

DNA-PK 抑制剂 AZD7648 衍生物的设计、合成与活性研究

刘汝龙,秦欢欢,蔡田,赵临襄*,黄敏*

(沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 为考察 AZD7648 母核对活性的影响,利用开环策略和扩环策略设计并合成 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类及 3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮类 DNA-PK 抑制剂,并进行抗肿瘤活性研究。方法 以 2-氯-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-羧酸为起始原料,经酰胺缩合和 Buchwald-Hartwig 偶联 2 步反应得到化合物 **HA1** ~ **HA6**;以 2-甲硫基-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲酸乙酯为起始原料,经氧化、芳香亲核取代、酯水解和酰胺缩合 4 步反应得到化合物 **HA7** ~ **HA9**;以 4-氯-2-甲硫基嘧啶-5-甲腈为起始原料,经亲核取代、还原、分子内环化、甲基化、氧化、亲核取代/Suzuki 偶联 6 步反应得到化合物 **HB1** ~ **HB7**。采用 ADP-Glo 法,以 AZD7648 为阳性对照药测试目标化合物对 DNA-PK 的抑制活性。采用 MTT 法,以 AZD7648 为阳性对照药测试化合物 **HB1**、**HB4**、**HB5** 在 50、25、12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三个浓度下对人结肠癌细胞系 HCT-116 的抗增殖活性。结果 共合成 16 个未见文献报道的化合物,其结构均经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS 谱确证。酶活性测试结果表明,采用开环策略设计得到的 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类化合物(**HA1** ~ **HA9**)酶活性弱于扩环策略设计得到的 3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮类化合物(**HB1** ~ **HB7**),其中化合物 **HB1**、**HB4**、**HB5** 与 AZD7648 活性相当。细胞活性测试结果表明,所测试的三个化合物对 HCT-116 细胞系表现出中等强度的抗增殖作用,优于阳性对照 AZD7648。结论 初步探索了 AZD7648 母核结构改造对 DNA-PK 抑制活性的影响,为后续 DNA-PK 抑制剂的开发奠定了基础。

关键词:DNA-PK 抑制剂;AZD7648;抗肿瘤活性;结构改造

中图分类号:R914 **文献标志码:**A

正常生理条件下,人体会受到各种内源性和外源性因素干扰诱发 DNA 损伤^[1],而人体通过 DNA 损伤应答抵御 DNA 损伤。随着体细胞突变总量的增加,致癌基因被激活与抑癌基因失活的可能性也随之增大,进而会驱动肿瘤的发生^[2]。DNA 依赖蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)是 DNA 损伤应答修复通路的关键调节因子^[3]。DNA-PK 是磷脂酰肌醇 3 激酶相关蛋白激酶超家族的成员,由 DNA 催化亚单位和调控异二聚体(Ku70/Ku80)组成^[4]。DNA-PK 的激酶活性依赖于 DNA 催化亚单位,而调控异二聚体主要负责识别 DNA 双链断裂,同时招募 DNA 催化亚单位并将其激活^[5]。DNA-PK 在多种人类肿瘤中表达异常,且 DNA-PK 在 DNA 损伤应答中具有多效性作用,而这种可调控多种生理过程的特性,也决定了其在肿瘤发生发展进程中的关键调控地位^[6]。因此,DNA-PK 成为抗肿

瘤新药研发的热门靶点^[7]。

早期发现的 DNA-PK 抑制剂存在活性低、水溶性差以及对同源蛋白选择性低等缺点^[8],为解决上述不足,研究者采用同源建模和基于结构的药物修饰策略,开发出一系列 DNA-PK 小分子抑制剂。其中,AZD7648 是一种选择性 DNA-PK 抑制剂,具有优异的抗肿瘤活性,且对放疗和化疗有较强的增敏作用,目前正处于血癌、软组织肉瘤适应症临床 I/II a 期研究。AZD7648 的临床疗效和安全性已经得到初步验证,表明其具有较好的抗肿瘤开发潜力和市场前景^[9],但现有数据表明 AZD7648 仍具有药物代谢动力学性质不佳等缺陷。

因此,本文作者以 AZD7648 为先导化合物,在实验室前期研究基础上,基于 AZD7648 与 DNA-PK 的共晶结构,设计合成了 9 个 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类化合物(**HA1** ~ **HA9**),采用骨架跃

收稿日期:2025-02-25

作者简介:刘汝龙(2000-),男(汉族),山东临沂人,硕士研究生,E-mail:15963904926@163.com; *通信作者:赵临襄(1964-),女(汉族),山西太原人,博士,教授,博士生导师,主要从事天然有效成分的结构改造及抗癌活性研究、抗癌前体药物的研究,Tel:(024)43520021,E-mail:zhaolinxiang@syphu.edu.cn;黄敏(1994-),男(汉族),江西九江人,博士,副教授,硕士生导师,主要从事基于靶点的创新药物研究,Tel:(024)43520218,E-mail:huangcrazye@sina.com。

迁策略设计并合成7个3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮类新型衍生物(**HB1** ~ **HB7**),旨在提高化合物对DNA-PK的抑制活性,增强化合物与DNA-PK蛋白的相互作用。

1 目标化合物的设计

为了进一步改善AZD7648的DNA-PK抑制活性,本文作者分析DNA-PK与AZD7648复合

物的共晶结构(图1)^[10]发现,三唑上4位氮原子与Asp-3941形成氢键;三唑并吡啶上7位甲基与Ile-3756形成疏水作用,芳胺上的NH与Glu-3804形成氢键作用;四氢吡喃结构占据ATP结合口袋的核糖区域,嘌呤酮部分占据Trp-3805等氨基酸形成的通往深疏水口袋的狭长通路,并与Trp-3805的苯环形成两个 π - π 相互作用。

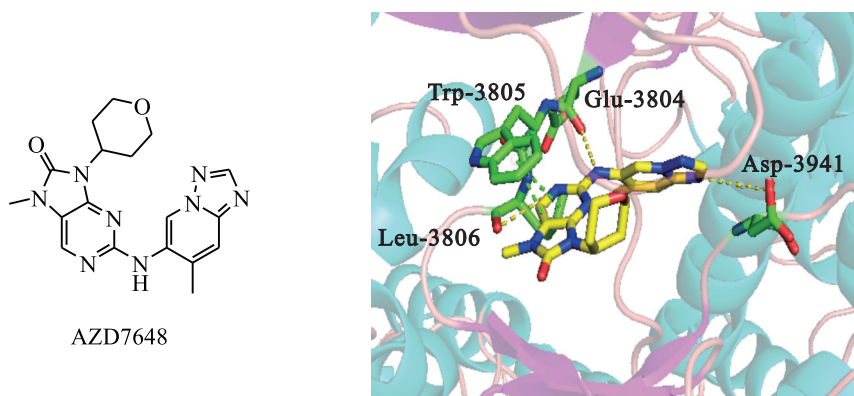


Figure 1 Structure of AZD7648 and binding mode of AZD7648 with DNA-PK (PDB:7OTW)

