

基于 CVL-231 的环丁胺类 M4 正向变构调节剂的设计、合成与活性

李馥菀¹, 李文歆², 何姝芳³, 陈毅昆², 周皓², 周海峰¹, 刘祈星¹, 田峦鸢²

(1. 三峡大学生物与制药学院, 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 宜昌 443002;

2. 宜昌人福药业有限责任公司, 宜昌 443005;

3. 宜昌天睿生物医药有限责任公司, 宜昌 443215)

摘要 以临床前药物 CVL-231 为先导化合物, 引入高活性化合物 VU6000918 中的 2-三氟甲基吡啶基团, 通过改造杂环基团设计合成了 27 个 2-三氟甲基吡啶氮杂环丁烷酰胺类化合物. 采用 FLIPR 荧光检测技术测定了化合物对 M4 受体细胞的变构调节活性. 结果表明, 部分化合物展现出显著的细胞活性, 其中化合物 IV1, IV12, IV20, IV23, IV25, IV26 和 IV27 的活性尤为突出. 半最大效应浓度 (EC₅₀ 值) 测定结果显示, 化合物 IV23 的 EC₅₀ 值低至 979 nmol/L, 略高于阳性对照 VU0467154. 通过构效关系分析发现, 喹啉环的引入对活性的提升具有重要作用, 尤其是 4-甲基喹啉结构. 分子对接模拟结果表明, 化合物 IV23 与 M4 受体蛋白 (7TRP) 存在氢键和 π - π 堆积相互作用, 这可以解释其与目标蛋白之间可能的作用机制. 化合物 IV23 作为一种具有潜在前景的 M4 正向变构调节剂先导化合物, 为后续的结构优化和药物开发提供了重要的研究基础.

关键词 M4 正向变构调节剂; 三氟甲基吡啶; 环丁胺; 合成; 分子对接

中图分类号 O626

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20250257

Design, Synthesis and Activity of Cyclobutylamine M4 Positive Allosteric Modulator Based on CVL-231

LI Fuchun¹, LI Wenxin², HE Shufang³, CHEN Yikun², ZHOU Hao²,

ZHOU Haifeng¹, LIU Qixing^{1*}, TIAN Luanyuan^{2*}

(1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological and

Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Yichang Humanwell Pharmaceutical Co., Ltd., Yichang 443005, China;

3. Yichang Tianrui Biopharm Co., Ltd., Yichang 443215, China)

Abstract Using the preclinical drug CVL-231 as a lead compound and introducing the 2-trifluoromethylpyridine moiety from the high-activity compound VU6000918, 27 novel 2-trifluoromethylpyridine cyclobutylamide derivatives were designed and synthesized by modifying the heterocyclic moiety. The allosteric modulatory activity of the compounds on M4 receptor cells was assessed using the FLIPR fluorescence detection technique. The results revealed that several compounds exhibited significant cellular activity, especially for compounds IV1, IV12, IV20, IV23, IV25, IV26, and IV27. The results of the EC₅₀ determination indicated that compound IV23 had an EC₅₀ value as low as 979 nmol/L, which is slightly higher than that of the positive control VU0467154. Structure-activity relationship

收稿日期: 2025-09-11. 网络首发日期: 2025-11-24.

联系人简介: 刘祈星, 男, 博士, 副教授, 主要从事药物化学和有机化学方面的研究. E-mail: qixingliu86@163.com

田峦鸢, 男, 博士, 高级工程师, 主要从事麻醉相关及中枢神经系统创新药方面的研究. E-mail: tianluanyuan@renfu.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22278244)和宜昌人福药业有限责任公司研发项目(批准号: SDHZ2023029)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22278244) and the Research Fund from Yichang Humanwell Pharmaceutical Co., Ltd., China(No.SDHZ2023029).

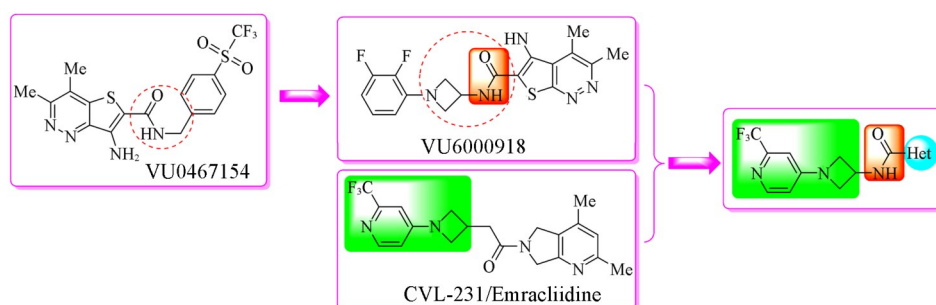
(SAR) analysis revealed that the introduction of a quinoline ring, particularly the 4-methylquinoline moiety, significantly enhanced the activity of the compounds. Molecular-docking simulations revealed that compound IV23 forms both hydrogen-bond and π - π stacking interactions with the M4 receptor protein (7TRP), providing a plausible mechanistic for its recognition by the target protein. In summary, compound IV23, as a promising lead compound for M4 positive allosteric modulators, provides an important research basis for subsequent structural optimization and drug development.

Keywords M4 positive allosteric modulator; Trifluoromethylpyridine; Cyclobutylamine; Synthesis; Molecular docking

精神分裂症是一种严重的精神疾病,影响认知和行为的多个领域^[1]. 全球精神分裂症的终生患病率达3.8%~8.4%^[2],通常在青春期晚期至成年早期首次发作,并且病程较长,患者的生活质量明显受损,失业率达80%~90%^[3],平均预期寿命减少10~20岁^[4],超过半数患者最终出现精神残疾,给患者、家属和社会带来巨大的负担和护理成本.

毒蕈碱乙酰胆碱受体(mAChR)的5种亚型(M1~M5)是G蛋白偶联受体,广泛分布于中枢神经系统,参与注意力、学习记忆、疼痛、睡眠、运动、胃肠动力及心血管调节等多种生理功能^[5]. M1与M4受体被视为阿尔茨海默病和精神分裂症的潜在治疗靶点,可通过激活M1/M4受体,间接对多巴胺能通路产生影响,从而改善精神症状的效果. 2024年,美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准KarXT作为口服药物,用于治疗成人精神分裂症患者. KarXT成为数十年来首个获得FDA批准,采用全新机制治疗精神分裂症的药物^[6]. 然而,由于5个亚型结合位点高度同源,药物的脱靶效应和胆碱能系统的过度激活,会导致包括恶心、消化不良、便秘和呕吐在内的一系列不良反应^[7].

近年来,研究人员发现了一种M4受体选择性新策略——正向变构调节剂(PAMs). PAMs不直接激活受体,而是通过与M4受体的变构位点结合,增强内源性乙酰胆碱(ACh)的信号传导,精确调节多巴胺能神经传递. 与M4激动剂相比,PAMs对M4 mAChR功能的调节更为精确,脱靶效应更少,亚型选择性高,副作用小^[8-11]. 在PAMs的研究过程中氮杂环丁烷是药物化学中的一个特殊结构,近年来,越来越多的药物设计、合成研究尝试引入氮杂环丁烷^[12-14]. 2014年, Jones等^[15,16]开发了一种噻吩并吡啶的M4受体正向变构调节剂VU0467154(Scheme 1). 该化合物显示出良好的细胞活性,同时在亚型选择性实验中,对M受体其它亚型无明显作用,未引发外周毒蕈碱受体激活所引起的主要副作用,目前已经对其进行了系统的临床前研究,并显示出良好的潜力和安全性. 2017年, Lindsley等^[17]在稠环和芳基片段之间引入氮杂环丁烷替换传统PAMs存在的亚甲基连接键得到化合物VU6000918(Scheme 1),该化合物具有显著活性($EC_{50}=19$ nmol/L),并改善了药物代谢动力学. 此后, AbbVie公司发现了第一个活性优异的PAMs临床候选药物CVL-231(Emraclidine, $EC_{50}=12.2$ nmol/L)(Scheme 1)^[18]. 临床前研究发现其对M4受体具有较高的选择性,在I期临床研究中, CVL-231显示出与KarXT相当的疗效及良好的安全性,遗憾的是在II期实验中, CVL-231在10或30 mg剂量下未能取得预期疗效,导致临床终止^[19-21].



