具有SBLs和MBLs双重抑制活性的吡咯烷衍生物设计合成及逆转耐药菌活性研究

周应勋[1], 王万存[1,2], 欧慧萍[1], 吴占攀[1], 杨国春[1], 许 晨[2*], 金文彬[1,3*]

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 3. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 本研究以FDA批准药物卡托普利为基本结构, 以反式阿魏酸为原料, 以全合成的方式合成了全新未经报道的17个吡咯烷衍生物**5a**～**5p**、**6a**, 并与临床分离携带新德里金属-β-内酰胺酶 (New Delhi metal beta lactamase, NDM-1) 基因的肺炎克雷伯菌及携带肺炎克雷伯菌碳青酶烯酶-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbacyticase-2, KPC-2) 基因的革兰阴性大肠杆菌测试了体外抗菌活性。结果显示, **5j**可使美罗培南 (meropenem, MEM) 对含临床分离携带NDM-1基因的肺炎克雷伯菌最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 降低至32 μg·mL^{-1}, 优于阳性药卡托普利; **5l**、**5m**和**5o**可使MEM对含KPC-2的革兰阴性大肠杆菌的MIC降低至2 μg·mL^{-1}, 优于阳性药卡托普利; 部分吡咯烷衍生物分子对接结果提示了吡咯烷衍生物与NDM-1及KPC-2可能的结合方式。

关键词: 吡咯烷衍生物; 美罗培南; NDM-1; KPC-2; 抑制剂

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)09-2837-12

Design and synthesis of pyrrolidine derivatives with dual inhibitory activity of SBLs and MBLs and reversal of drug-resistant bacterial activity

ZHOU Ying-xun[1], WANG Wan-cun[1,2], OU Hui-ping[1], WU Zhan-pan[1], YANG Guo-chun[1], XU Chen[2*], JIN Wen-bin[1,3*]

(*1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in Universities of Yunnan and Faculty of Chinese Materia Medica, Kunming 650500, China*)

Abstract: In this study, 17 new unreported pyrrolidine derivatives **5a**－**5p**, **6a** were synthesized in a fully synthetic manner using the FDA-approved drug captopril as the basic structure, and the antimicrobial activity was tested *in vitro* against clinically isolated *Klebsiella pneumoniae* carrying the New Delhi metal beta lactamase (NDM-1) gene and Gram-negative *E. coli* carrying the Klebsiella pneumoniae carbacyticase-2 (KPC-2) gene. The results showed that **5j** could reduce the minimum inhibitory concentration (MIC) of meropenem (MEM) against clinically isolated *Klebsiella pneumoniae* containing NDM-1 to 32 μg·mL^{-1}, which was better than that of the positive drug captopril; **5l**, **5m**, and **5o** reduce the MIC of MEM against KPC-2-containing Gram-negative *E. coli* to 2 μg·mL^{-1}, which was better than that of the positive drug captopril; the virtual molecular docking results of

收稿日期: 2024-12-25; 修回日期: 2025-01-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104067); 云南省重大科技专项 (202303AC100025); 云南省基础研究专项 (202401AT070182); 云南省中医联合专项 (202301AZ070001-038).

*通讯作者 Tel: 86-511-86102010, E-mail: chenxu99916@126.com;
Tel: 86-871-65918232, E-mail: jin.wenbin@connect.polyu.hk

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1279

some pyrrolidine derivatives suggested the possible binding mode of pyrrolidine derivatives to NDM-1 and KPC-2.

Key words: pyrrolidine derivative; meropenem; NDM-1; KPC-2; inhibitor

20世纪20年代, 英国科学家弗莱明偶然在青霉菌中发现了青霉素, 随后, 越来越多的抗生素被发现和合成。临床使用的抗生素按结构特征可分为β-内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、氟喹诺酮类等, 抗生素通过抑制细菌DNA[1]、RNA[2]、蛋白质合成[3], 以及破坏细菌细胞壁[4]等方式来杀灭细菌, 自发现抗生素以来随着抗生素的发展和广泛使用人类医学也迎来了巨大的进步, 因此抗生素也被称为20世纪的伟大发现之一[5]。

随着抗生素的滥用、细菌的自然选择等, 细菌对抗生素逐渐产生了耐药性, 导致抗生素的疗效正在下降。细菌产生耐药性的机制主要为: ① 降低渗透性或增加抗生素的外排来减少细菌体内抗生素的浓度[6,7]; ② 修饰或改变细菌体内抗生素的作用靶点[8]; ③ 改变抗生素的结构使抗生素失活[9]; ④ 群落间形成生物膜[10]等方式抵抗抗生素。碳青霉烯耐药肠杆菌科 (carbapenem-resistant enterobacteriaceae, CRE) 属于革兰阴性杆菌, 它们通过产生碳青霉烯酶改变抗生素结构来获得耐药性, 碳青霉烯酶属于β-内酰胺酶 (beta lactamases, BLs)。

BLs通过改变β-内酰胺类抗生素结构来使其失活, 按Ambler分类BLs可分为[11] A～D 4类: A、C、D均属于丝氨酸β-内酰胺 (serine beta lactamases, SBLs), 它们通过活性位点丝氨酸上的羟基进攻β-内酰胺类抗生素而使其失活[12], KPC、AmpC和OXA均属于SBLs; 金属β-内酰胺酶 (metallo beta lactamase, MBLs) 属于B类BLs, 它主要依赖于自身的金属离子使β-内酰胺类抗生素失活, 根据氨基酸序列、锌离子结合位点及锌离子数量的不同, MBLs又可分为B1、B2和B3三类[13], NDM、VIM、IMP均属于MBLs[14]。MBLs因其结构的特殊性, 很难找到通用于MBLs的抑制剂[15], 目前全球没有任何一种抑制剂被批准用于临床抑制MBLs。

NDM-1属于B1类MBLs[16], NDM-1是由270个氨基酸残基组成的单链蛋白, 它的活性位点呈宽而浅的凹槽状, 其中包含两个二价锌离子, 它几乎可以水解包括碳青霉烯在内的所有β-内酰胺类抗生素, 因此β-内酰胺类抗生素对携带bla_{NDM-1}的细菌引起的感染几乎没有任何治疗作用, 且NDM-1可以通过质粒等基因转移, 因而在全球范围内传播迅速[17], 应尽快寻找可用于临床的NDM-1抑制剂。在过去的研究中, 许多文献报道了对NDM-1具有抑制效果的抑制剂[18-21], 这些抑制剂包括共价键抑制剂和非共价键抑制剂, 近期报道的部分非共价键抑制剂包括硫咪卡巴酮衍生物19bd[22]、新型甲基二硫代氨基甲酸酯衍生物compound 8A[23]、1,2,4-三唑-3-硫醚类化合物Cpd 8[24], 以及*L*-captopril[24]等 (图1A); 部分共价键抑制剂包括硝基喹啉衍生物ASN-1733[25]、鱼腥草苷及其磺酸盐衍生物SNH[26]、ebselen及其衍生物11-a38[27]、ebsulfur及其衍生物3a[28]等 (图1B), 但同样没有任何一种抑制剂被批准临床用于抑制NDM-1。

肺炎克雷伯菌碳青酶烯酶 (*Klebsiella pneumoniae* carbacyticase, KPC) 属于A类SBLs, 于1996年在北卡罗莱纳州发现并传播到其他国家。KPC-2属于KPC中的一种, 它可以水解舒巴坦、他唑巴坦和克拉维酸在内的FDA批准的β-内酰胺类抗生素和β-内酰胺酶抑制剂[29]。PHT427已被证明具有高效的KPC-2抑制活性IC_{50} = 2.04 μmol·L^{-1} [30]; 三唑取代的苯硼酸衍生物2e也报道出了极强的KPC-2抑制活性[31]; FDA批准的药物avibactam与头孢他啶联合使用时可抑制KPC-2的活性, 但avibactam会引发恶心、呕吐、肝酶升高, 严重时会引发癫痫、手部震颤等不良反应[32](图1C)。因此, 需要进一步寻找活性好且不良反应程度低的KPC-2抑制剂。

尽管很少有同一细菌内共存NDM-1和KPC-2的报道, 但在中国、印度及巴基斯坦已经鉴定出4株共同具有NDM-1和KPC-2的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌株[33]。如图1D所示, 目前已有文献报道NDM-1及KPC-2的共同抑制剂如: 杂芳基磷酸盐Compound 16[34]、卡托普利类似物MS01[35]及其衍生物、阿嗪二亚胺衍生物7dfm[36]及其衍生物、异羟钨酸盐衍生物[37]等均对NDM-1及KPC-2均表现了较强的抑制效果, 但同样没有任何一种小分子化合物被批准用于临床共同抑制NDM-1及KPC-2。因此, 寻找NDM-1和KPC-2共同抑制剂迫在眉睫。

