



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101899013 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 01

(21) 申请号 201010223401. 5

A61P 31/18(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 12

(71) 申请人 山东大学

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路
44 号

(72) 发明人 刘新泳 展鹏 方增军

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 赵会祥

(51) Int. Cl.

C07D 249/12(2006. 01)

C07D 401/12(2006. 01)

A61K 31/4196(2006. 01)

A61K 31/4439(2006. 01)

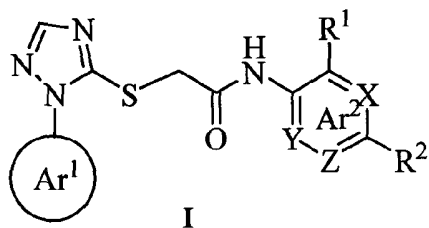
权利要求书 2 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

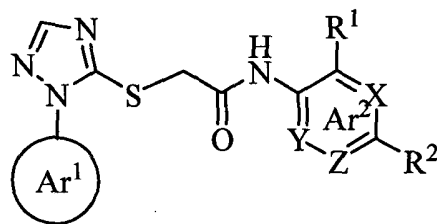
2-(2-取代芳基-2H-1, 2, 4-三唑-3-巯基)
乙酰胺衍生物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,具体公开了一类如通式 I 所示的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物、其 N-氧化物、立体异构体形式、立体异构体混合物和药学上可接受的盐、其水合物和溶剂化物,其多晶和共晶,其同样生物功能的前体和衍生物,其制备方法以及含有一个或多个此类化合物的组合物在治疗和预防人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染药物中的应用。



1. 具有通式 I 的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物, 以及其 N-氧化物、立体异构体形式、立体异构体混合物或药学上可接受的盐,



I

其中,

X、Y、Z 为碳原子或氮原子;

R¹ 为 H、F、Cl、Br、I、NO₂ 或 Me;

R² 为 H、F、Cl、Br、I、Me、OCH₃、COMe、COOMe、COOEt、COOH 或 SO₂NH₂。

与 1,2,4-三唑直接相连芳基 Ar¹ 为结构多样性的取代苯环或取代萘环。

2. 如权利要求 1 所述的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物, 其特征在于 Ar¹ 为 2,4-二氯苯环、2,4-二溴苯环、2-氯-4-环丙基苯环、2-溴-4-环丙基苯环、2-氯-4-叔丁基苯环、2-溴-4-叔丁基苯环、1-萘环、2-萘环、4-环丙基-1-萘环或 4-叔丁基-1-萘环。

3. 如权利要求 1 所述的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物, 其特征在于与酰胺相连的芳环 Ar² 为取代苯环或取代六元含氮芳杂环。

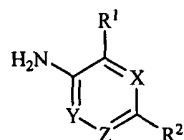
4. 如权利要求 1 所述的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物, 其特征在于所述化合物的药学上可接受的盐是盐酸盐, 硫酸盐, 酒石酸盐, 柠檬酸盐, 以及药学上可接受的前体药物或衍生物。

5. 权利要求 1 所述的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物的制备方法, 步骤如下:

利用中间体 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酸 (6), 通过与各种取代芳胺的酰化反应, 然后经柱层析分离纯化得到 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物, 具体步骤如下:

冰浴搅拌下将 1.1mmol 五氯化磷加入到 1mmol 中间体 (6) 的 15mL 乙醚溶液中; 室温下搅拌 2h, 减压浓缩后, 溶解到 15mL 四氢呋喃 (THF) 中, 依次加入 1mmol 芳胺和 1.2mmol 三乙胺; 混合物在室温下继续搅拌, TLC 检测反应完全, 旋干, 得到的粗产品, 用质量比为 1:4 的乙酸乙酯-石油醚快速柱层析得到目标化合物 (7);

上述的各种取代芳胺的结构通式为:



其中, X、Y、Z 为碳原子或氮原子; R¹ 为 H、F、Cl、Br、I、NO₂ 或 Me; R² 为 H、F、Cl、Br、I、Me、OCH₃、COMe、COOMe、COOEt、COOH 或 SO₂NH₂。

6. 权利要求 5 所述的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物的制

备方法,其中,中间体 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酸(6)的制备步骤如下:

在搅拌下,向 27.7mmol 取代芳基肼(1)的 15mL 水溶液中,加入 30.5mmol 50%的 2-乙醛酸和 5mL 水的混合溶液,再加入 3mL 浓盐酸;将生成的沉淀过滤,干燥,得 2-(2-芳基肼叉)乙酸(2);

在 12.9mmol 中间体(2)的 80mL 无水甲苯悬浊液中,搅拌下加入 12.9mmol 三乙胺和 12.9mmol 二苯基磷酰叠氮;混合物缓慢的加热到回流,到 60℃时开始有气体生成,持续 1h 左右;将反应完毕后澄清的橙色溶液冷却,倾入 100mL 10%的氢氧化钾溶液中;碱液中的提取物用浓盐酸酸化,析出固体,抽滤,乙酸乙酯-正己烷重结晶得到 2-芳基-2H-1,2,4-3(4H)-三唑(3);

1mmol 中间体 3 和 5mL 三氯氧磷的混合物在搅拌回流 10h,薄层层析(TLC)检测反应完毕后,冷却,旋干溶剂,残余物于 40mL 乙酸乙酯溶解;将有机相用水、饱和 NaHCO₃ 溶液和饱和氯化钠溶液洗涤,无水 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩滤液得 5-氯-1-取代芳基-1H-1,2,4-三唑(4)粗品,不经纯化直接用于下一步合成中;

将 2mmol 5-氯-1-取代芳基-1H-1,2,4-三唑(4)加入到 2.1mmol 2-巯基乙酸乙酯和 2.1mmol 氢化钠(NaH)的 10mL 四氢呋喃(THF)溶液中;混合物在 0℃下搅拌 10min,然后加热回流,TLC 检测反应完全,旋蒸除去溶剂,加入 30mL 二氯甲烷稀释,连续用 30mL 水洗涤两次、饱和的碳酸氢钠和氯化钠溶液洗涤;有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩滤液得到三唑硫乙酰胺(5)粗品;

