

新型含亲水基的噻唑烷-4-酮衍生物的合成及 HIV 逆转录酶抑制活性

陈 华* 黄长军 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 在微波辐射条件下合成了系列 C-2 或 N-3 位含酯基的噻唑烷-4-酮衍生物, 经水解或还原得到含亲水基如羧基、羟基的衍生物。化合物通过艾滋病病毒逆转录酶(HIV-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 **8a**, **8b**, **9a**, **9b** 和 **14c** 能有效地抑制 HIV 逆转酶的活性。其中在 N-3 嘧啶环 5 位连有乙基的化合物 **8a** 和 **9a** 的活性最高, IC_{50} 值分别为 3.02 和 3.06 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。构效关系表明亲水性基团的引入对 HIV 逆转录酶抑制活性影响不大, 而 N-3 位嘧啶基更有利于噻唑烷-4-酮抗 HIV 活性。

关键词 噻唑烷-4-酮; 抗 HIV 逆转酶活性; 亲水基团; 微波辐射

Synthesis and Anti-HIV-RT Activity of Novel Thiazolidin-4-one Derivatives Possessing Hydrophilic Groups

Chen, Hua* Huang, Changjun 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, and then the corresponding products with hydrophilic groups, like carboxyl and hydroxyl groups, were obtained after hydrolysis reaction or reduction reaction. The compounds were evaluated for their human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase inhibitory activities *in vitro* HIV-RT kit assay (colorimetric method). The results showed that some of the compounds, such as **8a**, **8b**, **9a**, **9b** and **14c**, could effectively inhibit RT activity. Among them, compounds **8a** and **9a** where ethyl group existed at 5-position on N-3 pyrimidine ring were the best ones with the IC_{50} values of 3.02 and 3.06 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Structure activity relationship analysis of these analogues suggested that the introduction of hydrophilic groups had little effect on their anti-HIV-RT activity and the N-3 pyrimidine moiety on thiazolidin-4-one ring should be more favorable to the anti-HIV activity than the C-2 phenyl group.

Keywords thiazolidin-4-one; anti-HIV-RT activity; hydrophilic group; microwave irradiation

HIV-1 非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)是一类高效低毒的抗艾滋病病毒(HIV)药物, 并被广泛用于临床治疗^[1]。这类化合物以病毒基因复制中的关键酶^[2]之一的 HIV 逆转录酶(RT)为靶点, 并结合在距酶活性中心 10 Å 的变构结合位点(allosteric binding site)^[3]。由于 RT 上的这个口袋状结合位点灵活易变的特点, 导致了 NNRTI 类药物的结构多样性, 为发现新型抗 HIV 药效团提供了机会^[4]。其中, TBZ (thiazolobenzimidazole)结构类似物(图 1), 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具有高的抗 HIV-1 活性和选择性引起了广泛关注^[5]。经系统的结构优化, 2-(2,6-二卤代苯基)-3-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)噻唑烷-4-酮化合物 **1~4** 较其它芳基取代具有更高的抗 HIV 活性(图 1)^[6~10]。目前大多数研究集中在 C-2 和 N-3 位的亲脂性芳基对 HIV-RT 的抑制活性的影响^[11], 而脂肪族的亲水性基团, 如羧基或羟基, 却研究得很少。最近研究发现, 合成的亚胺基糖并噻唑烷-4-酮衍生物表现出显著的抗 HIV 逆转录酶的活性^[12,13], 这引起我们探讨亲水性基团对 RT

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

Received November 21, 2013; revised December 13, 2013; published online December 23, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21372060), the Medicinal Joint Funds of the Natural Science Foundation of Hebei Province and Shijiazhuang Pharmaceutical Group (CSPC) Foundation (No. B2012201113), and the Natural Science Foundations of Education Department of Hebei Province (No. Y2011119).

国家自然科学基金(No. 21372060)、河北省自然科学基金石药集团医药联合基金(No. B2012201113)和河北省教育厅自然科学基金(No. Y2011119)资助项目。

抑制活性影响的兴趣. 因此, 为进一步发现抗 HIV 病毒药物的及构效关系分析(SAR), 本工作设计、合成了一系列在噻唑烷-4-酮环的 C-2 或 N-3 位上连有羧基和羟基的化合物 **9**, **13** 和 **14** (Schemes 1 和 2), 并对其 HIV 逆转录酶的抑制活性进行了评价.