Scheme 1 Design strategy of target compounds

为了挖掘CVL-231的潜力,在保持化合物活性的同时增强其代谢稳定性和药代动力学,本文以CVL-231为先导化合物,在药物设计中保留N-2-三氟甲基吡啶环丁胺主体结构,同时参考高活性化合物VU6000918对连接基团进行改造,去除亚甲基连接键,直接通过酰胺键将N-2-三氟甲基吡啶环丁胺

与杂环类化合物连接,设计了系列2-三氟甲基吡啶氮杂环丁烷酰胺类化合物(Scheme 1),并进行了M4细胞活性和构效关系研究.

1 实验部分

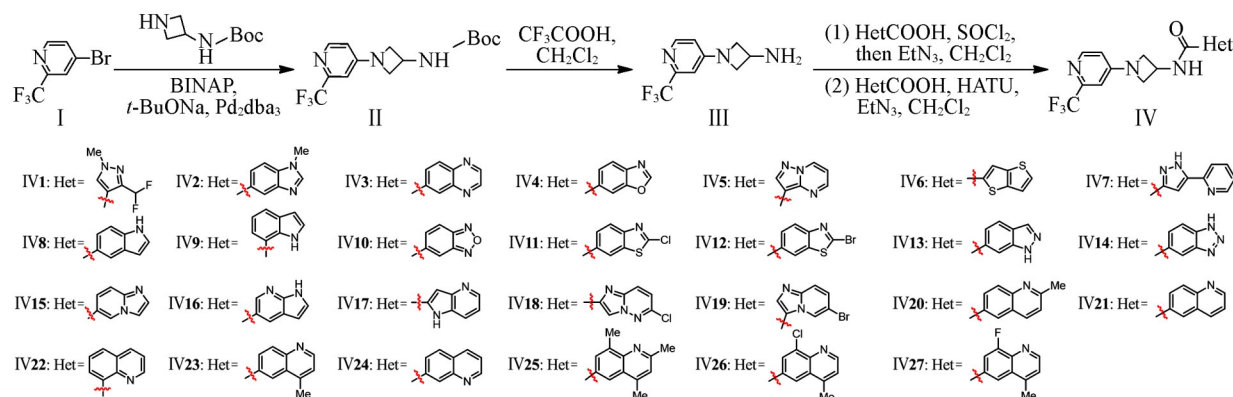
1.1 试剂与仪器

氮杂环丁烷-3-氨基甲酸叔丁酯、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)和叔丁醇钠,化学纯,上海皓鸿生物医药科技有限公司;三(二亚苄基丙酮)二钯[Pd₂(dba)₃]、1,1'-联萘-2,2'-双二苯膦(BINAP)、三乙胺(TEA)、氯化亚砷、三氟乙酸(TFA)、不同取代的2-三氟甲基吡啶类化合物和杂环羧酸类化合物,化学纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;盐酸和甲苯,分析纯,成都市科隆化学品有限公司;氢氧化钠,分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;二氯甲烷(DCM),分析纯,成都金山化学试剂有限公司;稳定表达M4的CHO细胞,上海药明康德新药开发有限公司;F12 gibco FBS培养基,依科赛生物科技有限公司;Geneticin培养基、Penicillin/Streptomycin培养基和Fluo-4 Direct试剂,赛默飞世尔科技公司.

Bruker AV 400 MHz型核磁共振波谱仪,瑞士Bruker公司;SHB-III A型循环水式多用真空泵,上海豫康科教仪器设备有限公司;EYELASB-1100型旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;低温冷却液体循环泵,巩义市英峪予华仪器厂;ZF-6型三用紫外分析仪,上海嘉鹏科技有限公司;FA2104B型分析天平,上海越平科技仪器有限公司;X-4型数字显示显微熔点测定仪,北京泰克仪器有限公司;6210ESI/TOF型质谱仪,安捷伦科技公司;Greiner 384孔板,格瑞纳生物科技有限公司;Vi-cell XR型细胞存活分析仪,贝克曼库尔特公司.

1.2 实验过程

目标化合物IV1~IV27的合成路线如Scheme 2所示.以4-溴-2-三氟甲基吡啶(I)为原料,以Pd₂(dba)₃为催化剂,BINAP为配体,在碱性条件下与氮杂环丁烷-3-氨基甲酸叔丁酯发生Buchwald-Hartwig交叉偶联反应,得到[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]氨基甲酸叔丁酯(II);化合物II在三氟乙酸条件下脱除Boc基团,得到1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-胺(III);最后,将中间体III分别通过两种方法合成目标化合物^[22,23].第一种方法:首先通过杂环羧酸与二氯亚砷在回流条件下制备杂环酰氯,然后与中间体III发生缩合反应,得到目标化合物;第二种方法:使用HATU缩合剂,在三乙胺碱性条件下直接发生缩合反应得到目标化合物,该方法适用性更广,反应步骤更短,操作简便.实验中目标化合物IV1~IV6采用第一种方法合成,而目标化合物IV7~IV27采用第二种方法合成.利用¹H NMR,¹³C NMR和HRMS谱对目标化合物IV1~IV27的结构进行了表征(见本文支持信息图S1~图S81).



Scheme 2 General synthetic route for target compounds

1.2.1 [1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]氨基甲酸叔丁酯(II)的合成 在150 mL反应瓶中加入4-溴-2-三氟甲基吡啶(I)(2.00 g, 8.85 mmol)、氮杂环丁烷-3-氨基甲酸叔丁酯(1.67 g, 9.74 mmol)、叔丁醇钠(1.19 g, 12.39 mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(202 mg, 0.22 mmol)、1,1'-联萘-2,2'-双二苯

膦(412 mg, 0.66 mmol)和甲苯(50 mL),升温至80 °C搅拌12 h后冷却,加水(100 mL),用乙酸乙酯(50 mL×3)萃取,以饱和氯化钠溶液(100 mL)洗涤,用无水Na₂SO₄干燥,经柱层析分离得到白色固体II共2.61 g,产率93%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃), δ: 8.28(d, *J*=5.8 Hz, 1H), 6.57(s, 1H), 6.33(d, *J*=5.5 Hz, 1H), 5.30(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 4.67(s, 1H), 4.33~4.29(m, 2H), 3.84~3.81(m, 2H), 1.45(s, 9H)。

1.2.2 1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-胺(III)的合成 将中间体II(2.61 g, 8.23 mmol)和二氯甲烷(25 mL)加入至100 mL反应瓶中,待溶解后于冰浴下缓慢滴加三氟乙酸(8 mL),加毕于室温下搅拌2 h。用薄层色谱(TLC)监测反应完成后,用质量分数为10%的NaOH水溶液将pH调至9~11,用二氯甲烷(50 mL×3)萃取,合并有机相,以无水Na₂SO₄干燥,经减压浓缩得到白色固体III共1.70 g,产率95%。该产物未经分离,直接用于下一步反应。

1.2.3 目标化合物的IV1~IV6的合成 将杂环羧酸(0.8 mmol)、甲苯(3 mL)和氯化亚砷(476 mg, 4.0 mmol)加入50 mL反应瓶中,加热至110 °C回流2 h。经减压浓缩并加入二氯甲烷(5 mL)溶解后,于冰浴下缓慢滴加中间体III(174 mg, 0.8 mmol)的二氯甲烷(3 mL)溶液和三乙胺(202 mg, 2.0 mmol),滴毕于室温下搅拌2 h。用薄层色谱(TLC)监测反应完成后,用水洗涤(10 mL×3),以无水Na₂SO₄干燥,经减压浓缩和柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇体积比50:1),得到目标产物IV1~IV6。