将 1.2mmol 三唑硫乙酰胺(5)溶解于 1mL 二甲基亚砜(DMSO)中,加入 2.0mmol 1N 的 NaOH 水溶液;室温搅拌 1h,再用 1N 的 HCl 酸化,加入 100mL 乙酸乙酯稀释,连续用水和饱和氯化钠溶液洗涤,无水 Na₂SO₄ 干燥,过滤,浓缩得 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酸(6)粗品,纯度足以进行下一步反应,不必纯化。

7. 权利要求 1-4 任一项所述的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物在制备抗 HIV 的药物中的应用。

8. 一种抗 HIV 药物组合物,包含权利要求 1-4 任一项所述化合物和一种或多种药学上可接受载体或赋形剂。

2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物 及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一类 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物及其药用盐,其水合物和溶剂化物,其多晶和共晶,其同样生物功能的前体药物和衍生物,其制备方法以及含有一个或多个此类化合物的组合物在治疗和预防人免疫缺陷病毒(HIV)感染药物中的应用。

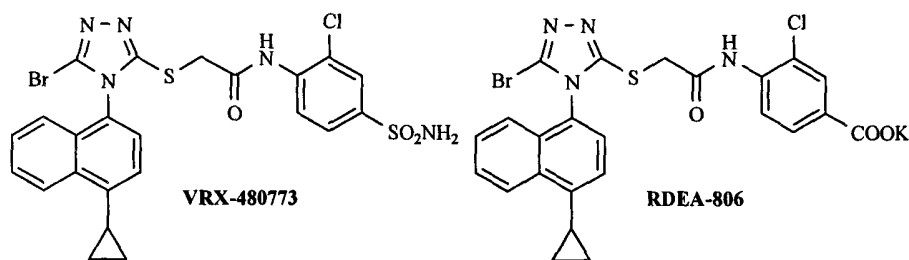
背景技术

[0002] 人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)是艾滋病(AIDS)的主要病原体。自 1981 年发现以来,艾滋病已成为危害人类生命健康的重大传染性疾病。虽然目前高效抗逆转录疗法(HAART)的实施是抗艾滋病治疗的一项重大突破,但是由于耐药性的出现及长期服药的毒性问题极大地限制了该疗法的应用,新型抗艾滋病药物的研发刻不容缓。逆转录酶在病毒整个生命周期中起着关键作用,靶向于 HIV-1RT 非底物结合位点的非核苷类抑制剂(NNRTIs)具有高效、低毒的优点,成为 HAART 疗法的重要组成部分。但是由于 NNRTIs 结合位点的氨基酸易发生突变,导致耐药毒株的蔓延,使该类药物迅速丧失临床效价。因此研发新型、高效抗耐药的 NNRTIs 是目前抗艾滋病药物研究的重要方向之一。参见《抗艾滋病药物研究》,刘新泳主编,人民卫生出版社,北京,2006,12。

[0003] 五元杂环化合物具有广泛的抗 HIV 活性,它们在 HIV 非核苷类逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、整合酶抑制剂、CCR5 抑制剂、gp41 抑制剂、Rev 抑制剂等的研究中发挥重要作用。它们广泛应用于新型抗 HIV 先导化合物的发现及结构优化,一是作为构成药效团的基本结构母核,以适合药物特殊作用靶点的空间要求,二是作为活性取代基或环系的组成部分而产生相应的生物活性。药物之所以依赖于杂环是因为杂环较脂肪或芳香化合物在体内更不易代谢分解,且具有更好的生物相容性。

[0004] 1,2,4-三唑硫乙酰胺类化合物是最近通过高通量筛选得到的一类新型、广谱高效的非核苷类 HIV-1 逆转录酶抑制剂,其中化合物 VRX-480773 和 RDEA-806 正处于临床研究(其中 RDEA-806 正处于 IIa 期临床试验),它在极低浓度下就能抑制对 EFV 及大多数 NNRTI 产生耐药的病毒株,而且表现出较高的生物利用度及优秀的药代动力学性质,进一步的临床研究正在进行中,有望成为新的抗艾滋病药物。(参见①Wang Z, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2006,16(16):4174-7. ②De La Rosa M, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2006,16(17):4444-9. ③Zhang Z, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2007, 51(2):429-37. ④Rossotti R, et al. HIV Ther. 2009,3(1),66-77.)

[0005]



[0006] 因此,以该类骨架化合物为模板,进行广泛的结构修饰,对发现广谱高效、生物利用度好且具有自主知识产权的新型抗 HIV 药物具有重大意义。

发明内容

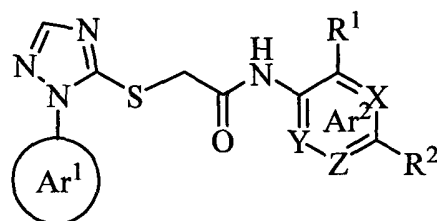
[0007] 本发明提供了 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物及其制备方法,本发明还提供了 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物的活性筛选结果及其应用。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 1. 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物

[0010] 本发明以 1,2,4-三唑硫乙酰胺类抗艾滋病临床候选药物为先导化合物,根据生物电子等排体药物设计原理,改变三唑环上氮原子的排布,由此设计合成了一系列全新结构骨架的具有通式 I 的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物,以及其 N-氧化物、立体异构体形式、立体异构体混合物或药学上可接受的盐,

[0011]



I

[0012] 其中,

[0013] 与 1,2,4-三唑直接相连芳基 Ar^1 为结构多样性的取代苯环或取代萘环,优选的, Ar^1 为 2,4-二氯苯环、2,4-二溴苯环、2-氯-4-环丙基苯环、2-溴-4-环丙基苯环、2-氯-4-叔丁基苯环、2-溴-4-叔丁基苯环、1-萘环、2-萘环、4-环丙基-1-萘环或 4-叔丁基-1-萘环;

[0014] 与酰胺相连的芳环 Ar^2 为取代苯环或取代六元含氮芳杂环;

