氘代-联苯-DAPYs衍生物作为高效低毒非核苷类逆转录酶抑制剂的设计、合成及抗HIV-1病毒活性研究

张 坤[1,2], 卜悦悦[1,2], Christophe Pannecouque[3], Erik De Clercq[3], Enzo Tramontano[4], Phuong-Thao Tran[5], 王 帅[1,2*], 陈芬儿[1,2*]

(1. 复旦大学化学系手性分子催化与合成工程中心, 上海 200433; 2. 郑州大学药物研究院, 河南 郑州 450001; 3. Laboratory of Virology and Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven B-3000, Belgium; 4. Dept Appl Sci Biosyst, University of Cagliari, Monserrato I-09042, Italy; 5. Department of Pharmaceutical Chemistry, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi 008404, Vietnam)

摘要: 非核苷类逆转录酶抑制剂 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) 在艾滋病的治疗中发挥重要作用。二芳基嘧啶类 (diarylpyrimidines, DAPYs) 抑制剂是目前NNRTIs研究的热点。本研究以前期发现的氘代-联苯-DAPYs抑制剂ZK-4a为先导化合物, 针对其细胞毒性大的问题 (CC_{50} = 5.98 μmol·L^{-1}), 通过引入O原子取代NH基团, 并对嘧啶环C-5位进行修饰, 先后设计、合成了27个新型氘代-联苯-DAPYs。随后, 抗病毒活性研究发现, 新设计的氘代-联苯-DAPYs对HIV-1野生株和突变株具有广泛、高效的抑制活性, 同时显著降低了化合物对正常细胞的毒性 (CC_{50} = 18.02～> 297.27 μmol·L^{-1})。其中, 化合物**8s**对HIV-1野生株的EC_{50}值为8.88 nmol·L^{-1}, 对正常细胞的毒性较弱 (CC_{50} > 287.68 μmol·L^{-1}); 同时**8s**对L100I、K103N、Y181C、Y188L和E138K突变株表现出高效、广谱的抑制活性, EC_{50}值依次为7.54、8.57、24.28、62.71和14.38 nmol·L^{-1}。此外, RT酶抑制试验验证了氘代-联苯-DAPYs化合物可以有效抑制逆转录酶的DNA聚合酶活性。

关键词: 艾滋病; HIV-1; 抗病毒; 非核苷类逆转录酶抑制剂; 氘代−联苯−DAPYs

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)08-2545-10

Deuterated-biphenyl-DAPY derivatives as potent and low-cytotoxicity non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: design, synthesis and anti-HIV-1 evaluation

ZHANG Kun[1,2], BU Yue-yue[1,2], Pannecouque Christophe[3], De Clercq Erik[3], Tramontano Enzo[4], Tran Phuong-Thao[5], WANG Shuai[1,2*], CHEN Fen-er[1,2*]

(*1. Engineering Center of Catalysis and Synthesis for Chiral Molecules, Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of Pharmaceutical Research and School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. Laboratory of Virology and Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven B-3000, Belgium; 4. Dept Appl Sci Biosyst, University of Cagliari, Monserrato I-09042, Italy; 5. Department of Pharmaceutical Chemistry, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi 008404, Vietnam*)

Abstract: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) play an important role in AIDS treatment. Diarylpyrimidine derivatives (DAPYs) represent one of the most important classes of NNRTIs. The previously

收稿日期: 2025-06-11; 修回日期: 2025-07-03.

基金项目: 上海市白玉兰人才计划浦江项目 (2023PJD005).

*通讯作者 Tel: 86-21-65643811, E-mail: shuaiwang@fudan.edu.cn; rfchen@fudan.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0653

reported ZK-4a showed high cytotoxicity (CC_{50} = 5.98 μmol·L^{-1}), significantly limiting its therapeutic potential. To resolve this issue, we adopted a two-pronged strategy: replacing the NH fragment with an O atom and modifying the C-5 position of the pyrimidine core. These modifications enabled the design and synthesis of 27 novel deuterated-biphenyl-DAPY analogues. Fortunately, all deuterated-biphenyl-DAPYs exhibited broad and highly efficient antiviral activity, as well as obviously decreased cytotoxicity (CC_{50} = 18.02 − > 297.27 μmol·L^{-1}). Among them, compound **8s** achieved an EC_{50} value of 8.88 nmol·L^{-1} while showing negligible cytotoxicity (CC_{50} > 287.68 μmol·L^{-1}). Compound **8s** also displayed exceptional resistance profiles with EC_{50} values of 7.54 nmol·L^{-1} (L100I), 8.57 nmol·L^{-1} (K103N), 24.28 nmol·L^{-1} (Y181C), 62.71 nmol·L^{-1} (Y188L) and 14.38 nmol·L^{-1} (E138K). Additionally, the target of deuterated-biphenyl-DAPYs was verified by reverse transcriptase enzyme inhibition assays.

Key words: acquired immunodeficiency syndrome; human immunodeficiency virus-1; antiviral; non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; deuterated-biphenyl-DAPY

当前, 艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDs) 仍是全球主要的流行性疾病之一[1,2]。研究表明, HIV (human immunodeficiency virus) 病毒感染是艾滋病病因[3-5]。据报道, 2023 年, 全球仍有约 3 990 万人感染 HIV 病毒, 约 130 万人为新增患者, 约 63 万人死于 AIDs 相关的疾病。然而, 现有医疗手段并不能彻底治愈 AIDS, 患者一旦感染 HIV 病毒, 需终身服用抗病毒类药物[5,6]。但由于 HIV 病毒的高变异性, 长期单一药物的使用, 使得临床上不断出现新的耐药突变株, 导致现有药物的疗效下降[7,8]。因此, 研发新型抗病毒药物, 克服现有临床药物的缺陷, 是药物化学工作者迫在眉睫的任务。

非核苷类逆转录酶抑制剂 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) 是一种靶向 HIV 病毒逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 变构结合位点的抑制剂[2,9]。自 1996 年第一款该类抑制剂奈韦拉平 (nevirapine, NVP) 被批准上市以来, 全球已有多个该类药物先后被批准用于治疗 AIDS, 包括最新一代的药物依曲韦林 (etravirine, ETR) 和利匹韦林 (rilpivirine, RPV)[10,11]。尽管 ETR 和 RPV 较第一代药物具有明显优势, 但也存在部分缺陷, 如: 细胞毒性高 (CC_{50} = ~4.61 μmol·L^{-1})、CYP 酶抑制以及其他毒副作用等[12-14]。针对以上问题, 本课题组先后开发了多个联苯−二芳基嘧啶类 (diarylpyrimidines, DAPYs) 化合物。其中, 化合物 ZK-4a (**1**) 对 HIV-1 野生株 (wild type, WT) 和突变株表现出高效的抑制活性, 但其细胞毒性较大 (CC_{50} = 5.98 μmol·L^{-1}), 限制了临床开发潜力[9]。

