新型 N-3 位酰胺连噻唑烷-4-酮二芳基衍生物的设计合成及 HIV 逆转酶抑制活性

陈 华* 邵 洁 朱 墨 李小六*

(河北大学化学与环境科学学院 河北省化学生物学重点实验室 保定 071002)

摘要 以氨基酸酯为原料,在微波辐射条件下合成了系列 N-3 位含酯基的噻唑烷-4-酮衍生物,经水解并酰胺缩合制备了 N-3 位酰胺键连接噻唑烷的二芳基噻唑烷-4-酮衍生物.化合物通过人类免疫缺陷病毒(HIV)逆转酶(RT)试剂盒(比色法)评价了其酶抑制活性.活性结果表明,部分化合物如 **5bb**, **5bc**, **5cb** 和 **5cc** 能有效地抑制 HIV 逆转酶的活性,IC₅₀ 值分别为 4.15, 3.53, 4.61 和 4.06 $\mu\text{mol/L}$. 构效关系表明 N-3 位 2 个碳的柔性侧链以及亲脂基如甲基的引入将有利于化合物的抗 HIV 逆转录酶活性.

关键词 噻唑烷-4-酮; 抗 HIV 逆转酶活性; 亲脂基团; 柔性侧链; 酰胺键

Design, Synthesis and Anti-HIV-Reverse Transcriptase Activity of Novel Diaryl Thiazolidin-4-one Derivatives Possessing Amide Linkage on N-3 Position

Chen, Hua* Shao, Jie Zhu, Mo Li, Xiaoliu*

(Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002)

Abstract A series of thiazolidin-4-one derivatives possessing ester were synthesized under microwave irradiation using amino acid ester as starting material. After ester hydrolysis reaction and amide condensation reaction, the aimed diaryl thiazolidin-4-one derivatives possessing amide linkage on N-3 position were obtained. The compounds were evaluated for their human immunodeficiency virus (HIV-1) reverse transcriptase (RT) inhibitory activities *in vitro* HIV-1 RT kit assay (colorimetric method). The results showed that some of the compounds, such as **5bb**, **5bc**, **5cb**, and **5cc** could effectively inhibit RT activity with the IC₅₀ values of 4.15, 3.53, 4.61 and 4.06 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Structure activity relationship analysis of these analogues suggested that the introduction of two carbons side chain on N-3 position and lipophilic group like methyl group should be favorable to their anti-HIV-RT activities.

Keywords thiazolidin-4-one; anti-HIV-RT activity; lipophilic group; flexible side chain; amide bond

噻唑烷酮是一类广谱的药效基团,其衍生物多具有抗菌、抗病毒、抗炎和抗癌等生物活性^[1,2].其中,2,3-二芳基-1,3-噻唑烷-4-酮作为非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)^[3],因具有高的抗艾滋病病毒(HIV)活性和选择性引起了广泛关注^[4].这类化合物以 HIV 逆转录酶(RT,病毒基因复制中的关键酶^[5])为靶点,呈类蝴蝶状(butterfly-like conformation)构象结合在距酶活性中心 10 Å 的变构位点(allosteric binding site)^[6],从而有效抑制

酶活.经系统的结构优化,2-(2,6-二氯苯基)-3-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)噻唑烷-4-酮 **1~4** 较其它芳基取代具有更高的抗 HIV 活性(图 1)^[7~11].因此,为了增加此类分子的柔性以提高化合物与 HIV 逆转录酶变构结合位点的构象适配性,进一步发现抗 HIV 病毒药物的及构效关系分析(SAR),本文设计、合成了一系列在噻唑烷-4-酮 N-3 位上通过柔性侧链连接噻唑烷的衍生物 **5aa~5dc**(图 2),并对其 HIV 逆转录酶的抑制活性进行了评价.

* E-mail: lixl@hbu.cn; hua-todd@163.com

Received September 30, 2015; revised December 2, 2015; published online December 7, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21372060), the Hebei Province Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars (Incubation) (No. B2015201005).

国家自然科学基金(No. 21372060)、河北省自然科学基金杰出青年基金(培育)(No. B2015201005).

