



新型Hsp90抑制剂的设计合成及其抗真菌和抗肿瘤活性研究

施乔, 韩贵焱, 张俊腾, 刘娜

Design, synthesis and antifungal and antitumor activity research of novel Hsp90 inhibitors

SHI Qiao, HAN Guiyan, ZHANG Junteng, LIU Na

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202501019>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

具核梭杆菌小分子抑制剂的筛选及其抗结直肠癌活性研究

Screening and anti-colorectal activity of small molecule inhibitors of *Fusobacterium nucleatum*

药学实践与服务. 2024, 42(12): 503-507 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202405009

小檗碱与氟康唑合用抗氟康唑耐受白念珠菌的研究

Study on the effect of berberine combined with fluconazole on fluconazole-tolerant *Candida albicans* strains

药学实践与服务. 2025, 43(2): 87-91 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202409047

铁死亡调控蛋白GPX4的小分子抑制剂研究进展

Research progress on small-molecule inhibitors of ferroptosis regulatory protein GPX4

药学实践与服务. 2024, 42(9): 375-378 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312075

青藏高原肺结核合并念珠菌感染患者的病原菌分布特点及耐药率分析

Distribution characteristics and drug resistance rate of pathogenic bacteria in patients with pulmonary tuberculosis combined with *Candida* infection on the Tibetan plateau

药学实践与服务. 2024, 42(6): 260-262, 272 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202304014

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌临床分离株耐药性及耐药基因分析

Analysis of resistance situation and resistance genes of clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*

药学实践与服务. 2024, 42(10): 439-444 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202309059

紫杉醇棕榈酸酯的合成及其脂质体的制备与处方研究

Synthesis of paclitaxel palmitate and the formulation optimization of its liposomes

药学实践与服务. 2024, 42(9): 379-384, 410 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202404062



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

新型 Hsp90 抑制剂的设计合成及其抗真菌和抗肿瘤活性研究

施 乔, 韩贵焱, 张俊腾, 刘 娜 (海军军医大学药理学系, 上海 200433)

[摘要] **目的** 以临床在研抗肿瘤候选药物人源 Hsp90 抑制剂 Ganetespiib 为先导发现兼具协同氟康唑(FLC)抗耐药真菌和抗肿瘤双重作用的新型 Hsp90 抑制剂。**方法** 基于前期研究发现 Ganetespiib 具有良好协同 FLC 抗耐药真菌活性, 协同指数(FICI) = 0.023 ~ 0.039, 对 Ganetespiib 进行结构改造, 将其吲哚环替换为含不同取代基的苯环而设计合成一系列新化合物, 并测定其体外协同 FLC 抗耐药真菌 *C. albicans* 0304103 和抗肿瘤(HEL、HL60 和 A549 细胞)及 Hsp90 α 抑制等活性, 探讨其构效关系和作用机制。**结果** 19 个新化合物的化学结构经氢谱(^1H NMR)、碳谱(^{13}C NMR)和高分辨质谱(HRMS)确证; 绝大多数化合物具有较强的 Hsp90 α 抑制活性、良好的协同 FLC 抗耐药真菌活性和抗肿瘤活性, 苯环上供电子基取代对提升协同 FLC 抗耐药真菌活性有利; 其中, 化合物 F3 和 F5 具有优秀的协同 FLC 抗耐药真菌活性(FICI 均为 0.047)和抗肿瘤活性(IC₅₀ 分别为 0.025 ~ 0.15 $\mu\text{mol/L}$, 0.021 ~ 0.23 $\mu\text{mol/L}$), 且能下调真菌耐药基因和外排泵基因表达水平, 抑制真菌生物被膜的形成, 并能阻滞 HEL 细胞的细胞周期于 G0/G1 期。**结论** 新型 Hsp90 抑制剂如 F3 和 F5 均能有效发挥协同 FLC 抗耐药真菌和抗肿瘤双重活性, 这为研发具有协同 FLC 抗耐药真菌和抗肿瘤双重作用的新药提供新的思路。

[关键词] Hsp90 抑制剂; Ganetespiib; 白念珠菌; 抗真菌耐药性; 抗肿瘤

[文章编号] 2097-2024(2025)03-0001-12 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202501019

Design, synthesis and antifungal and antitumor activity research of novel Hsp90 inhibitors

SHI Qiao, HAN Guiyan, ZHANG Junteng, LIU Na (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To discover human Hsp90 inhibitor Ganetespiib, a novel Hsp90 inhibitor with dual functions of synergistically enhancing the antifungal activity of fluconazole (FLC) against drug-resistant fungi and anti-tumor activity based on the clinical anti-tumor candidate drug. **Methods** The previous research found that Ganetespiib had a good synergistic anti-resistant fungal activity with FLC, with a fractional inhibitory concentration index (FICI) of 0.023 to 0.039 and structural modifications were made to Ganetespiib by replacing its indole ring with a phenyl ring containing different substituents to design and synthesize a series of new compounds. The *in vitro* synergistic anti-resistant fungal activity against *C. albicans* 0304103 in combination with FLC, anti-tumor activity (against HEL, HL60 and A549 cells), and Hsp90 α inhibition activity were determined to explore their structure-activity relationship and mechanism of action. **Results** The chemical structures of 19 new compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. Most of the compounds exhibited strong Hsp90 α inhibitory activity, good synergistic activity against drug-resistant fungi in combination with FLC and anti-tumor activity. The substitution of electron-donating groups on the benzene ring was beneficial to enhancing the synergistic activity against drug-resistant fungi in combination with FLC. Among them, compounds F3 and F5 showed excellent synergistic activity against drug-resistant fungi in combination with FLC (FICI were both 0.047) and anti-tumor activity (IC₅₀ were 0.025 to 0.15 $\mu\text{mol/L}$ and 0.021 to 0.23 $\mu\text{mol/L}$ respectively), and could down-regulate the expression levels of drug resistance genes and efflux pump genes in fungi, inhibit the formation of fungal biofilms, and arrest the cell cycle of HEL cells at G0/G1 phase. **Conclusion** The novel Hsp90 inhibitors such as F3 and F5 could both effectively exert the dual activities of synergizing with FLC to combat drug-resistant fungi and to fight against tumors, which provided a new idea for the development of new drugs with dual functions of synergizing with FLC to combat drug-resistant fungi and to fight against tumors.

[Key words] Hsp90 inhibitor; Ganetespiib; *Candida albicans*; antifungal resistance; anti-tumor

[基金项目] 国家自然科学基金(82373734)

[作者简介] 施 乔, 硕士研究生, Email: shiqiao6481@163.com

[通信作者] 刘 娜, 副教授, 研究方向: 药物化学, Email: liuna66@aliyun.com

肿瘤患者由于免疫功能低下容易发生感染,因此,侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFIs)是肿瘤治疗过程中一种非常严重的并发症,在临床上或将成为人类健康的重大威胁。为此,寻找新型抗真菌、抗肿瘤效果一体化的小分子化合物是一种解决当前问题的有效策略^[1]。

Hsp90 是热休克蛋白家族中重要的分子伴侣,其通过与客户蛋白结合,可协助客户蛋白进行正确的折叠与组装,从而影响客户蛋白构象与功能^[2]。

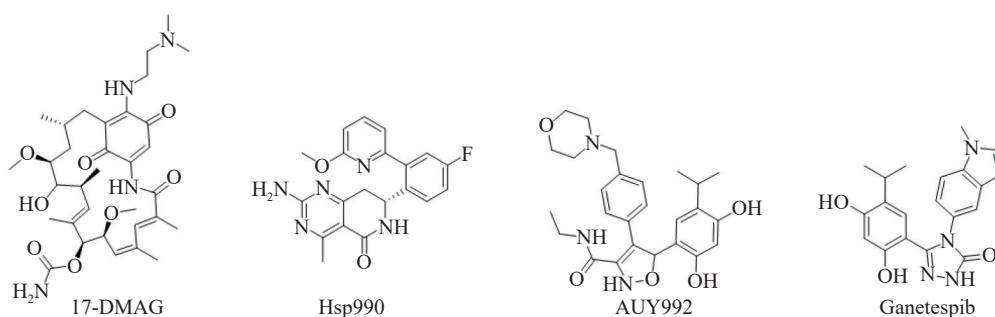


图1 部分处于临床试验阶段的Hsp90抑制剂结构

真菌细胞压力应激反应的调节与真菌抗性密不可分,真菌中Hsp90调控应激反应,在多个耐药形成的信号通路中起到重要作用,抑制真菌Hsp90也可使耐药真菌恢复对抗真菌药物的敏感性^[5]。此外作为可以诱导白念珠菌形态转变的热传感器,Hsp90参与调节真菌多个重要毒力因子的形成,如白念珠菌的生物被膜形成、菌丝态与酵母态之间的形态转换以及新生隐球菌荚膜的形成、黑素的产生等^[6]。据报道,白念珠菌Hsp90核苷酸结合结构域与人源Hsp90相似。因此,以人源Hsp90抑制剂为先导化合物发现新型Hsp90抑制剂可能是获得兼具有抗耐药真菌和抗肿瘤双重作用的化合物的一个新思路。

