

5-氰基-2-硫乙酰芳氨嘧啶酮类 DENV NS5 RdRp 抑制剂的 设计、合成及活性研究

王靖博^{1#}, 李春艳^{2,3,4#}, 赵子衿¹, 杨柳萌², 张洪彬^{1*}, 郑永唐^{2*}, 何严萍^{1*}

(1. 云南大学化学科学与工程学院, 自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223; 3. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 4. 中国药科大学基础与临床学院, 江苏 南京 211100)

摘要: 为了筛选新型的抗登革热病毒 (DENV) NS5 RdRp 酶抑制剂, 本论文采用分子杂合的方法, 基于嘧啶酮类 HCV NS5B RdRp 抑制剂 **3jc** 和 ZIKV NS5 RdRp 抑制剂 **4w** 的结构, 设计合成了一系列 5-氰基-2-硫乙酰芳氨嘧啶酮化合物。通过 MTT 法及噬斑法体外抗 DENV 活性筛选发现其中 5 个化合物显示了抗 DENV 活性, 其中活性最高的化合物 **7a'k** 的抗病毒活性优于阳性对照物利巴韦林 ($EC_{50} = 7.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs $EC_{50} = 18.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其余 4 个化合物与利巴韦林活性相当。最后通过分子对接分析了可能的结合模式, 为该类新型 DENV NS5 RdRp 酶抑制剂进一步研究提供了思路。

关键词: 登革热病毒 NS5 RdRp 酶抑制剂; 合成; 抗登革热病毒活性; 分子对接

中图分类号: R962 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3379-10

Design, synthesis, and activity of 5-cyano-2-thiacetyl aromatic pyrimidinone as DENV NS5 RdRp inhibitors

WANG Jing-bo^{1#}, LI Chun-yan^{2,3,4#}, ZHAO Zi-jin¹, YANG Liu-meng², ZHANG Hong-bin^{1*},
ZHENG Yong-tang^{2*}, HE Yan-ping^{1*}

(1. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource Ministry of Education, School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China; 4. School of Basic Medicine and Clinic Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China)

Abstract: To screen novel anti-dengue virus (DENV) NS5 RdRp enzyme inhibitors, a series of 5-cyano-2-thiacetyloaryl pyrimidinone compounds were designed and synthesized by molecular hybridization method with HCV NS5B RdRp inhibitor **3jc** and ZIKV NS5 RdRp inhibitor **4w** as lead compounds. The anti-DENV activity of these compounds was evaluated by MTT assay and plaque assay and five compounds showed anti-DENV activity. The most active compound **7a'k** showed better anti-DENV activity than that of the positive control ribavirin ($EC_{50} = 7.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs $EC_{50} = 18.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and the other four compounds showed almost the same anti-DENV

收稿日期: 2023-02-20; 修回日期: 2023-03-17.

基金项目: 国家自然科学基金 (21967020, 82273820, U1702286); 云南省重点研发计划 (202103AC100005, 202103AQ100001); 国家重点研发计划 (2019YFE0109200).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-871-65031119, E-mail: zhanghb@ynu.edu.cn;

Tel / Fax: 86-871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn;

Tel / Fax: 86-871-65031119, E-mail: yphe@ynu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0197

activity as ribavirin. Finally, the prediction and simulation of the binding mode through molecular provided new ideas for the further development of this new DENV NS5 RdRp inhibitor.

Key words: dengue virus NS5 RdRp inhibitor; synthesis; anti- dengue virus activity; molecular docking

登革热是由登革热病毒 (DENV) 引起的, 由雌性伊蚊携带并传播的病毒性疾病, DENV 病毒与黄病毒 (HCV)、寨卡病毒 (ZIKV) 同属于黄病毒科, 是黄病毒属的一个血清亚群^[1-3]。据估计, 每年约有 4 亿人感染 DENV 病毒^[4,5]。感染者通常会伴随出现头痛、关节痛、皮疹、白细胞减少等症状。并可能出现轻度无症状登革热 (DF) 或者严重登革出血热 (DHF), 更严重者甚至会出现伴有休克的登革休克综合征 (DSS)^[6]。此外, DENV 有 4 种血清型 DENV (1~4), 同一个体可以多次感染 DENV 病毒^[7,8], 这为登革热疫苗和特效药的研发带来了巨大的困难。因此, 研究高效低毒的抗 DENV 药物具有重大意义。

DENV 病毒有 3 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白, 结构蛋白影响着病毒的进入、组装和在宿主细胞中的释放, 非结构蛋白参与病毒 RNA 复制病毒组装和宿主免疫反应^[9-12]。其中非结构蛋白 NS5 由 900 个氨基酸残基组成, 是最大的黄病毒蛋白, 也是病毒蛋白中最保守的^[13,14]。NS5 蛋白的 N 端 (残基 1~296) 为甲基转移酶 (MT) 结构域, 负责给病毒 RNA 加帽^[15,16]; C 端 (残基 320~900) 为 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 结构域, 负责病毒 RNA 的合成^[17,18]。RdRp 酶是黄病毒科中常见的一类酶, 不同黄病毒属病毒的 NS5 RdRp 酶有很高的同源性^[19], 其结构被比作右手: 由拇指、手指、手掌 3 个结构子域组成^[20-22]。由于宿主细胞中不存在 RdRp 类似结构的蛋白, 所以 RdRp 酶抑制剂将具有很好的病毒特异性, 是开发抗登革病毒药物研究的重要靶点^[23]。

本课题组长期从事多取代嘧啶酮类抗病毒新药研究^[24-28], 最近报道了一系列新型的 5-烷基-2-硫乙酰芳胺嘧啶酮类抗 ZIKV 活性化合物^[29], 其中化合物 **4w** 靶向 ZIKV NS5 RdRp, 主要和 NS5 RdRp 的手掌结构域结合, 其抑制活性 IC_{50} 为 $7.65 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1B)。有趣的是, 将化合物 **4w** 与 DENV NS5 RdRp 酶 (PDB:5K5M) 进行分子对接发现, 化合物 **4w** 与 NS5 RdRp 有较好的结合, 其嘧啶酮环和 C-6 环已烷伸入了由 Trp-803、Ala-799、Met-761 等残基组成的疏水口袋—“N 口袋”, 该疏水口袋位于 NS5 RdRp 酶的拇指结构域中, Zhou 等^[29-31]研究发现, 抑制剂小分子与该口袋的结合的强弱对 RdRp 酶活性有重要影响。**4w** 嘧啶酮环的 1-NH 和 C-4 羰基分别与拇指区“N 口袋”中 Ser-796、Arg-729

形成了氢键, C-2 侧链则与手掌区残基 Asp-664 形成了氢键 (图 1A)。另外, Ding 等^[23,33]报道了通过高通量筛选及结构修饰后得到的 HCV NS5 RdRp 酶抑制剂 **3jc**, 其 IC_{50} 为 $3.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1B)。**4w** 与 **3jc** 同为 2,5,6-三取代的嘧啶酮类衍生物, 结构上具有一定的相似性, 且它们同样作用于黄病毒中保守的 NS5 RdRp 酶。DENV、ZIKV 及 HCV 同属黄病毒, 基于它们 NS5 RdRp 酶的高度同源性, 推断该类型化合物也可能具有抗 DENV 活性。因此, 为了筛选新骨架的抗 DENV 抑制剂, 本文采用分子杂合的方法, 在保留嘧啶酮母环的基础上, 将 **4w** 的 C-2 位硫乙酰芳胺侧链及 **3jc** 的 C-6 位取代苯环、C-5 氨基拼合以构建目标化合物的结构, 对 R_1 取代位, 保留了 4'-F 和 3',5'-2F 的优势基团, 而在 R_2 位置引入多种不同的取代基以增加结构多样性, 从而设计合成了一系列新型的 5-氨基-2-硫乙酰芳胺嘧啶酮类目标化合物 **7** (图 1B)。并采用噬斑法和 MTT 法对其抗 DENV 活性和细胞毒性进行了检测, 最后结合分子对接的方法对筛选到的抗 DENV 活性化合物的结合模式进行分析, 为新型骨架 DENV NS5 RdRp 抑制剂的研究提供了基础。