- 1 $X^1 = X^2 = F$ a: $R = H$; b: $R = CH_3$
 2 $X^1 = X^2 = Br$ a: $R = H$; b: $R = CH_3$
 3 $X^1 = X^2 = Cl$ a: $R = H$; b: $R = CH_3$; c: $R = CH_2CH_3$
 4 $X^1 = Cl, X^2 = F$ a: $R = H$; b: $R = CH_3$; c: $R = CH_2CH_3$

图1 2-(2,6-二氯苯基)-3-(嘧啶-2-基)噻唑烷-4-酮 1~4 的结构
 Figure 1 Structures of 2-(2,6-dihaloaryl)-3-(pyrimidin-2-yl)thiazolidin-4-ones 1~4

图2 设计合成的 *N*-3 酰胺键连接的新型二芳基噻唑烷-4-酮 5aa~5dc 的结构

Figure 2 Structures of the novel designed and synthesized di-aryl thiazolidin-4-one derivatives 5aa~5dc bearing amide bond linkage.

1 结果与讨论

1.1 新型二芳基噻唑烷-4-酮衍生物的合成

考虑到酰胺键的引入将有利于改善分子的溶解性并增加化合物与酶蛋白氨基酸残基的氢键结合^[12,13], 因此, 我们尝试在噻唑烷-4-酮 *N*-3 位上通过酰胺键连接嘧啶胺, 以获得分子更加柔性的图1所示化合物3的结构类似物。首先, 参考文献报道的合成方法^[14,15], 以 2,6-二氯苯甲醛(6)、氨基丙酸甲酯盐酸盐(7a)[或 *L*-丙氨酸甲酯盐酸盐(7b)]和巯基乙酸(8)为原料, 无水乙醇为溶剂,

微波辐射条件下一锅法反应 30 min 得到化合物 9a 和 9b, 继而将化合物 9a(或 9b)碱性条件下水解得到了利于酰胺缩合反应的羧酸类化合物 10a (10b) (Scheme 1)。在化合物 9b 的制备中, 三组分一锅法反应得到一对非对映异构体(薄层色谱显示比例约为 1:1), 结果与文献报道相似^[16,17]。异构体未经分离直接进行水解, 得到其中一个纯净产物 10b。

图式1 化合物 10a 和 10b 的合成

Scheme 1 Synthesis of compounds 10a and 10b

进一步, 分别以合成的 10a 和 10b, 以及之前合成的羧酸类噻唑烷-4-酮 10c 和 10d^[18]为原料, 在缩合剂 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU)和 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)的作用下, 与 4,6-二甲基嘧啶胺(11)缩合反应制备了目标化合物 5aa~5db (Scheme 2)。新合成的化合物 10a, 10b 和 5aa~5dc 通过核磁和元素分析确认。

1.2 化合物 HIV-RT 抑制活性评价

化合物 5aa~5dc 通过 HIV-RT 试剂盒(HIV-RT kit)^[19]评价了其酶抑制活性, 化合物 3b^[10]为阳性对照, 结果见表1。活性测试表明化合物 5bb, 5bc, 5cb 和 5cc

图式 2 化合物 5 的合成
Scheme 2 Synthesis of compounds 5

具有较好的 HIV-RT 抑制活性, 它们的 IC_{50} 值均低于 $10 \mu\text{mol/L}$, 其中化合物 **5bc** 和 **5cc** 的抑制活性最好, IC_{50} 值分别为 3.53 和 $4.06 \mu\text{mol/L}$. 其它化合物显示了中等偏弱的 HIV-RT 抑制活性. 虽然以上化合物的活性均低于阳性对照 **3b**, 但是较高的酶抑制活性(**5bb**, **5bc**, **5cb** 和 **5cc**), 提示 N-3 位引入酰胺键, 适当提高分子的柔性, 对化合物的 HIV 逆转录酶抑制活性影响不大. 进一步构效关系分析(SAR), 化合物 **5aa**~**5ac** 具有较弱的活性, 表明 N-3 位 3 个碳及以上的柔性链不利于分子的酶抑制活性, 2 个碳的侧链可能更适于分子与酶的结合, 如化合物 **5bb**, **5bc**, **5cb** 和 **5cc**. 相对而言, 化合物 **5bb** 和 **5bc** 的活性分别略高于 **5cb** 和 **5cc**, 提示在酰胺键(丙氨酸)的邻位引入甲基, 增加分子的亲脂性, 将有利于提高分子的酶抑制活性. 此外, 化合物 **5da**~**5dc** 中 C-2 位卤原子单取代的苯环也将导致酶抑制活性的下降. 以上构效关系分析将有助于指导噻唑烷-4-酮类抗 HIV 化合物的