Ganetespib是一种含有间二酚结构的第二代Hsp90抑制剂,其通过竞争性地与Hsp90的N端ATP结合位点结合,从而影响Hsp90生物学功能。当前Ganetespib针对多种类型的肿瘤已处于临床试验阶段,如非小细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌以及急性髓细胞白血病等。课题组前期研究表明,Ganetespib具有优秀的体外协同抗耐药真菌作用(FICI范围:0.023~0.039)^[7],其与氟康唑(FLC)联用在感染耐药菌的ICR小鼠模型中显著降低肾脏菌量,并显著下调*ERG11*和外排泵基因*CDR1*、*CDR2*和*MDR1*的表达水平,初步探索了Ganetespib的抗耐药真菌机制^[8]。

因此,本研究选择Ganetespib作为先导化合物

许多研究报道表明,肿瘤细胞中Hsp90高表达,且它的众多客户蛋白如表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体-2(Her2)和间变性淋巴瘤激酶(ALK)等也与肿瘤的增殖和转移等密切相关^[3,4]。因此,当前Hsp90抑制剂主要应用于抗肿瘤研究中,且已有多种结构类型的Hsp90抑制剂进入临床试验用于肿瘤的治疗,如17-DMAG、Hsp990、Ganetespib和AUY922等(图1)。

开展进一步化合物的设计合成、协同抗耐药真菌和抗肿瘤活性及其作用机制研究,为研发一种兼具抗肿瘤作用的新型抗耐药真菌增强剂来治疗耐药念珠菌感染。

1 材料

1.1 仪器

HZ-2111K-B Shaking Incubator(太仓华利达实验设备公司);SW-CT-IF型单人双面超净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HPX-160BSH-III恒温恒湿箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);XW-80A漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司);infinite M200多功能酶标仪(Tecan Austria GmbH)。

1.2 药物与试剂

甲醇、乙醇、石油醚、四氯化碳、水合肼、乙酸乙酯、CDCl₃、DMSO-*d*₆合成工作底物详见实验方法。氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)、吗啡啉丙磺酸(MOPS)、乙醇、正己烷、环己烷、酵母浸膏、葡萄糖、蛋白胨等。

2 实验方法

2.1 化学合成

无特别提及柱层析以H型硅胶(中国青岛海洋化学)为固定相,并使用快速液相制备色谱仪(TELEDYNE ISCO, CombiFlash@Rf+)进行分离。薄层色谱以硅胶GF254为固定相。化合物的核磁

共振谱由 Bruker 公司 MSL-600 型或 MSL-300 型核磁共振仪测试完成,测试时以四甲基硅烷为内标。核磁数据中化学位移和耦合常数单位分别为 ppm 和 Hz,以 s, bs, d, t, q, dd, m 分别代表单峰、宽单峰、二重峰、三重峰、四重峰、双二重峰和多重峰。高分辨质谱由 API-3000LC-MS 质谱仪测试完成。所有目标化合物的纯度(均> 95%)由 Agilent 1260 型高效液相色谱仪测试完成,并以 C₁₈ 柱为固定相,CH₃OH/H₂O(8/2, V/V)为流动相。

2.1.1 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-苯基-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F1)的制备

以化合物 29a 为原料制备中间体 32a。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 10.04(s, 1H), 7.42-7.27(m, 12H), 7.13-7.06(m, 2H), 7.05-6.92(m, 2H), 6.29(s, 1H), 4.92(s, 2H), 4.63(s, 2H), 3.36-3.20(m, 1H), 1.20(s, 3H), 1.18(s, 3H)。

取中间体 32a(0.400 g, 0.814 mmol, 1.0 equiv)溶解于无水甲醇(20 ml)中,向其中加入 10% 的 Pd/C(0.043 g, 40.7 μ mol, 0.05 equiv),在 H₂ 条件下室温搅拌反应 12 h,过滤,滤液经减压除去溶剂,得残余物以流动相(CH₂Cl₂/CH₃OH, 100/1-100/5, V/V)在硅胶柱层析中纯化得淡灰色固体状目标化合物 F1(0.210 g, 收率 83%)。¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.94(s, 1H), 9.60(s, 1H), 9.38(s, 1H), 7.40-7.34(m, 2H), 7.33-7.29(m, 1H), 7.21-7.11(m, 2H), 6.83(s, 1H), 6.25(s, 1H), 3.04-2.94(m, 1H), 0.98(s, 3H), 0.97(s, 3H)。¹³C NMR(151 MHz, DMSO-d₆) δ 157.43, 155.04, 154.60, 145.69, 134.78, 129.17(s, 2C), 128.05, 127.93, 127.04(s, 2C), 125.92, 105.16, 102.79, 25.96, 22.95(s, 2C)。HRMS(ESI) *m/z*: calcd for C₁₇H₁₆N₃O₃ [M-H]⁻ 310.1191, Found 310.1197。

2.1.2 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(4-甲氧基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F2)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.199 g, 收率 76%)。¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.89(s, 1H), 9.62(s, 1H), 9.42(s, 1H), 7.11(d, J=8.9 Hz, 2H), 6.92(d, J=8.9 Hz, 2H), 6.81(s, 1H), 6.27(s, 1H), 3.73(s, 3H), 3.05-2.93(m, 1H), 0.99(s, 3H), 0.97(s, 3H)。¹³C NMR(151 MHz, DMSO-d₆) δ 159.01, 157.38, 155.13, 154.83, 145.97, 128.56(s, 2C), 127.83, 127.41, 125.85, 114.44(s, 2C), 105.13, 102.82, 55.78, 25.94, 22.94(s, 2C)。

2.1.3 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(3-甲氧基

苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F3)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.223 g, 收率 85%)。¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.93(s, 1H), 9.62(s, 1H), 9.43(s, 1H), 7.27(t, J=8.1 Hz, 1H), 6.89-6.87(m, 1H), 6.86(s, 1H), 6.80-6.77(m, 1H), 6.75-6.73(m, 1H), 6.27(s, 1H), 3.63(s, 3H), 3.03-2.95(m, 1H), 1.00(s, 3H), 0.99(s, 3H)。¹³C NMR(151 MHz, DMSO-d₆) δ 159.70, 157.44, 155.11, 154.47, 145.67, 135.77, 129.89, 127.96, 125.96, 119.08, 113.84, 112.60, 105.30, 102.77, 55.58, 25.96, 22.98(s, 2C)。HRMS(ESI) *m/z*: calcd for C₁₈H₁₈N₃O₄ [M-H]⁻ 340.1303, Found 340.1391。

2.1.4 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(2-甲氧基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F4)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.213 g, 收率 81%)。¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.89(s, 1H), 9.61(s, 1H), 9.53(s, 1H), 7.36(t, J=7.9 Hz, 1H), 7.24(d, J=7.9 Hz, 1H), 7.06(d, J=7.9 Hz, 1H), 6.98(t, J=7.9 Hz, 1H), 6.65(s, 1H), 6.27(s, 1H), 3.59(s, 3H), 2.99-2.87(m, 1H), 0.86(d, J=6.9 Hz, 3H), 0.84(d, J=6.9 Hz, 3H)。¹³C NMR(151 MHz, DMSO-d₆) δ 157.15, 155.53, 155.32, 154.72, 146.49, 130.94, 130.54, 126.32, 125.65, 123.06, 120.99, 112.76, 104.72, 102.80, 56.07, 25.62, 22.95, 22.87。

2.1.5 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(4-甲基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F5)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.197 g, 收率 77%)。¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.89(s, 1H), 9.58(s, 1H), 9.37(s, 1H), 7.14(d, J=8.2 Hz, 2H), 7.04(d, J=8.2 Hz, 2H), 6.81(s, 1H), 6.24(s, 1H), 3.13-2.82(m, 1H), 2.25(s, 3H), 0.97(s, 3H), 0.96(s, 3H)。¹³C NMR(151 MHz, DMSO-d₆) δ 157.42, 155.06, 154.69, 145.86, 137.55, 132.20, 129.64(s, 2C), 127.93, 126.91(s, 2C), 125.89, 105.23, 102.80, 25.98, 22.91(s, 2C), 21.02。HRMS(ESI) *m/z*: calcd for C₁₈H₁₈N₃O₃ [M-H]⁻ 324.1354, Found 324.1356。

2.1.6 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(3-甲基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F6)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.208 g, 收率 81%)。¹H NMR(600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.90(s, 1H), 9.58(s, 1H), 9.40(s, 1H), 7.18(t, J=7.8 Hz, 1H), 7.07(d, J=7.8

Hz, 1H), 7.02(s, 1H), 6.89(d, J=7.8 Hz, 1H), 6.76(s, 1H), 6.24(s, 1H), 2.97-2.90(m, 1H), 2.19(s, 3H), 0.92(s, 3H), 0.91(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.41, 155.18, 154.64, 145.73, 138.66, 134.66, 129.03, 128.83, 127.82, 127.77, 125.93, 124.18, 105.02, 102.87, 25.91, 22.92(s, 2C), 21.20。