1.2.4 目标化合物的IV7~IV27的合成 将杂环羧酸(0.8 mmol)、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N'*,*N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU, 365 mg, 0.96 mmol)、二氯甲烷(3 mL)和三乙胺(243 mg, 2.4 mmol)加入至25 mL反应瓶中,室温下搅拌30 min后,加入中间体III(174 mg, 0.8 mmol),室温下反应4 h。用薄层色谱(TLC)监测反应完成后,加水(10 mL)淬灭,用二氯甲烷(15 mL×3)萃取,以无水Na₂SO₄干燥,经减压浓缩和柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇体积比50:1)得到目标化合物IV7~IV27。

1.2.5 目标化合物IV1~IV27的表征 *N*-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(3-二氟甲基-1-甲基吡啶)-4-甲酰胺(IV1):白色固体,产率84%, m. p. 205~207 °C。¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.87(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 8.36~8.20(m, 2H), 7.32(t, *J*=54.2 Hz, 1H), 6.81(d, *J*=1.7 Hz, 1H), 6.61(d, *J*=4.1 Hz, 1H), 4.85~4.79(m, 1H), 4.37~4.33(m, 2H), 3.93~3.91(m, 5H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 161.4, 155.7, 150.0, 147.4(d, *J*=32.6 Hz), 145.2(t, *J*=23.1 Hz), 132.9, 122.4(d, *J*=274.4 Hz), 116.1, 110.1(t, *J*=233.3 Hz), 108.6, 102.9, 58.4, 40.2, 39.8; ESI-HRMS(C₁₅H₁₅F₅N₅O计算值), *m/z*: 376.1193(376.1191)[*M*+H]⁺。

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(1-甲基苯并咪唑-5-基)甲酰胺(IV2):白色固体,产率64%, m. p. 233~235 °C。¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.09(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 8.30(s, 2H), 8.25(d, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.87(dd, *J*₁=8.5, *J*₂=1.6 Hz, 1H), 7.64(d, *J*=8.5 Hz, 1H), 6.80(d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.59(dd, *J*₁=5.7, *J*₂=2.3 Hz, 1H), 4.99~4.91(m, 1H), 4.40~4.36(m, 2H), 4.06~4.02(m, 2H), 3.41(s, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 167.0, 155.8, 149.9, 147.4(q, *J*=32.7 Hz), 146.8, 143.3, 137.2, 127.8, 122.5, 122.4(q, *J*=272.7 Hz), 119.3, 110.4, 108.5, 102.9(d, *J*=3.1 Hz), 58.4, 40.8, 31.3; ESI-HRMS(C₁₈H₁₇F₃N₅O计算值), *m/z*: 376.1379(376.1380)[*M*+H]⁺。

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(喹啶啉-6-基)甲酰胺(IV3):白色固体,产率78%, m. p. 240~242 °C。¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.50(d, *J*=6.9 Hz, 1H), 9.04~9.02(m, 2H), 8.67(s, 1H), 8.31~8.26(m, 2H), 8.18(d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.82(d, *J*=2.1 Hz, 1H), 6.62(dd, *J*₁=5.6, *J*₂=2.1 Hz, 1H), 5.01~4.94(m, 1H), 4.44~4.40(m, 2H), 4.10~4.06(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 165.5, 155.8, 140.0, 147.5, 147.4(q, *J*=30.7), 147.2, 143.9, 142.0, 135.3, 129.9, 129.0, 128.9, 122.4(q, *J*=274.3 Hz), 108.6, 102.9, 58.3, 41.0; ESI-HRMS(C₁₈H₁₅F₃N₅O计算值), *m/z*: 374.1215(374.1223)[*M*+H]⁺。

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(苯并恶唑-6-基)甲酰胺(IV4):白色固体,产率72%, m. p. 191~193 °C。¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.23(d, *J*=6.8 Hz, 1H), 8.90(s, 1H),

8.29(s, 1H), 8.26(d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.98(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.90(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 6.81(d, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.61(d, $J=5.5$ Hz, 1H), 4.98~4.90(m, 1H), 4.42~4.37(m, 2H), 4.05~4.02(m, 2H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 165.8, 156.7, 155.8, 149.9, 149.6, 147.4(q, $J=32.7$ Hz), 142.6, 131.9, 124.7, 122.4(d, $J=274.3$ Hz), 120.3, 110.9, 108.5, 102.9, 58.3, 40.9; ESI-HRMS($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$ 计算值), m/z : 363.1064(363.1063) [M+H] $^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(吡啶并嘧啶-3-基)甲酰胺(IV5): 白色固体, 产率62%, m. p. 213~215 °C. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.31(dd, $J_1=7.0$, $J_2=1.5$ Hz, 1H), 8.81(dd, $J_1=4.1$, $J_2=1.5$ Hz, 1H), 8.61(s, 1H), 8.50(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 8.25(d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.28(dd, $J_1=7.0$, $J_2=4.2$ Hz, 1H), 6.79(d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.59(dd, $J_1=5.6$, $J_2=2.0$ Hz, 1H), 5.02~4.94(m, 1H), 4.42~4.38(m, 2H), 4.05~4.02(m, 2H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 161.5, 155.8, 152.9, 149.9, 147.3(q, $J=32.8$ Hz), 146.4, 145.8, 137.9, 122.4(q, $J=274.3$ Hz), 110.5, 108.7, 105.1, 103.1, 58.7, 40.6; ESI-HRMS($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ 计算值), m/z : 363.1175(363.1176) [M+H] $^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(噻吩并噻吩-2-基)甲酰胺(IV6): 白色固体, 产率93%, m. p. 197~199 °C. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.24(d, $J=7.1$ Hz, 1H), 8.26(d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.14(s, 1H), 7.86(d, $J=5.3$ Hz, 1H), 7.50(d, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.82(d, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.60(dd, $J_1=5.7$, $J_2=2.2$ Hz, 1H), 4.93~4.85(m, 1H), 4.40~4.36(m, 2H), 4.04~4.00(m, 2H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 161.9, 155.7, 149.9, 147.4(q, $J=32.7$ Hz), 142.2, 141.0, 138.9, 132.2, 122.4(q, $J=274.3$ Hz), 121.7, 120.8, 108.6, 102.9(d, $J=3.1$ Hz), 58.3, 40.8; ESI-HRMS($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}_2$ 计算值), m/z : 384.0049(384.0447) [M+H] $^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-[5-(吡啶-2-基)吡啶-3-基]甲酰胺(IV7): 白色固体, 产率78%, m. p. 237~239 °C. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 14.03~13.88(m, 1H), 9.23~9.01(m, 1H), 8.65~8.59(m, 1H), 8.25~8.23(m, 1H), 7.99~7.84(m, 2H), 7.57~7.31(m, 2H), 6.81~6.76(m, 1H), 6.60~6.56(m, 1H), 4.96~4.92(m, 1H), 4.39~4.32(m, 2H), 4.07~4.01(m, 2H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 162.0, 155.8, 149.9, 149.8, 147.9(q, $J=32.7$ Hz), 143.7, 138.0, 137.4, 123.9, 122.4(q, $J=272.8$ Hz), 120.9, 119.6, 108.5, 104.6, 102.9, 58.3, 38.7; ESI-HRMS($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ 计算值), m/z : 389.1332(389.1332) [M+H] $^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(吡啶-5-基)甲酰胺(IV8): 白色固体, 产率69%, m. p. 241~243 °C. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.37(s, 1H), 8.95(d, $J=7.0$ Hz, 1H), 8.25(d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.21(s, 1H), 7.70(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.47~7.44(m, 2H), 6.81(d, $J=1.9$ Hz, 1H), 6.59(dd, $J_1=5.6$, $J_2=1.8$ Hz, 1H), 6.55(s, 1H), 5.00~4.91(m, 1H), 4.40~4.36(m, 2H), 4.05~4.01(m, 2H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 167.7, 155.8, 149.9, 147.4(q, $J=32.6$ Hz), 138.0, 127.5, 127.2, 125.3, 123.8(q, $J=272.8$ Hz), 121.1, 120.6, 111.4, 108.5, 102.9, 102.6, 58.5, 40.7; ESI-HRMS($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$ 计算值), m/z : 361.1270(361.1271) [M+H] $^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(吡啶-7-基)甲酰胺(IV9): 白色固体, 产率78%, m. p. 227~229 °C. ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.21(s, 1H), 9.16(d, $J=6.8$ Hz, 1H), 8.26(d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.76(t, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.39(s, 1H), 7.10(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.82(d, $J=1.9$ Hz, 1H), 6.60~6.58(m, 1H), 6.52(s, 1H), 5.05~4.99(m, 1H), 4.43~4.38(m, 2H), 4.11~4.07(m, 2H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 167.5, 155.8, 149.9, 147.4(q, $J=32.8$ Hz), 134.7, 129.7, 127.2, 124.6, 122.5(q, $J=274.3$ Hz), 120.6, 118.5, 116.8, 108.5, 102.9, 101.53, 58.3, 40.6; ESI-HRMS($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$ 计算值), m/z : 361.1271(361.1271) [M+H] $^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(苯并噻二唑-5-基)甲酰胺(IV10): 白色固体, 产率86%, m. p. 231~233 °C; ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.49(s, 1H), 8.63~8.58(m, 1H), 8.31~8.13(m, 2H), 7.96(d, $J=9.4$ Hz, 1H), 6.82(s, 1H), 6.63(s, 1H), 4.93(s, 1H), 4.43~4.39(m,

