

· 研究论文 ·

吡喃香豆素衍生物对 HIV-1 的抑制作用及其构效关系

董 飏¹, 马 涛², 章 天¹, 周春梅², 刘 刚², 王 琳², 陶佩珍¹, 张兴权^{3*}

(1. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050;
3. 加州大学圣地亚哥医学院传染病系, 拉霍亚 92093, 美国)

摘要: 研究香豆素衍生物对人类免疫缺陷病毒 1 型逆转录酶 (HIV-1 RT)、蛋白酶 (HIV-1 PR) 和细胞内复制的抑制作用及其构效关系。不同香豆素衍生物具有抑制 HIV-1 RT、HIV-1 PR 活性, 且在细胞内显示出抑制 HIV-1 复制的作用已见报道。本课题根据国内传统药学的特点, 考察以天然产物为先导化合物、结合 HIV-1 蛋白酶三维结构计算机辅助药物设计、合成的四环双吡喃香豆素及其类似物。以 HIV-1 RT 及 HIV-1 PR 以及细胞内病毒复制为靶点, 利用酶学模型和细胞培养模型进行药物筛选及其构效关系研究, 设计合成的 7 个化合物的药效学实验结果显示, 部分化合物显示了不同程度的抗 HIV-1 活性。其中 V0201 作用最强, 它对 HIV-1 PR 和 HIV-1 RT 的 IC_{50} 分别为 3.56 和 0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 PBMC 培养实验中, V0201 对 HIV-1 复制的 IC_{50} 为 0.036 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这些结果表明, 化合物 V0201 具有全新结构, 可能成为新的先导化合物。

关键词: calanolide A 衍生物; 人类免疫缺陷病毒 I 型; 构效关系; 抗病毒活性

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 01-0035-04

Anti-HIV-1 activity and structure-activity relationship of pyranocoumarin analogs

DONG Biao¹, MA Tao², ZHANG Tian¹, ZHOU Chun-mei², LIU Gang², WANG Lin²,
TAO Pei-zhen¹, ZHANG Xing-quan^{3*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China;

3. Infectious Disease Division, Medical School, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093 USA)

Abstract: The purpose of this study is to find out anti-HIV-1 reverse transcriptase (RT)/protease (PR) activity and inhibition of virus replication in cell cultures of novel coumarin analogs and determine their structure-activity relationship. Coumarin derivatives have been demonstrated to inhibit the activity of HIV-1 RT/PR in cell free system. It also shows inhibition effects to HIV-1 replication in cell culture. Based on the Chinese traditional pharmacological characteristics and protein three dimension computer aided design, analogs of tetracyclic dipyrano coumarin were synthesized from natural leading compounds. We studied the relationship of antiviral effects and chemical structures via HIV-1 PR/RT enzyme models and cell culture model system. Seven compounds were designed and tested. Several compounds showed anti-HIV-1 activity in varying degrees, especially V0201 showed much higher anti-HIV-1 activity with 3.56 and 0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of IC_{50} against HIV-1 PR/RT and 0.036 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ against HIV-1 replication in PBMC cultures. V0201 with a novel structure may be a new leading compound. These new compounds are valuable for development of new anti-HIV drugs in the future.

Key words: calanolide A derivative; human immunodeficiency virus type 1; structure-activity relationship; antiviral activity

收稿日期: 2010-06-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970868).