结果与讨论

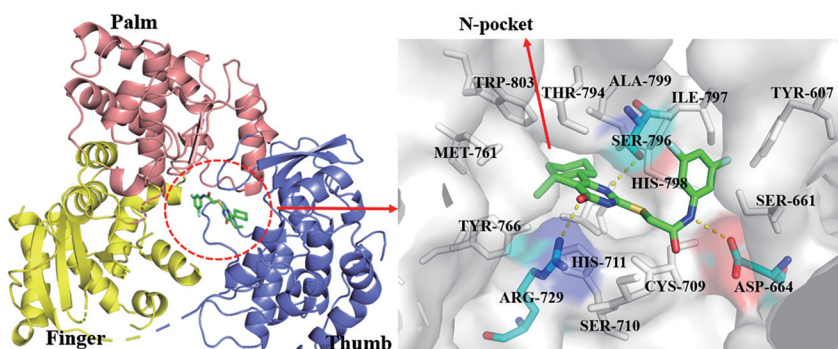
1 化学实验

目标化合物的合成如合成路线 1 所示: 首先苯胺 **1** 和溴乙酰溴 **2** 通过亲核取代反应得到 2-溴乙酰苯胺 **3**。另外, 取代苯甲醛 **4**、氨基乙酸乙酯 **5** 和硫脲经比吉内利一锅法合成 5-氨基-6 芳基-嘧啶酮 **6**。最后, **3** 和 **6** 在 K_2CO_3 催化下经 S-烷基化反应得到 5-氨基-2-硫乙酰芳胺嘧啶酮类化合物 **7**。

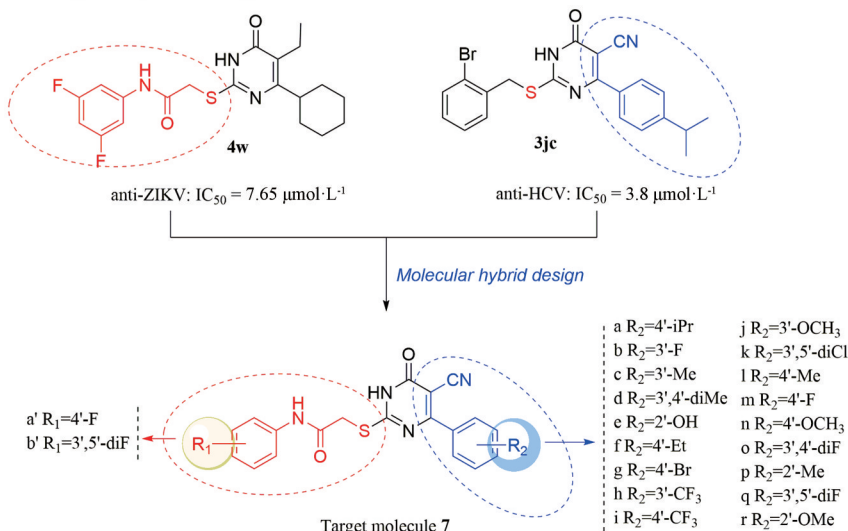
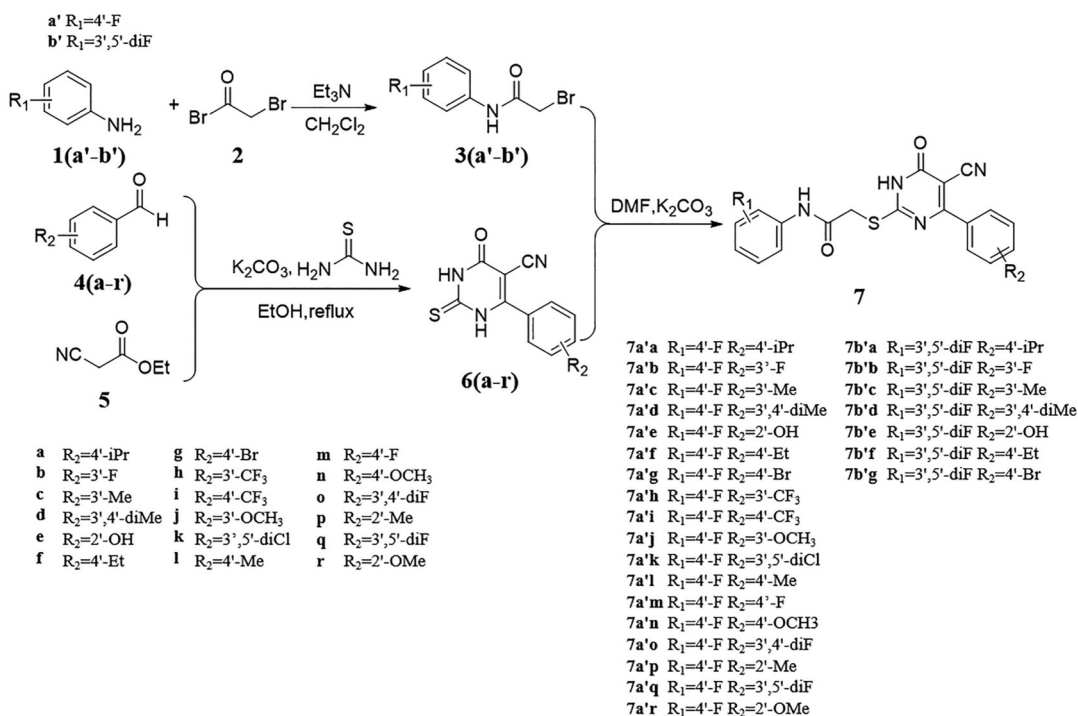
通过上述方法共合成了 25 个目标新化合物, 并通过 1H NMR、 ^{13}C NMR 谱和 HR-ESI-MS 进行了结构表征, 其理化性质和谱学数据见表 1 和表 2。

2 抗 DENV 活性评价

以临床使用的广谱抗病毒药物利巴韦林 (ribavirin) 为阳性对照, 采用噬斑法和 MTT 法评估了化合物 **7** (**a'a~a'r**, **b'a~b'g**) 的体外抗 DENV 病毒活性和细胞毒性 (表 3)。由表 3 中可见, 目标化合物均具有较小的细胞毒性, 除了化合物 **7b'a** 的 CC_{50} 为 $158.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外, 其余化合物的 CC_{50} 值均大于 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。25 个目标化合物中有 5 个化合物 **7a'k**、**7a'e**、**7a'f**、**7a'g**、**7a'h**

A Binding mode of **4w** with DENV NS5 RdRp

B Target compounds design

Figure 1 A: Predicted binding mode of compound **4w** with DENV NS5 RdRp (PDB: 5K5M). B: Target compounds design