调研文献发现, 将 RPV 左翼连接子的 NH 基团替换为 O 原子时, 化合物 **2** 的细胞毒性显著改善 (图 1A)[15]。同时, 通过对 ZK-4a 的分子对接发现其嘧啶母核的 C-5 位指向入口通道区域, 存在较大的修饰空间 (图 1B)。因此, 本研究以 ZK-4a 为先导化合物, 将左侧连接子的 NH 基团替换为 O 原子, 同时对其入口通道区域进行修饰, 以期保持化合物抗病毒活性并改善其细胞毒性 (图 1C)。最终, 设计、合成了 27 个新型氘代-联苯-DAPYs 抑制剂, 并进一步检测了其抗病毒活性和细胞毒性。

结果与讨论

1 目标化合物的合成及结构表征

1.1 化合物的合成

目标化合物的合成路线如合成路线 1 所示。其中氘代片段 **3a**、**3b** 作为起始原料, 首先通过 Suzuki 偶联反应合成联苯片段 **4a**、**4b**。随后, **4a**、**4b** 与化合物 **5** 进行芳香亲核取代得到化合物 **6a**、**6b**。接着, 化合物 **6a**、**6b** 通过亲电反应在 C-5 位引入不同的卤素原子生成化合物 **7a**～**7f**。最后, 化合物 **7c** 和 **7f** 通过与相应的硼酸反应得到化合物 **8a**～**8s**。

1.2 化合物的表征

所有合成的氘代-联苯-DAPYs 化合物经 ^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 HRMS 确认 (结果见实验方法部分)。

2 目标化合物对 HIV-1 野生株的抗病毒活性和细胞毒性

为评估目标化合物的抗病毒活性和细胞毒性, 采用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法检测了化合物保护 MT-4 细胞免受 HIV-1 野生型病毒破坏的半数有效浓度 (EC_{50}) 和化合物导致正常细胞死亡的半数致死浓度 (CC_{50})。上市药物 NVP、依非韦仑 (efavirenz, EFV) 和 ETR 被选做阳性对照, 所有实验均独立重复 3 次以上以计算有效的 SD 值。实验结果如表 1 所示。

所有化合物均表现出对 HIV-1 野生型毒株的有效抑制, 其 EC_{50} 值为 6.38～256.35 nmol·L^{-1}。值得注意的是, 新设计的化合物对正常细胞的毒性与先导化合物相比显著下降, CC_{50} 值为 ≥ 18.02 μmol·L^{-1}, 符合实验预期。其中, 化合物 **6a** 具有本系列最优的抗病毒活

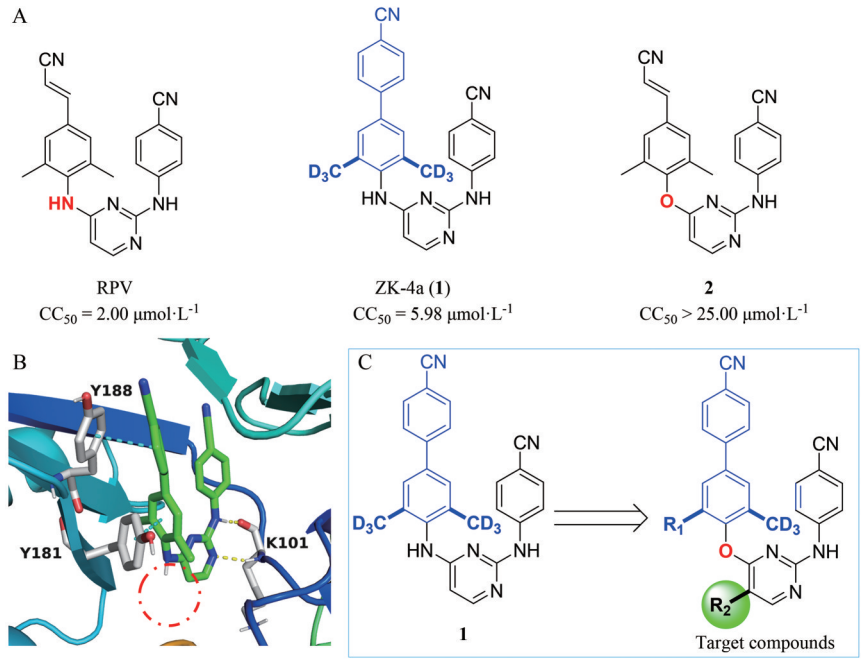
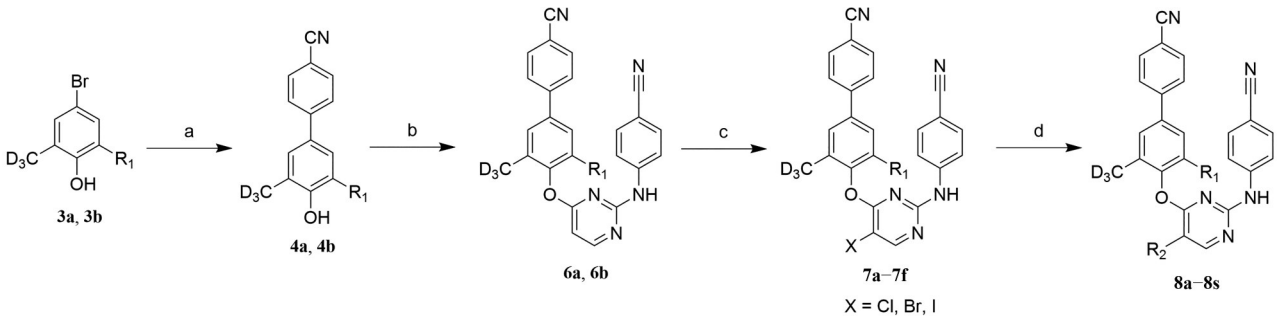


Figure 1　Research background and design concepts of deuterated-biphenyl-DAPYs. A: The structures of RPV, ZK-4a and **2**; B: The docking result of ZK-4a with RT (PDB: 2ZD1, Software: Schrödinger 12.8); C: The design of target compounds



Scheme 1　Synthetic route of target compounds. Reagents and reaction conditions: (a) 4-Cyanophenylboronic acid, $Pd(dppf)Cl_2$, Cs_2CO_3, dioxane∶H_2O = 2∶1, 100 ℃, 12 h, N_2; (b) 4-[(4-Chloropyrimidin-2-yl) amino] benzonitrile (**5a**), K_2CO_3, DMF, 80 ℃, 24 h; (c) NXS, trifluoroacetic acid, acetonitrile, r.t., 4 h; (d) Corresponding boronic acid, $Pd(PPh_3)_4$, Cs_2CO_3, dioxane∶H_2O = 2∶1, 100 ℃, 12 h, N_2