先导化合物AZD7648的嘌呤酮母核缺乏可以进一步引入取代基的位置,导致结构修饰受限。共晶结构显示其嘌呤酮部分暴露于结合蛋白的空腔中,因此可对该部分进行改造,期望更好地占据该空腔以提高与蛋白的亲合力。基于此,本文作者将嘌呤酮中的五元环打开,利用生物电子等排原理用酰胺结构代替脲结构^[11],并通过酰胺键引

入不同的取代基来进一步占据由Trp-3805等氨基酸残基形成的疏水口袋,与该位置的氨基酸残基形成新的极性相互作用。同时,引入极性原子有望改善化合物的药物代谢动力学性质,设计并合成了4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类化合物**HA1** ~ **HA9**(图2)。

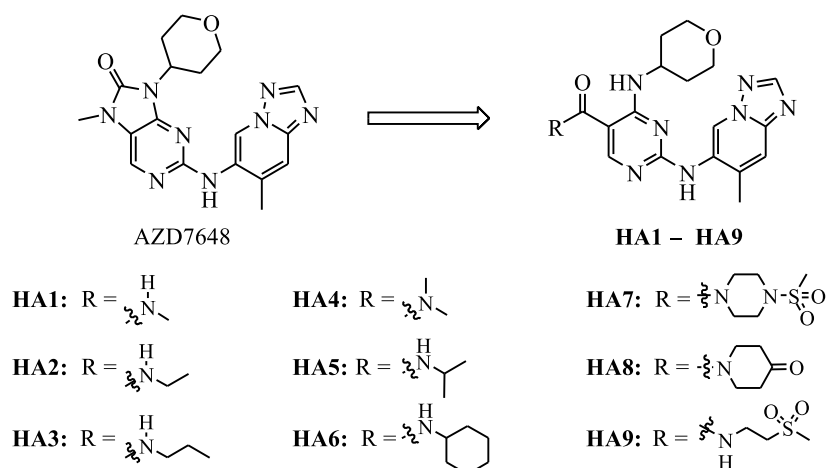


Figure 2 Design and structures of HA series compounds

以化合物**HA9**为代表与DNA-PK蛋白进行分子对接研究(图3),结果表明,其与AZD7648的作用模式类似。三唑上4位氮原子与蛋白的氨基酸残基Asp-3941形成氢键,芳胺上的NH与

Glu-3804形成氢键;四氢吡喃部分占据ATP结合口袋的核糖区域,嘧啶1位的氮原子与Leu-3806形成氢键,由于嘌呤酮结构的开环,嘧啶环保留了一个与Trp-3805苯环形成的 π - π 相互作用,与酰

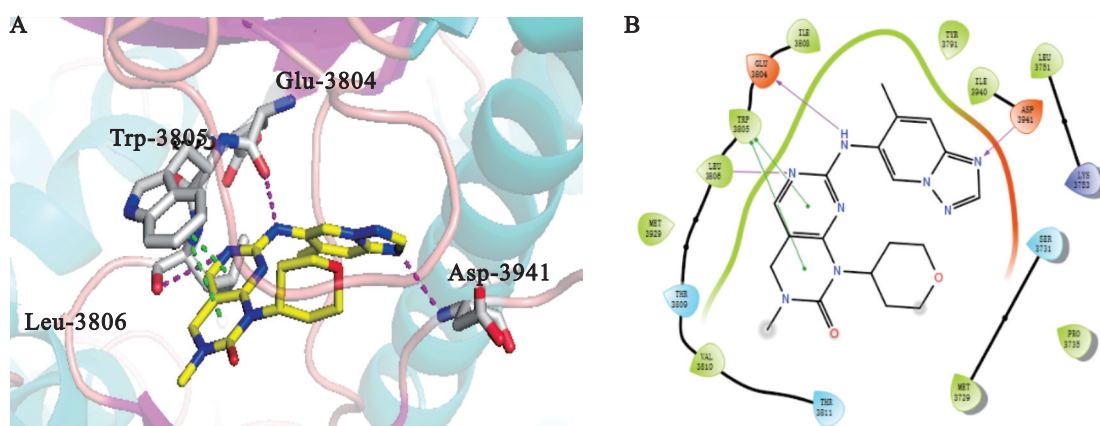
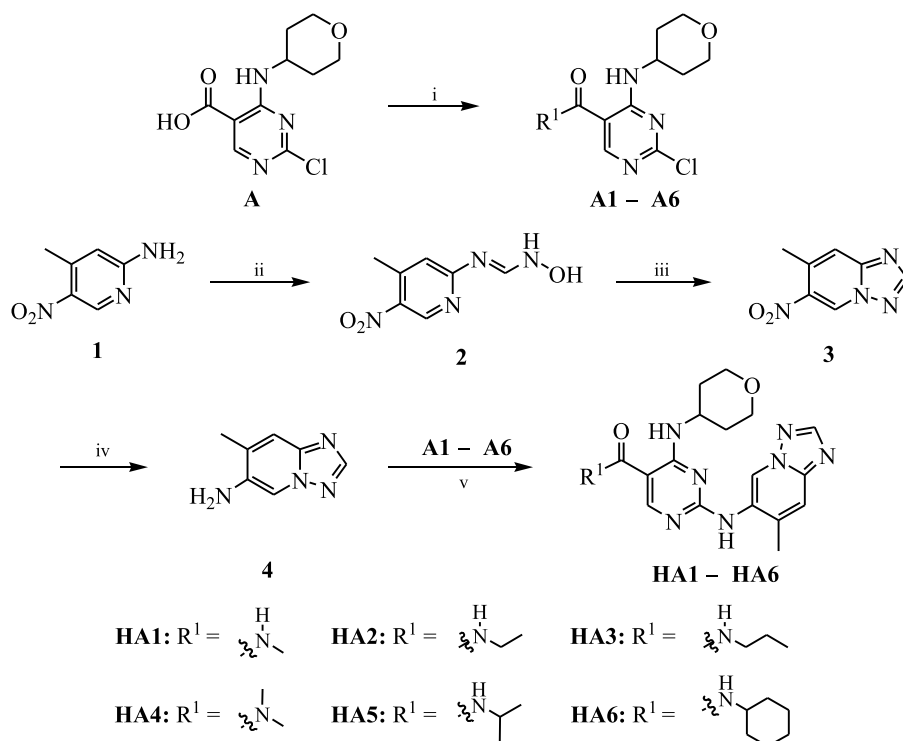