2.1.7 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(2-甲基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F7)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.202 g, 收率 78%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.99(s, 1H), 9.64(s, 1H), 9.55(s, 1H), 7.32-7.26(m, 2H), 7.22-7.18(m, 1H), 7.12(d, J=7.8 Hz, 1H), 6.69(s, 1H), 6.28(s, 1H), 2.98-2.90(m, 1H), 2.11(s, 3H), 0.90(d, J=6.9 Hz, 3H), 0.89(d, J=6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.34, 155.37, 154.37, 145.95, 136.71, 133.65, 131.07, 129.33, 129.31, 126.98, 126.93, 125.88, 104.61, 102.87, 25.73, 22.91, 22.83, 17.72。

2.1.8 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(4-氟苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F8)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.183 g, 收率 71%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.93(s, 1H), 9.59(s, 1H), 9.35(s, 1H), 7.27-7.17(m, 4H), 6.88(s, 1H), 6.25(s, 1H), 3.06-2.98(m, 1H), 1.03(s, 3H), 1.02(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 161.44(d, J=244.6 Hz), 157.52, 154.88, 154.54, 145.69, 131.14, 129.04 (d, J=8.6 Hz, 2C), 128.07, 125.96, 115.96(d, J=22.8 Hz, 2C), 105.11, 102.74, 25.99, 22.96(s, 2C). HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_3$ [M-H] $^-$ 328.1103, Found 328.1107。

2.1.9 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(3-氟苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F9)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.205 g, 收率 79%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.00(s, 1H), 9.64(s, 1H), 9.39(s, 1H), 7.42-7.37(m, 1H), 7.19-7.12(m, 1H), 7.09-7.05(m, 1H), 7.00-6.97(m, 1H), 6.91(s, 1H), 6.26(s, 1H), 3.08-2.97(m, 1H), 1.03(s, 3H), 1.02(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 162.08(d, J=243.7 Hz), 157.63, 154.89, 154.32, 145.48, 136.33 (d, J=10.6 Hz), 130.66(d, J=9.0 Hz), 128.15, 126.12, 122.80, 114.81(d, J=20.8 Hz), 114.02(d, J=24.0 Hz), 105.12, 102.78, 26.04, 22.98(s, 2C)。

2.1.10 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(2-氟苯

基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F10)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.196 g, 收率 76%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.00(s, 1H), 9.63(s, 1H), 9.41(s, 1H), 7.44-7.39(m, 1H), 7.33-7.28(m, 1H), 7.28-7.24(m, 1H), 7.22-7.16(m, 1H), 6.84(s, 1H), 6.25(s, 1H), 3.02-2.94(m, 1H), 0.99(s, 3H), 0.98(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.84(d, J=250.5 Hz), 157.58, 155.03, 154.36, 146.04, 131.09 (d, J=7.6 Hz), 130.60, 127.52, 125.94, 125.04, 122.42 (d, J=12.6 Hz), 116.63(d, J=19.4 Hz), 104.68, 102.74, 25.93, 22.93(s, 2C)。

2.1.11 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(2,4-二氟苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F11)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.211 g, 收率 80%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.97(s, 1H), 9.61(s, 1H), 9.38(s, 1H), 7.47-7.37(m, 1H), 7.35-7.27(m, 1H), 7.15-7.09(m, 1H), 6.89(s, 1H), 6.24(s, 1H), 3.08-2.95(m, 1H), 1.04(s, 3H), 1.03(s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161.52(dd, J=247.8, 11.8 Hz), 157.35(dd, J=252.3, 13.5 Hz), 156.92, 154.09, 153.52, 145.32, 130.92(d, J=10.1 Hz), 127.03, 125.21, 118.44 (d, J=12.3 Hz), 111.29(d, J=21.8 Hz), 104.41(t, J=25.5 Hz), 103.92, 101.91, 25.23, 22.20(s, 2C). HRMS(ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$ [M-H] $^-$ 346.1009, Found 346.1002。

2.1.12 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(4-三氟甲基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F12)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.219 g, 收率 81%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.03(s, 1H), 9.63(s, 1H), 9.32(s, 1H), 7.73(d, J=8.5 Hz, 2H), 7.36(d, J=8.5 Hz, 2H), 6.93(s, 1H), 6.23(s, 1H), 3.05-2.96(m, 1H), 1.03 (s, 3H), 1.02(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.79, 154.65, 154.23, 145.39, 138.56, 128.20, 128.02(q, J=32.0 Hz, 2C), 126.95(s, 2C), 126.25, 126.23, 124.44(q, J=272.0 Hz), 105.10, 102.77, 26.09, 22.93(s, 2C). HRMS(ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$ [M-H] $^-$ 378.1071, Found 378.1076。

2.1.13 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(3-三氟甲基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F13)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.203 g, 收率 75%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.05(s, 1H), 9.63(s, 1H),

9.36(s, 1H), 7.66(d, J=7.9 Hz, 1H), 7.60(t, J=7.9 Hz, 1H), 7.52(s, 1H), 7.46(d, J=7.9 Hz, 1H), 6.95(s, 1H), 6.25(d, J=2.4 Hz, 1H), 3.07-2.99(m, 1H), 1.04(s, 3H), 1.02(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.72, 154.74, 154.30, 145.43, 135.54, 130.38, 129.84 (q, J=32.2 Hz), 128.25, 126.30, 124.46, 124.12(q, J=272.4 Hz), 123.25, 123.22, 105.02, 102.72, 26.04, 22.94(s, 2C)。

2.1.14 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(2-三氟甲基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F14)的制备
目标化合物的制备方法参考化合物 F1。

淡灰色固体(0.211 g, 收率 78%)。 ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.01(s, 1H), 9.67(s, 1H), 9.61(s, 1H), 7.83(d, J=7.7 Hz, 1H), 7.75(t, J=7.7 Hz, 1H), 7.66(t, J=7.7 Hz, 1H), 7.54(d, J=7.7 Hz, 1H), 6.58(s, 1H), 6.25(s, 1H), 2.95-2.83(m, 1H), 0.85(d, J=6.9 Hz, 3H), 0.82(d, J=6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.46, 155.48, 154.71, 145.83, 133.99, 132.66, 132.03, 130.67, 127.97, 127.92(q, J=30.5 Hz), 126.91, 125.81, 123.52(q, J=273.9 Hz), 104.03, 102.83, 25.60, 22.84(s, 2C)。

2.1.15 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(4-氨基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F15)的制备

以化合物 29o 为原料制备中间体 31o。 ^1H NMR(600 MHz, CDCl_3) δ 8.38(s, 1H), 7.94(s, 1H), 7.35(d, J=8.9 Hz, 2H), 6.89(d, J=8.9 Hz, 2H), 6.75(s, 1H), 3.81(bs, 2H), 1.48(s, 9H)。

取中间体 31o(0.642 g, 2.41 mmol, 1.0 equiv) 溶解于无水乙醇/1,4-二氧六环(1/1, V/V , 50 ml)中, 在回流条件下搅拌反应 2 h, 后依次加入 NaOH(0.58 g, 14.5 mmol, 6.0 equiv)和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (2.38 g, 7.23 mmol, 3.0 equiv), 继续在回流条件下搅拌反应 12 h, 向反应液中加入 NaOH(0.193 g, 4.82 mmol, 2.0 equiv)和 H_2O (20 ml), 并继续在回流条件下搅拌反应 12 h, 待反应液降至室温后, 过滤, 滤液加入 150 ml 的水稀释, 以 1 mol/L HCl 水溶液调节 pH 至 7 左右, 加入乙酸乙酯(200 ml \times 2)萃取, 收集乙酸乙酯层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 滤液经减压除去溶剂, 得残余物以流动相($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100/0-100/8, V/V)在硅胶柱层析中纯化得棕色固体状中间体 32o(0.425 g, 收率 35%)。 ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.79(s, 1H), 7.40-7.30(m, 8H), 7.22(d, J=7.3 Hz, 2H), 7.11(s, 1H), 6.72(s, 1H), 6.67(d, J=8.6 Hz, 2H), 6.42(d, J=8.6 Hz, 2H), 5.21(s, 2H), 5.06(s, 2H), 4.94(s, 2H), 3.17-3.09(m, 1H),

1.08(s, 3H), 1.07(s, 3H)。

取中间体 32o(0.40 g, 0.790 mmol, 1.0 equiv) 溶解于无水甲醇(20 ml)中, 向其中加入 10% 的 Pd/C(0.042 g, 39.5 μmol , 0.05 equiv), 在 H_2 条件下室温搅拌反应 12 h, 过滤, 滤液经减压除去溶剂, 得残余物以流动相($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100/1-100/5, V/V)在硅胶柱层析中纯化得淡黄色固体即为目标化合物 F15(0.202 g, 收率 78%)。 ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.79(s, 1H), 9.62(s, 1H), 9.52(s, 1H), 6.80(d, J=8.6 Hz, 2H), 6.73(s, 1H), 6.50(d, J=8.6 Hz, 2H), 6.28(s, 1H), 5.26(bs, 2H), 2.98-2.87(m, 1H), 0.92(s, 3H), 0.91(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.19, 155.42, 155.03, 149.02, 146.25, 128.44(s, 2C), 127.35, 125.68, 122.56, 114.03(s, 2C), 104.89, 102.87, 25.84, 22.93(s, 2C). HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ 325.1306, Found 325.1314。

