

2-氨基吩噁嗪-3-酮类化合物的合成 及其生物活性评价

李周华^{1#}, 杨雅聪^{1#}, 陈雪冬¹, 徐锡明^{1,2}, 王一帆³,
柳晓春¹, 唐宇^{1,2*}

(1. 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室, 医药学院, 山东 青岛 266003;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237;
3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 对 2-氨基吩噁嗪-3-酮类化合物进行合成及生物活性评价。方法 以苄基保护甲基香兰素为初始原料, 经过格氏反应、Oppenauer 氧化、氧化环合等反应, 7 步合成 8-苯甲酰基-2-氨基-6-羟基-吩噁嗪-3-酮, 并对其进行了抗菌、抗癌等活性的测试。结果 合成了天然产物 8-苯甲酰基-2-氨基-6-羟基-吩噁嗪-3-酮, 通过对其进行抗菌活性测试, 发现其对耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑制作用均优于环丙沙星, 最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.390、6.250 $\mu\text{mol/L}$ 。通过酶水平活性测试, 发现此天然产物对 TBK1 (TANK-binding kinase 1) 的抑制活性与阳性对照药氨来占诺相近。

关键词: 次级代谢产物; 抗菌活性; 耐药菌

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2021)06-030-07

Synthesis and evaluation of the bioactivity of 2-aminophenoxazine -3- ketones from *Halomonas*

LI Zhou-hua^{1#}, YANG Ya-cong^{1#}, CHEN Xue-dong¹, XU Xi-ming^{1,2}, WANG Yi-fan³,
LIU Xiao-chun¹, TANG Yu^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology Qingdao, 266237, China; 3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective To study the structure and biological activity of 2-amino-8-benzoyl-6-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one from *Halomonas*. **Methods** 2-amino-8-benzoyl-6-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one was synthesized from benzyl protective methyl vanillin in 7 steps by grigner reagent, Oppenauer oxidation and oxidation cyclization, and its antibacterial and anticancer activities were tested. **Results** The natural product 2-amino-8-benzoyl-6-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one was synthesized, and the bioactivity test showed that its inhibitory effect on MRCNS (0.390 $\mu\text{mol/L}$) and MRSA (6.250 $\mu\text{mol/L}$) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was superior to that of ciprofloxacin. After molecular docking and enzyme activity tests, the inhibition

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21772181); 国家自然科学基金-山东省联合基金项目 (U2006204) 资助

共同第一作者简介: 李周华 (1996-), 女, 硕士研究生; 杨雅聪 (1997-), 女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 唐宇, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物化学、天然产物全合成。E-mail: tangyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2021-01-20

of the natural product on TBK1 activity was similar to that of the positive control drug Aminoxanol.

Key words: secondary metabolite; antibacterial activity; drug-resistance bacteria