2H), 4.07~4.05 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 164.8, 155.7, 149.9, 149.5, 149.2, 147.4 (q, $J=32.2$ Hz), 137.8, 131.7, 122.4 (q, $J=274.6$ Hz), 116.9, 116.5, 108.6, 102.9, 58.2, 41.1; ESI-HRMS ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2$ 计算值), m/z : 364.1017(364.1016) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(2-氯苯并噻唑-6-基)甲酰胺(IV11): 白色固体, 产率 73%, m. p. 193~195 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.27 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.26 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J=1.2$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J_1=5.7$, $J_2=2.2$ Hz, 1H), 5.97~4.89 (m, 1H), 4.41~4.37 (m, 2H), 4.04~4.00 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 165.8, 155.9, 155.8, 152.7, 149.9, 147.4 (q, $J=32.7$ Hz), 136.3, 131.9, 126.4, 122.7, 122.5, 122.4 (q, $J=274.4$ Hz), 108.5, 102.9, 58.3, 41.0; ESI-HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{OS}$ 计算值), m/z : 413.0448(413.0445) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(2-溴苯并噻唑-6-基)甲酰胺(IV12): 白色固体, 产率 69%, m. p. 207~209 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.27 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.25 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.09~8.01 (m, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.60~6.59 (m, 1H), 4.96~4.90 (m, 1H), 4.41~4.37 (m, 2H), 4.04~4.00 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 165.9, 155.7, 154.1, 149.9, 147.4 (q, $J=32.6$ Hz), 142.9, 137.4, 131.7, 126.3, 122.4 (q, $J=273.0$ Hz), 122.3, 122.2, 108.5, 102.9, 58.3, 41.0; ESI-HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrF}_3\text{N}_4\text{OS}$ 计算值), m/z : 456.9942(456.9940) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(吡啶-6-基)甲酰胺(IV13): 白色固体, 产率 50%, m. p. 245~247 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 13.44 (s, 1H), 9.23 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.84 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 5.00~4.91 (m, 1H), 4.41~4.37 (m, 2H), 4.06~4.03 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.9, 155.8, 149.9, 147.4 (q, $J=32.6$ Hz), 139.8, 134.0, 132.0, 124.9, 122.4 (q, $J=274.5$ Hz), 120.9, 119.8, 110.21, 108.5, 102.9, 58.3, 40.9; ESI-HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ 计算值), m/z : 362.1223(362.1223) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(苯并三唑-4-基)甲酰胺(IV14): 白色固体, 产率 70%, m. p. 285~287 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.29 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.26 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.00~7.95 (m, 2H), 6.82 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J_1=5.6$, $J_2=2.0$ Hz, 1H), 4.99~4.91 (m, 1H), 4.42~4.38 (m, 2H), 4.07~4.03 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.2, 155.8, 150.0, 147.4 (q, $J=32.7$ Hz), 131.1, 125.6, 122.4 (q, $J=272.7$ Hz), 108.6, 102.9 (d, $J=3.2$ Hz), 58.3, 40.9; ESI-HRMS ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ 计算值), m/z : 363.1174(363.1176) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(咪唑并吡啶-6-基)甲酰胺(IV15): 白色固体, 产率 61%, m. p. 144~146 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 9.36 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.25 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.73~7.61 (m, 3H), 6.80 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J_1=5.7$, $J_2=2.2$ Hz, 1H), 4.96~4.88 (m, 1H), 4.40~4.36 (m, 2H), 4.07~4.03 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 164.7, 155.7, 149.9, 147.4 (q, $J=32.7$ Hz), 145.1, 134.9, 129.2, 123.3, 122.4 (q, $J=274.4$ Hz), 119.6, 116.5, 114.8, 108.5, 102.9, 58.2, 40.9; ESI-HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ 计算值), m/z : 362.122(4362.1223) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(1H-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基)甲酰胺(IV16): 白色固体, 产率 68%, m. p. 324~326 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 11.96 (s, 1H), 9.12 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.26 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.60~6.57 (m, 2H), 4.99~4.92 (m, 1H), 4.41~4.31 (m, 2H), 4.05~4.02 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.5, 155.8, 150.1, 149.9, 147.4 (q, $J=32.6$ Hz), 143.0, 128.1, 122.4 (q, $J=274.4$ Hz), 122.1, 119.2, 108.5, 102.9 (d, $J=2.9$ Hz), 101.4, 58.4, 40.8; ESI-HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ 计算值), m/z : 362.1224(362.1223) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(1*H*-吡咯并[3,2-*b*]吡啶-2-基)甲酰胺(IV17): 白色固体, 产率 33%, m. p. 236~238 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 11.92(s, 1H), 9.29(d, *J*=7.3 Hz, 1H), 8.41(dd, *J*₁=4.5, *J*₂=1.4 Hz, 1H), 8.26(d, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.81(d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.34(d, *J*=1.2 Hz, 1H), 7.20(dd, *J*₁=8.3, *J*₂=4.5 Hz, 1H), 6.83(d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.61(dd, *J*₁=5.7, *J*₂=2.2 Hz, 1H), 5.02~4.94(m, 1H), 4.43~4.39(m, 2H), 4.07~4.03(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 161.0, 155.7, 150.0, 147.4(q, *J*=32.7 Hz), 145.4, 144.5, 134.0, 130.0, 122.4(q, *J*=274.3 Hz), 120.2, 119.2, 108.6, 103.4, 102.9, 58.4, 40.6; ESI-HRMS(C₁₇H₁₅F₃N₅O 计算值), *m/z*: 362.1224(362.1223)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(6-氯咪唑并[1,2-*b*]吡啶-2-基)甲酰胺(IV18): 白色固体, 产率 53%, m. p. 247~249 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.32(d, *J*=7.7 Hz, 1H), 8.72(s, 1H), 8.25~8.2(m, 2H), 7.47(d, *J*=9.6 Hz, 1H), 6.76(d, *J*=2.3 Hz, 1H), 6.56(dd, *J*₁=5.7, *J*₂=2.3 Hz, 1H), 5.01~4.93(m, 1H), 4.37~4.33(m, 2H), 4.10~4.06(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 161.8, 155.8, 149.9, 148.2, 147.3(q, *J*=32.7 Hz), 140.1, 137.4, 128.8, 122.4(q, *J*=274.3 Hz), 121.6, 119.3, 108.5, 102.9(d, *J*=3.1 Hz), 58.2, 40.0; ESI-HRMS(C₁₆H₁₃ClF₃N₆O 计算值), *m/z*: 397.0789(397.0786)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(6-溴咪唑并[1,2-*a*]吡啶-3-基)甲酰胺(IV19): 白色固体, 产率 62%, m. p. 237~239 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.59(dd, *J*₁=2.0, *J*₂=0.9 Hz, 1H), 9.17(d, *J*=7.1 Hz, 1H), 8.38(s, 1H), 8.26(d, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.71(dd, *J*₁=9.5, *J*₂=0.9 Hz, 1H), 7.60(dd, *J*₁=9.5, *J*₂=2.1 Hz, 1H), 6.81(d, *J*=2.3 Hz, 1H), 6.61(dd, *J*₁=5.7, *J*₂=2.3 Hz, 1H), 4.97~4.89(m, 1H), 4.42~4.38(m, 2H), 4.04~4.00(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 160.0, 155.7, 150.0, 147.4(q, *J*=32.7 Hz), 145.8, 137.9, 130.4, 127.7, 122.4(q, *J*=274.3 Hz), 118.8, 118.5, 108.6, 108.4, 102.9(d, *J*=3.2 Hz), 58.3, 40.2; ESI-HRMS(C₁₇H₁₄BrF₃N₅O 计算值), *m/z*: 440.0333(440.0328)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(2-甲基喹啉-6-基)甲酰胺(IV20): 白色固体, 产率 81%, m. p. 249~252 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.32(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 8.50(d, *J*=2.0 Hz, 1H), 8.33(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 8.26(d, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.17(dd, *J*₁=8.8, *J*₂=2.0 Hz, 1H), 7.99(d, *J*=8.7 Hz, 1H), 7.47(d, *J*=8.3 Hz, 1H), 6.81(d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.60(dd, *J*₁=5.5, *J*₂=2.3 Hz, 1H), 4.99~4.92(m, 1H), 4.41~4.31(m, 2H), 4.05~4.02(m, 2H), 2.67(s, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 166.3, 161.2, 155.8, 149.9, 148.9, 147.4(q, *J*=32.7 Hz), 137.5, 131.2, 128.7, 128.3, 128.1, 125.8, 123.4, 122.4(q, *J*=274.3 Hz), 108.5, 102.9(d, *J*=2.6 Hz), 58.3, 40.9, 25.4; ESI-HRMS(C₂₀H₁₈F₃N₄O 计算值), *m/z*: 387.1428(387.1427)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(喹啉-6-基)甲酰胺(IV21): 白色固体, 产率 82%, m. p. 243~249 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 9.35(d, *J*=6.6 Hz, 1H), 9.14~8.90(m, 1H), 8.56(s, 1H), 8.48(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 8.27(d, *J*=5.3 Hz, 1H), 8.22(d, *J*=8.6 Hz, 1H), 8.11(d, *J*=8.7 Hz, 1H), 7.61(dd, *J*₁=7.6, *J*₂=3.7 Hz, 1H), 6.82(s, 1H), 6.69~6.45(m, 1H), 4.97~4.89(m, 1H), 4.42~4.38(m, 2H), 4.04~4.00(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 166.2, 155.8, 152.6, 150.0, 149.2, 147.4(q, *J*=33.0, 32.6 Hz), 137.5, 132.1, 129.5, 128.6, 128.2, 127.5, 122.7, 122.4(q, *J*=274.4 Hz), 108.5, 102.9, 58.3, 40.9; ESI-HRMS(C₁₉H₁₆F₃N₄O 计算值), *m/z*: 373.1273(373.1271)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(喹啉-8-基)甲酰胺(IV22): 白色固体, 产率 65%, m. p. 232~234 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.02(d, *J*=5.6 Hz, 1H), 9.01~8.94(m, 1H), 8.85(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 8.38~8.25(m, 2H), 8.01(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.70(t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.54(dd, *J*₁=8.2, *J*₂=4.3 Hz, 1H), 6.71~6.59(m, 1H), 6.41(dd, *J*₁=5.2, *J*₂=1.6 Hz, 1H), 4.99~4.92(m,

