

2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮类 HIV-1 转录抑制剂的 设计、合成及活性研究

汤雁波^{1†}, 张传明^{1,2†}, 方成¹, 胡春², HUANG Li³, CHEN Chin-ho³, 肖志艳^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016;
3. Duke University Medical Center, Durham, NC 27710-2926, USA)

摘要: 转录反式激活因子 (*trans*-activator of transcription, Tat) 在 HIV-1 的转录中起着重要的调控作用, 针对 HIV-1 Tat 中的 β -转角结构, 采用 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮作为 β -转角肽链骨架的模拟结构, 分别以对硝基氯苯/苯乙腈、对甲基苯胺/苯甲酰氯以及硝西洋为起始原料, 采用不同合成路线得到了 19 个 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮类化合物 (10~18, 21~24, 26~31)。初步活性评价表明, 化合物 30 在没有明显细胞毒作用的浓度下对 Tat 介导的荧光素酶的表达显示了较好的抑制作用, 其半数有效浓度 EC₅₀ 为 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: HIV-1 转录反式激活因子; β -转角的模拟结构; 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0688-07

Design, synthesis and evaluation of novel 2H-1, 4-benzodiazepine-2-ones as inhibitors of HIV-1 transcription

TANG Yan-bo^{1†}, ZHANG Chuan-ming^{1,2†}, FANG Cheng¹, HU Chun², HUANG Li³,
CHEN Chin-ho³, XIAO Zhi-yan^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
3. Duke University Medical Center, Durham, NC 27710-2926, USA)

Abstract: HIV-1 *trans*-activator of transcription (Tat) plays a critical role in HIV-1 transcription. Based on the β -turn motif present in HIV-1 Tat, a series of novel benzodiazepine analogs were designed as β -turn mimetics and prepared from *p*-chloro-nitrobenzene/2-phenylacetonitrile, *p*-toluidine/benzoyl chloride, or (*Z*)-7-nitro-5-phenyl-1*H*-benzo[e][1, 4]diazepin-2(3*H*)-one (nitrazepam) through different synthetic routes. Preliminary biological evaluation indicated that compound 30 exhibited inhibitory activity on HIV-1 tat-mediated LTR transcription with EC₅₀ of 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and showed no obvious cytotoxic effects on TZM-B1 cells under the concentration of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: HIV-1 Tat; β -turn mimetics; 2H-1, 4-benzodiazepine-2-ones

人免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus, HIV-1) 是引起人类获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, 艾滋病)

的病原体。迄今, 美国 FDA 已批准上市 20 余种抗 HIV-1 感染的化学药物。这些药物的临床应用以及高效抗逆转录病毒疗法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 的推广在一定程度上改善了 HIV-1 感染的预后, 降低了致病、致死率。然而, 由于药物毒副作用、耐药问题的存在, 寻找高效、低毒, 作用机制新颖的抗 HIV-1 药物具有重要意义。

收稿日期: 2011-04-11.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7082061).

[†]同等贡献

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63189228, E-mail: xiaoz@imm.ac.cn

近年来, HIV-1 的转录过程, 即由前病毒 DNA 转录生成 HIV-1 mRNA 的过程, 成为抗 HIV-1 药物研究的新热点^[1]。转录反式激活因子 (*trans*-activator of transcription, Tat) 是 HIV-1 转录过程中的重要调控蛋白。Tat 可与转录产物 TAR (transactivation-responsive RNA) 以及蛋白因子复合物 P-TEFb (positive transcription elongation factor b) 结合, 促进 HIV-1 mRNA 的有效、完整转录。由于 Tat 蛋白结构相对保守, 并且可以通过跨膜转导作用调控潜伏期病毒的激活, 作用于 Tat 介导的转录反式激活过程的抗 HIV-1 药物可能具有不易产生耐药性以及对于潜伏期病毒亦有效的优势, 因此逐渐受到研究者的关注^[2, 3]。罗氏公司开发的 Ro 24-7429 (图 1A) 是首个进入临床研究阶段的 HIV-1 转录抑制剂^[3]。

Tat 蛋白的核心区 (aa 38~48) 结构较为保守, 是 Tat 蛋白进行分子识别的重要功能区。基于该区域氨基酸序列设计得到的活性短肽能够特异性地抑制 Tat 反式激活作用^[4, 5]。研究表明, 不同 HIV-1 株的 Tat 蛋白在核心区附近都存在类似 β -转角保守二级

结构^[6, 7]。由于特定的二级结构常常是活性肽进行分子识别的重要结构单元, 因此, 采用模拟肽的分子设计策略, 以已知 Tat 抑制剂 Ro 24-7429 的结构为切入点, 选择苯并二氮草优势结构作为 β -转角的小分子模拟骨架, 设计、合成了一系列新型 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮类化合物 (图 1B), 并初步评价了其抗 HIV-1 活性。