性, 其 EC_{50} 值达到了 6.38 nmol·L^{-1}, 同时细胞毒性大于 295.15 μmol·L^{-1}。与先导化合物 ZK-4a 相比, 化合物 **6a** 虽然在抗病毒活性方面略有下降 (EC_{50} = 1.83 *vs.* 6.38 nmol·L^{-1}), 但在细胞毒性方面显著改善, 较先导化合物改善了约 49 倍 (CC_{50} = 5.98 *vs.* > 295.15 μmol·L^{-1})。此外, 单 CD_3 取代的化合物 **8s** 也表现出个位数纳摩尔浓度的抗病毒活性和极低的细胞毒性 (EC_{50} = 8.88 nmol·L^{-1}, CC_{50} > 287.68 μmol·L^{-1})。

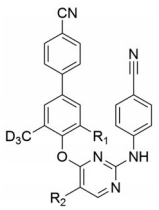
初步的构效关系总结如下: 当 R_1 处取代基为 CD_3 时, R_2 处无取代基表现出最佳的抗病毒抑制活性和最低的细胞毒性 (**6a**); 当 R_2 处引入卤素 (**7a**～**7c**) 或芳环 (**8a**～**8i**) 时, 其抗病毒活性显著下降, 同时细胞毒性明显上升; 当芳环上的杂原子为 N 原子时, 化合物的抗病毒活性较其他杂原子时明显提升 (**8a**～**8c**、**8g**、**8h** *vs.* **8d**～**8f**、**8i**)。当 R_1 处取代基为甲基时, R_2 处取代基为 4-吡啶基 (**8j**, EC_{50} = 9.88 nmol·L-1) 和 5-羟甲基-2-噻吩基 (**8s**, EC_{50} = 8.88 nmol·L-1) 时更有利于提升化合物的抗病毒活性。值得注意的是, 当在 R_2 处 2-噻吩基上进行修饰时, 无论 R_1 处取代基为 CD_3 还是 CH_3 均能够有效的提升抗病毒活性 (**8f** *vs.* **8i**, **8p** *vs.* **8s**)。

3　目标化合物对 HIV-1 突变株的抗病毒活性

鉴于目标化合物对 HIV-1 野生株较好的抑制活性以及显著改善的细胞毒性, 进一步测试了目标化合物对 5 种常见临床单突变株 (L100I、K103N、Y181C、Y188L 和 E138K) 的抑制活性, 以 NVP、EFV 和 ETR 为阳性对照。

氘代-联苯-DAPYs 抑制剂对所选 5 种单突变株表现出个位数纳摩尔到微摩尔浓度之间的抑制活性。化合

Table 1 Anti-HIV-1 WT activity and cytotoxicity of target compounds in MT-4 cells. EC_{50}: Concentration of compound required to achieve 50% protection of MT-4 cell cultures against HIV-1-induced cytopathicity, as determined using the MTT method; CC_{50}: Concentration required to reduce the viability of mock-infected cell cultures by 50%, as determined using the MTT method; NVP: Nevirapine; EFV: Efavirenz; ETR: Etravirine



Compd.	R_1	R_2	EC_{50}/nmol·L^{-1}	CC_{50}/μmol·L^{-1}
6a	CD_3	H	6.38 ± 0.00	> 295.15
7a	CD_3	Cl	35.69 ± 0.03	41.29 ± 5.95
7b	CD_3	Br	20.62 ± 0.01	34.73 ± 7.46
7c	CD_3	I	70.73 ± 0.02	127.47 ± 5.77
8a	CD_3	4-Pyridyl	17.69 ± 0.01	49.79 ± 3.94
8b	CD_3	3-Pyridyl	19.61 ± 0.02	> 249.70
8c	CD_3	5-Pyrimidyl	23.77 ± 0.02	128.01 ± 2.65
8d	CD_3	3-Furyl	37.99 ± 0.01	51.24 ± 7.08
8e	CD_3	2-Furyl	62.36 ± 0.02	198.18 ± 12.46
8f	CD_3	2-Thienyl	67.41 ± 0.01	178.66 ± 9.98
8g	CD_3	3-Pyrazolyl	10.94 ± 0.00	38.64 ± 7.75
8h	CD_3	4-Pyrazolyl	22.26 ± 0.03	121.45 ± 11.26
8i	CD_3	5-Hydroxymethyl-2-thienyl	30.72 ± 0.02	149.40 ± 14.02
6b	CH_3	H	13.18 ± 0.01	> 297.27
7d	CH_3	Cl	13.35 ± 0.00	26.88 ± 8.71
7e	CH_3	Br	27.43 ± 0.03	18.02 ± 4.59
7f	CH_3	I	42.57 ± 0.03	44.47 ± 4.50
8j	CH_3	4-Pyridyl	9.88 ± 0.00	62.61 ± 5.26
8k	CH_3	3-Pyridyl	35.29 ± 0.03	> 251.22
8l	CH_3	5-Pyrimidyl	33.04 ± 0.02	118.09 ± 7.45
8m	CH_3	3-Furyl	39.55 ± 0.03	229.04 ± 7.62
8n	CH_3	2-Furyl	68.91 ± 0.05	> 256.91
8o	CH_3	3-Thienyl	256.35 ± 0.17	200.79 ± 2.60
8p	CH_3	2-Thienyl	66.11 ± 0.01	> 248.70
8q	CH_3	3-Pyrazolyl	12.91 ± 0.01	48.41 ± 22.30
8r	CH_3	4-Pyrazolyl	25.57 ± 0.03	66.67 ± 31.92
8s	CH_3	5-Hydroxymethyl-2-thienyl	8.88 ± 0.00	> 287.68
NVP			237.5 ± 0.18	> 15.021
EFV			4.58 ± 0.002	> 6.336
ETR			4.23 ± 0.002	> 4.595

物**6a**对HIV-1野生株表现出最佳的抑制活性, 对L100I和K103N突变株也表现出个位数纳摩尔浓度的抑制活性 (EC_{50} = 9.27和5.96 nmol·L^{-1}), 对Y181C和E138K突变株表现出两位数纳摩尔浓度的抑制活性 (EC_{50} = 29.04和24.56 nmol·L^{-1})。但化合物**6a**对Y188L突变株的抑制活性显著下降, EC_{50}值为2 065.25 nmol·L^{-1}, 在本系列化合物中对Y188L突变株抑制活性最差。值得注意的是, 本系列化合物通常对L100I和K103N突变株具有与WT株相似的EC_{50}值, 尤其是在K103N突变株中。但对Y188L突变株, 本系列化合物的抑制活性通常显著下降。不过, 当R_2处引入卤素或芳环取代时, 化合物对Y188L突变的抵抗更强, 如**7b**、**8g**～**8j**和**8q**～**8s**。这可能是由于R_2处引入取代基后, 化合物会通过与入口通道处氨基酸的相互作用, 抵消Y188L突变造成的影响。此外, 当R_1处取代基为CH_3, R_2取代基为5-羟甲基-2-噻吩基时, 化合物**8s**对突变株的抑制活性值得关注。其对5种突变株的的EC_{50}值依次为7.54、8.57、24.28、62.71、14.38 nmol·L^{-1}, 显著优于本系列其他化合物。