Figure 5 The interaction of HB1 with DNA-PK protein (PDB:7OTW) in 3D (A) and 2D (B)

2 目标化合物的合成路线

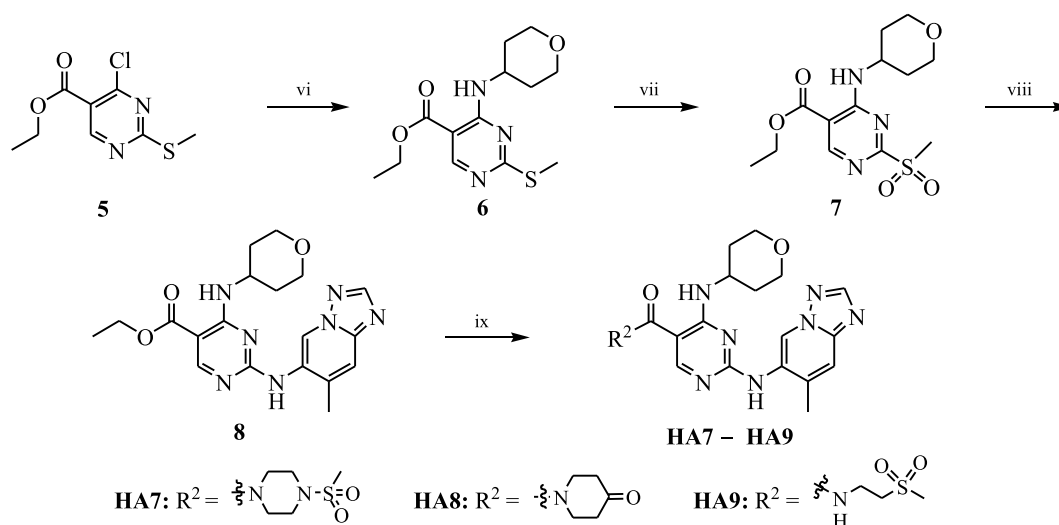
根据实验室前期研究的 AZD7648 合成路线, 本文作者设计了 HA 系列化合物的合成路线, 如图 6 所示。以 2-氯-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-羧酸 (**A**) 为起始原料, 与不同类型的脂肪胺反应得到关键中间体 **A1** ~ **A6**。以 2-氨基-4-甲基-5-硝基吡啶 (**1**) 为起始原料, 经重氮化反应生成羟胺中间体、分子内环合形成三氮唑并吡

啶环系、硝基还原为氨基得到中间体 **4**。中间体 **4** 与 **A1** ~ **A6** 经 Buchwald-Hartwig 交叉偶联反应构建 C-N 键, 得到 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类化合物 **HA1** ~ **HA6**。基于实验室前期对于 AZD7648 的工艺改进路线, 以 4-氯-2-(甲硫基)嘧啶-5-羧酸乙酯 (**5**) 为起始原料, 经取代、氧化和芳香亲核取代反应得到中间体 **8**, **8** 经酯水解后与不同的极性氨基侧链反应得到 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类化合物 **HA7** ~ **HA9**。



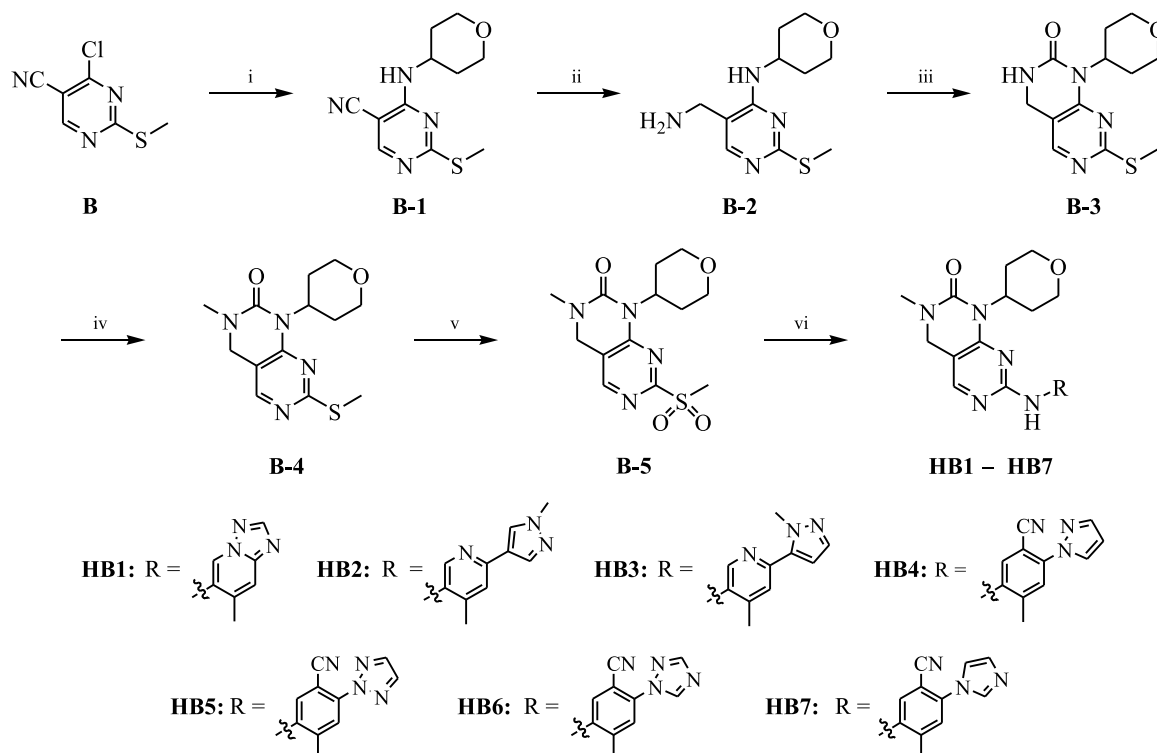
Reagents and conditions: i) substituted amines, HATU, DIEA, dry DCM, r. t. ; ii) DMF-DMA, EtOH, reflux; $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, MeOH, reflux; iii) T_3P , EtOAc, r. t. ; iv) Pd/C, HCOONH_4 , EtOH, reflux; v) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, Brettphos, Cs_2CO_3 , 1,4-dioxane, N_2 , 100 °C ; vi) tetrahydro-2*H*-pyran-4-amine hydrochloride, K_2CO_3 , MeCN- H_2O , r. t. ; vii) *m*-CPBA, EtOAc, r. t. ; viii) 7-methyl-[1,2,4] triazolo[1,5-*a*] pyridin-6-amine, *t*-BuONa, DMSO, r. t. ; ix) $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, MeOH; substituted amines, HATU, DIEA, dry DMF, r. t. .

