

L-高丝氨酸连接的双氢青蒿素及氟喹诺酮缀合分子研究

潘建芳^{1#}, 孙晓丽^{1#}, 范莉¹, 唐雪梅², 罗鹏¹, 杨大成^{1*}

(1. 西南大学化学化工学院, 重庆市高校应用化学重点实验室, 生物有机与药物化学研究所, 重庆 400715;

2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 基于多靶点药物设计思路以及双氢青蒿素和氟喹诺酮药物分子的活性优势, 采用活性片段拼接思路, 设计合成了 18 个未见文献报道的 L-高丝氨酸连接的双氢青蒿素及氟喹诺酮缀合物, 测试了抗结核分支杆菌和降血脂靶点 PCSK9 的体外活性。生物活性测试结果表明, 大多数目标分子具有抗结核活性, 其中 5 个化合物对于复制状态的结核分枝杆菌的抑制率在 80% 以上, 3 个化合物对于非复制状态的结核分枝杆菌 ($H_{37}Rv$) 的抑制率高于 50%; 构效关系分析发现 **TM2** (Boc 保护) 较 **TM1** (Cbz 保护) 系列化合物具有更好的抗结核活性。13 个目标分子的 PCSK9 抑制活性高于 72%, 且 **TM1-3** 达到了 92.30%, 显示良好的抑制活性。物理参数计算表明, 所有分子几乎无毒; 构毒关系分析可知, **TM2** 系列分子的安全性几乎都高于 **TM1**, 可能与目标分子中氨基酸保护基有关, 这对后续分子的设计和改构有一定的参考意义。本研究开创了 L-高丝氨酸残基作为多靶点药物分子联结结构的先例。

关键词: 双氢青蒿素; 氟喹诺酮; 抗结核活性; PCSK9 抑制活性; 高丝氨酸

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2157-13

Hybrid molecules of dihydroartemisinin with fluoroquinolones linked by L-homoserine have anti-tuberculosis and lipid-lowering effects

PAN Jian-fang^{1#}, SUN Xiao-li^{1#}, FAN Li¹, TANG Xue-mei², LUO Peng¹, YANG Da-cheng^{1*}

(1. Key Laboratory of Applied Chemistry of Chongqing Municipality, Institute of Bioorganic and Medicinal Chemistry,

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. School of Life

Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Eighteen dihydroartemisinin-fluoroquinolone molecules conjugated with L-homoserine were designed and synthesized using fragmented drug splicing approaches. The *in vitro* activities of the synthesized conjugates against *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and the lipid-lowering target PCSK9 were evaluated. The bioassay test results showed that most of the synthesized molecules had anti-tuberculosis (anti-TB) activity. Five compounds showed greater than 80% inhibitory activity against MTB in the replication state and three compounds exhibited more than 50% inhibitory activity against $H_{37}Rv$ in the non-replication state. A structure-activity relationship analysis demonstrated that **TM2** series compounds (Boc protection) have better anti-TB activity than **TM1** series compounds (Cbz protection). There were 13 compounds with strong inhibitory activity toward PCSK9 (>73%) and **TM1-3** compounds reached 92%. The determination of physical parameters showed that all the molecules are largely nontoxic. The structure-toxicity relationship analysis showed that the safety of **TM2** is higher than that of **TM1** in all parameters, perhaps related to the protecting group of the amino acid in the target molecule, and provides new ideas for the design and structural modification of subsequent molecules. This study sets a precedent for L-

收稿日期: 2020-03-10; 修回日期: 2020-04-04.

基金项目: 国家自然科学基金应急管理项目 (NSFC21542003); 中央高校基本业务费项目 (XDJK2019C043).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-13640566978, E-mail: hxydc@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0276

homoserine as a linking structural unit in multi-target drug molecules.

Key words: dihydroartemisinin; fluoroquinolone; antituberculosis activity; PCSK9 inhibitory activity; *L*-homoserine

青蒿素是中国科学家从植物黄花中提取的一种倍半萜内酯化合物, 结构新颖独特, 但结构本身难于直接修饰。双氢青蒿素 (DHA) 是青蒿素的还原产物, 不仅保留了抗疟活性的必要母体结构, 而且显示了比青蒿素更为优良的药学性质, 更为重要的是提供了直接进行结构修饰的反应位点—C-12位的羟基。中国科学家对DHA的羟基进行甲基修饰, 成功获得第一个青蒿素类抗疟药物蒿甲醚 (artemether)^[1]; DHA与丁二酸酐反应, 获得第二个青蒿素类抗疟药物—水溶性青蒿琥酯 (artesunate, 图1)^[2], 进一步显示了C-12位羟基修饰的前景。

DHA第一代衍生物的成功开发, 吸引了全球众多药物工作者的参与, 结构各异的DHA衍生物被合成出来; 这些O-苷、C-苷和N-苷类衍生物 (图2), 有的显示优异的抗疟活性, 有的表现为抗炎、抗肿瘤、抗肺纤维化、抗病毒、抗菌增敏或抗结核作用等^[3,4]。这些研究, 不仅证实了DHA的C-12位可以进行各种类型的修饰, 而且表明修饰产物可能具有多种多样的生物活性。

氟喹诺酮类 (FQs) 药物是喹诺酮药物发展史上的里程碑。FQs具有较高的口服生物利用度、良好的药代动力学特性和优异的抗感染活性, 已广泛应用于呼

吸道感染、胃肠道和泌尿道交叉感染、皮肤和软组织交叉感染、慢性骨髓炎以及性传播疾病等的治疗^[5,6]。进一步研究发现, FQs还具有多种非典型生物活性, 包括抗结核、抗肿瘤、抗人类免疫缺陷病毒 (HIV)、抗疟疾和抗阿尔茨海默病^[7]。FQs骨架是成药性最高的结构之一。2009年, 杨玉社研究团队^[8]开发的FQs新药盐酸安妥沙星成功上市; 最近几年, 国内外仍有大量的FQs研究论文发表或者活性分子甚至先导分子发现^[9,10]。分析上市药物和文献中的活性分子发现, 保留FQs基本骨架, 对其C-7位杂环的改变或修饰最多也最为成功。基于DHA和FQs的可修饰位点及其成功案例, 本研究设计了图3所示的分子模式。

为了验证研究的可行性, 选取第4代FQs中的明星分子克林沙星与简单的亚乙基和亚丙基连接, 获得了高活性的目标分子^[11] (图4)。

但是, 目标分子linker简单、FQs只选用了克林沙星。为了探索其他FQs及linker的可用性和新分子的生物活性, 本研究拟选取结构复杂的linker和多样性的FQs。考虑到分子的可连接性和FQs结构中XYZ的不同类型, 本研究尝试性地选择了如下9个FQs药物 (图5)。

