S-DAPYs 类似物的分子设计、合成及抑制 HIV-1 的活性研究

万正勇^①, 陈芬儿^{①②*}, Erik De Clercq^③, Dirk Daelemans^③,
Christophe Pannecouque^③

① 复旦大学化学系, 上海 200433

② 复旦大学生物医学研究院, 上海 200433

③ Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

*通讯作者, E-mail: rfchen@fudan.edu.cn

收稿日期: 2015-06-15; 接受日期: 2015-06-23; 网络版发表日期: 2015-08-20

doi: 10.1360/N032015-00094

摘要 我们以已上市的 etravirine 和正在临床研究的 VRX-480773 两个逆转录酶抑制剂为模板, 通过杂交这两个化合物的药效团, 获得含酰胺片段的 S-DAPYs 类似物, 该类似物对野生型 HIV-1 病毒株具有中等强度抑制活性. 而 Maurizio 所发现的另一类无酰胺片段的 S-DAPYs 类似物却表现出优异的抑制活性. 为了考察酰胺片段对 S-DAPYs 类似物抑制 HIV-1 活性的影响, 本文合成了一系列无酰胺片段的 S-DAPYs 类似物. 生物活性结果表明, 3 个化合物 (**6g**, **6m** 和 **6s**) 对野生型 HIV-1 具有中等强度抑制活性 (EC_{50} 在 6.5~15.4 $\mu\text{mol/L}$ 范围内), 弱于相应的具有酰胺片段的类似物. 此外, 分子模拟还揭示了酰胺片段可与 K103 形成至关重要的氢键作用, 这为新型非核苷类逆转录酶抑制剂的设计奠定了理论基础.

关键词

艾滋病
逆转录酶抑制剂
分子杂交
酰胺片段
氢键
分子模拟

1 引言

美国食品和药品管理局(FDA)批准上市的依曲韦林(etravirine, **1**, 图 1)和利匹韦林(rilpivirine, **2**, 图 1)对 HIV-1 野生株和耐药突变株均有很强的抑制活性, 这为对奈韦拉平(nevirapine)、地拉韦啉(delavirdine)和依非韦伦(efavirenz)产生耐药的艾滋病(AIDS)患者带来了新的希望. 但是依曲韦林水溶性和药代动力学性质较差, 故长时间服用会出现抑郁、失眠、头痛、较严重的皮疹和皮肤反应(包括史-约综合征、超敏反应和多行性红斑等)^[1,2]. 因此, 开发新型非核苷类逆转录酶抑制剂是当前药物化学研究领域具有重大意义的挑战性课题.

迄今, 对依曲韦林的左翼^[3~12], 左翼与中间嘧啶

环间的连接基^[13~21]和中间嘧啶环^[22~30]均已进行大量的结构修饰, 而右翼对氨基苯胺的改造报道甚少^[31,32]. 本课题组曾以依曲韦林和正在临床研究的 VRX-480773 (**3**, 图 1)为模板, 将这两个化合物的药效团进行融合, 所获得的杂交物为具有酰胺片段的 S-二芳基嘧啶(S-diarylpyrimidines, S-DAPYs)类似物 (**4**, 图 2), 其对 HIV-1 野生型病毒株具有低微摩尔水平的抑制活性, 半数有效浓度 EC_{50} 值介于 41~0.24 $\mu\text{mol/L}$, 选择性指数 SI 在 1~>1225 范围内^[33]. 2007 年, Botta 课题组^[34]发现, 没有酰胺片段的 S-DAPYs 类似物 (**5**, 图 1)却对 HIV-1 野生株呈现出极强的抑制活性(EC_{50} =25 pmol/L). 这两类 S-DAPYs 类似物抗病毒活性的差异引起了我们的极大兴趣. 为了考察酰胺片段对 S-DAPYs 类化合物抑制活性的影响, 我们设

计合成了一系列无酰胺片段的 S-DAPYs 类似物(6, 图 1)。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