Figure 6 The synthetic routes to HA series compounds



基于实验室前期对 AZD7648 进行的工艺路线改进,本文作者设计了 HB 系列化合物的合成路线,如图 7 所示。以 4-氯-2-甲硫基嘧啶-5-甲腈 (**B**) 为起始原料,经亲核取代、还原、分子内环合 3 步反应构建 3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮母核(**B-3**),随后在嘧啶并嘧啶酮 3 位引

入甲基、将嘧啶 2 位甲硫基氧化得到关键中间体 3-甲基-7-(甲磺酰基)-1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮(**B-5**),**B-5** 与不同的联芳杂环侧链发生芳香亲核取代反应得到 3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮类衍生物 **HB1** ~ **HB7**。

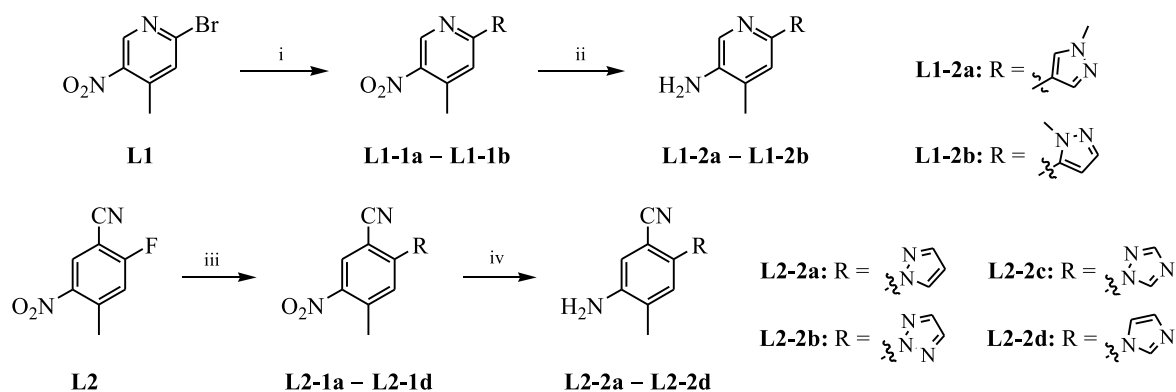


Reagents and conditions: i) K_2CO_3 , tetrahydro-2*H*-pyran-4-amine hydrochloride, MeCN- H_2O , r. t. ; ii) $LiAlH_4$, THF, N_2 , r. t. ; iii) CDI, DBU, THF, r. t. ; iv) $PhMe_3N^+I^-$, CS_2CO_3 , MeCN, 80 °C ; v) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , r. t. ; vi) substituted aniline, *t*-BuONa, DMSO, 25 °C.

Figure 7 The synthetic route to HB series compounds

HB 系列化合物联芳杂环侧链的合成如下(图8)。以2-溴-4-甲基-5-硝基吡啶(L1)为起始原料,经 Suzuki 偶联和还原反应得到6-取代-4-甲基吡啶-3-胺类联芳杂环化合物 L1-2a ~ L1-2b;以

2-氟-4-甲基-5-硝基苯甲腈(L2)为起始原料,经亲核取代和还原反应得到2-取代-4-甲基-5-氨基苯甲腈类联芳杂环化合物 L2-2a ~ L2-2d。



Reagents and conditions: i) pyrazole boronic acid pinacol ester, K_2CO_3 , Pd(dppf)Cl₂, 1,4-dioxane-H₂O (V:V = 5:1), N₂; ii) azoles, H₂, Pd/C, EtOH; iii) azoles, K_2CO_3 , DMF; iv) H₂, Pd/C, EtOH.

Figure 8 The synthetic routes to compounds L1-2a, L1-2b and L2-2a - L2-2d

3 合成实验

化学反应进程以 TLC 监测; ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 采用 Bruker AV-600 核磁共振仪(瑞士布鲁克公司)测定,以 TMS 为内标;质谱采用 Agilent 1100 LC/MSD Trap(安捷伦科技(中国)有限公司)在 ESI 模式下测定;高分辨质谱采用 Agilent 6540 UHD accurate mass Q-TOF MS(安捷伦科技(中国)有限公司)或 Bruker micro-TOF-Q(瑞士布鲁克公司)在 ESI 模式下测定。其他所用试剂均为分析纯或化学纯市售商品,使用时需进一步纯化。

3.1 HA 系列化合物的合成

3.1.1 (E)-N-羟基-N'-(4-甲基-5-硝基吡啶-2-基)甲脒(2)的合成

将 10.00 g (65.34 mmol) 2-氨基-4-甲基-5-硝基吡啶(1)置于 500 mL 茄形瓶中,用 100 mL 无水乙醇溶解,室温下滴加 9.54 mL (71.82 mmol) N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(DMF-DMA),回流反应 5 h, TLC 监测反应完全。反应液冷却至 65 °C,加入 5.44 g (78.36 mmol) 盐酸羟胺,继续搅拌 3 h。冷却至室温,有大量固体析出,经布氏漏斗抽滤,水洗滤饼,干燥,得到黄色固体(2) 11.27 g,收率为 88.1%, mp 160.1 ~ 161.5 °C。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₇H₉N₄O₃ 197.0628 [M+H]⁺, found 197.0658。

3.1.2 7-甲基-6-硝基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶(3)的合成

将 10.00 g (51.01 mmol) 中间体 2 置于 250 mL 茄形瓶中,用 150 mL 干燥乙酸乙酯溶解,室温下缓慢加入 18.2 mL (61.21 mmol) 体积分数为 50% 的丙基膦酸酐(T₃P)的乙酸乙酯溶液, TLC 监测反应完全。加入 20 mL 饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应,分液,有机相用 50 mL 饱和氯化钠溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到浅黄色固体(3) 8.91 g,收率 98.1%, mp 108.5 ~ 110.1 °C。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₇H₇N₄O₂ 179.0508 [M+H]⁺, found 179.0522。