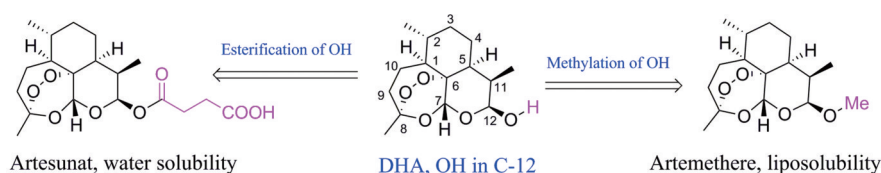


Figure 1 First-generation artemisinin antimalarials

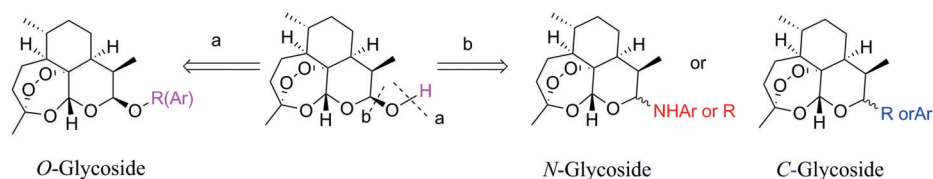


Figure 2 Some types of dihydroartemisinin (DHA) derivatives

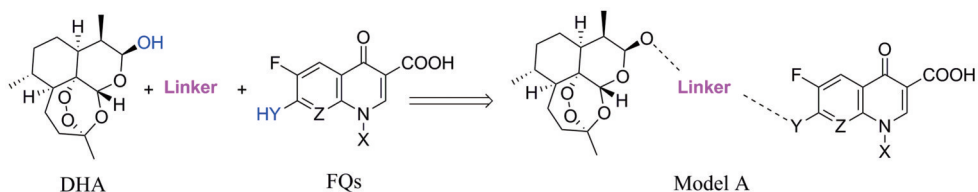


Figure 3 Model A of target molecule

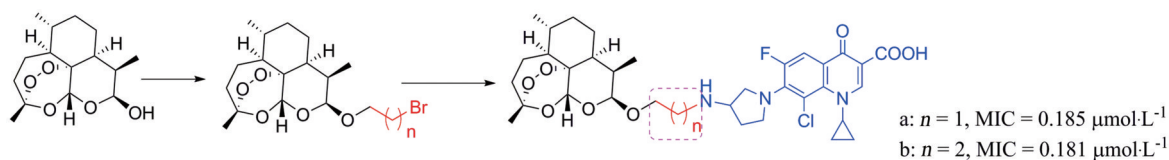


Figure 4 Highly bioactive molecules founded previously

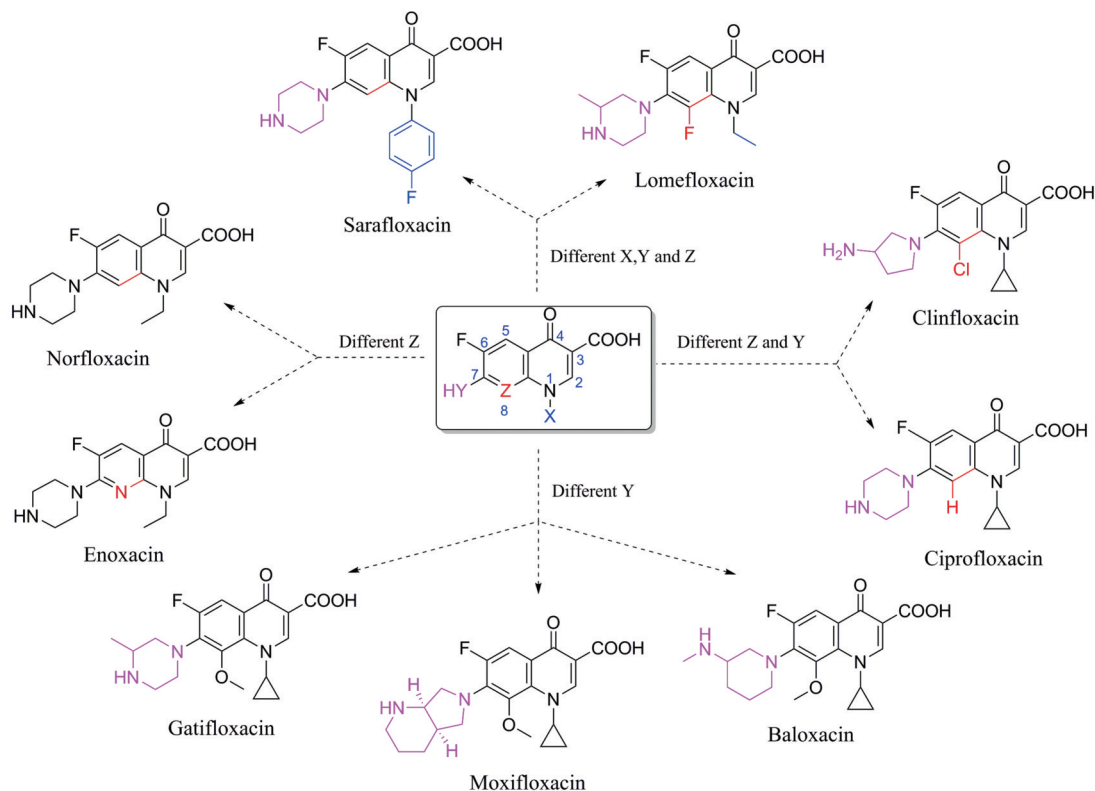


Figure 5 Nine selected fluoroquinolone drugs in clinical

众所周知, Linker 首先必须拥有连接功能, 其次尽可能满足分子量小、分子刚性适度、代谢片段无毒等基本要求。鉴于 Linker 是连接 DHA 的羟基和 FQs 的氨基, 那么 Linker 含有羟基和羧基具有优势。考虑到分子复杂、无毒以及结构可修饰等设想, 选定 *L*-高丝氨酸为设计分子的 Linker 骨架: *L*-高丝氨酸含有羟基、氨基和羧基 3 个官能团, 其中羟基和 DHA 连接、羧基和 FQs 反应, 剩下一个可以修饰的氨基。有文献报道, 氨基被保护的 *L*-高丝氨酸是合成非蛋白质氨基酸的重要

手性源化合物, 也是合成某些药物 (如抗癌物质刀豆氨酸和 *S*-腺苷甲硫氨酸等) 的重要中间体。为了调整分子的理化特性, 选择苄氧羰基 (Cbz)、叔丁氧羰基 (Boc) 这两个特色氨基保护基对 *L*-高丝氨酸的氨基进行修饰。作为尝试, 设计了两类目标分子 (图 6)。

基于目标分子模式, 本研究设计并合成了 18 个目标分子; 美国礼来制药公司 (Eli Lilly and Company) 进行生物活性测试, 得到多种生物活性。本文即报道上述研究结果。

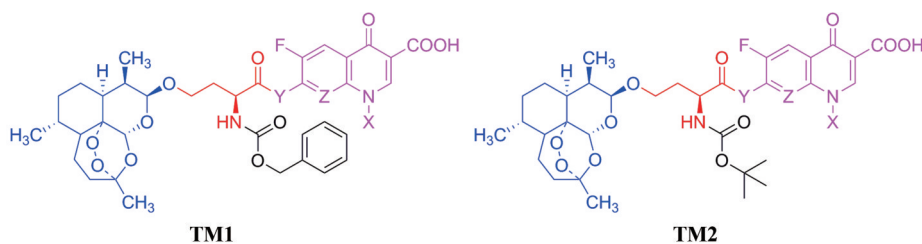


Figure 6 Designed target molecules

结果与讨论

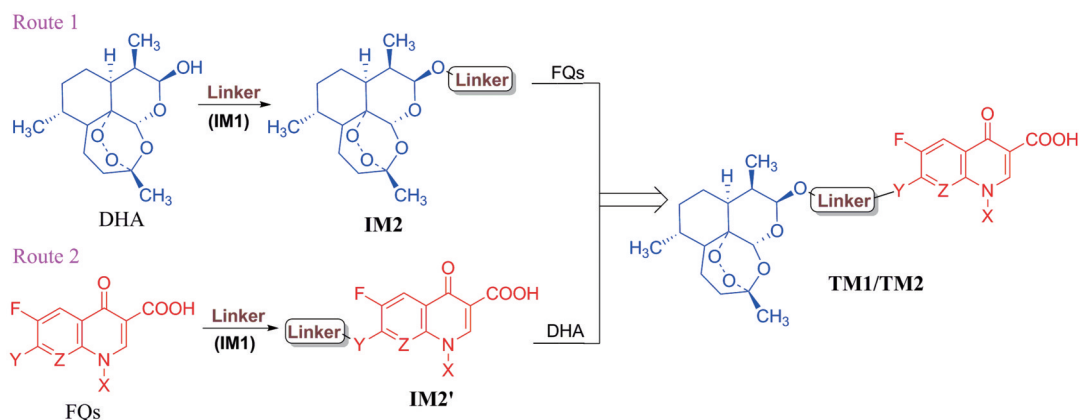
1 化学部分

设计的目标分子 **TM1/TM2**, 是双氢青蒿素与氟喹诺酮片段连接物, 结构由3部分组成, 因此有如下两条合成路线 (合成路线1)。

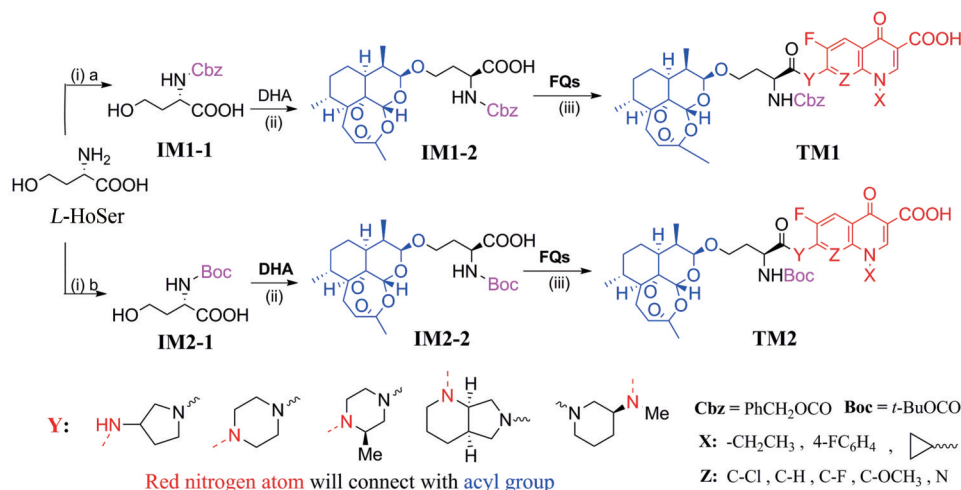
氨基酸进行 Boc 或 Cbz 保护得到 Linker 分子 **IM1**。Route 1 是先将 **IM1** 与 DHA 成醚连接, 合成关键中间体 **IM2**, 随后采用酰胺合成法连接沙星和 **IM2**, 进而合成目标分子 **TM**。此路线的优点是偶联片段大小相近, 有前期合成经验; 不足是沙星溶解性差, **IM2** 价格相对较高不宜超量使用, 可能影响反应速度和反应收率。Route 2 是先将沙星与 **IM1** 连接合成中间体 **IM2'**, 其后再和 DHA 偶联合成目标分子 **TM**。由于 DHA 过氧桥键不稳定, DHA 参与的反应越少越好; **IM2'** 溶解性可能比沙星好, 有利于其与 DHA 偶联。Route 2 看起来是一条不错的路线。但是本研究室前期研究发现, DHA 与含羟基的小分子能够形成醚键, 但与含羟基的复杂分子反应难度较大, 据此推测, 由