L-Captoril虽然对NDM-1有抑制作用, 但含硫醇化合物会导致皮肤过敏、味觉丧失和呼吸困难等不良反应[38]。因此, 作者基于captopril的五元吡咯烷结构, 以反式阿魏酸为原料, 通过酯化, 硼酸催化等方式合成一系列不含巯基的1,3,4三取代吡咯烷衍生物[39](图1E), 通过单独使用及与美罗培南 (meropenem, MEM)联合使用治疗含*NDM-1*基因的肺炎克雷伯菌 (*Clinical* KP_{NDM-1}) 及含*KPC-2*基因的大肠杆菌 (*E coli* $EC600_{KPC-2}$)来评估合成的吡咯烷衍生物对NDM-1和KPC-2的抑制效果, 期待能寻找到不良反应弱且抗NDM-1和抗KPC-2活性好的吡咯烷衍生物。

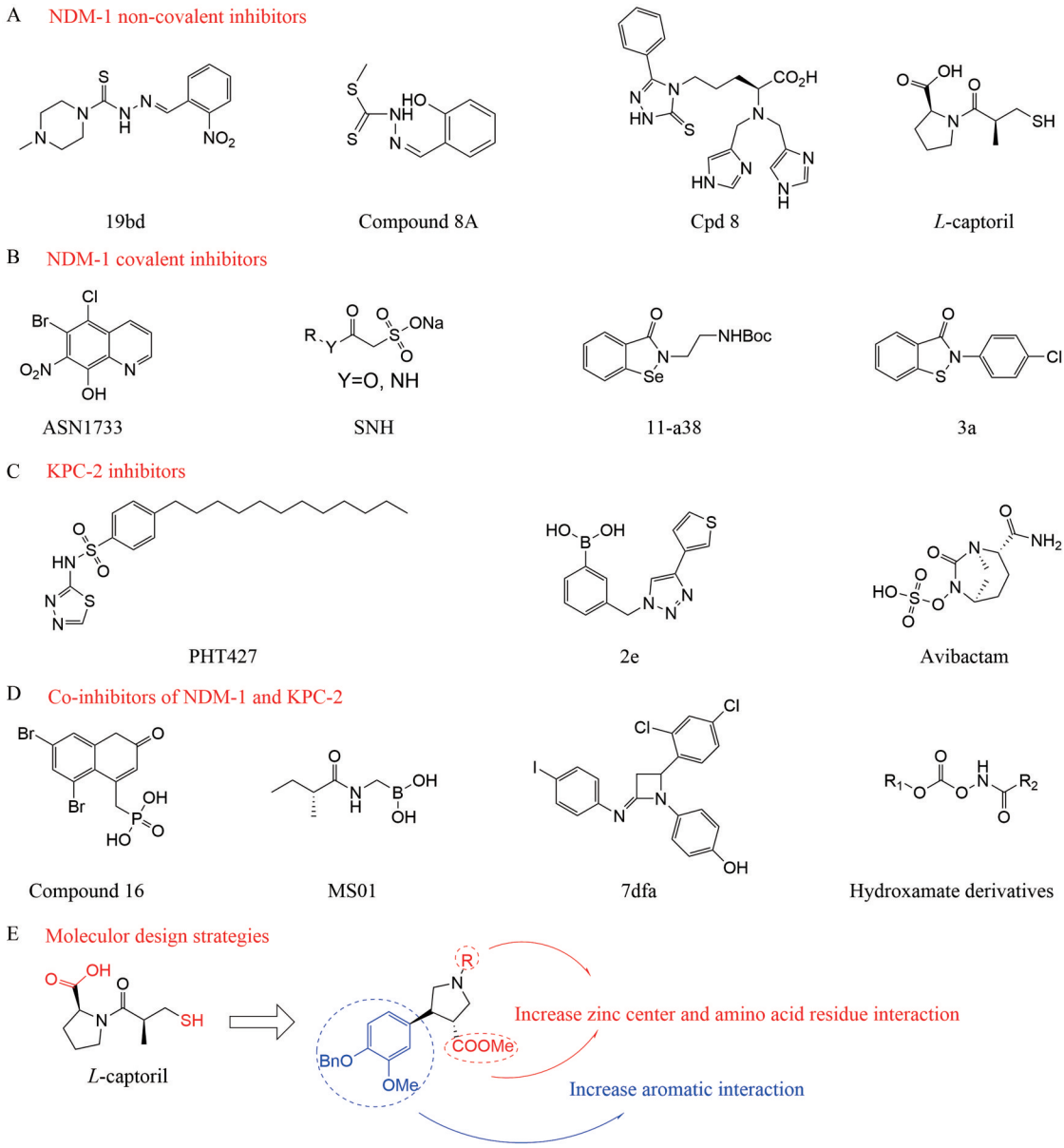


Figure 1 Partial NDM-1 and KPC-2 inhibitors and design of pyrrolidine derivatives. A: NDM-1 non-covalent inhibitors; B: NDM-1 covalent inhibitors; C: KPC-2 inhibitors; D: Co-inhibitors of NDM-1 and KPC-2; E: Moleculor design strategies

结果与讨论

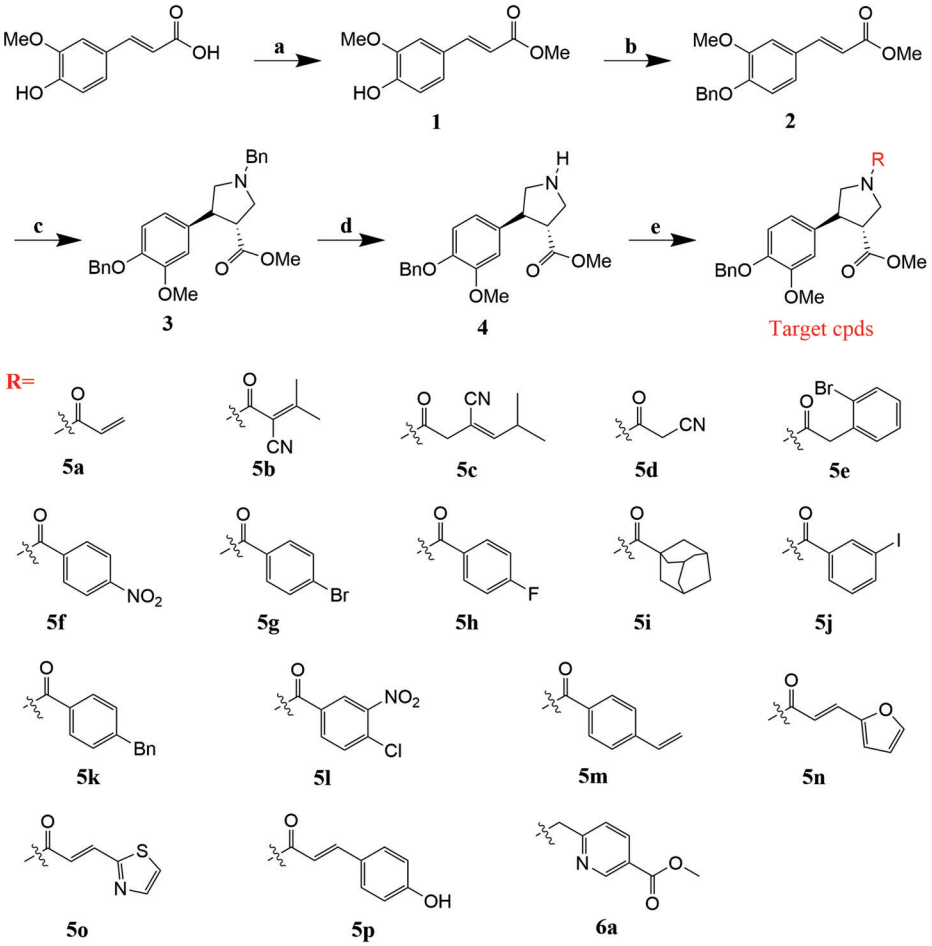
1 吡咯烷衍生物的合成路线设计

如合成路线1所示, 以反式阿魏酸为原料, 甲醇为溶剂, 在浓硫酸的催化下回流反应生成化合物**1**, 化合物**1**通过和溴化苄反应保护酚羟基生成化合物**2**。化合物**2**在硼酸的催化下与*N*-甲氧基甲基-*N*-(三甲基硅烷甲基)苄胺发生[3+2]环加成反应, 生成含五元吡咯烷的化合物**3**, 化合物**3**与1-氯乙基氯甲酸酯反应脱去吡咯烷氨基上的苄基生成关键中间体化合物**4**。化合物**4**分别与相应的酸和卤化物进行亲核取代反应共生成17个结构新颖的吡咯烷衍生物**5a**～**5p**、**6a**。所有新化合物都进行了高分辨质谱和NMR表征。