Scheme 1 Synthetic route of target compounds

Table 1 Physical data and spectral data of compounds **7 (a'a–a'r, b'a–b'g)**

Compd.	Yield/%	mp/°C	Compd.	Yield/%	mp/°C
7a'a	96.3	170.0–172.1	7a'n	54.1	194.0–195.1
7a'b	49.7	191.7–193.2	7a'o	24.0	166.7–167.8
7a'c	29.8	196.0–197.1	7a'p	29.6	188.6–189.8
7a'd	94.5	210.4–211.7	7a'q	33.8	175.1–176.2
7a'e	76.7	202.1–202.8	7a'r	53.1	196.1–197.2
7a'f	87.5	202.9–203.1	7b'a	89.3	215.3–216.4
7a'g	66.8	198.1–199.7	7b'b	48.0	182.1–183.6
7a'h	72.8	108.4–109.5	7b'c	37.3	185.4–186.6
7a'i	89.8	195.1–196.2	7b'd	84.9	194.2–195.6
7a'j	20.7	193.4–194.5	7b'e	85.5	228.5–229.6
7a'k	58.1	168.5–169.2	7b'f	60.2	233.1–234.5
7a'l	92.4	212.5–213.0	7b'g	63.3	198.6–198.9
7a'm	50.1	196.5–197.8			

表现出了抗 DENV 活性, 其中化合物 **7a'k** 活性最高, 其 $EC_{50} = 7.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 治疗指数 $TI > 25.45$, 较阳性对照物利巴韦林 ($TI > 11.07$) 提高了 2 倍。其余 4 个化合物活性与阳性对照物利巴韦林活性 ($EC_{50} = 18.07 \pm 0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相当。

另外, 由表 3 可见 5 个抗 DENV-2 活性化合物的 R_1 取代基均为 4'-F, 而 R_1 为 3',5'-diF 取代基的 **7b'** 系列化合物均未显示出抗 DENV 活性。对于 R_1 为 4'-F 的 **7a'** 系列化合物, 在 C-6 苯环上引入了 18 种不同取代基 (R_2), 而其中只有 5 种显示了抗 DENV 病毒活性, 可见 R_1 和 R_2 取代基均对活性有影响, 且它们之间可能存在某种协同关系。对此采用分子对接的方法对该类化合

Table 2 Spectral data of compounds **7 (a'a–a'r, b'a–b'g)**

Compd.	$^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, HR-ESI-MS
7a'a	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.84 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.71 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 2H, ArH), 7.56 (ddt, $J = 6.8, 5.0, 1.8$ Hz, 2H, ArH), 7.27–7.21 (m, 2H, ArH), 7.13 (td, $J = 8.9, 1.9$ Hz, 2H, ArH), 3.87 (s, 2H, S-CH ₂), 2.98–2.85 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1.21 (d, $J = 1.7$ Hz, 3H, CH ₃), 1.19 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H, CH ₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 170.4, 167.1, 167.1, 159.1, 158.0 ($^1J_{CF} = 238$ Hz), 150.9, 135.6 ($^4J_{CF} = 2$ Hz), 134.6, 128.4 (2C), 126.1 (2C), 120.5 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 119.2, 115.4 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 90.2, 35.2, 33.4, 23.7 (2C); HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₂₂ H ₁₉ FN ₂ O ₂ S [M+H] ⁺ 423.124 6, found 423.124 8
7a'b	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.73 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.57 (td, $J = 7.4, 5.8, 2.7$ Hz, 3H, ArH), 7.45 (q, $J = 7.1, 6.5$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.13 (td, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 2H, ArH), 3.91 (s, 2H, S-CH ₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 170.6, 166.9, 165.8, 165.7, 161.8 ($^1J_{CF} = 242$ Hz), 158.0 ($^1J_{CF} = 237$ Hz), 139.2 ($^3J_{CF} = 8$ Hz), 135.51 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 130.3 ($^3J_{CF} = 8$ Hz), 124.5 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 120.6 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 118.6, 117.2 ($^2J_{CF} = 21$ Hz), 115.4 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 115.0 ($^2J_{CF} = 23$ Hz), 91.4, 35.3; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₁₉ H ₁₂ F ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 399.068 3, found 399.068 6
7a'c	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.94 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.58 (dd, $J = 8.3, 5.0$ Hz, 2H, ArH), 7.54 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, ArH), 7.29 (td, $J = 9.6, 9.0, 6.8$ Hz, 2H, ArH), 7.18–7.08 (m, 2H, ArH), 3.81 (s, 2H, S-CH ₂), 2.30 (s, 3H, CH ₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.5, 170.0, 167.6, 167.5, 157.9 ($^1J_{CF} = 238$ Hz), 137.4, 137.3, 135.6 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 130.4, 128.6, 128.0, 125.4, 120.5 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 119.7, 115.4 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 89.5, 35.1, 20.9; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₂₀ H ₁₃ FN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 395.093 3, found 395.093 5
7a'd	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.90 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.65–7.44 (m, 4H, ArH), 7.22–7.02 (m, 3H, ArH), 3.85 (s, 2H, S-CH ₂), 2.25 (s, 3H, CH ₃), 2.19 (s, 3H, CH ₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 170.6, 168.9, 167.3, 167.3, 157.9 ($^1J_{CF} = 239$ Hz), 138.7, 136.1, 135.6 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 134.7, 129.2 (2C), 125.8, 120.5 (2C, $^3J_{CF} = 7$ Hz), 119.3, 115.3 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 89.7, 35.2, 19.3 (2C); HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₂₁ H ₁₇ FN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 409.109 0, found 409.109 2
7a'e	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.24 (s, 1H, Ph-NH-CO), 10.87–10.72 (m, 1H, OH), 10.54 (s, 1H, Ar-NH), 8.35 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, ArH), 7.75 (ddd, $J = 8.7, 7.3, 1.7$ Hz, 1H, ArH), 7.67–7.60 (m, 2H, ArH), 7.52 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.14 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 4.04 (s, 2H, S-CH ₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.2, 169.0, 166.7, 165.8, 157.9 ($^1J_{CF} = 238$ Hz), 157.4, 151.5, 135.5 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 133.9, 125.9, 125.0, 120.7 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 118.7, 116.9, 115.3 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 94.7, 35.6; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₁₉ H ₁₃ FN ₄ O ₃ S [M+H] ⁺ 397.072 6, found 397.073 0
7a'f	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.72 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.73 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.64–7.50 (m, 2H, ArH), 7.29–7.03 (m, 4H, ArH), 3.94 (s, 2H, S-CH ₂), 2.63 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 1.17 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH ₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 169.5, 167.1, 166.7, 161.9, 158.0 ($^1J_{CF} = 239$ Hz), 146.7, 135.5 ($^4J_{CF} = 2$ Hz), 134.0, 128.5 (2C), 127.6 (2C), 120.6 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 118.4, 115.4 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 90.3, 35.3, 28.1, 15.4; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₂₁ H ₁₃ FN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 409.109 0, found 409.109 4
7a'g	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.83 (s, 1H, Ph-NH-CO), 10.77 (s, 1H, Ar-NH), 7.72 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 2H, ArH), 7.58 (ddd, $J = 9.1, 4.8, 2.1$ Hz, 4H, ArH), 7.13 (td, $J = 8.9, 2.1$ Hz, 2H, ArH), 3.89 (s, 2H, S-CH ₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 170.6, 168.1, 167.0, 166.1, 157.9 ($^1J_{CF} = 238$ Hz), 136.1, 135.5 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 131.2 (2C), 130.4 (2C), 123.8, 120.5 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 118.8, 115.3 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 90.1, 35.2; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₁₉ H ₁₂ BrFN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 459.982 8, found 459.982 9
7a'h	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.82 (s, 1H, Ph-NH-CO), 8.06 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H, ArH), 7.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.66 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.59 (ddt, $J = 6.9, 4.9, 1.8$ Hz, 2H, ArH), 7.13 (td, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 2H, ArH), 3.86 (s, 2H, S-CH ₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.5, 169.2, 167.3, 165.7, 157.9 ($^1J_{CF} = 238$ Hz), 138.2, 135.6 ($^4J_{CF} = 3$ Hz), 132.3, 129.5, 129.0 ($^2J_{CF} = 32$ Hz), 126.6, 124.6 ($^3J_{CF} = 4$ Hz), 124.0 ($^1J_{CF} = 271$ Hz), 120.6 (2C, $^3J_{CF} = 8$ Hz), 119.2, 115.4 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 90.0, 35.1; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₂₀ H ₁₂ F ₄ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 449.065 1, found 449.064 7
7a'i	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.75 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.94 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, ArH), 7.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, ArH), 7.58 (ddt, $J = 6.9, 4.9, 1.9$ Hz, 2H, ArH), 7.13 (tt, $J = 9.0, 4.6$ Hz, 2H, ArH), 3.88 (s, 2H, S-CH ₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.2, 168.6, 167.2, 165.9, 157.9 ($^1J_{CF} = 239$ Hz), 141.1, 135.6 ($^4J_{CF} = 2$ Hz), 130.1 ($^1J_{CF} = 31$ Hz), 129.1 (2C), 125.1 (2C, $^3J_{CF} = 3$ Hz), 124.0 ($^1J_{CF} = 271$ Hz), 120.5 (2C, $^3J_{CF} = 7$ Hz), 118.9, 115.3 (2C, $^2J_{CF} = 22$ Hz), 90.4, 35.3; HR-ESI-MS: m/z calcd. for C ₂₀ H ₁₂ F ₄ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 449.056 1, found 499.055 8