海洋占地球表面积 71%，资源丰富，海洋生态系统具有高压、高盐、缺氧、低光照等特性，致使海洋生物具有独特的多样性。海洋内微生物的初级或次级代谢产物具有独特的结构

以及高效的生物活性^[1-2]。目前国内外共有 49 种来自海洋的化合物被批准上市或进入临床研究^[3]，部分海洋药物及海洋天然产物的化学结构式见图 1。

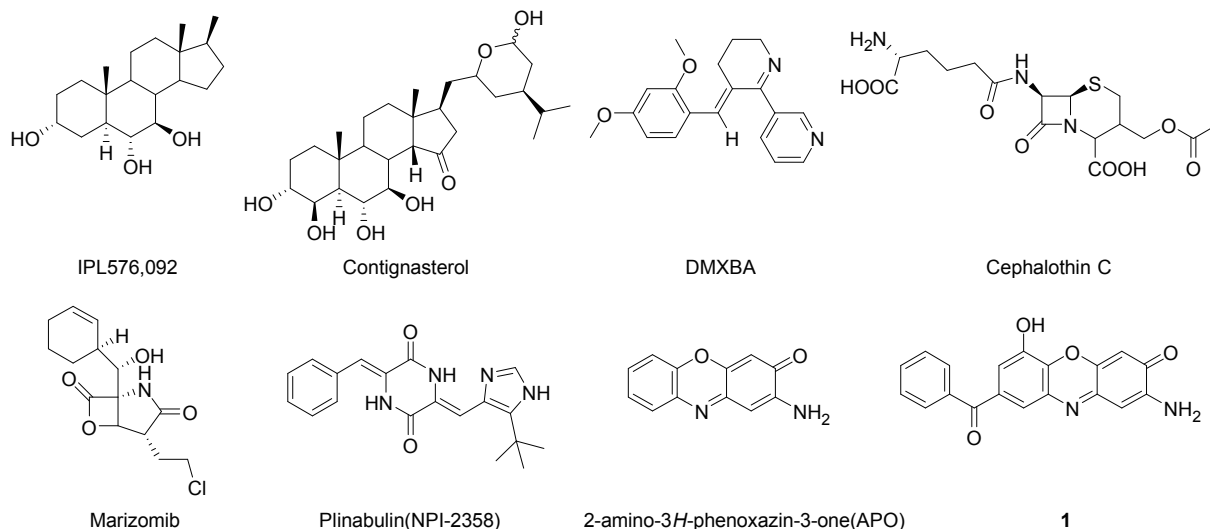


图 1 部分海洋药物及海洋天然产物的结构式

Fig.1 Chemical structures of some marine drugs and natural products from marine

2-氨基吩噁嗪-3-酮 (2-amino-3H-phenoxazin-3-one, APO) 是由链霉菌 (*Streptomyces*) 所产生的 1 种具有吩噁嗪结构的天然产物，又名寻霉素 A (Questiomycin A)^[4]，在海洋细菌或真菌中也曾提取到该类物质。寻霉素 A 对细菌^[5-6]、真菌、植物都具有多样的生物学作用，并对肿瘤细胞系展示出良好的抑制细胞增殖方面的活性^[7]。

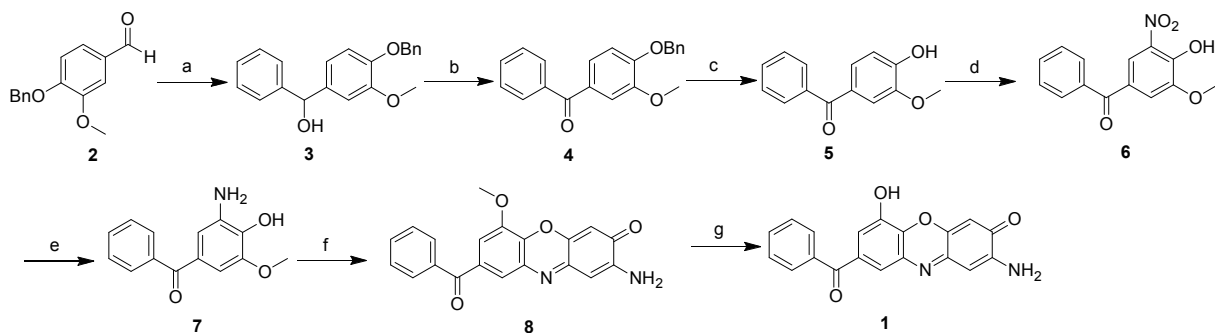
2005 年 Bitzer 等^[8]在源于海洋的盐单胞菌 GWS-BW-H8hM 培养基中添加邻氨基苯胺酸，相对于标准的培养条件，这种条件改变了盐单胞菌的次生代谢模式。从盐单胞菌红色的滤液中提取得到 APO 和新的天然产物 8-苯甲酰基-2-氨基-6-羟基-吩噁嗪-3-酮 (2-amino-8-benzoyl-6-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one, 化合物 1)，这 2 种化合物均具有抗菌、抗病毒和抗癌的活性。

然而通过海洋提取的天然产物面临着“药源”不足的问题^[3]，因此本课题组通过有机合成来实现此类天然产物的合成，一方面可以解决“药源”不足的问题，一方面还可以对其活性进行深层次探究。

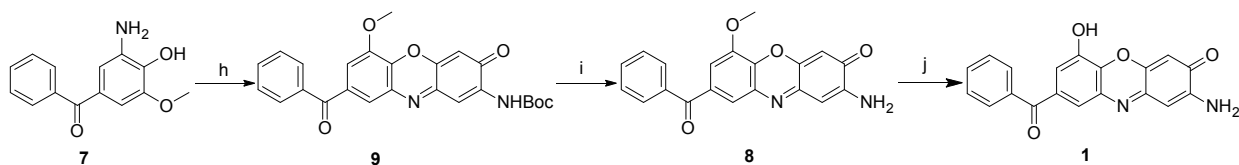
本课题组通过查阅相关合成文献，以苄基保护甲基香兰素为初始原料，经过格氏反应、Oppenauer 氧化^[9]、氧化环合^[10]等反应，共 7 步合成了 8-苯甲酰基-2-氨基-6-羟基-吩噁嗪-3-酮 (见方案 1)。本课题组对路线不断进行优化，降低了因化合物本身的性质导致的分离困难，快速高效地合成了天然产物 1，并对其进行相关的生物活性测试与评价。