1H), 4.41~4.31(m, 2H), 4.05~4.02(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆), δ: 165.9, 155.2, 149.8, 149.5, 148.5(q, J=33.4 Hz), 145.5, 138.0, 134.0, 132.6, 128.6, 127.7, 126.6, 121.8(q, J=274.3 Hz), 121.1, 107.6, 102.6, 58.3, 40.8; ESI-HRMS(C₁₉H₁₆F₃N₄O 计算值), m/z: 373.1256(373.1271)[M+H]⁺.

4-甲基-N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(喹啉-6-基)甲酰胺(IV23): 白色固体, 产率 71%, m. p. 230~232 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ: 9.39(d, J=6.8 Hz, 1H), 8.83(d, J=4.0 Hz, 1H), 8.64(s, 1H), 8.27(d, J=5.6 Hz, 1H), 8.20(d, J=8.8 Hz, 1H), 8.08(d, J=8.8 Hz, 1H), 7.46~7.44(m, 1H), 6.83(s, 1H), 6.64~6.62(m, 1H), 5.01~4.95(m, 1H), 4.44~4.40(m, 2H), 4.09~4.05(m, 2H), 3.47(s, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.3, 155.7, 152.3, 150.0, 149.1, 147.4(q, J=32.7 Hz), 146.0, 131.6, 130.1, 128.0, 127.4, 124.6, 123.2, 122.4(q, J=272.8 Hz), 108.6, 102.9, 58.3, 40.9, 18.7; ESI-HRMS(C₂₀H₁₈F₃N₄O 计算值), m/z: 387.1427(387.1427)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(喹啉-7-基)甲酰胺(IV24): 白色固体, 产率 77%, m. p. 229~232 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ: 9.45(d, J=7.2 Hz, 1H), 8.98(dd, J₁=4.0, J₂=1.6 Hz, 1H), 8.58(d, J=0.4 Hz, 1H), 8.42(dd, J₁=8.0, J₂=0.8 Hz, 1H), 8.24(d, J=5.6 Hz, 1H), 8.07(d, J=8.4 Hz, 1H), 8.03(dd, J₁=8.8, J₂=1.6 Hz, 1H), 7.62(dd, J₁=8.0, J₂=4.0 Hz, 1H), 6.80(d, J=2.4 Hz, 1H), 6.60(dd, J₁=5.6, J₂=2.0 Hz, 1H), 5.00~4.92(m, 1H), 4.42~4.38(m, 2H), 4.07~4.04(m, 2H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.4, 155.8, 152.1, 149.9, 147.4, 147.3(q, J=32.6 Hz), 136.5, 134.9, 129.9, 122.4(q, J=272.5 Hz), 108.6, 102.9, 58.2, 40.9; ESI-HRMS(C₁₉H₁₆F₃N₄O 计算值), m/z: 373.1271(373.1271)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(2,4,8-三甲基喹啉-6-基)甲酰胺(IV25): 白色固体, 产率 71%, m. p. 256~258 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ: 9.27(d, J=7.2 Hz, 1H), 8.42(d, J=1.2 Hz, 1H), 8.27(d, J=5.6 Hz, 1H), 8.02(s, 1H), 7.35(s, 1H), 6.83(d, J=2.0 Hz, 1H), 6.63(dd, J₁=5.6, J₂=2.4 Hz, 1H), 5.02~4.93(m, 1H), 4.43~4.39(m, 2H), 4.07~4.04(m, 2H), 2.71(d, J=8.4 Hz, 6H), 2.64(s, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆), δ: 166.5, 159.5, 155.8, 150.0, 147.8, 147.4(q, J=33.1 Hz), 145.9, 136.8, 130.2, 127.8, 125.7, 123.6, 122.4(q, J=272.0 Hz), 122.3, 108.6, 103.0, 58.4, 40.8, 25.7, 18.9, 18.7; ESI-HRMS(C₂₂H₂₂F₃N₄O 计算值), m/z: 415.1740(415.1740)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(4-甲基-8-氯喹啉-6-基)甲酰胺(IV26): 白色固体, 产率 75%, m. p. 238~242 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ: 9.43(d, J=7.2 Hz, 1H), 8.94(d, J=4.4 Hz, 1H), 8.62(d, J=2.0 Hz, 1H), 8.38(d, J=1.6 Hz, 1H), 8.27(d, J=5.6 Hz, 1H), 7.58(d, J=4.4 Hz, 1H), 6.84(d, J=2.4 Hz, 1H), 6.65~6.63(m, 1H), 5.02~4.94(m, 1H), 4.45~4.61(m, 2H), 4.09~4.06(m, 2H), 2.79(s, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆), δ: 164.7, 155.8, 152.8, 150.0, 147.4(d, J=32.7 Hz), 147.0, 145.0, 133.8, 131.6, 128.9, 127.8, 126.5(q, J=272.2 Hz), 124.1, 124.0, 108.6, 103.0, 58.3, 41.0, 19.0; ESI-HRMS(C₂₀H₁₇ClF₃N₄O 计算值), m/z: 421.1037(421.1038)[M+H]⁺.