*通讯作者 Tel: 8585341812, Fax: 8588225362, E-mail: xiz002@ucsd.edu

尽管高效抗逆转录病毒治疗 (highly active anti-retroviral therapy, HAART) 使 HIV-1 感染者的病毒滴度大幅度持久下降, 体内 CD4⁺淋巴细胞数目显著回升, 机会性感染程度大大地减轻; 患者的生活质量明显改善, 生存日期延长到 10 年以上, 但由于病毒耐药性、药物毒副作用及昂贵的药物费用等, 只能使极少数患者得到有效的药物治疗^[1]。因此研制新型抗耐药低毒低价的药物仍是当前热门的课题。本研究根据国内外传统药学特点, 考察以天然产物为先导物、结合 HIV-1 蛋白酶三维结构计算机辅助设计、合成的三环及四环双吡喃香豆素衍生物在体外酶及细胞模型中的抗 HIV-1 活性, 并分析其构效关系。

材料与方法

受试化合物与药品 7 个双吡喃香豆素衍生物 (表 1) 为中国医学科学院药物研究所合成^[2–4]。阳性对照药茚地那韦 (indinavir) 和奈韦拉平 (nevirapine) 为瑞典 Medvir AD 公司惠赠。齐多夫定 (zidovudine,

AZT) 由美国纽约三角研究公园 Wellcome 研究实验室的 P.A.Furman 先生惠赠 (干粉)。

试剂和仪器 HIV-1 蛋白酶底物[Arg-Glu(EDANS)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-Lys(dabcyl)-Arg] 由 Molecular Probe 公司生产, 编号 H-2930, 纯度>91%。牛血清白蛋白 (BSA) 和多聚 (rA)、寡聚 (dT)_{12–15} 购于 Sigma 公司; 二硫苏糖醇 (DTT) 为 Promega 产品; ³H 标记的脱氧胸苷三磷酸 (³HdTTP) 购于 NEN 公司, 比活性为 82.9 Ci·mmol⁻¹。其他试剂均为分析纯 (北京化工厂生产)。

多功能闪烁计数器 (德国 Beckman, LS 6000 型); 超低温冰箱 (日本三洋公司, MDF-U50V 型); 荧光检测仪 (德国 BMG 公司, Polarstar 型)。

病毒、HIV-1 逆转录酶 (RT) 和蛋白酶 (PR) 病毒: HIV-1 O18a 系 AZT 敏感株, 由美国加州大学圣地亚哥医学院 Douglas Richman 教授提供。

HIV-1 RT 和 HIV-1 PR 为中国医学科学院医药生物技术研究所在病毒室提取, 纯化, -80 °C 保存。其中 HIV-RT 由质粒 PKRT2 (美国 NIH Richard 博士和 William 博士惠赠) 在 E.coli JM109 中表达纯化。HIV-1 PR 由质粒 p100w (中国医学科学院医药生物技术研究所在病毒室提取, 纯化, -80 °C 保存) 表达纯化。

细胞及培养液 人外周血 T 淋巴细胞 (PBMC): 使用 Ficoll Hypaque 密度梯度离心方法, 从未感染 HIV-1 的健康供血者的外周血分离得到。细胞使用 RPMI 1640 培养基, 含有 20% 胎牛血清和 5% 白细胞介素-2。新分离的 PBMC 需要预先用含有 3% PHA 的培养基孵化 48 h, 之后用 PBS 洗 1 次, 然后悬浮在培养基内待用。

高通量荧光测定方法评价 HIV-1 PR 活性模型 采用荧光测定方法检测 HIV-1 PR 活性模型^[5]。操作如下: 于 96 孔板, 在反应缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹ 醋酸钠, 0.9 mol·L⁻¹ NaCl, 1.0 mmol·L⁻¹ DTT, 1.0 mmol·L⁻¹ EDTA) 中加入待测样品和 HIV-1 PR 底物 (底物终浓度为 5 μmol·L⁻¹) 后混匀, 最终反应体积为 200 μL。然后将 96 孔板置于 37 °C 温浴至少 15 min 后, 在荧光检测仪中以 355 nm 激发光和 490 nm 发射光进行测定读数。加入 HIV-1 PR 开始反应并计时, 反应 6 min 时再次进行荧光测定读数后结束。此方法在均相条件下进行, 因此能达到高通量筛选的要求。