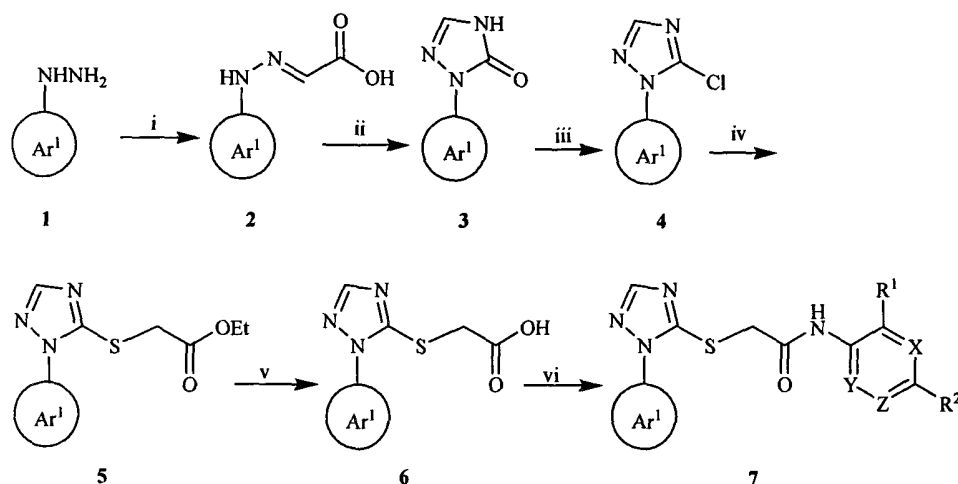
[0015] X、Y、Z 为碳原子或氮原子;

[0016] R^1 为 H、F、Cl、Br、I、 NO_2 或 Me;

[0017] R^2 为 H、F、Cl、Br、I、Me、 OCH_3 、 $COMe$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、 $COOH$ 或 SO_2NH_2 。

[0018] 2. 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物的合成路线如下:

[0019]



[0020] 其中,

[0021] 与 1,2,4-三唑直接相连芳基 Ar^1 为结构多样性的取代苯环或取代萘环, 优选的, Ar^1 为 2,4-二氯苯环、2,4-二溴苯环、2-氯-4-环丙基苯环、2-溴-4-环丙基苯环、2-氯-4-叔丁基苯环、2-溴-4-叔丁基苯环、1-萘环、2-萘环、4-环丙基-1-萘环或 4-叔丁基-1-萘环;

[0022] 与酰胺相连的芳环 Ar^2 为取代苯环或取代六元含氮芳杂环;

[0023] X、Y、Z 为碳原子或氮原子;

[0024] R^1 为 H、F、Cl、Br、I、 NO_2 或 Me;

[0025] R^2 为 H、F、Cl、Br、I、Me、 OCH_3 、 $COMe$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、 $COOH$ 或 SO_2NH_2 。

[0026] 试剂及条件:(i) $HCOC_2H_4OH$, H_2O ; (ii) DPPA, TEA, Tol; (iii) $POCl_3$; (iv) NaH, $HSCH_2COOEt$, THF; (v) NaOH, $H_2O/DMSO$, HCl; (vi) PCl_5 , 芳胺, THF, 室温。

[0027] 3. 中间体 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酸(6)的制备方法

[0028] 在搅拌下,向取代芳基肼 1(27.7mmol)的水(15mL)溶液中,加入 2-乙醛酸(4.5g, 30.5mmol, 50%)和水(5mL)的混合溶液,再加入 3mL 浓盐酸;将生成的沉淀过滤,干燥,得 2-(2-芳基肼叉)乙酸 2;

[0029] 在中间体 2(12.9mmol)的无水甲苯(80mL)悬浊液中,搅拌下加入 1.8mL 三乙胺(1.3g, 12.9mmol)和 2.8mL 二苯基磷酰叠氮(3.6g, 12.9mmol);混合物缓慢的加热到回流,到 60℃时开始有气体生成,持续 1h 左右;将反应完毕后澄清的橙色溶液冷却,倾入 100mL 10%的氢氧化钾溶液中;碱液中的提取物用浓盐酸酸化,析出固体,抽滤,乙酸乙酯-正己烷重结晶得到 2-芳基-2H-1,2,4-3(4H)-三唑 3;

[0030] 中间体 3(1mmol)和三氯氧磷(5mL)的混合物在搅拌回流 10h,薄层层析(TLC)检测反应完毕后,冷却,旋干溶剂,残余物于 40mL 乙酸乙酯溶解。将有机相用水、饱和 $NaHCO_3$ 溶液和饱和氯化钠溶液洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩滤液得 5-氯-1-取代芳基-1H-1,2,4-三唑 4 粗品,不经纯化直接用于下一步合成中;

[0031] 将 5-氯-1-取代芳基-1H-1,2,4-三唑 4(2mmol)加入到 2-巯基乙酸乙酯(0.23mL, 2.1mmol)和氢化钠(NaH)(0.084g, 2.1mmol)的四氢呋喃(THF)(10mL)溶液中。混合物在 0℃下搅拌 10min,然后加热回流,TLC 检测反应完全,旋蒸除去溶剂,加入 30mL 二氯甲烷稀释,连续用水(2×30mL)、饱和的碳酸氢钠和氯化钠溶液洗涤。有机层用无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩滤液得到三唑硫乙酰胺 5 粗品。

[0032] 将三唑硫乙酰胺 5 (1.2 mmol) 溶解于 1 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中, 加入 1 N 的 NaOH 水溶液 (2.0 mL, 2.0 mmol)。室温搅拌 1 h, 再用 1 N 的 HCl 酸化, 加入 100 mL 乙酸乙酯稀释, 连续用水和饱和氯化钠溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩得 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酸 6 粗品, 纯度足以进行下一步反应, 不必纯化。

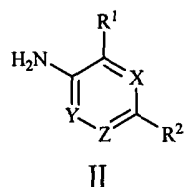
[0033] 4. 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酰胺衍生物 (7) 的制备方法

[0034] 利用上述中间体 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酸 6, 通过与各种取代芳胺的酰化反应, 然后经柱层析分离纯化得到 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酰胺衍生物, 具体步骤如下:

