新型八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶衍生物作为趋化因子受体(CCR5)抑制剂的设计、合成及生物活性研究

王雨捷^a Upul Halambage^c 曾程初^a 胡利明^{*,a,b}

(^a 北京工业大学生命科学与生物工程学院 北京 100124)

(^b 北京工业大学环境与病毒肿瘤学北京重点实验室 北京 100124)

(^c Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University Medical Center Nashville 37232)

摘要 设计并合成一系列新型八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶衍生物作为趋化因子受体(CCR5)抑制剂,并测试其抗人免疫缺陷病毒(HIV-1)生物活性。大多数化合物显示了抗 HIV-1 活性,其中,八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶衍生物 **19c** 活性最好(IC₅₀ < 1 μmol·L⁻¹)。但在研究其药物作用机理时发现,该化合物除作用于 CCR5 外,还可作用于其他抗 HIV-1 靶标。另外,利用计算机模拟、分子对接方法,对该系列化合物进行了初步的构效关系讨论。

关键词 HIV-1; CCR5 抑制剂; 哌啶衍生物; 构效关系

Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Octahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine Derivatives as C-C Chemokine Receptor Type 5 (CCR5) Antagonists

Wang, Yujie^a Halambage, Upul^c Zeng, Chengchu^a Hu, Liming^{*,a,b}

(^a College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124)

(^b Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, Beijing University of Technology, Beijing 100124)

(^c Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville 27232)

Abstract A series of novel octahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine derivatives were designed and synthesized as C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) antagonists, and their biological activity of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is evaluated. A majority of these compounds showed anti-HIV-1 activities. Octahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine derivative **19c** exhibited potency against HIV-1 replication less than 1 μmol·L⁻¹. Function assay was employed and the result showed that there were other drug targets for HIV-1 inhibition besides CCR5. In addition, the preliminary structure-activity relationship (SAR) of these compounds was rationalized by docking studies.

Keywords HIV-1; CCR5 antagonists; piperidine derivatives; structure-activity relationships

获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immune Deficiency Syndrome),简称艾滋病(AIDS),是由感染人类免疫缺陷病毒 1 型病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV-1)感染引起的,逐步摧毁人体免疫系统的重大传染性疾病。经过三十多年的研究,人们对艾滋病的致病机理研究取得了重要进展。到目前为止,被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床治疗的艾滋病单组分药物有 29 种,以逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂为主。目前,临床中常用的治疗方法为高效抗病毒疗法(Highly

Active Antiretroviral Therapy, HAART)^[1],这一疗法很大程度上减少了艾滋病及其相关疾病的发病率和死亡率^[2]。但由于药物的毒副作用,病毒的抗药性等问题难以解决,因此,研究高效,低毒的艾滋病治疗药物具有十分重要的意义。

HIV-1 生命周期包括感染和复制两部分,其中感染过程为第一阶段。HIV-1 首先通过其表面糖蛋白 gp120 与细胞膜受体 CD4 紧密结合,使 gp120 膜蛋白的构象发生变化^[3,4];继而 HIV-1 包膜上的 gp41 与宿主细胞膜上

* Corresponding author. E-mail: huliming@bjut.edu.cn

Received February 13, 2017; revised April 3, 2017; published online May 2, 2017.

国家自然科学基金(No. 21272020)、环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室资助项目。

的辅助受体 CCR5 (CC-Chemokine Receptor 5) 或 CXCR4 结合, 其构象进一步发生改变^[5,6]. 最后, 病毒膜与细胞膜融合, 接着脱去包膜和核衣壳, 病毒核酸进入细胞.

CCR5 是 G 蛋白偶联受体家族的一个成员, 是 R5 嗜性病毒感染宿主细胞必不可少的辅助受体之一^[7,8]. 近十年, 许多大型制药公司和科研人员都致力于 CCR5 抑制剂的研发. 最终, 由美国 Pfizer 公司^[9]研发的 Maraviroc (图 1) 于 2007 年经美国 FDA 批准上市, 成为第一个成功上市的小分子 CCR5 抑制剂.