2.1.16 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(3-氨基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F16)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F15。

淡黄色固体(0.220 g, 收率 85%)。 ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.87(s, 1H), 9.60(s, 1H), 9.50(s, 1H), 6.99(t, J=7.9 Hz, 1H), 6.79(s, 1H), 6.56-6.51(m, 1H), 6.47(t, J=2.1 Hz, 1H), 6.29(s, 1H), 6.26-6.24(m, 1H), 5.27(bs, 2H), 3.02-2.93(m, 1H), 0.96(s, 3H), 0.95(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.22, 155.38, 154.54, 149.78, 145.69, 135.32, 129.48, 127.28, 125.73, 114.57, 113.85, 112.94, 104.78, 102.86, 25.84, 22.91(s, 2C)。

2.1.17 5-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-4-(4-氨基苯基)-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(F17)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F15。

淡黄色固体(0.183 g, 收率 71%)。 ^1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.92(s, 1H), 9.69(s, 1H), 9.65(s, 1H), 7.11-7.06(m, 1H), 6.87-6.83(m, 1H), 6.80-6.76(m, 1H), 6.74(s, 1H), 6.55-6.50(m, 1H), 6.29(s, 1H), 3.62(bs, 2H), 2.92-2.83(m, 1H), 0.83(d, J=6.9 Hz, 3H), 0.76(d, J=6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 157.11, 155.64, 154.50, 145.87, 130.19, 129.96, 126.10, 125.87, 119.24, 116.71, 116.37, 104.02, 102.90, 25.58, 22.86, 22.82。

2.1.18 4-(3-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-5-氧代-1,5-二氢-4H-1,2,4-三唑-4-基)苯甲酸(F18)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F15。

淡灰色固体(0.196 g, 收率 74%)。 ^1H NMR

(600 MHz, DMSO- d_6) δ 13.02(bs, 1H), 12.00(s, 1H), 9.61(s, 1H), 9.30(s, 1H), 7.91(d, J=8.3 Hz, 2H), 7.28(d, J=8.3 Hz, 2H), 6.95(s, 1H), 6.24(s, 1H), 3.07-3.01(m, 1H), 1.06(s, 3H), 1.05(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 167.34, 157.68, 154.72, 154.25, 145.48, 138.52, 130.45, 130.07(s, 2C), 128.15, 126.26(s, 2C), 126.10, 105.23, 102.72, 26.07, 22.96(s, 2C). HRMS(ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.1241, Found 356.1253.

2.1.19 3-(3-(2,4-二羟基-5-异丙基苯基)-5-氧代-1,5-二氢-4H-1,2,4-三唑-4-基)苯甲酸(F19)的制备

目标化合物的制备方法参考化合物 F15。

淡灰色固体(0.220 g, 收率 83%)。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13.14(bs, 1H), 11.99(s, 1H), 9.61(s, 1H), 9.34(s, 1H), 7.92-7.86(m, 1H), 7.79(t, J=1.8 Hz, 1H), 7.50(t, J=7.9 Hz, 1H), 7.41-7.33(m, 1H), 6.94(s, 1H), 6.25(s, 1H), 3.10-2.97(m, 1H), 1.05(s, 3H), 1.04(s, 3H). ^{13}C NMR(151 MHz, DMSO- d_6) δ 166.98, 157.59, 154.77, 154.45, 145.56, 135.08, 131.97, 130.80, 129.39, 128.59, 128.15, 127.67, 126.10, 105.16, 102.77, 26.05, 22.97(s, 2C)。

2.2 体外抗真菌活性测试

化合物体外协同抗耐药真菌活性测试采用美国临床和实验室标准协会推荐的棋盘式微量液基稀释法, 实验步骤如下所示。

收集指数生长末期的真菌细胞, 以真菌用 RPMI 1640 培养基稀释至 1×10^3 CFU/ml。按照每孔 100 μl 接种真菌稀释液至透明 96 孔板中, 其中 1~11 列加入系列稀释的化合物, A-H 行加入系列稀释的 FLC(第 12 列作为阳性对照, 孔中仅加入真菌稀释液不加入药物, 第 G 行作为阴性对照, 孔中不加入药物也以 RPMI 1640 培养基代替真菌稀释液, 11 列仅加入化合物不加入 FLC, H 行仅加入 FLC 不加入化合物), 而后在 35 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 48 h。

测定每孔在 630 nm 处的吸光度 A , 依据公式: 抑制率 $\% = (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{化合物孔}}) / (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{阴性对照孔}}) \times 100\%$, 计算各孔对应的抑制率。在 96 孔板中 A1-F10 区域内, 如果某一孔对应的所有左上方孔和该孔的抑制率均大于 80%, 则该孔对应的化合物和 FLC 浓度分别作为 $\text{FIC}_{\text{化合物}}$ 和 FIC_{FLC} , 利用公式: $\text{FICI} = (\text{FIC}_{\text{化合物}} / \text{MIC}_{80_{\text{化合物}}}) + (\text{FIC}_{\text{FLC}} / \text{MIC}_{80_{\text{FLC}}})$ (MIC₈₀>64 $\mu\text{g/ml}$ 的化合物, MIC₈₀ 以 64 $\mu\text{g/ml}$ 计算), 计算各化合物对应的 FICI。

2.3 体外 Hsp90 α 抑制活性测试

体外 Hsp90 α 抑制活性测试采用荧光偏振法,

实验步骤如下所示。

向黑色 96 孔板的每孔中加入 Hsp90 α (3.4 $\mu\text{g/ml}$)、FITC-Geldanamycin 和系列稀释的化合物的实验用 Buffer 溶液 100 μl (阳性对照孔不加入化合物, 阴性对照孔既不加入 Hsp90 α 也不加入化合物), 而后在室温条件下孵育 3 h。测定每孔在激发波长 485 nm 和发射波长 530 nm 下的荧光强度, 根据荧光强度转换得荧光偏振值 Fb。利用公式: 抑制率 $\% = (\text{Fb}_{\text{阳性对照孔}} - \text{Fb}_{\text{化合物孔}}) / (\text{Fb}_{\text{阳性对照孔}} - \text{Fb}_{\text{阴性对照孔}}) \times 100\%$, 计算各浓度下化合物的抑制率, 并以 Graphpad 软件计算化合物 IC₅₀ 值。

2.4 体外抗肿瘤活性测试

抗 HEL 和 HL60 的细胞活性测试步骤如下所示。

在透明 96 孔板中每孔加入 50 μl 接种 HEL 细胞(含 10 000 个)培养基悬液或 HL60 细胞(含 20 000 个)培养基悬液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO₂ 的条件下培养 24 h。向每孔加入含有系列浓度的化合物培养基溶液 50 μl , 继续在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO₂ 的条件下培养 48 h(阳性对照孔接种细胞不加入化合物, 阴性对照孔不接种细胞也不加入化合物, 并均以纯培养基代替)。向每孔中加入含有 10 μl 的 CCK-8, 在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO₂ 的条件下培养 30 min。测定每孔在 450 nm 处的吸光度 A , 依据公式: 抑制率 $\% = (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{化合物孔}}) / (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{阴性对照孔}}) \times 100\%$, 计算各浓度下化合物的抑制率, 并以 Graphpad 软件计算化合物的 IC₅₀ 值。

抗 A549 的细胞活性测试步骤如下所示。

按照每孔 5 000 个细胞数接种 A549 的细胞培养基悬液 100 μl 于透明 96 孔板中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO₂ 的条件下培养 24 h。吸弃每孔培养基, 向每孔加入含有不同浓度的化合物培养基溶液 100 μl , 在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO₂ 的条件下继续培养 48 h(阳性对照孔接种细胞不加入化合物, 阴性对照孔不接种细胞也不加入化合物且以等体积纯培养基代替)。吸弃每孔培养基, 向每孔中加入含有 10% CCK-8 的培养基溶液 100 μl , 在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO₂ 的条件下继续培养 30 min。测定每孔在 450 nm 处的吸光度 A , 依据公式: 抑制率 $\% = (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{化合物孔}}) / (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{阴性对照孔}}) \times 100\%$, 计算各浓度下化合物的抑制率, 并以 Graphpad 软件计算化合物 IC₅₀。

2.5 体外时间杀菌曲线实验

收集指数生长末期的 *C. albicans* 0304103, 并以真菌用 RPMI 1640 培养基稀释至 1×10^4 CFU/ml。按照每管 5 ml 接种真菌稀释液至培养管中, 加入

不同浓度的化合物 C6 和 32 μg/ml 的 FLC, 后在 30 °C 和 200 r/min 条件下的恒温振荡箱中培养。取 0、3、6、9、12 和 24 h 时各组真菌培养液 100 μl, 以 PBS 稀释至适宜浓度后, 均匀涂布在含有 SDA 固体培养基的培养皿中, 各组每个时间点均涂布 3 次, 而后在 30 °C 条件下培养 48 h。对培养皿中生成的菌落数计数, 并绘制时间-菌落数折线图。