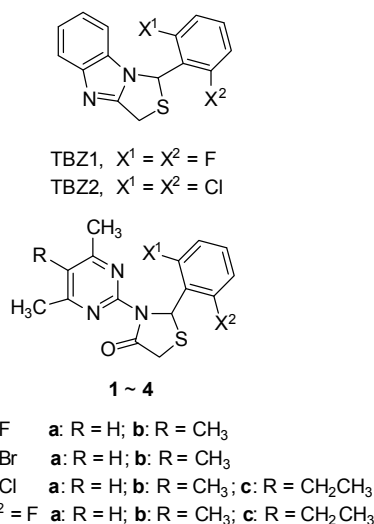
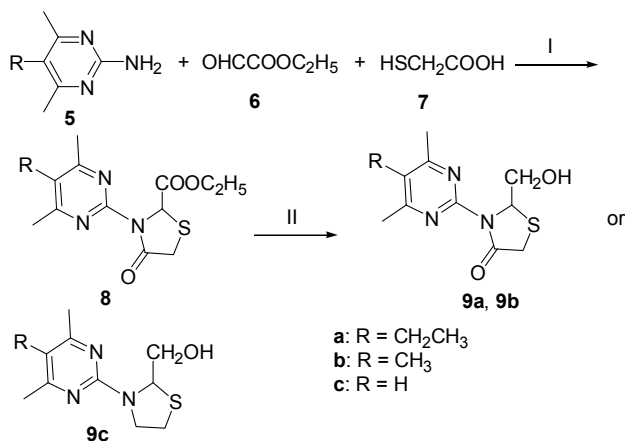


图 1 TBZ 和 2-(2,6-二卤代苯基)-3-(嘧啶-2-基)噻唑烷-4-酮 **1~4** 的结构

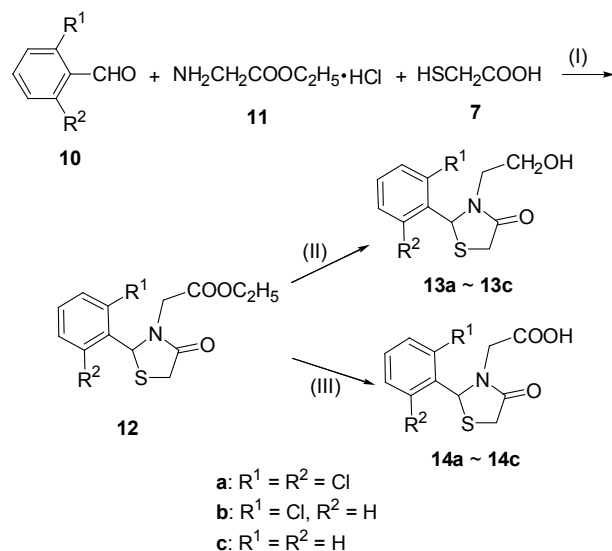
Figure 1 Structures of TBZ and 2-(2,6-dihalo-phenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)thiazolidin-4-ones **1~4**



1 结果与讨论

1.1 含亲水基噻唑烷-4-酮衍生物的合成

考虑到二芳基噻唑烷-4-酮环上 N-3 位的嘧啶基和 C-2 位的苯基对化合物的抗 HIV 活性有利, 如化合物 **1~4** (图 1), 因此我们选用相应的 2-嘧啶胺(**5**, Scheme 1) 和苯甲醛(**10**, Scheme 2)为起始原料. 参考文献报道的



Reagents and conditions: (I) M.W., 120 °C, ethanol, 30 min. (II) $NaBH_4$, MeOH/H₂O, r.t. (III) NaOH, r.t.

Scheme 2

合成方法^[10,14,15], 以嘧啶胺(**5**)、乙醛酸乙酯(**6**)和巯基乙酸(**7**)为原料, 无水甲苯为溶剂, 微波辐射条件下反应 15 min 得到了化合物 **8**. 继而用硼氢化钠还原化合物 **8** 得到化合物 **9** (Scheme 1). 化合物 **8c** 的还原, 得到了酯基与酰胺羰基同时被还原的产物 **9c**, 与之前文献报道一致^[14].