由日本 Takeda 公司研发的 TAK-220 (图 1) 具有很好的抗 HIV-1 活性. 该化合物具有较强的 CCR5 亲和力 ($IC_{50} = 3.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 较好的膜融合抑制活性 ($IC_{50} = 0.42 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和很好的代谢稳定性^[10]. Roche 公司使用八氢吡咯[3,4-*c*]吡咯桥环结构取代 TAK-220 中的哌啶结构, 从而得到化合物 1 (图 1), 其活性与 TAK-220 相当 ($IC_{50} = 2.7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[11]. 2012 年, 军事医学科学院戴秋云课题组使用 1,4-二取代哌嗪取代 TAK-220 的核心母核哌啶结构, 得到化合物 2 (图 1), 具有很好的抗病毒活性 ($IC_{50} = 6.17 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 并且较先导化合物 TAK-220 具有更好的水溶性和口服生物利用度^[12]. 2013 年, 刘涛课题组^[13]将带有手性中心的甲基引入化合物 2 的哌嗪环中, 得到化合物 3, 该化合物具有纳摩尔级抗病毒活性, 且在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下未见细胞毒性.

本文在前期文献调研的基础上, 以 TAK-220 作为先

导化合物, 引入二取代八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶桥环结构取代 TAK-220 核心结构哌啶环, 来研究哌啶桥环对于抗病毒活性的影响. 设计并合成了一系列新型的 CCR5 抑制剂, 1-取代-*N*-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-取代苯基哌啶-4-酰胺类化合物, 最终筛选出了一个 IC_{50} 值 (半数抑制浓度) 小于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HIV-1 抑制剂.

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

以取代苯胺为原料, 经甲酰基保护, 亲核取代, 脱保护, 酰胺化反应, 生成中间体 7 和 8 (Scheme 1)^[14]. 以 3,3-二乙氧基丙酸乙酯为原料, 在氨水中发生胺解反应, 得到 3,3-二乙氧基丙酰胺 12. 而后在乙醚中经氢化铝锂还原, 得到 3,3-二乙氧基丙胺 13. 胺类衍生物 13 经 Boc 保护后, 与烯丙基溴反应, 得到化合物 15. 该化合物在丙酮和水的混合溶剂中, 经对甲苯磺酸吡啶盐催化水解, 得到烯丙基(3-氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯 16. 化合物 16 与 *N*-苄基-*N*,*O*-二(三甲硅基)甘氨酸(10)发生缩合关环反应, 生成 1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶-5-甲酸叔丁酯(17). 如果使化合物 16 与 *N*-苄基甘氨酸(9)直接反应, 也可生成关环产物 17, 但收率很低, 主要的副产物为 β -消除产物^[15]. 化合物 17 脱保护后, 与中间体 7 和 8 发生亲核取代反应, 生成目标化合物 19 (Scheme 2).

图 1 已报道 CCR5 抑制剂结构
Figure 1 Structures of CCR5 antagonists

7a, 8a R² = H; 8b R² = 4-Me; 8c R² = 3-Me; 8d R² = 4-Cl; 8e R² = 3-Cl; 8g R² = 3-Cl, 4-Me; 8h R² = 3,4-Cl₂

Reaction conditions: (a) HCOOH, Ac₂O, 60 °C; (b) 1-bromo-3-chloropropane, Cs₂CO₃, actone, reflux; (c) conc. HCl, ⁱPrOH, 60 °C; (d) Et₃N, DCM, r.t.

图式 1 中间体 7 和 8 的合成方法
Scheme 1 Syntheses of intermediates 7 and 8

图式 2 目标化合物 19a~19h 的合成方法

Scheme 2 Syntheses of target compounds 19a~19h

1.2 生物活性与讨论

生物活性测试在合作方美国范德堡大学医学院 (Vanderbilt University Medical Center) 的 Aiken 实验室完成。使用单周期抗 HIV-1 活性测试方法^[16], 筛选化合物 **19a**~**19h** 抑制 R5 嗜性毒株感染 TZM-bl 细胞的能力。大多数化合物表现出了抗病毒活性。其中, 分子中间的取代苯基对于生物活性影响很大。如表 1 所示, 在苯环的 4 位引入甲基或在 3 位引入氯, 化合物的生物活性得到了很大的提高。特别是化合物 **19c** (3-Cl-4-Me), 具有很好的生物特征, HIV-1 抑制活性 IC₅₀ 值为 0.8 μmol·L⁻¹, 其细胞毒性 CC₅₀ 值为 15 μmol·L⁻¹。