2.6 Real time RT-PCR 实验

挑取 *C. albicans* 0304103 单菌落接种于 1 ml 的 YEPD 培养基, 在 30 °C 的条件下培养 16 h。吸取 10 μl 真菌培养液, 分别接种于含有 B8(32 μg/ml), C6(32 μg/ml), FLC(32 μg/ml) 以及空白组)的 YEPD 培养基(50 ml)中, 然后在 30 °C 条件下继续培养 24 h。离心收集各组真菌细胞, 参照柱式真菌 RNAout 试剂盒提取各组真菌总 RNA, 并测定各组提取的总 RNA 浓度。以提取的总 RNA 为模板参照反转录试剂盒制备各组 cDNA。以获得的 cDNA 参照 qPCR 试剂盒, 在 40 个循环内扩增各组基因以计算 CT 值。根据公式: 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, 计算不同组间各基因的表达倍数。本实验中所使用的内参基因为 ACT1(表 1)。

2.7 生物被膜形成实验

离心收集指数生长末期的 *C. albicans* 0304103, 以真菌用 RPMI 1640 培养基稀释至 1×10^6 CFU/ml, 后以每孔 100 μl 接种至透明 96 孔板中, 在 37 °C 下培养 90 min(阴性对照组不接种真菌)。吸弃每孔培养基, 以 PBS 清洗 2 次, 向每孔中加入系列稀释的化合物 RPMI 1640 培养基溶液(阳性对照孔和阴性对照孔均加入不含化合物培养基)。后继续在 37 °C 下培养 24 h。吸弃每孔培养基, 以 PBS 清洗 2 次, 向每孔中加入甲萘醌(3 μmol/L)和 XTT (0.5 mg/ml)的 PBS 溶液 100 μl, 继续在 37 °C 下培养 3 h。吸取各孔培养液 80 μl 至另一透明 96 孔板中, 读取各孔在 492 nm 处的吸光度值 A。根据吸光度计算各浓度化合物下的生物被膜形成率, 形成率 = $(A_{\text{化合物孔}} - A_{\text{阴性对照孔}}) / (A_{\text{阳性对照孔}} - A_{\text{阴性对照孔}}) \times 100\%$ 。

2.8 菌丝生长实验

离心收集指数生长末期的 *C. albicans* 0304103, 以 Spider 培养基稀释真菌至 1×10^5 CFU/ml。吸取 2 ml 菌悬液接种在 12 孔板中, 并加入不同浓度化合物, 在 37 °C 下培养 3 h。使用无目镜倒置显微镜观察并记录各组真菌的细胞形态。

2.9 体外细胞周期实验

吸取 1 ml 含 HEL 细胞的培养基悬液(含 $3 \times$

表 1 Real time RT-PCR 实验所用的基因引物序列

名称	序列
ERG11-F	ACTCATGGGGTTGCCAATGT
ERG11-R	GAGCAGCATCACGTCTCCAA
CDR1-F	TCCACGGTCGTGAATTCCAATGTG
CDR1-R	GCCAGCAACAGGACCAGCTTC
CDR2-F	GCTACTGCCATGTCACCTCTCCAC
CDR2-R	GGACAACCTGTGCTTCCAGGAGTAG
MDR1-F	CCACTGGTGGTGAAGTGTT
MDR1-R	TCGTTACCGGTGATGGCTCT
ALS1-F	GTGTCCGGTTGTCAGAAGAGC
ALS1-R	TGTTCACGTGAGCCATGG
ALS3-F	ACTTTGTGGTCTACAACCTGGG
ALS3-R	CCAGATGGGGATTGTAAAGTGG
HWPI-F	CTGAACCTTCCCAGTTGCT
HWPI-R	CGACAGCACTAGATTCCGGA
EAPI-F	TCCTACACGACTGACACTGC
EAPI-R	TGACACCCGTAGTTACTGCTG
BCR1-F	TCCTTTACGTGCACCACCTC
BCR1-R	ATGCCGACGATTCAGCTGAT
ACE2-F	ACTTTGTGGTCTACAACCTGGG
ACE2-R	CCAGATGGGGATTGTAAAGTGG
RLM1-F	GTGCCTGCGAATGTTCCAAA
RLM1-R	TGCATTGCTTCTCCTGTCA
ZAPI-F	TACCGCGACTACAAACCACC
ZAPI-R	TGCCCTGTTGCTCATGTTT
ACT1-F	GGTTTGAAGCTGCTGGTAT
ACT1-R	ACCACCAATCCAGACAGAGT

10^5 个细胞)接种于 24 孔板中, 在 37 °C 和 5% CO₂ 的条件下培养 24 h。向每孔中加入含有系列浓度的化合物培养基溶液 1 ml(对照孔不加入化合物), 继续在 37 °C 和 5% CO₂ 的条件下培养 48 h。1 000 r/min 离心 5 min 收集每孔细胞悬液, 并以 PBS 清洗两次。向收集的细胞中加入 300 μl Binding Buffer 结合液以及 10 μl PI 染料, 混合均匀, 在室温下避光孵育 15 min, 以流式细胞仪进行检测各组细胞。

3 实验结果

3.1 新型 Hsp90 抑制剂的设计

分析 Ganetespib 与人 Hsp90α 的复合物晶体结构(PDB: 3UTH), 可发现其分子中的间二酚部分和三唑酮部分与 Hsp90α 结合较为紧密(如间二酚部分的 2'位酚羟基与 Asp93, 三唑酮的 1 位 N 原子

与 Thr184 均存在氢键结合), 而甲基咪唑片段中苯环一侧也可与 Lys58 存在阳离子- π 作用, 吡咯环一侧则处于溶剂暴露区^[9]。近期 Ganetespib 的类似物 AUY922 同 *C. albicans* Hsp90 复合物晶体结构 (PDB: 6CJS) 也已见报道^[10]。该晶体结构显示, AUY922 同 *C. albicans* Hsp90 的结合模式与 Ganetespib 同人 Hsp90 α 之间的结合相似, 结构中 AUY922 的间二酚部分的 2' 位酚羟基和噁(排版造字: 口字旁的恶)唑环中 1 位 O 原子可分别与 Asp82 和 Thr174 形成氢键作用, 而另一侧连接有吗啉的苯环与 Lys47 具有阳离子- π 作用。因此, 本研究拟计划保留 Ganetespib 重要的结合部分(间二酚部分、三唑酮部分与咪唑的苯环一侧), 将吡咯环替换为新的基团(即咪唑环替换为含不同取代基的苯环)以设计新型 Hsp90 抑制剂, 以期发现活性更

优的抗真菌与抗肿瘤双重作用化合物(图 2)。

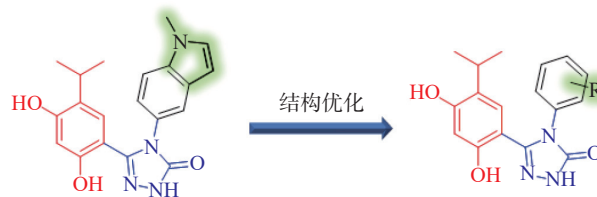


图 2 新型 Hsp90 抑制剂的设计

3.2 目标化合物的合成

以含不同取代基的苯胺(29a-s)为原料, 在三乙胺作用下与氯甲酸苯酯反应得到中间体 30a-s, 在回流条件下与水合肼反生肼解反应得到中间体 31a-s, 再经三步反应得到中间体 32a-s, 最后经 H₂ 作用下去除苄基保护基得到目标化合物 F1-F19 (图 3)。

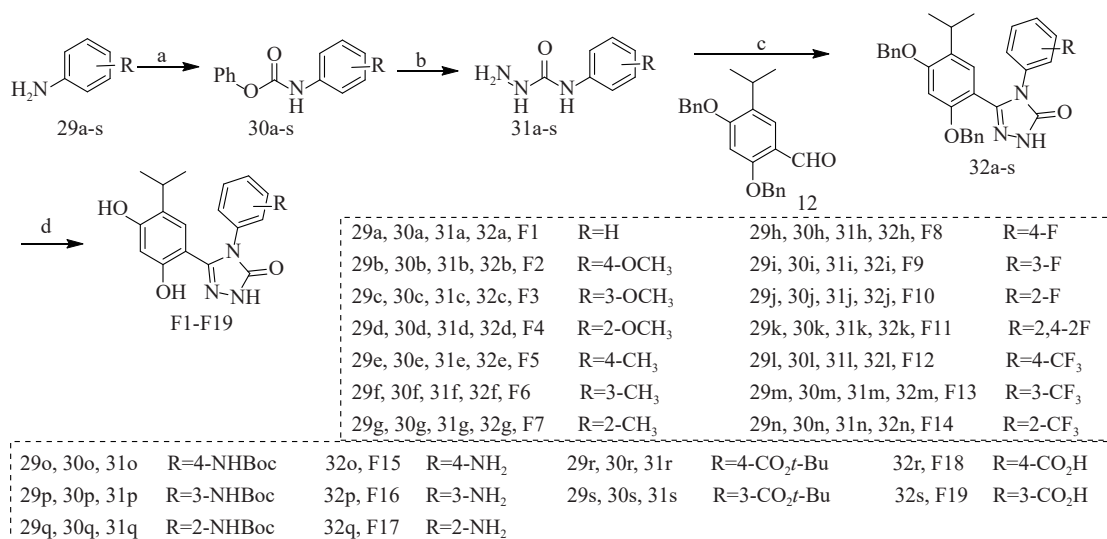


图 3 目标化合物的合成路线

反应与条件: (a) PhOCOCl, CH₂Cl₂, Et₃N, rt, 30 min, 产率 75%~92%; (b) NH₂NH₂·H₂O, EtOH, 回流, 3 h, 产率 72%~91%; (c) (i) EtOH, 1,4-dioxane, 回流, 2 h; (ii) K₃Fe(CN)₆, NaOH, 回流, 12 h 产率 53%~72%; (iii) (用于制备 32o~32s) NaOH, H₂O, 回流, 12 h, 产率 35%~49%; (d) H₂, Pd/C, CH₃OH, rt, 12 h, 产率 71%~85%。