Continued

Compd.	¹ H NMR, ¹³ C NMR, HR-ESI-MS
7a'j	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.88 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.63–7.50 (m, 2H, ArH), 7.33 (dtd, <i>J</i> = 6.1, 3.7, 3.2, 1.2 Hz, 3H, ArH), 7.20–7.09 (m, 2H, ArH), 7.08–6.98 (m, 1H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂), 3.76 (s, 3H, -OCH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.4, 169.8, 167.4, 167.1, 158.9, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 239 Hz), 138.6, 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 129.3, 120.5, 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 119.5, 115.6, 115.3 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 113.6, 89.6, 55.2, 35.1; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₀ H ₁₅ FN ₄ O ₃ S [M+H] ⁺ 411.088 2, found 411.088 5
7a'k	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.77 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.74 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 3H, ArH), 7.64–7.55 (m, 2H, ArH), 7.13 (td, <i>J</i> = 8.9, 1.9 Hz, 2H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.8, 169.4, 167.3, 164.3, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 140.6, 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 134.0 (2C, Ph), 129.3, 126.8 (2C, Ph), 120.6 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 7 Hz), 119.1, 115.3 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 89.8, 35.2; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 449.993 4, found 449.993 5
7a'l	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.84 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.70 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.8 Hz, 2H, ArH), 7.58 (ddt, <i>J</i> = 6.8, 4.9, 1.7 Hz, 2H, ArH), 7.24–7.09 (m, 4H, ArH), 3.91 (s, 2H, S-CH ₂), 2.34 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169.8, 167.1, 166.9, 163.8, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 140.3, 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 2 Hz), 133.9, 128.8 (2C), 128.4 (2C), 120.6 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 7 Hz), 118.8, 115.4 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 90.1, 35.2, 21.0; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₀ H ₁₅ FN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 395.093 3, found 395.093 6
7a'm	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.88 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.83 (ddd, <i>J</i> = 8.3, 5.5, 2.1 Hz, 2H, ArH), 7.59 (ddt, <i>J</i> = 7.4, 5.0, 2.1 Hz, 2H, ArH), 7.24 (td, <i>J</i> = 8.9, 2.2 Hz, 2H, ArH), 7.14 (td, <i>J</i> = 9.1, 2.2 Hz, 2H, ArH), 3.83 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.4, 169.7, 167.5, 166.1, 163.0 (¹ <i>J</i> _{CF} = 246 Hz), 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 133.8 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 130.6 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 119.6, 115.4 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 115.1 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 21 Hz), 89.4, 35.2; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₂ F ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 399.068 3, found 399.068 7
7a'n	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.92 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.79 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.59 (dd, <i>J</i> = 8.4, 4.9 Hz, 2H, ArH), 7.14 (t, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, ArH), 6.94 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, ArH), 3.85 (s, 2H, S-CH ₂), 3.79 (s, 3H, -OCH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 170.5, 169.0, 167.3, 166.5, 160.9, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 130.0 (2C), 129.3, 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 119.6, 115.4 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 113.50 (2C), 89.0, 55.3, 35.2; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₀ H ₁₅ FN ₄ O ₃ S [M+H] ⁺ 411.088 2, found 411.088 4
7a'o	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.81 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.78 (ddd, <i>J</i> = 11.8, 7.9, 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.70–7.63 (m, 1H, ArH), 7.63–7.55 (m, 2H, ArH), 7.49 (dt, <i>J</i> = 10.7, 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.18–7.08 (m, 2H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.5, 169.4, 167.3, 164.7, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 150.3 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz, ² <i>J</i> _{CF} = 12 Hz), 149.1 (¹ <i>J</i> _{CF} = 246 Hz, ² <i>J</i> _{CF} = 12 Hz), 135.5 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 2 Hz), 130.8 (³ <i>J</i> _{CF} = 6 Hz), 125.4 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 119.3, 117.4 (² <i>J</i> _{CF} = 18 Hz), 117.31 (² <i>J</i> _{CF} = 17 Hz), 115.3 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 89.6, 35.1; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₁ F ₃ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 417.058 8, found 417.058 6
7a'p	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.93 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.62–7.52 (m, 2H, ArH), 7.36–7.24 (m, 2H, ArH), 7.22 (dd, <i>J</i> = 3.8, 0.9 Hz, 2H, ArH), 7.18–7.09 (m, 2H, ArH), 3.81 (s, 2H, S-CH ₂), 2.21 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.3, 169.8, 169.4, 167.4, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 137.8, 135.5 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 3 Hz), 134.9, 130.1, 128.7, 128.3, 125.5, 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 118.9, 115.3 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 91.9, 35.1, 19.1; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₀ H ₁₅ FN ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 395.093 3, found 395.093 6
7a'q	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.77 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.64–7.54 (m, 2H, ArH), 7.49–7.32 (m, 3H, ArH), 7.13 (t, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.8, 169.5, 167.4, 164.5, 162.0 (2C, ¹ <i>J</i> _{CF} = 245 Hz, ³ <i>J</i> _{CF} = 13 Hz), 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 140.8 (³ <i>J</i> _{CF} = 9 Hz), 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 2 Hz), 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 119.2, 115.3 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 111.5 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 105.29 (² <i>J</i> _{CF} = 25 Hz), 89.7, 35.2; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₁ F ₃ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 417.058 8, found 417.059 1
7a'r	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.00 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.57 (ddt, <i>J</i> = 6.9, 5.0, 2.8 Hz, 2H, ArH), 7.44–7.35 (m, 1H, ArH), 7.25–7.06 (m, 4H, ArH), 6.93 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, ArH), 3.78 (s, 2H, S-CH ₂), 3.76 (s, <i>J</i> = 1.7 Hz, 3H, -OCH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.2, 169.2, 167.6, 166.9, 157.9 (¹ <i>J</i> _{CF} = 238 Hz), 156.2, 135.6 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 2 Hz), 130.6, 129.6, 127.1, 120.5 (2C, ³ <i>J</i> _{CF} = 7 Hz), 120.1, 118.9, 115.3 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 22 Hz), 111.6, 93.1, 55.4, 35.1; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₀ H ₁₅ FN ₄ O ₃ S [M+H] ⁺ 411.088 2, found 411.088 6
7b'a	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.38 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.31–7.19 (m, 4H, ArH), 6.89 (tt, <i>J</i> = 9.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.83 (s, 2H, S-CH ₂), 2.91 (p, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H, -CH(CH ₃) ₂), 1.21 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H, -CH(CH ₃) ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.1, 169.7, 168.4, 167.1, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 241 Hz), 162.4 (¹ <i>J</i> _{CF} = 241 Hz), 150.6, 141.6 (³ <i>J</i> _{CF} = 14 Hz), 134.9, 128.3 (2C), 126.05 (2C), 119.6, 101.7 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.2 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 89.4, 35.3, 33.3, 23.7 (2C); HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₂ H ₁₈ F ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 441.115 2, found 441.115 0
7b'b	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.30 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.64–7.57 (m, 1H, ArH), 7.54–7.42 (m, 2H, ArH), 7.29 (pd, <i>J</i> = 8.0, 7.4, 2.6 Hz, 3H, ArH), 6.88 (tt, <i>J</i> = 9.3, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.5, 169.7, 168.3, 165.8, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 162.4 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 161.8 (¹ <i>J</i> _{CF} = 243 Hz), 141.5 (³ <i>J</i> _{CF} = 14 Hz), 139.7 (³ <i>J</i> _{CF} = 7 Hz), 130.2 (³ <i>J</i> _{CF} = 8 Hz), 124.4 (⁴ <i>J</i> _{CF} = 2 Hz), 119.4, 116.8 (² <i>J</i> _{CF} = 20 Hz), 114.9 (² <i>J</i> _{CF} = 23 Hz), 101.7 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.3 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 89.8, 35.3; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₁ F ₃ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 417.058 8, found 417.059 2
7b'c	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.43 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.53 (dd, <i>J</i> = 6.4, 1.7 Hz, 2H, ArH), 7.34–7.22 (m, 4H, ArH), 6.88 (tt, <i>J</i> = 9.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.83 (s, 2H, S-CH ₂), 2.30 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.3, 170.0, 168.5, 167.5, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 162.5 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 141.6 (³ <i>J</i> _{CF} = 14 Hz), 137.4, 137.4, 130.5, 128.6, 128.0, 125.4, 119.6, 101.7 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.3 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 89.7, 35.3, 20.9; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₀ H ₁₄ F ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 413.083 9, found 413.083 7
7b'd	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.45 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.56–7.45 (m, 2H, ArH), 7.29–7.13 (m, 3H, ArH), 6.88 (tt, <i>J</i> = 9.3, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.83 (s, 2H, S-CH ₂), 2.25 (s, 3H, CH ₃), 2.20 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.0, 169.7, 168.4, 167.4, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 162.4 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 141.6 (³ <i>J</i> _{CF} = 14 Hz), 138.5, 136.0, 134.9, 129.2, 129.1, 125.7, 119.6, 101.7 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.3 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 89.5, 35.3, 19.3 (2C); HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₁ H ₁₆ F ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 427.099 6, found 427.099 3