MR3001K 型磁力搅拌器(Heidolph, 德国); Laborota 4000 型旋转蒸发仪(Heidolph, 德国); DZF-6020 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司, 中国); 熔点使用 SGW X-1 显微熔点仪测定(上海精密科学仪器有限公司, 中国); ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 用 DMX 500 及 AV 400 型核磁共振仪测定(Bruker, 德国), TMS 为内标, DMSO- d_6 或 CDCl_3 为溶剂; IR 用 FT/IR-4200 型红外光谱仪测定(Jasco, 日本), KBr 压片法; ESI-MS 用 Waters Quattro 质谱仪(Waters, 美国)

测定。

2.2 化合物合成

将 4-[(2-巯基嘧啶-4-基)氧基]-3,5-二甲基苯腈 **7** (0.1287 g, 0.50 mmol)^[33] 和叔丁醇钾(0.0589 g, 0.525 mmol)加入到 *N,N*-二甲基甲酰胺(1.5 mL)中, 室温下搅拌 0.5 h。将相应取代 α -溴甲苯(0.50 mmol)逐滴加入到上述反应体系中, 滴加完毕后继续搅拌 1 h, 薄层色谱(TLC)表明, 原料完全消失。搅拌下将反应液倒入水(15 mL)中, 乙酸乙酯萃取(3 $\times$ 15 mL), 合并有机相, 依次用水(3 $\times$ 10 mL)和饱和食盐水(3 $\times$ 10 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 残余物经柱层析(乙酸乙酯/石油醚=1:2 洗脱)分离得目标物 **6a~6z** (图 3)。

目标物 **6a~6z** 的 FR-IR、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及 MS 谱图表征结果见网络版补充材料。

图 1 化合物 1~6 的化学结构式

图 2 杂交物 S-DAPY 类似物的分子设计^[33]

图 3 目标物 6a~6z 的合成

2.3 生物活性测试

在 HIV 感染的 MT-4 细胞中, 在感染 HIV 不同的时间, 采用 MTT 法^[35]测定药物对 HIV 诱变的细胞病变的保护作用, 计算使 50% 细胞免于 HIV 诱导的细胞病变所需的浓度即半数有效浓度 EC_{50} 。毒性测定实验与抗 HIV 活性实验平行操作, 也在 MT-4 细胞培养中, 用 MTT 法测定化合物使 50% 未感染细胞发生细胞病变的浓度 (CC_{50}), 并计算选择性指数 $SI = CC_{50}/EC_{50}$ 。采用的病毒株有 3 种: HIV-1 野生型病毒株 IIB、HIV-2 野生型病毒株 ROD 和 HIV-1 耐药突变株 RES056。变异部位和变异类型为 K103N 和 Y181C, 此耐药突变株可对 NNRTIs (NEV、DEV、EFV 等) 产生耐药性。

所有化合物的抗 HIV 活性由药物通过对 HIV 在细胞中引起的细胞病变的抑制作用效率来检测^[36]。具体操作如下: 将化合物用 DMSO 或水溶解后用磷酸盐缓冲食盐水溶液稀释, 将 MT-4 细胞 (3×10^5 cells/mL) 用 100 μ L 各化合物不同浓度溶液在 37°C 预培养 1 h。然后向该混合物中加入 100 μ L 适当的病毒稀释液, 将细胞于 37°C 培养 1 h。洗涤 3 次后, 将细胞再次分别悬浮于含有或者不含化合物的培养介质中。接着将细胞在 5% CO_2 氛围下, 于 37°C 下再培养 7 d, 并于感染后第 3 天用含有或者不含有化合物的培养介质替换补充培养液。每种培养条件都重复操作 2 次。对病毒的细胞病变作用每天用反向光学显微镜监控。典型来讲, 本实验中所用的病毒稀释液常常会在病毒感染后第 5 天导致细胞病变。药物抑制浓度以药物对病毒细胞病变作用产生 50% 抑制作用而同时对细胞无直接毒性的浓度 (EC_{50}) 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) 远低于影响 HIV-1 在 T 细胞中复制所需浓度。