[0035] 冰浴搅拌下将五氯化磷 (PCl_5) (0.23 g, 1.1 mmol) 加入到 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酸 6 (1 mmol) 的乙醚 (15 mL) 溶液中。室温下搅拌 2 h, 减压浓缩后, 溶解到 15 mL 四氢呋喃 (THF) 中, 依次加入 1 mmol 芳胺和 1.2 mmol 三乙胺。混合物在室温下继续搅拌, TLC 检测反应完全, 旋干, 得到的粗产品, 用乙酸乙酯: 石油醚 (1:4) 快速柱层析得到目标化合物 7。

[0036] 上述的各种取代芳胺的结构通式 II 为:

[0037]



[0038] 其中, X、Y、Z 为碳原子或氮原子; R^1 为 H、F、Cl、Br、I、 NO_2 或 Me; R^2 为 H、F、Cl、Br、I、Me、 OCH_3 、 COMe 、 COOMe 、 COOEt 、 COOH 或 SO_2NH_2 。

[0039] 5. 目标化合物的抗 HIV-1 (III_B) 及耐药毒株活性和毒性实验

[0040] 对按照上述方法合成的 15 个化合物进行了抗 HIV-1 (III_B) 活性筛选, 它们的抗 HIV-1 活性和毒性数据列于表 1 中, 并以奈韦拉平 (NVP) 和 AZT 为对照。由表 1 可以看出新型三唑硫乙酰胺类化合物呈现出显著的抗野生型 HIV 活性, 其中有 6 个化合物抑制 HIV-1 复制的 EC_{50} 值在微摩尔水平, 这几个化合物依次是 I-7a ($\text{EC}_{50} = 6.21 \pm 0.87 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 5$)、I-7c ($\text{EC}_{50} = 4.85 \pm 0.83 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 20$)、I-7e ($\text{EC}_{50} = 4.99 \pm 0.92 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 20$)、I-7g ($\text{EC}_{50} = 2.78 \pm 0.97 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 67$)、I-7l ($\text{EC}_{50} = 4.13 \pm 0.41 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 14$) 和 I-7m ($\text{EC}_{50} = 4.68 \pm 0.72 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 7$)。此外化合物 I-7d 和 I-7h 也表现出一定程度的抗 HIV 活性。

[0041] 同时对部分新型三唑硫乙酰胺类化合物进行了多种抗耐药株活性筛选, 结果发现, 上述对野生型 HIV 的 EC_{50} 处在微摩尔级的 6 个化合物也对 E138K、K103N 及 L100I 耐药株具有显著的抑制活性, EC_{50} 大约为 7-28 μM 之间 (如表 2 所示)。而对 F227L+V106A、RES056、Y181C 及 Y188L 耐药株无活性。

[0042] 由于该类化合物仅对 HIV-1 呈现出抑制活性, 而对 HIV-2 无活性, 可认为是经典的非核苷类抑制剂。

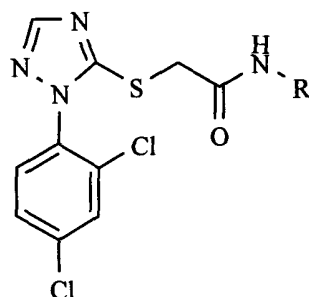
[0043] 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酰胺衍生物是一系列结构新颖的非核苷类 HIV-1 抑制剂, 具有进一步的研发价值, 可作为抗 HIV 的先导化合物加以利用。

[0044] 本发明的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酰胺衍生物可作为 HIV-1 非核苷类抑制剂应用。具体地说, 作为 HIV-1 抑制剂用于制备抗艾滋病药物。

[0045] 一种抗 HIV-1 药物组合物, 包括本发明的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基) 乙酰胺衍生物。

[0046] 表 1 化合物 I-7a ~ I-7o 的结构及抗 HIV-1 (III_B) 的活性和毒性 (MT-4 细胞)

[0047]



[0048]

No.	R	EC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	SI ^c
I-7a	2-氯苯基	6.21±0.87	29.13±3.36	5
I-7b	2-氟苯基	>38.39	38.36±6.72	<1
I-7c	2-溴苯基	4.85±0.83	95.12±54.87	20
I-7d	2,4-二氯苯基	34.36±13.57	171.88±9.93	5
I-7e	2-氯吡啶-3-基	4.99±0.92	98.46±13.96	20
I-7f	4-甲基-2-硝基苯基	>285.20	>285.20	X1
I-7g	2-硝基苯基	2.78±0.97	186.91±9.62	67
I-7h	邻甲苯基	32.42±1.25	106.41±8.90	3
I-7i	4-乙酰基-2-溴苯基	>114.21	114.21±4.86	<1
I-7j	2-溴-4-甲基苯基	>184.25	>184.25	X1
I-7k	2-溴-4-氯苯基	>188.90	188.90±2.78	<1
I-7l	2-溴-4-甲氧羰基苯基	4.13±0.41	59.34±28.60	14
I-7m	2-溴-4-乙氧羰基苯基	4.68±0.72	33.06±2.58	7
I-7n	4-甲氧羰基苯基	>26.27	26.27±8.74	<1
I-7o	4-乙氧羰基苯基	>22.82	22.82±4.36	<1
NVP		0.1877±0.0375	>15.02	>80
AZT		0.00	>93.5488	>11587

[0049] 注:^aEC₅₀:保护 50%感染 HIV-1 的 MT-4 细胞免于细胞病变的化合物浓度;^bCC₅₀:使 50%未感染 HIV-1 的细胞发生病变的化合物浓度;^c选择性系数:CC₅₀/EC₅₀ 的比值;^dNA:无活性。

[0050] 表 2 部分化合物对耐药株的抑制活性

[0051]