HIV-1 RT 活性测定 HIV-1 RT 活性测定^[6]的反应总体积为 60 μL, 在细胞板内加入待测样品, 再加入反应缓冲液 (含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.8; 6 mmol·L⁻¹ MgCl₂; 100 mmol·L⁻¹ KCl; 5 mmol·L⁻¹

Table 1 Chemical structures of seven synthetic compounds and calanolide A

Compound	Chemical structure
V0201	
V0202	
V0203	
V0204	
V9827	
V9503	
V9612	
Calanolide A	

DTT; 0.133 mg·mL⁻¹ BSA; 2 μg·mL⁻¹ rA.(dT)₁₂₋₁₅; 0.2 μmol·L⁻¹ ³HdTTP) 及适量 HIV-1 RT 酶, 37 °C 反应 30 min, 取反应液 50 μL 均匀点在园形滤纸片上, 立即投入冷 5%三氯醋酸 (TCA) 溶液 (含 0.02 mol·L⁻¹ 焦磷酸钠)。经 3 次 5% TCA 及 3 次 95%乙醇洗涤脱水后, 烤干, 在液闪记数仪内测定每分钟计数 (counts per minute, cpm) 值。

药物活性及 HIV-1 P24 抗原产量的测定 按文献^[7, 8]进行如下操作: PBMC (细胞数 1×10⁶) 被 100 TCID₅₀ 的 HIV-1 O18a 感染, 2 h 后用培养液洗细胞 1 次, 并最终制成细胞数为 1×10⁶/mL 的细胞悬液待用。将病毒感染的细胞悬液 0.1 mL 和不同浓度的药物 (50、12.5、3.2、0.8、0.2、0.05、0.012 5 和 0 μg·mL⁻¹) 0.1 mL 培养在 96 孔板中, 每个药物浓度保持 3 孔。4 天后收获上清液。HIV-1 P24 抗原产量的定量测定使用全病毒抗原俘获的酶联免疫 (ELISA) 方法 (试剂盒为 Hialeah Coulter 公司产品, 美国佛州), 检测程序见说明书。计算 IC₅₀。临床使用药物齐多夫定 (zidovudine, AZT) 用于阳性对照。

药物毒性测定 将 PBMC (细胞数 1×10⁶/mL) 0.1 mL 和不同浓度的药物 (50、12.5、3.2、0.8、0.2、0.05、0.012 5 和 0 μg·mL⁻¹) 培养于 96 孔板, 每个药物浓度保持 3 孔。4 天后, 加入 ³H-胸腺嘧啶 1 μCi/孔, 继续培养 4~6 h 后收获并检测 cpm 值, 计算 TC₅₀。50%抑制浓度 (IC₅₀) 和 50%毒性浓度 (TC₅₀) 由 Chou Dose Effect Program 软件计算^[9]。

结果

1 吡喃香豆素衍生物对 HIV-1 PR 活性和 HIV-1 RT 活性的影响

V0201 和 V0204 显示了抑制 HIV-1 RT 活性; V0201、V0202、V0203 及 V0204 显示了抑制 HIV-1 PR 活性, IC₅₀ 在 μmol·L⁻¹ 水平 (表 2)。

2 吡喃香豆素衍生物对 HIV-1 P24 抗原的作用

在 PBMC 细胞培养体系中检测到 5 个化合物具有 HIV-1 抑制活性。空白对照的 cpm 读数为 63 606。V0201 和 V0202 具有明显的抑制 HIV-1 复制活性, 其 IC₅₀ 分别是 0.036 和 0.096 μmol·L⁻¹ (图 1)。

3 吡喃香豆素衍生物对 PBMC 细胞的毒性作用

检测到 5 个化合物具有 PBMC 细胞毒作用 (图 2)。空白对照的 cpm 读数为 19 911, V0201 和 V0202 的细胞毒性比另外 3 个化合物大, TC₅₀ 分别为 2.528 和 2.739 μmol·L⁻¹。上述 5 个化合物在 PBMC 培养