1 结果与讨论

本课题组通过合成路线 1 (见方案 1 中第 1 条路线) 得到目标产物为天然产物 1 即 8-苯甲酰基-2-氨基-6-羟基-吩噁嗪-3-酮，但是由于氧化环合部分可同时生成天然产物 APO 和目标产物，二者溶解度均较差，导致二者不易分离，为解决目标产物的分离问题，对路线做了调整 (见方案 1 中第 2 条路线)。由于这种方法不产生天然产物 APO，且在中间体上引入叔丁氧羰基 (Boc 基团) 作为保护基，化合物的溶解度都有所改善，很大程度上改善了目标产物的分离难度。



a: Phenylmagnesium bromide, dry THF, N_2 , 0 °C to rt, 1.5 h; b: Anhydrous toluene, C_4H_9OK , 100 °C, 1 h, 86% after two steps;
c: $COOHNH_4$, Pd/C, CH_3OH , N_2 , reflux, 1 h, 89%; d: HNO_3 , CH_3COOH , 0 °C to rt, 0.5 h, 82%; e: $SnCl_2$, EA, reflux, 1 h, 90%;
f: $NaIO_3$, Acetone, H_2O , reflux, overnight, 39%; g: BBr_3 , DCM, N_2 , 0 °C to rt, 4 h, 80%.



h: $NaIO_3$, Acetone, H_2O , reflux, overnight, 32%; i: CF_3COOH , DCM, rt, overnight, 82%; j: BBr_3 , DCM, N_2 , 0 °C to rt, 4h, 80%.

方案 1 天然产物 1 的合成路线

Scheme 1 Synthesis routes of natural product 1

用化合物 1 对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 (Meticillin-resistant *Coagulase Negative Staphylococcus*, MRCNS)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、变形杆菌 (*Proteus species*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Meticil-

lin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、草分枝杆菌 (*Mycobacterium Phlei*) 9 种细菌进行抗菌活性评价, 以环丙沙星作为阳性对照药, 结果见表 1, 化合物 1 对草分枝杆菌有较好的抑制作用 ($6.250 \mu\text{mol/L}$)。化合物 1 展现出了抑制耐药菌的巨大潜力, 其对 MRCNS 的抑制作用最明显, 为 $0.390 \mu\text{mol/L}$, 对 MRSA 的抑制作用为 $6.250 \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 化合物 1 的抗菌活性测试 (MIC 值)

Table 1 The results of antibacterial test for compounds 1 (MIC)

菌株	MIC 值 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	化合物 1	环丙沙星
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	50.000	0.050
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	> 50.000	0.013
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	> 50.000	200.000
耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 MRCNS	0.390	12.500
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	50.000	25.000
变形杆菌 <i>Proteus species</i>	50.000	0.013
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	50.000	0.100
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA	6.250	12.500
草分枝杆菌 <i>Mycobacterium Phlei</i>	6.250	1.560

用化合物 1 与 A549 (腺癌人类肺泡基底上皮细胞)、VERO (非洲绿猴肾细胞)、HepG2 (肝癌组织)、Caco-2 (结肠腺癌细胞) 和 HEK-293 (人

胚胎肾细胞 293) 5 种细胞进行细胞毒活性测试, 与空白组进行对照, 结果见图 2, 在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 化合物 1 对 Caco-2 基本无细胞毒性, 对