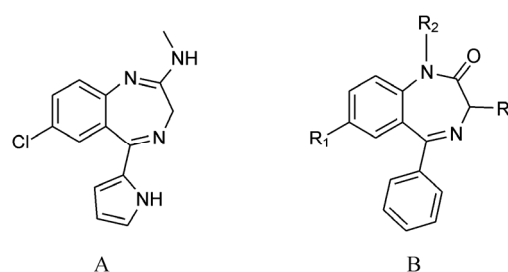
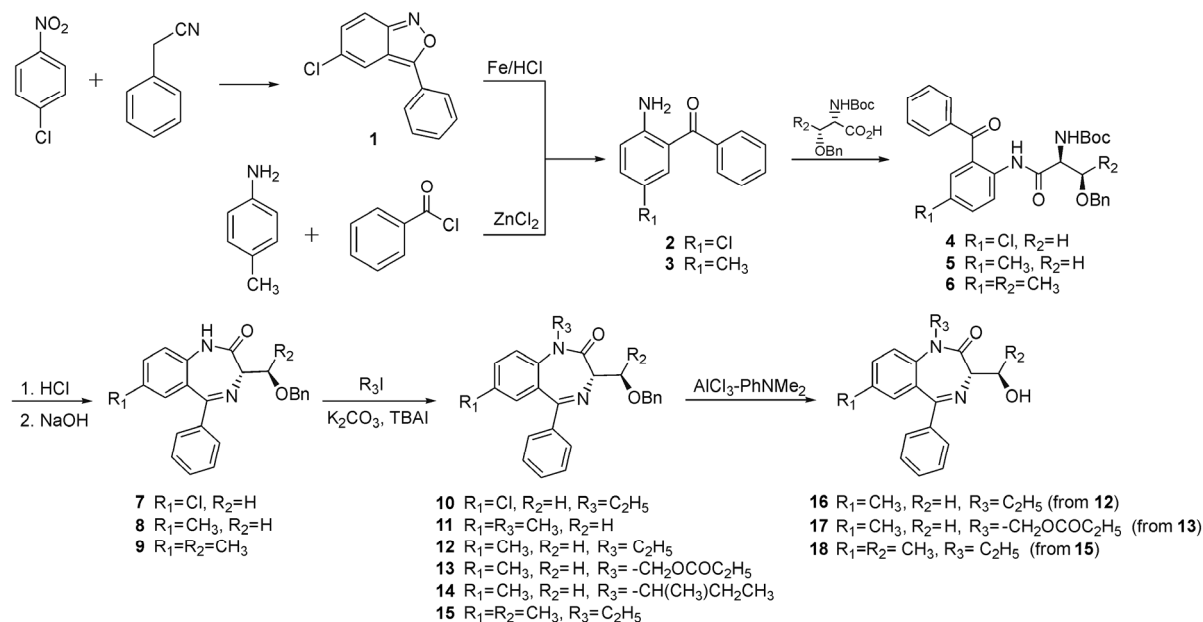
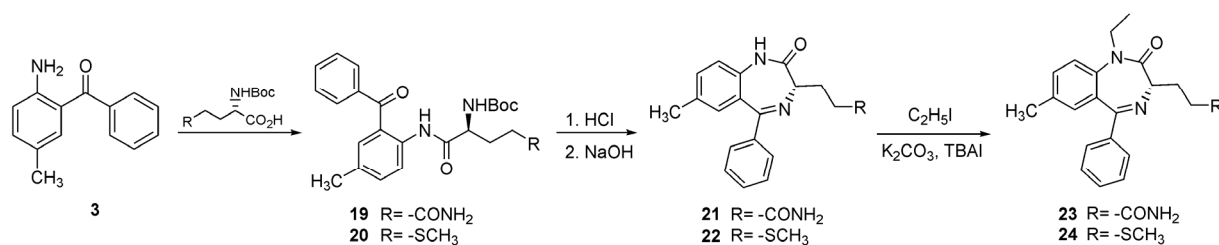


Figure 1 A: Structure of Ro 24-7429; B: General formula of target compounds.

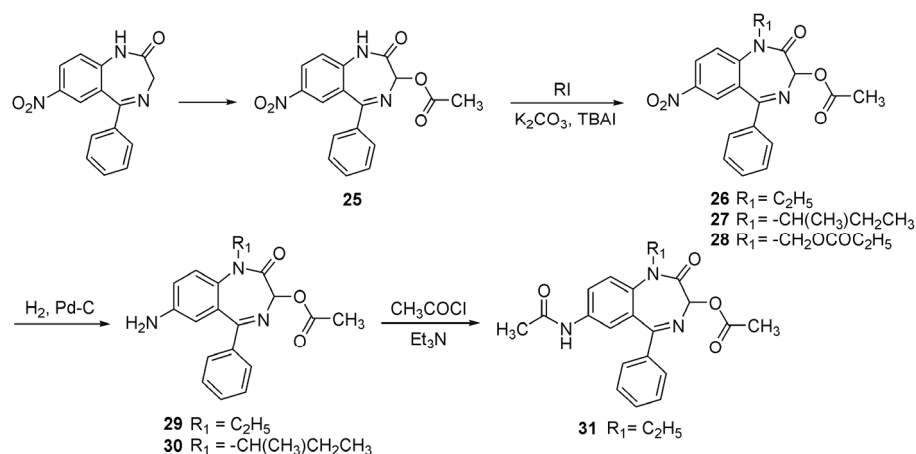
如合成路线 1~3 所示, 目标化合物由 3 条不同的合成路线获得。以对硝基氯苯和苯乙腈为起始原