Continued

Compd.	¹ H NMR, ¹³ C NMR, HR-ESI-MS
7b'e	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.21 (s, 1H, Ph-NH-CO), 10.94 (s, 1H, -OH), 8.32 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.75 (ddd, <i>J</i> = 8.6, 7.3, 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.42 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.38–7.27 (m, 2H, ArH), 6.90 (tt, <i>J</i> = 9.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 4.05 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 176.9, 169.0, 167.6, 165.8, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 162.4 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 157.4, 151.6, 141.6 (³ <i>J</i> _{CF} = 13 Hz), 133.9, 125.8, 125.0, 118.7, 116.9, 101.9 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.4 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 94.9, 35.7; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₂ F ₂ N ₄ O ₃ S [M+H] ⁺ 415.063 2, found 415.063 6
7b'f	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.40 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.30–7.18 (m, 4H, ArH), 6.88 (tt, <i>J</i> = 9.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂), 2.63 (q, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H, -CH ₂ CH ₃), 1.18 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 3H, -CH ₂ CH ₃); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.0, 169.5, 168.4, 167.2, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 162.4 (¹ <i>J</i> _{CF} = 241 Hz), 146.1, 141.6 (³ <i>J</i> _{CF} = 13 Hz), 134.7, 128.3 (2C), 127.5 (2C), 119.5, 101.7 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.3 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 89.5, 35.3, 28.1, 15.4; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₂₁ H ₁₆ F ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 427.099 6, found 427.100 0
7b'g	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.35 (s, 1H, Ph-NH-CO), 7.73–7.67 (m, 2H, ArH), 7.61 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.32–7.24 (m, 2H, ArH), 6.89 (tt, <i>J</i> = 9.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.84 (s, 2H, S-CH ₂); ¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 171.4, 169.6, 168.3, 166.1, 162.6 (¹ <i>J</i> _{CF} = 242 Hz), 162.4 (¹ <i>J</i> _{CF} = 241 Hz), 141.6 (³ <i>J</i> _{CF} = 13 Hz), 136.5, 131.2 (2C), 130.3 (2C), 123.5, 119.4, 101.7 (2C, ² <i>J</i> _{CF} = 29 Hz), 98.3 (² <i>J</i> _{CF} = 26 Hz), 89.6, 35.3; HR-ESI-MS: <i>m/z</i> calcd. for C ₁₉ H ₁₁ BrF ₂ N ₄ O ₂ S [M+H] ⁺ 422.973 4, found 422.973 8

物与 NS5 RdRp 可能的作用方式进行了探讨 (PDB: 5K5M)。首先, 选择 R₂ 取代基相同, R₁ 取代基不同的 **7a'e** 和 **7b'e**、**7a'f** 和 **7b'f**、**7a'g** 和 **7b'g** 组化合物的复合物模型进行了比较。如图 2A-1、B-1、C-1 所示, 3 个有抗 DENV 活性化合物 **7a'e**、**7a'f** 和 **7a'g** 与 NS5 RdRp 酶的结合模式和先导化合物 **4w** 相似, 它们的嘧啶环和 C-6 取代苯环均指向“N 口袋”, 并通过嘧啶环的 C-5-CN 与“N 口袋”内 Tyr-765 上羧基间形成氢键作用从而稳定与“N 口袋”的结合。同时, **7a'e** 和 **7a'f** 的 C-2 侧链上的 NH 和嘧啶环上的 3-NH 与活性位点残基 Thr-793 形成双重氢键作用, 进一步加强了其 NS5 RdRp 的结合。而 **7a'g** 则通过 C-2β 羰基与 Tyr-758 间的氢键作用加强这种结合。而由图 2A-2、B-2、C-2 所示的 **7b'e**、**7b'f**、**7b'g** 复合物模型可见, C-2 侧链末端 3',5'-diF 取代基使这 3 个化合物的 C-2 侧链形成特定的空间走向, 且和 Asn-406、Ser-791、Leu-754 等氨基酸残基形成多种氢键作用, 从而拉扯化合物分子不能进入到“N 口袋”中, 这种远离“N 口袋”的无效结合不能对 NS5 RdRp 活性产生影响。