No.	CC ₅₀ (μ M) ^b	E138K		K103N		L100I	
		EC ₅₀ (μ M) ^a	SI ^c	EC ₅₀ (μ M) ^a	SI	EC ₅₀ (μ M) ^a	SI
I-7a	32.75±6.36	20.86±0.87	2	16.05±0.56	2	21.42±1.31	2
I-7c	85.52±52.14	28.22±15.65	3	8.36±0.33	10	25.69±20.17	3
I-7e	84.45±25.08	6.79±0.31	5	10.49±0.41	8	15.38±3.11	5
I-7g	176.17±25.43	9.45±4.57	19	7.42±2.76	24	8.51±2.85	21
I-7l	54.28±27.22	NA ^d		7.73±1.67	7	6.95±1.86	8
I-7m	38.66±9.35	NA		9.54±0.91	4	10.75±1.72	4

[0052] 注：^aEC₅₀：保护 50% 感染 HIV-1（耐药株）的 MT-4 细胞免于细胞病变的化合物浓度；^bCC₅₀：使 50% 未感染 HIV-1 的细胞发生病变的化合物浓度；^c选择性系数：CC₅₀/EC₅₀ 的比值；^dNA：无活性。

[0053] 本发明提供了全新结构的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物、其制备方法、抗 HIV 活性筛选结果及其作为抗 HIV 抑制剂的首次应用。通过实验证明本发明的 2-(2-取代芳基-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺衍生物可作为 HIV-1 非核苷类抑制剂应用。具体地说，作为 HIV-1 抑制剂用于制备抗艾滋病药物。

具体实施方式

[0054] 通过下述实例有助于理解本发明，但是不能限制本发明的内容，在下列实例中，所有目标化合物的编号与表 1 相同。

[0055] 实施例 1. 中间体 2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酸 I-6 的制备

[0056] 在搅拌下，向 2,4-二氯苯肼 I-1 (4.9g, 27.7mmol) 的水 (15mL) 溶液中，加入 2-乙醛酸 (4.5g, 30.5mmol, 50%) 和水 (5mL) 的混合溶液，再加入 3mL 浓盐酸。将生成的沉淀过滤，干燥，得到 4.8g 2-(2-(2,4-二氯苯基)肼叉)乙酸 I-2 为黄色固体，产率：75%。mp：158℃。¹H-NMR(DMSO-d₆, ppm) δ ：6.91-7.05(m, 3H, Ph), 7.55(s, 1H, N=CH), 10.5(s, 1H, CO₂H), 11.9(bs, 1H, NH). ESI-MS :m/z 233.1 (M+1).

[0057] 在 2-(2-(2,4-二氯苯基)肼叉)乙酸 I-2 (3.0g, 12.9mmol) 的无水甲苯 (80mL) 悬浊液中，边搅拌边加入 1.8mL 三乙胺 (1.3g, 12.9mmol) 和 2.8mL 二苯基磷酰叠氮 (3.6g, 12.9mmol)。混合物缓慢的加热到回流，到 60℃ 时开始有气体生成，持续 1h 左右。将反应完毕后澄清的橙色溶液冷却，倾入 100mL 10% 的氢氧化钾溶液中。碱液中的提取物用浓盐酸酸化，析出固体，在乙酸乙酯和庚烷中重结晶得到 2.55g 2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-3(4H)-三唑 I-3，为褐色固体，产率：86%。mp：189-190℃。¹H-NMR(DMSO-d₆, ppm) δ ：12.1(s, 1H, NH), 8.11(s, 1H, 三唑-H), 7.65(d, 1H, J = 2.4Hz, PhH), 7.47(dd, 1H, J₁ = 2.4Hz, J₂ = 8.4Hz, PhH), 7.39(d, 1H, J = 8.4Hz, PhH). ¹³C-NMR(DMSO-d₆, ppm) δ ：153.35, 137.76, 134.68, 133.96, 132.81, 131.62, 130.46, 128.89. ESI-MS :m/z 230.4 (M+1), 232.3 (M+3).

[0058] 2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-3(4H)-三唑 I-3 (0.23g, 1mmol) 和三氯氧磷 (5mL) 的混合物在搅拌回流 10h, TLC 检测反应完毕后，冷却，旋干溶剂，残余物于 40mL 乙酸乙酯溶

解。将有机相用水、饱和 NaHCO_3 溶液和饱和氯化钠溶液洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩滤液得到淡黄色固体,为 5-氯-1-(2,4-二氯苯基)-1H-1,2,4-三唑 I-4 粗品,直接用于下一步合成中。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , ppm) δ : 8.38 (s, 1H, 三唑-H), 8.04 (d, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.84 (dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.73 (d, 1H, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH)。

[0059] 将 5-氯-1-(2,4-二氯苯基)-1H-1,2,4-三唑 I-4 (0.5g, 2mmol) 加入到 2-巯基乙酸乙酯 (0.23mL, 2.1mmol) 和 NaH (0.084g, 2.1mmol) 的 THF (10mL) 溶液中。混合物在 0°C 下搅拌 10min, 然后加热回流 8h。反应完毕, 旋蒸除去溶剂, 加入 30mL 二氯甲烷稀释, 连续用水 ($2 \times 30\text{mL}$)、饱和的碳酸氢钠和氯化钠溶液洗涤。有机层用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩滤液得到 I-5 粗品黄色油状物。ESI-MS: m/z 232.3 (M+1), 234.4 (M+3). $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (Exact Mass: 330.99)。

[0060] 将 I-5 (0.4g, 1.2mmol) 于 1mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中溶解, 加入 1N 的 NaOH 水溶液 (2.0mL, 2.0mmol)。室温搅拌 1h, 再用 1N 的 HCl 酸化, 加入 100mL 乙酸乙酯稀释, 连续用水和饱和氯化钠溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩得到黄色油状物, 即 2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酸 I-6 粗品 0.35g, 产率 97%。

[0061] 实施例 2. N-(2-氯苯基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7a 的制备

[0062] 将 PCl_5 (0.23g, 1.1mmol) 加入到冰浴中的 I-6 (0.30g, 1mmol) 的乙醚 (15mL) 溶液中。室温下搅拌 2h, 减压浓缩后, 溶解到 15mL THF 中, 依次加入 1mmol 2-氯苯胺和 1.2mmol 三乙胺。混合物在室温下继续搅拌, TLC 检测反应完全, 旋干, 得到的产物乙酸乙酯: 石油醚 (1:4) 快速柱层析得到目标化合物 I-7a。白色针晶, 产率: 45.7%。熔点: $118-121^\circ\text{C}$ 。