4 化合物对野生型逆转录酶的抑制活性

为了验证氘代-联苯-DAPYs抑制剂的作用靶点, 本研究检测了目标化合物对HIV-1野生型RT酶的抑制活性。上市药物NVP、EFV和ETR被选作阳性对照, 实验结果如表3所示。结果表明, 氘代-联苯-DAPYs可以有效的抑制RT酶的DNA聚合酶活性, 其IC_{50}值介于0.043～0.144 μmol·L^{-1}。其中, 化合物**6b**表现出最佳的RT酶抑制活性, IC_{50}值达到0.043 μmol·L^{-1}, 超过阳性对照NVP, 与上市药物EFV和ETR相当。

5 结论

本研究以课题组前期报道的化合物ZK-4a作为先导化合物, 通过引入O原子取代NH基团并对入口通道区域修饰, 先后设计并合成了27个氘代-联苯-DAPYs。随后, 对目标化合物的抗病毒活性实验中发现, 所设计的化合物在保持对HIV-1野生株抑制活性的同时, 对正常细胞的毒性显著降低, CC_{50}值改善3至49倍。其中, 化合物**6a**具有本系列最佳的抑制HIV-1野生株的活性和最低的细胞毒性 (EC_{50} = 6.38 nmol·L^{-1}, CC_{50} > 295.15 μmol·L^{-1})。随后的抗耐药性实验发现, 氘代-联苯-DAPYs对突变株具有广泛有效的抑制活性。其中, 对L100I和E138K突变株的抑制活性通常下降较少, 对Y188L突变株的抑制活性则显著降低。化合物**8s**表现出本系列最佳的抗耐药性, 对L100I、K103N、Y181C、Y188L和E138K突变株的EC_{50}值依次为7.54、8.57、24.28、62.71和14.38 nmol·L^{-1}。最后, 本研究通过RT酶抑制试验验证了氘代-联苯-DAPYs的作用靶点, 所测试化合物对RT酶普遍表现出纳摩尔到亚微摩尔水平的IC_{50}值。总之, 本研究发现氘代-联苯-DAPYs作为一种新型HIV-1非核苷类逆转录酶抑制剂, 可以高效、广泛的抑制HIV-1野生株和突变株, 同时展现出更低的细胞毒性, 具有进一步开发的潜力。

Table 2　Antiviral activity of target compounds toward HIV-1 mutants

Compd.	EC_{50}/nmol·L^{-1}				
	L100I	K103N	Y181C	Y188L	E138K
6a	9.27 ± 0.00	5.96 ± 0.00	29.04 ± 0.01	2 065.25 ± 0.81	24.56 ± 0.01
7a	38.60 ± 0.02	30.41 ± 0.02	65.13 ± 0.01	242.66 ± 0.05	59.56 ± 0.02
7b	21.35 ± 0.01	20.00 ± 0.01	39.51 ± 0.01	79.37 ± 0.02	46.18 ± 0.01
7c	30.94 ± 0.01	28.80 ± 0.02	67.94 ± 0.02	197.35 ± 0.16	53.01 ± 0.01
8a	37.36 ± 0.01	11.24 ± 0.00	61.98 ± 0.02	93.44 ± 0.06	42.55 ± 0.01
8b	16.58 ± 0.01	13.08 ± 0.01	44.50 ± 0.02	60.23 ± 0.01	31.36 ± 0.01
8c	31.90 ± 0.02	26.22 ± 0.02	83.09 ± 0.04	125.65 ± 0.07	44.61 ± 0.01
8d	25.18 ± 0.01	25.84 ± 0.00	86.20 ± 0.03	169.79 ± 0.03	41.87 ± 0.01
8e	62.04 ± 0.02	56.94 ± 0.01	290.00 ± 0.05	295.21 ± 0.06	279.38 ± 0.09
8f	51.22 ± 0.01	50.83 ± 0.01	172.90 ± 0.07	303.68 ± 0.08	93.70 ± 0.03
8g	21.29 ± 0.01	18.69 ± 0.01	45.91 ± 0.00	46.62 ± 0.01	32.27 ± 0.01
8h	11.54 ± 0.00	16.85 ± 0.01	40.55 ± 0.02	36.21 ± 0.02	26.76 ± 0.01
8i	20.12 ± 0.01	32.58 ± 0.02	52.46 ± 0.02	59.55 ± 0.01	35.33 ± 0.01
6b	19.56 ± 0.02	8.80 ± 0.00	63.26 ± 0.01	1 014.35 ± 0.52	68.97 ± 0.01
7d	17.04 ± 0.00	19.45 ± 0.02	60.72 ± 0.02	204.26 ± 0.11	51.66 ± 0.04
7e	12.52 ± 0.01	29.19 ± 0.02	55.07 ± 0.01	211.46 ± 0.07	54.42 ± 0.02
7f	31.30 ± 0.01	32.07 ± 0.01	42.92 ± 0.01	101.39 ± 0.05	47.49 ± 0.03
8j	14.97 ± 0.00	13.62 ± 0.00	41.95 ± 0.01	64.66 ± 0.03	20.00 ± 0.00
8k	76.12 ± 0.05	36.28 ± 0.01	161.53 ± 0.06	162.19 ± 0.07	147.26 ± 0.11
8l	61.88 ± 0.01	44.33 ± 0.03	187.29 ± 0.05	254.03 ± 0.04	71.51 ± 0.03
8m	39.36 ± 0.03	31.55 ± 0.01	94.49 ± 0.01	180.92 ± 0.05	49.79 ± 0.01
8n	94.75 ± 0.02	73.32 ± 0.05	187.13 ± 0.05	599.01 ± 0.34	144.23 ± 0.04
8o	273.77 ± 0.06	179.71 ± 0.05	655.38 ± 0.20	1 268.93 ± 0.33	352.61 ± 0.05
8p	33.13 ± 0.01	36.41 ± 0.01	127.04 ± 0.04	248.90 ± 0.07	134.00 ± 0.09
8q	28.05 ± 0.01	25.90 ± 0.01	50.77 ± 0.01	51.23 ± 0.01	56.78 ± 0.00
8r	22.97 ± 0.01	16.44 ± 0.00	42.60 ± 0.01	53.80 ± 0.02	62.43 ± 0.02
8s	7.54 ± 0.00	8.57 ± 0.00	24.28 ± 0.01	62.71 ± 0.02	14.38 ± 0.00
NVP	1 560.33 ± 1.56	3 740.14 ± 2.93	5 007.71 ± 2.09	7 524.92 ± 3.25	172.87 ± 0.12
EFV	28.53 ± 0.01	63.96 ± 0.02	5.83 ± 0.002	289.86 ± 0.12	5.97 ± 0.003
ETR	5.94 ± 0.002	2.95 ± 0.001	12.92 ± 0.01	19.9 ± 0.01	8.68 ± 0.01

