 7,8-和 8,13-双取代衍生物活性弱于相应单取代衍生物或者相当。化合物 **9a** 对临床棘手的耐甲氧西林金黄葡萄球菌/中介耐万古霉素金黄葡萄球菌菌株活性明显优于左氧氟沙星, MIC 值达 $1\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。体外代谢实验表明 **9a** 对血浆和肝微粒体的稳定性良好。分子对接显示其可能通过靶向细菌 Topo IV 的 ParE 亚基发挥抗 MRSA 活性, 与临床现有抗菌药作用位点均不同。本研究结果为此类化合物发展成一类新型抗 MRSA 化合物提供了重要的科学数据。

关键词: 环化小檗碱; 抗菌活性; MRSA; 构效关系; 分子对接

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)09-1627-09

Anti-MRSA activities of cycloberberine derivatives with a novel chemical scaffold

FAN Tian-yun, YANG Yuan-shuai, HU Xin-xin, WANG Yan-xiang, YOU Xue-fu, SONG Dan-qing*

(Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Using CBBR as the parent core constructed in our lab, we designed and synthesized 15 novel compounds with diverse structures for evaluation of anti-bacterial activities. Structure activity relationship studies revealed that ① ring C was essential for the activity; ② 7,8- or 8,13-disubstituted CBBR derivatives showed ideal activities, weaker or similar to those corresponding to 7-, 8-, or 13-monosubstituted CBBR derivatives. Among those, compound **9a** showed the most potential activity against MRSA/VISA isolates with MIC values of $1\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, much better than Lev. **9a** also displayed higher stability in the plasma and liver microsomes. Molecular docking indicated that **9a** might target bacterial DNA Topo IV ParE subunit, indicating a mode of action distinct from current antibacterial drugs on market. The results provided key scientific evidence for developing such compounds into a new family of anti-MRSA drugs.

Key words: cycloberberine; antibacterial; MRSA; structure-activity relationship; molecular dock

金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 已成为继 HIV 之后第二大威胁人类生命的病原微生物, 其导致的感染可遍及全身并有高发病率及高死亡率特点, 被认为是 21 世纪十大最致命的感染性疾病之一^[1-4]。耐

甲氧西林金黄葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 因对常用抗生素多重耐药, 已成为院内获得性感染首要致病菌^[5-11]。仅在美国, 每年大约有两百万人感染 MRSA, 23 000 余人死于 MRSA 感染^[12]。为应对耐药菌威胁, 我国启动了《遏制细菌耐药国家行动计划 (2016~2020 年)》, 2016 年全国细菌耐药的检测报告显示: 全国 MRSA 平均检出率仍高达 34.4%。随着人类对抗生素的大量使用甚至滥用, 被认为是抵御 MRSA 的“最后一道防线”的万古霉素 (vancomycin) 的

收稿日期: 2019-06-19; 修回日期: 2019-07-10.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2019-12M-1-005); 北京市自然科学基金资助项目 (7172136).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165268,

E-mail: songdanqingsdq@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0485

中介耐万古霉素金黄葡萄球菌 (vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*, VISA) 菌株也在不断被报道^[13-15]。遗憾的是抗生素研发却是投入强度最低的常见病药物之一, 过去30年无新骨架上市。因此, 新型抗菌药的研发成为各国政府及从事药物研究的科学家特别关注的聚焦问题。

本课题组首先发现一类由生物碱天然产物小檗碱 (berberine) 衍生、具有全新结构骨架的环化小檗碱 (CBBR) 衍生物具有较好的抗 MRSA 活性, 虽然 CBBR 本身没有抗菌活性, 但在其 7-、8-位或 13-位引入适当取代基, 均可在不同程度上对 MSSA/MRSA、以及对耐万古霉素肠球菌 (vancomycin resistant *Enterococcus*, VRE) 显示较好抑制活性, 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 介于 $0.25 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间^[16-21]。提示 CBBR 衍生物的化学骨架和作用机制与临床使用抗菌药物完全不同, 值得进一步研究。为丰富与发展该类衍生物的抗菌构效关系 (structure-

activity relationship, SAR), 以期同时获得抗菌活性更好、抗菌谱更广的候选物, 本文以前期工作为基础, 将 7-、8-、或者 13-位的活性基团进行组合, 设计合成了一系列未经报道的 7,8-位和 8,13-位双取代环化小檗碱衍生物 (图 1), 并对代表性化合物开展了体外代谢稳定性评价与初步机制研究。

结果和讨论

1 化合物的合成

首先, 以市售盐酸巴马亭 (palmatine) 为原料, 经还原、取代、环化等反应, 以 64% 的产率得到关键中间体环化巴马亭 (CPMT), 随后与相应的格氏试剂反应得到中间体 **3**, 经溴素氧化得到 7-取代 CPMT **4a**、**4b**, 高温负压条件下, 选择性脱除甲基得到化合物 **5a**、**5b**。CPMT 经间氯过氧苯甲酸氧化开环得到目标物 **6**, 然后 **6** 在三乙胺作用下, 与 2-呋喃甲酰氯反应得到目标物 **7**^[21-23] (合成路线 1)。