2 吡咯烷衍生物的抗菌活性

2.1 吡咯烷衍生物抗NDM-1活性 吡咯烷衍生物抗NDM-1活性结果如表1所示, 所合成的17个吡咯烷衍生物与阳性药captopril单独使用治疗*Clinical KP*$_{NDM-1}$时均无明显抑菌活性 [最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) > 256 μg·mL^{-1}], **5j**和美罗培南(meropenem, MEM)联合使用可使MEM最低抑菌浓度降低至32 μg·mL^{-1}, 活性优于阳性药captopril, FIC = 0.375, 联合抑菌指数显示**5j**和MEM联合用于治疗*Clinical KP*$_{NDM-1}$时具有相互协同作用。

2.2 吡咯烷衍生物抗KPC-2活性 吡咯烷衍生物抗KPC-2活性结果如表2所示。合成的17个吡咯烷衍生



Scheme 1 The synthesis route for pyrrolidine derivative. Reagents and reaction conditions: a: MeOH, H_2SO_4, reflux; b: Benzyl bromide, Et_3N, K_2CO_3, acetone, reflux; c: *N*-(Methoxymethyl)-*N*-(trimethylsilylmethyl) benzylamine, H_3BO_3, DCM; d: (i) 1-Chloroethyl chloroformate, DCM, reflux; (ii) MeOH reflux; e: (i) HATU, DIEPA, DMF; (ii) DEIPA, DCM

物中与阳性药captopril单独使用治疗*E coli EC600*$_{KPC-2}$时无明显抑菌活性 (MIC > 128 μg·mL^{-1}); 与MEM联合使用**5a**、**5j**、**5l**、**5m**、**5n**、**5o**及**6a**活性均优于阳性药captopril。**5l**、**5m**、**5o**可使MEM的最低抑菌浓度降低至2 μg·mL^{-1}, FIC = 0.14显示上述3个化合物和MEM联合使用治疗*E coli EC600*$_{KPC-2}$时具有相互协同作用; **5a**、**5j**、**5n**、**6a**可使MEM的最低抑菌浓度降低至8 μg·mL^{-1}, FIC = 0.56表明上述4个化合物和MEM联合使用治疗*E coli EC600*$_{KPC-2}$时表现出相加作用。

3 部分吡咯烷衍生物的分子对接结果

化合物**5j**与NDM-1 (ID: 5ZGE)的分子对接结果如图2A所示, 结合能为−8.11 kcal·mol^{-1}, **5j**分别与NDM-1的氨基酸残基Lys181和Lys242形成氢键, 氢键长度小于3.0 Å, 提示**5j**与NDM-1能够结合; 化合物**5j**与KPC-2 (PDB ID: 3RXX)对接结果如图2B所示, 结合能为−7.58 kcal·mol^{-1}, 与氨基酸残基Trp105、Ser106和Glu110能够形成氢键, 但部分氢键长度大于3.0 Å, 对接结果提示在生理条件下, **5j**可能与KPC-2结合并对KPC-2的活性发挥具有一定的抑制作用; 化合物**5l**与KPC-2 (PDB ID: 3RXX)分子对接结果如图2C所示, 结合能为−9.0 kcal·mol^{-1}, **5l**分别与KPC-2的氨基酸残基Ser70、Lys73、Asn132和Thr237形成氢键, 长度均小于3.0 Å。与**5j**相比, **5l**与KPC-2蛋白的结合能更低, 氢键长度更短, 连接氨基酸残基更多, 提示**5l**与KPC-2结合更紧密, 可能抑制活性更强, 虚拟对接结果与抗菌活性结果显示一致, 佐证了所合成的吡咯烷衍生物对NDM-1和KPC-2的抑制活性。

4 讨论

本研究基于卡托普利对NDM-1的抑制作用, 以反式阿魏酸为原料, 通过酯化、取代及加成等反应合成了17个新的吡咯烷衍生物。在合成的吡咯烷衍生物中期待吡咯烷4位上苯基可增强与NDM-1及KPC-2的芳香亲和性, 吡咯烷3位上的羧酸甲酯及1位氮原子上的R基期待可增强对NDM-1锌离子和氨基酸残基及KPC-2的氨基酸残基的亲和性; 通过与NDM-1和KPC-2的芳香基团、氨基酸残基及锌离子结合从而发

Table 1 The anti-NDM-1 activity of pyrrolidine derivatives. MIC: Minimum inhibitory concentration; MEM: Meropenem; RF: MIC_{MEM} / $MIC_{compd.}$ + MEM; FIC: MEM and compound combined antibacterial index; N.A: The result is meaningless

Compd.	MIC/μg·mL^{-1}		RF	FIC
	Compd.	Compd. + MEM		
MEM	128	N.A	N.A	N.A
Captopril	> 256	> 128	1	1.5
5a	> 256	> 128	1	1.5
5b	> 256	> 128	1	1.5
5c	> 256	> 128	1	1.5
5d	> 256	> 128	1	1.5
5e	> 256	> 128	1	1.5
5f	> 256	> 128	1	1.5
5g	> 256	> 128	1	1.5
5h	> 256	> 128	1	1.5
5i	> 256	> 128	1	1.5
5j	> 256	32	4	0.375
5k	> 256	> 128	1	1.5
5l	> 256	> 128	1	1.5
5m	> 256	> 128	1	1.5
5n	> 256	> 128	1	1.5
5o	> 256	> 128	1	1.5
5p	> 256	> 128	1	1.5
6a	> 256	> 128	1	1.5

Table 2 The anti-KPC-2 activity of pyrrolidine derivatives

Compd.	MIC/μg·mL^{-1}		RF	FIC
	Compd.	Compd. + MEM		
MEM	16	N.A	N.A	N.A
Captopril	> 128	16	1	1.13
5a	> 128	8	2	0.56
5b	> 128	16	1	1.13
5c	> 128	16	1	1.13
5d	> 128	16	1	1.13
5e	> 128	16	1	1.13
5f	> 128	16	1	1.13
5g	> 128	16	1	1.13
5h	> 128	16	1	1.13
5i	> 128	16	1	1.13
5j	> 128	8	2	0.56
5k	> 128	16	1	1.13
5l	> 128	2	8	0.14
5m	> 128	2	8	0.14
5n	> 128	8	2	0.56
5o	> 128	2	8	0.14
5p	> 128	16	1	1.13
6a	> 128	8	2	0.56

挥对NDM-1及KPC-2的抑制作用。

通过分析吡咯烷衍生物单独用药和联合用药的抑菌结果及分子对接结果可知, **5j**通过抑制NDM-1活性且抑制效果强于阳性药captopril, 可使MEM在低浓度下发挥更高效的杀菌作用; **5a**、**5j**、**5l**、**5m**、**5n**、**5o**及**6a**均可抑制KPC-2的活性且抑制效果强于captopril, **5l**、**5m**、**5o**对KPC-2的抑制效果强于**5a**、**5j**、**5n**。分子对接佐证了吡咯烷衍生物对NDM-1及KPC-2的抑制活性。

通过分析不同吡咯烷衍生物的抗NDM-1及KPC-2活性可知, 在合成的吡咯烷衍生物中, 在R基苯环的间位连接卤素原子时对NDM-1的抑制活性优于R基苯环对位连接卤素原子及R基为杂环取代基和脂肪链取代基的吡咯烷衍生物, 提示R基苯环间位的卤素原子可能是发挥抗NDM-1活性的重要部分; 当R基为含杂原子的取代基时, 抗KPC-2的活性优于R基为苯环及脂肪链的吡咯烷衍生物, 提示杂原子是对KPC-2抑制剂发挥活性的关键基团。

综上所述, **5j**、**5l**、**5m**和**5o**抗NDM-1及KPC-2活性较好, 对NDM-1及KPC-2小分子抑制剂的开发奠定了一定基础, 值得进一步研究其抑制NDM-1及KPC-2的作用机制, 以及进一步将吡咯烷3位羧酸甲酯水解后继续在羧酸基团上引入苯环间位有卤素原子和杂原子的基团以期获得活性更好的NDM-1及KPC-2抑制剂。