Table 3　Inhibitory activity of target compounds toward WT HIV-1 RT. IC_{50}: Inhibitory concentration of test compound required to inhibit biotin deoxyuridine triphosphate incorporation into WT HIV-1 RT by 50%

Compd.	IC_{50}/μmol·L^{-1}	Compd.	IC_{50}/μmol·L^{-1}	Compd.	IC_{50}/μmol·L^{-1}
6a	0.057 ± 0.007	**8g**	0.091 ± 0.013	**8m**	0.061 ± 0.001
7a	0.062 ± 0.005	**8h**	0.045 ± 0.006	**8n**	0.086 ± 0.012
7b	0.066 ± 0.008	**8i**	0.093 ± 0.016	**8o**	0.144 ± 0.013
7c	0.049 ± 0.005	**6b**	0.043 ± 0.003	**8p**	0.081 ± 0.007
8a	0.109 ± 0.007	**7d**	0.059 ± 0.006	**8q**	0.082 ± 0.000
8b	0.100 ± 0.008	**7e**	0.057 ± 0.007	**8r**	0.074 ± 0.012
8c	0.110 ± 0.008	**7f**	0.096 ± 0.001	**8s**	0.052 ± 0.002
8d	0.092 ± 0.020	**8j**	0.106 ± 0.004	NVP	0.602 ± 0.066
8e	0.086 ± 0.029	**8k**	0.085 ± 0.018	EFV	0.014 ± 0.003
8f	0.080 ± 0.013	**8l**	0.078 ± 0.011	ETR	0.029 ± 0.005

实验部分

本实验所用原料均购自毕得医药、乐研试剂、麦克林试剂、阿拉丁试剂、安耐吉化学等商业化公司平台, 纯度为化学纯和分析纯, 无须纯化可直接使用。实验中所用部分仪器如下: 磁力搅拌器 (RCT basic, 德国IKA公司), 旋转蒸发仪 (IKA RV8, 德国IKA公司), 核磁共振仪 (Bruker AV-400型, 美国布鲁克公司), 高分辨质谱仪 (290II-6545 Q-TOF, 美国安捷伦公司), 循环水式真空泵 (A-1000S, 日本EYELA公司) 等。

1　化学合成

1.1　中间体4a～4b的合成

将化合物**3a**、**3b**[9] (1.0 mmol, 1.0 equiv.)、对氰基苯硼酸 (1.05 mmol, 1.05 equiv.)、碳酸铯 (1.5 mmol, 1.5 equiv.) 和 $Pd(dppf)Cl_2$ (0.05 mmol, 0.05 equiv.) 加入到25 mL的茄形瓶中。随后, 将6 mL的二氧六环∶水 = 2∶1的混合溶液加入到反应瓶中, 并快速进行氮气置换。置换完毕, 将反应体系转至100 ℃加热反应12 h。TLC板监测反应进程。反应完毕后, 停止加热,

待体系冷却至室温后, 将反应液倒入 50 mL 水中, 用乙酸乙酯 (50 mL × 3) 萃取 3 次。萃取完毕, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤。将滤液浓缩后, 粗产品通过柱层析分离, 即得中间体**4a**、**4b**。

1.1.1 4′-羟基-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (4a) 白色固体, 产率: 31.6%。m.p.: 157.1～159.7 ℃。HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{15}H_7D_6NO$ $[M-H]^-$ 228.130 1, found 228.130 9。

1.1.2 4′-羟基-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (4b) 白色固体, 产率: 37.0%。m.p.: 155.7～156.5 ℃。HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{15}H_{10}D_3NO$ $[M-H]^-$ 225.111 3, found 225.112 1。

1.2 化合物6a、6b的合成

将中间体**4a**、**4b** (1.0 mmol, 1.0 equiv.)、中间体**5**[9] (1.2 mmol, 1.2 equiv.) 和碳酸钾 (1.5 mmol, 1.5 equiv.) 依次加入到 25 mL 的茄形瓶中, 随后加入 5 mL *N*,*N*-二甲基甲酰胺 (DMF)。将反应体系转至 80 ℃下加热 12 h, TLC 板监测反应进程。反应完毕后, 停止加热, 待体系冷却至室温后, 将反应液倒入 50 mL 水中, 用乙酸乙酯 (50 mL × 3) 萃取 3 次。萃取完毕, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤。将滤液浓缩后, 粗产品通过柱层析分离, 即得化合物**6a**、**6b**。

1.2.1 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (6a) 白色固体, 产率: 50.2%。m.p.: 265.6～268.3 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.16 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.64 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.91, 160.80, 159.68, 150.66, 145.04, 144.51, 136.14, 133.33, 133.02, 131.63, 128.00, 127.90, 119.80, 119.35, 118.74, 110.43, 102.90, 99.43, 15.89 (t, *J* = 19.6 Hz); HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{26}H_{13}D_6N_5O$ $[M+H]^+$ 424.203 9, found 424.203 4。

1.2.2 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (6b) 白色固体, 产率: 57.5%。m.p.: 269.0～270.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.15 (s, 1H), 8.48 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.95 (s, 4H), 7.64 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.62 (s, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 168.91, 160.81, 159.68, 150.62, 145.04, 144.51, 136.14, 133.33, 133.02, 131.74, 131.65, 128.00, 127.98, 127.90, 119.80, 119.35, 118.75, 110.44, 102.91, 99.44, 16.66; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{26}H_{16}D_3N_5O$ $[M+H]^+$ 421.185 1, found 421.184 0。

1.3 化合物7a～7f的合成

将化合物**6a**、**6b** (1.0 mmol, 1.0 equiv.) 和 NXS (1.05 mmol, 1.05 equiv.) 加入到 25 mL 的茄形瓶中, 随后加入 6 mL 的乙腈溶解。室温搅拌状态下, 加入催化量的三氟乙酸。加入完毕, 室温搅拌 4 h, TLC 板监测反应进程。反应完毕后, 加入适量饱和氯化铵溶液淬灭反应。随后, 将反应液倒入 50 mL 水中, 用乙酸乙酯 (50 mL × 3) 萃取 3 次。萃取完毕, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤。将滤液浓缩后, 粗产品通过柱层析分离, 即得化合物**7a**～**7f**。

1.3.1 4′-((5-氯-2-((4-氰基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (7a) 白色固体, 产率: 82.1%。m.p.: 274.1～276.3 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.29 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.67 (s, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.37, 158.74, 157.62, 150.59, 144.58, 144.39, 136.47, 133.35, 132.98, 131.46, 128.05, 127.93, 119.66, 119.32, 118.76, 110.53, 106.43, 103.30, 15.74; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{26}H_{12}D_6N_5OCl$ $[M+Na]^+$ 480.146 9, found 480.148 3。