以苯甲醛或氯代苯甲醛(**10**)、甘氨酸乙酯盐酸盐(**11**)和巯基乙酸(**7**)为原料, 溶于无水乙醇, 微波辐射下反应 30 min 得到化合物 **12**. 将化合物 **12** 还原或水解分别以较好的收率得到了化合物 **13** 和 **14** (Scheme 2).

所有合成的化合物 **8a**, **9a** 和 **12~14** 结构通过核磁和元素分析确认, 其中化合物 **8b**, **8c**, **9b**, **9c**, **14a** 和 **14c** 为已知化合物^[14,16,17].

1.2 化合物 HIV-RT 抑制活性评价

化合物 **8**, **9**, **12**, **13** 和 **14** 通过 HIV-RT 试剂盒 (HIV-RT kit)^[18]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 **8a**, **8b**, **9a**, **9b** 和 **14c** 具有较好的 HIV-RT 抑制活性, 它们的 IC₅₀ 值均低于 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中化合物 **8a** 和 **9a** 的抑制活性最好, IC₅₀ 值分别为 3.02 和 3.06 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 化合物 **8c**, **9c**, **12b**, **13b**, **14b** 和 **12c** 显示了中等的 HIV-RT 抑制活性, 而在 4-噻唑烷酮环 C-2 位置上连接 2,6-二氯苯基的化合物 **12a**, **13a** 和 **14a** 没有 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(**8a**, **8b**, **9a**, **9b** 和 **14c**), 提示无论在 N-3 或 C-2 位上含有酯基、羧基或羟基这样的亲水基团, 对化合物的 HIV 逆转录酶抑制活性影响不大. 构效关系分析(SAR)

表明, 具有相似结构的化合物显示了相近的抑制活性, 如化合物 **8** 与 **9**, 或化合物 **12**, **13** 与 **14**. 亲脂性的芳基对 HIV-RT 的抑制活性起到了重要作用. 4-噻唑烷酮环上 N-3 位噻唑基较 C-2 位苯基更有利于化合物的抗 HIV 活性, 尤其是当乙基存在于 4,6-二甲基噻唑的 5 位, 如化合物 **8a** 和 **9a**. 而 5 位的烷基链变短时, 化合物 HIV-RT 抑制活性也会随着降低, 如化合物 **8c** 和 **9c**, 与 **8a**, **9a** 或 **8b**, **9b** 相比, 显示了相对较弱的活性. 对于 C-2 位上苯基(化合物 **12**~**14**), 2,6-二氯苯基的引入(**12a**, **13a** 和 **14a**)导致活性完全丧失, 这表明当亲水性基团在 N-3 位时, 这种取代将对抗 HIV-RT 活性不利. 以上构效关系分析将有助于指导噻唑烷-4-酮类抗 HIV 化合物的进一步结构修饰.

表 1 化合物 **8**, **9** 和 **12**~**14** 的 HIV-RT 抑制活性Table 1 HIV-RT kit assay for compounds **8**, **9** and **12**~**14**

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
8a	3.02 $\pm$ 0.67	9a	3.06 $\pm$ 0.52
8b	9.87 $\pm$ 1.16	9b	4.48 $\pm$ 0.84
8c	17.35 $\pm$ 3.20	9c	13.58 $\pm$ 2.45
12a	>100 ^a	12b	10.01 $\pm$ 1.98
13a	>100	13b	14.08 $\pm$ 2.16
14a	>100	14b	28.86 $\pm$ 5.22
12c	38.01 $\pm$ 8.36	14c	6.45 $\pm$ 0.81
3b	1.02 $\pm$ 0.15		

^aNo activity.

2 结论

设计合成了系列新型含亲水基团如羧基和羟基的噻唑烷-4-酮衍生物, 并评价了化合物的 HIV 逆转酶抑制活性. 化合物 **8a**, **8b**, **9a**, **9b** 和 **14c** 具有良好的 HIV 逆转酶的抑制活性. 构效关系分析表明, 亲水性基团的引入对其抗 HIV 逆转录酶活性影响不大, 而 N-3 位噻唑基较 C-2 位苯基更有利于化合物的抗 HIV 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 HEKAEUS (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. 本工作所用其它试剂均为分析纯, 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 **8** 的合成