实验部分

本研究所有化合物^{1}H NMR及^{13}C NMR使用核磁共振仪 (Bruker Avance III 600MHz; Bruker Avance III 400 MHz, 布鲁克公司); 四极杆串联飞行时间质谱仪 (Agilent 6545LC/Q-TOF, 安捷伦技术有限公司); 旋转蒸发仪 (RE212-B, 雅马拓科技贸易公司); 超声波清洗器 (KQ5200B, 巩义市予华仪器有限责任公司); 旋片式真空泵 (2XZ-2, 临海市谭式真空设备有限公司); 循环水式多用真空泵 (SHB-III, 郑州长城科工贸有限公司); 分光光度计 (Molecular Devices CMax Plus, Molecular Devices, LLC.); 低温冷却循环泵 (DLSB-510, 巩义市予华仪器有限责任公司); 分析天平 [CP124C, 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司]; 立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-50KB, 上海申安医疗机械厂); 电热恒温培养箱 (DNP-9272, 上海精宏实验设备有限公司); 硅胶 (青岛海洋化工厂有限公司); 浓硫酸、丙酮 (云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司); MH肉汤 (1089790, Thermo Fisher Scientific公司); LB营养琼脂 (HB0129, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 其余均为阿拉丁市售分析纯或化学纯试剂。

1 吡咯烷衍生物的合成

1.1 (*E*)-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)丙烯酸甲酯 (1) 的合成 在100 mL反应瓶中加入10.00 g (51.50 mmol)反式阿魏酸, 加入过量甲醇超声使反式阿魏酸溶解后, 滴加2滴浓硫酸, 90 ℃下恒温回流反应8 h, 薄层色谱 (TLC) 检测反应完全后减压蒸干为油状物, 用乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 使其溶解, 加水和EA萃取3次, 取有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤加硅胶减压蒸干, 色谱

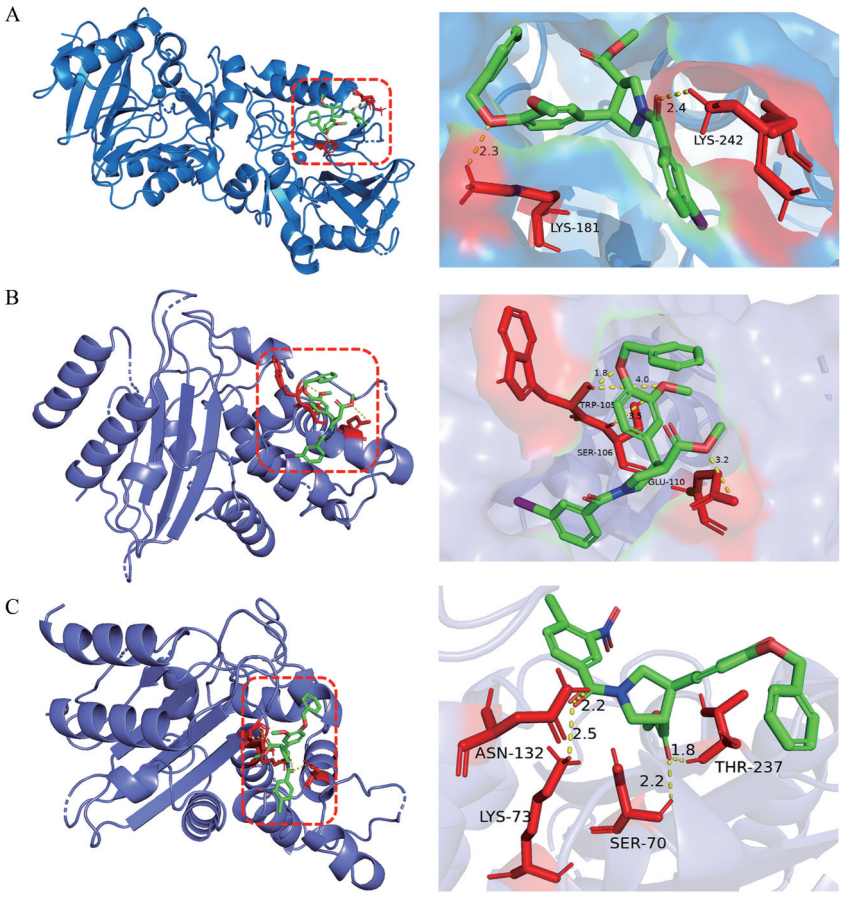


Figure 2 The docking results of different compounds with NDM-1 (PDB ID: 5ZGE) and KPC-2 (PDB ID: 3RXX). A: **5j** with NDM-1; B: **5j** with KPC-2; C: **5l** with KPC-2

柱纯化, 石油醚 (petroleum ether, PE)∶乙酸乙酯 (EA) = 4∶1 洗脱后得黄色油状物 **1** (9.10 g, 43.78 mmol), 产率为 85.05%。

1.2 (*E*)-3-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸甲酯 (2) 的合成 在 100 mL 反应瓶中加入 1 倍量的化合物 **1** (2.04 g, 9.81 mmol), 丙酮溶解, 加入 1.5 倍量的溴化苄 (2.51 g, 14.68 mmol) 和 1 倍量的碳酸钾 (1.85 g, 9.81 mmol), 在 75 ℃下回流反应 2 h。在回流反应过程中溶液逐渐变黄, 2 h 后加入 1.5 倍量的三乙胺 (1.49 g, 14.72 mmol) 继续反应 4 h 至溶液变白。4 h 后 TLC 检测反应完全后将反应液冷却至室温, 过滤, 弃滤渣, 减压蒸干滤液用 EA 和水萃取 3 次, 取有机相加无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤加压蒸干得产物 **2** (2.50 g, 8.38 mmol), 产率为 85.43%。该反应所得化合物具有足够纯度可直接用于下一步反应。

1.3 (3*R*,4*R*)-1-苄基-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (3) 的合成 在 100 mL 反应瓶中加入 1 倍量的化合物 **2** (2.50 g, 8.38 mmol), 加入二氯甲烷 (dichloromethane, DCM) 使其溶解, 缓慢滴加 1.5 倍量的 *N*-甲氧基甲基-*N*-(三甲基硅烷甲基)苄胺 (3.00 g, 12.64 mmol) 和硼酸 (30 mg, 0.50 mmol)。室温下反应 48 h 后将反应液加硅胶减压蒸干, 色谱柱纯化, PE∶EA = 20∶1 洗脱得黄色油状物化合物 **3** (2.29 g, 5.68 mmol), 产率为 67.78%。

1.4 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (4) 的合成 在 100 mL 反应瓶中加入 1 倍量的产物 **3** (2.29 g, 5.68 mmol), 用 DCM 使其完全溶解, 加入 1.5 倍量的 1-氯乙基氯甲酸酯 (1.14 g, 7.97 mmol), 50 ℃加热回流反应。3 h 后将反应液减压蒸干, 加入 MeOH 使其溶解, 70 ℃加热回流反应 3 h, TLC 检测后, 减压蒸干溶剂, 加 DCM 使其刚好溶解后加硅胶减压蒸干, 色谱柱纯化, DCM∶MeOH = 10∶1 洗脱得黄色油状物化合物 **4** (1.40 g, 4.48 mmol), 产率为 78.87%。

1.5 (3*R*,4*R*)-1-丙烯酰基-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5a) 的合成 在 25 mL 反应瓶中加入 1.5 倍量的丙烯酸 (0.03 g, 0.44 mmol) 加入 DMF 刚好使其溶解后加入 1.5 倍量的 *N*-(二甲基氨基)-1*H*-1,2,3-三唑-4,5-b 吡啶-1-亚甲基-*N*-甲基甲铵六氟磷酸酯-*N*-氧化物 (HATU) (0.17 g, 0.44 mmol), N_2 保护下反应 20 min 后加入 1 倍量的化合物 **4** (0.10 g, 0.29 mmol)

和1.5倍量的*N*,*N*′-二异丙基乙胺 (*N*,*N*-diisopropylethylamine, DIEPA) (0.06 g, 0.44 mmol)[40], 室温下反应过夜。TLC检测反应完全后, 用水和DCM萃取3次, 取有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 加硅胶减压蒸干溶剂, 色谱柱纯化, PE∶EA = 2∶1洗脱得油状产物**5a** (0.90 g, 0.23 mmol), 产率为78.47%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.12～3.27 (m, 1H), 3.58～3.63 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.68～3.79 (m, 1H), 3.88 (d, *J* = 4.28 Hz, 3H), 3.96～4.16 (m, 3H), 5.13 (s, 2H), 5.67～5.76 (m, 1H), 6.36～6.46 (m, 2H), 6.70～6.74 (m, 1H), 6.76～6.79 (m, 1H), 6.82～6.88 (m, 1H), 7.29～7.33 (m, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.40 Hz, 2H), 7.41～7.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 27.73, 46.01, 47.62, 48.81, 48.82, 50.86, 71.04, 111.06, 114.19, 119.08, 127.27, 127.90, 127.98, 128.32, 128.57, 128.85, 130.92, 131.67, 137.08, 147.66, 149.87, 164.29, 172.50; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{25}NO_5$ $[M+Na]^+$ 418.166 6, found 418.163 0。