Scheme 1 Synthesis of compounds 10-18



Scheme 2 Synthesis of compounds 21-24



Scheme 3 Synthesis of compounds 26-31

料, 在 NaOH 作用下生成苯并异噻唑 (1), 经还原得到苯甲酰化产物 2, 或以对甲苯胺为起始原料, 经傅-克酰化得到化合物 3。2 或 3 经缩合、环合以及 N-烷基化得到化合物 10~15。化合物 12、13 及 15 经脱苄得到化合物 16~18 (合成路线 1)。化合物 3 经缩合、环合以及 N-烷基化得到化合物 21~24 (合成路线 2)。以硝西洋为起始原料, 经 3-位酰氧化、N-烷基化、还原得到化合物 26~30, 29 经酰化得到化合物 31 (合成路线 3)。

结果与讨论

1 分子设计

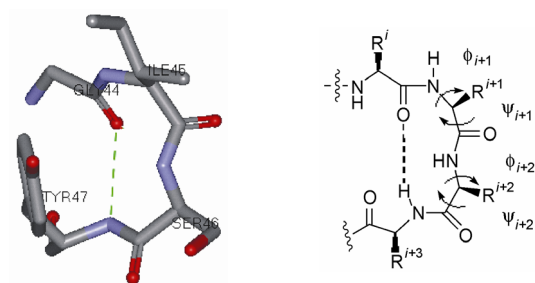
β -转角模拟物的分子设计通常是采用刚性小分子结构模拟肽链骨架, 并将 β -转角中各氨基酸残基的侧链视为药效基团, 作为选择刚性骨架上取代基团的依据。因此, 确定 HIV-1 Tat 中 β -转角的氨基酸组成是针对 β -转角设计 HIV-1 转录抑制剂的前提。

本研究对 PDB 中 6 个 NMR 测定的 HIV-1 Tat 结构中 Leu43-Arg53 段的构象进行了比对分析, 初步确定 β -转角结构由 $^{44}\text{GISY}$ 4 个氨基酸残基构成, 其代表性构象及肽链中相应的扭转角值示于图 2。依据这 4 个氨基酸的结构特点, 确定目标分子 (图 1B) 的 R_1 为甲基、氯或取代氨基 (模拟 G), R_2 为疏水基团 (模拟 I), R_3 为含可形成氢键原子的基团 (模拟 S), 而 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮骨架的 5 位苯环则作为酪氨酸 (Y) 的模拟基团。

2 实验结果

2.1 化学实验结果 化合物 10~18、21~24 和 26~31 的理化性质和光谱数据见表 1 和表 2。

2.2 生物活性评价结果 采用 Tat-介导的荧光素



Torsion angle	$i+1$	$i+1$	$i+2$	$i+2$
Observed	44.0°	-122.0°	-97.1°	7.0°
Calculated (Type II')	60°	-120°	-80°	0°

Figure 2 Representative conformation of $^{44}\text{GISY}$ of HIV-1 Tat

Table 1 Physical properties of compounds 10-18, 21-24 and 26-31

Compd.	Yield/%	mp/°C	Compd.	Yield/%	mp/°C
10	69	65-66	22	85	78-80
11	82	128-130	23	24	176-178
12	87	52-54	24	64	80-82
13	49	60-61	26	86	206-208
14	26	86-87	27	38	122-124
15	64	80-82	28	68	167-169
16	63	149-152	29	94	219-221
17	75	77-79	30	99	181-183
18	90	130-132	31	98	253-255
21	65	158-161			

酶表达实验以及 HIV-1 复制实验初步评价了 19 个 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮类化合物 (10~18、21~24、26~31) 的抗 HIV-1 活性, 并且采用发光法细胞活力检测实验评价了这些化合物的细胞毒作用。部分化合物的活性评价结果示于表 3。虽然这些化合物对 Tat-介导的荧光素酶表达和/或 HIV-1 复制表现出一定的抑制作用, 但多数化合物的半数有效浓度 EC_{50} 与半数细胞毒浓度 CC_{50} 相当。只有化合物 30 在没有明