VERO、HepG2 和 HEK-293 细胞毒性较弱, 对 A549 有较弱的细胞毒性。

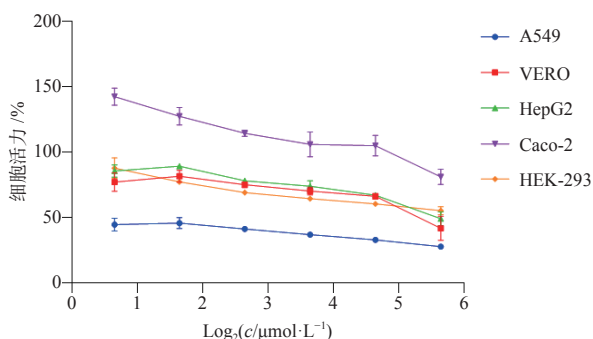


图2 化合物1的细胞毒性测试结果

Fig.2 The results of anticancer test for compound 1

使用 ledock-go 进行分子对接, 对接结果显示了6种不同的构象, 使用 PyMOL 软件将对接结果中出现的所有构象与处理过的 5W5V 进行逐一比较, 发现对接后的第二个构象和 TBK1 的结合与氨来占诺类似, 均是与 TBK1 激酶结构域的铰链区 Glu87 和 Cys89 结合 (见图3), 可竞争 ATP 腺嘌呤环产生的作用, 发挥类似于氨来占诺 (amlexanox) 的抗炎、抗病毒和抗癌作用^[11-12]。

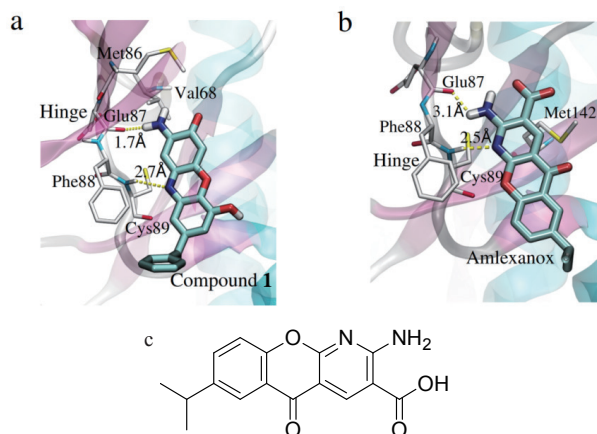


图3 化合物1(a)、氨来占诺(b)与TBK1的对接结果图及氨来占诺结构式(c)

Fig.3 The docking results of compound 1 (a), amlexanox (b) and TBK1, structure of amlexanox (c)

通过均相时间分辨荧光技术 (homogeneous time resolved fluorescence, HTRF) 实验检测氨来占诺和化合物1对TBK1活性的抑制作用, 根据酶标仪测试结果, 化合物1在150、200 μmol/L的情况下, 对于TBK1的抑制作用均明显优于氨来占诺 (见图4)。150 μmol/L时, 氨来占诺可抑制

20%的TBK1酶的活性, 而化合物1可抑制接近40%, 接近氨来占诺的2倍。200 μmol/L时, 氨来占诺仅能抑制约32%的酶活性, 低于化合物1(43%左右)。所以对于TBK1, 化合物1具有优于氨来占诺的抑制作用, 可作为TBK1抑制剂的潜在先导化合物。

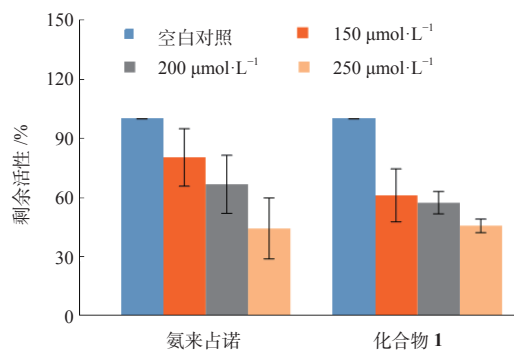


图4 氨来占诺和化合物1的酶活性测试

Fig.4 Enzyme activity test for amlexanox and compound 1

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

WRS-3型数字熔点仪 (上海申光仪器仪表有限公司); JEOL JNM-EPC 400、600 NMR核磁共振仪 (捷欧路科贸有限公司); HB10加热锅, C-MAG HS 7恒温磁力搅拌器 (德国IKA集团); 真空旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 手提式紫外分析仪 (骥辉分析仪器上海有限公司); KH3200B型超声清洗器 (昆山禾创仪器有限公司); SHB-III循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 高分辨质谱检测仪 (赛默飞世尔科技公司); 低温恒温搅拌反应浴 (XHDHJF-8002, 广州市予华仪器有限公司); 柱层析硅胶 (100~200目, 烟台新诺化工有限公司); MLS3750高压灭菌锅、MIR-253恒温培养箱、MCV-131BNF (T)超净工作台 (日本SANYO电器股份有限公司); 96孔紫外酶标板 [康宁 (上海) 管理有限公司]; 384孔板 (上海优宁维生物科技股份有限公司); 多功能酶标仪 (美谷分子仪器有限公司); Spark® 20M多模微孔酶标仪 (珀金埃尔默仪器有限公司)。