为进一步探索该系列化合物的抗 HIV-1 作用机理, 我们选取两种不同的 HIV-GFP 病毒, 来测试这一系列中活性最好的化合物 **19c** 的抗病毒活性(表 2)。其中一种病毒是带有 ΔGPVV R8 Bal 包膜的 R5 嗜性毒株, 而另一种是带有 ΔGPVV R8 包膜的 X4 嗜性毒株。另外, 使用 CCR5 抑制剂 Maraviroc 和 CXCR4 抑制剂 AMD3100 作为阳性对照组。实验结果发现化合物 **19c** 不仅可以抑制 R5 嗜性病毒, 对 X4 嗜性病毒也有一定的抑制作用, 其对 R5 嗜性毒株的抑制活性(IC₅₀ = 1.5 μmol·L⁻¹)是 X4 毒株抑制活性(IC₅₀ = 5.0 μmol·L⁻¹)的 3 倍。这一结果说明, **19c** 除作用于 CCR5 靶标外, 在 HIV-1 感染复制的过程中, 该化合物还存在其他的作用靶标。

1.3 分子对接研究

为了研究该系列化合物与 CCR5 蛋白的作用方式,

表 1 目标化合物 19a~19h 的抗 HIV-1 活性和细胞毒性

Table 1 Anti-HIV-1 activities and cytotoxicities of 19a~19h

Compd.	R ¹	R ²	IC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)	CC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)
19a	MeCO	H	>20	>40
19b	CF ₃ CO	4-Me	10	>40
19c	CF ₃ CO	3-Cl-4-Me	0.8	15
19d	CF ₃ CO	H	>20	>40
19e	CF ₃ CO	3-Me	18	40
19f	CF ₃ CO	3-Cl	18	>40
19g	CF ₃ CO	4-Cl	>20	30
19h	CF ₃ CO	3,4-Cl ₂	8	25
Maraviroc			0.004	

表 2 抗病毒功能评价中的选择性

Table 2 The selectivity of function assay

Compd.	IC ₅₀ for R5 virus strain	IC ₅₀ for X4 virus strain
19c	1.5 μmol·L ⁻¹	5.0 μmol·L ⁻¹
Maraviroc	30 nmol·L ⁻¹	None activity
AMD3100	None activity	<0.5 nmol·L ⁻¹

我们挑选了活性最好的化合物 **19c** 与 CCR5 蛋白晶体 (PDB: 4MBS)^[17] 在 Autodock 4.0 程序上进行分子对接实验。如图 2 所示, 化合物 **19c** 的核心母核结构八氢吡咯 [3,2-*c*] 吡啶中吡啶环上的氮原子质子化后, 与 CCR5 蛋白上的 Glu-283 氨基酸形成盐桥, 这一现象与 CCR5-

Maraviroc 复合物的高分辨晶体结构报道特征类似^[17]。然而,与前期报道相反的是,化合物 **19c** 分子一端的苄基结构,进入由 Phe-112, Phe-109, Tyr-108 等疏水氨基酸组成的疏水口袋中,并与这些氨基酸发生 Pi-Pi 相互作用,而小分子中间的苯环并没有进入这一疏水口袋中。或许这就是这一系列化合物相比先导化合物 TAK-220 活性降低的主要原因。因此,在以后的研究中,我们将尝试在分子一端的苄基中引入弱疏水基团,从而调整小分子化合物与 CCR5 蛋白的结合构象。

图2 化合物 **19c** 的结构对接图

Figure 2 Binding model of **19c**

Oxygen atom (red stick), nitrogen atom (blue stick), fluorine atom (green stick), H-bone (green dash line), salt bridge (organic dash line), pi-pi stack (purple dash line)

2 结论

在文献调研的基础上,我们以 TAK-220 为先导化合物,设计并合成了一系列 1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶衍生物作为抗 HIV-1 CCR5 抑制剂,共合成 8 个目标化合物,其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS 确认。在抗 HIV-1 生物活性评价中,多数化合物表现出了抗 HIV-1 活性以及可接受的细胞毒性。然而在功能实验中,活性最好的化合物 **19c** 显示出了包括 CCR5 在内的多重抗病

毒活性靶标。因此,该系列化合物的抗病毒机理还需要进一步验证。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