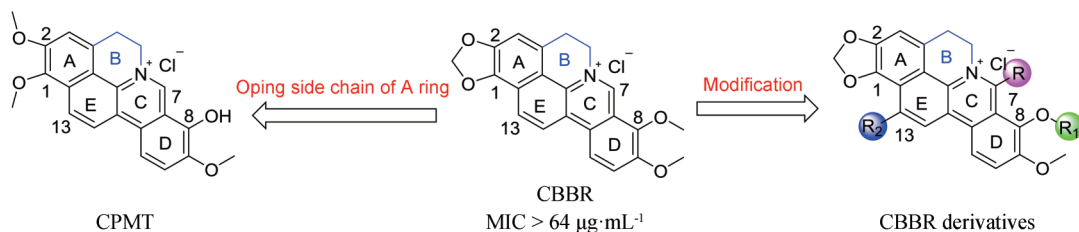
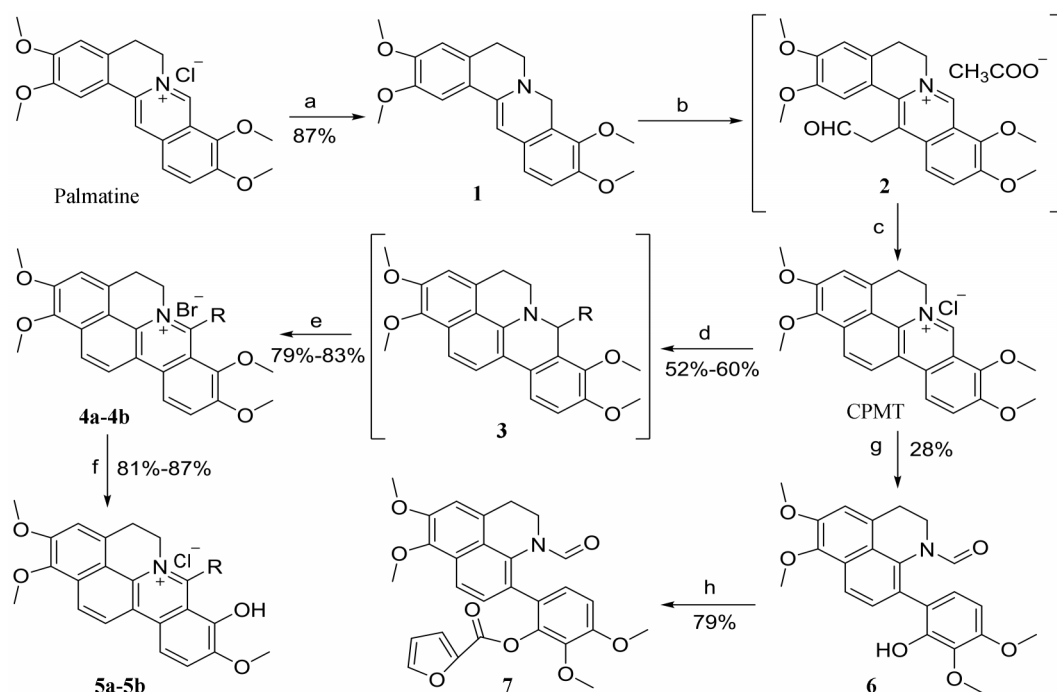


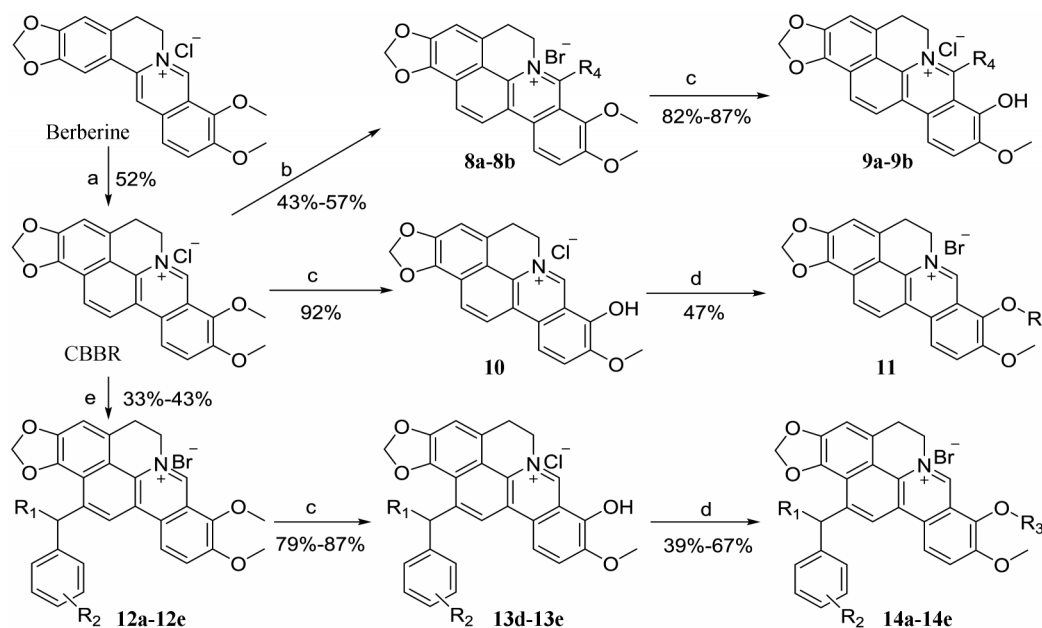
Figure 1 Chemical structure of CBBR, and its structure modification strategy



Scheme 1 Synthetic route of target compounds. Reagents and conditions: (a) NaBH_4 , 5% NaOH , K_2CO_3 , CH_3OH , r.t., 3 h; (b) 40% glyoxal, HOAc , CH_3CN , reflux, 6 h; (c) Methanol/ HCl (2:1 by vol.), r.t., 24 h, 73% (over two steps); (d) RMgBr , 60°C , 3 h; (e) Br_2 , 60°C , 1 h; (f) 20–30 mmHg, $195\text{--}210^\circ\text{C}$, 60 min; (g) NaH , mCPBA , HMPA , 3 h; (h) Triethylamine, CH_3CN , 40°C , 2 h

CBBR的合成路线与CPMT的路线一致。以CBBR为原料,先与格氏试剂反应,后经溴素氧化得到中间体**8a-8b**,高温选择性脱除甲基得到目标物**9a-9b**、**9b**^[19]。以CBBR为原料,高温选择性脱除甲基,得到中间体**10**,使其与相应的溴代烷烃反应得到目标物**11**^[18]。然后,以CBBR为原料,经还原后与相应的取代苄溴反

应后,氧化得到目标物**12a~12e**,对**12d**、**12e**高温选择性脱除甲基,得到中间体**13d**、**13e**,使其与相应的溴代烷烃反应得到目标物**14a~14e**(合成路线2)。所有目标化合物结构均经¹H NMR、¹³C 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。