苯基溴化镁 (北京百灵威科技有限公司); 4-(苄氧基)-3-甲氧基苯甲醛、甲酸铵、邻氨基苯酚、2-(N-Boc-氨基)苯酚、氯化亚锡、碳酸氢钠 (上海毕得医药科技股份有限公司); 三溴化硼、钼碳、碘酸钠、环己酮、叔丁醇钠、冰醋酸、刃天

青(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);三氟乙酸(北京偶合科技有限公司);阳性药氨来占诺(批号P161-2004001,山东科源制药股份有限公司);环丙沙星(批号C-0388102,天津希恩思生化科技有限公司);HTRF KinEASE-STK S1 Kit(Cisbio Bioassays公司);细胞(中科院细胞库);DMSO(上海生工生物公司),四氢呋喃溶剂使用前作干燥处理,二氯甲烷使用前重蒸除水。

2.2 化合物的合成

2.2.1 4-苄氧基-3-甲氧基二苯酮(4)

在250 mL三颈瓶中,将化合物4-苄氧基-3-甲氧基苯甲醛(2, 10 g, 41.3 mmol)溶于100 mL无水四氢呋喃中,在氮气保护、冰浴条件下,向反应体系缓慢滴加苯基溴化镁(9.73 g, 53.66 mmol, 18 mL),冰浴下搅拌0.5 h后,转至室温搅拌约1 h,薄层色谱(Thin Layer chromatography, TLC)监测反应完全后,加入2 mol/L稀盐酸10 mL淬灭反应,乙酸乙酯(150 mL×3)进行萃取,饱和盐水(200 mL)洗涤,无水MgSO₄干燥,蒸干即得到白色固体化合物3,不需进一步纯化即可用于下一步。

将已制备的化合物3置于250 mL圆底烧瓶,用100 mL甲苯将其溶解后,加入叔丁醇钠(7.8 g, 81.15 mmol)及环己酮(7.96 g, 81.15 mmol),于100 °C条件下反应约1 h,待反应完全后,冷却至室温后加水淬灭,加入乙酸乙酯与水(200 mL×3)萃取,有机相加入无水MgSO₄干燥后,蒸干,粗产品经硅胶柱层析后即得白色产品4,两步总产率为86%。mp: 89~91 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.74~7.72 (m, 2H), 7.56~7.53 (m, 1H), 7.50 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.46~7.41 (dd, *J* = 14.3, 6.6 Hz, 4H), 7.37 (dd, *J* = 8.3, 6.8 Hz, 2H), 7.33~7.28 (m, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 3.93 (s, 3H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 195.70, 152.23, 149.56, 138.31, 136.39, 131.98, 130.52, 129.81, 128.79, 128.25, 128.21, 127.30, 125.42, 112.59, 111.93, 70.90, 56.21。HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₁₈O₃ [M+H]⁺ 319.133 4, found: 319.132 9。

2.2.2 4-羟基-3-甲氧基二苯酮(5)

称取化合物4(10 g, 31.41 mmol)与甲酸

铵(9.25 g, 146.68 mmol)溶解于150 mL甲醇中,加入钨碳(1.0 g, 96 mmol, 10%),于氮气气氛下反应3 h,反应完全后趁热抽滤钨碳,使用旋转蒸发器将溶剂蒸干,加入500 mL二氯甲烷,水洗3遍(100 mL×3),有机相经无水MgSO₄干燥,蒸干的粗品经硅胶柱层析(PE-EtOAc,体积比100:2)纯化后得到白色固体5,产率89%。mp:101~103 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 2H), 7.57~7.53 (m, 1H), 7.50 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.47~7.45 (m, 2H), 7.32 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 195.72, 150.24, 146.74, 138.37, 131.94, 129.95, 129.78, 128.26, 126.37, 113.61, 111.86, 56.23。HRMS (ESI) calcd for C₁₄H₁₂O₃ [M-H]⁻ 227.070 8, found: 227.071 4。