图 2D、E 显示了化合物 **7a'h** 和 **7a'k** 与 DENV NS5 RdRp 的相互作用, 由图 2D 可见, **7a'h** 的嘧啶环和 C-6 苯环同样指向“N 口袋”, 但因 R₂ 取代基的差异, **7a'h** 采取与化合物 **7a'e**、**7a'f**、**7a'g** 不同的结合构象, 该构象使 **7a'h** 以 C-4 羰基与 Arg-727 间的氢键作用替代 **7a'e**、**7a'f**、**7a'g** 中 C-5-CN 与 Tyr-765 间的氢键作用, 并使 C-6 苯环上的 4'-CF₃ 更深入“N 口袋”内部, 保证抑制剂小分子与 NS5 RdRp 稳定结合, 因而 **7a'h** 具有略高于与 **7a'e**、**7a'f**、**7a'g** 活性。在 R₁ 取代基相同的情况下 (R₁ = 4'-F), C-6 苯环上 3',5'-diCl 取代基的引入 (R₂ = 3',5'-diCl) 使化合物 **7a'k** 与 NS5 RdRp 的结合模式发生了变化。如图 2E 所示, 进入到“N 口袋”内部的是 **7a'k** 的 C-2 侧

Table 3 Anti-DENV activities of target compounds **7 (a'a–a'r, b'a–b'g)** (mean ± SD, *n* = 2). EC₅₀: The 50% effective concentration; CC₅₀: The 50% cytotoxicity concentration; TI: Therapeutic index

Compd.	R ₁	R ₂	EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	CC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	TI
7a'a	4'-F	4'-iPr	>50	>200	
7a'b	4'-F	3'-F	>50	>200	
7a'c	4'-F	3'-Me	>50	>200	
7a'd	4'-F	3',4'-diMe	>50	>200	
7a'e	4'-F	2'-OH	21.23	>200	>9.42
7a'f	4'-F	4'-Et	20.21	>200	>9.90
7a'g	4'-F	4'-Br	19.13	>200	>10.45
7a'h	4'-F	3'-CF ₃	18.29	>200	>10.93
7a'i	4'-F	4'-CF ₃	>50	>200	
7a'j	4'-F	3'-OCH ₃	>50	>200	
7a'k	4'-F	3',5'-diCl	7.86	>200	>25.45
7a'l	4'-F	4'-Me	>50	>200	
7a'm	4'-F	4'-F	>50	>200	
7a'n	4'-F	4'-OCH ₃	>50	>200	
7a'o	4'-F	3',4'-diF	>50	>200	
7a'p	4'-F	2'-Me	>50	>200	
7a'q	4'-F	3',5'-diF	>50	>200	
7a'r	4'-F	2'-Ome	>50	>200	
7b'a	3',5'-diF	4'-iPr	>50	158.61	
7b'b	3',5'-diF	3'-F	>50	>200	
7b'c	3',5'-diF	3'-Me	>50	>200	
7b'd	3',5'-diF	3',4'-diMe	>50	>200	
7b'e	3',5'-diF	2'-OH	>50	>200	
7b'f	3',5'-diF	4'-Et	>50	>200	
7b'g	3',5'-diF	4'-Br	>50	>200	
Ribavirin			18.07 ± 0.36	>200	>11.07

链, 其嘧啶酮上的 C-4 位羰基和 C-2β 位羰基与“N 口袋”内的 Arg-729 形成较强的双重氢键 (*d* = 1.9Å 及 2.0Å), 这种加强的有效结合使 **7a'k** 具有最高的抗 DENV 活性。以上分子对接分析表明, 与 NS5 RdRp “N 口袋”内活性位点残基的有效结合是该类化合物具有抗 DENV 活性的关键, 而 R₁ 和 R₂ 取代基间通过某种协同作用对该类化合物与 NS5 RdRp 的结合方式产生

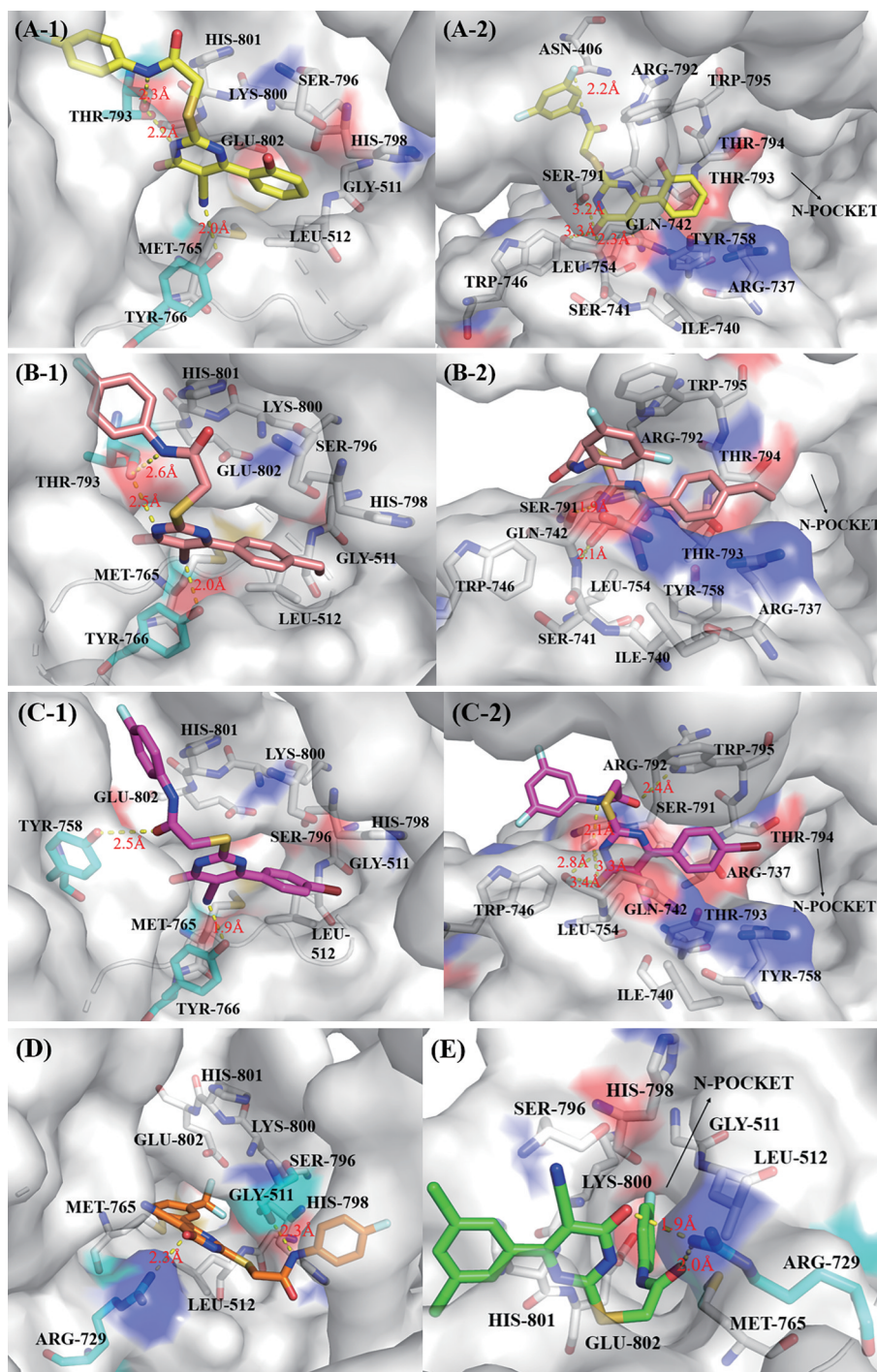


Figure 2 Predicted binding modes of compound **7a'e** (A-1) and **7b'e** (A-2) (carbons in yellow), **7a'f** (B-1) and **7b'f** (B-2) (carbons in pink), **7a'g** (C-1) and **7b'g** (C-2) (carbons in purple), **7a'h** (D, carbons in orange), **7a'k** (E, carbons in green) in the N-pocket. Residues in the N-pocket are shown as green sticks. Residues involved in interactions are shown as cyan sticks