Scheme 2 Synthetic route of target compounds. Reagents and conditions: (a) 1) NaBH₄, 5% NaOH/K₂CO₃, CH₃OH, r.t., 3 h; 2) 40% glyoxal, HOAc/CH₃CN, reflux, 6 h; 3) methanol/HCl (3:1 by vol.), r.t., 24 h, 52% (over three steps); (b) RMgBr, Br₂, 60 °C, 4 h; (c) 20–30 mmHg, 195–210 °C, 60 min; (d) KOH, DMF, 71 °C, 6–12 h; (e) 1) NaBH₄, K₂CO₃, CH₃OH, r.t., 2 h; 2) substituted benzyl bromide, K₂CO₃, CH₃CN, reflux, 3–8 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 (m/z)
5a	83	192–194	¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.94 (s, 1H), 8.44 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 8.10 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 7.55–7.47 (m, 3H), 7.43–7.36 (m, 4H), 7.24 (s, 1H), 4.06 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.26 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 158.1, 150.2, 150.1, 145.4, 141.4, 136.8, 129.5, 129.1 (2), 128.9, 128.7, 127.8, 127.7 (2), 127.1, 121.9, 121.5, 117.3, 117.2, 117.1, 116.6, 114.0, 113.9, 61.5, 56.9, 56.0, 29.5, 27.6.	C ₂₈ H ₂₄ NO ₄ Cl [M–Cl] ⁺ : 438.170 0, found: 438.170 8.
5b	78	197–199	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.94 (s, 1H), 8.46 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.46 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.36–7.20 (m, 2H), 4.10 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.72 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H).	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 157.0, 150.2, 148.7, 143.9, 141.9, 141.4, 135.9, 135.4, 133.6, 133.6, 129.9 (2), 129.5, 129.3 (2), 128.7, 127.8, 127.1, 122.0, 121.5, 116.8, 117.3, 113.9, 61.5, 56.9, 55.9, 29.5, 27.6.	C ₂₈ H ₂₃ Cl ₂ NO ₄ [M–Cl] ⁺ : 472.131 0, found: 472.131 7.
6	28	186–188	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.98 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.84 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.94 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 6.63 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.90–3.78 (m, 8H), 3.70 (s, 3H), 3.12 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H).	¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 161.6, 153.0, 148.9, 148.3, 141.0, 137.2, 133.4, 131.0, 129.5, 128.6, 125.9, 124.5, 120.8, 120.7, 118.5, 115.1, 104.7, 61.4, 60.9, 57.2, 56.3, 38.8, 30.3.	C ₂₃ H ₂₄ NO ₆ [M+H] ⁺ : 410.159 8, found: 410.160 5.
7	79	202–204	¹ H NMR (600 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ 8.19 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.82 (t, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 7.45 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.16 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.12 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.64 (dd, <i>J</i> = 3.6, 1.8 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.13 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 2.80 (s, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) δ 162.1, 155.8, 153.1, 149.0, 147.9, 143.4, 142.0, 141.2, 133.4, 129.4, 129.2, 129.0, 126.1, 125.4, 122.23, 120.7, 119.7, 118.2, 114.7, 112.3 (2), 111.1, 60.2, 60.0, 56.1, 55.6, 38.6, 29.8.	C ₂₈ H ₂₆ NO ₈ [M+H] ⁺ : 504.165 3, found: 504.166 0.