DHA 和中间体 **IM2'** 连接形成醚键的反应难度可能很大甚至不发生反应; 此外通过 Route 2 制备 **TM**, 从头到尾没有一个共同的中间体, 合成工作量很大, 不符合有机合成的基本原则。初步实验证实, **IM2'** 与 DHA 成醚反应不能进行。因此选择 Route 1 为 **TM1/TM2** 的合成路线 (合成路线2)。

L-高丝氨酸分别与 Cbz-Cl 和 Boc₂O 反应合成 **IM1-1** 和 **IM2-1**, 收率超过 90%。DHA 与高丝氨酸中的羟基反应, 未见文献报道, 作者发现用 BF₃·Et₂O 做催化剂、Et₂O 做溶剂, 在 -5 °C 控温反应最好, 收率可达 55% 左右。从 FQs 获取目标分子 **TM1** 及 **TM2** 的反应是酰胺形成反应。实验发现, 采用常规的多肽偶联法, 反应慢杂质多, 产物还不易纯化, 主要原因在于 DHA 的不稳定性和 FQs 的低溶解性。利用本研究室长期开展多肽合成和酰胺类化合物合成的丰富经验, 发现特戊酰氯是合成目标分子的最好试剂, 通过条件摸索, 较为顺利地合成了目标分子, 结果见表 1; 目标化合物的结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 确证, 具体数据见



Scheme 1 Synthetic routes of designed target molecules



(i) a. CbzCl, Na₂CO₃; b. (Boc)₂O, Na₂CO₃; (ii) DHA, BF₃·Et₂O, Et₂O; (iii) FQs, *t*-BuCOCl, DIPEA, DCM, -3 °C

Scheme 2 Synthetic routes of **TM1/TM2**

Table 1 Experimental results of **TM1/TM2**. *Yield (%) refers to the yield of step iii

TM	Y	Z	X	Time/h	Weight/g	Yield/%*
1-1		C-Cl		5.5	0.601	69
1-2		C-H		5.5	0.688	83
1-3		N	Et	5.0	0.594	72
1-4		C-H	Et	5.5	0.358	44
1-5		C-H		5.5	0.579	65
1-6		C-OCH ₃		3.3	0.402	46
1-7		C-F	Et	3.5	0.358	42
1-8		C-OCH ₃		3.5	0.672	74
1-9		C-OCH ₃		3.0	0.214	24
2-1		C-Cl		3.8	0.707	85
2-2		C-H		3.5	0.636	80
2-3		N	Et	4	0.596	76
2-4		C-H	Et	3.7	0.593	75
2-5		C-H		3.5	0.578	68
2-6		C-OCH ₃		4.2	0.467	55
2-7		C-F	Et	5.3	0.483	59
2-8		C-OCH ₃		4.3	0.469	54
2-9		C-OCH ₃		5.2	0.362	42

实验部分。

实验发现, 偶联反应的最适温度为 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。当 FQ 为克林沙星、环丙沙星、依诺沙星、诺氟沙星和沙拉沙星 (**TM1-1**~**TM1-5**, **TM2-1**~**TM2-5**) 时, **TM1** 系列的反应时间为 5.0~5.5 h, 产物收率 44%~83%, **TM2** 在相同条件下反应更快 (3.5~4.0 h) 且收率普遍更高 (68%~85%)。当 FQ 为加替沙星、洛美沙星、莫西沙星和巴洛沙星 (**TM1-6**~**TM1-9**, **TM2-6**~**TM2-9**) 时, **TM1** 的反应时间为 3.0~3.5 h, 收率 24%~74%; **TM2** 的反应时间 4.2~5.3 h, 收率 42%~59%。由于洛美沙星和巴洛沙星反应效果不好, 因此 **TM1-7**、**TM1-9**、**TM2-7** 和 **TM2-9** 的收率较低。**TM2** 的收率整体高于 **TM1**, 可能与保护基的种类及产物的溶解性有一定的关系, 也与有些杂质需柱色谱纯化才能除掉有关。

2 生物活性评价

2.1 抗结核活性与理化性质的关系

结核病 (tuberculosis, TB) 是结核分枝杆菌感染导致的重大传染病,

发病率和死亡率很高。结核病的治疗主要依赖化学药物。单一化学药物, 无论是新药还是传统老药, 长期用药后都会出现耐药性。为了克服耐药性, 一般采用联合用药和长期用药的策略。为了保证有药可用, 发现新型药物始终是医药界的追求。

FQs 药物是耐药结核病的核心治疗药物。青蒿素类药物是目前治疗疟疾的最好药物。为了研究目标分子的生物活性, 首先进行了抗结核活性测试。活性测试在美国礼来制药公司的 Open Innovation Drug Discovery program (OIDD) 平台进行。开展 **TM1/TM2** 系列分子对非复制状态 (hTHP-1) 和复制状态 ($H_{37}R_v$) 的结核分枝杆菌的抑制活性测试, 包括抑制率 ($5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个浓度)、半抑制浓度 (IC_{50}) 以及细胞毒性 (hTHP-1 Cytot) 测试。此外, 利用美国礼来制药公司提供的 Plexus 软件, 计算了目标化合物的理化性质 $clogP$ 及分子参数 TPSA 和 Fsp³ (统称“分子参数”, 见表 2), 并讨论了化合物的抗结核活性与分子参数之间的关系。

从表 2 看出, 在 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 测试浓度时, 几乎所有目标化合物对非复制状态的结核分枝杆菌 THP-1 的抑制率 (45.69%~92.95%) 比 DHA (7.7%) 显著提高: 抑制率在 80% 以上有 5 个化合物, 其中 **TM2-5** 达到了 92.95% ($IC_{50}=0.72\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); IC_{50} 在 $0.28\sim 1.70\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $IC_{50}<0.50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的分子就有 8 个。在 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 测试浓度时, 有 3 个化合物对于复制状态的结核分枝杆菌 $H_{37}R_v$ 的抑制率高于 50%, 特别是 **TM2-3** 达到了 62.7%。构效关系分析可以看出, **TM2** (Boc 保护) 较 **TM1** (Cbz 保护) 系列化合物具有更好的抗结核活性, 含有加替沙星 (**TM2-6/TM1-6**)、沙拉沙星 (**TM2-5/TM1-5**) 的分子对非复制状态的结核分枝杆菌的抑制率都很好 (>80%), 含有加替沙星 (**TM2-6/TM1-6**)、克林沙星 (**TM2-1/TM1-1**) 的分子对 $H_{37}R_v$ 、结核分枝杆菌的抑制率也不错 (强于 DHA)。此外, 测试的分子对两种细胞的抑制活性强度几乎不一致, 可能分子对复制与非复制细胞的抑制机制差异较大。

表 2 中 hTHP-1 Cytot. 表达分子对非复制结核菌株的细胞毒性, 通常 IC_{50} 值越大分子对细胞的毒性越低。所测试的分子, 其 IC_{50} 值在 $0.46\sim 6.22\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明这些分子对 hTHP-1 细胞毒性相差较大; 遗憾的是, 对 hTHP-1 细胞抑制率高于 80% 的化合物的细胞毒性虽不是最强但整体不低。

分子的理化性质及参数 (表 2) 也是先导化合物确定时必需考虑的因素。Fsp³ 是 sp³ 杂化碳数与总碳数的比值, 是描述化合物不饱和度的参数^[12]。有研究表明, 高的 Fsp³ 数值代表着分子拥有更多可旋转的碳, 意

Table 2 Anti-TB activity and parameters of target molecules **TM1/TM2**. "/": Not calculated or determined

TM	clogP	TPSA	Fsp ³	hTHP-1 w/ <i>M. tuberculosis</i> growth		hTHP-1 Cytot.	H ₃₇ Rv
				% Inhib. 5 μmol·L ⁻¹	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	%Inhib. 20 μmol·L ⁻¹
1-1	6.48	174.43	0.59	74.46	1.70	1.39	45.7
1-2	5.98	165.64	0.59	45.69	1.40	1.17	24.3
1-3	5.85	178.53	0.60	72.42	1.30	4.27	27.2
1-4	5.87	165.64	0.58	72.91	1.50	5.90	20.7
1-5	7.37	165.64	0.49	82.51	0.31	0.58	20.7
1-6	6.24	174.87	0.61	87.39	0.40	1.93	47.9
1-7	6.43	165.64	0.59	72.96	0.28	1.36	32.7
1-8	6.40	174.87	0.63	66.63	0.35	1.26	24.0
1-9	6.46	174.87	0.62	-105.0	/	/	59.8
2-1	5.81	174.43	0.71	77.69	0.29	2.42	58.3
2-2	5.31	165.64	0.71	68.20	1.40	0.46	10.6
2-3	5.18	178.53	0.72	68.59	0.83	4.96	62.7
2-4	5.20	165.64	0.70	64.02	1.10	6.22	15.4
2-5	6.70	165.64	0.59	92.95	0.72	1.36	28.2
2-6	5.57	174.87	0.72	83.13	0.30	2.11	41.3
2-7	5.76	165.64	0.71	81.07	0.40	1.56	40.1
2-8	5.73	174.87	0.73	67.39	0.49	1.99	35.1
2-9	5.79	174.87	0.73	64.39	1.10	1.03	26.6
DHA	/	/	/	7.7	/	/	33.9