3.3 目标化合物的体外活性评价与构效关系

目标化合物的体外活性评价包括对人源 Hsp90 α 的抑制活性评价、通过棋盘式微量液基稀释法测试的化合物联合 FLC 的体外协同抗耐药真菌活性以及抗肿瘤细胞活性评价。其中, 耐药真菌选择临床分离的耐药 *C. albicans* (菌编号: 0304103); 肿瘤细胞选择 2 株血液肿瘤细胞系 HEL (人红白细胞白血病细胞) 和 HL60 (人早幼粒白血病细胞), 1 株人肺癌细胞系 (A549)。实验中以先导化合物 Ganetespib 作为对照药物。

通过将 Ganetespib 的分子中甲基咪唑结构替换为含有不同取代基的苯环得到了目标化合物, 该

类化合物的体外活性如表 2 所示。在 1 μ mol/L 的浓度下, 目标化合物对 Hsp90 α 均具有强的抑制作用(抑制率均 \geq 94%)。

体外协同抗耐药真菌活性显示, 绝大部分目标化合物都具有与 FLC 的协同作用(FICI<0.5)。整体上看, 苯环上取代基的电子效应对协同抗耐药真菌活性的影响较大, 如苯环上无取代基(F1)或含有供电子基团如甲氧基(F2-F4)、甲基(F5-F7)、氨基(F15-F17)或弱吸电子基团如氟取代(F8-F10)的化合物要比含有强吸电子基团如三氟甲基(F12-F14)和羧基(F18-F19)的化合物协同抗耐药真菌活性强, 后者大部分化合物(F12, F14, F18-F19)甚至丧

表2 化合物 F1-F19 的 Hsp90 α 抑制活性、体外协同抗耐药真菌及抗肿瘤活性

化合物	取代基(R)	Hsp90 α	<i>C. albicans</i> 0304103($\mu\text{g/ml}$)		HEL	HL60	A549
		抑制率(% , 1 $\mu\text{mol/L}$)	MIC ₈₀	FICI	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
F1	H	99	>64	0.047	0.049 \pm 0.003	0.13 \pm 0.05	0.15 \pm 0.024
F2	4-OCH ₃	99	>64	0.047	0.026 \pm 0.003	0.17 \pm 0.014	0.32 \pm 0.031
F3	3-OCH ₃	97	>64	0.047	0.025 \pm 0.002	0.061 \pm 0.011	0.15 \pm 0.022
F4	2-OCH ₃	97	>64	0.063	0.048 \pm 0.007	0.069 \pm 0.005	0.55 \pm 0.15
F5	4-CH ₃	97	>64	0.047	0.021 \pm 0.002	0.067 \pm 0.005	0.23 \pm 0.026
F6	3-CH ₃	97	>64	0.047	0.052 \pm 0.002	0.12 \pm 0.017	0.22 \pm 0.02
F7	2-CH ₃	98	>64	0.023	0.107 \pm 0.019	0.28 \pm 0.029	0.79 \pm 0.076
F8	4-F	95	>64	0.125	0.138 \pm 0.012	0.325 \pm 0.026	0.26 \pm 0.008
F9	3-F	97	>64	0.063	0.115 \pm 0.012	0.25 \pm 0.008	0.25 \pm 0.063
F10	2-F	95	>64	0.047	0.037 \pm 0.002	0.083 \pm 0.004	0.40 \pm 0.067
F11	2,4-2F	94	>64	0.188	0.153 \pm 0.012	0.466 \pm 0.012	0.76 \pm 0.012
F12	4-CF ₃	96	>64	2	0.033 \pm 0.001	0.115 \pm 0.007	0.10 \pm 0.022
F13	3-CF ₃	97	>64	0.094	0.085 \pm 0.009	0.361 \pm 0.024	0.47 \pm 0.1
F14	2-CF ₃	98	>64	-	0.408 \pm 0.022	0.650 \pm 0.014	0.22 \pm 0.02
F15	4-NH ₂	99	>64	0.063	0.047 \pm 0.003	0.055 \pm 0.003	0.65 \pm 0.14
F16	3-NH ₂	97	>64	0.125	0.070 \pm 0.034	0.077 \pm 0.006	0.25 \pm 0.063
F17	2-NH ₂	96	>64	0.141	0.120 \pm 0.025	0.135 \pm 0.013	0.63 \pm 0.068
F18	4-CO ₂ H	94	>64	-	5.5 \pm 0.73	16 \pm 2.9	43 \pm 3
F19	3-CO ₂ H	95	>64	-	16 \pm 1.2	13 \pm 0.47	21 \pm 2.1
Ganetespib	-	99	>64	0.023	0.021 \pm 0.002	0.023 \pm 0.002	0.11 \pm 0.019

失与 FLC 的协同作用(FICI > 0.5);此外,含有单个吸电子基团的单氟取代的化合物(F8-F10)也要强于含有两个氟取代的化合物(F11)。对比同一取代基在苯环上的取代位置,可发现取代位点的不同对化合物的协同抗耐药真菌活性影响不大。

目标化合物的体外抗肿瘤活性显示,除含有强吸电子效应和负电荷的羧基取代化合物(F18-F19, IC₅₀=5.5 ~ 43 $\mu\text{mol/L}$)外均呈现出强的抗肿瘤活性(IC₅₀=0.021 ~ 0.8 $\mu\text{mol/L}$)。相比于协同抗耐药真菌活性,目标化合物分子中苯环上取代基的电子效应对抗肿瘤活性影响不大,如含强吸电子基团三氟甲基的化合物 F12-F14(IC₅₀=0.03 ~ 0.8 $\mu\text{mol/L}$)对同一肿瘤细胞系的活性仅稍弱于含供电子基团甲氧基的化合物 F2-F4(IC₅₀=0.02 ~ 0.6 $\mu\text{mol/L}$)。但苯环上取代基位置对活性影响较大,若苯环的 2 位上含有较大体积的取代基如甲氧基(F4)、甲基(F7)、三氟甲基(F14)、氨基(F17),其抗肿瘤活性要明显弱于这些取代基在苯环 3 位和 4 位取代的化合物,然而较小空间体积的氟取代化合物(F8、F9 与 F10 比较)则几乎不受取代位点的影响。

由于化合物 F3 和 F5 的体外协同抗耐药真菌活性与抗肿瘤活性均较强,因此选择这两个化合物开展进一步的抗耐药真菌与肿瘤细胞的作用机制研究。

3.4 作用机制研究

3.4.1 化合物 F3 和 F5 作用于耐药菌的杀菌作用

为进一步验证化合物 F3 和 F5 抗真菌作用机制,开展了时间-杀菌曲线实验。结果显示,在化合物 F3(16 $\mu\text{g/ml}$)、F5(16 $\mu\text{g/ml}$)以及 FLC(8 $\mu\text{g/ml}$, CLSI 推荐的敏感性折点浓度)作用下,真菌能够正常生长,与化合物无直接抗真菌活性结果一致。而化合物 F3 和 F5(4 $\mu\text{g/ml}$)与 FLC(8 $\mu\text{g/ml}$)联合作用下,真菌生长几乎完全抑制(图 4)。上述结果表明,化合物 F3 和 F5 能够恢复耐药真菌对 FLC 的敏感性,与设计思想吻合。

3.4.2 化合物 F3 和 F5 对真菌 CYP51 和外排泵相关基因表达的抑制作用

利用 real time RT-PCR 技术,对化合物 F3 (8 $\mu\text{g/ml}$)、F5(8 $\mu\text{g/ml}$)和先导化合物 Ganetespib 协同 FLC(8 $\mu\text{g/ml}$)作用下白念珠菌的耐药相关基