表 1 化合物 **5aa~5dc** 的 HIV-RT 抑制活性
Table 1 HIV-RT kit assay for compounds **5aa~5dc**

化合物	IC ₅₀ /(μmo•L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ /(μmo•L ⁻¹)
5aa	62.81±4.39	5bb	4.15±0.82
5ab	42.66±3.26	5bc	3.53±0.71
5ac	53.70±4.08	5da	43.40±3.52
5ca	16.34±2.13	5db	33.27±3.26
5cb	4.61±0.60	5dc	26.02±3.04
5cc	4.06±0.58	3b	0.98±0.85

进一步结构修饰.

2 结论

本文设计合成了系列在 N-3 位上通过柔性酰胺键连接嘧啶胺的二芳基噻唑烷-4-酮衍生物, 并评价了化合物的 HIV 逆转酶抑制活性. 化合物 **5bb**, **5bc**, **5cb** 和 **5cc** 具有良好的 HIV 逆转酶的抑制活性. 构效关系分析表明, N-3 位 2 个碳的柔性侧链以及亲脂基如甲基的引入将有利于化合物的抗 HIV 逆转录酶活性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

微波合成仪为美国 CEM 公司的 DISCOVER S-Class; 熔点由 SGW[®] X-4 显微熔点仪(温度计未校正)测定; 核磁共振谱用 BRUKER AC-P600 (600 MHz)型核磁共振仪测定, TMS 为内标; 质谱(ESI)用 Agilent G6300 离子阱液相质谱联用仪; 元素分析用 HERAEUS (CHNO, rapid)型元素分析仪; 光密度用 BioRad 3550 型酶标仪测定; 层析用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂产品。本文所用其他试剂均为分析纯, 无水试剂均按常规方法处理。水为二次蒸馏水。

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 10 的合成

以化合物 **10a** 的合成为例: 向 10 mL 微波反应管中分别加入 2,6-二氯苯甲醛(**6**) (1.0 mmol)、3-氨基丙酸甲酯盐酸盐(**7a**) (1.0 mmol)和巯基乙酸(**8**) (1.0 mmol), 溶于 1 mL 无水乙醇中, 在 120 °C 封管微波辐射条件下, 搅拌反应 30 min. 反应结束后, 冷至室温, 加入固体 K_2CO_3 中和溶液至中性. 加入 5 mL 乙酸乙酯萃取, 有机相依次用饱和 NaHCO_3 水溶液、水及饱和食盐水洗, 无水 MgSO_4 干燥. 抽滤, 减压蒸除溶剂, 剩余固体以硅胶柱色谱 [V (石油醚): V (乙酸乙酯)=3:1] 分离得化合物 **9a**, 收率 55.5%. 将化合物 **9a** (1.0 mmol) 用 10 mL CH_3OH 溶解, 然后加入 NaOH (2.5 mmol), 室温下搅拌反应. 用薄层色谱(TLC)监测反应结束后, 用阳离子树脂中和至 $\text{pH} \approx 5$ 左右, 抽滤, 减压蒸除溶剂, 剩余固体以二氯甲烷和环己烷重结晶得目标化合物 3-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]丙酸(**10a**), 白色固体, 产率 55.5%. m.p. 37~39 °C; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 2.41~2.46 (m, 1H, CH_2), 2.64~2.69 (m, 1H, CH_2), 2.87~2.92 (m, 1H, CH_2), 3.74~3.79 (m, 1H, CH_2), 6.87 (s, 1H, H-2), 7.36 (t, $J=15.0$ Hz, 1H, Ar-H) 7.47 (t, $J=15.0$ Hz, 2H, Ar-H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 30.8, 33.4, 39.1, 59.0, 128.9, 130.9, 133.4, 135.4, 172.8, 173.1; MS (ESI) m/z : 319.2 $[\text{M}-\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}$

Cl₂NO₃S: C 45.01, H 3.46, N 4.37; found C 45.14, H 3.52, N 4.26.