2.4 分子对接

采用商用软件 Sybyl 的 Surflex-Dock 模块进行分子对接研究。由于 etravirine-VRX-480773 杂合物与二苯醚类抑制剂结构上的高度相似性, 故采用二苯醚类似物/逆转录酶 (RT) 复合物晶体结构 (PDB code: 3C6T)^[37] 进行分子模拟研究。选取化合物 6g 和相应的先导化合物 4g 为代表进行分子对接研究。

使用 Chemdraw 软件以 ACS 杂志标准键长和键角画出抑制剂的结构, 然后通过 ChemBio3D 软件转变成 .mol2 格式。将此文件读入 Sybyl 1.2 中, 以分子力学程序进行 1000 步的能量优化 (minimize), 优化过程时采用 Powell 能量梯度法, Tripos 力场, 加载 Gasteiger-Hückel 电荷, 非键的距离截断阈值设定为 8 Å, 能量收敛梯度值为 0.001 kcal/(mol Å), 其参数均为默认值。

RT 的非核苷类抑制剂结合口袋 (non-nucleoside inhibitor binding pocket, NNIBP) 通过二苯醚/RT 复合物晶体结构 (PDB code: 3C6T) 来定义。首先, 用 Sybyl 1.2 读入该晶体结构的 PDB 文件。然后, 通过移除水分子和配体分子 (即二苯醚) 和其他多余的小分子, 给氨基酸残基加氢 (Tripos 力场下标准构象), 加电荷 (配体分子加 Gasteiger-Hückel 电荷、蛋白加 Kollman all-atom 电荷) 和修补末端等准备蛋白分子。接着, 通过“配体”的方法在配体附近产生活性口袋 (“Threshold”=0.5, “Boalt”=0), 通过 Surflex Dock 模块将要对接的分子导入结合口袋中, 进行柔性对接。该模块将通过 Tripos 力场对小分子与 RT 的相互作用力 (包括范德华力、静电作用力、扭转能等) 进行计算并打分。通过遗传算法, 相互作用结构将进行 20000 步的搜索, 最终保留 20 个得分最高的配体构象用于分析。本文只选取其中得分最高的构象分析抑制剂与逆转录酶结合的可能模式。

3 结果与讨论

3.1 生物活性

如表 1 所示, 所有新合成的目标化合物 6a~6z 并无预期的优异活性, 活性弱于相应含酰胺片段的类

表 1 化合物 6a~6z 在 MT-4 细胞中的抗 HIV 活性及细胞毒性^{a)}

Compounds	R	EC ₅₀ (μmol/L) ^{b)}			CC ₅₀ (μmol/L) ^{c)}	SI ^{d)}
		III _B	K103N+Y181C	HIV-2		
6a	H	>20.4	>20.4	>20.4	20.4	<1
6b	2-Me	>17.1	ND ^{e)}	>17.1	17.1	<1
6c	3-Me	>25.8	ND	>25.8	25.8	<1
6d	4-Me	>6.6	ND	>6.6	6.6	<1
6e	4- <i>t</i> -Bu	>309.8	ND	>309.8	309.8	<1
6f	2-CN	>7.8	>11.7	>11.7	>11.7	<2
4g ^[33]	4-CN	4.3±0.7	>301	>301	>301	>70
6g	4-CN	8.2±1.9	>238.7	>238.7	>238.7	>29
6h	4-COOMe	>308.3	ND	>308.3	>308.3	1
6i	4-CF ₃	>27.8	ND	>27.8	27.8	<1
6j	3,5-diCF ₃	>258.6	ND	>258.6	>258.6	1
6k	2-NO ₂	>15.7	>15.7	>15.7	15.7	<1
6l	3-NO ₂	>318.5	ND	>318.5	>318.5	1
6m	4-NO ₂	15.4±2.8	>318.5	>318.5	>318.5	>21
4n ^[33]	4-OMe	7.3±1.3	>69	>69	>69	>9
6n	4-OMe	>331.2	ND	>331.2	>331.2	1
6o	2-F	>22.5	ND	>22.5	22.5	<1
6p	3-F	>19.7	ND	>19.7	19.7	<1
6q	4-F	>22.2	ND	>22.2	22.2	<1
6r	2,6-diF	>326.0	ND	>326.0	>326.0	1
6s	2-F-4-CN	6.5±1.6	>33.6	>33.6	>33.6	>5
6t	4-SO ₂ Me	47.1	>35.5	>35.5	>35.5	<1
6u	2-Cl	>15.4	>15.4	>15.4	15.4	<1
6v	2-F-3-Cl	>312.6	ND	>312.6	>312.6	1
6w	4-Cl	>17.1	ND	>17.1	17.1	<1
6x	2,4-diCl	>23.7	ND	>23.7	23.7	<1
6y	2-Br	>11.6	ND	>11.6	11.6	<1
6z	4-Br	>18.3	ND	>18.3	18.3	<1
DEV		0.66±0.61	>44	ND	>44	>67
ETV		0.0041±0.0002	0.025±0.002	ND	>4.6	>1122