3.1.3 7-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-6-胺(4)的合成

将 6.00 g (33.69 mmol) 中间体 3 置于 250 mL 茄形瓶中,用 150 mL 无水乙醇溶解,室温下依次加入 0.72 g (6.74 mmol) 10% 钯炭和 10.61 g (168.50 mmol) 甲酸铵,回流反应 2 h, TLC 监测反应完全。抽滤,浓缩滤液得到浅褐色固体(4) 4.63 g,收率 92.8%, mp 169.5 ~ 170.8 °C。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₇H₉N₄ 149.0721 [M+H]⁺, found 149.0698。

3.1.4 N-甲基-2-氯-4-[(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲酰胺(A1)的合成

将 0.25 g (0.97 mmol) 化合物 A 置于 50 mL 茄形瓶中,用 10 mL 干燥二氯甲烷溶解,依次加

入 0.44 g (1.16 mmol) 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-四甲基脲六氟磷酸盐 (HATU)、0.48 mL (2.92 mmol) *N,N*-二异丙基乙胺 (DIEA) 和 0.098 g (1.46 mmol) 甲胺盐酸盐, 室温搅拌 0.5 h, TLC 监测反应完全。反应液中加入 50 mL 水, 用二氯甲烷萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩有机相, 得到黄色固体粗品。经硅胶柱色谱分离纯化 (石油醚-丙酮, 体积比 8:1), 得到白色固体 (**A1**) 0.12 g, 收率 54.7%, mp 195.7 ~ 197.3 °C。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{11}H_{16}N_4O_2Cl$ 271.0814 $[M+H]^+$, found 271.0804。

中间体 **A2** ~ **A6** 参考此方法合成。

3.1.5 *N*-甲基-2-[(7-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]吡啶-6-基)氨基]-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲酰胺 (**HA1**) 的合成

将 0.04 g (0.27 mmol) 中间体 **4** 和 0.088 g (0.32 mmol) 中间体 **A1** 置于 100 mL 双颈瓶中, 用 15 mL 干燥 1,4-二氧六环溶解, 加入 0.18 g (0.54 mmol) 碳酸铯, 氮气置换 3 次, 加入 0.024 g (0.027 mmol) $Pd_2(dba)_3$ 和 0.029 g (0.054 mmol) Brettphos, 氮气置换 3 次, 100 °C 反应 4 h, TLC 监测反应完全。冷却至室温, 加入 150 mL 水, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 所得粗品经硅胶柱色谱分离纯化 (二氯甲烷-甲醇, 体积比 50:1), 得到白色固体 (**HA1**) 0.062 g, 收率 57.2%。

目标化合物 **HA2** ~ **HA6** 参考此法合成。

3.1.6 2-甲硫基-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲酸乙酯 (**6**) 的合成

将 10.00 g (43.10 mmol) 4-氯-2-甲硫基嘧啶-5-甲酸乙酯 (**5**) 置于 500 mL 茄形瓶中, 用 200 mL 乙腈-水 (体积比 4:1) 混合溶剂溶解, 加入 5.93 g (43.10 mmol) 四氢-2*H*-吡喃-4-胺盐酸盐, 分批缓慢加入 14.89 g (107.75 mmol) 碳酸钾, 室温反应 5 h, TLC 监测反应完全。抽滤, 除去碳酸钾, 减压浓缩反应液, 用乙酸乙酯复溶后加入 150 mL 水, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得到透明油状液体 (**6**) 12.55 g, 收率 98.2%。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{13}H_{20}N_3O_3S$ 298.1121 $[M+H]^+$, found 298.1134。

3.1.7 2-甲磺酰基-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲酸乙酯 (**7**) 的合成

将 0.15 g (0.50 mmol) 中间体 **6** 置于 100 mL

茄形瓶中, 用 20 mL 乙酸乙酯溶解, 加入 0.26 g (1.51 mmol) 间氯过氧苯甲酸 (*m*-CPBA), 室温搅拌 3 h, TLC 监测反应完全。加入 10 mL 饱和碳酸钠溶液淬灭反应, 搅拌 10 min, 用二氯甲烷 (30 mL × 3) 萃取, 合并有机相, 依次用水和饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得到白色固体 (**7**) 0.18 g, 收率 92.1%, mp 172.3 ~ 173.8 °C。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{13}H_{20}N_3O_5S$ 330.1014 $[M+H]^+$, found 330.1022。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.82 (s, 1H), 8.52 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 4.34 ~ 4.30 (m, 2H), 4.29 ~ 4.24 (m, 1H), 3.92 ~ 3.89 (m, 2H), 3.51 ~ 3.46 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 1.97 ~ 1.93 (m, 2H), 1.59 ~ 1.53 (m, 2H), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)。

3.1.8 2-[(7-甲基[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]吡啶-6-基)氨基]-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲酸乙酯 (**8**) 的合成

将 0.15 g (0.45 mmol) 中间体 **7** 置于 100 mL 茄形瓶中, 用 20 mL 干燥的二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 加入 0.08 g (0.54 mmol) 中间体 **4** 和 0.87 g (0.90 mmol) 叔丁醇钠, 室温反应 4 h, TLC 监测反应完全。将反应液倒入 150 mL 水中, 搅拌 30 min, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 所得粗品经硅胶柱色谱分离纯化 (二氯甲烷-甲醇, 体积比 100:1), 得到浅黄色固体 (**8**) 0.14 g, 收率 80.5%, mp 234.1 ~ 235.4 °C。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.59 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.35 ~ 4.31 (m, 2H), 4.26 ~ 4.22 (m, 1H), 4.01 ~ 3.98 (m, 2H), 3.63 ~ 3.61 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 2.06 ~ 2.02 (m, 2H), 1.68 ~ 1.60 (m, 2H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)。

3.1.9 {2-[(7-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]吡啶-6-基)氨基]-4-[(四氢-2*H*-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-基}[4-(甲磺酰基)哌嗪-1-基]甲酮 (**HA7**) 的合成

将 0.12 g (0.3 mmol) 中间体 **8** 置于 100 mL 茄形瓶中, 用 15 mL 甲醇溶解, 加入 1 mL 浓度为 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液, 升温至 50 °C 反应 8 h, TLC 监测反应完全。反应液冷却至室温, 减压浓缩除去大部分溶剂, 剩余反应液用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 值至 5.0 ~ 6.0, 有固体析出, 抽滤, 干燥, 得到浅黄色固体, 置于 100 mL 茄形瓶中, 加入 20 mL 干燥的 DMF 溶解, 加入 0.14 g