Continued

No.	Yield /%	mp/°C (Dec.)	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS (<i>m/z</i>)
9a	82	194–196	¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.97 (s, 1H), 8.36 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.77 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.32–7.24 (m, 2H), 6.26 (s, 2H), 4.63 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.39 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 1.39 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.25–1.18 (m, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 164.5, 151.4, 145.1, 140.6, 129.8, 128.0, 127.0, 126.8, 121.8, 121.4, 119.7, 117.7, 117.5, 117.2, 116.7, 113.8, 109.4, 102.7, 56.1, 29.5, 28.1, 24.0, 12.7.	C ₂₃ H ₂₀ NO ₄ Cl [M–Cl] ⁺ : 374.138 7, found: 374.138 2.
9b	87	199–201	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.95 (s, 1H), 8.43 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.54 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.40 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.18 (s, 2H), 5.77 (s, 2H), 4.04 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 1.18 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H).	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 158.9, 150.6, 149.0, 145.1, 144.5, 140.7, 137.1, 129.9, 129.2 (2), 128.7, 127.9, 127.8 (2), 127.1, 127.0, 126.9, 122.1, 121.9, 117.9, 117.7, 116.8, 109.7, 102.7, 55.4, 21.2, 14.6.	C ₂₇ H ₂₀ NO ₄ Cl [M–Cl] ⁺ : 422.138 7, found: 422.139 3.
11	47	165–167	¹ H NMR (500 MHz, MeOD) δ 9.98 (s, 1H), 8.35 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 2H), 7.99 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.90 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.25 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.47 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.66 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 3.43 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.14–2.03 (m, 2H), 1.42 (s, 9H).	¹³ C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158.8, 151.8, 148.6, 147.7, 146.5, 142.9, 130.5, 129.6, 127.3, 126.6, 124.4, 123.6, 121.5, 121.0, 119.7, 118.6, 117.2, 111.5, 104.6, 80.0, 73.1, 57.7, 57.4, 38.1, 32.0, 28.8 (3), 27.9.	C ₂₉ H ₃₁ N ₂ O ₆ Br [M–Br] ⁺ : 513.217 7, found: 513.218 0.
12a	43	181–183	¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 10.02 (s, 1H), 8.42 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.80 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.54 (td, <i>J</i> = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.44 (td, <i>J</i> = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.19 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 6.21 (s, 2H), 5.26 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.33 (s, 3H), 4.15 (s, 3H), 3.72 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 151.2, 148.8, 147.0, 145.9, 143.7, 142.9, 137.9, 133.9, 133.7, 129.9, 129.5, 128.9, 127.9, 127.0, 126.7, 123.4, 121.9, 121.0, 119.0, 118.8, 118.5, 117.7, 113.1, 111.5, 103.0, 62.7, 57.3, 56.9, 39.5, 27.8.	C ₃₀ H ₂₃ N ₂ O ₄ Br [M–Br] ⁺ : 475.165 2, found: 475.165 3.
12b	37	192–194	¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 10.11 (s, 1H), 8.45 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.08 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.61–7.51 (m, 2H), 7.49–7.45 (m, 2H), 7.38 (s, 1H), 6.19 (s, 2H), 5.32 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.34 (s, 3H), 4.14 (s, 3H), 3.72 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 151.0, 148.4, 146.9, 145.8, 142.5, 141.3, 138.2, 133.8, 132.3, 130.6, 129.8, 129.2, 128.5, 126.9, 126.3, 123.2, 121.7, 120.7, 119.0, 118.7, 118.5, 117.5, 112.6, 111.4, 102.5, 62.8, 57.2, 56.8, 40.3, 27.6.	C ₃₀ H ₂₃ N ₂ O ₄ Br [M–Br] ⁺ : 475.165 2, found: 475.164 0.
12c	33	204–206	¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 10.12 (s, 1H), 8.47 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.14–8.02 (m, 3H), 7.64 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.52 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 5.32 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.34 (s, 3H), 4.13 (s, 3H), 3.72 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 150.6, 148.3, 148.1, 146.6, 145.6, 142.1, 141.6, 137.8, 135.1, 129.5, 128.8, 128.2, 126.6, 125.9, 123.4, 122.8, 121.7, 121.4, 120.4, 118.5, 118.2, 117.2, 111.0, 102.2, 62.5, 56.8, 56.4, 40.1, 27.3.	C ₂₉ H ₂₃ N ₂ O ₆ Br [M–Br] ⁺ : 495.155 1, found: 495.155 0.
14a	47	222–224	¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 9.86 (s, 1H), 8.44 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.15 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.41 (t, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 7.17–7.12 (m, 4H), 6.24 (s, 2H), 5.21 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.75 (s, 2H), 4.58 (q, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.14 (s, 3H), 3.68 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.57 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).	¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 151.6, 149.1, 146.2, 145.6, 143.5, 141.4, 137.0, 136.8, 130.0 (2), 129.6 (3), 129.3, 127.3, 126.7, 124.0, 121.7, 121.4, 119.6, 119.3, 118.1, 111.4, 103.1, 71.4, 57.3, 57.1, 40.8, 28.0, 21.14, 15.8.	C ₃₁ H ₂₈ NO ₄ Br [M–Br] ⁺ : 478.201 3, found: 478.201 7.
14b	39	225–227	¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 9.83 (s, 1H), 8.33 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.06 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.16 (s, 4H), 6.25 (s, 2H), 5.25 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.74 (s, 2H), 4.49 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.13 (s, 3H), 3.71 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.02 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.15 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).	¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 150.9, 148.6, 146.1, 144.7, 143.1, 141.2, 136.6, 136.2, 129.7 (2), 129.3 (2), 129.0, 128.9, 126.5, 126.3, 123.6, 121.1, 120.8, 119.2, 118.7, 117.5, 111.1, 102.7, 77.0, 57.2 (2), 40.6, 27.8, 23.9, 21.2, 10.5.	C ₃₂ H ₃₀ NO ₄ Br [M–Br] ⁺ : 492.216 9, found: 492.217 3.
14c	67	240–242	¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 9.81 (s, 1H), 8.37 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.35–7.32 (m, 3H), 7.27–7.23 (m, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.18 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 5.54 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 5.25–5.20 (m, 3H), 4.14 (s, 3H), 3.69 (dd, <i>J</i> = 8.4, 5.4 Hz, 2H), 2.02 (q, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 1.88 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 3H), 1.48 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 6H).	¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) δ 151.4, 149.0, 146.8, 145.3, 145.1, 143.0, 130.4 (2), 129.2 (2), 129.1 (2), 128.6 (2), 127.2, 126.4, 123.7, 122.3, 119.3, 119.0, 118.7, 118.0, 111.4, 102.8, 77.6, 57.2, 57.0, 42.3, 28.1, 23.2, 22.7 (2).	C ₃₂ H ₃₀ NO ₄ Br [M–Br] ⁺ : 492.216 9, found: 492.217 7.

Continued

No.	Yield /%	mp/°C (Dec.)	¹ H NMR	¹³ C NMR	HR-ESI-MS (m/z)
14d	59	187-189	¹ H NMR (600 MHz, CD ₃ OD) δ 9.99 (s, 1H), 8.41 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.4, 7.2 Hz, 2H), 7.29-7.24 (m, 3H), 6.24 (s, 2H), 5.22 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.59 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.14 (s, 3H), 3.94 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.70 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.19 (p, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H).	¹³ C NMR (151 MHz, CD ₃ OD) δ 151.6, 148.9, 146.2, 145.6, 143.3, 141.0, 139.8, 129.5 (2), 129.4, 129.2 (2), 129.1, 127.1, 127.0, 126.4, 123.8, 121.5, 121.3, 119.4, 119.3, 117.9, 111.4, 103.0, 72.8, 59.1, 57.3, 57.0, 41.1, 33.2, 27.9.	C ₃₁ H ₂₈ NO ₃ Br [M-Br] ⁺ : 494.196 2, found: 494.197 0.
14e	47	182-184	¹ H NMR (600 MHz, CD ₃ OD) δ 9.97 (s, 1H), 8.42 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.15 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.34-7.31 (m, 4H), 7.26-7.22 (m, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.16 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 5.54 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 5.32-5.11 (m, 2H), 4.58 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 4.14 (s, 3H), 3.93 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.69 (dt, <i>J</i> = 6.6, 1.8 Hz, 2H), 2.19 (p, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.88 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 3H).	¹³ C NMR (151 MHz, CD ₃ OD) δ 151.7, 149.1, 146.7, 146.4, 145.8, 145.6, 143.1, 129.4, 129.3, 129.2 (2), 128.8 (2), 127.4, 127.2, 126.6, 123.8, 121.6, 119.5, 119.4, 119.1, 118.2, 111.5, 102.9, 72.9, 59.2, 57.3, 57.1, 42.5, 33.4, 28.1, 22.8.	C ₃₂ H ₃₀ NO ₃ Br [M-Br] ⁺ : 508.211 9, found: 508.212 7.