N-[1-(2-三氟甲基吡啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基]-(4-甲基-8-氟喹啉-6-基)甲酰胺(IV27): 白色固体, 产率 69%, m. p. 231~235 °C. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ: 9.40(d, J=7.0 Hz, 1H), 8.88(d, J=4.3 Hz, 1H), 8.61~8.39(m, 1H), 8.27(d, J=5.6 Hz, 1H), 8.00~7.97(m, 1H), 7.56(d, J=4.4 Hz, 1H), 6.84(d, J=2.3 Hz, 1H), 6.65~6.23(m, 1H), 5.02~4.94(m, 1H), 4.44~4.40(m, 2H), 4.09~4.05(m, 2H), 2.77(s, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆), δ: 165.1, 157.9(d, J=253.4 Hz), 155.7, 152.4, 150.0, 147.4(q, J=32.6 Hz), 146.4(d, J=2.5 Hz), 139.2(d, J=11.7 Hz), 131.6(d, J=7.1 Hz), 129.3(d, J=2.2 Hz), 124.2, 122.4(q, J=272.7 Hz), 120.5(d, J=4.2 Hz), 112.1(d, J=20.8 Hz), 108.6, 102.9(d, J=2.9 Hz), 58.3, 41.0, 19.0; ESI-HRMS(C₂₀H₁₇F₄N₄O 计算值), m/z: 405.1333

(405. 1333)[M+H]⁺.

1.3 M4受体的正向变构调节细胞活性测试

1.3.1 细胞准备 吸掉384孔板中的培养基,用3 mL杜氏磷酸缓冲盐(D-PBS)洗涤细胞,然后吸掉,加入3 mL胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA),于37 °C孵育1~2 min,通过倒置显微镜观察酶处理的进展情况.轻轻敲击培养瓶,将细胞从底部剥离;加入3 mL生长培养基,用移液管充分悬浮细胞,将底部剩余的细胞洗涤,以1000 r/min转速离心5 min;倒掉或吸去上层清液,注意不要吸去细胞.用5~10 mL培养基重新悬浮细胞,取出1 mL进行细胞计数,用Vi-Cell计数细胞浓度.将细胞以10×10⁵个/毫升的浓度悬浮于生长培养基中;在384孔板的每个孔中加入20 μL细胞悬液(20 k/well);将细胞放入37 °C,5%CO₂的培养箱中过夜.

1.3.2 FLIPR实验准备 准备FLIPR实验缓冲液中的Probenecid;准备2×Fluo-4 Direct TM(8 μmol/L)免洗上样缓冲液(每10 mL).

1.3.3 实验流程 (1)化合物的制备:将待测化合物用DMSO配制成10 mmol/L的储备液,将每个化合物进行3倍梯度稀释,10个浓度梯度,设置3个平行,然后使用ECHO移液系统将250 nL化合物转移到384孔化合物板中.加入50 μL实验缓冲液,振荡15 min.(2)加入Fluo-4:从培养箱取出细胞板,移除培养基,用移液器向384孔培养板中加入20 μL实验缓冲液和20 μL 2×Fluo-4 Direct TM无需洗涤加载缓冲液.细胞培养板中液体最终体积为40 μL.(3)孵育:在37 °C,5%(体积分数)CO₂下孵育2 h.(4)准备FLIPR:从培养箱取出细胞板并放入FLIPR中.将化合物板和吸头盒放入FLIPR中.(5)对于化合物板(激动剂测试):在FLIPRTETRA上运行检测,从化合物板向细胞板转移10 μL参考物质和化合物;读取荧光信号;计算从第一次读数到最大允许值的“Max-Min”.使用FLIPR计算每个细胞系的EC₂₀值;准备6×EC₂₀浓度的激动剂参考化合物.(6)对于化合物板(PAM测试):在FLIPRTETRA上进行检测;将化合物板中的10 μL参考物质和化合物转移到细胞板;读取荧光信号;从化合物板中转移6×EC₂₀的激动剂参考物质到细胞板上;读取荧光信号;计算从第一次读数到最大允许值的“Max-Min”.(7)数据处理分析:通过信号值与化合物浓度作图,用如下GraphPad非线性拟合公式计算化合物的EC₅₀值:

$$\text{Activity}(\%) = (\text{Signal}_{\text{compd}} - \text{Signal}_{\text{Ave_VC}}) / (\text{Signal}_{\text{Ave_PC}} - \text{Signal}_{\text{Ave_VC}}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:Signal_{compd}, Signal_{Ave_VC}和Signal_{Ave_PC}分别为目标化合物、空白对照组和对照化合物VU0467154的荧光信号.

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / \{1 + 10^{[(\lg \text{EC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}]}\} \quad (2)$$

式中: X为化合物浓度的对数值; Y表示Activation(%); Top, Bottom和EC₅₀由GraphPad自动拟合生成; HillSlope为希尔斜率.

1.4 分子对接

从蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org>)下载M4受体蛋白(PDB编码为7TRP)的晶体结构,采用PyMOL和AutoDock Vina软件进行对接模拟研究.

2 结果与讨论

2.1 M4受体的正向变构调节活性测试

测定了目标化合物IV1~IV27对M4受体的正向变构调节细胞活性.首先测定了目标化合物在7.5 μmol/L浓度下参考阳性对照化合物VU0467154的活性水平.由表1可见,部分目标化合物在7.5 μmol/L浓度下展现出一定的M4正向变构调节活性.化合物IV23具有最高的活性,为70.8%,优于阳性对照VU0467154(62.8%).此外,化合物IV1和IV26的活性也较高,分别达到62.8%和63.9%,与阳性对照相当,表明这两个化合物在较高剂量下具有较强的M4正向变构调节活性;化合物IV12和IV27的活性介于50%~60%之间,化合物IV20的活性达到45.7%,其余化合物的活性均低于40%.