a) 所有数据为至少三次平行试验结果的平均值; b) EC₅₀: 半数有效浓度, 使 50% MT-4 细胞免于病变所需的药物浓度; c) CC₅₀: 使 50% 正常未感染细胞发生病变时的药物浓度; d) SI 选择性指数, SI=CC₅₀/EC₅₀ (WT); e) ND: 未检测到。

似物、参考药物地拉韦啉(EC₅₀=0.66 μmol/L)和依曲韦林(EC₅₀=0.0041 μmol/L)。其中, 化合物 6g、6m 和 6s 对 HIV-1 野生株呈现中等强度抑制活性, EC₅₀ 分别为 8.2、15.4 和 6.5 μmol/L, 选择性指数分别≥29、>21 和≥5。然而, 无目标物对 K103N+Y181C 双突变病毒株(RES056)和 HIV-2 野生型病毒株(ROD)具有抑制活性。通过比较发现, 右翼苯环 4 位含吸电子基团化合物的活性(6g 和 6m)好于含给电子基团化合物(6e 和 6n), 并且右翼苯环 4 位含大体积取代基(6e 和 6h)不利于活性。

3.2 分子模拟

为了从分子水平理解活性结果, 选取化合物 6g 和相应含酰胺片段的先导化合物 4g 为代表进行分子模拟研究(图 4)。它们均采用 DAPYs 类衍生物经典的

图 4 4g (白色)和 6g (紫色)与野生型 HIV-1 (PDB code: 3C6T)的作用模型(网络版为彩图)

空间取向和“马蹄型”构象. 其中, 左翼的 2,6-二甲基-4-氰基苯基均处于 Tyr181、Tyr183、Tyr188、Phe227 和 Trp229 所形成的疏水亚口袋中, 并与这些芳香氨基酸残基形成 π - π 堆积作用. 先导化合物 **4g** 右翼酰胺片段的羰基可与 Lys103 的氨基形成氢键作用, 而本系列化合物无此作用, 故活性比含酰胺片段的先导物有所降低. 总之, 酰胺片段对此类 S-DAPY 类似物的抑制活性具有重要贡献.

4 结论

本文设计合成了一系列无酰胺片段的 S-DAPYs 类似物, 其生物活性结果表明, 3 个类似物 (**6g**、**6m** 和 **6s**) 对野生型 HIV-1 具有中等强度抑制活性 (EC_{50} 在 6.51~15.4 $\mu\text{mol/L}$ 范围内), 但弱于相应的含酰胺片段的类似物. 此外, 还通过分子模拟揭示酰胺片段可与 K103 形成至关重要的氢键作用, 为进一步结构修饰提供指导.