体系中对 HIV-1 的 IC₅₀、TC₅₀ 和治疗指数 TI 值见表 3。

Table 2 Results of seven compounds against HIV-RT/PR enzymes. —: Have no inhibition activity; ND: Undetected

Compound	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	
	HIV-1 RT	HIV-1 PR
V0201	0.78 ± 0.10	3.56 ± 0.57
V0202	—	2.22 ± 0.09
V0203	—	3.46 ± 0.52
V0204	15.15 ± 2.15	1.63 ± 0.61
V9827	—	—
V9503	—	—
V9612	—	227.73
Indinavir	ND	0.004 46 ± 0.000 79
Nevirapine	0.438 ± 0.056	ND

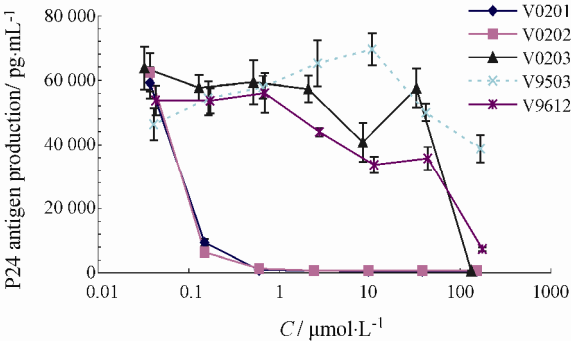


Figure 1 Anti-HIV-1 activity of five compounds in cell cultures

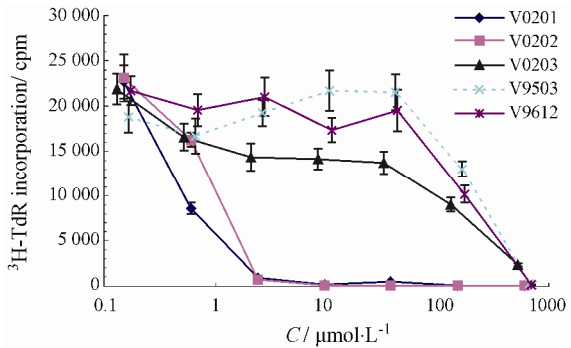


Figure 2 Toxicity assay of five compounds in cell cultures

Table 3 Activities of five compounds against HIV replication in PBMC cultures. TI: Therapeutic index (TC₅₀/IC₅₀). ND: Undetected. AZT: Zidovudine

Compound	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	TC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	TI
V0201	0.036	2.528	70.0
V0202	0.096	2.739	28.4
V0203	13.823	43.816	3.2
V9503	139.261	158.116	1.1
V9612	13.181	140.137	10.6
AZT	0.004 3	ND	ND

讨论

香豆素及其衍生物具有多种生物学活性,如抗炎、抗氧化、抗过敏、肝保护、抗肿瘤、抗病毒等。同样在 HIV-1 病毒复制的不同阶段,香豆素及其衍生物也起着独特的作用,可以对于病毒的逆转录酶、整合酶、蛋白酶起抑制作用^[10]。初步研究指出,一些香豆素衍生物是与酶的活性部位相结合使酶失去活性的^[11],其 IC_{50} 在 $0.5\sim 2.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。作者所得到的化合物抑制酶活性浓度也大致在这个范围。