味着分子柔性更好、空间适应性更强,以致分子中原有的苯环可以更好地与蛋白质残基中的芳香环产生 π - π 堆积作用^[13],从而与受体蛋白更好地结合。从表2看出,化合物Fsp³值大,其对H₃₇R_v的抑制活性可能大(如**TM2-3/2-1/2-6/1-6**)也可能小(如**TM2-9/2-8/2-2**),对hTHP-1的抑制活性与对H₃₇R_v的活性大致相同,虽然**TM2-5**的Fsp³不大(0.59)但其抑制活性最高(92.95%)、**TM1-5**的Fsp³不大(0.49)但其抑制活性不错(82.51%),表明Fsp³值和活性没有必然联系。

clogP是衡量分子脂溶性的重要指标。抗结核药物需要通过由磷脂双分子层组成的人体细胞膜和结核分支杆菌的高脂质含量的细胞壁,因此脂溶性直接影响着药物的透膜性、吸收、分布、代谢、外排和毒性。针对结核分枝杆菌,需要脂溶性较高的分子。本研究设计的18个分子的clogP \geq 5,与目前结核分子设计的趋势一致;从表2可以看出,**TM1**的clogP值整体上高于**TM2**,但是**TM1**系列分子的抑制活性,无论对hTHP-1还是H₃₇R_v,并非都好于**TM2**,虽然活性好的分子一般还是具有较高的clogP值。然而,clogP值最大(7.37和6.70)的两个分子**TM1-5**和**TM2-5**,抑制hTHP-1的活性是最强的,clogP值最小(5.20和5.31)的两个分子**TM2-4**和**TM2-2**,其抗结核菌活性确实是最低的,表明活性与clogP值一般成正比。

TPSA(拓扑极性表面积)是分子中极性原子的表面积总和,它是预测药物吸收能力的一个参数,常作为药物透膜性的评价指标^[14]。对于口服药物的TPSA应小于140,有助于口服吸收,但抗菌药物不同于一般药物,一般需要较大的TPSA。表2可以看出,活性好的

分子,一般来说TPSA值都较大,但并非TPSA值大的分子就有好的活性。

本研究所得分子的生物活性及分子参数,对后续研究应该具有一定的指导意义。

2.2 降血脂靶点 PCSK9 抑制活性 前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)是2003年发现的一个脂质代谢调节蛋白。大量研究发现,PCSK9能介导低密度脂蛋白受体降解,调节血浆低密度脂蛋白胆固醇水平。因此,抑制或降低PCSK9水平的治疗方法可有效治疗高胆固醇血症,已成为高胆固醇血症研究的热点^[15-17]。针对PCSK9的生理特点及作用机制^[18],PCSK9抑制剂可分为以下3种:抑制它与低密度脂蛋白胆固醇结合的单克隆抗体或小分子多肽;抑制PCSK9合成的反义寡核氨酸或小干扰RNA(siRNA);阻断PCSK9在内质网中的自身裂变的小分子抑制物。

目标化合物**TM1/TM2**系列的PCSK9抑制活性由美国礼来制药公司OIDD平台按照如下流程进行测试:首先进行单浓度初筛,采用AlphaLisa方法测试化合物对肝癌细胞Huh7分泌PCSK9的百分抑制率,并采用CellTiter-Glo试剂测试化合物对肝癌细胞Huh7活力的影响(细胞毒性);对初步筛选出的潜力分子进行多浓度测试;然后进行复筛,采用ELISA法检测24 h处理后Huh7细胞ApoA-I蛋白表达抑制。

由表3发现,在测试浓度下,有13个化合物的PCSK9抑制率超过72%,其中**TM1-3**、**TM1-7**、**TM2-9**、**TM2-8**、**TM2-5**的抑制率高于80%,且**TM1-3**达到了92.30%,显示良好的抑制活性。从结构上看,喹诺酮

Table 3 PCSK9 inhibitory activity of **TM1**/**TM2**

TM	Huh7 SP	Huh7 viability cell titer-Glo SP
	% Inhib@40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	% Inhib@40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1-1	46.43	30.89
1-2	75.28	45.18
1-3	92.30	72.11
1-4	45.40	31.82
1-5	52.73	29.19
1-6	76.50	49.20
1-7	89.53	68.96
1-8	73.65	53.33
1-9	77.53	39.18
2-1	72.73	38.50
2-2	32.84	32.58
2-3	79.59	46.22
2-4	54.73	31.98
2-5	83.40	55.55
2-6	74.31	65.48
2-7	79.08	51.71
2-8	87.92	63.36
2-9	88.64	59.09

环 8-位含有甲氧基的分子, 都显示较好的抑制活性。这是首次发现 *L*-高丝氨酸连接的双氢青蒿素-氟喹诺酮偶联物具有 PCSK9 抑制活性。遗憾的是, 活性较好的分子对肝癌细胞 Huh7 的细胞毒性可能较大。

2.3 目标化合物的毒性预测值 为寻找青蒿素-氟喹诺酮连接物的高活性低毒性的先导分子, 采用美国 Simulations Plus 公司开发的 ADMET-Predictor 7.0 软件预测 **TM1** 和 **TM2** 系列目标化合物的毒性, 包括心脏毒性 (TOX hERG)、致癌毒性 (TOX BRM Rat and BRM Mouse)、致突变性 (TOX MUT Risk) 和综合毒性 (TOX Risk), 给出毒性风险系数评估, 进而判断分子成药性。

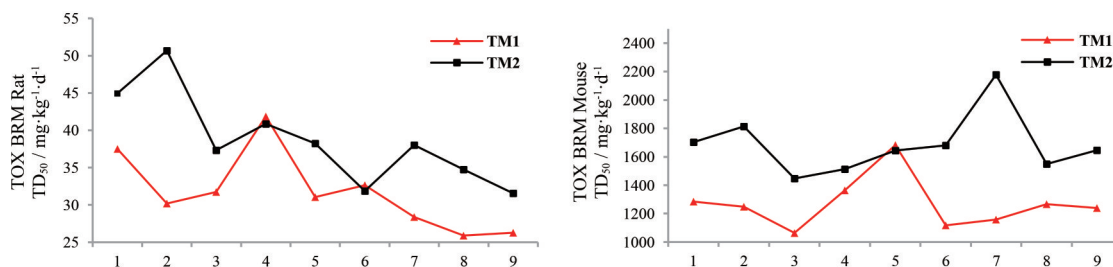
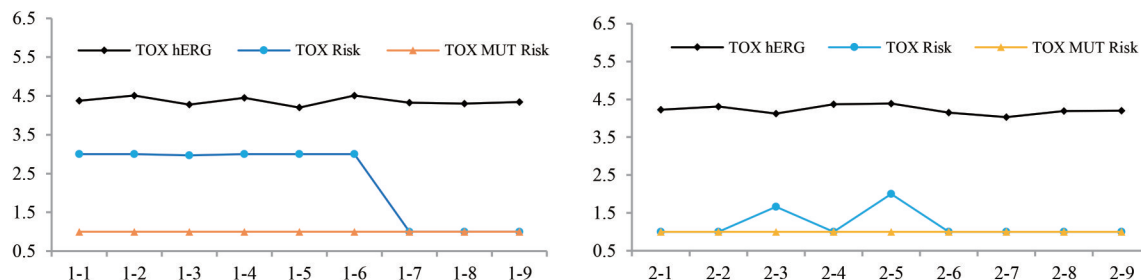
TOX-BRM-Rat 预测化合物的致癌性, 动物模型为大鼠, 规定 $\text{TD}_{50} \geq 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 为安全值, 从图 7 (左) 可以看出, 合成的 18 个化合物 $\text{TD}_{50} \geq 20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 应该没有致癌性。TOX-BRM-Mouse 也是预测化合物的致癌性, 但动物为小鼠, 规定 $\text{TD}_{50} \geq 25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 为安全值, 从图 7 (右) 可以看出, 所有分子均无致癌性。

从图 8 可以看出, 目标分子的心脏毒性 (TOX hERG) ≤ 4.51 , 而心脏毒性的规定值应小于 6.0, 预测无心脏毒性。TOX-MUT-Risk 是预测化合物在不同的沙门菌属中的致突变可能性的综合评价。目前大多数药物分子满足 TOX MUT Risk ≤ 2 的要求, 所有目标分子的 TOX MUT Risk 数值为 1, 表明它们均无致突变性。TOX-Risk 对于毒性的综合打分应当 ≤ 3.0 , 该风险系数越大, 表示化合物的毒性性质越不理想。图 8 显示, **TM2** 系列分子的毒性风险较低且低于 **TM1**。

综上所述, **TM2** 系列分子的安全性几乎都高于 **TM1**, 可能与这些分子中的氨基酸保护基有关, 表明分子的安全性可以通过结构修饰调整, 这为后续分子的设计和改构指明了方向。

3 结论

本研究采用活性拼接原理, 将 DHA 与 9 个氟喹诺酮药物分子通过高丝氨酸连接, 设计并合成了 18 个新分子, 收率 24%~85%。目标分子结构得到 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HR-MS 的确证。测试了所有目标化合物对 MTB 的体外活性和细胞毒性, 发现目标化合物对非复制状态结核分枝杆菌 (hTHP-1) 的抑制活性好于复制状态的结核分枝杆菌 ($H_{37}\text{Rv}$), 其中 **TM2-5** 对 hTHP-1 的抑制率高达 92.5%; 同一化合物对这两种 MTB 菌株