[0063] 产物光谱分析数据:

[0064] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , ppm) δ : 9.76 (s, 1H, NH), 8.33 (d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 8.08 (s, 1H, 三唑-H), 7.60 (d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.43-7.26 (m, 4H, PhH), 7.05 (dt, 1H, PhH), 4.03 (s, 2H, S- CH_2)。ESI-MS: m/z 413.5 (M+1), 415.4 (M+3), 417.5 (M+5), 435.4 (M+Na). $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{OS}$ (411.97)。

[0065] 实施例 3. 2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)-N-(2-氟苯基)乙酰胺 I-7b 的制备

[0066] 操作同上, 所不同的是使用 2-氟苯胺。白色粉末, 产率: 50.4%。mp: $108-110^\circ\text{C}$ 。

[0067] 产物光谱分析数据:

[0068] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , ppm) δ : 10.17 (s, 1H, NH), 8.34-8.31 (m, 1H, PhH), 8.11 (s, 1H, 三唑-H), 7.61 (d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.41 (dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.37 (d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.14-7.05 (m, 3H, PhH), 3.96 (s, 2H, S- CH_2)。ESI-MS: m/z 397.1 (M+1), 399.0 (M+3). $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{OS}$ (396)。

[0069] 实施例 4. N-(2-溴苯基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7c 的制备

[0070] 操作同上, 所不同的是使用 2-溴苯胺。白色方晶, 产率: 35.2%。mp: $115-116^\circ\text{C}$ 。

[0071] 产物光谱分析数据:

[0072] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , ppm) δ : 9.55 (s, 1H, NH), 8.26 (d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 8.08 (s, 1H, 三唑-H), 7.60 (d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.60 (dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.54 (dd,

1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.42(dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.37(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.05(dt, 1H, PhH), 4.04(s, 2H, S-CH₂).

[0073] ESI-MS :m/z 457.0 (M+1), 459.0 (M+3). C₁₆H₁₁BrCl₂N₄OS(455.92).

[0074] 实施例 5. N-(2,4-二氯苯基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7d 的制备

[0075] 操作同上,所不同的是使用 2,4-二氯苯胺。白色针晶,产率:44.7%。mp: 115-118℃.

[0076] 产物光谱分析数据:

[0077] ¹H NMR(CDCl₃, ppm) δ :9.90(s, 1H, NH), 8.26(d, 1H, $J = 9.6\text{Hz}$, PhH), 8.07(s, 1H, 三唑-H), 7.43-7.37(m, 4H, PhH), 7.25(dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 4.04(s, 2H, S-CH₂). ESI-MS :m/z 447.1 (M+1), 449.1 (M+3). C₁₆H₁₀Cl₄N₄OS(445.93).

[0078] 实施例 6. N-(2-氯吡啶-3-基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7e 的制备

[0079] 操作同上,所不同的是使用 2-氯吡啶-3-胺。白色针晶,产率:65.4%。mp: 143-145℃.

[0080] 产物光谱分析数据:

[0081] ¹H NMR(DMSO, ppm) δ :10.15(s, 1H, NH), 8.68(d, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, 吡啶-H), 8.28(d, 1H, $J_1 = 1.8\text{Hz}$, PhH), 8.20(dd, 1H, $J = 1.2\text{Hz}$, $J = 4.8\text{Hz}$, 吡啶-H), 8.01(s, 1H, 三唑-H), 7.61(dd, 1H, $J_1 = 1.8\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.40(d, 1H, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.33-7.29(m, 1H, 吡啶-H), 4.28(s, 2H, S-CH₂).

[0082] ESI-MS :m/z 414.1 (M+1), 416.1 (M+3), 418.3 (M+3), 436.3 (M+Na⁺), 438.2 (M+2+Na⁺). C₁₅H₁₀Cl₃N₅OS(412.97).

[0083] 实施例 7. 2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)-N-(4-甲基-2-硝基苯基)乙酰胺 I-7f 的制备

[0084] 操作同上,所不同的是使用 4-甲基-2-硝基苯胺。浅黄色粉末,产率:37.4%。mp: 185-186℃.

[0085] 产物光谱分析数据:

[0086] ¹H-NMR(CDCl₃, ppm) δ :11.07(s, 1H, NH), 8.55(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 8.01(s, 1H, 三唑-H), 7.97(s, 1H, PhH), 7.61(d, 1H, $J = 1.8\text{Hz}$, PhH), 7.46-7.42(m, 3H, PhH), 4.11(s, 2H, S-CH₂), 2.40(s, 3H, CH₃).

[0087] MS(ESI) :m/z 438.2 (M+1), 540.1 (M+3). C₁₇H₁₃Cl₂N₅O₃S(437.01).

[0088] 实施例 8. 2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)-N-(2-硝基苯基)乙酰胺 I-7g 的制备

[0089] 操作同上,所不同的是使用 2-硝基苯胺。黄色针晶,产率:53.8%。mp: 153-154℃.

[0090] 产物光谱分析数据:

[0091] ¹H-NMR(CDCl₃, ppm) δ :11.19(s, 1H, NH), 8.68(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 8.18(dd, 1H, $J = 1.8\text{Hz}$, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 8.06(s, 1H, 三唑-H), 7.65(t, 1H, PhH), 7.61(d, 1H, $J_1 = 1.8\text{Hz}$, PhH), 7.46-7.42(m, 2H, PhH), 7.22(m, 1H, PhH), 4.13(s, 2H, S-CH₂).

[0092] MS(ESI) :m/z 424. 1 (M+1), 426. 3 (M+3). $C_{16}H_{11}Cl_2N_5O_3S$ (423).