2 抗阳性菌活性 SAR 研究

以左氧氟沙星 (levofloxacin, Lev) 为阳性对照, 评价了所有新合成的化合物对甲氧西林敏感的金黄葡萄球菌 (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA)、MRSA、VISA、甲氧西林敏感/耐药的表皮葡萄球菌 (methicillin-susceptible, -resistant *Staphylococcus epidermidis*, MSSE/MRSE) 在内的 7 株致病的革兰氏阳性菌的体外抑菌

活性 (表 2)。如表 2 所示, 前期 SAR 表明 CBBR 单取代时, 其 8-位引入 OH (**10**) 或 7-位引入苯基或对氯苯基 (**4a**、**4b**) 利于活性提高^[18,20], 基于优势基团组合理念, 首先对其 8-位保留羟基、7-位引入苯基和对氯苯基, 将 CBBR 亚甲二氧环打开, 得到以 CPMT 为母核的衍生物 **5a**、**5b**, MIC 介于 16~32 μg·mL⁻¹ 之间, 抗菌活性明显低于单取代化合物 **4a**、**4b** 和 **10**。然后, 将

Table 2 Antibacterial activities of the target compounds against drug-susceptible and drug-resistant gram-positive strains. ^aThe American Type Culture Collection (ATCC); ^bStrains isolated from patients in Chinese hospitals

No.	R ₁	R ₂	MIC/μg·mL ⁻¹								
			MSSE		MRSE		MSSA		MRSA		VISA
			ATCC 12228 ^a	13-3 ^b	ATCC 29213 ^a	13-17 ^b	ATCC 33591 ^a	13-18 ^b	ATCC 700698 ^a		
4a	C ₆ H ₅	CH ₃	4	4	16	8	16	16	32		
4b	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	CH ₃	2	2	2	4	8	8	16		
10	H	-	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5		
5a	C ₆ H ₅	H	64	64	64	32	32	64	64		
5b	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	H	32	32	16	16	16	16	32		
6	H	H	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		
7	2-Furoyl	H	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		
9a	C ₂ H ₅	H	1	2	2	1	2	2	2		
9b	C ₆ H ₅	H	32	32	32	64	32	32	64		
11	BocNH(CH ₂) ₃	H	8	8	32	32	32	64	64		
12a	CH ₃	<i>o</i> -CNC ₆ H ₄ CH ₂	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		
12b	CH ₃	<i>m</i> -CNC ₆ H ₄ CH ₂	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		
12c	CH ₃	<i>m</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CH ₂	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		
14a	C ₂ H ₅	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂	1	8	2	2	2	4	32		
14b	CH ₃ (CH ₂) ₂	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂	1	4	4	4	4	4	64		
14c	(CH ₂) ₂ CH	<i>α</i> -CH ₃ C ₆ H ₅ CH	4	8	4	4	4	4	64		
14d	(CH ₂) ₃ OH	C ₆ H ₅ CH	16	>64	>64	>64	>64	32	>64		
14e	(CH ₂) ₃ OH	<i>α</i> -CH ₃ C ₆ H ₅ CH	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		
Lev			0.06	4	0.06	0.5	0.125	32	8		

CPMT 的 C 环打开, 由此得到 2 个衍生物 **6** 和 **7**, 其 MIC >64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抑菌活性完全丧失, 提示环 C 为活性必需片段。其次, 保留 CBBR 母核, 同样对其 8-位保留羟基、7-位引入乙基和苯基得到 7,8-双取代衍生物 **9a**、**9b**, **9a** 的 MIC 介于 1~8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间, 明显强于衍生物 **9b**, 并且对 MRSA 和 VISA 的活性分别是 Lev 的 16 和 4 倍, 但是抗菌活性仍弱于单取代 **10**^[18]。

随后, 继续考察 8,13-双取代衍生物抗菌构效关系。对 CBBR 的 8-位引入长链大基团取代基得到较弱活性衍生物 **11**, MIC 介于 8~64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。将苯环上含吸电子基的苄基引入 CBBR 的 13-位得到目标物 **12a**~**12c**, 经抗菌活性评价, MIC >64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抗菌活性丧失, 此和前期报道的构效关系一致^[18,19]。基于此, 保留 CBBR 13-位为含供电子基, 将小基团乙基、正丙基、异丙基引入其 8-位得到 8,13-位双取代的衍生物 **14a**~**14c**, 发现其对除 VISA 外的其他测试菌株显示很强的抗菌活性, MIC 介于 1~8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间, 对临床分离的 MRSA 菌株强于 Lev, 此与 13-位引入含供电子的苄基的单取代衍生物活性相当。而 8-位为 3-羟基丙基衍生物 **14d**、**14e** 抗菌活性完全丧失。鉴于本文合成的所有化合物中, **9a** 具有良好的抗 MRSA/VISA 活性, 选其作为代表性化合物进行下一步体外药代稳定性研究和初步机制研究。

3 体外代谢稳定性评价

为进一步探讨此类化合物的成药性特点, 对代表性化合物 **9a** 开展了体外全血稳定性试验研究。选择临床用前药依那普利马来酸盐 (Enalapril maleate, Ems) 作为阳性对照药, 在 6 个不同时间点测定其残余浓度^[18,19], 结果如表 3 所示。前药 Ems 很容易被血液中的酯酶水解释放出原药, 在 3 h 时全部被酶解残余浓度为 0; 而化合物 **9a** 在 24 h 仍然有 81% 的残余率, 说明 **9a** 可能拥有较好的体外血浆稳定性。

Table 3 Metabolic stability of **9a** in whole blood

Compd.	Remaining ratio /%					
	0 h	0.5 h	1 h	3 h	7 h	24 h
9a	100	97.9	94.1	90.5	87.4	81.2
Enalapril maleate	100	33.1	12.9	0	0	0

随后, 以临床用药物睾酮 (testosterone, Tes) 为阳性对照, 评估了 **9a** 在人和大鼠的肝微粒体中的稳定性^[20]。从表 4 中可以看出, 对比 Tes, **9a** 在上述肝微粒体中具有较长的半衰期和较高的残余率; **9a** 在人和大鼠的肝微粒体中半衰期分别长达 76.2 和 105.9 min, 60 min 后的体外残余率仍有 62.1% 和 71.7%。综上, 认为 **9a** 可能具有较好的体外代谢稳定性。

Table 4 Metabolic stability of tested compound in human, rat and mouse liver microsomes. $t_{1/2}$ = half-life. $\text{CL}_{\text{int(mic)}}$ = microsomal intrinsic clearance. Liver weight: 20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for humans