2.2.3 4-羟基-3-甲氧基-5-硝基二苯酮(6)

冰浴条件下,将化合物5(5 g, 21.90 mmol)溶解于20 mL冰醋酸中,缓慢滴加2.28 mL浓硝酸(3.19 g, 32.86 mmol, 68%)与3 mL冰醋酸混合液,后转至室温条件下反应0.5 h,反应完全后将反应液倒入冰水中,搅拌后出现黄色固体析出,静置10 min后过滤,清水洗涤滤饼,真空干燥得4.91 g黄色固体6,产率82%。产物无须纯化即可直接进行下一步反应。

2.2.4 3-氨基-4-羟基-5-甲氧基二苯酮(7)

于250 mL圆底烧瓶中分别加入化合物6(5.5 g, 20.13 mmol)和氯化亚锡(23 g, 121.30 mmol),溶解于100 mL乙酸乙酯中,反应加热回流1 h,反应完全冷却至室温后,将反应液倾入烧杯,加入饱和碳酸氢钠溶液(150 mL)和乙酸乙酯(150 mL),搅拌析出白色固体,经布氏漏斗抽滤除去滤饼,乙酸乙酯洗涤2遍(50 mL×2),滤液使用水洗3遍(50 mL×3),饱和食盐水洗涤1遍,有机相加无水MgSO₄干燥,抽滤并蒸干后得粗品,经硅胶柱层析纯化得淡黄色固体7,产率90%。mp:147~148 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.76~7.72 (m, 2H), 7.58~7.53 (m, 1H), 7.48~7.43 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 196.16, 146.42, 138.51, 137.19, 133.62, 131.85,

129.83, 129.35, 128.22, 113.05, 103.68, 56.36。HRMS (ESI) calcd for $C_{14}H_{13}NO_3$ [M-H]⁻ 242.081 7, found: 242.082 0。

2.2.5 8-苯甲酰基-2-氨基-6-甲氧基-吩噻嗪-3-酮 (8)

室温将化合物 7 (500 mg, 2.06 mmol) 溶解于 50 mL 丙酮中, 碘酸钠 (1.5 eq, 610.12 mg, 3.08 mmol) 溶解于 60 mL 水中后缓慢加入反应体系中, 缓慢滴加邻氨基苯酚 (1.3 eq, 291.59 mg, 2.67 mmol, 溶于 50 mL 丙酮中), 常温下反应 20 h, 反应完全后冷却至室温, 旋转蒸发除去多余的丙酮, 加入 300 mL 乙酸乙酯, 水洗 3 遍 (60 mL × 3), 饱和氯化钠水洗 1 遍, 有机相中加入无水 $MgSO_4$ 干燥, 蒸干后硅胶柱层析分离 (PE-EA, 体积比 3:1) 得化合物 8, 产率 39%。mp: 153~155 °C; ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅): δ 7.94~7.89 (m, 2H), 7.79 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.72 (s, 2H), 7.57 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 3.76 (s, 3H)。¹³C NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅): δ 194.77, 180.93, 149.87, 148.84, 148.63, 147.93, 137.94, 135.67, 134.31, 133.35, 132.60, 130.14, 128.66, 123.72, 110.93, 104.76, 99.30, 56.17。HRMS (ESI) calcd for $C_{20}H_{14}N_2O_4$ [M+H]⁺ 347.102 6, found: 347.103 2。

2.2.6 8-苯甲酰基-2-氨基-6-羟基-吩噻嗪-3-酮 (1)

将化合物 8 (300 mg, 0.672 mmol) 溶于 10 mL 无水二氯甲烷中, 于 0 °C 条件下缓慢滴加三溴化硼 (841.7 mg, 3.36 mmol), 滴毕后反应 0.5 h, 逐渐升至室温, 搅拌过夜, 反应完全后缓慢加入冰水淬灭反应, 蒸干后, 粗品经硅胶柱层析 (CH_2Cl_2 -MeOH, 体积比 10:1) 即得红褐色化合物 1, 产率 98%。mp: >340 °C; ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅): δ 8.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.43 (s, 1H)。¹³C NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅): δ 194.99, 180.95, 149.59, 149.44, 149.05, 148.38, 146.76, 138.09, 134.92, 133.84, 132.42, 130.07, 128.55, 121.87, 116.69, 104.36, 99.48。HRMS (ESI) calcd for