1.3.2 4′-((5-溴-2-((4-氰基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (7b) 白色固体, 产率: 84.7%。m.p.: 291.8～293.2 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.28 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.66 (s, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.24, 161.22, 158.22, 150.77, 144.55, 144.40, 136.43, 133.35, 132.97, 131.43, 128.02, 127.92, 119.66, 119.33, 118.82, 110.51, 103.30, 94.24, 16.00～15.18 (m); HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{26}H_{12}D_6N_5OBr$ $[M+H]^+$ 502.114 4, found 502.113 8。

1.3.3 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-碘嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (7c) 白色固体, 产率: 96.3%。m.p.: 284.2～286.1 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.24 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.66 (s, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.66, 166.43, 151.17, 144.60, 144.43, 136.30, 134.87, 133.35, 132.95, 131.40, 127.97, 127.91, 123.89, 119.68, 119.34, 118.86, 110.48, 103.18, 16.11～15.48 (m); HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{26}H_{12}D_6N_5OI$ $[M+H]^+$ 550.100 6, found 550.101 9。

1.3.4 4′-((5-氯-2-((4-氰基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (7d) 白色固体, 产率: 94.4%。m.p.: 279.6～281.4 ℃。^{1}H NMR

(400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.28 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.67 (s, 2H), 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.36, 158.75, 157.63, 150.55, 144.58, 144.39, 136.48, 133.35, 132.98, 131.56, 131.47, 128.05, 127.93, 119.66, 119.32, 118.77, 110.53, 106.43, 103.31, 16.51; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{26}H_{15}D_3N_5OCl$ $[M+H]^+$ 455.146 1, found 455.144 6。

1.3.5　4′-((5-溴-2-((4-氰基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (7e)　白色固体, 产率: 65.9%。m.p.: 301.0～303.4 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6,) δ_H: 10.28 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.66 (s, 2H), 7.50 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.23, 161.22, 158.23, 150.73, 144.56, 144.39, 136.43, 133.35, 132.97, 131.53, 131.44, 128.02, 127.92, 119.65, 119.32, 118.82, 110.52, 103.30, 94.24, 16.52; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{26}H_{15}D_3N_5OBr$ $[M+Na]^+$ 521.077 5, found 521.075 3。

1.3.6　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-碘嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (7f)　白色固体, 产率: 93.4%。m.p.: 304.0～305.0 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.23 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.97 (s, 4H), 7.68 (s, 2H), 7.49 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.66, 166.45, 158.98, 151.14, 144.60, 144.44, 136.31, 133.37, 132.96, 131.51, 131.42, 127.98, 127.93, 119.68, 119.35, 118.87, 110.49, 103.18, 16.56; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{26}H_{15}D_3N_5OI$ $[M+H]^+$: 547.081 7, found 547.080 3。

1.4　化合物8a～8s的合成

化合物**8a**～**8s**的合成方法类似于中间体**4a**～**4b**的合成, 将其中的$Pd(dppf)Cl_2$催化剂换成$Pd(PPh_3)_4$。

1.4.1　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(吡啶-4-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8a)　白色固体, 产率: 59.2%。m.p.: 254.5～256.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.41 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.73～8.63 (m, 2H), 7.98 (s, 4H), 7.87～7.81 (m, 2H), 7.69 (s, 2H), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 165.56, 160.29, 159.09, 150.90, 150.46, 144.61, 144.46, 141.01, 136.24, 133.39, 132.95, 131.58, 128.02, 127.91, 123.24, 119.64, 119.36, 118.91, 110.48, 110.05, 103.31; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{31}H_{16}D_6N_6O$ $[M+H]^+$ 501.230 5, found 501.230 6。

1.4.2　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(吡啶-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8b)　白色固体, 产率: 73.2%。m.p.: 250.4～252.8 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.33 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.61 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.96 (s, 4H), 7.67 (s, 2H), 7.55 (dt, J = 9.7, 5.1 Hz, 3H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 165.54, 159.94, 158.82, 150.90, 149.41, 149.01, 144.78, 144.47, 136.48, 136.18, 133.37, 132.95, 131.59, 129.46, 127.99, 127.89, 124.16, 119.69, 119.35, 118.78, 110.46, 109.94, 103.10; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{31}H_{16}D_6N_6O$ $[M+H]^+$ 501.230 5, found 501.229 4。

1.4.3　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-[5,5′-二吡啶]-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8c)　白色固体, 产率: 58.9%。m.p.: 298.2～299.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.41 (s, 1H), 9.23 (s, 3H), 8.82 (s, 1H), 7.97 (s, 4H), 7.67 (s, 2H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.4 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 165.57, 160.11, 159.26, 157.63, 156.44, 150.73, 144.61, 144.45, 136.30, 133.37, 132.98, 131.63, 128.01, 127.91, 127.86, 119.65, 119.34, 118.94, 110.48, 106.75, 103.34; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{15}D_6N_7O$ $[M+H]^+$ 502.225 7, found 502.223 6。

1.4.4　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(呋喃-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8d)　灰色固体, 产率: 22.0%。m.p.: 216.4～217.0 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.23 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.30～8.27 (m, 1H), 8.02～7.94 (m, 4H), 7.86 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 7.69 (s, 2H), 7.54 (dd, J = 9.0, 3.3 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 1.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.64, 157.69, 157.58, 151.17, 144.96, 144.55, 144.29, 141.22, 136.16, 133.36, 132.91, 131.66, 127.92, 127.89, 119.77, 119.36, 118.50, 117.82, 110.44, 108.92, 105.15, 102.72; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{15}D_6N_5O_2$ $[M+H]^+$ 490.214 5, found 490.215 0。

1.4.5　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(呋喃-2-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8e)　白色固体, 产率: 45.8%。m.p.: 255.8～256.9 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.33 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.99 (d, J = 1.9 Hz, 4H), 7.86 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.70 (s, 2H), 7.54 (dd, J = 8.6, 5.9 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 3.4, 1.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.36, 157.54, 155.55, 150.99, 146.42, 144.72, 144.51, 143.16, 136.26,

134.82, 133.37, 132.96, 131.61, 127.98, 127.91, 124.17, 118.69, 112.65, 110.47, 109.76, 104.59, 103.02; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{30}H_{15}D_6N_5O_2$ $[M+H]^+$ 490.214 5, found 490.214 8。

1.4.6 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(噻吩-2-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8f) 白色固体, 产率: 47.5%。m.p.: 278.0～280.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.33 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 1.7 Hz, 4H), 7.78 (dd, *J* = 3.7, 1.2 Hz, 1H), 7.70 (s, 2H), 7.66 (dd, *J* = 5.1, 1.1 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.23 (dd, *J* = 5.1, 3.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.60, 157.79, 157.68, 150.90, 144.77, 144.50, 136.28, 134.36, 133.37, 132.95, 131.60, 128.06, 128.02, 127.92, 126.83, 125.22, 119.73, 119.35, 118.66, 110.48, 107.47, 102.98; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{30}H_{15}D_6N_5OS$ $[M+H]^+$ 506.191 6, found 506.190 8。