1.6 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(2-氰基-3-甲基丁-2-烯酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5b) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的2-氰基-3-甲基丁-2-烯酸 (0.03 g, 0.44 mmol), 其余操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 3∶1洗脱后得产物**5b** (0.11 g, 0.24 mmol), 产率为82.28%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 2.81 (s, 6H), 3.22 (dd, *J* = 8.56, 2.45 Hz, 1H), 3.58～3.72 (m, 5H), 3.82 (t, *J* = 8.07 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.90～4.13 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 6.69～6.78 (m, 2H), 6.84 (dd, *J* = 8.25, 3.48 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.21 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.46 Hz, 2H), 7.40～7.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 22.29, 24.42, 38.63, 46.04, 47.74, 52.36, 53.83, 56.13, 71.04, 107.58, 110.82, 114.25, 115.01, 119.08, 127.27, 127.89, 128.57, 130.91, 131.52, 137.03, 147.75, 149.92, 161.00, 171.85, 172.31; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{28}N_2O_5$ $[M+Na]^+$ 471.185 3, found 471.189 6。

1.7 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(2-氰基-4-甲基戊-2-烯酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5c) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的*E*-2-氰基-4-甲基戊-2-烯酸 (0.06 g, 0.43 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, DCM∶MeOH = 30∶1洗脱后得产物**5c** (0.09 g, 0.19 mmol), 产率为67.09%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 1.11～1.19 (m, 7 H) 2.90～3.06 (m, 1H), 3.16～3.27 (m, 1H), 3.61～3.70 (m, 4H), 3.76～3.86 (m, 1H), 3.88 (d, *J* = 1.47 Hz, 3H), 3.95～4.08 (m, 1H), 4.11～4.19 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 6.70～6.75 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.82～6.86 (m, 1H), 7.25 (d, *J* = 10.51 Hz, 1H), 7.29～7.33 (m, 1H), 7.34～7.40 (m, 2H), 7.41～7.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 21.24, 21.52, 31.47, 31.74, 45.69, 48.48, 50.07, 52.33, 56.12, 71.06, 108.97, 110.91, 111.15, 114.25, 119.18, 127.26, 127.89, 128.58, 130.63, 137.01, 149.89, 167.54, 172.19; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{30}N_2O_5$ $[M+Na]^+$ 485.213 5, found 485.205 2。

1.8 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(2-氰基乙酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5d) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的氰乙酸 (0.04 g, 0.47 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 1∶1洗脱后得产物**5d** (0.09 g, 0.22 mmol), 产率为75.98%。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.19 (q, *J* = 8.72 Hz, 1H), 3.43 (s, 1H), 3.47 (s, 1H), 3.55～3.61 (m, 1H), 3.66 (d, *J* = 6.36 Hz, 3H), 3.69～3.73 (m, 1H), 3.75～3.84 (m, 1H), 3.88 (d, *J* = 4.36 Hz, 3H), 3.89～3.93 (m, 1H), 4.02～4.07 (m, 1H), 5.12～5.15 (m, 2H), 6.69～6.72 (m, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.17, 4.00 Hz, 1H), 7.28～7.32 (m, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 7.45 Hz, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 25.75, 46.08, 47.72, 49.77, 52.82, 53.28, 56.08, 70.35, 111.88, 113.99, 119.97, 121.11, 128.21, 128.86, 131.70, 137.65, 147.48, 149.63, 161.44, 161.48, 172.63; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{24}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 409.176 1, found 409.176 3。

1.9 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(2-(2-溴苯基)乙酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5e) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的2-溴苯乙酸 (0.11 g, 0.51 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 4∶1洗脱后得产物**5e** (0.11 g, 0.20 mmol) 产率为70.45%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.16 (d, *J* = 9.05 Hz, 1H), 3.24 (d, *J* = 8.56 Hz, 1H), 3.53～3.62 (m, 2H), 3.63～3.66 (m, 3H), 3.67～3.72 (m, 1H), 3.74～3.78 (m, 2H), 3.87 (d, *J* = 1.22 Hz, 3H), 3.96 (ddd, *J* = 14.18, 10.15, 7.95 Hz, 1H), 4.02～4.14 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 6.66～6.85 (m, 3H), 7.08～7.16 (m, 1H), 7.26～7.33 (m, 3H), 7.33～7.39 (m, 2H), 7.40～7.45 (m, 2H), 7.52～7.57 (m, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 41.73, 46.10, 47.58, 48.95, 50.93, 52.33, 56.13, 71.05, 110.99, 114.17, 119.02, 124.78, 127.24, 127.71, 127.90, 128.56, 128.77, 131.19, 132.72, 134.53, 137.07, 147.67, 149.86, 168.72, 172.16; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{28}H_{28}BrNO_5$ $[M+H]^+$ 540.121 2, found 540.120 9。

1.10 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(4-硝基苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5f) 的合成 在25 mL

的反应瓶中加入1.5倍量的对硝基苯甲酸 (0.07 g, 0.42 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 4∶1 洗脱后得产物**5f** (105.20 mg, 0.21 mmol), 产率为73.96%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.11～3.37 (m, 1H), 3.58～3.71 (m, 4H), 3.71～3.84 (m, 2H), 3.88 (d, *J* = 15.28 Hz, 3H), 4.06～4.24 (m, 2H), 5.13 (d, *J* = 12.10 Hz, 2H), 6.62～6.74 (m, 1H), 6.74～6.89 (m, 2H), 7.29～7.46 (m, 5H), 7.73 (d, *J* = 8.31 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.31 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.31 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.44 Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 29.70, 46.37, 47.86, 48.65, 52.36, 56.12, 71.01, 110.97, 111.08, 114.18, 118.87, 119.15, 123.80, 127.22, 127.92, 128.31, 128.58, 130.90, 131.24, 137.01, 142.04, 147.75, 148.75, 149.89, 167.23, 172.41; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{26}N_2O_7$ $[M+H]^+$ 491.181 3, found 491.181 2。

1.11 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(4-溴苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5g) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的对溴苯甲酸 (0.09 g, 0.45 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 6∶1 洗脱后得产物**5g** (102.04 mg, 0.19 mmol), 产率为65.52%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.07～3.34 (m, 1H), 3.61 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.84～3.91 (m, 4H), 5.13 (d, *J* = 8.68 Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.80 (s, 2H), 7.31 (d, *J* = 7.09 Hz, 1H), 7.36 (br s, 2H), 7.42 (t, *J* = 8.25 Hz, 4H), 7.51～7.59 (m, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 29.71, 46.43, 47.82, 48.73, 51.02, 52.05, 56.10, 71.04, 110.94, 111.09, 114.17, 118.93, 119.24, 124.75, 127.23, 127.90, 128.57, 128.98, 131.65, 134.95, 137.01, 147.65, 149.84, 168.46, 172.56; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{26}BrNO_5$ $[M+Na]^+$ 546.087 8, found 546.089 2。

1.12 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(4-氟苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5h) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的对氟苯甲酸 (0.06 g, 0.43 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 6∶1 洗脱后得产物**5h** (96.70 mg, 0.21 mmol), 产率为71.94%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.07～3.35 (m, 1H), 3.61 (br s, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.70～3.85 (m, 2H), 3.88 (d, *J* = 9.41 Hz, 4H), 4.13 (br s, 1H), 5.13 (d, *J* = 6.72 Hz, 2H), 6.71 (br s, 1H), 6.76～6.89 (m, 2H), 7.04～7.15 (m, 2H), 7.31 (d, *J* = 7.09 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.03 Hz, 2H), 7.40～7.46 (m, 2H), 7.56 (d, *J* = 5.26 Hz, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 29.70, 46.47, 47.85, 48.78, 49.22, 51.05, 56.09, 71.04, 110.94, 111.10, 114.16, 118.96, 119.26, 127.23, 127.90, 128.57, 129.62, 137.01, 147.64, 149.84, 168.50, 172.59; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{26}FNO_5$ $[M+H]^+$ 464.187 0, found 464.187 3。