化合物 V0204 为 11-去甲基-inophyllum B, V0203 为其前体化合物,即 12-羰基-11-去甲基-inophyllum B; V0201 为其三环线型中间体, V0202 为其三环角型中间体。这 4 个化合物对 HIV-1 PR 均表现了抑制作用,且活性相近。四环吡喃香豆素化合物对 HIV-1 PR 的抑制活性未见文献报道,因此这 4 个化合物对 HIV-1 PR 的作用机制值得进一步研究探讨。值得注意的是,另外 3 个化合物,即 V9827、V9503、V9612,均是合成 calanolide A 及其 11-去甲基类似物的三环线型中间体,对 HIV-1 PR 没有抑制活性或活性极弱。在化学结构上,这两组化合物最大的区别是 4-位取代基,分别为苯基和正丙基,芳香环与饱和链式烷烃在化学性质上差别很大,因此可以推测 4-位取代苯基对 PR 的抑制活性起到了重要的作用。对比之下,它们对 HIV-1 RT 却显示出不同结果。7 个目标化合物中,仅 V0201 和 V0204 具有 HIV-1 RT 的抑制活性,且 V0201 比 V0204 强约 20 倍,这是值得注意的结果。天然产物 calanolide A, inophyllum B 和 cordatolide A 均具有体外 HIV-1 RT 的抑制活性,其中以 calanolide A 的活性最强,其 IC_{50} 约为 $0.07\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[12];并且可以认为四环吡喃香豆素是具有 HIV-1 抑制活性所必需的结构骨架。需要指出,这几个化合物在细胞培养抑制 HIV-1 活性实验中只使用了一种病毒株和一种细胞系统。在将来的研究中,应进一步考察多种细胞系、多种病毒株及作用于不同靶点的阳性对照药物。

本文首次发现 V0201 作为三环线型中间体具有抑制 HIV-1 RT 及 HIV-1 PR 的活性,并且该化合物在细胞培养实验中也表现了很好的 HIV-1 抑制活性,治疗指数与天然产物 calanolide A 相似。与天然产物相比,化合物 V0201 结构更加简单,其合成也更加简便。综合以上的研究结果,化合物 V0201 可以作为候选先导化合物,值得进一步研究,以开发新型的活性更强的抗 HIV 药物。

References

- [1] Sobieszczyk ME, Taylor BS, Hammer SM. Antiretroviral agents [M]//Richman DD, Whiteley RJ, Hayden FG. Clinical Virology. 3rd ed. Washington DC: ASM Press, 2009: 167–216.
- [2] Ma T, Liu L, Xue H, et al. The chemical library and structure-activity relationships of 11-demethyl-12-oxo calanolide A analogues as anti-HIV-1 agents [J]. J Med Chem, 2008, 51: 1432–1446.
- [3] Ma T, Wang L, Cheng GF, et al. Synthesis of calophyllolide analogue and its preliminary anti-inflammatory activity [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 1265–1269.
- [4] Wang L, Zhang XQ, Chen HS, et al. Improved synthesis and pharmacological evaluation of racemic 11-demethylcalanolide A [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 707–718.
- [5] Matayoshi ED, Wang GT, Krafft GA, et al. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer [J]. Science, 1990, 247: 954–958.
- [6] D'Aquila RT, Summers WC. HIV-1 reverse transcriptase/ribonuclease H: high level expression in *Escherichia coli* from a plasmid constructed using the polymerase chain reaction [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 1989, 2: 579–587.
- [7] Harishorn KL, Vogt MW, Chou TC, et al. Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus *in vitro* by azidothymidine and recombinant alpha A interferon [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987, 31: 168–172.
- [8] Zhang XQ, Sorensen M, Fung M, et al. Synergistic *in vitro* antiretroviral activity of a humanized monoclonal anti-CD4 antibody (TNX-355) and enfuvirtide (T-20) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 2231–2233.
- [9] Chou TC. The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism [M]//Chou TC, Rideout DC (editor). Synergism and Antagonism in Chemotherapy. San Diego: Academic Press, 1991.
- [10] Kostova I. Coumarins as inhibitors of HIV reverse transcriptase [J]. Curr HIV Res, 2006, 4: 347–363.
- [11] Lunney EA, Hagen SE, Domagala JM, et al. A novel nonpeptide HIV-1 protease inhibitor: elucidation of the binding mode and its application in the design of related analogs [J]. J Med Chem, 1994, 37: 2664–2677.
- [12] Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, et al. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum* [J]. J Med Chem, 1992, 35: 2735–2743.