影响。虽然目前 R_1 和 R_2 取代基的构效关系尚未表现出明显的规律性,但在上述结合模型的指导下,可尝试在 5-氨基-2-硫乙酰芳氨基嘧啶酮基本骨架上,进一步丰富 R_1 和 R_2 取代基,构建结构多样性分子,通过分子模拟寻找能与 NS5 RdRp“N 口袋”加强结合的分子并加以合成,以发现更优活性的抗 DENV 化合物。

小结

为了筛选新型的抗 DENV NS5 RdRp 酶抑制剂,本文基于嘧啶酮类 HCV NS5B RdRp 抑制剂 **3jc** 和 ZIKV NS5 RdRp 抑制剂 **4w** 的结构,采用分子杂合的方法,设计合成系列 5-氨基-2-硫乙酰芳基嘧啶酮化合物,并通过噬斑法从中筛选到 5 个抗 DENV 活性化合

物,最后通过对该类化合物与 DENV NS5 RdRp 分子对接发现该类化合物具有抗 DENV 活性的关键在于与 NS5 RdRp“N 口袋”结合,同时指出 R_1 和 R_2 取代基间对化合物的结合方式产生协同影响,从而为该类化合物的进一步结构优化设计提供理论指导。

实验部分

市售分析纯 (AR) 或试剂级 (RG) 或是根据反应所需自行制备得到。常压柱色谱所用硅胶 (100/200~300 目) 购自青岛海洋化工。薄层色谱 (TLC) 板购自乳山市太阳干燥剂有限公司。Bruker DRX 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) 购自德国 Bruker 公司,内标 TMS, 溶剂 DMSO- d_6 购自中国扬格赛公司; Manon MP430 全自动熔点仪, 邢台润联公司; Agilent LC/MSD TOF 质谱仪, 购自美国 Agilent 公司。

利巴韦林 (ribavirin) 购自广州昂飞生物科技有限公司; N,N -二甲基甲酰胺 (N,N -dimethyl formamide, DMF) 购自西陇化工股份有限公司; MTT、硫酸链霉素 (streptomycin sulfate)、青霉素 (penicillin)、DMSO 购自美国 Sigma 公司; 多聚甲醛购自天津光复精细化工研究所; 结晶紫购自北京索莱宝; DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自美国 Thermo Fisher 公司; 小牛血清、胰酶购自美国 Gibco 公司; 低熔点琼脂糖购自美国 Amresco 公司。

倒置显微镜 (TS-100F) 购自日本 Nikon 公司; 离心机 (Allegra X-30) 购自美国 Beckman 公司; 酶联斑点分析仪 (Immunospot S6 Universal) 购自美国 CTL 公司; 酶标仪 (ELX800) 购自美国 Biotek 公司; 生物安全柜 (1287)、细胞培养箱 (311) 购自美国 Thermo Fisher 公司。4 °C 冰箱 (HYC-360) 购自 Haier 公司。

所有化合物均用 DMSO 溶解, 终浓度为 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 避光至于 4 °C 冰箱保存, 使用时 DMEM 培养基稀释至所需浓度。

1 化合物的合成

1.1 2-溴乙酰苯胺 (3) 的合成 将取代苯胺 1 (10 mmol, 1 eq.)、三乙胺 (15 mmol, 1.5 eq.) 和溴乙酰溴 2 (15 mmol, 1.5 eq.) 溶于 150 mL 二氯甲烷中, 在 0 °C 反应 2 h 后, 用二氯甲烷 (100 mL×3) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 蒸发得到粗品, 粗品重结晶, 过滤得到 2-溴乙酰苯胺 3 纯品, 产率为 88%~92%。

1.2 5-氰基-6-芳基-2-巯基嘧啶酮类化合物 (6) 的合成 依次将氰基乙酸乙酯 5 (10 mmol, 1 eq.)、取代苯甲醛 4 (10 mmol, 1 eq.)、硫脲 (10 mmol, 1 eq.) 和无水碳酸钾 (10 mmol, 1 eq.) 加入乙醇溶液中, 回流反应 10~14 h。TLC 跟踪反应结束后, 将溶液冷却至室温,

过滤, 固体用无水乙醇洗涤, 溶于 200 mL 80 °C 水中, 冷却至室温, 用乙酸调节溶液 pH 至 5~6, 析出白色或黄色固体, 将固体过滤, 干燥, 重结晶或柱色谱分离得到 5-氰基-6-芳基-2-巯基嘧啶酮 6, 产率为 38%~75%。

1.3 目标化合物 7 的合成 将 5-氰基-6-芳基-2-巯基嘧啶酮 6 (1 mmol, 1 eq.) 溶解于 15 mL DMF 溶液中, 加入无水碳酸钾 (1.2 mmol, 1.2 eq.) 搅拌 0.5 h 后, 加入 2-溴乙酰苯胺 3 (1 mmol, 1 eq.), 室温下反应 0.5 h。用 TLC 跟踪反应完成后用乙酸乙酯 (80 mL×3) 萃取, 合并有机相, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥。将有机相减压浓缩得到粗产品, 通过柱色谱或重结晶得到目标化合物。产率为 21%~92%。

2 目标化合物抗 DENV 活性测试

通过上述合成方法合成了共 25 个目标化合物, 本实验采用噬斑法和 MTT 法分别测试目标分子的抑制 DENV 活性 (EC_{50}) 和对细胞毒性 (CC_{50})。其中抗 DENV 活性以抗病毒药物利巴韦林为阳性对照。

2.1 噬斑法测试抗 DENV 活性 将 Vero 细胞铺种于 12 孔细胞培养板中 (每孔 3×10^5 个), 培养过夜后向其加入 DENV ($\text{MOI} = 0.5$), 吸附 2~4 h, $1\times\text{PBS}$ 洗涤后, 加入含梯度稀释待测化合物的 2% 低熔点琼脂糖-DEME (2% FBS) 培养基, 在 37 °C、5% CO_2 培养箱中条件下培养 5 天。用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 清洗 3 次, 加入 0.8% 结晶紫对其进行染色。利用酶联斑点分析仪对细胞板中的噬斑数进行图像分析并计算半数有效浓度 EC_{50} 。

2.2 MTT 法检测细胞分子毒性 将 Vero 细胞铺种于 96 孔细胞培养板中 (每孔 4×10^4 个), 在 37 °C、5% CO_2 培养箱条件下培养至细胞成长呈单层状, 弃去上清。随后, 加入含有梯度稀释待测化合物 (终浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每个梯度浓度设置 3 复孔, 同时设置正常对照组、空白对照组。培养 5 天后, 每孔加入 20 μL MTT ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育 4 h 后弃去 100 μL 上清液, 每孔加入 100 μL SDS-DMF (12% SDS-50% DMF) 溶液。将细胞培养板置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育过夜, 待其结晶完全溶解后, 震荡均匀, 利用 Bio-TEK 酶标仪检测 OD 值 (检测波长: 570 nm、参考波长: 630 nm), 并计算半数细胞毒性浓度 CC_{50} 。