以化合物 **8a** 的合成为例. 将芳香胺 **5a** (1.0 mmol), 乙醛酸乙酯(**6**, 0.5 mmol)和巯基乙酸(**7**, 1.0 mmol)加入到 10 mL 微波反应管中, 加入 1 mL 无水甲苯搅拌溶解, 在微波辐射条件下, 140 °C 搅拌反应 5 min. 然后再加入 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC, 2.0 mmol)和 4 mL 无水甲苯, 使反应混合物的浓度为 0.25 mmol/mL, 继续在微波辐射 140 °C 封管搅拌反应 10 min. 反应结束后, 冷却至室温, 过滤除去 *N,N'*-二环己基脲(DCU), 并加入固体 K₂CO₃ 中和溶液至中性. 加入 20 mL 乙酸乙酯萃取, 有机相依次用饱和 NaHCO₃ 水溶液、水及饱和食盐水洗, 无水 MgSO₄ 干燥. 抽滤, 减压蒸除溶剂, 剩余固体以硅胶柱色谱(石油醚/乙酸乙酯, *V*:*V*=3:1)分离得化合物 **8a**.

3-(5-乙基-4,6-二甲基噻唑-2-基)-4-氧代噻唑烷基-2-羧酸乙酯(**8a**): 白色固体, 产率 34.5%. m.p. 77~79 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 1.12 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.30 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.48 (s, 6H, 2CH₃), 2.63 (q, *J*=15.0 Hz, 2H, CH₂), 3.67 (d, *J*=16.2 Hz, 1H, H-5), 4.00 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-5), 4.24~4.33 (m, 2H, CH₂), 5.48 (s, 1H, H-2); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 12.9, 14.1, 21.1, 21.8, 33.6, 59.3, 61.8, 129.6, 154.1, 165.6, 169.7, 170.3; MS (ESI) *m/z*: 310.3 ([*M*+*H*]⁺). Anal. calcd for C₁₄H₁₉N₃O₃S: C 54.35, H 6.19, N 13.58; found C 54.30, H 6.17, N 13.56.

按相同的方法, 分别以 **5b** 和 **5c** 为原料, 得到 3-(5-甲基-4,6-二甲基噻唑-2-基)-4-氧代噻唑烷基-2-羧酸乙酯(**8b**)和 3-(4,6-二甲基噻唑-2-基)-4-氧代噻唑烷基-2-羧酸乙酯(**8c**). 化合物结构通过熔点, ¹H NMR 和 ESI-MS 测定. 表征数据与文献[14]报道一致.

3.2.2 化合物 **12** 的合成

将芳香醛 **10** (1.0 mmol)、甘氨酸乙酯盐酸盐(1.0 mmol)和巯基乙酸(**7**, 2.0 mmol)加入到 10 mL 微波反应管中, 加入 1 mL 乙醇搅拌溶解, 在微波辐射 120 °C 封管搅拌反应 30 min. 反应结束后, 冷至室温, 混合物用固体 K₂CO₃ 中和. 减压蒸除溶剂, 剩余固体以硅胶柱色谱(石油醚/乙酸乙酯, *V*:*V*=3:1)分离得到化合物 **12**.

2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧代噻唑烷-3-基]乙酸乙酯(**12a**): 白色固体, 产率 75.5%. m.p. 88~90 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 1.26 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.11 (d, *J*=17.4 Hz, 1H, H-5), 3.82 (s, 2H, CH₂), 4.13~4.19 (m, 2H, CH₂), 4.53 (d, *J*=18 Hz, 1H, H-5), 6.83 (s, 1H, H-2), 7.22 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.31~7.34 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, Ar-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 14.1, 33.6,

43.7, 58.3, 61.7, 129.0, 130.5, 135.5, 136.1, 167.7, 171.7; MS (ESI) m/z : 357.6 ($[M + Na]^+$). Anal. calcd for $C_{13}H_{13}Cl_2NO_3S$: C 46.72, H 3.92, N 4.19; found C 46.84, H 3.85, N 4.26.