Compd.	Species	$t_{1/2}$ /min	$\text{CL}_{\text{int(mic)}}$ / $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	Remaining Ratio/% ($t = 60 \text{ min}$)
9a	Human	76.2	18.2	62.1
	Rat	105.9	13.1	71.7
Testosterone	Human	15.0	92.2	6.0
	Rat	0.7	1972.9	0

4 分子对接研究

鉴于 CBBR 与喹诺酮类抗菌药相似的平面刚性结构, 本课题组前期初步证实 CBBR 类通过抑制拓扑异构酶 IV (Topo IV) 活性发挥强抗 MRSA 作用^[20,21], 与喹诺酮类相似。然而 CBBR 类对喹诺酮耐药的 MRSA 仍显示良好活性, 推测两者的作用位点可能不同。Topo IV 由两个亚基组成, 即亲水性的 ParC 亚基与疏水性的 ParE 亚基^[24-27]。本研究使用 Discovery Studio 4.5 软件, 以分子对接方法模拟代表性化合物 **9a** 分别和 ParC、ParE 活性腔的相互作用。结果显示, **9a** 和 ParE 对接得分较高 (-CDOCKER energy = 35.22), 如图 2 所示, 主要通过分子间范德华力、碳氢键、 π -烷基等产生强的相互作用, 很好地匹配 ParE 活性腔。而化合物 **9a** ($\text{CLogP} = 2.93$) 为疏水性小分子, 很难与喹诺酮的作用位点 ParC 亚基结合。因此, 推测化合物 **9a** 主要是通过靶向 Topo IV 的 ParE 亚基发挥强的抗 MRSA 活性。

结论

本研究针对 CBBR 母核分子中多个结构片段继续延伸开展结构修饰, 共设计合成了 15 个未见文献报道的全新化合物, 评价了其体外抗革兰氏阳性菌活性, 进一步补充 CBBR 类衍生物的抗菌构效关系: ① C 环为必需片段; ② 和 7-, 8-, 或 13-单取代衍生物活性相比, 7,8-和 8,13-双取代衍生物活性较弱或者相当。其中代表性化合物 **9a** 对临床难治的 MRSA 的 MIC 值达 1~2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显优于阳性对照药 Lev, 并且具有较好的体外代谢稳定性。分子对接实验表明 **9a** 可能是通过靶向 Topo IV 的 ParE 亚基进而发挥抗临床耐药菌 MRSA 活性, 与临床用抗菌药作用机制完全不同。CBBR 类衍生物组成了一类化学骨架新颖、作用机制独特的抗 MRSA 新型化合物, 值得进一步研究。

实验部分

熔点用 CXM-300 型精密熔点仪测定, 温度未校正; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 用 Bruker Avance III 500 和

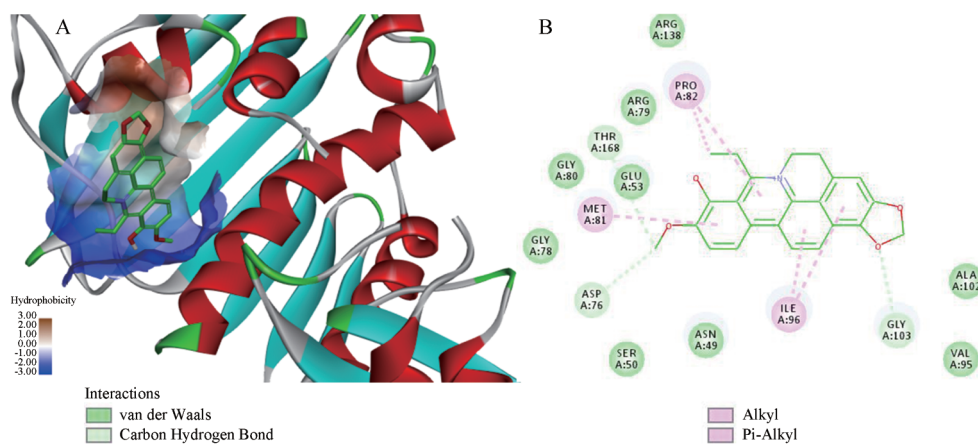


Figure 2 (A) Solid surface map of the interaction pocket with compound **9a**. Red, blue, and white colored regions correspond to negatively charged, positively charged, and neutral areas, respectively. (B) Binding modes within the receptor *S. aureus* Topo IV active pocket. The receptor structure is shown in surface form. Key bonds are indicated by dashed lines between the atoms involved, and the colors of key bonds and residues are shown according to the interaction mode (van der Waals, light green; carbon hydrogen bond, celadon; amide- π stacked, amaranth; alkyl and π -alkyl, mauve pink)

600核磁共振仪测定; HR-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; 荧光检测用ZF-20D暗箱式紫外分析仪; 薄层色谱(TLC)采用E-Merck公司预铺硅胶铝箔卷; 试剂均为分析纯。

1 化学合成

1.1 化合物**5a**、**5b**、**6**和**7**的合成

将溶有硼氢化钠(0.83 g, 22 mmol)的5%氢氧化钠溶液10 mL逐滴加入至含巴马亭(7.7 g, 20 mmol)和碳酸钾(8.3 g, 60 mmol)的250 mL甲醇溶液中, 室温搅拌3 h, 抽滤收集析出的黄绿色固体, 滤饼依次用蒸馏水(100 mL)和80%乙醇(100 mL)洗涤, 得到黄绿色二氢巴马亭**1**(6.1 g, 87%)。将**1**(6.0 g, 17 mmol)溶解在160 mL乙腈中, 分别加入乙酸40 mL和40%的乙二醛水溶液3 mL, 加热至85~90 °C回流6 h, 将反应液浓缩得深红色油状物**2**, 然后加入体积比为1:3的浓盐酸与甲醇200 mL, 室温搅拌24 h。将反应液浓缩, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得橙红色中间体CPMT(6.9 g, 74%)。