Table 2 Spectral data of compounds **10–18**, **21–24** and **26–31**

Compd.	¹ H NMR (acetone- <i>d</i> ₆ for 10–18 , 26 , 27 , 29 , 30 , CDCl ₃ for 22–24 , 28 , 31 , and CD ₃ OD for 21)	HR-ESI-MS (<i>m/z</i>)
10	7.67–7.22 (m, 13H, ArH), 4.64 (s, 2H, ArCH ₂), 4.37 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.3, 9.3 Hz, CHCH ₂ a), 4.31–4.22 (m, 1H, NCH ₂ a), 4.10 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.0, 9.6 Hz, CHCH ₂ b), 3.82–3.72 (m, 1H, NCH ₂ b), 3.29 (t, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz, CH), 1.03 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃)	419.152 6 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₅ H ₂₄ ClN ₂ O ₂ , 419.152 2)
11	7.63–7.12 (m, 13H, ArH), 4.64 (s, 2H, ArCH ₂), 4.35 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.3, 9.6 Hz, CHCH ₂ a), 4.10 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.6, 9.6 Hz, CHCH ₂ b), 3.79 (t, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz, CH), 3.36 (s, 3H, NCH ₃), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃)	385.189 7 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₅ H ₂₅ N ₂ O ₂ , 385.191 0)
12	7.63–7.10 (m, 13H, ArH), 4.63 (s, 2H, ArCH ₂), 4.36 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.6, 9.6 Hz, CHCH ₂ a), 4.33–4.21 (m, 1H, CH ₃ CH ₂ a), 4.09 (dd, 1H, <i>J</i> = 3.3, 9.6 Hz, CHCH ₂ b), 3.78 (t, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz, CH), 3.78–3.66 (m, 1H, CH ₃ CH ₂ b), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 0.99 (t, 3H, <i>J</i> = 6.9 Hz, CH ₃)	399.208 1 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₆ H ₂₇ N ₂ O ₂ , 399.207 3)
13	7.66–7.12 (m, 13H, ArH), 4.75–4.53 (m, 4H, ArCH ₂ , NCH ₂), 4.34 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.6, 9.6 Hz, CHCH ₂ a), 4.11 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.0, 9.6 Hz, CHCH ₂ b), 4.09–4.01 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 3.89 (t, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz, CH), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 1.10 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃ CH ₂)	457.214 2 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₈ H ₂₉ N ₂ O ₄ , 457.212 7)
14	7.69–7.08 (m, 13H, ArH), 4.63 (s, 2H, ArCH ₂), 4.37–4.04 (m, 3H, CH ₃ CHN, CHCH ₂ O), 3.76 (dd, 1H, <i>J</i> = 6.3, 13.5 Hz, CHCH ₂ O), 2.34 (s, 3H, ArCH ₃), 1.67–1.57 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 1.42–1.40 (m, 3H, CH ₃), 0.73–0.69 (m, 3H, CH ₂ CH ₃)	427.240 2 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₂ , 427.238 6)
15	7.65–7.11 (m, 13H, ArH), 4.93, 4.85 (d, each 1H, <i>J</i> = 12.0 Hz, ArCH ₂), 4.51 (dq, 1H, <i>J</i> = 6.0, 9.0 Hz, OCH), 4.26 (dq, 1H, <i>J</i> = 6.9, 13.8 Hz, CH ₃ CH ₂ a), 3.70 (dq, 1H, <i>J</i> = 6.9, 13.8 Hz, CH ₃ CH ₂ b), 3.51 (d, 1H, <i>J</i> = 9.0 Hz, NCHCO), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 1.28 (d, 3H, <i>J</i> = 6.3 Hz, CH ₃ CH), 0.98 (t, 3H, <i>J</i> = 6.9 Hz, CH ₃ CH ₂)	413.224 0 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₂ , 413.222 9)
16	7.65–7.11 (m, 8H, ArH), 4.36–4.21 (m, 2H, CHCH ₂ a, CH ₃ CH ₂ a), 4.10 (dt, 1H, <i>J</i> = 6.0, 11.7 Hz, CH), 3.78–3.63 (m, 2H, CHCH ₂ b, CH ₃ CH ₂ b), 3.59 (t, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz, OH), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 1.01 (t, 3H, <i>J</i> = 6.9 Hz, CH ₃)	309.161 7 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₁₉ H ₂₁ N ₂ O ₂ , 309.160 3)
17	7.69–7.12 (m, 8H, ArH), 4.70 (d, 1H, <i>J</i> = 17.4 Hz, NCH ₂ a), 4.57 (d, 1H, <i>J</i> = 17.4 Hz, NCH ₂ b), 4.29 (dt, 1H, <i>J</i> = 6.6, 11.1 Hz, CHCH ₂ a), 4.17–4.10 (m, 1H, CHCH ₂ b), 4.10–4.03 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 3.76 (t, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz, CHCH ₂), 3.61 (t, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz, OH), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 1.12 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃)	367.166 5 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₄ , 367.165 8)