合成实验中所用到的仪器为 Bruker Advance 400 核磁共振仪或 Bruker Advance 500 核磁共振仪;高分辨质谱仪(型号为 G3250AALC/MSD TOF system,由美国安捷伦公司生产并销售);ESI-MS (Esquire 6000);FA2004A 电子天平;本实验所用化学药品试剂均为市售商品,常用溶剂及原料等均为分析纯产品。薄层色谱(TLC)使用的是高效薄层硅胶板,柱层析使用的是 300-400 目硅胶。

3.2 实验方法

3.2.1 3,3-二乙氧基丙酰胺(**12**)的合成

将 3,3-二乙氧基丙酸乙酯(5 g, 26.3 mmol)溶于氨水(100 mL),室温下搅拌 48 h。用氯仿萃取反应体系,合并有机相,用水和饱和食盐水洗涤有机相,干燥有机相后减压脱溶,得到的白色固体未经进一步分离纯化,直接进行下一步反应。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.41 (s, 1H), 4.82 (t, *J*=5.2 Hz, 1H), 3.71 (tt, *J*=14.1, 7.1 Hz, 2H), 3.62~3.52 (m, 2H), 2.58 (d, *J*=5.2 Hz, 2H), 1.23 (t, *J*=7.1 Hz, 6H)。

3.2.2 3,3-二乙氧基丙胺(**13**)的合成

将化合物 **12** (0.5 g, 3.1 mmol)溶于乙醚(10 mL)中,冰浴条件下缓慢加入氢化铝锂(0.24 g, 6.2 mmol)乙醚溶液,体系加热回流 5 h。待体系冷却后,用 8%的氢氧化钠溶液淬灭,有灰白色固体析出。过滤后,用二氯甲烷萃取滤液,合并有机相,减压脱溶。得到的粗产物未经进一步分离纯化,直接进行下一步反应。

3.2.3 3,3-二乙氧基丙胺甲酸叔丁酯(**14**)的合成

将化合物 **13** (3.3 g, 22.4 mmol)溶于甲苯(40 mL),冰浴下加入氢氧化钠(0.9 g, 22.4 mmol)水溶液,然后逐滴加入二碳酸二叔丁酯(5.5 g, 25 mmol)。体系在室温下搅拌过夜,分离有机相和水相,用甲苯多次萃取水相。合并有机相,减压脱溶。柱层析纯化后得到目标产物。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.07 (s, 1H), 4.40 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 3.56~3.45 (m, 2H), 3.05 (d, *J*=5.9 Hz, 2H), 1.65 (dd, *J*=12.2, 6.2 Hz, 2H), 1.30 (d, *J*=18.9 Hz, 13H), 1.05 (t, *J*=7.0 Hz, 6H)。

3.2.4 烯丙基(3,3-二乙氧基丙基)氨基甲酸叔丁酯(**15**)的合成

将化合物 **14** (5 g, 20.2 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(50 mL),加入烯丙基溴(24 g, 202 mmol)和氢氧化钾

(11.3 g, 202 mmol). 体系在室温下搅拌过夜, 加水淬灭反应体系, 并用甲苯萃取水相. 合并有机相, 用水洗涤有机相, 干燥后, 减压脱溶. 柱层析纯化后得到目标化合物. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.69 (dd, $J=15.7$, 9.9 Hz, 1H), 5.03 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 4.42 (s, 1H), 3.73 (d, $J=16.6$ Hz, 2H), 3.61-3.51 (m, 2H), 3.47~3.34 (m, 2H), 3.15 (s, 2H), 1.77 (d, $J=6.7$ Hz, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.11 (t, $J=6.7$ Hz, 6H).

3.2.5 烯丙基(3-氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯(16)的合成

将化合物 15 (3.2 g, 11.3 mmol)溶于丙酮(25 mL)和水(6 mL)的混合溶液, 加入对甲苯磺酸吡啶盐(2.8 g, 11.3 mmol), 体系在 45 °C 下搅拌 2 h. 反应体系减压脱溶, 加水稀释, 并用乙酸乙酯萃取, 用饱和食盐水洗涤有机相, 干燥有机相后, 减压脱溶. 柱层析纯化后得到目标化合物. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 9.79 (s, 1H), 5.86~5.68 (m, 1H), 5.13 (d, $J=10.5$ Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.66 (d, $J=34.4$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H).