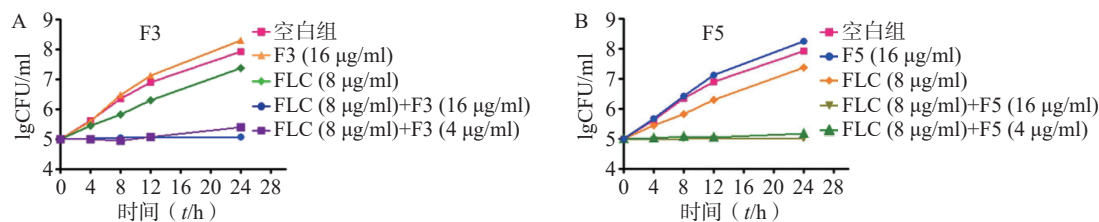


图4 时间杀菌曲线

A.F3 与 FLC 协同作用下的时间杀菌曲线实验结果; B.F5 与 FLC 协同作用下的时间杀菌曲线实验结果

因如 CYP51 基因 (*ERG11*) 和外排泵相关基因 (*CDR1*、*CDR2*、*MDR1*) 的表达量进行了检测。结果如图 5A 所示: 相比于 FLC 的单独用药组, 化合物 F3、F5 以及先导化合物 Ganetespib 与 FLC 的联合用药组的 *ERG11*、*CDR1*、*CDR2* 和 *MDR1* 基因表达水平均显著下调。

为验证化合物对药物外排泵基因表达的影响, 进一步开展了 Rh6G 外排试验 (图 5B)。结果显示: 化合物 F3、F5 和 Ganetespib 协同 FLC 组在多个时间点的 Rh6G 外排量均明显低于 FLC 组, 这与它们在联合作用下真菌外排泵基因表达明显低于 FLC 组的 real time RT-PCR 实验结果相一致。

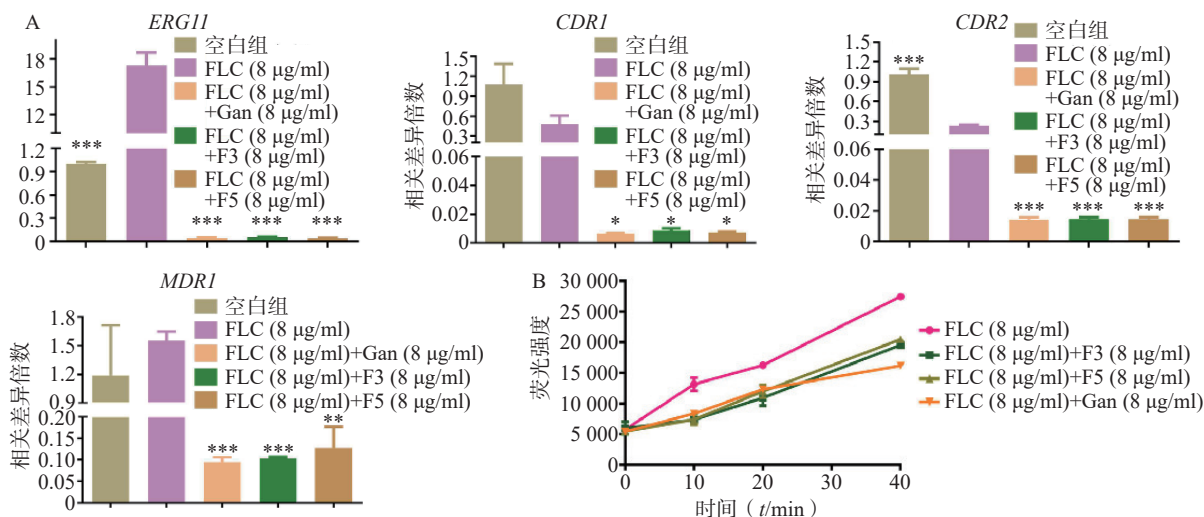


图5 化合物对真菌外排泵的抑制

A. 化合物作用下 *C. albicans* 0304103 真菌耐药基因相对表达水平; B. 不同时间点细胞外 Rh6G 荧光强度

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 FLC (8 $\mu\text{g/ml}$) 组比较。

3.4.3 化合物 F3 和 F5 对真菌生物被膜形成的抑制作用

真菌生物被膜的形成既是真菌产生耐药的重要因素, 也是重要的毒力因子。通过 XTT 还原法, 对化合物 F3、F5 以及先导化合物 Ganetespib 作用下耐药白念珠菌生物被膜的形成率进行了测定。结果表明, 化合物 F3、F5 以及 Ganetespib 在高浓度下对生物被膜的形成均具有抑制作用, 如在 64 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下, 生物被膜形成率分别为 77.3%、70.8% 和 70.4% (图 6A)。

菌丝态真菌的产生是影响生物被膜形成的重要因素。为研究化合物 F3、F5 以及先导化合物 Ganetespib 抑制生物被膜形成的作用机制, 通过倒置显微镜观察了化合物 F3、F5 以及先导化合物 Ganetespib 在 64 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下, 耐药真菌的形态

上变化 (图 6B)。结果显示, 与空白组相比, 这些化合物作用后的真菌形态均无明显区别。提示化合物 F3、F5 以及先导化合物 Ganetespib 可能不通过抑制菌丝态真菌的产生而抑制生物被膜的形成。

真菌黏附作用的形成与胞外聚合物的产生也是影响生物被膜形成的重要因素。为进一步地探究化合物抑制生物被膜形成的作用机理, 利用 real time RT-PCR 技术对这两种生物被膜形成因素的相关基因进行了考察 (图 6C)。基因 *ALSI*、*ALS3*、*HWPI*、*EAPI*、*BCR1* 和 *ACE2* 均编码影响真菌形成黏附作用相关的蛋白从而影响生物被膜的形成, 基因 *RLM1* 和 *ZAP1* 则编码调节胞外聚合物产生的转录因子进而影响生物被膜的形成^[11-18]。针对这些基因的 real time RT-PCR 实验结果表明, 相比于空白组, 化合物 F3 可显著引起 *ALSI*、*ALS3*、

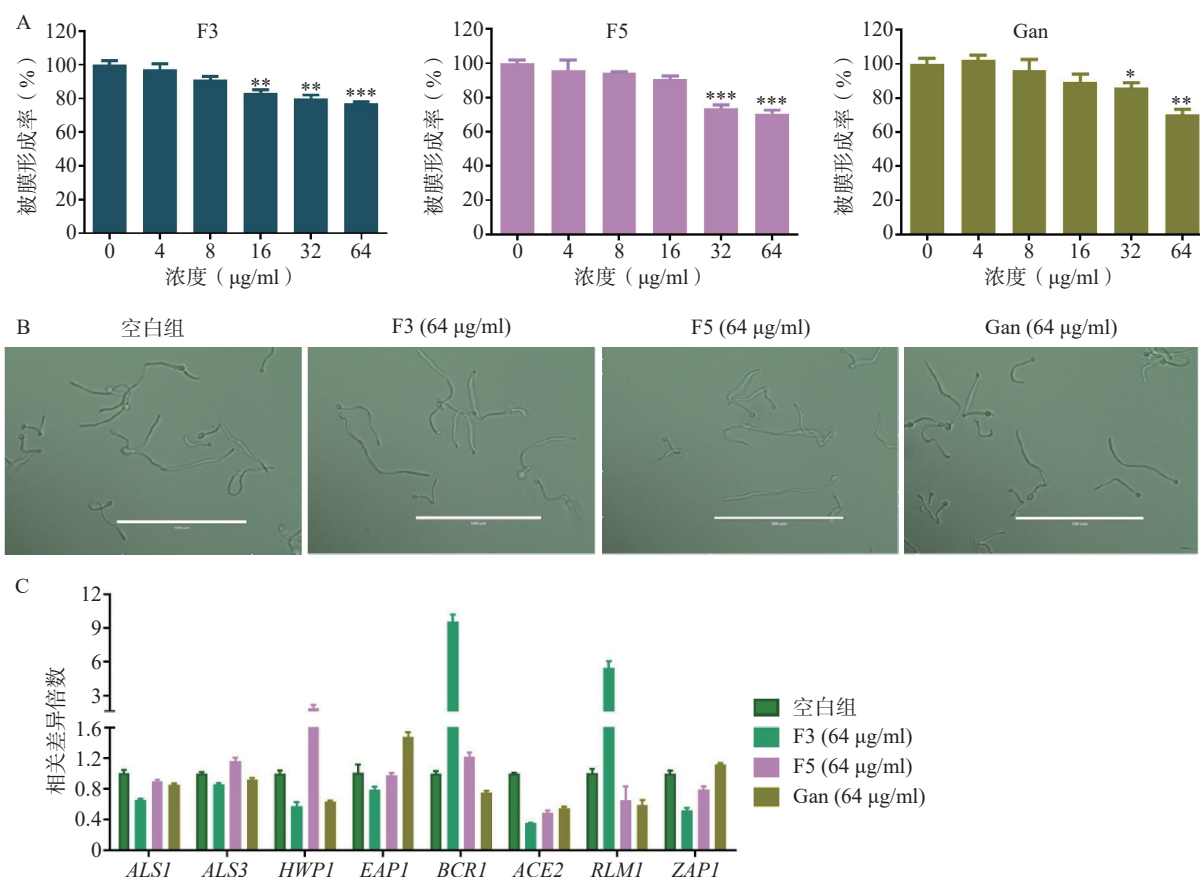


图6 化合物对真菌生物被膜和菌丝的抑制

A. 化合物作用下 *C. albicans* 0304103 的生物被膜形成率; B. 化合物作用下 *C. albicans* 0304103 菌丝的倒置显微镜图; C. 化合物作用下 *C. albicans* 0304103 生物被膜和菌丝形成相关基因的表达水平