在0 °C、 N_2 保护条件下, 将相应格氏试剂(60 mmol)缓慢滴加到溶有CPMT(3.1 g, 7.5 mmol)的干燥THF溶液中, 0.5 h后将反应体系移至60 °C条件下, 继续反应3 h后, 用丙酮淬灭反应, 减压旋干后的固体溶解于二氯甲烷中, 用饱和氯化铵萃取, 有机层用无水硫酸钠干燥, 旋干后得到黄色固体。将其溶于乙醇中, 滴加溶有 Br_2 (7.5 mmol)乙酸溶液5 mL, 移至60 °C条件下继续反应1 h后, 冷却至室温, 抽滤, 用10% $Na_2S_2O_5$ 洗涤滤渣, 用二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化

得**4a**、**4b**。

在195~210 °C负压(20~30 mmHg, 1 mmHg = 133 Pa)下, 将**4a**、**4b**加热60 min得紫黑色固体。产物经5%盐酸/乙醇酸化, 减压除去溶剂, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得紫红色固体**5a**、**5b**。

将CPMT(107 mg, 0.26 mmol)溶于10 mL HMPA中, 在0 °C、 N_2 保护条件下, 依次加入80% NaH(16 mg, 0.52 mmol)和70% mCPBA(100 mg, 0.4 mmol), 将反应体系移至室温继续反应3 h, 加入甲醇5 mL淬灭反应, 将旋干后的固体溶解于二氯甲烷中, 用饱和碳酸氢钠萃取, 有机层用无水硫酸钠干燥, 旋干后得到淡黄色固体, 以石油醚-乙酸乙酯为流动相, 经硅胶柱分离纯化得白色固体**6**。

将**6**(100 mg, 0.24 mmol)溶于无水乙腈(5 mL)中, 加入三乙胺(66 μ L, 0.48 mmol)和2-呋喃甲酰氯(0.36 mmol), 40 °C反应2 h。加入水2 mL淬灭反应, 减压除去体系中溶剂, 将旋干后的固体溶解于二氯甲烷中, 用饱和碳酸氢钠萃取, 有机层用无水硫酸钠干燥, 以石油醚-乙酸乙酯为流动相, 经硅胶柱分离纯化得白色固体**7**。

1.2 化合物**9a**、**9b**、**11**、**12a**~**12c**和**14a**~**14e**的合成

在0 °C、 N_2 保护条件下, 将相应格氏试剂(60 mmol)缓慢滴加到溶有CBBR(3.0 g, 7.5 mmol)的干燥THF溶液中, 0.5 h后将反应体系移至60 °C条件下, 继续反应3 h后, 用丙酮淬灭反应体系, 减压除去体系中溶剂, 将旋干后的固体溶解于二氯甲烷中, 用饱和氯化铵萃取, 有机层用无水硫酸钠干燥, 旋干后得到黄色固体。将上述黄色固体溶于乙醇中, 滴加5 mL溶有 Br_2

(7.5 mmol) 的乙酸溶液, 将反应体系移至 60 °C 条件下继续反应 1 h 后, 冷却至室温, 抽滤, 用 10% Na₂S₂O₅ 洗涤滤渣, 再用二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得 **8a**、**8b**。

在 195~210 °C 负压 (20~30 mmHg, 1 mmHg = 133 Pa) 下, 将 **8a**、**8b** 加热 60 min 得紫黑色固体。产物经 5% 盐酸/乙醇酸化, 减压除去溶剂, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得紫红色固体 **9a**、**9b**。类似地, 将 CBBR (3.95 g, 10 mmol) 加热 60 min 得紫黑色固体, 得红色固体 **10** (3.5 g, 92%)。将化合物 **10** (198 mg, 0.52 mmol) 和 KOH (120 mg, 2.08 mmol) 混悬于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺 (6 mL) 中, 氮气保护下, 升温至 71 °C, 15 min 后加入 BocNH(CH₂)₃Br (2.08 mmol), 反应 8 h, 充分冷却抽滤析出的固体, 以二氯甲烷/甲醇体系梯度洗脱得橘黄色产物 **11** (47%)。

将 CBBR (0.79 g, 2 mmol) 和碳酸钾 (0.83 g, 6.0 mmol) 溶于 20 mL 95% 的甲醇中, 分批次加入硼氢化钠 (0.15 g, 4.5 mmol), 室温条件下反应 2 h 后, 抽滤体系中析出的固体, 分别用水 (20 mL) 和 80% 乙醇 (20 mL) 洗涤滤渣得到黄绿色固体。将该固体 (361 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) 和碳酸钾 (2.0 equiv) 溶于 20 mL 无水乙腈中, 加入相应的苯溴 (10.0 equiv), 反应体系回流 3~8 h, 冷却, 抽滤体系中析出的固体, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得目标物 **12a**~**12e**。然后 **12d**、**12e** 在 195~210 °C 负压 (20~30 mmHg, 1 mmHg = 133 Pa) 下, 加热 60 min 得紫黑色固体, 产物后经 5% 盐酸/乙醇酸化, 减压除去溶剂, 以二氯甲烷/甲醇为流动相, 经硅胶柱分离纯化得红色固体 **13d**、**13e**。将 **13d**、**13e** (0.52 mmol) 和 KOH (120 mg, 2.08 mmol) 混悬于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺 (6 mL) 中, 氮气保护下升温至 71 °C, 15 min 后加入相应的溴代烷烃 (2.08 mmol), 反应 6~12 h, 充分冷却抽滤析出的固体, 以二氯甲烷/甲醇体系梯度洗脱得目标物 **14a**~**14e**。

2 生物实验

2.1 抗阳性菌活性 MIC 测定

参照 CLSI 标准, 采用平皿二倍稀释法 (Agar dilution) 进行药敏实验。试验菌用 MH 肉汤或脑心浸液增菌, 药液用 MH 肉汤二倍稀释成各种所需浓度, 分别加适量到平皿中, MH 琼脂培养基融化后定量注入含药液的平皿内混匀。样品终浓度分别为: 64、32、……、0.06、0.03 μg·mL⁻¹。接种试验菌 (接种量为 10⁴ cfu/点) 后置 35 °C 恒温培养 18 h 后观察结果, 无菌生长的平皿中所含药物最小的浓度即为 MIC。