3.2.6 *N*-苄基-*N,O*-二(三甲基硅基)甘氨酸(10)的合成

将 *N*-苄基甘氨酸(3 g, 18.2 mmol)溶于干燥二氯甲烷(50 mL), 加入三乙胺(7.35 g, 72.8 mmol)和三甲基氯硅烷(5.9 g, 54.6 mmol), 体系呈泥浆状, 并在室温下搅拌 20 h. 反应体系减压脱溶, 加入干燥苯(12 mL), 过滤, 将滤液减压脱溶. 得到的粗产物未经进一步分离纯化, 立即进行下一步反应.

3.2.7 1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶-5-甲酸叔丁酯(17)的合成

将化合物 10 溶于干燥甲苯(20 mL), 加入化合物 16 (0.75 g, 3.5 mmol), 体系加热回流 16 h. 待体系冷却后, 减压脱溶, 柱层析纯化后得到目标化合物. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.40~7.22 (m, 5H), 3.95 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.70~3.50 (m, 1H), 3.46~3.24 (m, 3H), 3.10 (s, 1H), 2.66 (s, 1H), 2.39~2.15 (m, 2H), 1.90~1.68 (m, 3H), 1.54~1.33 (m, 11H).

3.2.8 1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶(18)的合成

将化合物 17 溶于二氯甲烷(8 mL), 加入三氟乙酸(1.5 mL), 体系室温搅拌过夜. 反应体系减压脱溶, 加入饱和碳酸氢钠溶液. 用二氯甲烷萃取体系, 合并有机相并减压脱溶. 得到的粗产物未经进一步分离纯化, 直接进行下一步反应.

3.2.9 目标化合物 19a~19h 的一般合成过程

将化合物 18 (80 mg, 0.37 mmol)溶于 5 mL 乙腈溶液, 加入相应的已知中间体 7 或 8 (0.37 mmol), 加入碳酸钾(260 mg, 1.85 mmol)和碘化钾(60 mg, 0.37 mmol),

体系回流 8 h. 反应体系减压脱溶, 加入水, 用二氯甲烷萃取体系, 合并有机相后, 减压脱溶, 柱层析分离纯化, 得到目标化合物.

1-乙酰基-*N*-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-苄基吡啶-4-甲酰胺(19a): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.50 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J=14.0$, 6.2 Hz, 7H), 4.52 (d, $J=13.3$ Hz, 1H), 4.04~3.62 (m, 4H), 3.43~2.96 (m, 8H), 2.92~2.96 (m, 3H), 2.45~2.16 (m, 5H), 2.04 (s, 6H), 1.71 (d, $J=11.2$ Hz, 2H), 1.67 (d, $J=24.3$ Hz, 3H). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 503.3386, found 503.3386.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-对甲苯基-1-(2,2,2-三氟乙酰基)吡啶-4-甲酰胺(19b): ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.38~7.22 (m, 9H), 4.42 (d, $J=13.1$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J=13.8$ Hz, 2H), 3.84~3.57 (m, 2H), 3.21 (dd, $J=23.9$, 17.2 Hz, 3H), 3.05 (s, 3H), 2.98~2.86 (m, 2H), 2.70~2.64 (m, 2H), 2.53~2.45 (m, 1H), 2.41 (d, $J=6.7$ Hz, 3H), 2.22 (d, $J=15.2$ Hz, 2H), 2.02 (s, 2H), 1.84~1.60 (m, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz) δ : 174.70, 155.28, 155.11, 154.75, 138.91, 130.98, 129.78, 128.57, 127.90, 127.52, 117.90, 115.04, 112.97, 57.11, 54.83, 51.46, 47.67, 46.89, 44.87, 42.66, 38.69, 35.43, 28.88, 27.99, 25.66, 23.04, 22.55, 21.11. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 571.3260, found 571.3251.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-(3-氯-4-甲基苄基)-1-(2,2,2-三氟乙酰基)吡啶-4-甲酰胺(19c): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.40~7.23 (m, 6H), 7.09 (dd, $J=13.6$, 7.0 Hz, 2H), 4.48~4.33 (m, 1H), 4.22~4.14 (m, 1H), 4.08~3.87 (m, 2H), 3.87~3.75 (m, 1H), 3.58 (dt, $J=23.5$, 6.5 Hz, 4H), 3.37~3.17 (m, 2H), 2.93 (dt, $J=22.9$, 11.4 Hz, 1H), 2.72~2.53 (m, 2H), 2.38~2.18 (m, 8H), 2.16~1.97 (m, 5H), 1.93~1.84 (m, 1H), 1.82~1.68 (m, 3H), 1.61 (d, $J=11.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz) δ : 174.04, 155.27, 140.25, 137.04, 135.46, 132.29, 128.52, 128.19, 127.36, 126.84, 117.89, 115.03, 112.17, 59.23, 56.99, 54.94, 53.97, 51.54, 48.05, 47.23, 44.76, 42.57, 38.67, 35.97, 29.64, 28.84, 27.95, 25.72, 23.63, 23.18, 19.76. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 605.2870, found 605.2869.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-苄基-1-(2,2,2-三氟乙酰基)吡啶-4-甲酰胺(19d): ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.50 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.41~7.32 (m, 4H), 7.31 (s, 1H), 7.26 (s, 2H), 4.42 (d, $J=13.3$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J=12.9$ Hz, 2H),