补充材料

本文的补充材料见网络版 chem.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(81172918)、上海市自然科学基金(13ZR1402200)和国家科技重大专项(2012ZX09103101-068)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Schrijvers R. Etravirine for the treatment of HIV/AIDS. *Expert Opin Pharmacother*, 2013, 14: 1087–1096
- 2 Lee WG, Gallardo-Macias R, Frey KM, Spasov KA, Anderson KS, Jorgensen WL. Picomolar inhibitors of HIV reverse transcriptase featuring bicyclic replacement of a cyanovinylphenyl group. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 16705–16713
- 3 Ludovici DW, De Corte BL, Kukla MJ, Ye H, Ho CY, Lichtenstein MA, Kavash RW, Andries K, Béthune M, Azijn H, Pauwels R, Lewi PJ, Heeres J, Koymans LMH, Jonge MR, van Aken KJA, Daeyaert FFD, Das K, Arnold E, Janssen PAJ. Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 3: diarylpyrimidine (DAPY) analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 2235–2239
- 4 Rotili D, Tarantino D, Artico M, Nawrozkij MB, Gonzalez-Ortega E, Clotet B, Samuele A, Esté JA, Maga G, Mai A. Diarylpyrimidine-dihydrobenzoxopyrimidine hybrids: new, wide-spectrum anti-HIV-1 agents active at (sub)-nanomolar level. *J Med Chem*, 2011, 54: 3091–3096
- 5 Guillemont J, Pasquier E, Palandjian P, Vernier D, Gaurrand S, Lewi PJ, Heeres J, Jonge MR, Koymans LMH, Daeyaert FFD, Vinkers MH, Arnold E, Das K, Pauwels R, Andries K, Béthune M, Bettens E, Hertogs K, Wigerinck P, Timmerman P, Janssen PAJ. Synthesis of novel diarylpyrimidine analogues and their antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. *J Med Chem*, 2005, 48: 2072–2079
- 6 Feng X, Liang Y, Zeng Z, Chen F, Balzarini J, Pannecouque C, De Clercq E. Structural modifications of DAPY analogues with potent anti-HIV-1 activity. *Chem Med Chem*, 2009, 4: 219–224
- 7 Liang Y, Feng X, Zeng Z, Chen F, Balzarini J, Pannecouque C, De Clercq E. Design, synthesis, and SAR of naphthyl-substituted diarylpyrimidines as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Chem Med Chem*, 2009, 4: 1537–1545
- 8 Liang Y, He Q, Zeng Z, Liu Z, Feng X, Chen F, Balzarini J, Pannecouque C, De Clercq E. Synthesis and anti-HIV activity of 2-naphthyl substituted DAPY analogues as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 4601–4605
- 9 Gu S, Yang S, He Q, Ma X, Chen F, Dai H, De Clercq E, Balzarini J, Pannecouque C. Design, synthesis and biological evaluation of cycloalkyl arylpyrimidines (CAPYs) as HIV-1 NNRTIs. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 7093–7099
- 10 Yang S, Pannecouque C, Daelemans D, Ma X, Liu Y, Chen F, De Clercq E. Molecular design, synthesis and biological evaluation of BP-O-DAPY and O-DAPY derivatives as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2013, 65: 134–143
- 11 Wu H, Yao J, He Q, Chen W, Chen F, Pannecouque C, De Clercq E, Daelemans D. Synthesis and biological evaluation of DAPY-DPEs hybrids as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 624–631
- 12 Mao T, He Q, Wan Z, Chen W, Chen F, Tang G, De Clercq E, Daelemans D, Pannecouque C. Anti-HIV diarylpyrimidine-quinolone hybrids and their mode of action. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 3860–3868