按相同的方法, 以 *L*-丙氨酸甲酯盐酸盐 **7b** 为原料, 得到化合物 **10b**.

(2*R*)-2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]丙酸(**10b**): 白色固体, 产率 52.0%. m.p. 181~182 °C, ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 3.29 (d, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.80 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 3.98 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 4.82 (q, *J*=7.2 Hz, 1H, CH), 6.93 (s, 1H, H-2), 7.35 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.46 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 13.2, 33.6, 52.6, 57.2, 128.8, 130.6, 134.5, 135.2, 172.2, 173.9, MS (ESI) *m/z*: 319.4 ([M-H]⁺). Anal. calcd for C₁₂H₁₁Cl₂NO₃S: C 45.01, H 3.46, N 4.37; found C 45.12, H 3.55, N 4.29.

3.2.2 化合物 **5** 的合成

以化合物 **5aa** 的合成例: 将酸 **10a** (1.0 mmol) 溶解在 5 mL 二氯甲烷中, 再向溶液中加入 HATU (1.0 mmol)、DIPEA (2.0 mmol), 氮气保护, 室温条件下搅拌反应 15 min, 再往混合溶液中加入嘧啶胺 **11a** (2.0 mmol), 加热至回流. 用 TLC 监测反应结束后, 蒸干溶剂, 剩余固体以硅胶柱色谱 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=1:1] 分离得到目标化合物. 3-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)丙酰胺(**5aa**), 白色固体, 产率 65.5%. m.p. 201~203 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 2.34 (s, 6H, 2CH₃), 2.60~2.65 (m, 1H, H-5), 2.82~2.93 (m, 2H, CH₂), 3.69~3.73 (m, 1H, H-5), 3.78 (s, 2H, CH₂), 6.71 (s, 1H, H-2), 6.92 (s, 1H, Ar-H), 7.43 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.54 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 10.45 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 23.8, 33.8, 34.2, 39.3, 58.6, 115.6, 129.7, 131.7, 132.7, 134.5, 135.2, 157.5, 168.0, 172.3; MS (ESI) *m/z*: 448.4 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₁₈H₁₈Cl₂N₄O₂S: C 50.83, H 4.27, N 13.17; found C 50.81, H 4.26, N 13.19.

按相同的方法, 以不同的噻唑烷-4-酮酸 **10** 和嘧啶胺 **11** 为原料, 得到化合物 **5**. 所有化合物脂溶性较好, 水溶性差. 但与化合物 **3b** 相比, 化合物 **5cb** 在 *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=1:1 体系中, *R*_f 值为 0.25 (**3b** 为 0.52), 极性有所增大.

3-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(4,5,6-三甲基嘧啶-2-基)丙酰胺(**5ab**): 白色固体, 产率 60.0%. m.p. >250 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 6H, 2CH₃), 3.08~3.13 (m, 2H, CH₂), 6.84 (s, 1H, H-2), 7.37~7.39 (m, 3H, Ar-H), 10.48 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 17.3, 26.1, 38.0, 38.1, 43.3, 63.2, 133.0, 134.4, 134.9, 136.1,

138.9, 139.7, 169.3, 170.0, 176.4; MS (ESI) *m/z*: 462.3 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₂S: C 51.94, H 4.59, N 12.75; found C 52.15, H 4.61, N 12.69.

3-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(5-乙基-4,6-二甲基嘧啶-2-基)丙酰胺(**5ac**): 白色固体, 产率 65.1%. m.p. 105~107 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 1.05 (t, *J*=7.8 Hz, 3H, CH₃), 2.38 (s, 6H, 2CH₃), 2.58 (q, *J*=7.8 Hz, 2H, CH₂), 2.60 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, CH₂), 2.83~2.85 (m, 1H, H-5), 2.87 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, CH₂), 3.70~3.72 (m, 1H, H-5), 3.76 (s, 2H, CH₂), 6.70 (s, 1H, H-2), 7.42 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H), 10.32 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 13.4, 20.8, 21.7, 33.8, 34.1, 39.4, 58.6, 128.1, 129.7, 131.7, 132.7, 134.7, 135.2, 154.9, 165.6, 171.3; MS (ESI) *m/z*: 476.4 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₂₀H₂₂Cl₂N₄O₂S: C 52.98, H 4.89, N 12.36; found C 53.12, H 4.97, N 12.39.