(0.32 mmol) HATU 和 0.2 mL (0.78 mmol) DIEA, 室温搅拌 5 min, 加入 0.06 g (0.26 mmol) 1-甲磺酰基哌嗪, 室温搅拌反应 3 h, TLC 监测反应完全。将反应液倒入 200 mL 水中, 搅拌 30 min, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 所得粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 20:1), 得到浅黄色固体(**HA7**)0.06 g, 收率 43.1%。

化合物 **HA8** 和 **HA9** 参考此法合成。

3.2 HB 系列化合物的合成

3.2.1 2-甲硫基-4-[(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基]嘧啶-5-甲腈(**B-1**)的合成

将 5.00 g (26.94 mmol) 4-氯-2-甲硫基嘧啶-5-甲腈(**B**)置于 500 mL 茄形瓶中, 用 100 mL 乙腈-水(体积比 4:1)溶解, 依次加入 3.89 g (28.28 mmol) 四氢-2H-吡喃-4-胺盐酸盐和 9.31 g (67.33 mmol) 碳酸钾, 室温反应 5 h, TLC 监测反应完全。抽滤除去碳酸钾, 减压浓缩反应液, 用 100 mL 乙酸乙酯复溶, 加入 100 mL 水, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩有机相, 得到透明油状液体(**B-1**)6.25 g, 收率 92.8%。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.42 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.26 ~ 4.20 (m, 1H), 3.89 ~ 3.86 (m, 2H), 3.38 ~ 3.34 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.76 ~ 1.73 (m, 2H), 1.71 ~ 1.64 (m, 2H)。

3.2.2 5-(氨基甲基)-*N*-[(四氢-2H-吡喃-4-基)-2-甲硫基-嘧啶-4-胺(**B-2**)的合成

将 3.00 g (11.99 mmol) 中间体 **B-1** 置于 100 mL 双颈瓶中, 用 15 mL 干燥四氢呋喃溶解, 氮气置换 3 次, 将反应瓶置于冰水浴下冷却 3 min, 滴加 35 mL 含有 0.91 g (23.99 mmol) 四氢铝锂的四氢呋喃溶液, 室温反应 12 h, TLC 监测反应完全。0 °C 缓慢加入 5 g 十水合硫酸钠, 过滤, 滤饼用少量四氢呋喃淋洗, 合并有机相, 减压浓缩, 经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 40:1), 得到黄色固体(**B-2**)2.10 g, 收率 69.1%, mp 195.5 ~ 196.7 °C。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₁₁H₁₉N₄OS 255.1214 [M + H]⁺, found 255.1208。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.81 (s, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.11 ~ 4.02 (m, 1H), 3.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.68 ~ 3.61 (m, 1H), 3.55 ~ 3.48 (m, 2H), 3.45 ~ 3.40 (m, 2H), 3.34 ~ 3.29 (m, 1H), 2.56 (s, 3H), 1.96 ~

1.87 (m, 2H), 1.75 ~ 1.66 (m, 2H)。

3.2.3 7-甲硫基-1-(四氢-2H-吡喃-4-基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1H)-酮(**B-3**)的合成

将 2.00 g (7.87 mmol) 中间体 **B-2** 溶于 20 mL 干燥四氢呋喃中, 0 °C 加入 2.55 g (15.74 mol) *N,N'*-羰基二咪唑(CDI)和 0.1 mL (7.78 mmol) 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU), 0 °C 反应 3 h, 后转移至室温反应, TLC 监测反应完全。加入 8 mL 饱和氯化铵溶液淬灭反应, 减压浓缩反应液, 剩余物经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-丙酮, 体积比 4:1), 得到白色固体(**B-3**)1.46 g, 收率 66.2%, mp 159.2 ~ 161.1 °C。ESI-MS *m/z*: 278.1 [M - H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8.21 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.47 ~ 4.38 (m, 1H), 4.21 ~ 4.11 (m, 1H), 3.88 ~ 3.76 (m, 2H), 3.70 ~ 3.54 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.11 ~ 2.01 (m, 2H), 1.86 ~ 1.65 (m, 2H)。

3.2.4 3-甲基-7-甲硫基-1-(四氢-2H-吡喃-4-基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1H)-酮(**B-4**)的合成

将 1.46 g (5.21 mmol) 中间体 **B-3** 置于 500 mL 茄形瓶中, 用 150 mL 乙腈溶解, 依次加入 3.40 g (10.42 mmol) 碳酸铯和 2.74 g (10.42 mmol) 苯基三甲基碘化铵, 80 °C 反应 5 h, TLC 监测反应完全。加入 50 mL 水淬灭反应, 减压浓缩去除溶剂, 剩余物用乙酸乙酯萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得到 1.25 g 白色固体(**B-4**), 收率 81.7%, mp 181.5 ~ 182.7 °C。ESI-MS *m/z*: 295.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8.04 (s, 1H), 4.97 ~ 4.93 (m, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.08 ~ 4.05 (m, 2H), 3.49 ~ 3.45 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.93 ~ 2.87 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 1.59 ~ 1.57 (m, 2H)。

3.2.5 3-甲基-7-甲磺酰基-1-(四氢-2H-吡喃-4-基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1H)-酮(**B-5**)的合成

以 1.25 g (4.26 mmol) 中间体 **B-4** 为原料, 以二氯甲烷为溶剂, 参照 3.1.7 项下方法, 制备得到 1.18 g 白色固体(**B-5**), 收率 85.2%, mp 200.7 ~ 201.4 °C。ESI-MS *m/z*: 327.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8.37 (s, 1H), 4.99 ~ 4.95 (m, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.08

(dd, $J = 11.5, 4.6$ Hz, 2H), 3.47 ~ 3.51 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.88 ~ 2.81 (m, 2H), 1.62 ~ 1.59 (m, 2H)。

3.2.6 3-甲基-7-[(7-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-*a*]吡啶-6-基)氨基]-1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮(**HB1**)的合成

将 0.10 g (0.67 mmol) 中间体 **4** 和 0.24 g (0.73 mmol) 中间体 **B-5** 置于 100 mL 茄形瓶中, 用 15 mL 干燥 DMSO 溶解, 加入 0.13 g (1.34 mmol) 叔丁醇钠, 室温反应 4 h, TLC 监测反应完全。将反应液倒入 100 mL 水中, 剧烈搅拌 30 min, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 残余物经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 25:1), 得到浅黄色固体(**HB1**) 0.16 g, 收率 62.1%。