进一步测定部分高活性化合物的EC₅₀值.如表2和图1所示,化合物IV20和IV23的EC₅₀值分别为

Table 1 Activities of all target compounds at doze of 7.5 $\mu\text{mol/L}$

Compd.	Activity (%)	Compd.	Activity (%)	Compd.	Activity (%)	Compd.	Activity (%)
IV1	62.8	IV8	-1.0	IV15	-5.6	IV22	0.3
IV2	2.2	IV9	8.7	IV16	11.8	IV23	70.8
IV3	10.6	IV10	-3.2	IV17	9.5	IV24	25.1
IV4	15.5	IV11	8.6	IV18	1.7	IV25	46.7
IV5	6.3	IV12	53.9	IV19	18.2	IV26	63.9
IV6	-1.8	IV13	24.8	IV20	45.7	IV27	57.8
IV7	-11.8	IV14	-0.2	IV21	34.8	VU0467154	62.8

Table 2 EC_{50} values of target compounds

Compd.	$\text{EC}_{50}/(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$	Compd.	$\text{EC}_{50}/(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$
IV1	3194	IV25	4808
IV12	13316	IV26	1894
IV20	1007	IV27	3531
IV23	979	VU0467154	512

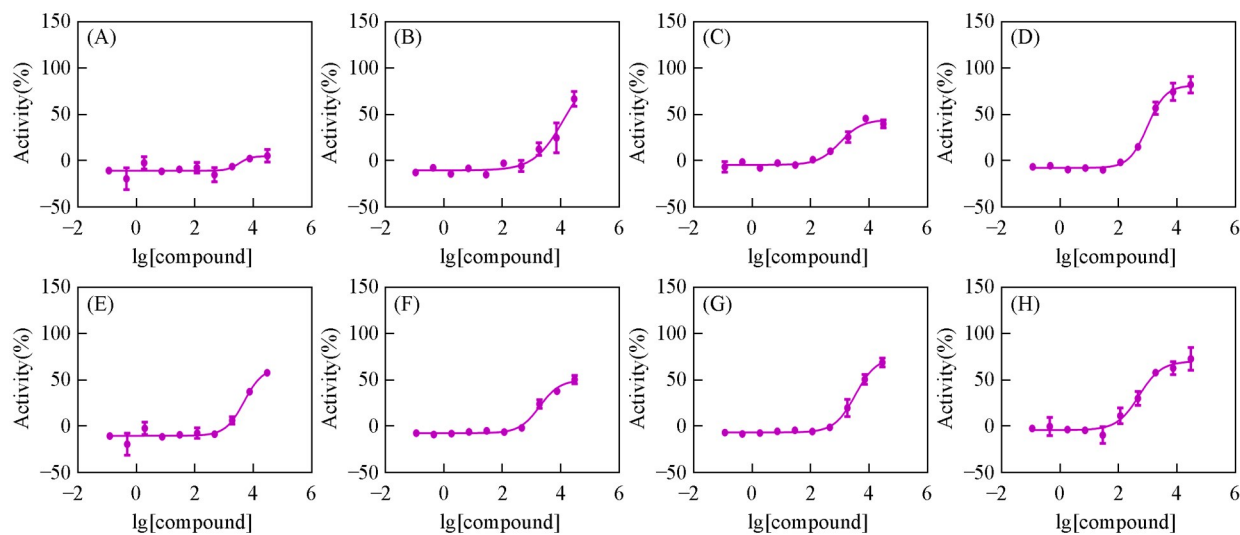


Fig. 1 M4 FLIPR Assay_PAM of the target compounds

(A) IV1; (B) IV12; (C) IV20; (D) IV23; (E) IV25; (F) IV26; (G) IV27; (H) VU0467154.

1007 和 979 nmol/L , 稍高于阳性对照 VU0467154; 化合物 IV1, IV25~IV27 的 EC_{50} 值介于 1894~4808 nmol/L 之间, 活性不及预期; 化合物 IV12 的 EC_{50} 值高达 13316 nmol/L , 说明降低浓度后其活性较差.

2.2 构效关系分析

通过对目标化合物的结构与活性关系进行分析, 探究了杂环和喹啉取代基对化合物活性的影响.

2.2.1 杂环的影响 通过对杂环进行分析发现, 含吡唑、苯并咪唑、喹啉、苯并噁唑、吡唑并嘧啶、噻吩并噻吩、吡啶、苯并噁二唑、苯并噻唑、吡唑、苯并三唑、咪唑并吡啶、吡咯并吡啶、咪唑并哒嗪及咪唑并吡啶的目标化合物的活性大部分处于较低水平, 无进一步研究价值; 而含有喹啉结构片段的化合物(如化合物 IV20, IV21, IV23, IV24, IV26 和 IV27)大部分表现出较高的细胞活性, 尤其是化合物 IV23 和 IV26. 这表明喹啉环是一个具有开发潜力的结构.

2.2.2 喹啉取代基的影响 当喹啉环为 6 位与酰胺连接时活性最佳, 而喹啉环为 7 位和 8 位时几乎不产生活性或活性较低(如化合物 IV22 和 IV24 的活性分别为 0.3% 和 25.1%); 对喹啉环上的不同取代基进行分析发现, 喹啉环 4 位含有甲基的化合物(如化合物 IV23, IV25, IV26 和 IV27)较 4 位无取代基化合物(如化合物 IV20 和 IV21)的活性更高, 表明甲基的引入可以显著提高化合物的活性, 后期将对此进行重点研究.

2.3 分子对接实验

为探究化合物IV23与人类M4毒蕈碱受体(M4R)间的相互作用机制,采用基于结构的分子对接方法进行了分析.从RCSB PDB数据库获取M4R的冷冻电镜结构(PDB ID: 7TRP)^[24].首先,使用Chimera去除结构中的原配体及水分子,随后通过Schrödinger Maestro平台的Protein Preparation Wizard模块对蛋白进行优化^[25],包括氢键网络优化、质子化状态调整以及能量最小化,以消除原子间空间冲突.配体化合物IV23经由LigPrep模块处理^[26],在OPLS4力场下生成三维结构^[27],考虑可能的互变异构与立体异构体,并优化其电荷状态.对接过程中,以7TRP结构中变构配体所在区域的质心为基准定义对接网格,采用Glide模块的SP模式进行分子对接^[28].

分子对接结果显示,化合物IV23与M4R的结合能为-30.05 kJ/mol,提示其具有较强的结合亲和力.由结合模式(图2)可以看出,IV23的结合姿态与已知正向变构调节剂LY2033298高度相似^[24].具体而言,IV23分子中的酰胺键羰基与Tyr89侧链形成氢键;其喹啉环则与Trp435的吲哚环及Phe186的苯环间存在稳定的 π - π 堆积相互作用[图2(B)].喹啉环的引入有效增强了疏水及堆叠作用,这可能是该化合物发挥变构调节活性的关键结构特征.

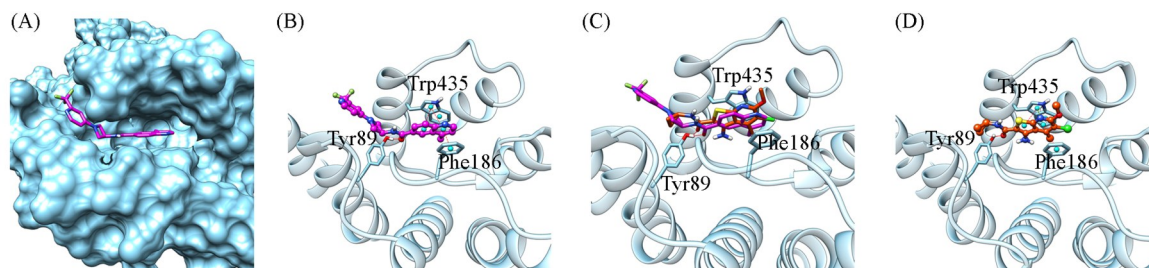


Fig. 2 Molecular docking analysis of IV23 within the allosteric site of the Mmuscarinic acetylcholine receptor(M4 mAChR; PDB ID 7TRP)

(A) Surface representation of the allosteric binding pocket with docked IV23; (B) the predicted binding mode of IV23, as determined by Glide docking; (C) superimposition of the computationally docked IV23 (magenta) with the cryo-EM structure (PDB ID 7TRP) of the resident allosteric agonist (orange); (D) the binding mode of the allosteric agonist observed in the cryo-EM structure (PDB ID 7TRP).