3.76 (dd, $J=21.4, 14.7$ Hz, 2H), 3.23 (d, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.92 (dd, $J=19.8, 9.2$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J=12.1$ Hz, 2H), 2.52~2.42 (m, 1H), 2.20 (s, 2H), 2.02 (s, 2H), 1.87~1.62 (m, 10H). HRMS (ESI) calcd for $C_{31}H_{39}F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 557.3103, found 557.3104.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-(3-甲基苯基)-1-(2,2,2-三氟乙酰基)哌啶-4-甲酰胺(**19e**): 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.36 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 7.26 (s, 5H), 7.22 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.42 (d, $J=13.4$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J=14.3$ Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.25 (d, $J=40.4$ Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.94 (t, $J=12.5$ Hz, 1H), 2.65 (d, $J=40.6$ Hz, 2H), 2.47 (d, $J=25.4$ Hz, 3H), 2.25 (d, $J=26.0$ Hz, 2H), 2.02 (s, 2H), 1.76 (d, $J=11.1$ Hz, 4H), 1.59 (s, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 101 MHz) δ : 174.51, 155.30, 141.25, 140.72, 131.30, 130.06, 129.52, 128.84, 128.82, 128.47, 125.03, 117.90, 57.10, 54.84, 51.57, 47.12, 44.81, 42.64, 38.67, 35.21, 29.64, 28.88, 27.99, 25.60, 22.96, 22.52, 21.32. HRMS (ESI) calcd for $C_{32}H_{41}F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 571.3260, found 571.3252.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-(3-氯苯基)-1-(2,2,2-三氟乙酰基)哌啶-4-甲酰胺(**19f**): 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.55~7.31 (m, 7H), 7.27 (s, 2H), 4.43 (d, $J=13.4$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J=13.9$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 3.24 (d, $J=29.6$ Hz, 2H), 3.12 (d, $J=37.0$ Hz, 3H), 3.00~2.86 (m, 2H), 2.71~2.56 (m, 2H), 2.46 (s, 1H), 2.06 (dd, $J=55.0, 29.2$ Hz, 5H), 1.91~1.63 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 101 MHz) δ : 174.18, 155.34, 142.58, 135.79, 131.46, 129.23, 128.09, 126.98, 117.89, 115.03, 54.72, 51.56, 46.91, 44.75, 42.59, 38.79, 34.94, 29.66, 28.83, 27.97, 27.19, 25.49. HRMS (ESI) calcd for $C_{31}H_{38}ClF_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 591.2714, found 591.2717.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-(4-氯苯基)-1-(2,2,2-三氟乙酰基)哌啶-4-甲酰胺(**19g**): 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.48 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.37 (s, 6H), 7.27 (s, 1H), 4.43 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J=14.0$ Hz, 2H), 3.76 (ddd, $J=34.0, 25.0, 10.8$ Hz, 3H), 3.27 (s, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.00~2.85 (m, 2H), 2.62 (dd, $J=18.9, 9.4$ Hz, 2H), 2.50~2.42 (m, 1H), 2.17 (s, 2H), 2.11~1.90 (m, 3H), 1.89~1.54 (m, 8H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 101 MHz) δ : 174.37, 155.07, 139.81, 134.86, 133.78, 130.68, 129.76, 128.95, 122.85, 117.89, 116.52, 115.03, 54.75, 51.51, 46.81, 44.81, 42.61, 38.80, 35.11, 29.66, 28.66, 28.00, 25.56, 22.94, 14.07. HRMS (ESI) calcd for $C_{31}H_{38}ClF_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 591.2714, found 591.2706.