1.13 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(金刚烷-1-羰基)-吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5i) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的金刚烷酸 (0.08 g, 0.44 mmol), 其余反应操作和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 4∶1 洗脱后得产物**5i** (114.55 mg, 0.23 mmol), 产率为78.43%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 1.72 (br s, 6H), 1.97～2.07 (m, 9H), 3.09 (d, *J* = 8.80 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 7.82 Hz, 1H), 3.61～3.69 (m, 4H), 3.83 (br s, 1H), 3.88 (s, 3H), 4.04～4.20 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.71～6.75 (m, 1H), 6.77 (d, *J* = 1.96 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.31 Hz, 1H), 7.27～7.33 (m, 1H), 7.33～7.39 (m, 2H), 7.40～7.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 14.20, 21.06, 28.09, 28.19, 28.31, 29.70, 36.46, 36.59, 38.19, 39.32, 41.77, 52.19, 54.26, 56.10, 60.40, 71.06, 111.08, 114.14, 119.24, 127.25, 127.87, 128.56, 132.08, 137.10, 147.55, 149.82, 175.89; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{31}H_{37}NO_5$ $[M+H]^+$ 504.275 4, found 504.275 0。

1.14 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(3-碘苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5j) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的3-碘苯甲酸 (0.11 g, 0.44 mmol), 其余反应条件和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 6∶1 洗脱后得产物**5j** (135.62 mg, 0.24 mmol), 产率为81.84%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.08～3.35 (m, 1H), 3.62 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.77 (d, *J* = 11.74 Hz, 2H), 3.88 (d, *J* = 9.41 Hz, 4H), 4.07～4.18 (m, 1H), 5.13 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H), 6.64～6.76 (m, 1H), 6.76～6.88 (m, 2H), 7.09～7.23 (m, 1H), 7.29～7.33 (m, 1H), 7.33～7.45 (m, 5H), 7.46～7.52 (m, 1H), 7.70～7.80 (m, 1H), 7.83～7.92 (m, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 28.67, 45.40, 46.80, 47.75, 49.98, 51.29, 55.07, 70.01, 117.94, 125.25, 126.20, 126.87, 127.54, 129.06, 135.05, 135.96, 137.09, 137.93, 138.20, 139.94, 141.14, 146.65, 148.84, 166.72, 171.49; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{26}INO_5$ $[M+H]^+$ 572.092 9, found 572.093 4。

1.15 (3*R*,4*R*)-4-(4-苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(4-苄基苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5k) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的4-苄基苯甲酸 (0.09 g, 0.42 mmol), 其余条件和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 3∶1纯化后得产物**5k** (104.05 mg, 0.19 mmol), 产率为66.98%。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 2.96 (d, *J* = 19.80 Hz, 2H), 3.30～3.44 (m, 1H), 3.51 (s, 1H), 3.56～3.67 (m, 2H), 3.83～3.88 (m, 2H), 3.91 (s, 1H), 3.95～4.04 (m,

2H), 5.08 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 6.45 (d, J = 7.81 Hz, 1H), 6.48～6.58 (m, 1H), 6.65 (d, J = 8.17 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.36 Hz, 1H), 7.13～7.16 (m, 1H), 7.18～7.23 (m, 3H), 7.23～7.26 (m, 1H), 7.27～7.32 (m, 3H), 7.33 (d, J = 5.45 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.08 Hz, 2H), 7.37～7.41 (m, 2H), 7.44 (d, J = 7.45 Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 39.37, 48.26, 48.45, 51.36, 52.00, 55.98, 60.05, 71.07, 111.03, 111.25, 114.03, 119.08, 119.28, 126.23, 126.46, 127.19, 127.30, 127.84, 128.30, 128.44, 128.55, 129.38, 130.63, 130.87, 130.99, 137.05, 138.23, 140.50, 147.53, 149.61, 165.68, 172.22; HRMS m/z Calcd. for $C_{34}H_{33}NO_5$ $[M+H]^+$ 536.243 2, found 536.243 7。

1.16 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(4-氯-3-硝基苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5l) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的4-氯-3-硝基苯甲酸(0.09 g, 0.44 mmol), 其余反应条件和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, PE∶EA = 4∶1洗脱后得产物**5l** (86.61 mg, 0.16 mmol), 产率为56.89%。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.53～3.58 (m, 1H), 3.62～3.69 (m, 3H), 3.72～3.79 (m, 1H), 3.82 (d, J = 8.17 Hz, 1H), 3.88 (d, J = 16.17 Hz, 3H), 3.95 (dd, J = 12.17, 9.26 Hz, 1H), 4.10～4.17 (m, 1H), 5.13 (d, J = 13.44 Hz, 2H), 6.67 (d, J = 7.99 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.76 (d, J = 7.99 Hz, 1H), 6.78～6.88 (m, 1H), 7.30 (d, J = 6.18 Hz, 1H), 7.36 (q, J = 7.39 Hz, 2H), 7.39～7.46 (m, 2H), 7.57～7.66 (m, 1H), 7.71 (dd, J = 19.16, 8.08 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 15.62 Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 29.70, 46.31, 48.58, 49.41, 51.00, 52.40, 56.13, 71.04, 111.10, 114.23, 118.90, 119.14, 124.72, 127.23, 127.92, 128.58, 130.73, 131.17, 131.89, 132.20, 135.79, 136.95, 147.81, 149.92, 171.73, 172.32; HRMS m/z Calcd. for $C_{27}H_{25}ClN_2O_7$ $[M+H]^+$ 525.141 2, found 525.142 9。

1.17 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-(4-乙烯基苯甲酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5m) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的4-乙烯基苯甲酸(0.07 g, 0.47 mmol), 其余反应条件和**5a**的合成相同, 经色谱柱纯化后得产物**5m** (93.01 mg, 0.20 mmol), 产率为68.01%。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.59～3.65 (m, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.80 (dd, J = 18.44, 9.54 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 19.44 Hz, 3H), 3.91～3.97 (m, 1H), 4.14 (dd, J = 11.90, 8.63 Hz, 1H), 5.12 (d, J = 15.99 Hz, 2H), 5.29～5.35 (m, 1H), 5.80 (t, J = 17.62 Hz, 1H), 6.66～6.86 (m, 4H), 7.30 (d, J = 6.36 Hz, 1H), 7.36 (q, J = 7.51 Hz, 2H), 7.39～7.47 (m, 4H), 7.47～7.56 (m, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 29.71, 46.45, 47.82, 49.15, 51.05, 52.20, 56.09, 71.04, 111.10, 114.17, 115.59, 118.98, 119.30, 126.11, 127.24, 127.68, 127.88, 128.57, 135.30, 136.01, 137.05, 139.51, 147.60, 149.82, 172.08, 172.67; HRMS m/z Calcd. for $C_{29}H_{29}NO_5$ $[M+H]^+$ 472.210 5, found 472.212 4。

1.18 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-((*E*)-3-(呋喃-2-基)丙烯酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5n) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的(*E*)-3-(呋喃-2-基)丙烯酸(0.06 g, 0.43 mmol), 其余反应条件和**5a**的合成相同, 经色谱柱纯化后得产物**5n** (74.86 mg, 0.16 mmol), 产率为55.93%。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.19 (q, J = 8.90 Hz, 1H), 3.59～3.64 (m, 1H), 3.66 (d, J = 3.27 Hz, 3H), 3.71～3.76 (m, 1H), 3.86～3.90 (m, 3H), 4.07～4.12 (m, 1H), 4.12～4.19 (m, 2H), 5.10～5.16 (m, 2H), 6.44～6.47 (m, 1H), 6.55～6.59 (m, 1H), 6.59～6.64 (m, 1H) 6.74 (dd, J = 7.99, 2.54 Hz, 1H), 6.78～6.80 (m, 1H), 6.84 (dd, J = 8.17, 4.90 Hz, 1H), 7.28～7.32 (m, 1H), 7.36 (t, J = 7.36 Hz, 2H), 7.40～7.46 (m, 3H), 7.48 (dd, J = 15.26, 5.81 Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 29.70, 46.03, 47.64, 48.99, 50.85, 52.23, 56.11, 71.06, 110.98, 111.08, 112.25, 114.22, 114.30, 115.56, 119.14, 127.26, 127.89, 128.56, 129.09, 131.67, 144.07, 147.63, 149.87, 151.53, 172.22, 172.55; HRMS m/z Calcd. for $C_{27}H_{27}NO_6$ $[M+H]^+$ 462.190 1, found 462.191 7。