2-[2-(2-氯苯基)-4-氧代噻唑烷-3-基]乙酸乙酯(**12b**): 白色固体, 产率 74.5%. m.p. 33~34 °C; 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 1.26 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 3.35 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, H-5), 3.78 (s, 2H, CH_2), 4.15~4.23 (m, 2H, CH_2), 4.53 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, H-5), 6.29 (s, 1H, H-2), 7.29~7.41 (m, 4H, Ar-H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 13.0, 31.2, 44.0, 60.1, 61.33, 127.7, 129.9, 130.1, 132.9, 136.0, 167.9, 173.2; MS (ESI) m/z : 322.7 ($[M + Na]^+$). Anal. calcd for $C_{13}H_{14}ClNO_3S$: C 52.09, H 4.71, N 4.67; found C 52.14, H 4.79, N 4.50.

2-(2-苯基-4-氧代噻唑烷-3-基)乙酸乙酯(**12c**): 白色固体, 产率 69.0%. m.p. 105~107 °C; 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 1.24 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 3.30 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, H-5), 3.77~3.84 (m, 2H, CH_2), 4.12~4.19 (m, 2H, CH_2), 4.40 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, H-5), 5.84 (s, 1H, H-2), 7.33~7.41 (m, 5H, Ar-H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 14.1, 32.8, 43.9, 61.5, 63.7, 127.7, 129.2, 129.6, 137.9, 168.0, 172.0; MS (ESI) m/z : 288.3 ($[M + Na]^+$). Anal. calcd for $C_{13}H_{15}NO_3S$: C 58.85, H 5.70, N 5.28; found C 58.72, H 5.64, N 5.33.

3.2.3 化合物 9 和 13 的合成

将化合物 **8a** 或 **12** (1.0 mmol) 用 2.0 mL CH_3OH 溶解。然后将 $NaBH_4$ (1.0 mmol) 溶解在 2.0 mL 水中, 并缓慢滴加到化合物 **8a** 或 **12** 的甲醇溶液中室温搅拌反应, TLC 监测。反应结束后, 减压蒸除甲醇, 加入 20 mL $CHCl_3$ 萃取 3~4 次, 无水 $MgSO_4$ 干燥, 抽滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物以硅胶柱色谱(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=1:1$) 分离得目标化合物 **9a** 或 **13**。

2-(羟甲基)-3-(5-乙基-4,6-二甲基嘧啶-2-基)噻唑烷-4-酮(**9a**): 白色固体, 产率 58.5%. m.p. 123~125 °C; 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 1.15 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.50 (s, 6H, CH_3), 2.71 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.56 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 3.76~3.80 (m, 1H, CH_2), 3.95~3.98 (m, 1H, CH_2), 3.99 (d, $J=17.4$ Hz, 1H, H-5), 5.56 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 11.6, 20.2, 20.5, 63.6, 65.0, 130.6, 153.9, 166.4, 172.1; MS (ESI) m/z : 267.5 ($[M + H]^+$). Anal. calcd for $C_{12}H_{17}N_3O_2S$: C 53.91, H 6.41, N 15.72; found C 53.82, H 6.34, N 15.83.

按相同的方法, 分别以 **8b** 和 **8c** 为原料, 得到化合物按 2-(羟甲基)-3-(4,5,6-三甲基嘧啶-2-基)噻唑烷-4-酮(**9b**)和[3-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)噻唑烷-2-基]甲醇(**9c**)。

化合物结构通过熔点, 1H NMR 和 ESI-MS 测定。表征数据与文献[14]报道一致。

2-(2,6-二氯苯基)-3-(2-羟甲基)噻唑烷-4-酮(**13a**): 白色固体, 产率 69.5%. m.p. 113~114 °C; 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 2.61~2.65 (m, 1H, CH_2), 3.58~3.62 (m, 1H, H-5), 3.69~3.71 (m, 1H, H-5), 3.79~3.84 (m, 1H, CH_2), 3.85~3.88 (m, 2H, CH_2), 6.95 (s, 1H, H-2), 7.35 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.48 (t, $J=9.0$ Hz, 2H, Ar-H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 33.5, 45.1, 58.2, 59.4, 128.8, 130.7, 132.1, 135.0, 173.0; MS (ESI) m/z : 315.4 ($[M + Na]^+$). Anal. calcd for $C_{11}H_{11}Cl_2NO_2S$: C 45.22, H 3.79, N 4.79; found C 45.18, H 3.82, N 4.81.