2.2 体外代谢稳定性实验

2.2.1 体外全血稳定性实验 实验当天取 SD 大鼠新

鲜血液于 37 °C 水浴中保温, 选 Enalapril 为阳性对照药。用 DMSO 将化合物 **9a** 和 Enalapril 配置成 10 mmol·L⁻¹ 溶液, 后用 45% MeOH/H₂O 稀释到 100 μmol·L⁻¹, 取 2 μL 稀释后的上述溶液置于 98 μL 新鲜血液中, 在 37 °C 水浴中分别孵育 0、1、5、10、30 min, 到达设置孵育时间后, 迅速加入 100 μL 水和 800 μL 孵育终止液 (含 200 ng·mL⁻¹ 甲苯磺丁脲和 20 ng·mL⁻¹ 丁螺环酮乙腈溶液), 以 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。取 100 μL 上清液与 200 μL 水混合, 振荡 10 min, 随后取样用 LC-MS/MS 分析。

2.2.2 肝微粒体稳定性实验 肝微粒体来源于 CD-1 小鼠、SD 大鼠和人, 每个孵育体系为 200 μL, 包括 0.1 mol·L⁻¹ 的 PBS 缓冲液 188 μL 和 NADPH 发生系统 12 μL, 冰浴中将 1~2 μL 药物加入孵育体系中, 37 °C 水浴中预热 5 min, 然后冰浴上加入肝微粒体酶 5 μL, 轻轻混匀, 37 °C 条件下孵育, 在 0、5、10、20、30、60 min 时间点采集样品, 按照标准方法, 加入含 100 ng·mL⁻¹ 甲糖宁和 100 ng·mL⁻¹ 拉贝洛尔的冰乙腈终止反应。样品用 LC/MS/MS 检测^[20]。

2.3 分子对接实验

本实验用以对接的活性腔选自 Topo IV 和化合物 kibdelomycin 共结晶中 kibdelomycin 所占的蛋白腔体 (PDB code 4URL, resolution: 2.29 Å)^[27]。对接软件为 Discovery Studio 4.5 工作站中 LibDock^[19]。对接之前先将小分子配体和目标蛋白进行预处理, 如小分子配体能量最低化、目标蛋白加氢、去水等^[28]。最后选择 Discovery Studio 4.5 打分最高相互作用模式作为最终对接结果。

References

- [1] Roberts S, Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue [J]. Intern Med J, 2005, 35: S97-105.
- [2] Mitchell DH, Howden BP. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia [J]. Intern Med J, 2005, 35: S17-S24.
- [3] Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, et al. Clinical presentation, etiology and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the international collaboration on endocarditis- prospective cohort study [J]. Arch Intern Med, 2009, 169: 463-473.
- [4] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections [J]. N Engl J Med, 1998, 339: 520-532.
- [5] Levy SB. Multidrug resistance--a sign of the times [J]. N Engl J Med, 1998, 338: 1376-1378.
- [6] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance [J]. Science, 1992, 257: 1064-1073.

- [7] Kong KF, Schneper LK. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology [J]. *APMIS*, 2010, 118: 1-36.
- [8] Purrello SM, Garau J, Giamarellos E, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of the currently available treatment options [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2016, 7: 178-186.
- [9] Auckland C, Teare L, Cooke F, et al. Linezolid-resistant *enterococci*: report of the first isolates in the United Kingdom [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 50: 743-746.
- [10] Grundmann H, Airesdesousa M, Boyce J, et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat [J]. *Lancet*, 2006, 368: 874-885.
- [11] Kupferschmidt K. Infectious diseases. Genome study helps contain MRSA outbreak-and breeds new questions [J]. *Science*, 2012, 338: 1019.
- [12] Antibiotic Resistance: The Global Threat . National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.). <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/31340>, 2015.
- [13] Hidayat LK, Hsu DI, Quist R, et al. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity [J]. *Arch Intern Med*, 2006, 166: 2138-2144.
- [14] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 40: 135-136.
- [15] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin [J]. *Lancet*, 1997, 350: 1670-1673.
- [16] Li YB, Zhao WL, Wang YX, et al. Discovery, synthesis and biological evaluation of cycloproberberine derivatives as potential antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 68: 463-472.
- [17] Fan TY, Hu XX, Wang YX, et al. Design, synthesis and anti-MRSA activities of cycloberberine derivatives with a novel chemical scaffold [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)* 2018, 53: 887-894.
- [18] 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.
- [19] Fan TY, Wang YX, Tang S, et al. Synthesis and antibacterial evaluation of 13-substituted cycloberberine derivatives as a novel class of anti-MRSA agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 157: 877-886.
- [20] Yang YS, Wei W, Hu XX, et al. Evolution and antibacterial evaluation of 8-hydroxy-cycloberberine derivatives as a novel family of antibacterial agents against MRSA [J]. *Molecules*, 2019, 24: 984.
- [21] Yang YS, Lu X, Zeng QX, et al. Synthesis and biological evaluation of 7-substituted cycloberberine derivatives as potent antibacterial agents against MRSA [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 168: 283-292.
- [22] Garcíá A, Castedo L, Domínguez D. Revision of the structures of linaresine and dihydrolinaresine [J]. *Tetrahedron*, 1996, 52: 5929-5932.
- [23] Ishii H, Ishikawa T, Lu ST, et al. Baeyer-Villiger-type oxidation of an Immonium group: the structural establishment of naturally occurring amides related to benzo[c]phenanthridine alkaloids [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1984, 1769-1774. DOI: 10.1039/P19840001769.
- [24] Badshah SL, Ullah A. New developments in non-quinolone-based antibiotics for the inhibition of bacterial gyrase and topoisomerase IV [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 152: 393-400.
- [25] Champoux J. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism [J]. *J Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 369-413.
- [26] Phillips JW, Goetz MA, Smith SK, et al. Discovery of kibdelomycin, a potent new class of bacterial type II topoisomerase inhibitor by chemical-genetic profiling in *Staphylococcus aureus* [J]. *Chem Biol*, 2011, 18: 955-965.
- [27] Sharma N, Sharma M, Shakeel E, et al. Molecular interaction and computational analytical studies of pinocembrin for its antiangiogenic potential targeting VEGFR-2: a persuader of metastasis [J]. *Med Chem*, 2018, 14: 626-640.