3 结 论

以CVL-231为先导化合物,保留其环丁胺酰基连接基团,引入高活性化合物VU6000918中的2-三氟甲基吡啶基团,对与酰胺基连接的杂环进行改造,设计合成了27个2-三氟甲基吡啶氮杂环丁烷酰胺类化合物.目标化合物的结构经¹H NMR, ¹³C NMR和HRMS表征确认.采用FLIPR荧光检测技术研究了化合物对M4受体细胞的活性.初步活性测试结果显示,部分目标化合物具有显著的M4正向变构调节作用,其中化合物IV1, IV12, IV20, IV23, IV25, IV26和IV27展现出较高的细胞活性.进一步测定了其EC₅₀值,化合物IV23的EC₅₀值低至979 nmol/L,略高于阳性对照VU0467154.构效关系分析结果表明,喹啉环的引入对活性的提高具有重要作用,尤其是4位含甲基的喹啉环.分子对接实验进一步证实,化合物IV23能够与M4受体蛋白(7TRP)良好结合,验证了其发挥活性的作用机制.综上所述,本研究为M4正向变构调节剂的设计和 optimization 提供了重要的理论依据和参考.未来的研究可通过进一步改造喹啉环上的取代基,以改善其生物活性,开发出更有效的M4正向变构调节剂.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20250257>.

参 考 文 献

- [1] Jauhar S., Johnstone M., McKenna P. J., *Lancet*, **2022**, 399(10323), 473—486
- [2] Zhao J. P., *Chinese Guidelines for Prevention and Treatment of Schizophrenia (2nd Ed.)*, China Medical Electronic Audio-visual Publishing House, Beijing, **2015**(赵靖平. 中国精神分裂症防治指南(第2版), 北京: 中华医学电子音像出版社, **2015**)
- [3] Marwaha S., Johnson S., *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.*, **2004**, 39(5), 337—349

- [4] Chesney E., Goodwin G. M., Fazel S., *World Psychiatry*, **2014**, *13*(2), 153—160
- [5] Kennedy J. P., Bridges T. M., Gentry P. R., Brogan J. T., Kane A. S., Jones C. K., Brady A. E., Shirey J. K., Conn P. J., Lindsley C. W., *ChemMedChem*, **2009**, *4*(10), 1600—1607
- [6] Lawrence A. J., Langmead C. J., *Br. J. Pharmacol.*, **2024**, *181*(22), 4383—4384
- [7] Correll C. U., Angelov A. S., Miller A. C., Weiden P. J., Brannan S. K., *Schizophrenia*, **2022**, *8*(1), 109
- [8] Brady A. E., Jones C. K., Bridges T. M., Kennedy J. P., Thompson A. D., Heiman J. U., Breininger M. L., Gentry P. R., Yin H. Y., Jadhav S. B., Shirey J. K., Conn P. J., Lindsley C. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2008**, *327*(3), 941—953
- [9] Chan W. Y., McKinzie D. L., Bose S., Mitchell S. N., Witkin J. M., Thompson R. C., Christopoulos A., Lazareno S., Birdsall N. J. M., Bymaster F. P., Felder C. C., *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*(31), 10978—10983
- [10] Farrell M., Roth B. L., *Neuropsychopharmacology*, **2010**, *35*(4), 851—852
- [11] Foster D. J., Wilson J. M., Remke D. H., Mahmood M. S., Uddin M. J., Wess J., Patel S., Marnett L. J., Niswender C. M., Jones C. K., Xiang Z. X., Lindsley C. W., Rook J. M., Conn P. J., *Neuron*, **2016**, *91*(6), 1244—1252
- [12] Bauer M. R., Di Fruscia P., Luca S. C. C., Michaelides I. N., Nelson J. E., Storer R. I., Whitehurst B. C., *RSC Med. Chem.*, **2021**, *12*(4), 448—471
- [13] Mughal H., Szostak M., *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *19*(15), 3274—3286
- [14] Luo Y., Qiu Y. L., Lin Y., Li Q. X., Fu L. S., Xu X. Q., Shi Y. W., Lu T., Wei X., Xu X. Y., Chen Y. D., Jiao Y., *Eur. J. Med. Chem.*, **2025**, *298*, 117993
- [15] Bubser M., Bridges T. M., Dencker D., Gould R. W., Grannan M., Noetzel M. J., Lamsal A., Niswender C. M., Daniels J. S., Poslusney M. S., Melancon B. J., Tarr J. C., Byers F. W., Wess J., Duggan M. E., Dunlop J., Wood M. W., Brandon N. J., Wood M. R., Lindsley C. W., Conn P. J., Jones C. K., *ACS Chem. Neurosci.*, **2014**, *5*(10), 920—942
- [16] Wood M. R., Noetzel M. J., Poslusney M. S., Melancon B. J., Tarr J. C., Lamsal A., Chang S., Luscombe V. B., Weiner R. L., Cho H. P., Bubser M., Jones C. K., Niswender C. M., Wood M. W., Engers D. W., Brandon N. J., Duggan M. E., Conn P. J., Bridges T. M., Lindsley C. W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*(2), 171—175
- [17] Tarr J. C., Wood M. R., Noetzel M. J., Bertron J. L., Weiner R. L., Rodriguez A. L., Lamsal A., Byers F. W., Chang S., Cho H. P., Jones C. K., Niswender C. M., Wood M. W., Brandon N. J., Duggan M. E., Conn P. J., Bridges T. M., Lindsley C. W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*(13), 2990—2995
- [18] Krystal J. H., Kane J. M., Correll C. U., Walling D. P., Leoni M., Duvvuri S., Patel S., Chang I., Iredale P., Frohlich L., Versavel S., Perry P., Sanchez R., Renger J., *Lancet*, **2022**, *400*(10369), 2210—2220
- [19] Nag S., Arakawa R., Jia Z. S., Lachapelle E., Zhang L., Maresca K., Chen L. G., Jahan M., McCarthy T., Halldin C., *Molecules*, **2023**, *28*(12), 4612
- [20] Belov V., Guehl N. J., Duvvuri S., Iredale P., Moon S. H., Dhaynaut M., Chakilam S., MacDonagh A. C., Rice P. A., Yokell D. L., Renger J. J., El Fakhri G., Normandin M. D., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2024**, *44*(8), 1329—1342
- [21] Butler C. R., Popiolek M., McAllister L. A., LaChapelle E. A., Kramer M., Beck E. M., Mente S., Brodney M. A., Brown M., Gilbert A., Helal C., Ogilvie K., Starr J., Uccello D., Grimwood S., Edgerton J., Garst-Orozco J., Kozak R., Lotarski S., Rossi A., Smith D., O'Connor R., Lazzaro J., Steppan C., Steyn S. J., *J. Med. Chem.*, **2024**, *67*(13), 10831—10847
- [22] Zhang H. Y., Peng J. M., Zhong Y. H., Chen Y., Wang Q., Hadiatullah H., Xie W. B., Xiong L. X., Yuchi Z. U., Liu J. B., Li Y. X., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2024**, *40*(1), 96—108
- [23] Jiang W., Chen J. Y., Wang H. F., Xue A. Q., Zhang X. Y., Guan J. C., Wei L. L., Cai J. F., Hu Y., Liu D., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(1), 66—78
- [24] Vuckovic Z., Wang J., Pham V., Mobbs J. I., Belousoff M. J., Bhattarai A., Burger W. A., Thompson G., Yeasmin M., Nawaratne V., Leach K., van der Westhuizen E. T., Khajehali E., Liang Y. L., Glukhova A., Wootten D., Lindsley C. W., Tobin A., Sexton P., Danev R., Valant C., Miao Y. L., Christopoulos A., Thal D. M., *eLife*, **2023**, *12*, e83477
- [25] Sastry G. M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2013**, *27*(3), 221—234
- [26] Johnston R. C., Yao K., Kaplan Z., Chelliah M., Leswing K., Seekins S., Watts S., Calkins D., Elk J. C., Jerome S. V., Repasky M. P., Shelley J. C., *J. Chem. Theory Comput.*, **2023**, *19*(8), 2380—2388
- [27] Lu C., Wu C. J., Ghoreishi D., Chen W., Wang L. L., Damm W., Ross G. A., Dahlgren M. K., Russell E., Von Bargen C. D., Abel R., Friesner R. A., Harder E. D., *J. Chem. Theory Comput.*, **2021**, *17*(7), 4291—4300
- [28] Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K., Shaw D. E., Francis P., Shenkin P. S., *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*(7), 1739—1749

(Ed.: L, V, K)