化合物 **HB2** ~ **HB7** 的合成参考此法。

3.3 HB 系列化合物侧链的合成

3.3.1 4-甲基-2-(1-甲基-1*H*-吡啶-4-基)-5-硝基吡啶(**L1-1a**)的合成

将 0.25 g (1.16 mmol) 2-溴-4-甲基-5-硝基吡啶(**L1**) 置于 100 mL 双颈瓶中, 用 20 mL 1,4-二氧六环-水(体积比 5:1) 混合溶剂溶解, 依次加入 0.29 g (1.39 mmol) (1-甲基-1*H*-吡啶-4-基) 硼酸频哪醇酯、0.32 g (2.32 mmol) 碳酸钾和 0.097 g (0.12 mmol) [1,1-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯, 氮气置换 3 次, 100 °C 搅拌反应 10 h, TLC 监测反应完全。反应液冷却至室温, 加入 50 mL 水, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 残余物经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 80:1), 得到黄色固体(**L1-1a**) 0.15 g, 收率 67.5%, mp 170.9 ~ 171.8 °C。ESI-MS m/z : 219.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 9.14 (s, 1H), 8.17 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.87 (d,

$J = 1.6$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.71 (s, 3H)。

化合物 **L1-1b** 的合成参考此法。

3.3.2 4-甲基-5-硝基-2-(1*H*-吡啶-1-基) 苯甲腈(**L2-1a**)的合成

将 0.2 g (1.11 mmol) 2-氟-4-甲基-5-硝基苯甲腈(**L2**) 置于 100 mL 茄形瓶中, 用 15 mL DMF 溶解, 加入 0.18 g (2.66 mmol) 吡啶和 0.23 g (1.67 mmol) 碳酸钾, 80 °C 反应 2 h, TLC 监测反应完全。加入 50 mL 水, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 残余物经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-丙酮, 体积比 5:1), 得到白色固体(**L2-1a**) 0.13 g, 收率 54.1%, mp 160.5 ~ 161.7 °C。ESI-MS m/z : 229.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.51 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.94 (q, $J = 1.0$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 2.63 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H)。

化合物 **L2-1b** ~ **L2-1d** 的合成参考此法。

3.3.3 4-甲基-6-(1-甲基-1*H*-吡啶-4-基) 吡啶-3-胺(**L1-2a**)的合成

将 0.12 g (0.55 mmol) 中间体 **L1-1a** 和 29 mg (0.27 mmol) 钯炭(湿) 置于 100 mL 双颈瓶中, 用 25 mL 乙醇溶解, 氢气置换 6 次, 升温至 60 °C, 搅拌反应 2 h, TLC 监测反应完全。过滤, 减压浓缩滤液, 得到白色固体(**L1-2a**) 0.11 g, 收率 98.5%, mp 250.1 ~ 251.6 °C。ESI-MS m/z : 189.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.15 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.35 (s, 3H)。

化合物 **L1-2b**、**L2-2a** ~ **L2-2d** 的合成参考此法。

目标化合物的理化性质及波谱数据见表 1。

Table 1 Experimental and spectral data of the target compounds

Compd.	mp/°C	ESI-HR-MS m/z found calcd. for	¹ H-NMR (600 MHz) δ	¹³ C-NMR (150 MHz) δ	Purity/%
HA1	247.1 - 248.9	405.1768 [M + Na] ⁺ C ₁₈ H ₂₂ N ₈ O ₂ Na 405.1778	①9.17 (s, 1H), 9.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.30 - 8.26 (m, 1H), 7.70 (s, 1H), 3.98 - 3.92 (m, 1H), 3.82 - 3.78 (m, 2H), 3.32 - 3.28 (m, 2H), 2.72 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.89 - 1.84 (m, 2H), 1.47 - 1.38 (m, 2H)	①167.6, 161.2, 160.9, 157.0, 154.4, 148.2, 139.4, 128.3, 124.2, 114.8, 100.9, 66.3 (2C), 46.6, 32.9 (2C), 26.2, 18.7	99.08

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	mp/°C	ESI-HR-MS <i>m/z</i> found calcd. for	¹ H-NMR(600 MHz)δ	¹³ C-NMR(150 MHz)δ	Purity/%
HA2	252.3 – 254.3	419.1932 [M + Na] ⁺ C ₁₉ H ₂₄ N ₈ O ₂ Na 419.1955	^① 9.18 (s, 1H), 9.03 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.80 (dt, <i>J</i> = 11.9, 3.6 Hz, 2H), 3.30 (t, <i>J</i> = 11.3 Hz, 2H), 3.25 – 3.20 (m, 1H), 2.39 (s, 3H), 1.86 (d, <i>J</i> = 12.5 Hz, 2H), 1.48 – 1.38 (m, 2H), 1.10 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H)	^① 166.9, 161.2, 161.0, 157.0, 154.3, 148.2, 139.4, 128.3, 124.1, 114.8, 100.9, 66.3 (2C), 54.0, 46.6, 34.0 (2C), 18.7, 15.2	98.93
HA3	257.1 – 258.0	433.2106 [M + Na] ⁺ C ₂₀ H ₂₆ N ₈ O ₂ Na 433.2119	^① 9.18 (s, 1H), 9.02 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.30 (s, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.82 – 3.77 (m, 2H), 3.30 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz, 2H), 3.19 – 3.13 (m, 1H), 2.40 (s, 2H), 1.86 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 2H), 1.56 – 1.48 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 0.88 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H)	^① 167.1, 161.2, 161.0, 157.0, 154.3, 148.2, 139.4, 128.3, 124.2, 114.8, 100.9, 66.3 (2C), 46.6, 41.0, 33.0 (2C), 22.8, 18.7, 11.9	97.52
HA4	237.7 – 238.6	397.2011 [M + H] ⁺ C ₁₉ H ₂₅ N ₈ O ₂ 397.2023	^① 9.17 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.02 – 3.99 (m, 1H), 3.84 – 3.79 (m, 2H), 3.28 (t, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H), 2.98 (s, 6H), 2.41 (s, 1H), 1.83 – 1.78 (m, 2H), 1.53 – 1.44 (m, 2H)	^① 168.2, 160.6, 159.9, 156.8, 154.3, 148.2, 139.5, 128.4, 124.1, 114.8, 103.7, 66.6 (2C), 55.4, 47.0, 32.8 (2C), 18.7 (3C)	98.47
HA5	243.1 – 246.0	411.2179 [M + H] ⁺ C ₂₀ H ₂₇ N ₈ O ₂ 411.2175	^① 9.19 (s, 1H), 9.03 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.04 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 4.10 – 4.01 (m, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.83 – 3.78 (m, 2H), 3.30 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.86 (d, <i>J</i> = 16.3 Hz, 1H), 1.48 – 1.39 (m, 2H), 1.15 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 6H)	^① 166.3, 161.2, 161.0, 157.2, 154.3, 148.2, 139.3, 128.3, 124.0, 114.8, 100.9, 66.3 (2C), 46.7, 41.0, 33.0 (2C), 22.8 (2C), 18.7	98.11
HA6	254.1 – 258.0	449.2544 [M – H] ⁻ C ₂₃ H ₂₉ N ₈ O ₂ 449.2548	^① 9.18 (s, 1H), 9.03 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 4.00 – 3.90 (m, 1H), 3.80 (dt, <i>J</i> = 11.9, 3.6 Hz, 2H), 3.76 – 3.67 (m, 1H), 3.31 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.86 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 2H), 1.76 (dd, <i>J</i> = 14.7, 6.7 Hz, 4H), 1.60 (d, <i>J</i> = 14.1 Hz, 1H), 1.47 – 1.39 (m, 2H), 1.28 (t, <i>J</i> = 10.1 Hz, 4H), 1.16 – 1.08 (m, 1H)	^① 166.3, 161.2, 161.0, 157.2, 154.3, 148.2, 139.3, 128.3, 124.0, 114.8, 100.9, 66.3 (2C), 48.4, 46.6, 33.0 (2C), 32.9 (2C), 25.7, 25.4 (2C), 18.7	99.01
HA7	145.8 – 146.6	538.1992 [M + Na] ⁺ C ₂₂ H ₂₉ N ₉ O ₄ SNa 538.2003	^① 9.15 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.04 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 4.04 – 3.96 (m, 1H), 3.82 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz, 2H), 3.59 – 3.56 (m, 4H), 3.25 – 3.23 (m, 2H), 3.17 (t, <i>J</i> = 5.1 Hz, 4H), 2.90 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 1.80 (d, <i>J</i> = 12.6 Hz, 2H), 1.53 – 1.46 (m, 2H)	^① 167.4, 160.9, 159.7, 157.1, 154.3, 148.2, 128.3, 124.4, 114.8 (2C), 103.4, 66.6 (2C), 60.2, 55.4, 47.2, 45.8, 34.6 (2C), 32.8 (2C), 18.7	98.82