$C_{19}H_{12}N_2O_4$ [M+H]⁺ 333.087 0, found: 333.087 1。

2.2.7 8-苯甲酰基-2-(N-Boc-氨基)-6-甲氧基-吩噻嗪-3-酮 (9)

将化合物 7 (500 mg, 2.06 mmol) 与 2-(N-Boc-氨基)苯酚 (645.12 mg, 3.08 mmol) 溶解于 50 mL 丙酮中, 称取碘酸钠 (813.43 mg, 4.11 mg) 溶解于 60 mL 水中, 缓慢加入反应体系中, 转移完全后回流反应 8 h, 反应完全后冷却至室温, 旋转蒸发仪除去多余的丙酮, 加入 300 mL 乙酸乙酯, 水洗 3 遍 (60 mL × 3), 饱和氯化钠水洗 1 遍, 有机相中加入无水 $MgSO_4$ 干燥, 蒸干后, 经硅胶柱层析 (PE-EA, 体积比 3:1) 即得化合物 9, 产率为 32%。mp: 208~209 °C; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.00 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.84~7.82 (m, 2H), 7.80~7.79 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.65~7.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.54~7.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.57 (s, 1H), 4.08 (s, 3H), 1.52 (s, 9H)。¹³C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 194.91, 179.63, 151.74, 149.84, 148.48, 147.83, 138.62, 137.14, 136.02, 133.73, 133.63, 132.86, 130.05, 128.64, 124.93, 113.17, 111.02, 105.07, 82.14, 56.84, 28.23。HRMS (ESI) calcd for $C_{24}H_{20}N_2O_6$ [M+Na]⁺ 455.121 4, found: 455.141 9。

冰浴条件下, 化合物 9 (500 mg, 1.12 mmol) 溶解于 5 mL 二氯甲烷中, 缓慢滴加 2 mL 三氟乙酸, 后转至室温条件下反应 4 h, 使用旋转蒸发仪除去溶剂得褐色粗品, 经硅胶柱层析 (CH_2Cl_2 -MeOH, 体积比 40:1) 分离后即得纯品 8, 产率 82%。

2.3 最小抑菌浓度测定实验 (MIC)

本次实验中采用牛肉膏固体培养基、液体培养基。将致病菌 (详见表 1) 活化, 分离纯化菌落, 培养后稀释菌液。将菌液 (10^6 cfu/mL) 加入 96 孔板中, 加入不同浓度待测化合物 (50.000 μmol/L 到 0.390 μmol/L) 和阳性药 (环丙沙星)。28 °C 恒温培育箱孵育 24 h 后读取最终结果。药物最低浓度管无细菌生长者即为受试菌的 MIC。

2.4 细胞毒性测定实验

采用刃天青检测化合物 1 对 A549 (腺癌人类肺泡基底上皮细胞)、VERO (非洲绿猴肾细胞)、HepG2 (肝癌组织)、Caco-2 (结肠腺癌细胞) 和 HEK-293 (人胚胎肾细胞 293) 5 种细胞的生长抑

制作用。细胞按每孔 3 000 个铺于 96 孔板, 每孔 100 μL , 12 h 以后按照 50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度加药, 72 h 后每孔加 10 μL 刃天青, 4 h 后在 544 nm 激发, 595 nm 吸收波长处读取荧光。

2.5 分子对接

对化合物 **1** 进行 Morgan 指纹和药效团分析, 发现其与 TBK1 激酶的抑制剂氨来占诺结构相似性达 76%。本研究采用 ledock-go 软件进行分子对接, 分别对蛋白质、配体进行结构处理或者优化, 并对配体和蛋白进行对接和结果分析^[13]。从 RCSB PDB 蛋白质数据库下载 TBK1 与氨来占诺结合的蛋白质晶体结构 (PDB ID : 5W5V)^[14], 通过 Schrodinger 软件^[15] 中的 Protein Preparation Wizard 模块对下载的蛋白质文件 5W5V 进行处理, 去除 3Å 以外的水分子、氨基酸和小分子的 pka 分别采用 Propka 和 Epik 进行预测, 并在 pH=7 下加氢。在 OPLS3e 力场下, 对蛋白结构及配体进行能量优化; 采用 lepro 将受体转换为 CHARMM 力场的原子类型并确定对接参数。使用 ledock-go 对已处理的蛋白质文件和配体文件进行分子对接, 使用 vmd 来分析和可视化分子对接构象^[16]。