2-(2-氯苯基)-3-(2-羟甲基)噻唑烷-4-酮(**13b**): 白色固体, 产率 67.5%. m.p. 52~54 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 2.97~3.01 (m, 1H, CH_2), 3.69 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-5), 3.72~3.75 (m, 2H, CH_2), 3.77 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-5), 3.81~3.85 (m, 1H, CH_2), 6.24 (s, 1H, H-2), 7.24~7.41 (m, 4H, Ar-H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 31.5, 45.4, 58.7, 59.8, 127.7, 128.4, 129.7, 132.5, 136.0, 173.2; MS (ESI) m/z : 290.1 ($[M + Na]^+$). Anal. calcd for $C_{11}H_{12}ClNO_2S$: C 51.26, H 4.69, N 5.43; found C 51.37, H 4.72, N 5.51.

3.2.4 化合物 14 的合成

将化合物 **12b** (1.0 mmol) 用 10 mL CH_3OH 溶解, 然后搅拌下加入 $NaOH$ (2.5 mmol), 室温下反应, TLC 检测。反应结束后, 用阳离子树脂中和, 抽滤, 减压蒸除溶剂, 粗品以硅胶柱色谱(乙酸乙酯)分离得目标化合物 **14b**。

2-[2-(2-氯苯基)-4-氧代噻唑烷-3-基]乙酸(**14b**): 白色固体, 产率 93.5%. m.p. 136~138 °C; 1H NMR ($DMSO-d_6$, 600 MHz) δ : 3.27 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, CH_2), 3.70 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-5), 3.81 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-5), 4.26 (d, $J=18.0$ Hz, 1H, CH_2), 6.15 (s, 1H, H-2), 7.32 (dd, $J=7.2, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.38~7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.51 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, Ar-H); ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 150 MHz) δ : 31.2, 44.0, 60.1, 127.7, 129.9, 130.0, 132.9, 136.0, 167.9, 173.2; MS (ESI) m/z : 270.5 ($[M - H]^+$). Anal. calcd for $C_{11}H_{10}ClNO_3S$: C 48.62, H 3.71, N 5.15; found C 48.53, H 3.68, N 5.23.

按相同的方法, 分别以 **12a** 和 **12c** 为原料, 得到化合物 2-[2-(2,6-二氯苯基)-4-氧代噻唑烷-3-基]乙酸(**14a**)^[16]和 2-(4-氧代-2-苯基噻唑烷-3-基)乙酸(**14c**)^[17]。化合物结构通过熔点, 1H NMR 和 ESI-MS 测定。表征数据与文献报道一致。

3.2.5 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^[18]. 简单的实验操作过程如下: 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和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物素蛋白的微孔板(MTP)上, 具有活性的逆转录酶与链霉菌类抗生物素蛋白结合, 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: 样品逆转录酶抑制活性 = $[1 - (\text{样品组 OD}_{405 \text{ nm}} / \text{空白组 OD}_{405 \text{ nm}})] \times 100\%$.

References

- [1] Reynold, C.; de Koning, C. B.; Pelly, S. C.; van Otterlo, W. A. L.; Bode, M. L. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4657.
- [2] 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.)
- [3] 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.
- [4] Prajapati, D. G.; Ramajayam, R.; Yadav, M. R.; Giridhar, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5744.
- [5] Tian, Y.; Zhan P.; Rai, D.; Zhang, J. Y.; De Clercq, E.; Liu, X. Y. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2026.
- [6] Rawal, R. K.; Tripathi, R.; Katti, S. B.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2800.
- [7] Rawal, R. K.; Tripathi, R.; Katti, S. B.; Pannecouque, C.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3134.
- [8] Rawal, R. K.; Prabhakar, Y. S.; Katti, S. B.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6771.
- [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] Chen, H.; Yang, T. Y.; Wei, S. N.; Zhang, H. Z.; Li, R.; Qin, Z. B.; Li, X. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7041.
- [13] Chen, H.; Li, R.; Liu, Z. Y.; Wei, S. N.; Zhang, H. Z.; Li, X. L. *Carbohydr. Res.* **2013**, *365*, 1.
- [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] Holmes, C. P.; Chinn, J. P.; Look, G. C.; Gordon, E. M.; Gallop, M. A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7328.
- [17] Gududuru, V.; Hurh, E.; Dalton, J. T.; Miller, D. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5289.
- [18] Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric kit, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany.

(Zhao, C.)