HWPI、*ACE2*、*ZAP1* 下调和 *BCRI*、*RLMI* 上调, 化合物 F5 则显著引起 *ACE2*、*ZAP1* 下调和 *HWPI* 上调, 而先导化合物 Ganetespiib 可明显导致 *ALS1*、*ALS3*、*HWPI*、*BCRI*、*ACE2*、*RLMI* 下调和 *EAP1*、*ZAP1* 上调。

3.4.4 化合物 F3 和 F5 对 HEL 细胞周期的阻滞作用

由于化合物 F3 和 F5 对血液肿瘤细胞系 HEL 相比于 HL60 和 A549 细胞具有更强的抑制作用, 且血液肿瘤患者需使用抗真菌药物以预防 IFIs。因此, 以空白组作为对照, 通过流式细胞术对化合物 F3、F5 以及先导化合物 Ganetespiib 在多个浓度作用下 HEL 细胞的细胞周期分布进行了测定(图 7A)。结果表明: 化合物 F3、F5 以及 Ganetespiib 均能够剂量依赖地阻滞 HEL 的细胞周期于 G0/G1 期; 如化合物 F3、F5 以及 Ganetespiib 在接近 IC₅₀ 的 0.02 µmol/L 的浓度下, 处于 G0/G1 期的细胞占比分别为 45.7%、45.3% 和 39.4%, 与空白组的 44.0% 相当; 但在 0.06 µmol/L 浓度下, G0/G1 期的细胞占比分别明显地增加至 87.2%、77.6% 和 91.5%; 而在

0.18 µmol/L 浓度下, 化合物 F3 和 F5 组分别进一步上升至 91.7%、91.1%, Ganetespiib 组则略微下降至 89.8%(图 7B)。

4 讨论

通过对前期发现的具有良好协同抗耐药真菌活性的 Hsp90 抑制剂 Ganetespiib 进行结构改造, 成功设计合成了 19 个新型 Hsp90 抑制剂, 绝大部分化合物具有较强的 Hsp90α 抑制活性、良好的协同 FLC 抗耐药真菌活性及较优的抗肿瘤活性。其中, 目标化合物 F3 和 F5 具有优秀的协同 FLC 抗耐药真菌活性(FICI 均为 0.047)和抗肿瘤活性(IC₅₀ 分别为 0.025 ~ 0.15 µmol/L, 0.021 ~ 0.23 µmol/L)。机制研究表明, 优选化合物 F3 和 F5 能下调真菌耐药基因和外排泵基因表达水平, 抑制真菌生物被膜的形成; 且能阻滞血液肿瘤细胞的细胞周期处于 G0/G1 期。研究结果提示, 化合物 F3 和 F5 可以有效发挥协同 FLC 抗耐药真菌和抗肿瘤双重活性, 这为开发具有抗耐药真菌和抗肿瘤双重作用的新药提供了新的思路。

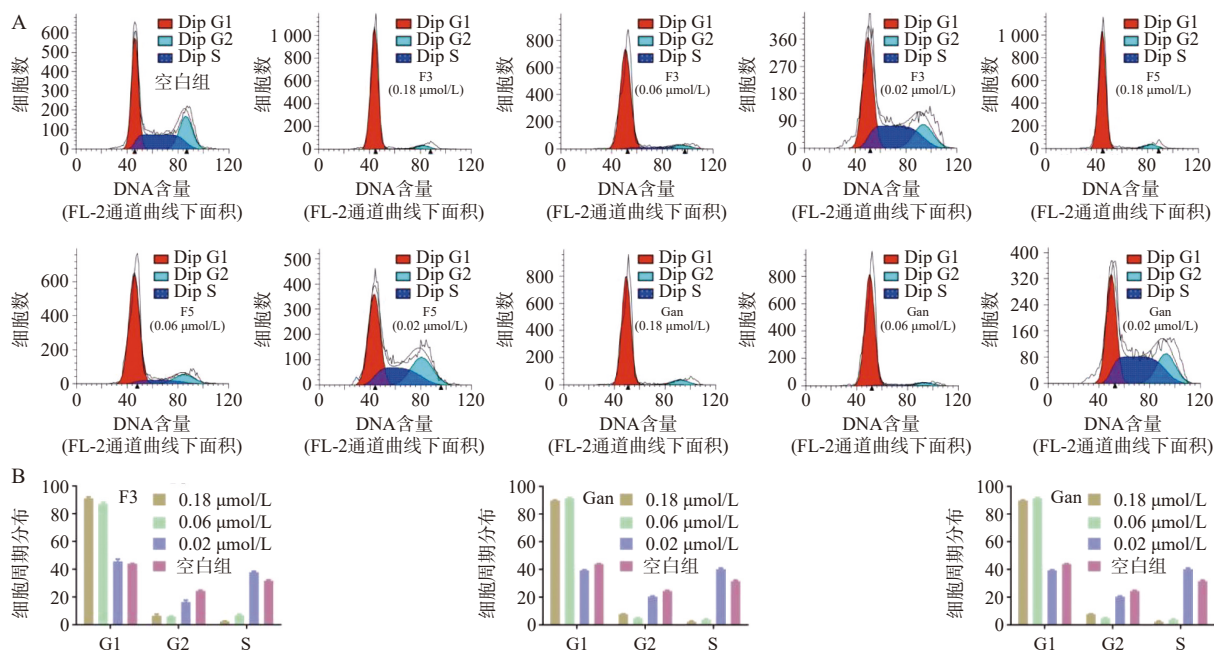


图7 化合物作用下对细胞周期的影响

A.化合物作用下 HEL 细胞周期流式图; B.化合物作用下 HEL 细胞周期分布图

【参考文献】

- [1] AHMADI N, AHMADI A, KHEIRALI E, et al. Systemic infection with *Candida albicans* in breast tumor bearing mice: Cytokines dysregulation and induction of regulatory T cells[J]. *J Mycol Med*, 2019, 29(1): 49-55.
- [2] LI J, BUCHNER J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery[J]. *Biomed J*, 2013, 36(3): 106-117.
- [3] LIN S F, LIN J D, HSUEH C, et al. Efficacy of an HSP90 inhibitor, ganetespib, in preclinical thyroid cancer models[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 41294-41304.
- [4] WANG M N, SHEN A J, ZHANG C, et al. Development of heat shock protein(Hsp90)inhibitors to combat resistance to tyrosine kinase inhibitors through Hsp90-kinase interactions[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(12): 5563-5586.
- [5] COWEN L E. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(4): 377-384.
- [6] TIWARI S, THAKUR R, SHANKAR J. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi[J]. *Biotechnol Res Int*, 2015, 2015: 132635.
- [7] LI L P, AN M M, SHEN H, et al. The non-Geldanamycin Hsp90 inhibitors enhanced the antifungal activity of fluconazole[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12): 2589-2602.
- [8] YUAN R, TU J, SHENG C Q, et al. Effects of Hsp90 inhibitor ganetespib on inhibition of azole-resistant *Candida albicans*[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 680382.
- [9] HE S, DONG G, WU S, et al. Small molecules simultaneously inhibiting p53-murine double minute 2(MDM2)interaction and histone deacetylases(HDACs): discovery of novel multitargeting antitumor agents[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(16): 7245-7260.
- [10] WHITESSELL L, ROBBINS N, HUANG D S, et al. Structural basis for species-selective targeting of Hsp90 in a pathogenic fungus[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 402.
- [11] ROUDBARMOHAMMADI S, ROUDBARY M, BAKHSHI B, et al. *ALS1* and *ALS3* gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis[J]. *Adv Biomed Res*, 2016, 5: 105.
- [12] NOBILE C J, NETT J E, ANDES D R, et al. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation[J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(10): 1604-1610.
- [13] LI F, SVAROVSKY M J, KARLSSON A J, et al. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(6): 931-939.
- [14] NOBILE C J, ANDES D R, NETT J E, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(7): e63.
- [15] KELLY M T, MACCALLUM D M, CLANCY S D, et al. The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence[J]. *Mol Microbiol*, 2004, 53(3): 969-983.
- [16] OLIVEIRA-PACHECO J, ALVES R, COSTA-BARBOSA A, et al. The role of *Candida albicans* transcription factor *RLM1* in response to carbon adaptation[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1127.
- [17] NOBILE C J, NETT J E, HERNDAY A D, et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1[J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(6): e1000133.
- [18] 郭东东, 岳慧珍, 魏羽佳, 黄广华. 白念珠菌生物被膜形成的遗传调控机制[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(9): 1567-1581.

[收稿日期] 2025-01-14 [修回日期] 2025-02-12

[本文编辑] 李睿旻