N-[3-(1-苄基八氢吡咯[3,2-*c*]吡啶)丙基]-*N*-(3,4-二氯苯基)-1-(2,2,2-三氟乙酰基)哌啶-4-甲酰胺(**19h**): 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.61 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.37~7.24 (m, 6H), 4.44 (d, $J=13.3$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J=23.7, 14.3$ Hz, 2H), 3.74 (dd, $J=89.0, 27.5$ Hz, 2H), 3.37 (s, 1H), 3.17 (d, $J=65.1$ Hz, 2H), 2.97 (dd, $J=28.5, 17.8$ Hz, 4H), 2.85~2.59 (m, 3H), 2.57~2.33 (m, 3H), 2.11 (s, 2H), 2.05~1.89 (m, 3H), 1.89~1.67 (m, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 101 MHz) δ : 174.06, 155.31, 140.89, 134.08, 133.36, 132.08, 129.83, 128.54, 127.59, 117.88, 115.02, 59.06, 56.98, 54.64, 53.28, 51.47, 47.83, 47.11, 44.71, 42.53, 38.78, 35.62, 29.64, 28.83, 27.97, 25.61, 23.40, 22.73, 14.07. HRMS (ESI) calcd for $C_{31}H_{37}Cl_2F_3N_4O_2$ $[M+H]^+$ 625.2324, found 625.2323.

3.3 生物活性实验

3.3.1 抗 HIV-1 活性测试

用含牛血清 10% 的 DMEM 培养基培养 293T 细胞, 使用 Δ GPVV R8 Bal 和 R9-Eve 两种质粒共转染的方式制备 HIV-1 假病毒株. 将待测试样品溶于二甲基亚砜(DMSO), 浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并用培养基将母液序列稀释为 12 个浓度, 其最高浓度为 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

用含牛血清 10% 的 DMEM 培养基将对数生长期的细胞接种于 96 孔板中(每孔 6000 细胞), 之后放置于恒温培养箱($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5%二氧化碳)中培养过夜. 加入待测药品和 HIV-1 假病毒株后, 继续放入恒温培养箱中培养 48 h. 吸出培养基上清液, 加入细胞裂解液(Reportasol extraction buffer), 用分析仪(Molecular Devices Lmax microplate luminometer)定量分析荧光强度.

3.3.2 细胞毒性测试

使用 MTT 试剂盒(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四氮唑溴盐, Sigma)测试样品细胞毒性. 用含牛血清 10%, 无苯酚红指示剂的 DMEM 培养基将 TZM-bl 细胞接种于 96 孔板中(每孔 6000 细胞), 放置于恒温培养箱($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5%二氧化碳)中培养过夜. 加入待测样品, 培养约 48 h, 加入 5 mg/mL MTT(每孔 $10\text{ }\mu\text{L}$). 继续放入培养箱中培养 2 h. 取出 96 孔板, 加入 MTT 溶解液(每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$), 溶解生成的 MTT 甲皱沉淀. 使用 SpectraMax plate reader 在 $570\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 波长下定量分析生成的甲皱浓度.

3.3.3 功能实验

使用 PEI 转染方式, 用 Δ GPVV R8 Bal 与 HIV-GFP 共转染, 生成 R5 嗜性 HIV-1 假病毒, 使用 Δ GPVV R8 与 HIV-GFP 共转染, 生成 X4 嗜性 HIV-1 假病毒. 用含 10% 牛血清蛋白的 DMEM 培养基将 TZM-bl 细胞接种于

96 孔板(每孔 6000 细胞), 放置于恒温培养箱(37 °C, 5% 二氧化碳)中培养过夜, 加入病毒和待测样品(**19c**, Maraviroc 和 AMD3100). 继续放入培养箱中培养 48 h, 使用 trypsin 将细胞转移至 4%多聚甲醛溶液中固定. 使用流式细胞仪定量分析细胞中 GFP 的表达, 计算病毒感染率.