(2*R*)-2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(5-乙基-4,5,6-二甲基嘧啶-2-基)丙酰胺(**5bb**): 白色固体, 产率 41.0%. m.p. 172~174 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 0.96 (d, *J*=7.8 Hz, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 6H, 2CH₃), 3.72 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 3.92 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 5.01 (s, 1H, CH), 6.99 (s, 1H, H-2), 7.39 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, Ar-H), 10.58 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 13.6, 15.4, 22.4, 34.1, 54.1, 57.6, 123.0, 129.7, 131.4, 133.8, 136.4, 154.6, 165.7, 173.1; MS (ESI) *m/z*: 462.5 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₂S: C 51.94, H 4.59, N 12.75; found C 52.08, H 4.67, N 12.81.

(2*R*)-2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(5-乙基-4,6-二甲基嘧啶-2-基)丙酰胺(**5bc**): 白色固体, 产率 45.5%. m.p. 205~207 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 0.96 (d, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.06 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.39 (s, 6H, 2CH₃), 2.58 (q, *J*=7.8 Hz, 2H, CH₂), 3.71 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 3.92 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 5.01 (s, 1H, CH), 6.98 (s, 1H, H-2), 7.39 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, Ar-H), 10.58 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 13.4, 15.4, 20.8, 21.7, 34.1, 54.2, 57.6, 128.5, 129.7, 131.4, 133.8, 136.4, 154.6, 165.7, 173.1; MS (ESI) *m/z*: 476.2 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₂₀H₂₂Cl₂N₄O₂S: C 52.98, H 4.89, N 12.36; found C 53.05, H 4.91, N 12.44.

2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)乙酰胺(**5ca**): 白色固体, 产率 71.3%.

m.p. 123~125 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 2.34 (s, 6H, 2CH₃), 3.83 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, H-5), 3.87 (s, 2H, CH₂), 5.14 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, H-5), 6.68 (s, 1H, H-2), 6.95 (s, 1H, Ar-H), 7.21 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 8.14 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 23.7, 33.4, 46.1, 58.3, 115.8, 129.7, 131.7, 131.8, 134.7, 135.5, 157.2, 165.7, 168.1, 171.5; MS (ESI) m/z : 434.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal. calcd for C₁₇H₁₆Cl₂N₄O₂S: C 49.64, H 3.92, N 13.62; found C 49.80, H 4.01, N 13.57.

2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(4,5,6-三甲基嘧啶-2-基)乙酰胺(**5cb**): 白色固体, 产率 72.0%. m.p. 153~155 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 6H, 2CH₃), 3.52 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 3.87 (s, 2H, CH₂), 4.64 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 6.96 (s, 1H, H-2), 7.44 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.52~7.57 (m, 2H, Ar-H), 10.48 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 13.5, 22.5, 33.4, 46.0, 58.4, 122.6, 129.7, 131.7, 131.9, 134.8, 135.5, 154.5, 165.8, 171.5; MS (ESI) m/z : 448.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal. calcd for C₁₈H₁₈Cl₂N₄O₂S: C 50.83, H 4.27, N 13.17; found C 50.62, H 4.32, N 13.09.

2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(5-乙基-4,6-二甲基嘧啶-2-基)乙酰胺(**5cc**): 白色固体, 产率 54.7%. m.p. 137~140 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 1.09 (t, $J=7.8$ Hz, 3H, CH₃), 2.37 (s, 6H, 2CH₃), 2.57 (q, $J=7.8$ Hz, 2H, CH₂), 3.82 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 3.87 (s, 2H, CH₂), 5.13 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 6.96 (s, 1H, H-2), 7.20 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 8.02 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 13.3, 20.8, 21.7, 33.4, 46.0, 58.4, 128.3, 129.7, 131.8, 134.7, 135.6, 154.6, 165.7, 166.6, 171.5; MS (ESI) m/z : 462.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal. calcd for C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₂S: C 51.94, H 4.59, N 12.75; found C 51.96, H 5.02, N 12.67.