18	7.70–7.11 (m, 8H, ArH), 4.56–4.51 (m, 1H, CH ₃ CH), 4.26 (dq, 1H, <i>J</i> = 6.9, 14.1 Hz, CH ₃ CH ₂ a), 3.91 (d, 1H, <i>J</i> = 2.4 Hz, OH), 3.72 (dq, 1H, <i>J</i> = 6.9, 14.1 Hz, CH ₃ CH ₂ b), 3.30 (d, 1H, <i>J</i> = 7.2 Hz, =NCH), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 1.20 (d, 3H, <i>J</i> = 6.0 Hz, CH ₃ CH), 1.00 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃ CH ₂)	323.175 6 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₆ H ₂₃ N ₂ O ₂ , 323.175 4)
21	7.46–7.00 (m, 8H, ArH), 3.56 (t, 1H, <i>J</i> = 5.7 Hz, CH), 2.42–2.36 (m, 4H, CH ₂ CH ₂), 2.23 (s, 3H, CH ₃ Ar)	322.156 0 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₂ , 322.155 6)
22	8.22 (s, 1H, NH), 7.61–6.91 (m, 8H, ArH), 3.79 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.1, 8.7 Hz, CH), 2.85–2.72 (m, 2H, CH ₂ S), 2.60–2.55 (m, 1H, CHCH ₂ a), 2.50–2.41 (m, 1H, CHCH ₂ b), 2.32 (s, 3H, ArCH ₃), 2.10 (s, 3H, SCH ₃)	325.136 7 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₁₉ H ₂₁ N ₂ OS, 325.136 9)
23	7.54–7.02 (m, 8H, ArH), 6.24 (s, 1H, NH ₂ a), 5.85 (s, 1H, NH ₂ b), 4.30–4.18 (m, 1H, NCH ₂ a), 3.70–3.57 (m, 2H, NCH ₂ b, CH), 2.57–2.38 (m, 4H, CH ₂ CH ₂), 2.27 (s, 3H, ArCH ₃), 1.02 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃)	350.186 8 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₂ , 350.186 3)
24	7.61–7.08 (m, 8H, ArH), 4.35–4.27 (m, 1H, CH ₃ CH ₂ a), 3.76–3.66 (m, 2H, CH, CH ₃ CH ₂ b), 2.81–2.71 (m, 2H, CH ₂ S), 2.61–2.42 (m, 2H, CHCH ₂), 2.33 (s, 3H, ArCH ₃), 2.10 (s, 3H, SCH ₃), 1.08 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃)	353.167 9 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₅ N ₂ OS, 353.168 8)
26	8.54–7.47 (m, 8H, ArH), 5.91 (s, 1H, CH), 4.26 (dq, 1H, <i>J</i> = 7.2, 14.4 Hz, CH ₂ a), 4.02 (dq, 1H, <i>J</i> = 7.2, 14.4 Hz, CH ₂ b), 2.20 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.17 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃)	368.125 2 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₅ , 368.124 1)
27	8.43–7.50 (m, 8H, ArH), 5.56–5.55 (m, 1H, OCH), 5.20–5.08 (m, 1H, NCH), 2.22–2.21 (m, 3H, CH ₃ CO), 1.75–1.56 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 1.37–1.15 (m, 3H, CH ₂ CH), 0.98–0.80 (m, 3H, CH ₃ CH ₂)	396.156 3 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₅ , 396.156 3)
28	8.43 (dd, 1H, <i>J</i> = 2.7, 9.0 Hz, ArH), 8.25 (d, 1H, <i>J</i> = 2.7 Hz, ArH), 7.67–7.47 (m, 6H, ArH), 6.02 (s, 1H, CH), 4.76 (d, 1H, <i>J</i> = 17.7 Hz, NCH ₂ a), 4.62 (d, 1H, <i>J</i> = 17.7 Hz, NCH ₂ b), 4.22–4.12 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 2.32 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.20 (t, 3H, <i>J</i> = 6.9 Hz, CH ₃)	426.131 1 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₀ N ₃ O ₇ , 426.130 1)
29	7.68–6.53 (m, 8H, ArH), 5.87 (s, 1H, CH), 5.03 (s, 2H, NH ₂), 4.23 (dq, 1H, <i>J</i> = 7.2, 14.1 Hz, CH ₂ a), 3.63 (dq, 1H, <i>J</i> = 7.2, 14.1 Hz, CH ₂ b), 2.12 (s, 3H, CH ₃ CO), 0.98 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃ CH ₂)	338.151 6 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₁₉ H ₂₀ N ₃ O ₃ , 338.150 5)
30	7.61–6.56 (m, 8H, ArH), 5.53–5.52 (m, 1H, OCH), 5.07–4.97 (m, 1H, CH ₃ CHN), 4.77 (s, 2H, NH ₂), 2.17 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.72–1.50 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 1.30–1.10 (m, 3H, CH ₂ CH), 0.94–0.80 (m, 3H, CH ₃ CH ₂); ¹³ C NMR (acetone- <i>d</i> ₆) δ: 170.5 (C=O), 166.5 (C=O), 157.6 (C=N), 156.3 (C=N), 147.2 (Ar-C), 143.8 (Ar-C), 139.6 (Ar-C), 139.0 (Ar-C), 131.2 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 120.2 (Ar-C), 114.1 (Ar-C), 84.4 (N-CH-O), 75.7 (N-CH), 75.1 (N-CH), 29.1 (CH ₂), 20.8 (CH ₃), 19.0 (CH ₃), 9.7 (CH ₃)	366.182 1 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₃ , 366.181 2)
31	7.89–7.35 (m, 9H, CONH, ArH), 5.91 (s, 1H, CH), 4.28 (dq, 1H, <i>J</i> = 7.2, 14.4 Hz, CH ₂ a), 3.72 (dq, 1H, <i>J</i> = 7.2, 14.4 Hz, CH ₂ b), 2.30 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.13 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.10 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃)	380.162 2 [M+H] ⁺ (calcd. for C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₄ , 380.160 5)