- 13 Feng X, Zeng Z, Liang Y, Chen F, Pannecouque C, Balzarini J, De Clercq E. Synthesis and biological evaluation of 4-(hydroxyimino)arylmethyl diarylpyrimidine analogues as potential non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 2370–2374
- 14 Zeng Z, Liang Y, Feng X, Chen F, Pannecouque C, Balzarini J, De Clercq E. Lead optimization of diarylpyrimidines as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Chem Med Chem*, 2010, 5: 837–840
- 15 Ma X, Yang S, Gu X, He Q, Chen F, De Clercq E, Balzarini J, Pannecouque C. Synthesis and anti-HIV activity of aryl-2-[(4-cyanophenyl)-amino]-4-pyrimidinone hydrazones as potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Chem Med Chem*, 2011, 6: 2225–2232
- 16 Gu S, He Q, Yang S, Ma X, Chen F, De Clercq E, Balzarini J, Pannecouque C. Synthesis and structure-activity relationship of novel diarylpyrimidines with hydromethyl linker (CH(OH)-DAPYs) as HIV-1 NNRTIs. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 5117–5124
- 17 Gu S, Li Z, Ma X, Yang S, He Q, Chen F, De Clercq E, Balzarini J, Pannecouque C. Chiral resolution, absolute configuration assignment and biological activity of racemic diarylpyrimidine CH(OH)-DAPY as potent nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2012, 53: 229–234
- 18 Meng G, Liu Y, Zheng A, Chen F, Chen W, De Clercq E, Pannecouque C, Balzarini J. Design and synthesis of a new series of modified CH-diarylpyrimidines as drug-resistant HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2014, 82: 600–611
- 19 Liu Y, Meng G, Zheng A, Chen F, Chen W, De Clercq E, Pannecouque C, Balzarini J. Design and synthesis of a new series of cyclopropylamino-linking diarylpyrimidines as HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 62: 334–341
- 20 Yan Z, Huang X, Wu H, Chen W, He Q, Chen F, De Clercq E, Pannecouque C. Structural modifications of CH(OH)-DAPYs as new HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 2535–2541
- 21 Yan Z, Wu H, Chen W, Wu Y, Piao H, He Q, Chen F, De Clercq E, Pannecouque C. Synthesis and biological evaluation of CHX-DAPYs as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 3220–3226
- 22 Heeres J, Jonge MR, Koymans LMH, Daeyaert FFD, Vinkers M, van Aken KJA, Arnold E, Das K, Kilonda A, Hoornaert GJ, Compennolle F, Cegla M, Azzam RA, Andries K, Béthune M, Azijn H, Pauwels R, Lewi PJ, Janssen PAJ. Design, synthesis, and SAR of a novel pyrazinone series with non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *J Med Chem*, 2005, 48: 1910–1918
- 23 Tian X, Qin B, Lu H, Lai W, Jiang S, Lee K, Chen CH, Xie L. Discovery of diarylpyridine derivatives as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 5482–5485
- 24 Zeng Z, He Q, Liang Y, Feng X, Chen F, De Clercq E, Balzarini J, Pannecouque C. Hybrid diarylbenzopyrimidine non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors as promising new leads for improved anti-HIV-1 chemotherapy. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 5039–5047
- 25 Qin B, Jiang X, Lu H, Tian X, Barbault F, Huang L, Qian K, Chen C, Huang R, Jiang S, Lee K, Xie L. Diarylaniline derivatives as a distinct class of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Med Chem*, 2010, 53: 4906–4916
- 26 Tian X, Qin B, Wu Z, Wang X, Lu H, Morris-Natschke SL, Chen CH, Jiang S, Lee K, Xie L. Design, synthesis, and evaluation of diarylpyridines and diarylanilines as potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *J Med Chem*, 2010, 53: 8287–8297
- 27 Sun L, Zhu L, Qian K, Qin B, Huang L, Chen CH, Lee K, Xie L. Design, synthesis, and preclinical evaluations of novel 4-substituted 1,5-diarylanilines as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) drug candidates. *J Med Chem*, 2012, 55: 7219–7229
- 28 Chen W, Zhan P, Rai D, De Clercq E, Pannecouque C, Balzarini J, Zhou Z, Liu H, Liu X. Discovery of 2-pyridone derivatives as potent HIV-1 NNRTIs using molecular hybridization based on crystallographic overlays. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 1863–1872
- 29 Wang J, Zhan P, Li Z, Liu H, De Clercq E, Pannecouque C, Liu X. Discovery of nitropyridine derivatives as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors via a structure-based core refining approach. *Eur J Med Chem*, 2014, 76: 531–538
- 30 Liu Z, Chen W, Zhan P, De Clercq E, Pannecouque C, Liu X. Design, synthesis and anti-HIV evaluation of novel diarylnicotinamide derivatives (DANAs) targeting the entrance channel of the NNRTI binding pocket through structure-guided molecular hybridization. *Eur J Med Chem*, 2014, 87: 52–62
- 31 Kertesz DJ, Brotherton-Pleiss C, Yang M, Wang Z, Lin X, Qiu Z, Hirschfeld DR, Gleason S, Mirzadegan T, Dunten PW, Harris SF, Villaseñor AG, Hang JQ, Heilek GM, Klumpp K. Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses. Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 4215–4218
- 32 Tang G, Kertesz DJ, Yang M, Lin X, Wang Z, Li W, Qiu Z, Chen J, Mei J, Chen L, Mirzadegan T, Harris SF, Villaseñor AG, Fretland J, Fitch WL, Hang JQ, Heilek G, Klumpp K. Exploration of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *N-phenyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses. Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 6020–6023
- 33 Wan Z, Tao Y, Wang Y, Mao T, Yin H, Chen F, Piao H, De Clercq E, Daelemans D, Pannecouque C. Hybrid chemistry: part 4. Discovery of etravirine-VRX-480773 hybrids as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 4248–4255
- 34 Mugnaini C, Alongi M, Togninelli A, Gevariya H, Brizzi A, Manetti F, Bernardini C, Angeli L, Tafi A, Bellucci L, Corelli F, Massa S, Maga G, Samuele A, Facchini M, Clotet-Codina I, Armand-Ugon M, Este JA, Botta M. Dihydro-alkylthio-benzyl-oxypyrimidines as inhibitors of reverse