3.3.4 分子对接

使用 Discovery Studio 4.0 (DS 4.0)处理 4MBS 共晶结构 A 链, 得到 HIV-1 CCR5 蛋白模型. 使用 Gaussian 03 软件, 半经验 AM1 计算方法, 优化目标化合物 **19c** 至最低能量构型.

使用 Autodock 4.0 软件, AutodockTools 模块进行对接, 蛋白处理包括加氢和加电荷. 分子对接采取半柔性对接, 即以蛋白做刚性处理, 配体可自由转动. 在对接过程中, grid box 的大小为 66 Å×88 Å×66 Å grid points, grid spacing 设置约为碳碳单键长度的四分之一 0.375 Å. 对接算法采用 Lamarckian 遗传算法, 最大迭代次数为 2500000, 其他为采用默认设置. 最终产生 100 个复合物结构构象.

致谢 感谢范德堡大学微生物学、免疫学与病理学系的 Christopher R Aiken 教授在活性研究方面提供的帮助.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **12~17** 的 ¹H NMR 和 MS 谱图, 化合物 **19a~19h** 的 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Garima, K.; Pamendra, K. S. *HIV AIDS Rev.* **2012**, 3, 5.
- [2] Yeni, P. G.; Hammer, S. M.; Carpenter, C. C. J.; Cooper, D. A.; Fischl, M. A.; Gatell, J. M.; Gazzard, B. G.; Hirsch, M. S.; Jacobsen, D. M.; Katzenstein, D. A.; Montaner, J. S. G.; Richman, D. D.; Saag, M. S.; Schechter, M.; Schooley, R. T.; Thompson, M. A.; Vella, S.; Volberding, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 288, 222.
- [3] Eckert, D. M.; Kim, P. S. *Ann. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 777.
- [4] Freed, E. O.; Martin, M. A. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23883.
- [5] Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A. *Science* **1996**, 272, 872.
- [6] Moore, J. P.; Trkola, A.; Dragic, T. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, 9, 551.
- [7] Wu, L.; Gerard, N. P.; Wyatt, R.; Cheo, H.; Parolin, C.; Ruffing, N.; Borsetti, A.; Cardoso, A. A.; Desjardins, E.; Newman, W.; Gerard, C.; Sodroski, J. *Nature* **1996**, 384, 179.
- [8] Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Robinson, J.; Sweet, R. W.; Sodroski, J.; Hendericks, W. A. *Nature* **1998**, 393, 648.
- [9] Gulick, R. M.; Lalezari, J.; Goodrich, J.; Clumeck, N.; DeJesus, E.; Horban, A.; Nadler, J.; Clotet, B.; Karlsson, A.; Wohlfeiler, M.; Montana, J. B.; McHale, M.; Sullivan, J.; Ridgway, C.; Felstead, S.; Dunne, M. W.; Van der Ryst, E.; Mayer, H. N. *Engl. J. Med.* **2008**, 359, 1429.
- [10] Imamura, S.; Ichikawa, T.; Nichikawa, Y.; Kanzaki, N.; Takashima, K.; Niwa, S.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Sugihara, Y. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2784.
- [11] Lee, E. K.; Melville, C. R.; Rotstein, D. M. *WO 2005121145*, **2005** [*Chem. Abstr.* **2005**, 144, 69821].
- [12] Dong, M. X.; Lu, L.; Li, H. T.; Wang, X. H.; Lu, H.; Jiang, S. B.; Dai, Q. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3284.
- [13] Hu, S. W.; Wang, Z. L.; Hou, T. J.; Ma, X. D.; Li, J.; Liu, T.; Xie, X. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1157.
- [14] Imamura, S.; Nishikawa, Y.; Ichikawa, T.; Hattori, T.; Matsushita, Y.; Hashiguchi, S.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Sugihara, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 397.
- [15] Hardy, S.; Martin, S. F. *Org. Lett.* **2011**, 13, 3102.
- [16] Wang, Y. J.; Rong, J.; Zhang, B.; Hu, L. M.; Wang, X. L.; Zeng, C. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 735.
- [17] Tan, Q.; Zhu, Y.; Li, J.; Zhen, Z.; Han, G. W.; Kufareva, I.; Li, T.; Ma, L.; Fanalti, G.; Li, J.; Zhang, W.; Xie, X.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Liu, H.; Stevens, R. C.; Zhao, Q.; Wu, B. *Science* **2013**, 341, 1387.

(Li, L.; Fan, Y.)