显细胞毒作用的浓度下对 Tat 介导的荧光素酶的表达显示了较好的抑制作用, 半数有效浓度 EC₅₀ 为 25.0 μmol·L⁻¹ (图 3)。但 **30** 对 HIV-1 的复制没有表现出明显的抑制作用。

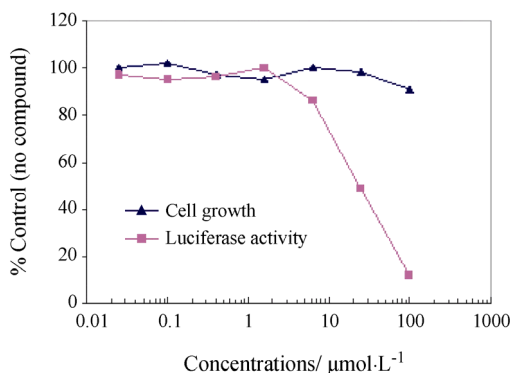
3 讨论

在早期对 Ro 24-7429 的作用机制研究中发现,

虽然 Ro 24-7429 对 HIV-1 复制有较强的抑制作用, 但它并不直接阻断 Tat 和 TAR RNA 的结合, 而可能通过与参与 HIV-1 转录的宿主蛋白发生相互作用来调控 HIV-1 复制^[8]。本研究合成的 2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮类化合物与 Ro 24-7429 骨架结构类似, 可能作用机制相似, 这可能是它们产生较强细胞毒作用

Table 3 Anti-HIV activity of selected compounds. * Measured with acutely infected MOLT-4 cells in reference [8]

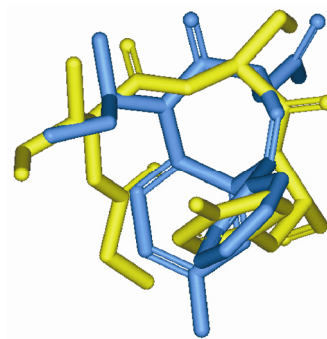
Compd.	HIV-1 Tat-mediated LTR transcription / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Effect on HIV-1 (NL4-3) replication in MT-4 cells / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	EC ₅₀	CC ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀
15	61.4	46.4	39.6	41.0
16	>125	>125	90.2	>125
21	>125	>125	118	>125
22	35.8	60.5	42.9	39.8
24	>100	>100	81.2	80.9
28	>80	>80	63.9	>80
30	25.0	>100	>100	>100
Ro 24-7429	—	—	0.19	6.6*

**Figure 3** Effect of Compound 30 on tat-mediated LTR transcription and cells

的原因。事实上, Ro 24-7429 的类似物 Ro 5-3355^[8, 9] 及 GCPK^[9] 也具有较强烈的细胞毒作用。此外, 早期研究还表明, Ro 24-7429 及其类似物对 HIV-1 复制的抑制作用可能随用于 HIV-1 感染实验的细胞类型不同而存在明显差异^[8, 9], 这至少可以部分解释化合物 30 在 TZM-bl 细胞中对 Tat 介导的荧光素酶表达具有较好的抑制作用, 但在 MT-4 细胞中对 HIV-1 的复制却没有表现出明显的抑制作用。

Ro 24-7429 与其类似物 Ro 5-3355、GCPK 的活性及毒性水平均呈现出明显差异^[8, 9], 这表明在苯并二氮萘骨架上引入恰当的药效基团是实现 HIV-1 特异性抑制作用的可行途径。本研究合成、评价的 19 个 2H-1, 4-苯并二氮萘-2-酮类化合物中, 仅有化合物 30 对 Tat 介导的荧光素酶表达具有一定的特异性抑制作用。分析其结构发现, 该化合物 1, 3, 5 位的取代基与构成 β -转角⁴⁴GISY 中的氨基酸侧链最为吻合, 并且其低能量构象能够与 NMR 测定的⁴⁴GISY 部分的构象很好地叠合 (图 4)。化合物 30 中的苯并二氮萘骨架较好地模拟了 β -转角中肽链骨架的构象; 同时, 1, 3, 5 位的取代基与组成 β -转角的 4 个氨基酸

残基的侧链也有着相似的基团性质和空间分布。

**Figure 4** Superimposition of ⁴⁴GISY and compound 30 (Yellow: ⁴⁴GISY; Blue: Compound 30)

4 小结

化合物 30 对 Tat 反式激活过程的特异性抑制作用, 以及它与 ⁴⁴GISY 结构和构象的相似性提示, 针对 Tat 中的 β -转角结构进行肽模拟物的分子设计有可能发现结构新颖的 HIV-1 转录抑制剂, 而对苯并二氮萘骨架进行恰当的功能基取代是实现特异性转录抑制作用的关键。化合物 30 的结构优化和进一步的分子模拟研究仍在进行中。

实验部分

熔点用 Fisher Scientific 显微熔点仪测定, 温度未校正。核磁共振仪为 Varian Mercury 300 型, 内标为 TMS。质谱仪为 LC/MDC-MS 串联质谱仪 (Agilent, USA)。柱色谱分离用硅胶 H 或粗硅胶 (200~300 目)、薄层色谱用硅胶 GF254 均购自青岛海洋化工厂。实验所用试剂为化学纯或分析纯。无水乙醚、四氢呋喃 (THF) 和甲苯用金属钠回流至二苯酮变蓝, 重蒸而得; 无水乙醇用金属镁回流重蒸而得; 二甲基亚砜和 *N, N'*-二甲基甲酰胺 (DMF) 经分子筛干燥, 直接使用。其他溶剂未特别指出则未经处理。