**Figure 7** Prediction results of carcinogenic toxicity of **TM1**/**TM2** (the left and right animal models are rats and mice, respectively)**Figure 8** The line chart of TOX hERG, TOX risk and TOX MUT risk of the **TM1**/**TM2**, and the ordinate represents the predicted value

的抑制活性差别很大。本研究首次发现, DHA 与 FQs 偶联物对 PCSK9 具有抑制活性。软件计算发现, 几乎所有目标分子都没有致癌性、致突变性、心脏毒性。这些研究结果, 为后续研究奠定了基础。

实验部分

1 目标化合物的合成

克林沙星、沙拉沙星(郑州克尔泰生化科技有限公司, >95%); 诺氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、加替沙星、莫西沙星(成都爱斯特贸易有限公司, AR); 依诺沙星、巴洛沙星、氯甲酸苄酯(Cbz-Cl)(上海达瑞精细化工有限公司, AR); 双氢青蒿素(重庆华立武陵山制药有限公司, AR); 46.5% 三氟化硼乙醚溶液($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)(上海晶纯试剂有限公司, AR); *L*-高丝氨酸(*L*-HoSer)、*N*-苄氧羰氧基丁二酰亚胺(*Z*-OSu)、二碳酸二叔丁酯(Boc_2O)(成都凯泰新技术有限责任公司, AR); 其余试剂均为市售化学纯或分析纯产品, 未经纯化直接使用。

磁力搅拌低温恒温水槽(PSL-1810, 上海爱朗仪器有限公司); 熔点测定仪(X-6, 北京福凯仪器有限公司); 自动旋光仪(WZZ-2S, 上海精密科学仪器有限公司); 核磁共振仪(600 MHz, Bruker, 瑞士, TMS 为内标); 高分辨质谱仪(HR-MS)(Varian7.0T, Varian, USA)。

1.1 中间体 IM1-1/IM2-1 的合成 于 100 mL 反应瓶中加入 *L*-HoSer (1 mmol)、冷却的饱和 Na_2CO_3 溶液 3 mL, 冰浴搅拌溶解; 滴加 Cbz-Cl/ Boc_2O (1.5 mmol) 的丙酮溶液 2 mL; 室温搅拌反应, 必要时补加 Na_2CO_3 溶液调节 pH>9; TLC-紫外荧光及茚三酮显色法监测反应进程。反应结束后, 加水 15 mL, 在 pH>9 时用乙醚 (10 mL×2) 萃取, 收集水相, 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸调节 pH 至 3~4, 乙酸乙酯 (10 mL×3) 萃取, 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, TLC-茚三酮显色法检查纯度, 减压蒸干, 真空干燥, 得中间体 IM1-1/IM2-1, 收率分别为 94%、92%, 低温保存。

1.2 中间体 IM1-2/IM2-2 的合成 于 100 mL 反应瓶中依次加入 IM1-1/IM2-1 (1.0 mmol) 及 Et_2O 3 mL, 室温搅拌溶解, 控温加入 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 0.2 mL, 搅拌 0.5 h, 加 DHA (1.5 mmol), 继续控温搅拌反应, TLC-紫外荧光和磷钼酸显色法监测反应进程。反应结束后, 加 Et_2O 15 mL, 饱和 NaHCO_3 溶液 (10 mL×3) 萃取, 合并水相, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸调节 pH 至 3~4, EtOAc (10 mL×3) 萃取, 合并有机相, 饱和 NaCl 溶液 (10 mL×3) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸干得到粗品; 柱色谱纯化, 收集洗脱液, 减压蒸干, TLC-紫外荧光和磷钼酸显色法检查纯度, 真空干燥, 得中间体 IM1-2/IM2-2, 收率分别为 55%、59%, 低温保存。

1.3 目标化合物 TM1/TM2 系列的合成 于 100 mL 反应瓶中依次加入 IM1-2/IM2-2 (1.2 mmol) 和二氯甲烷 (DCM) 3 mL, -3 °C 搅拌溶解, 顺次加入 *N,N'*-二异丙基乙胺 (DIPEA) (1.5 mmol) 和特戊酰氯 (1.5 mmol), -3 °C 搅拌反应 0.5 h, 分别加入 FQ (克林沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、莫西沙星、洛美沙星、加替沙星、依诺沙星或巴洛沙星)(1 mmol), 继续在 -3 °C 搅拌反应, TLC 监测反应进程。反应结束后, 减压抽滤, 滤饼用 DCM (2 mL×3) 洗涤, 合并洗液及滤液, 加 DCM 20 mL, 依次用饱和 NaHCO_3 溶液 (15 mL×2)、5% 柠檬酸水溶液 (15 mL×2)、饱和 NaCl 溶液 (10 mL×2) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸干得到粗品; 柱色谱纯化 [PE:EA=1:1 (体积比)], 收集洗脱液, 减压蒸干, 乙醚重结晶, TLC-紫外荧光和磷钼酸显色法检查纯度, 真空干燥, 得目标化合物 TM1/TM2。

TM1/TM2 系列化合物的表征数据如下:

TM1-1: 淡黄色固体, mp 159~161 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +69.7$ (*c* 1 mg·mL⁻¹, CH_2Cl_2)。¹H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.26 (1H, s), 8.92 (1H, s), 8.06 (1H, t), 7.36~7.31 (5H, m), 5.73 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.44 (1H, s), 5.14~5.07 (2H, dd, *J* = 12.0, 25.2 Hz), 4.86~4.84 (1H, m), 4.37~4.35 (1H, m), 3.95~3.78 (4H, m), 3.56~3.52 (1H, td, *J* = 3.6, 10.2, 19.8 Hz), 3.38~3.34 (3H, m), 2.67~2.66 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, *J* = 3.6, 14.4, 28.2 Hz), 2.07~2.00 (3H, m), 1.90~1.46 (8H, m), 1.43 (3H, s), 1.40 (1H, s), 1.34~1.21 (5H, m), 0.98~0.94 (6H, m), 0.86 (1H, d, *J* = 6.6 Hz); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.0, 171.0, 166.0, 157.4, 156.3, 155.7, 152.4, 138.0, 136.5, 128.7, 128.1, 124.7, 120.6, 112.3, 109.1, 104.3, 102.6, 91.4, 88.1, 81.1, 80.5, 67.1, 64.9, 52.7, 51.3, 48.3, 46.3, 45.5, 44.5, 42.9, 41.4, 37.6, 36.6, 34.9, 34.2, 32.7, 31.1, 26.3, 24.9, 22.3, 20.5, 13.2, 12.7, 11.6。HR-MS: *m/z* $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{ClFN}_4\text{O}_{11}$ [*M*+*Na*]⁺ 计算值为 889.320 28, 实测值为 889.317 27。

TM1-2: 淡黄色固体, mp 162~164 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +53.4$ (*c* 1 mg·mL⁻¹, CH_2Cl_2)。¹H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.68 (1H, s), 8.78 (1H, s), 8.16 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.98 (1H, s), 7.35~7.34 (5H, m), 5.90 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.44 (1H, s), 5.12~5.07 (2H, dd, *J* = 13.2, 18.6 Hz), 4.93~4.91 (1H, m), 4.85 (1H, s), 3.99~3.73 (5H, m), 3.60 (1H, s), 3.54~3.52 (1H, td, *J* = 3.0, 9.6, 19.2 Hz), 3.18~3.08 (4H, m), 2.67~2.65 (1H, m), 2.38~2.33 (1H, td, *J* = 3.0, 14.4, 27.6 Hz), 2.06~2.00 (2H, m), 1.89~1.60 (5H, m), 1.53~1.38 (7H, m), 1.27~1.22 (4H, m), 1.00 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 0.95 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.87 (1H, d, *J* =

6.6 Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.7, 170.9, 166.6, 156.3, 147.9, 137.5, 136.4, 128.6, 125.6, 119.7, 117.0, 108.8, 104.2, 102.6, 100.4, 91.3, 88.0, 81.1, 80.4, 67.0, 65.2, 64.8, 52.7, 51.4, 48.1, 45.6, 44.5, 42.3, 37.5, 36.5, 35.5, 34.8, 34.1, 32.6, 31.0, 27.2, 26.2, 24.8, 22.2, 20.4, 14.3, 13.1, 12.6, 8.3。HR-MS: m/z $\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{FN}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ 计算值为 871.333 19, 实测值为 871.323 02。

TM1-3: 淡黄色固体, mp 191~193 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +44.2$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.85 (1H, s), 8.70 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 8.16~8.12 (1H, t, $J = 12.6$ Hz), 7.36~7.30 (5H, m), 5.67 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.43 (1H, s), 5.13~5.06 (2H, q), 4.87 (1H, d, $J = 30.0$ Hz), 4.42~4.41 (3H, m), 3.93~3.91 (3H, m), 3.87~3.85 (5H, m), 3.73~3.71 (1H, m), 3.57~3.53 (1H, td, $J = 3.0, 9.6, 19.8$ Hz), 2.68~2.67 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.04~1.98 (2H, m), 1.90~1.88 (1H, m), 1.83~1.76 (2H, m), 1.61~1.58 (1H, m), 1.52~1.47 (5H, m), 1.43 (2H, s), 1.34 (4H, s), 1.28~1.23 (1H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.3, 176.9, 171.1, 166.8, 156.4, 148.4, 146.8, 145.1, 136.5, 128.7, 128.3, 128.1, 121.0, 120.9, 120.7, 109.8, 104.4, 102.7, 88.2, 81.1, 67.2, 65.0, 52.7, 48.3, 47.9, 47.3, 45.3, 45.0, 44.5, 41.9, 39.0, 37.7, 36.6, 34.9, 33.9, 31.0, 28.6, 26.3, 24.8, 20.5, 15.2, 13.2, 12.7。HR-MS: m/z $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{FN}_5\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 844.354 51, 实测值为 844.351 50。