1.4.7 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8g) 白色固体, 产率: 42.0%。m.p.: 275.6～277.4 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 13.13 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.02～7.94 (m, 4H), 7.87 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.69 (s, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 158.02, 157.75, 151.23, 144.90, 144.56, 136.09, 133.36, 132.92, 131.69, 130.02, 127.93, 127.89, 119.75, 119.36, 118.57, 110.44, 105.23, 102.82; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{29}H_{15}D_6N_7O$ $[M+H]^+$ 490.225 7, found 490.223 9。

1.4.8 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(1H-吡唑-4-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8h) 白色固体, 产率: 26.6%。m.p.: 263.7～265.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 13.12 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.02～7.91 (m, 4H), 7.68 (s, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.09, 157.12, 157.08, 151.31, 145.12, 144.58, 136.06, 133.36, 132.90, 131.71, 127.88, 119.82, 119.36, 118.33, 112.76, 110.43, 106.19, 102.47; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{29}H_{15}D_6N_7O$ $[M+H]^+$ 490.225 7, found 490.224 4。

1.4.9 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(5-(羟甲基)噻吩-2-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′,5′-双(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8i) 白色固体, 产率: 37.5%。m.p.: 255.0～256.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.29 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.01～7.92 (m, 4H), 7.69 (s, 2H), 7.59 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.53 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.56, 157.58, 157.51, 150.91, 147.13, 144.79, 144.50, 136.26, 133.36, 133.12, 132.94, 131.58, 128.00, 127.91, 124.91, 124.81, 119.73, 119.35, 118.65, 110.48, 107.73, 102.96, 58.84; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{31}H_{17}D_6N_5O_2S$ $[M+H]^+$ 536.202 2, found 536.200 3。

1.4.10 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(吡啶-4-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8j) 白色固体, 产率: 83.3%。m.p.: 281.2～282.5 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.41 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.72～8.67 (m, 2H), 7.97 (d, *J* = 1.5 Hz, 4H), 7.88～7.81 (m, 2H), 7.68 (s, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 165.55, 160.27, 159.09, 150.86, 150.45, 144.60, 144.44, 141.01, 136.24, 133.36, 132.93, 131.67, 131.58, 127.99, 127.89, 123.23, 119.48 (d, *J* = 30.2 Hz), 118.91, 110.49, 110.05, 103.32, 16.80; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{31}H_{19}D_3N_6O$ $[M+H]^+$ 498.211 6, found 498.212 1。

1.4.11 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(吡啶-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8k) 白色固体, 产率: 87.6%。m.p.: 290.5～291.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.33 (s, 1H), 8.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.62 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 8.20 (dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 4H), 7.67 (s, 2H), 7.60～7.50 (m, 3H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 165.53, 159.94, 158.82, 150.86, 149.42, 149.01, 144.78, 144.46, 136.47, 136.18, 133.37, 132.95, 131.69, 131.60, 129.46, 127.98, 127.89, 124.16, 119.52 (d, *J* = 34.8 Hz), 118.78, 110.47, 109.94, 103.10, 16.82; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{31}H_{19}D_3N_6O$ $[M+H]^+$ 498.211 6, found 498.210 5。

1.4.12 4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-[5,5′-二吡啶]-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-*d*$_3$)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8l) 白色固体, 产率: 74.5%。m.p.: 303.4～305.0 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.41 (s, 1H), 9.23 (s, 2H), 9.23 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.97 (s, 4H), 7.67 (s, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 165.56, 160.11, 159.26, 157.63, 156.44, 150.69, 144.61, 144.44, 136.30, 133.37, 132.97, 131.72, 131.64, 128.00, 127.90, 127.86, 119.49 (d, *J* = 30.9 Hz), 118.93, 110.49, 106.74, 103.34, 16.82; HRMS (ESI) *m*/*z*: Calcd. for $C_{30}H_{18}D_3N_7O$ [M+

H]$^+$ 499.206 9, found 499.204 8。

1.4.13　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(呋喃-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8m)　白色固体, 产率: 59.5%。m.p.: 284.6～286.6 ℃, HPLC purity: 95.12%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.22 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.29～8.25 (m, 1H), 8.01～7.93 (m, 4H), 7.84 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 2H), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.63, 157.69, 157.58, 151.13, 144.96, 144.55, 144.29, 141.22, 136.16, 133.36, 132.91, 131.77, 131.68, 127.92, 127.89, 119.56 (d, J = 41.7 Hz), 118.51, 117.82, 110.45, 108.92, 105.16, 102.73, 16.66; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{18}D_3N_5O_2$ [M+H]$^+$ 487.195 7, found 487.197 1。

1.4.14　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(呋喃-2-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8n)　白色固体, 产率: 80.9%。m.p.: 287.0～288.7 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.32 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.02～7.94 (m, 4H), 7.86 (dd, J = 1.9, 0.8 Hz, 1H), 7.69 (s, 2H), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.98 (dd, J = 3.4, 0.8 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 3.4, 1.9 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.35, 157.53, 155.56, 150.95, 146.41, 144.71, 144.50, 143.16, 136.26, 133.38, 132.96, 131.72, 131.63, 127.98, 127.92, 119.54 (d, J = 36.6 Hz), 118.69, 112.66, 110.47, 109.77, 104.59, 103.03, 16.61; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{18}D_3N_5O_2$ [M+H]$^+$ 487.195 7, found 487.193 9。

1.4.15　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(噻吩-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8o)　白色固体, 产率: 42.8%。m.p.: 296.6～298.4 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.24 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.06 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 8.02～7.94 (m, 4H), 7.79～7.70 (m, 2H), 7.69 (s, 2H), 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.79, 158.88, 157.67, 151.16, 144.91, 144.52, 136.11, 133.37, 133.09, 132.91, 131.75, 131.66, 127.95, 127.89, 127.35, 127.00, 123.55, 119.55 (d, J = 38.6 Hz), 118.54, 110.44, 108.52, 102.79, 16.76; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{18}D_3N_5OS$ [M+H]$^+$ 503.172 8, found 503.173 5。

1.4.16　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(噻吩-2-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8p)　白色固体, 产率: 68.5%。m.p.: 297.6～299.1 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.32 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.01～7.92 (m, 4H), 7.77 (dd, J = 3.7, 1.2 Hz, 1H), 7.68 (s, 2H), 7.64 (dd, J = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (dd, J = 5.1, 3.7 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.60, 157.79, 157.68, 150.87, 144.77, 144.50, 136.29, 134.37, 133.36, 132.94, 131.71, 131.62, 128.06, 128.00, 127.91, 126.81, 125.22, 119.53 (d, J = 38.1 Hz), 118.67, 110.49, 107.47, 103.00, 16.70; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{18}D_3N_5OS$ [M+H]$^+$ 503.172 8, found 503.171 4。