1 化学实验

化合物 2、3^[10] 和 25^[11] 依文献方法合成。

1.1 *N*-(2-苯甲酰基-4-氯苯基)-2-叔丁氧基甲酰胺基-3-苄氧基丙酰胺 (4) *N*-叔丁氧羰基-*O*-苄基-*L*-丝氨酸 (7.08 g, 24 mmol) 溶于干燥的 THF 中, 加入 *N*-甲基吗啡啉 (2.43 g, 24 mmol), 冷却至 -15 °C, 滴加氯甲酸异丁酯 (3.28 g, 24 mmol)。滴毕, 于 -15 °C 下搅拌反应 10 min, 加入 2-氨基-5-氯-二苯甲酮 (2) (4.22 g, 20 mmol), 待固体物全部溶解后于室温下反应过夜。滤除反应液中不溶物, 滤液减压浓缩后残余物用 300 mL 二氯甲烷溶解, 依次用水、0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠

溶液和饱和 NaCl 溶液洗涤有机层。无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 残余物进行硅胶柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 4 : 1), 得化合物 4。按类似方法合成了化合物 5、6、19 和 20。

1.2 7-氯-1, 3-二氢-3-苄氧基甲基-5-苯基-2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮 (7) 化合物 4 (6 g, 11.8 mmol) 溶于乙酸乙酯 (100 mL) 中, 通入干燥的 HCl 气体, TLC 检测反应结束后, 减压浓缩, 残余物溶于甲醇 (75 mL) 中, 室温下滴加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 至溶液 pH = 10, 室温下搅拌过夜, 向反应液中加入适量水, 有白色固体析出。抽滤, 少量水洗滤饼, 将滤饼干燥得化合物 7。按类似方法合成了化合物 8、9、21 和 22。

1.3 7-氯-1, 3-二氢-1-乙基-3-苄氧基甲基-5-苯基-2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮 (10) 化合物 7 (100 mg, 0.256 mmol) 溶于干燥的 DMF (30 mL) 中, 加入无水碳酸钾 (38.9 mg, 0.282 mmol) 和四丁基碘化铵 (TBAI, 10 mg)。室温无水条件下搅拌反应 15 min, 滴加碘乙烷 (64 mg, 0.41 mmol), 室温搅拌 5 h, 将反应液倾入 100 mL 冰水中, 充分搅拌, 乙酸乙酯萃取 (150 mL \times 2), 有机相分别用水和饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后残余物进行硅胶柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 4 : 1), 得化合物 10。按类似方法合成了化合物 11~15、23、24 和 26~28。

1.4 7-甲基-1, 3-二氢-1-乙基-3-羟甲基-5-苯基-2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮 (16) 化合物 12 (500 mg, 1.26 mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (5 mL) 中, 加入 *N, N*-二甲基苯胺 (0.68 mL, 3.78 mmol), 搅拌 5 min 后加入无水三氯化铝 (678 mg, 5.08 mmol), 室温下搅拌至 TLC 检测反应完全, 向反应液中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 15 mL, 剧烈搅拌, 用乙酸乙酯 (20 mL \times 3) 萃取, 合并有机层, 用 5% NaHCO₃ 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后残余物进行硅胶柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 5 : 1), 得化合物 16。按类似方法合成了化合物 17 和 18。

1.5 7-氨基-1, 3-二氢-1-乙基-3-乙酰氧基-5-苯基-2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮 (29) 化合物 26 (800 mg, 2.2 mmol) 溶于乙酸乙酯, 加入 10% 钯碳 250 mg, 常压氢化至不再吸氢。滤除钯碳, 滤液减压浓缩后, 残余物进行硅胶柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 10 : 1), 得化合物 29。按类似方法合成了化合物 30。

1.6 7-乙酰氨基-1, 3-二氢-1-乙基-3-乙酰氧基-5-苯基-2H-1, 4-苯并二氮草-2-酮 (31) 化合物 29 (400 mg, 1.18 mmol) 溶于干燥的 THF (30 mL) 中, 冰浴

冷却下加入三乙胺 (125 mg, 1.24 mmol) 和乙酰氯 (98 mg, 1.24 mmol), 滴加完毕后于 0 °C 继续搅拌反应 30 min, 再室温搅拌反应 1 h。滤除不溶物, 滤液减压浓缩, 残余物溶于乙酸乙酯 (200 mL) 中, 依次用水和饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥。减压浓缩后残余物进行硅胶柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 4 : 1), 得化合物 31。

2 分子模拟实验

在 Sybyl 7.3 下, 采用最小二乘叠合方法, 计算各分子叠合点间的位置均方根偏差 (RMSD)。对 NMR 测定的 6 个 HIV-1 Tat 结构代表构象的 Leu43-Arg53 段进行分子叠合, 考察它们的结构相似性, 并由各残基的平均 RMSD 值判断保守二级结构的位置。

3 药理活性实验

3.1 对 Tat 反式激活的抑制作用实验 1 μg Tat 表达质粒 pgtat 通过电穿孔来转染 1×10^6 个 TZM-bl 细胞。荧光素酶的表达由 HIV-1 LTR 及 TAR RNA 共同调控。转染后的 TZM-bl 细胞与不同浓度的待测化合物一起培养 2 天。在 TZM-bl 细胞中采用 Promega、Luis Obispo、CA 提供的 Bright-Glo 荧光素酶试剂盒来定量荧光素酶的活性, 以此来确定 Tat 介导的荧光素酶的表达水平, 并由剂量-效应曲线计算待测化合物对 Tat 反式激活作用的半数有效浓度 EC₅₀。

3.2 抗 HIV 复制实验 以 p24 抗原酶联免疫分析法 (ELISA), 采用 HIV-1 NL4-3 感染的 MT-4 细胞来测定对 HIV-1 复制的半数有效浓度 EC₅₀。