- transcriptase: synthesis and rationalization of the biological data on both wild-type enzyme and relevant clinical mutants. *J Med Chem*, 2007, 50: 6580–6595
- 35 Pannecouque C, Daelemans D, De Clercq E. Tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of HIV replication inhibitors: revisited 20 years later. *Nat Protoc*, 2008, 3: 427–434
- 36 Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 1984, 224: 497–500
- 37 Tucker TJ, Sagar S, Sisko JT, Tynebor RM, Williams TM, Felock PJ, Flynn JA, Lai M, Liang Y, McGaughey G, Liu M, Miller M, Moyer G, Munshi V, Perlow-Poehnelt R, Prasad S, Sanchez R, Torrent M, Vacca JP, Wan B, Yan Y. The design and synthesis of diaryl ether second generation HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) with enhanced potency versus key clinical mutations. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 2959–2966

Design, synthesis and biological evaluation of *S*-DAPY derivatives as novel HIV-1 inhibitors

Zhengyong Wan¹, Fener Chen^{1,2*}, Erik De Clercq³, Dirk Daelemans³, Christophe Pannecouque³

¹ Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China

² Institute of Biomedical Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

³ Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

*Corresponding author (email: rfchen@fudan.edu.cn)

Abstract: In our previous studies, we combined the pharmacophoric group of etravirine and VRX-480773 using structure-guided molecular hybridization strategy, which led to the identification of *S*-DAPYs with an amide subunit that exhibited moderate potency against wild-type HIV-1 strain. However, Maurizo's discovering of *S*-DAPYs without the amide subunit showed excellent potency against HIV-1. To investigate the effect of the amide subunit on antiviral activity, a series of novel *S*-DAPYs derivatives without the amide subunit were synthesized and evaluated for their anti-HIV activities in MT-4 cell cultures. Biological results showed that three compounds (**6g**, **6m** and **6s**) exhibited moderate inhibitory activities against wild-type HIV-1 strain with EC₅₀ values ranging from 6.5 to 15.4 μmol/L, but inferior to that of the corresponding derivatives with the amide subunit. Molecular simulation revealed that a hydrogen bond was formed between the C=O of the amide moieties and the NH group of Lys103, and it provides ideas for more drug research in the treatment of AIDS.

Keywords: AIDS, reverse transcriptase, molecular hybridization, amide subunit, hydrogen bond, molecular simulation