[0093] 实施例 9. 2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)-N-邻甲苯基乙酰胺 I-7h 的制备

[0094] 操作同上,所不同的是使用邻甲苯胺。白色片晶,产率:50.7%。mp:121-122℃。

[0095] 产物光谱分析数据:

[0096] 1H -NMR($CDCl_3$, ppm) δ : 9.42 (brs, 1H, NH), 8.06 (s, 1H, 三唑-H), 7.91 (d, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, PhH), 7.61 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, Ph' H), 7.43 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, PhH), 7.37 (d, 1H, $J_2 = 2.4$ Hz, PhH), 7.22 (t, 1H, Ph' H), 7.18 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, Ph' H), 7.08 (t, 1H, Ph' H), 3.96 (s, 2H, S- CH_2), 2.27 (s, 3H, CH_3).

[0097] MS(ESI) :m/z 393. 1 (M+1), 395. 1 (M+3). $C_{17}H_{14}Cl_2N_4OS$ (392. 03).

[0098] 实施例 10. N-(4-乙酰基-2-溴苯基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7i 的制备

[0099] 操作同上,所不同的是使用 4-乙酰基-2-溴苯胺。白色针晶,产率:55.4%。mp:131-133℃。

[0100] 产物光谱分析数据:

[0101] 1H -NMR($CDCl_3$, ppm) δ : 9.27 (s, 1H, NH), 8.36 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ph' H), 8.24 (s, 1H, Ph' H), 8.09 (s, 1H, 三唑-H), 7.98 (d, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz, PhH), 7.91 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ph' H), 7.64 (dd, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, PhH), 7.45 (d, 1H, $J_2 = 8.4$ Hz, PhH), 3.85 (s, 2H, S- CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3).

[0102] MS(ESI) :m/z 199. 1 (M+1), 202. 1 (M+3), 204. 1 (M+5). $C_{18}H_{13}BrCl_2N_4O_2S$ (497. 93)。

[0103] 实施例 11. N-(2-溴-4-甲基苯基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7j 的制备

[0104] 操作同上,所不同的是使用 2-溴-4-甲基苯胺。白色固体,产率:48.6%。mp:125-126℃。

[0105] 产物光谱分析数据:

[0106] 1H -NMR($CDCl_3$, ppm) δ : 9.55 (s, 1H, NH), 8.17 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ph' H), 8.04 (s, 1H, 三唑-H), 7.88 (d, 1H, $J_1 = 1.8$ Hz, PhH), 7.59 (dd, 1H, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, PhH), 7.43 (s, 1H, Ph' H), 7.38 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, PhH), 7.20 (s, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ph' H), 3.57 (s, 2H, S- CH_2), 2.39 (s, 3H, CH_3).

[0107] MS(ESI) :m/z 471. 2 (M+1), 473. 2 (M+3). $C_{17}H_{13}BrCl_2N_4OS$ (469. 94)。

[0108] 实施例 12. N-(2-溴-4-氯苯基)-2-(2-(2,4-二氯苯基)-2H-1,2,4-三唑-3-巯基)乙酰胺 I-7k 的制备

[0109] 操作同上,所不同的是使用 2-溴-4-氯苯胺。白色固体,产率:49.8%。mp:163-165℃。产物光谱分析数据:

[0110] 1H -NMR($CDCl_3$, ppm) δ : 9.67 (s, 1H, NH), 8.24 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ph' H), 8.08 (s, 1H, 三唑-H), 7.61 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, PhH), 7.54 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, Ph' H), 7.42 (dd, 1H, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, Ph' H), 7.38 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, PhH), 7.28 (dd, 1H, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, PhH), 4.02 (s, 2H, S- CH_2).

[0111] MS(ESI) :m/z 491. 1 (M+1), 493. 1 (M+3), 495. 0 (M+5). $C_{16}H_{10}BrCl_3N_4OS$ (489. 88).

[0112] 实施例 13. 3- 溴 -4-(2-(2-(2,4- 二氯苯基)-2H-1,2,4- 三唑 -3- 巯基) 乙酰氨基) 苯甲酸甲酯 I-7l 的制备

[0113] 操作同上, 所不同的是使用 2- 溴 -4- 甲氧羰基苯胺。白色针状晶体, 产率: 59.3% . mp :164-166°C .

[0114] 产物光谱分析数据: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$:9.84(s, 1H, NH), 8.24(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 8.23(d, 1H, $J = 1.8\text{Hz}$, Ph' H), 8.09(s, 1H, 三唑 -H), 7.97(dd, 1H, $J_1 = 1.8\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 7.61(d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.41(dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.38(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 4.05(s, 2H, S-CH₂), 3.91(s, 3H, OCH₃).

[0115] MS(ESI) :m/z 515.3 (M+1), 517.4 (M+3), 537.0 (M+Na⁺). C₁₈H₁₃BrCl₂N₄O₃S(513.93).

[0116] 实施例 14. 3- 溴 -4-(2-(2-(2,4- 二氯苯基)-2H-1,2,4- 三唑 -3- 巯基) 乙酰胺基) 苯甲酸乙酯 I-7m 的制备

[0117] 操作同上, 所不同的是使用 2- 溴 -4- 乙氧羰基苯胺。白色针晶, 产率: 67.1% . mp : 103-105°C .

[0118] 产物光谱分析数据:

[0119] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$:9.82(s, 1H, NH), 8.45(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 8.23(d, 1H, $J = 1.8\text{Hz}$, Ph' H), 8.09(s, 1H, 三唑 -H), 7.99(dd, 1H, $J_1 = 1.8\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 7.61(d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.42(dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.38(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 4.36(s, 2H, OCH₂), 4.05(s, 2H, S-CH₂), 1.39(s, 3H, CH₃).

[0120] MS(ESI) :m/z 529.2 (M+1), 531.1 (M+3), 533.2 (M+5), 551.2 (M+Na⁺), 551.2 (M+2+Na⁺). C₁₉H₁₅BrCl₂N₄O₃S(527.94).

[0121] 实施例 15. 4-(2-(2-(2,4- 二氯苯基)-2H-1,2,4- 三唑 -3- 巯基) 乙酰胺基) 苯甲酸甲酯 I-7n 的制备

[0122] 操作同上, 所不同的是使用 4- 甲氧羰基苯胺。白色针晶, 产率: 68.2% . mp : 153-154°C .