1.19 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-((*E*)-3-(噻唑-2-基)丙烯酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5o) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的(*E*)-3-(噻唑-2-基)丙烯酸(0.07 g, 0.45 mmol), 其余反应条件和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, DCM∶MeOH = 30∶1洗脱后得产物**5o** (69.16 mg, 0.14 mmol), 产率为49.83%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 3.38～3.54 (m, 2H), 3.56～3.64 (m, 4H), 3.66～3.74 (m, 1H), 3.78 (d, J = 3.09 Hz, 3H), 3.96～4.03 (m, 1H), 4.19～4.26 (m, 1H), 5.06 (d, J = 4.18 Hz, 2H), 6.80～6.86 (m, 1H), 6.97 (d, J = 8.17 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 1.82 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 19.80, 15.26 Hz, 1H), 7.31～7.36 (m, 1H), 7.39 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 7.42～7.47 (m, 2H), 7.62 (dd, J = 15.35, 1.91 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 14.53, 3.09 Hz, 1H), 7.96 (dd, J = 13.44, 3.27 Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 46.01, 47.94, 48.20, 49.35, 52.34, 53.23, 56.08, 70.36, 111.97, 113.96, 120.05, 123.11, 124.22, 128.86, 131.85, 132.31, 132.95, 137.68, 144.82, 147.43, 149.65, 164.01, 172.43, 172.83; HRMS m/z Calcd. for $C_{26}H_{26}N_2O_5S$ $[M+H]^+$ 479.163 6, found 479.164 1。

1.20 (3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-1-((*E*)-3-(4-羟基苯基)丙烯酰基)吡咯烷-3-羧酸甲酯 (5p) 的合成 在25 mL的反应瓶中加入1.5倍量的(*E*)-3-(4-羟基苯基)丙烯酸(0.07 g, 0.44 mmol), 其余反应条件和**5a**的合成相同, 色谱柱纯化, DCM∶EA = 3∶1洗脱后得产物**5p** (92.80 mg, 0.19 mmol), 产率为65.63%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 3.38～3.43 (m, 1H), 3.46～3.54 (m, 1H), 3.57 (d, *J* = 9.63 Hz, 3H), 3.63 (d, *J* = 9.81 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 3.63 Hz, 3H), 3.93～3.99 (m, 1H), 3.99～4.06 (m, 1H), 4.19 (d, *J* = 8.72 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 7.63 Hz, 2H), 6.73～6.86 (m, 4H), 6.95～7.02 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 7.30～7.35 (m, 1H), 7.36～7.47 (m, 5H), 7.56 (d, *J* = 8.17 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.36 Hz, 1H), 9.85 (d, *J* = 13.26 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 46.08, 47.99, 48.17, 49.99, 52.34, 56.10, 60.26, 70.34, 111.83, 112.00, 113.88, 113.98, 116.05, 119.86, 120.07, 126.52, 128.29, 128.89, 130.41, 132.13, 137.71, 141.56, 147.37, 149.65, 159.54, 164.48, 173.01; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{29}H_{29}NO_6$ $[M+H]^+$ 488.205 1, found 488.207 3。

1.21 6-(((3*R*,4*R*)-4-(4-(苄氧基)-3-甲氧基苯基)-3-(甲酸甲酯)吡咯烷-1-基)甲基)烟酸甲酯 (6a) 的合成 在25 mL反应瓶中加入1.5倍量的6-(溴甲基)烟酸甲酯(0.10 g, 0.43 mmol), 加入DCM使其溶解, 0 ℃下加入1倍量的化合物**4** (0.10 g, 0.29 mmol)和2倍量的DIEPA (0.08 g, 0.62 mmol), 冰浴下反应4 h后撤去冰浴继续反应4 h。TLC检测后用水和DCM萃取反应液3次, 无水硫酸钠干燥有机相, 过滤加硅胶减压蒸干, 色谱柱纯化, PE∶EA = 3∶1洗脱后得产物**6a** (73 mg, 0.15 mmol), 产率为51.31%。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 2.79 (dd, *J* = 9.17, 6.63 Hz, 1H), 2.96～3.01 (m, 1H), 3.07 (t, *J* = 8.72 Hz, 1H), 3.10～3.13 (m, 2H), 3.62～3.66 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.84 (d, *J* = 14.53 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.97 (d, *J* = 14.53 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 6.77～6.83 (m, 2H), 6.89～6.91 (m, 1H), 7.27～7.32 (m, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.63 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 7.45 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.99 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 8.08, 2.09 Hz, 1H), 9.14 (d, *J* = 1.82 Hz, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 46.77, 51.56, 52.03, 52.34, 56.06, 57.56, 61.29, 61.85, 71.10, 111.27, 114.07, 119.26, 122.26, 124.57, 127.23, 127.79, 128.52, 137.28, 137.67, 147.00, 149.68, 150.40, 165.78, 174.41; HRMS *m*/*z* Calcd. for $C_{28}H_{30}N_2O_6$ $[M+H]^+$ 491.217 6, found 491.218 2。

2 吡咯烷衍生物抗菌活性的检测

2.1 吡咯烷衍生物抗菌活性检测 本研究所合成化合物经HPLC验证纯度均为85.00%及以上后进行抗菌活性检测, 使用临床分离的携带NDM-1基因的肺炎克雷伯菌 (*Clinical* KP_{NDM-1}), 携带*KPC-2*基因的大肠杆菌 (*E coli* $EC600_{KPC-2}$) 菌株, 按照美国实验室临床标准委员会方法测定吡咯烷衍生物单独使用及与美罗培南联合使用对*Clinical* KP_{NDM-1}和*E coli* $EC600_{KPC-2}$的最低抑菌浓度[41]。

将*Clinical* KP_{NDM-1}和*E coli* $EC600_{KPC-2}$分别接种到LB琼脂板上, 37 ℃培养15 h后放置于室温备用。将合成的吡咯烷衍生物与美罗培南分别用DMSO和经高压灭菌的生理盐水配置成8 mg·mL^{-1}溶液备用。取96孔板, 除第1列和最后2列均加入经高压灭菌的MH肉汤100 μL, 第1列加入MH肉汤187.2 μL及6.4 μL的吡咯烷衍生物及美罗培南溶液, 充分混匀后吸取100 μL溶液加入第2列并混匀, 依次进行对半稀释混匀至吡咯烷衍生物和美罗培南质量浓度分别为256、128～0.25 μg·mL^{-1}。用无菌棉签粘取琼脂板上细菌置于无菌生理盐水中, 使其OD_{600} = 0.08～0.10, 吸取200 μL菌液分别加入最后一列各孔中, 依次从最后一列中吸取5 μL菌液加入其余各列。37 ℃培养15 h, 用CMax Plus光吸酶标仪测定96孔板在600 nm处吸光度 (OD_{600}) 值并通过肉眼观察其浑浊度, 以抑制细菌生长的最小质量浓度为MIC。

2.2 吡咯烷衍生物与美罗培南联合应用的抗菌活性检测 采用棋盘稀释法对吡咯烷衍生物与美罗培南进行联合抗菌活性检测。将*Clinical* KP_{NDM-1}和*E coli* $EC600_{KPC-2}$分别接种到LB琼脂板上, 37 ℃培养15 h后放置于室温备用。分别配置256、128、64、32、16、8、4、2和0 μg·mL^{-1}吡咯烷衍生物溶液。96孔板的第1列加入193.6 μL配置好的不同浓度的等量吡咯烷衍生物溶液, 除最后1列均加入100 μL不同浓度的等量吡咯烷衍生物溶液; 在第1列各孔中加入8 mg·mL^{-1}的美罗培南溶液6.4 μL, 从第1列中吸取100 μL溶液加入第2列混匀, 第2列继续吸取100 μL溶液加入第3列混匀, 然后依次按上述步骤两倍稀释, 倒数第3列吸取100 μL后不加入倒数第2列, 直接丢弃。用无菌棉签粘取琼脂板上细菌置于无菌生理盐水中, 用CMax Plus光吸酶标仪测OD_{600}值, 其OD_{600} = 0.08～0.10, 吸取200 μL菌液分别加入最后1列各孔中, 依次从最后1列中吸取5 μL菌液加入其余各列。37 ℃培养15 h, 测定96孔板在OD_{600}值, 计算吡咯烷衍生物和美罗培南联合使用的MIC, 并根据 (1) 和 (2) 计算RF和FIC:

$$RF = MIC_{MEM} / MIC_{Compd+MEM} \quad (1)$$

$$FIC = MIC_{Compd+MEM} / MIC_{Compd} + MIC_{Compd+MEM} / MIC_{MEM} \quad (2)$$

其中, MIC_{MEM}、MIC_{Compd}、$MIC_{Compd+MEM}$分别为美罗培南单独使用、化合物单独使用, 以及美罗培南和化合物联合使用时最低抑菌浓度。FIC ≤ 0.5表示两种药物表现协同作用, 0.5 < FIC ≤ 2表示两种药物表现相加作用, FIC > 2表示联众药物表现拮抗作用。