TM1-4: 淡黄色固体, mp 132~134 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +47.3$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.97 (1H, s), 8.67 (1H, s), 8.03 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 7.35~7.29 (5H, m), 6.85 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.79~5.75 (1H, t), 5.44 (1H, s), 5.13~5.06 (2H, dd, $J = 12.0, 28.8$ Hz), 4.85~4.83 (1H, m), 4.34 (2H, q), 4.05~3.64 (6H, m), 3.56~3.52 (1H, td, $J = 3.0, 9.6, 19.2$ Hz), 3.4~3.24 (4H, m), 2.68~2.66 (1H, m), 2.40~2.34 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.06~1.99 (2H, m), 1.90~1.87 (1H, m), 1.82~1.74 (3H, m), 1.59 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.53~1.46 (2H, m), 1.36 (3H, s), 1.33~1.22 (3H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.86 (1H, d, $J = 6.6$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.0, 170.9, 167.0, 156.3, 154.4, 152.7, 147.4, 145.6, 137.2, 136.5, 128.6, 121.2, 113.0, 108.6, 104.3, 102.7, 100.6, 91.3, 88.1, 81.1, 80.5, 67.1, 64.9, 52.7, 51.8, 49.8, 48.3, 45.5, 44.5, 41.9, 37.6, 36.6, 34.8, 33.8, 32.8, 31.0, 26.3, 24.8, 22.2, 20.5, 14.6, 13.1, 12.6。HR-MS: m/z $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{FN}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 843.359 26, 实测值为 843.355 35。

TM1-5: 淡黄色固体, mp 158~160 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +233.0$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.75 (1H, s), 8.61 (1H, s), 8.03~7.99 (1H, m), 7.51~7.49 (2H, m), 7.38 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.32~7.28 (5H, m), 6.33 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 5.90~5.85 (1H, m), 5.44~5.34 (1H, m), 5.10~5.03 (2H, dd, $J = 13.2, 18.6$ Hz), 4.83~4.79 (2H, m), 3.99~3.79 (3H, m), 3.67~3.55 (2H, m), 3.51~3.48 (1H, td, $J = 3.0, 9.6, 19.2$ Hz), 3.21~2.96 (4H, m), 2.64~2.60 (1H, m), 2.38~2.33 (1H, td, $J = 3.0, 14.4, 27.6$ Hz), 2.03~1.94 (2H, m), 1.88~1.87 (1H, m), 1.76~1.72 (3H, m), 1.58~1.54 (1H, m), 1.47~1.45 (1H, m), 1.41 (3H, s), 1.34~1.32 (1H, m), 1.26~1.20 (2H, m), 0.98~0.91 (6H, m), 0.82 (1H, d, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.2, 170.8, 166.5, 164.2, 162.5, 156.2, 154.3, 152.7, 147.9, 145.2, 139.2, 136.0, 129.1, 128.5, 118.0, 112.3, 108.6, 106.1, 104.2, 102.5, 91.1, 88.0, 81.0, 80.3, 66.9, 64.8, 52.6, 51.7, 49.0, 48.1, 45.2, 44.3, 41.7, 37.5, 36.4, 34.7, 34.3, 33.5, 32.6, 30.9, 26.1, 24.7, 22.1, 20.3, 14.2, 13.0, 12.5。HR-MS: m/z $\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 909.349 83, 实测值为 909.344 92。

TM1-6: 淡黄色固体, mp 152~154 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +38.3$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.63 (1H, s), 8.83 (1H, s), 7.92 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.35~7.32 (5H, m), 5.74~5.65 (1H, m), 5.44 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.14~5.05 (2H, m), 4.96~4.84 (2H, m), 4.56~4.41 (1H, m), 4.02~3.65 (6H, m), 3.58~3.19 (6H, m), 2.68~1.66 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, m), 2.11~1.68 (7H, m), 1.62~1.50 (4H, m), 1.44~1.41 (3H, m), 1.36~1.20 (7H, m), 1.02~0.94 (6H, m), 0.87~0.86 (1H, m); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.2, 171.1, 166.7, 150.3, 146.0, 136.5, 134.3, 128.7, 128.1, 108.4, 104.3, 102.7, 91.4, 88.1, 81.1, 80.5, 67.1, 66.0, 64.9, 63.7, 55.7, 52.7, 51.9, 51.2, 45.6, 44.5, 40.6, 37.7, 37.6, 36.6, 34.9, 34.5, 31.1, 26.3, 26.2, 24.9, 22.3, 20.5, 17.0, 15.4, 13.2, 12.7, 9.7。HR-MS: m/z $\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{FN}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 899.385 47, 实测值为 899.382 63。

TM1-7: 淡黄色固体, mp 160~162 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +37.8$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.53 (1H, s), 8.63 (1H, s), 8.01 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.37~7.31 (5H, m), 5.73~5.66 (1H, m), 5.44 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 5.14~5.05 (2H, m), 4.93~4.83 (2H, m), 4.56~4.48 (3H, m), 3.94~3.86 (1H, m), 3.67~3.60 (1H, m), 3.56~3.51 (1H, m), 3.45~3.22 (4H, m), 2.71~2.64 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, $J = 3.6, 13.8, 27.6$ Hz),

2.08~1.72 (6H, m), 1.71~1.47 (7H, m), 1.42 (3H, t), 1.38~1.33 (3H, m), 1.27~1.23 (1H, m), 1.01~0.94 (6H, m), 0.86 (1H, d, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 176.4, 171.1, 166.5, 156.4, 154.6, 150.5, 136.5, 128.7, 127.3, 122.7, 108.6, 104.3, 102.7, 98.5, 91.4, 88.1, 81.1, 80.5, 67.5, 67.1, 66.0, 55.8, 54.7, 52.7, 51.9, 51.2, 49.5, 48.3, 45.6, 44.5, 37.6, 36.6, 34.9, 34.5, 33.8, 31.1, 26.3, 24.9, 22.3, 20.5, 16.5, 15.4, 13.2, 12.7。HR-MS: m/z $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 875.365 48, 实测值为 875.363 11。

TM1-8: 淡黄色固体, mp 164~166 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +118.1$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.92 (1H, s), 8.78 (1H, s), 7.81 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.35~7.28 (5H, m), 5.78~5.61 (1H, m), 5.40 (1H, d, $J = 18.6$ Hz), 5.32~5.25 (1H, m), 5.14~4.82 (4H, m), 4.55~4.52 (1H, m), 4.07~3.87 (4H, m), 3.59 (3H, s), 3.50~3.46 (3H, m), 3.25~3.16 (1H, m), 2.67~2.60 (1H, m), 2.40~2.30 (2H, m), 2.07~1.69 (8H, m), 1.61~1.42 (8H, m), 1.34~1.24 (4H, m), 1.13~1.08 (2H, m), 1.00 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.96~0.85 (3H, m), 0.84~0.82 (3H, m); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.0, 167.0, 156.4, 149.9, 141.8, 136.6, 134.6, 128.7, 128.3, 123.6, 108.1, 104.3, 102.8, 91.4, 88.1, 81.1, 67.1, 66.0, 65.0, 61.5, 56.7, 54.5, 52.7, 50.8, 48.8, 48.2, 44.5, 41.5, 40.6, 38.0, 37.7, 36.6, 35.7, 34.9, 34.6, 33.6, 31.1, 26.3, 25.4, 24.9, 23.9, 22.3, 20.5, 15.4, 13.1, 10.6, 8.7。HR-MS: m/z $\text{C}_{48}\text{H}_{59}\text{FN}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 925.401 12, 实测值为 925.398 14。

TM1-9: 淡黄色固体, mp 165~167 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +33.7$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.78 (1H, s), 8.87 (1H, t), 7.87 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.35~7.27 (5H, m), 5.84~5.76 (1H, m), 5.37~5.30 (1H, m), 5.13~5.01 (1H, m), 4.83~4.67 (2H, m), 4.44~4.35 (1H, m), 4.06~3.80 (5H, m), 3.63~3.41 (3H, m), 3.26~2.86 (5H, m), 2.37~2.23 (2H, m), 2.07~1.89 (7H, m), 1.74~1.63 (3H, m), 1.40 (2H, d, $J = 15.6$ Hz), 1.26~1.17 (9H, m), 0.95~0.85 (8H, m); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.3, 166.9, 150.7, 150.0, 139.6, 136.6, 133.9, 128.7, 128.2, 108.5, 108.0, 104.4, 102.6, 100.7, 100.2, 91.4, 88.1, 81.1, 80.5, 67.1, 64.9, 62.5, 54.3, 52.7, 51.7, 49.7, 48.9, 45.6, 44.5, 40.8, 37.6, 36.5, 34.8, 34.4, 32.6, 27.3, 26.7, 26.1, 24.9, 22.3, 20.4, 15.4, 12.7, 9.8。HR-MS: m/z $\text{C}_{47}\text{H}_{59}\text{FN}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 913.401 12, 实测值为 913.398 05。