[0123] 产物光谱分析数据:

[0124] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$:10.43(s, 1H, NH), 8.16(s, 1H, 三唑 -H), 8.01(d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 7.64(d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 7.61(d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.43(dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.37(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 3.90(s, 2H, S-CH₂), 3.88(s, 3H, OCH₃).

[0125] MS(ESI) :m/z 437.3 (M+1), 439.3 (M+3), 441.4 (M+5), 559.3 (M+Na⁺), 461.3 (M+2+Na⁺). C₁₈H₁₄Cl₂N₄O₃S(436.02).

[0126] 实施例 16. 4-(2-(2-(2,4- 二氯苯基)-2H-1,2,4- 三唑 -3- 巯基) 乙酰胺基) 苯甲酸乙酯 I-7o 的制备

[0127] 操作同上, 所不同的是使用 4- 乙氧羰基苯胺。白色针晶, 产率: 71.4% . mp : 147-149°C .

[0128] 产物光谱分析数据:

[0129] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$:10.43(s, 1H, NH), 8.16(s, 1H, 三唑 -H), 8.01(d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 7.63(d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, Ph' H), 7.61(d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, PhH), 7.42(dd, 1H, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, PhH), 7.37(d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, PhH), 4.35(s, 2H, OCH₂), 4.04(s, 2H,

S-CH₂), 1.41 (s, 3H, CH₃).

[0130] MS (ESI) :m/z 451.2 (M+1), 453.2 (M+3), 455.1 (M+5), 473.3 (M+Na⁺), 475.3 (M+2+Na⁺). C₁₉H₁₆Cl₂N₄O₃S (450.03).

[0131] 实施例 17. 目标化合物的体外抗 HIV 活性测试

[0132] (参见① Pauwels R, et al. J. Virol. Methods. 1988, 20, 309. ② Pannecouque C, et al. Nat Protocols 2008, 3, 427.)

[0133] 术语解释:

[0134] MT-4 细胞:人急性淋巴母细胞白血病细胞。

[0135] MTT 分析法:MTT 即为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,商品名:噻唑蓝。

[0136] Nevirapine (NVP):抗艾滋病上市药物奈韦拉平。

[0137] AZT. 抗艾滋病上市药物齐多夫定。

[0138] DMSO:二甲基亚砷。

[0139] 测试原理

[0140] 由于 HIV 感染的 MT-4 细胞在一定时间内(5-7 天)会发生病变,因此向 HIV 感染的 MT-4 细胞悬浊液中加入适当浓度的待检测化合物溶液,经过一段时间(5-7 天)的培养后,用 MTT 分析法测定 MT-4 细胞活力,得到保护 50%细胞免于细胞病变的药物浓度(EC₅₀)即可得出目标化合物的抗 HIV 的活性。同时得到目标化合物使 50%未感染 HIV 的细胞发生病变的浓度(CC₅₀),计算出选择系数(selectivity index, SI = CC₅₀/EC₅₀)。

[0141] MTT 分析法原理:MTT 即溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四唑氮,可与活的细胞内琥珀酸脱氢酶相结合,而不与死亡细胞发生反应。目前 MTT 法是一种快速、简洁反映细胞活力的酶分析方法。

[0142] 测试材料和方法

[0143] (1)HIV-1(IIIB)、HIV-2(ROD)毒株、各种 HIV-1 耐药株:由比利时 Leuven 大学 Rega 研究院微生物与免疫学研究所提供。

[0144] (2)MT-4 细胞:由比利时 Leuven 大学 Rega 研究院微生物与免疫学研究所提供。

[0145] (3)MTT:购自美国 Sigma 公司。

[0146] (4)样品处理:样品临用前溶于 DMSO 配成适当浓度,并用双蒸水作 5 倍稀释,各 5 个稀释度。

[0147] (5)阳性对照药:Nevirapine(NVP)、AZT。

[0148] (6)测试方法:样品稀释后加入到 HIV 感染 MT-4 细胞悬浊液中,经过一段时间后用 MTT 比色法测定细胞活力,于酶标仪中,在 590nm 下记录吸光度(A)值,计算出 EC₅₀, CC₅₀ 以及 SI。

[0149] (7)MTT 染色法:加入样品培养一段时间后,再向每孔加入 MTT 溶液(5mg/ML)20 μL,继续培养若干小时,弃染色液,并向每孔加入 150 μL DMSO,充分混合,于酶标仪中,在 590nm 下记录吸光度。

[0150] 具体操作如下:将化合物用 DMSO 或水溶解后用磷酸盐缓冲液稀释,将 3×10⁵MT-4 细胞与 100 μL 不同浓度的化合物溶液在 37℃共同预孵育 1h。然后向该混合物中加入 100 μL 适当浓度的病毒稀释液,将细胞于 37℃孵育 1h。洗涤三次后,将细胞再次分别悬浮

于含有或不含化合物的培养基质中。接着将细胞在 5% CO₂ 环境中, 于 37℃ 下再孵育 7 天, 并于感染后的第三天用含有或不含化合物的培养基质补充原培养液。每种培养条件都重复操作两次。对病毒的细胞病变作用每天都用反向光学显微镜监控。一般来讲, 本实验中所用的病毒稀释液常常会在病毒感染后第五天发生细胞病变。药物抑制浓度以药物对病毒致细胞病变作用产生 50% 抑制作用而同时对细胞无直接毒性的浓度 (EC₅₀) 表示。值得强调的是, 当化合物水溶性较差, 需要用 DMSO 才能溶解时, DMSO 体积比浓度相对于水来讲, 一般会低于 10% (DMSO 在 MT-4 细胞培养介质中最终浓度小于 2%)。因为 DMSO 能影响测试化合物抗病毒活性, 对含有相同浓度 DMSO 溶液的抗病毒活性对比空白实验也应该平行操作进行。另外, DMSO 最终浓度 (1/1000) 远远低于影响 HIV-1 在 T- 细胞中复制所需浓度。

[0151] 目标化合物的体外抗 HIV-1 (IIIB)、HIV-2 (ROD) 及多种耐药株活性筛选数据由比利时 Leuven 大学 Rega 研究院微生物与免疫学研究所提供, 所有的活性数据都经过至少两次独立、平行的实验测得。