3 部分吡咯烷衍生物的分子对接

在PDB网站下载NDM-1 (ID: 5ZGE)及KPC-2 (ID: 3RXX)蛋白文件(受体), 使用Chem3D 22.0.0软件处理化合物**5j**及**5l**结构式(配体), 使其处于势能最低状态保证结构稳定; 使用AutoDockTools 1.5.6软件对NDM-1蛋白和KPC-2蛋白进行了去水及加全氢处理并保存蛋白文件及对化合物**5j**及**5l**进行加全氢处理并保存文件; 做盒子包裹受体后与**5j**、**5l**进行分子对接。使用PyMol软件将对接结果突出显示氢键长度及**5j**和**5l**与蛋白连接的氨基酸残基以进行可视化处理后得虚拟分子对接结果。

作者贡献: 周应勋负责化学工作及文章初稿撰写; 王万存负责部分生物活性检测; 欧慧萍、吴占攀及杨国春完成分子对接工作; 许晨完成生物活性检测技术支持; 金文彬完成实验设计及文章初稿修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8: 423-435.

[2] Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase [J]. Cell, 2001, 104: 901-912.

[3] Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 1759-1767.

[4] Park JT, Uehara T. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan) [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, 72: 211-227.

[5] Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, et al. Antibiotic resistance in microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects [J]. J Infect Public Health, 2021, 14: 1750-1766.

[6] Maitra A, Munshi T, Healy J, et al. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: an achilles' heel for the TB-causing pathogen [J]. FEMS Microbiol Rev, 2019, 43: 548-575.

[7] Nazarov PA. MDR pumps as crossroads of resistance: antibiotics and bacteriophages [J]. Antibiotics (Basel), 2022, 11: 734.

[8] Al-Hadid Q, White J, Clarke S. Ribosomal protein methyltransferases in the yeast saccharomyces cerevisiae: roles in ribosome biogenesis and translation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470: 552-557.

[9] Schaenzer AJ, Wright GD. Antibiotic resistance by enzymatic modification of antibiotic targets [J]. Trends Mol Med, 2020, 26: 768-782.

[10] Preda VG, Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention [J]. Discoveries (Craiova), 2019, 7: e100.

[11] Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of *β*-lactamases [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55: 1050-1051.

[12] Walsh C. Where will new antibiotics come from? [J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1: 65-70.

[13] Chen J, Shang XH, Hu F, et al. *β*-Lactamase inhibitors: an update [J]. Mini Rev Med Chem, 2013, 13: 1846-1861.

[14] Palzkill T. Metallo-*β*-lactamase structure and function [J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 1277: 91-104.

[15] Li T, Wang Q, Chen FH, et al. Biochemical characteristics of New Delhi metallo-*β*-lactamase-1 show unexpected difference to other MBLs [J]. PLoS One, 2013, 8: e61914.

[16] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 5046-5054.

[17] Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, et al. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain [J]. PLoS One, 2014, 9: e99209.

[18] Linciano P, Cendron L, Gianquinto E, et al. Ten years with New Delhi metallo-*β*-lactamase-1 (NDM-1): from structural insights to inhibitor design [J]. ACS Infect Dis, 2019, 5: 9-34.

[19] Wang T, Xu K, Zhao L, et al. Recent research and development of NDM-1 inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2021, 223: 113667.

[20] Nagulapalli Venkata KC, Ellebrecht M, Tripathi SK. Efforts towards the inhibitor design for New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) [J]. Eur J Med Chem, 2021, 225: 113747.

[21] Jin WB, Li J, Li J, et al. An update on New Delhi metallo-*β*-lactamase-1 and its inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 1157-1165.

[22] Zhao B, Zhang XH, Yu TT, et al. Discovery of thiosemicarbazone derivatives as effective New Delhi metallo-*β*-lactamase-1 (NDM-1) inhibitors against NDM-1 producing clinical isolates [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 203-221.

[23] Wang N, Yu H, Zhu ZH, et al. Novel methyldithiocarbazate derivatives as NDM-1 inhibitors to combat multidrug-resistant bacterial infection with *β*-lactams [J]. Bioorg Chem, 2024, 154: 108104.

[24] Legru A, Verdirosa F, Vo-Hoang Y, et al. Optimization of 1,2,4-triazole-3-thiones toward broad-spectrum metallo-*β*-lactamase inhibitors showing potent synergistic activity on VIM-and NDM-1-producing clinical isolates [J]. J Med Chem, 2022, 65: 16392-16419.

[25] He P, Huang SJ, Wang R, et al. Novel nitroxoline derivative combating resistant bacterial infections through outer membrane disruption and competitive NDM-1 inhibition [J]. Emerg Microbes Infect, 2024, 13: 2294854.

[26] Wang LF, Liang YW, Luo P, et al. Novel partially reversible NDM-1 inhibitors based on the naturally occurring houttuynin [J]. Bioorg Chem, 2024, 147: 107328.

[27] Jin WB, Xu C, Cheng QP, et al. Investigation of synergistic antimicrobial effects of the drug combinations of meropenem and 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one derivatives on carbapenem-resistant Enterobacteriaceae producing NDM-1 [J]. Eur J Med Chem, 2018, 155: 285-302.

[28] Jin WB, Xu C, Cheung Q, et al. Bioisosteric investigation of ebselen: synthesis and *in vitro* characterization of 1,2-benzisothiazol-3(2*H*)-one derivatives as potent New Delhi metallo-*β*-lactamase inhibitors [J]. Bioorg Chem, 2020, 100: 103873.

[29] Pemberton OA, Zhang XJ, Chen Y. Molecular basis of substrate recognition and product release by the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) [J]. Med Chem, 2017, 60: 3525-3530.

[30] Li XH, Wang Q, Liu CN, et al. PHT427 functions as a novel inhibitor of KPC-2 [J]. J Chin Pharm Sci, 2023, 32: 989-997.

[31] Zhou JY, Stapleton P, Xavier FH Jr, et al. Triazole-substituted phenylboronic acids as tunable lead inhibitors of KPC-2 antibiotic resistance [J]. Eur J Med Chem, 2022, 240: 114571.

[32] Cheng K, Newell P, Chow JW, et al. Safety profile of ceftazidime-avibactam: pooled data from the adult phase II and phase III clinical trial programme [J]. Drug Saf, 2020, 43: 751-766.

[33] Gao H, Liu YD, Wang RB, et al. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings [J]. EBioMedicine, 2020, 51: 102599.

[34] Pemberton OA, Jaishankar P, Akhtar A, et al. Heteroaryl phosphonates as noncovalent inhibitors of both serine-and metallocarbapenemases [J]. J Med Chem, 2019, 62: 8480-8496.

[35] Wang YL, Liu S, Yu ZJ, et al. Structure-based development of [1-(3'-mercaptopropanamido) methyl] boronic acid derived broad-spectrum, dual-action inhibitors of metallo- and serine-*β*-lactamases [J]. J Med Chem, 2019, 62: 7160-7184.

[36] Romero E, Oueslati S, Benchekroun M, et al. Azetidinimines as a novel series of non-covalent broad-spectrum inhibitors of *β*-lactamases with submicromolar activities against carbapenemases KPC-2 (class A), NDM-1 (class B) and OXA-48 (class D) [J]. Eur J Med Chem, 2021, 219: 113418.

[37] Wu XR, Chen WY, Liu L, et al. Discovery of hydroxamate as a promising scaffold dually inhibiting metallo- and serine-*β*-lactamases [J]. Eur J Med Chem, 2024, 265: 116055.

[38] Patchett AA, Harris E, Tristram EW, et al. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors [J]. Nature, 1980, 288: 280-283.

[39] Jin WB, Xu C, Xiao LQ, et al. Synthesis of 1,3,4-trisubstituted pyrrolidines as meropenem adjuvants targeting New Delhi metallo-*β*-lactamase [J]. New J Chem, 2021, 45: 3515-3534.

[40] Zhou YX, Wang WP, Ke J, et al. Nuciferine analogs block voltage-gated sodium, calcium and potassium channels to regulate the action potential and treat arrhythmia [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 179: 117422.

[41] Feng DY, Zhu LX, Yang SJ, et al. Design, synthesis and relational biological researches of novel acetyl-contained sulfanilamide tertiary amine thiol azole compounds and sulfanilamide tertiary amine amino azole compounds [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 3315-3324.