3.3 细胞毒性评价 采用 Promega 提供的 CellTiter-Glo[®] 发光法细胞活力检测试剂盒来评价 TZM-bl 及 MT-4 细胞的细胞毒性。该试剂盒是通过 ATP 进行定量测定来检测培养物中活细胞数目的一种均质检测方法。受试化合物对细胞的半数细胞毒浓度 CC₅₀ 由 Biosoft CalcuSIN 软件来计算。

References

- [1] Baba M. Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors [J]. *Antivir Res*, 2006, 71: 301-306.
- [2] D'Orso I, Grunwell JR, Nakamura RL, et al. Targeting Tat inhibitors in the assembly of human immunodeficiency virus type 1 transcription complexes [J]. *J Virol*, 2008, 82: 9492-9504.
- [3] Giacca M. The HIV-1 Tat protein: a multifaceted target for novel therapeutic opportunities [J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2004, 4: 277-285.
- [4] Kashanchi F, Sadaie MR, Brady JN. Inhibition of HIV-1

- transcription and virus replication using soluble Tat peptide analogs [J]. *Virology*, 1997, 227: 431-438.
- [5] Agbottah E, Zhang N, Dadgar S, et al. Inhibition of HIV-1 virus replication using small soluble Tat peptides [J]. *Virology*, 2006, 345: 373-389.
- [6] Pantano S, Carloni P. Comparative analysis of HIV-1 Tat variants [J]. *Proteins*, 2005, 58: 638-643.
- [7] Esquieu D, Péloponése JM, Opi S, et al. Discovery of a Tat HIV-1 inhibitor through computer-aided drug design [J]. *Spectroscopy*, 2003, 17: 639-645.
- [8] Braddock M, Cannon P, Muckenthaler M, et al. Inhibition of human immune-deficiency virus type 1 Tat-dependent activation of translation in *Xenopus* oocytes by the benzodiazepine Ro24-7429 requires *trans*-activation response element loop sequences [J]. *J Viral*, 1994, 68: 25-33.
- [9] Kira T, Hashimoto K, Baba M, et al. 2-Glycineamide-5-chlorophenyl 2-pyrryl ketone, a non-benzodiazepin Tat antagonist, is effective against acute and chronic HIV-1 infections *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 1996, 32: 55-62.
- [10] Chen FE. *Synthetic Methods for Organic Drugs: Vol 1. (有机药物合成法: 第一卷)* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 1998: 28-30; 234-236.
- [11] Cepanec I, Litvić M, Pogorelić I. Efficient synthesis of 3-hydroxy-1, 4-benzodiazepines oxazepam and lorazepam by new acetoxylation reaction of 3-position of 1, 4-benzodiazepine ring [J]. *Org Process Res Dev*, 2006, 10: 1192-1198.

第六届亚洲药物流行病学大会暨 2011 中国药学会药物流行病学学术年会 (第二轮征文通知)

为促进药物流行病学事业的进步,推动药物安全领域的工作,中国药学会与国际药物流行病学学会定于 2011 年 10 月 28~30 日在北京共同主办“第六届亚洲药物流行病学大会 (6th ACPE) 暨 2011 中国药学会药物流行病学学术年会 (AMCP-CPA)”。大会的主题为“药物流行病学与风险管理:从科学研究到临床实践——机遇与挑战”。大会邀请国际国内知名专家作一系列专题报告,国际及主要来自亚洲的该专业研究者、临床医学及药学工作者将与会交流分享。大会同期举办相关卫星会、专题研讨会、药品及技术展览展示。

一、会议征文内容: 1. 药物政策与监管; 2. 药物流行病学、药物警戒研究方法; 3. 上市后药品的有效性、安全性再评价; 4. 药品安全与风险的监测、评价、预防及研究; 5. 临床药学的发展与临床药师的培训; 6. 药源性疾病的预防与治疗; 7. 生物制剂及营养制剂的合理应用; 8. 药物警戒及药品风险管理; 9. 循证医学、循证药学与合理用药; 10. 用药差错、药物误用/滥用的防范; 11. 抗菌药及其临床合理应用; 12. 生物制品 (含疫苗) 和单克隆抗体; 13. 罕见病与孤儿药; 14. 药物基因组学与安全用药; 15. 基本药物在中国的应用; 16. 中国药物流行病学与传统医药; 17. 其他相关主题。

二、论文及摘要提交:

1. 向 6th ACPE 提交: 英文 500 单词以内, word 格式在线提交 (www.acpe-beijing.org), 截止期 2011 年 6 月 30 日。

2. 向 AMCP-CPA 提交: 国内代表除向 6th ACPE 大会提交英文摘要外, 还可提交论文的中文全文 (文题处注明 ACPE 稿), 提交网址为 www.tg.cnjpe.org, 截止期 2011 年 9 月 10 日。

会议议程、参会注册、展览展示等会务事项请登录大会网站 www.acpe-beijing.org 查询。

大会秘书处电话: 010-58699280 转 822, 010-58699271 E-mail: acpe@cpa.org.cn;

大会征文组电话: 027-82835077, 82778580 E-mail: cnjpetg@163.com, ywlbxzz@periodicals.net.cn