TM2-1: 淡黄色固体, mp 132~135 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +70.5$

(c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.27 (1H, s), 8.92 (1H, s), 8.07 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 5.46 (1H, s), 5.38 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 4.85~4.84 (2H, m), 4.36~4.34 (1H, m), 3.94~3.91 (1H, m), 3.80~3.77 (2H, m), 3.55~3.51 (1H, td, $J = 3.0, 10.2, 19.8$ Hz), 3.39~3.34 (4H, m), 2.68~2.63 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.09~1.97 (3H, m), 1.91~1.88 (1H, m), 1.81~1.74 (3H, m), 1.61~1.58 (1H, m), 1.54~1.38 (16H, m), 1.32~1.31 (2H, m), 1.28~1.23 (3H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.8$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.90 (1H, t, $J = 7.8$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.0, 171.5, 166.0, 155.7, 152.4, 144.0, 138.1, 128.5, 128.0, 125.8, 124.7, 120.6, 112.2, 109.1, 104.3, 102.7, 88.2, 81.2, 79.9, 65.0, 52.8, 51.3, 47.6, 46.3, 45.2, 44.6, 42.9, 41.4, 37.6, 36.6, 35.0, 34.2, 31.1, 29.0, 28.5, 26.4, 24.9, 21.5, 20.5, 13.2, 11.6。HR-MS: m/z $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{ClFN}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 855.335 93, 实测值为 855.332 12。

TM2-2: 淡黄色固体, mp 141~144 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +43.3$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.68 (1H, s), 8.81 (1H, s), 8.15 (1H, s), 8.03 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.47 (1H, s), 5.42 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 4.86~4.85 (2H, m), 3.95~3.91 (1H, m), 3.85~3.77 (4H, m), 3.59 (1H, m), 3.54~3.51 (1H, m), 3.22~3.17 (3H, m), 3.09~3.08 (1H, m), 2.67~2.63 (1H, m), 2.40~2.34 (1H, td, $J = 3.0, 13.8, 27.6$ Hz), 2.05~1.96 (2H, m), 1.90~1.88 (1H, m), 1.81~1.73 (3H, m), 1.63~1.61 (1H, m), 1.53~1.44 (17H, m), 1.27~1.20 (4H, m), 1.00 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.8, 171.3, 166.7, 155.7, 154.8, 147.9, 147.6, 137.5, 136.5, 128.5, 128.0, 125.8, 119.7, 117.2, 109.0, 104.3, 102.7, 88.2, 81.2, 79.8, 65.0, 52.8, 51.5, 47.6, 45.6, 45.2, 44.6, 42.3, 37.6, 36.6, 35.5, 34.9, 34.3, 31.1, 28.5, 26.3, 24.9, 20.5, 13.2, 12.6, 8.4。HR-MS: m/z $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{FN}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ 计算值为 837.348 84, 实测值为 837.342 58。

TM2-3: 淡黄色固体, mp 135~137 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +64.3$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.88 (1H, s), 8.70 (1H, s), 8.13 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 5.46 (1H, s), 5.41 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 4.84~4.83 (2H, m), 4.42 (2H, s), 3.94~3.82 (7H, m), 3.74~3.73 (2H, m), 3.56~3.52 (1H, td, $J = 3.6, 10.2, 19.8$ Hz), 2.68~2.66 (1H, m), 2.41~2.35 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.05~1.96 (2H, m), 1.91~1.88 (1H, m), 1.79~1.77 (3H, m), 1.63~1.61 (1H, m), 1.52~1.37 (19H, m), 1.29~1.24 (1H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.97 (3H,

d, $J = 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.2, 171.6, 166.8, 155.7, 150.6, 148.4, 146.8, 145.1, 120.9, 114.6, 109.7, 104.3, 102.7, 88.2, 81.1, 80.0, 65.0, 52.7, 47.9, 47.3, 46.9, 45.2, 44.5, 41.9, 37.6, 36.6, 34.9, 33.8, 31.1, 28.5, 27.3, 26.3, 24.9, 20.5, 15.1, 13.2。HR-MS: m/z $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{FN}_5\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 810.370 16, 实测值为 810.367 39。

TM2-4: 淡黄色固体, mp 155~157 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +79.4$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.99 (1H, s), 8.68 (1H, s), 8.04 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 6.86 (1H, s), 5.47 (1H, s), 5.43 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 4.85~4.83 (2H, m), 4.36~4.34 (2H, m), 4.03~4.02 (1H, m), 3.92 (2H, s), 3.78~3.74 (2H, m), 3.54 (1H, m), 3.36~3.26 (4H, m), 2.67~2.65 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.02~1.99 (1H, m), 1.90~1.88 (1H, m), 1.80~1.78 (3H, m), 1.61~1.59 (4H, m), 1.48~1.34 (17H, m), 1.27~1.25 (1H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.97 (3H, d, $J = 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.1, 173.9, 171.3, 167.1, 155.7, 154.4, 152.8, 147.5, 145.7, 137.2, 121.2, 113.2, 108.7, 104.3, 102.8, 88.2, 81.1, 79.9, 65.1, 55.8, 52.7, 50.5, 49.9, 47.6, 45.4, 44.5, 41.9, 37.6, 36.6, 36.1, 34.9, 33.8, 31.1, 28.5, 26.3, 24.9, 20.4, 14.6, 13.2。HR-MS: m/z $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{FN}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 809.374 91, 实测值为 809.371 67。

TM2-5: 淡黄色固体, mp 180~182 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +65.9$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.76 (1H, s), 8.65 (1H, s), 8.09 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 7.45 (2H, s), 7.37 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 6.33 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 5.43 (1H, s), 5.31 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 4.80~4.75 (2H, m), 3.95~3.82 (3H, m), 3.68~3.55 (2H, m), 3.51~3.47 (1H, td, $J = 2.4, 9.6, 19.2$ Hz), 3.17~3.12 (3H, m), 2.96~2.93 (1H, m), 2.66~2.64 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.07~2.02 (1H, m), 1.95~1.88 (2H, m), 1.75~1.68 (3H, m), 1.60~1.58 (1H, m), 1.49~1.45 (2H, m), 1.41 (12H, s), 1.36~1.33 (1H, m), 1.28~1.23 (2H, m), 0.97 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.95 (3H, d, $J = 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.5, 171.1, 166.7, 164.4, 162.7, 155.6, 154.5, 152.9, 148.1, 145.5, 139.3, 136.2, 129.3, 120.5, 118.2, 112.9, 109.0, 106.2, 104.3, 102.8, 88.2, 81.1, 80.0, 65.1, 52.7, 50.2, 49.3, 47.6, 45.3, 44.5, 41.7, 37.6, 36.6, 34.9, 33.8, 31.1, 28.5, 28.5, 26.3, 24.9, 20.5, 13.2。HR-MS: m/z $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 875.365 48, 实测值为 875.366 06。

TM2-6: 淡黄色固体, mp 140~142 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +33.5$

(c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.66 (1H, s), 8.82 (1H, s), 7.90~7.87 (1H, dd, $J = 3.0, 11.4$ Hz), 5.50~5.40 (2H, m), 4.90~4.81 (3H, m), 4.04 (1H, m), 3.95~3.88 (2H, m), 3.79~3.69 (4H, m), 3.59~3.48 (3H, m), 3.37~3.34 (1H, m), 3.28~3.20 (1H, m), 2.68~2.66 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, m), 2.09~2.03 (2H, m), 1.98~1.89 (2H, m), 1.79 (3H, m), 1.62~1.60 (1H, m), 1.53~1.34 (20H, m), 1.28~1.24 (3H, m), 1.00~0.98 (3H, m), 0.96~0.95 (3H, m); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 177.1, 171.3, 166.6, 157.1, 155.7, 150.3, 146.0, 139.8, 134.2, 108.2, 104.3, 102.7, 100.2, 88.1, 81.1, 79.8, 64.9, 63.6, 55.6, 55.2, 52.7, 51.1, 45.6, 45.2, 44.5, 41.4, 40.5, 37.6, 36.6, 34.9, 33.4, 31.1, 28.5, 27.2, 26.3, 24.8, 20.5, 17.0, 15.6, 13.2, 9.8。HR-MS: m/z $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{FN}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 865.401 12, 实测值为 865.397 98。

TM2-7: 淡黄色固体, mp 148~150 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +53.7$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.58 (1H, s), 8.64 (1H, s), 7.99~7.97 (1H, m), 5.48~5.40 (2H, m), 4.86~4.83 (2H, m), 4.51~4.49 (2H, m), 3.96~3.86 (2H, m), 3.73~3.36 (5H, m), 3.31~3.20 (2H, m), 2.68~2.66 (1H, m), 2.40~2.35 (1H, td, $J = 3.0, 14.4, 28.2$ Hz), 2.05~2.03 (1H, m), 1.97~1.88 (2H, m), 1.79~1.77 (3H, m), 1.59~1.57 (4H, m), 1.52~1.47 (4H, m), 1.43 (12H, s), 1.38 (3H, t), 1.28~1.23 (1H, m), 1.01~0.98 (3H, m), 0.97~0.95 (3H, m); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 176.3, 174.2, 171.9, 171.6, 171.0, 166.5, 156.3, 155.6, 154.6, 150.4, 134.3, 127.2, 122.5, 108.4, 104.3, 102.7, 88.1, 81.1, 79.8, 64.9, 55.6, 54.8, 52.7, 51.1, 49.4, 47.6, 45.4, 44.5, 41.3, 37.6, 36.6, 34.9, 33.3, 31.1, 28.5, 26.3, 24.8, 20.6, 20.5, 16.5, 15.4, 15.2, 13.2。HR-MS: m/z $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 计算值为 841.381 13, 实测值为 841.381 47。