1.4.17　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8q)　白色固体, 产率: 48.3%。m.p.: 310.7～312.6 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 13.31～13.01 (m, 1H), 10.28 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.05～7.93 (m, 4H), 7.90～7.78 (m, 1H), 7.70 (s, 2H), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 158.01, 157.74, 151.18, 144.90, 144.55, 136.09, 133.36, 132.92, 131.79, 131.70, 127.92, 127.89, 119.75, 119.36, 118.56, 110.44, 105.22, 102.81, 16.69; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{29}H_{18}D_3N_7O$ [M+H]$^+$ 487.206 9, found 487.205 3。

1.4.18　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(1H-吡唑-4-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8r)　白色固体, 产率: 35.9%。m.p.: 292.4～294.4 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 13.13 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.03～7.92 (m, 4H), 7.68 (s, 2H), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.36～7.28 (m, 2H), 2.16 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 164.08, 157.12, 157.08, 151.28, 145.12, 144.58, 136.07, 133.36, 132.90, 131.82, 131.73, 127.91, 127.88, 119.83, 119.36, 118.33, 112.77, 110.43, 106.18, 102.46, 16.71; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{29}H_{18}D_3N_7O$ [M+H]$^+$ 487.206 9, found 487.206 0。

1.4.19　4′-((2-((4-氰基苯基)氨基)-5-(5-(羟甲基)噻吩-2-基)嘧啶-4-基)氧基)-3′-甲基-5′-(甲基-d_3)-[1,1′-联苯]-4-腈 (8s)　白色固体, 产率: 66.1%。m.p.: 258.9～261.0 ℃; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.31 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.03～7.94 (m, 4H), 7.70 (s, 2H), 7.59 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.55 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 163.54, 157.57, 157.52, 150.87,

147.14, 144.79, 144.49, 136.26, 133.38, 133.12, 132.95, 131.69, 131.60, 128.00, 127.92, 124.92, 124.80, 119.56 (d, J = 38.6 Hz), 118.64, 110.48, 107.72, 102.94, 58.84, 16.70; HRMS (ESI) m/z: Calcd. for $C_{31}H_{20}D_3N_5O_2S$ $[M+H]^+$ 533.183 4, found 533.181 9。

2 生物活性检测

本实验中所有化合物的生物活性检测, 包括抗病毒活性、细胞毒性、RT酶抑制活性均由比利时鲁汶大学Rega研究所进行[10]。

作者贡献: 张坤负责化合物的合成、表征、波谱数据解析; 卜悦悦负责化合物的合成及数据整理; Christophe Pannecouque、Erik De Clercq和Enzo Tramontano负责化合物的生物活性检测; Phuong-Thao Tran参与分子设计; 王帅负责课题规划及文章的撰写; 陈芬儿负责课题规划及论文的修改、校对。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Kang DW, Sun YY, Feng D, et al. Development of novel dihydrofuro[3, 4-*d*]pyrimidine derivatives as HIV-1 NNRTIs to overcome the highly resistant mutant strains F227L/V106A and K103N/Y181C [J]. J Med Chem, 2022, 65: 2458-2470.

[2] Wang JS, Zhao KX, Zhang K, et al. Structure-guided design of novel biphenyl-quinazoline derivatives as potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors featuring improved anti-resistance, selectivity, and solubility [J]. Bioorg Chem, 2024, 147: 107340.

[3] Jin X, Wang S, Zhao LM, et al. Development of fluorine-substituted NH2-biphenyl-diarylpyrimidines as highly potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: boosting the safety and metabolic stability [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 1192-1203.

[4] Zhao LM, Pannecouque C, Clercq ED, et al. Structure-based design of novel heterocycle-substituted ATDP analogs as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with improved selectivity and solubility [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 4906-4917.

[5] Lane T, Makarov V, Nelson JAE, et al. *N*-Phenyl-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-1, 2, 4-triazol-3-amine as a new class of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor [J]. J Med Chem, 2023, 66: 6193-6217.

[6] Zhang K, Zhang YJ, Li M, et al. Deciphering the enigmas of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): a medicinal chemistry expedition towards combating HIV drug resistance [J]. Med Res Rev, 2024, 45: 426-483.

[7] Sang YL, Pannecouque C, De Clercq E, et al. Picomolar inhibitor of reverse transcriptase featuring significantly improved metabolic stability [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 3054-3066.

[8] Sun YY, Zhou ZZ, Wang N, et al. Discovery of novel aryl triazolone dihydropyridines (ATDPs) targeting highly conserved residue W229 as promising HIV-1 NNRTIs [J]. J Med Chem, 2024, 67: 6570-6584.

[9] Zhang K, Xing TH, Ding L, et al. Deuteration strategy-inspired design of novel diarylpyrimidine derivatives as potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors featuring improved efficacy, selectivity, and druggability [J]. J Med Chem, 2025, 68: 8564-8577.

[10] Zhou ZZ, Xie MH, Zhuo ZJ, et al. Structure-based design of novel 2,4,5-trisubstituted pyrimidine derivatives as potent HIV-1 NNRTIs by exploiting the tolerant regions in NNTRIs binding pocket [J]. Eur J Med Chem, 2025, 289: 117464.

[11] Chen XM, Pannecouque C, De Clercq E, et al. Structure-based discovery of novel diarylpyrimidines as potent and selective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: from CH(CN)-biphenyl-diarylpyrimidines to C NNH2-biphenyl-diarylpyrimidines [J]. Eur J Med Chem, 2025, 285: 117271.

[12] Young MA, Lane TR, Raman R, et al. Cryo-EM structure of HIV-1 reverse transcriptase with *N*-phenyl-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol-3-amine: a new HIV-1 non-nucleoside inhibitor [J]. ACS Infect Dis, 2025, 11: 1257-1267.

[13] Meng B, Zhuo Z, Yu H, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of benzo[4, 5]thieno[2, 3-*d*]pyrimidine derivatives as novel HIV-1 NNRTIs [J]. Chin Chem Lett, 2024, 35: 108827.

[14] Dai JJ, Jiang XY, Gao H, et al. Discovery of novel fused-heterocycle-bearing diarypyrimidine derivatives as HIV-1 potent NNRTIs targeting tolerant region I for enhanced antiviral activity and resistance profile [J]. Eur J Med Chem, 2025, 281: 117033.

[15] Mordant C, Schmitt B, Pasquier E, et al. Synthesis of novel diarylpyrimidine analogues of TMC278 and their antiviral activity against HIV-1 wild-type and mutant strains [J]. Eur J Med Chem, 2007, 42: 567-579.