2.6 酶活性测试实验

采用 HTRF 方法检测化合物 **1** 及氨来占诺对 TBK1 激酶活性的抑制作用。在 384 孔板中加入 4 μL 物质的量浓度为 250、200、150 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **1** 或氨来占诺、2 μL STK-Substrate- biotin、2 μL kinase、2 μL ATP, 常温下反应 1 h; 分别加入 5 μL Sa-XL665、STK-antibody-Eu3⁺, 反应 1 h 后用酶标仪检测结果。

3 结论

本课题组合成了海洋来源的 2-氨基吩噻嗪-3-酮类化合物 **1**, 并对其进行活性测试, 结果显示化合物 **1** 对耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和草分枝杆菌均有不错的效果; 化合物 **1** 对腺癌人类肺泡基底上皮细胞有较强的细胞毒性; 化合物 **1** 对 TBK1 的活性抑制与氨来占诺相似。化合物 **1** 展现出了多样的药物活性, 可作为进一步药物开发的模板骨架。

参考文献

- [1] 王长云, 邵长伦. 海洋药理学 [M]. 北京: 中国科学出版社, 2011.
- [2] 于广利, 谭仁祥. 海洋天然产物与药物开发 [M]. 北京: 中国科学出版社, 2016.
- [3] 王成, 张国建, 刘文典, 等. 海洋药物研究开发进展 [J]. 中国海洋药物, 2019, 38(6): 35-69.
- [4] ANZAI K, ISONO K, OKUMA K, et al. The new antibiotics, questiomycins A and B[J]. J Antibiot, 1960, 13: 125-132.
- [5] UMETSU, KANDA, IMAI I, et al. Questiomycins, algicidal compounds produced by the marine bacterium *alteromonas* sp. D and their production cue[J]. Molecules, 2019, 24(24): 4522.
- [6] SHIGETAKA S, MAMORU S, AKIO T, et al. Phenoxazine compounds produced by the reactions with bovine hemoglobin show antimicrobial activity against non-tuberculosis mycobacteria[J]. Tohoku J Exp Med, 2004, 203(1): 47-52.
- [7] KAYO M, HIDENORI T, YOSHIHIRO H, et al. Questiomycin A stimulates sorafenib-induced cell death via suppression of glucose-regulated protein 78[J]. Arch Biochem Biophys, 2017, 492(1): 33-40.
- [8] BITZER J, GROBE T, WANG L, et al. New aminophenoxazinones from a marine *halomonas* sp.: Fermentation, structure elucidation, and biological activity[J]. J Antibiot, 2006, 59(2): 86-92.
- [9] LEARMONTH D A, VIEIRA-COELHO M A, BENES J, et al. Synthesis of 1-(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)-2-phenyl-ethanone and derivatives as potent and long-acting peripheral inhibitors of catechol-O-methyltransferase[J]. J Med Chem, 2002, 45(3): 685-695.
- [10] PASCERI R, SIEGEL D, ROSS D, et al. Aminophenoxazinones as inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Synthesis of exfoliazone and chandrananimycin A[J]. J Med Chem, 2013, 56(8): 3310-3317.
- [11] MORITZ M ÖL, JULIA W L, JULIA S, et al. The specific IKK ϵ /TBK1 inhibitor amlexanox suppresses human melanoma by the inhibition of autophagy, NF- κ B and MAP kinase pathways[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4721.
- [12] WANG N, LI Y H, WANG X F, et al. Inhibition of TBK1 by amlexanox attenuates paraquat-induced acute lung injury[J]. Toxicology, 2020, 443(2020): 152555.
- [13] LIU N, XU Z B. Using LeDock as a docking tool for computational drug design[J]. Earth Env Sci, 2019, 218(1): 21-43.
- [14] BEYETT T S, GAN X M, REILLY S M, et al. Carboxylic acid derivatives of amlexanox display enhanced potency toward TBK1 and IKK ϵ and reveal mechanisms for selective inhibition[J]. Mol Phar, 2018, 94(4): 1210-1219.
- [15] HEGE B, ANURADHA C, DAVID P, et al. Applying physics-based scoring to calculate free energies of binding for single amino acid mutations in protein-protein complexes[J]. PLoS One, 2017, 8(12): e2849.
- [16] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: Visual molecular dynamics[J]. J Mol Graph, 1996, 14(1): 33-38.