TM2-8: 淡黄色固体, mp 173~175 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +91.3$ (c 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, CH_2Cl_2)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 14.96 (1H, s), 8.80~8.78 (1H, m), 7.81 (1H, t, $J = 14.4$ Hz), 5.45~5.38 (2H, m), 5.29~5.28 (1H, m), 4.88~4.81 (2H, m), 4.57~4.53 (1H, m), 4.29~3.88 (5H, m), 3.60 (3H, s), 3.50~3.42 (2H, m), 3.27~3.16 (1H, m), 2.86~2.80 (1H, m), 2.67~2.60 (1H, m), 2.40~2.32 (2H, m), 2.10~2.04 (2H, m), 1.92~1.90 (3H, m), 1.81~1.80 (3H, m), 1.66~1.56 (4H, m), 1.50~1.43 (10H, m), 1.39~1.36 (4H, m), 1.33~1.25 (2H, m), 1.15~1.09 (2H, m), 0.99~0.84 (7H, m); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 176.9, 172.5, 167.1, 155.7, 153.3, 149.9, 137.2, 134.5, 119.3, 107.9, 104.3, 102.8, 88.1, 81.1, 79.7, 74.9,

65.0, 64.7, 61.5, 56.7, 54.4, 52.7, 50.8, 49.8, 48.2, 44.6, 41.4, 40.6, 37.6, 36.6, 35.7, 34.9, 33.5, 31.1, 28.5, 26.3, 25.7, 25.4, 24.9, 23.9, 20.5, 13.1, 10.6, 8.7。HR-MS: m/z $C_{45}H_{61}FN_4O_{12}$ $[M+Na]^+$ 计算值为 891.416 77, 实测值为 891.413 67。

TM2-9: 淡黄色固体, mp 126~128 °C, $[\alpha]_D^{23} = +45.5$ (c 1 mg·mL⁻¹, CH₂Cl₂)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 14.77 (1H, s), 8.82 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 7.87~7.84 (1H, dd, $J = 5.4, 12$ Hz), 5.50~5.39 (2H, m), 4.82~4.76 (2H, m), 4.70~4.66 (1H, m), 4.06~4.04 (1H, m), 3.86 (3H, d, $J = 10.2$ Hz), 3.52~3.48 (2H, m), 3.40~3.38 (1H, m), 3.27~3.23 (1H, m), 3.10~3.05 (4H, m), 2.95 (1H, s), 2.66~2.60 (1H, m), 2.39~2.34 (1H, td, $J = 3.6, 14.4, 28.2$ Hz), 2.05~2.02 (1H, m), 1.94~1.89 (4H, m), 1.81~1.73 (3H, m), 1.69~1.60 (2H, m), 1.51~1.41 (13H, m), 1.32 (3H, s), 1.27~1.21 (4H, m), 1.06~1.02 (1H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.89 (1H, d, $J = 7.2$ Hz); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 177.2, 174.8, 173.0, 166.9, 157.7, 156.0, 150.1, 146.3, 139.6, 133.9, 122.5, 108.4, 107.9, 104.3, 102.8, 88.1, 81.1, 79.7, 65.0, 62.4, 54.2, 53.3, 52.7, 51.7, 48.3, 45.2, 44.6, 40.8, 37.6, 36.6, 34.9, 33.7, 31.1, 30.5, 28.9, 28.5, 28.4, 27.4, 26.3, 25.7, 24.9, 20.5, 13.1, 9.5。HR-MS: m/z $C_{44}H_{61}FN_4O_{12}$ $[M+Na]^+$ 计算值为 879.416 77, 实测值为 879.414 04。

2 生物活性测试

测试工作由美国礼来制药公司的 OIDD 平台以及美国传染病研究所 (Infectious Disease Research Institute, IDRI) 的研究团队完成, 具体实验结果见表 2、3。测试方法参见文献^[19-21]。

3 目标化合物的毒性预测^[22-24]

为寻找青蒿素-氟喹诺酮连接物的高活性低毒性的先导分子, 采用美国 Simulations Plus 公司开发的 ADMET-Predictor 7.0 软件计算目标化合物的心脏毒性、致癌毒性、致突变性和综合毒性, 同时也用美国礼来制药公司提供的 Plexus 软件, 计算了目标化合物的物理参数 (表 2), 对需合成的目标分子先计算、再合成和测试活性。

致谢: 美国礼来制药公司和美国传染病研究所研究团队在活性测试方面提供的帮助。本学院老师在质谱和核磁共振测试中提供的支持和帮助。

作者贡献: 潘建芳负责部分实验, 论文的撰写、修改和校对; 孙晓丽负责分子设计、大多数化合物的合成, 文本校对; 范莉、唐雪梅、罗鹏负责少数分子合成, 文本修改、校对; 杨大

成负责课题规划, 指导实验的设计、化合物的合成, 对外联系, 文本的修改。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Li GQ, Li Y, Li ZL, et al. Artemisinin Antimalarials (青蒿素类抗疟药) [M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [2] Lin AJ, Klayman DL, Milhous WK. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives [J]. J Med Chem, 1987, 30: 2147-2150.
- [3] Jiang WW, Qian Y. Research progress on antibacterial activity of artemisinin and its derivatives [J]. China Pharm (中国药房), 2019, 30: 2003-2007.
- [4] Zhang N, Liu Y, Li Y, et al. Enhancement of water solubility and anti-tuberculosis activities by a novel artemisinin derivative [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 36-40.
- [5] Zhang GF, Zhang S, Pan B, et al. 4-Quinolone derivatives and their activities against gram positive pathogens [J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 710-723.
- [6] Hu YQ, Zhang S, Xu Z, et al. 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities [J]. Eur J Med Chem, 2017, 141: 335-345.
- [7] Wang AP, Feng LS, Liu ML, et al. Recent research progress of fluoroquinolones antibacterials [J]. World Notes Antibiot (国外医药抗生素分册), 2019, 40: 171-179.
- [8] Yang ZY, Sun DM. Antofloxacin hydrochloride, the first innovative fluoroquinolone drug in China, was successfully developed [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2009, 33: 435-436.
- [9] Sriram D, Aubry A, Yogeewari P, et al. Gatifloxacin derivatives: synthesis, antimycobacterial activities and inhibition of mycobacterium tuberculosis DNA gyrase [J]. Cheminform, 2006, 16: 2982-2985.
- [10] Carta A, Palomba M, Paglietti G, et al. [1,2,3]Triazolo[4,5-h]quinolones. a new class of potent antitubercular agents against multidrug resistant mycobacterium tuberculosis strains [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17: 4791-4794.
- [11] Zhou FW, Lei HS, Fan L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dihydroartemisinin-fluoroquinolone conjugates as a novel type of potential antitubercular agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24: 1912-1917.
- [12] Lovering F, Bikker J, Humblet C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success [J]. J Med Chem, 2009, 52: 6752-6756.
- [13] Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates [J]. J Med Chem, 2002, 45: 2615-2623.
- [14] Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, et al. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties [J]. J Med Chem, 2002, 45: 2615-2623.

- [15] Cao A, Wu M, Li H, et al. Janus kinase activation by cytokine oncostatin M decreases PCSK9 expression in liver cells [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52: 518-530.
- [16] Li H, Dong B, Park SW, et al. Hepatocyte nuclear factor α plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 28885-28895.
- [17] Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: 172-177.
- [18] Desai NR, Kohli P, Giugliano RP, et al. AMG145, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin kexin type 9, significantly reduces lipoprotein(a) in hypercholesterolemic patients receiving statin therapy: an analysis from the LDL-C assessment with proprotein convertase subtilisin kexintype 9 monoclonal antibody inhibition combined with statin therapy (LAPLACE)-thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 57 trial [J]. *Circulation*, 2013, 128: 962-969.
- [19] Liu J, Ren ZH, Fan L, et al. Design, synthesis, biological evaluation, structure-activity relationship, and toxicity of clinafloxacin-azole conjugates as novel antitubercular agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27: 175-187.
- [20] Ollinger J, Bailey MA, Moraski GC, et al. A dual read-out assay to evaluate the potency of compounds active against mycobacterium tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e60531.
- [21] Basak A, Chen A, Majumdar S, et al. *In vitro* assay for protease activity of proprotein convertase subtilisin kexins (PCSKs): an overall review of existing and new methodologies [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 768: 127-153.
- [22] Feng JZ, Liu HP, Fan L, et al. A series of Mannich bases with anti-leukemia activity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 766-772.
- [23] Huang M, Xu J, Fan L, et al. Design, synthesis and antidiabetic activities of 5-arylmethylenethiazolidine-2, 4-dione derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1287-1298.
- [24] Liu JY, Su XY, Li HC, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel *L*-phenylglycine derivatives as potential PPAR γ lead compounds [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 4153-4167.