2.3 治疗指数 (TI) 值的计算 依据 MTT 检测法实验结果绘制剂量-反应曲线, 利用 Reed&Muench 法计算有效抑制 50% 细胞感染病毒的药物浓度 (EC_{50}) 和使 50% 的细胞发生病变时的药物浓度 (CC_{50})。利用 $\text{TI} = \text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$ 获得药物的 TI 值。

3 分子对接

使用 Autodock 4.2 程序进行分子对接, 所有用于对接的分子采用 Sybyl/Minimize 分子力学程序进行能量优

化, 迭代 6 000 次, 直到能量梯度收敛至 $0.005 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。所选 DENV-2 NS5 RdRp 的 3D 晶体结构检索自 RCSBB 蛋白质数据库 (PDB:5K5M)。使用 AutoDock Tools (ADT) 处理小分子和蛋白质, 从配合物中提取结合配体, 除去水分子, 自动添加氢原子, 使用 Lamarckian GA 对接算法对目标分子执行 50 次对接计算, 最后根据抑制剂与酶相互作用能量大小和几何构型匹配程度来确定抑制剂的结合构象, 并用 Pymol 软件显示对接结果。

作者贡献: 王靖博负责化合物的合成和分子对接及文章撰写; 李春艳负责体外抗 DENV 活性测试; 赵子衿负责数据的整理及文章部分撰写; 杨柳萌协助活性测试和文章的修改; 何严萍、郑永唐、张洪彬负责课题规划、实验指导及文章修改及校对。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Lims YM, Chieng JY, Pan Y. Recent insights on anti-dengue virus (DENV) medicinal plants: review on *in vitro*, *in vivo* and *in silico* discoveries [J]. *All Life*, 2021, 14: 1-33.
- [2] Tripathin K, Shrivastava A. Recent developments in recombinant protein-based dengue vaccines [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1919.
- [3] Silveira da LTC, Tura B, Santos M. Systematic review of dengue vaccine efficacy [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19: 750.
- [4] Hadinegoros RS, Arredondo-García JL, Capeding RM, et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373: 1195-1206.
- [5] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496: 504-507.
- [6] Gujarati TP, Ambika G. Virus antibody dynamics in primary and secondary dengue infections [J]. *J Mathemat Biol*, 2014, 69: 1773-1800.
- [7] Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response [J]. *Emerg Microb Infect*, 2018, 7: 167.
- [8] Adimy M, Mancera PFA, Rodrigues DS, et al. Maternal passive immunity and dengue hemorrhagic fever in infants [J]. *Bull Math Biol*, 2020, 82: 24.
- [9] Barnard TR, Abram QH, Lin QF, et al. Molecular determinants of flavivirus virion assembly [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46: 378-390.
- [10] Lim SP, Wen D, Yap TL, et al. A scintillation proximity assay for dengue virus NS5 2'-O-methyltransferase-kinetic and inhibition analyses [J]. *Antivir Res*, 2008, 80: 360-369.
- [11] Yon C, Teramoto T, Mueller N, et al. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 27412-27419.
- [12] Nasar S, Rashid N, Iftikhar S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: a review [J]. *J Med Virol*, 2020, 92: 941-955.
- [13] Laurent-Rolle M, Morrison J. The role of NS5 protein in determination of host cell range for yellow fever virus [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38: 1414-1417.
- [14] Issur M, Geiss BJ, Bougie I, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure [J]. *RNA*, 2009, 15: 2340-2350.
- [15] Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 2757-2768.
- [16] Geiss BJ, Thompson AA, Andrews JA, et al. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding [J]. *J Mol Biol*, 2009, 385: 1643-1654.
- [17] Hou LX, Ju H, Zhan P, et al. New advances in anti-dengue virus medicinal chemistry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 669-678.
- [18] Zou G, Chen YL, Dong HP, et al. Functional analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 14362-14372.
- [19] Lu GL, Gong P. A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus [J]. *Virus Res*, 2017, 234: 34-43.
- [20] Tarannum H, Nandi S. Repositioning of RdRp inhibitors against HCV NS5B polymerase utilizing structure-based molecular docking [J]. *Combinat Chem High Throughput Screen*, 2021, 25: 702-719.
- [21] Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man [J]. *Curr Gen*, 2006, 50: 81-99.
- [22] Shim J, Larson G, Lai V, et al. Canonical 3'-deoxyribonucleotides as a chain terminator for HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Antivir Res*, 2003, 58: 243-251.
- [23] Ding YL, Girardet JL, Smith KL, et al. Parallel synthesis of 5-cyano-6-aryl-2-thiouracil derivatives as inhibitors for hepatitis C viral NS5B RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Bioorg Chem*, 2006, 34: 26-38.
- [24] Rui RM, Tang CR, Zhang CT, et al. C6-structural optimizations of 2-aryl-1H-pyrazole-5-DABOs: from anti-HIV to anti-DENV activity [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105494.
- [25] Li DX, Zhang CS, Ding W, et al. Structure-based linker optimization of 6-(2-cyclohexyl-1-alkyl)-2-(2-oxo-2-phenylethylsulfanyl)pyrimidin-4(3H)-ones as potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors [J]. *Chin Chem Lett*, 2021, 32: 1020-1024.
- [26] Wu YM, Tang CR, Rui RM, et al. Synthesis and biological evaluation of a series of 2-(((5-alkyl/aryl-1H-pyrazol-3-yl)methyl)thio)-5-alkyl-6-(cyclohexylmethyl)-pyrimidin-4(3H)-ones as

- potential HIV-1 inhibitors [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 512-528.
- [27] Wu DC, Feng Y, Wang H, et al. Synthesis and biological evaluation of novel anti-hepatitis C virus (HCV) agents: 2-hydroxy-phenethyl sulfanyl-oxypyrimidines [J]. Med Chem Res, 2017, 26: 1388-1396.
- [28] Yang JX, Yu L, Yang YZ, et al. Synthesis of amino acid derivatives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor DB02 and anti-HIV-1 activity [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2023, 58: 405-412.
- [29] Zhou GF, Xie CQ, Xue JX, et al. Identification of 6 ω -cyclohexyl-2-(phenylamino carbonylmethylthio)pyrimidin-4(3H)-ones targeting the ZIKV NS5 RNA dependent RNA polymerase [J]. Front Chem, 2022, 10: 1010547.
- [30] Noble CG, Lim SP, Arora R, et al. A conserved pocket in the dengue virus polymerase identified through fragment based screening [J]. J Biol Chem, 2016, 291: 8541-8548.
- [31] Lim SP, Noble CG, Seh CC, et al. Potent allosteric dengue virus NS5 polymerase inhibitors: mechanism of action and resistance profiling [J]. PLoS Pathog, 2016, 12: e1005737.
- [32] Yokokawa F, Nilar S, Noble CG, et al. Discovery of potent non-nucleoside inhibitors of dengue viral RNA-dependent RNA polymerase from a fragment hit using structure-based drug design [J]. J Med Chem, 2016, 59: 3935-3952.
- [33] Tang ZL, Li XX, Yao Y, et al. Design, synthesis, fungicidal activity and molecular docking studies of novel 2-((2-hydroxyphenyl)methylamino)acetamide derivatives [J]. Bioorg Med Chem, 2019, 27: 2572-2578.