2-[2-(2-氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)乙酰胺(**5da**): 白色固体, 产率 66.5%. m.p. 150~152 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 2.31 (s, 6H, 2CH₃), 3.73 (d, $J=15.6$ Hz, 2H, CH₂), 3.83 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 4.68 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 6.13 (s, 1H, H-2), 6.92 (s, 1H, Ar-H), 7.38~7.43 (m, 3H, Ar-H), 7.51 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 10.61 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 23.7, 31.63, 47.0, 60.0, 115.8, 128.5, 130.5, 130.7, 132.5, 137.2, 157.3, 166.8, 168.1, 172.3; MS (ESI) m/z : 399.3($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal.

calcd for C₁₇H₁₇ClN₄O₂S: C 54.18, H 4.55, N 14.87; found C 54.05, H 4.57, N 14.92.

2-[2-(2-氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(4,5,6-三甲基嘧啶-2-基)乙酰胺(**5db**): 白色固体, 产率 52.0%. m.p. 122~124 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 6H, 2CH₃), 3.71 (d, $J=15.6$ Hz, 2H, CH₂), 3.84 (d, $J=16.8$ Hz, 1H, H-5), 4.68 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 6.14 (s, 1H, H-2), 7.38~7.44 (m, 3H, Ar-H), 7.51 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, Ar-H), 10.45 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 13.5, 22.5, 31.6, 40.5, 46.9, 60.0, 122.5, 122.9, 128.5, 130.6, 132.4, 154.6, 161.8, 165.8, 172.3; MS (ESI) m/z : 413.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal. calcd for C₁₈H₁₉ClN₄O₂S: C 55.31, H 4.90, N 14.33; found C 55.29, H 5.03, N 14.46.

2-[2-(2-氯苯基)-4-氧亚基噻唑烷-3-基]-*N*-(5-乙基-4,6-二甲基嘧啶-2-基)乙酰胺(**5dc**): 白色固体, 产率 51.5%. m.p. 73~75 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 1.09 (t, $J=4.2$ Hz, 3H, CH₃), 2.37 (s, 6H, 2CH₃), 2.57 (q, $J=7.8$ Hz, 2H, CH₂), 3.82 (s, 2H, CH₂), 4.16 (d, $J=18.8$ Hz, 1H, H-5), 5.16 (d, $J=18.8$ Hz, 1H, H-5), 6.35 (s, 1H, H-2), 7.27 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.33 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.38 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, Ar-H) 8.15 (s, 1H, N-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 13.4, 20.8, 21.7, 31.6, 46.9, 60.2, 128.1, 128.5, 130.5, 130.6, 130.8, 132.5, 140.4, 154.7, 165.7, 172.3; MS (ESI) m/z : 427.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal. calcd for C₁₉H₂₁ClN₄O₂S: C 56.36, H 5.23, N 13.84; found C 56.38, H 5.31, N 13.79.

3.2.3 HIV-RT 抑制活性测试

抗 HIV-RT 活性测试使用的是从罗氏公司购买的逆转录酶试剂盒, 操作遵循试剂盒上的实验说明. 简单的实验操作过程如下^[19]: 将装有 2'-脱氧-核苷酸-5'-三磷酸盐 (dNTPs)、用缓冲溶液配制的逆转录酶和抑制剂的实验组 and 没有加抑制剂的阳性对照组的多孔 37 °C 恒温 1 h 后, 将反应液转移到涂有链霉菌类抗生素蛋白的微孔板(MTP)上, 具有活性的逆转录酶与链霉菌类抗生素蛋白结合, 生物素标记的 dNTPs 被吸附到多孔板上, 用洗液洗去未被吸附的 dNTPs, 向 MTP 中加入抗地高辛-氧化酶(DIG-POD), 吸附到微孔板上的被 DIG 标记的 dNTPs 与抗-DIG-POD 抗体结合. 洗去未结合的抗-DIG-POD, 在 MTP 中加入过氧化底物(ABST), 经过氧化酶的催化得到颜色不同的反应液, 通过酶标仪在 OD_{405 nm} 下测定样品的吸光率, 所得吸光强度与逆转录酶活性成正比. 样品逆转录酶抑制活性计算公式如下:

$$\text{样品逆转录酶抑制活性}(\%) = (100 - \text{样品组 OD}_{405 \text{ nm}} / \text{空白组 OD}_{405 \text{ nm}}) \times 100\%$$

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **10a~10b** 和 **5aa~5dc** 的核磁共振氢谱和碳谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Verma, A.; Saraf, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 897.
- [2] Tripathi, A. C.; Gupta, S. J.; Fatima, G. N.; Sonar, P. K.; Verma, A.; Saraf, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *72*, 52.
- [3] Reynold, C.; de Koning, C. B.; Pelly, S. C.; van Otterlo, W. A. L.; Bode, M. L. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4657.
- [4] Tian Y.; Zhan P.; Rai, D.; Zhang, J. Y.; De Clercq, E.; Liu, X. Y. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2026.
- [5] Hao, G. F.; Yang, G. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 1545 (in Chinese).
(郝格非, 杨光富, 有机化学, **2008**, *28*, 1545.)
- [6] Zhan, P.; Chen, X. W.; Li, D. Y.; Fang, Z. J.; De Clercq, E.; Liu, X. Y. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*(suppl. 1), E1.
- [7] Rawal, R. K.; Tripathi, R.; Katti, S. B.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2800.
- [8] Rawal, R. K.; Tripathi, R.; Katti, S. B.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3134.
- [9] Rawal, R. K.; Tripathi, R.; Kulkarni, S.; Paranjape, R.; Katti, S. B.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72*, 147.
- [10] Chen, H.; Bai, J.; Jiao, L. L.; Guo, Z. H.; Yin, Q. M.; Li, X. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3980.
- [11] Ravichandran, V.; Prashantha, K. B. R.; Sankar, S.; Agrawal, R. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1180.
- [12] Singh, A.; Yadav, D.; Yadav, M.; Dhamanage, A.; Kulkarni, S.; Singh, R. K. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *85*, 336.
- [13] DiMauro, E. F.; Newcomb, J.; Nunes, J. J.; Bemis, J. E.; Boucher, C.; Chai, L.; Chaffee, S. C.; Deak, H. L.; Epstein, L. F.; Faust, T.; Gallant, P.; Gore, A.; Gu, Y.; Henkle, B.; Hsieh, F.; Huang, X.; Kim, J. L.; Lee, J. H.; Martin, M. W.; McGowan, D. C.; Metz, D.; Mohn, D.; Morgenstern, K. A.; Oliveira-dos-Santos, A.; Patel, V. F.; Powers, D.; Rose, P. E.; Schneider, S.; Tomlinson, S. A.; Tudor, Y. Y.; Turci, S. M.; Welcher, A. A.; Zhao, H.; Zhu, L.; Zhu, X. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1681.
- [14] Chen, H.; Yuan, X. G.; Guo, Z. H.; Zhao, L.; Li, X. L.; Zhang, J. C. *J. Hebei Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2009**, *29*, 153 (in Chinese).
(陈华, 苑香果, 郭在红, 赵莲, 李小六, 张金超, 河北大学学报自然科学版, **2009**, *29*, 153.)
- [15] Zhou, Z. Z.; Huang, W.; Ji, F. Q.; Ding, M. W.; Yang, G. F. *Heteroat. Chem.* **2007**, *18*, 381.
- [16] Gududuru, V.; Nguyen, V.; Dalton, J. T.; Miller, D. D. *Synlett* **2004**, 2357.
- [17] Holmes, C. P.; Chinn, J. P.; Look, G. C.; Gordon, E. M.; Gallop, M. A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7328.
- [18] Chen, H.; Huang, C. J.; Zhu, M.; Li, X. L. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 756 (in Chinese).
(陈华, 黄长军, 朱墨, 李小六, 有机化学, **2014**, *34*, 756.)
- [19] Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric kit, Roche Diagnostics GmbH, *Roche Applied Science*, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany.

(Lu, Y.)