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	mp/°C	ESI-HR-MS <i>m/z</i> found calcd. for	¹ H-NMR(600 MHz)δ	¹³ C-NMR(150 MHz)δ	Purity/%
HA8	88.7 – 90.1	473.2047 [M + Na] ⁺ C ₂₂ H ₂₆ N ₈ O ₃ Na 473.2028	^① 9.16 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 4.03 – 3.98 (m, 1H), 3.85 – 3.81 (m, 2H), 3.76 – 3.70 (m, 4H), 3.22 – 3.21 (m, 2H), 2.47 – 2.46 (m, 4H), 2.40 (s, 3H), 1.81 – 1.79 (m, 2H), 1.51 – 1.45 (m, 2H)	^① 207.9, 167.7, 160.8, 159.7, 156.6, 154.3, 148.2, 139.6, 128.3, 124.3, 114.8, 103.8, 66.6(2C), 47.2, 43.7, 40.8(2C), 32.8(2C), 29.5, 18.7	95.78
HA9	237.5 – 238.9	497.1721 [M + Na] ⁺ C ₂₀ H ₂₆ N ₈ O ₄ SNa 497.1708	^① 9.16 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.88 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.56 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 3.79 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz, 2H), 3.63 – 3.59 (m, 2H), 3.50 – 3.49 (m, 1H), 3.35 – 3.34 (m, 2H), 3.30 – 3.26 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.86 – 1.84 (m, 2H), 1.46 – 1.39 (m, 2H)	^① 167.4, 161.4, 160.9, 157.4, 154.4, 148.3, 130.1, 128.1, 124.4, 114.8, 100.4, 70.2, 66.3(2C), 55.4, 53.3, 41.3, 33.3, 32.9, 18.7	97.56
HB1	216.4 – 217.3	417.1778 [M + Na] ⁺ C ₁₉ H ₂₂ N ₈ O ₂ Na 417.1766	^② 9.40 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.90 – 4.85 (m, 1H), 4.26 (s, 2H), 4.03 – 4.01 (m, 2H), 3.50 – 3.46 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.84 – 2.78 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.59 – 1.56 (m, 2H)	^② 159.2, 158.4, 154.2, 153.8, 153.1, 148.2, 135.8, 127.8, 121.5, 115.9, 104.5, 68.5 (2C), 52.6, 46.6, 36.0, 30.1(2C), 18.9	97.33
HB2	165.9 – 166.7	457.2109 [M + Na] ⁺ C ₂₀ H ₂₆ N ₈ O ₂ Na 457.2119	^② 8.81 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 4.84 – 4.80 (m, 1H), 4.22 (s, 2H), 4.01 – 3.99 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.42 – 3.38 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.81 – 2.75 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.55 – 1.52 (m, 2H)	^② 158.7, 156.9, 152.7, 152.0, 146.8, 144.2, 140.3, 136.3, 131.2, 127.8, 121.6, 120.1, 102.4, 67.2 (2C), 50.9, 45.4, 38.2, 34.6, 28.8(2C), 16.9	96.84
HB3	171.1 – 172.6	457.2115 [M + Na] ⁺ C ₂₂ H ₂₆ N ₈ O ₂ Na 457.2109	^② 9.10 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.90 – 4.85 (m, 1H), 4.25 (s, 2H), 4.22 (s, 3H), 4.03 – 4.01 (m, 2H), 3.46 – 3.42 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.83 – 2.78 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.58 – 1.57 (m, 2H)	^② 158.1, 157.0, 152.6, 151.9, 144.3, 142.8, 140.1, 138.1, 137.0, 132.5, 123.4, 104.9, 102.8, 67.2 (2C), 51.2, 45.3, 38.3, 34.6, 28.9(2C), 16.8	97.63
HB4	203.3 – 204.4	467.1957 [M + Na] ⁺ C ₂₃ H ₂₄ N ₈ O ₂ Na 467.1980	^② 8.99 (s, 1H), 8.31 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.84 – 7.83 (m, 1H), 7.68 (s, 1H), 6.60 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz, 1H), 4.75 – 4.69 (m, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.88 – 3.85 (d, 2H), 3.30 – 3.26 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.59 – 2.53 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.47 – 1.44 (m, 2H)	^② 159.7, 157.6, 154.3, 153.6, 141.9, 139.3, 138.2, 137.2, 130.8, 129.8, 126.5, 117.4, 108.4, 104.0, 103.2, 67.8(2C), 51.5, 45.7, 35.5, 29.8(2C), 18.8	96.85
HB5	181.4 – 182.3	468.1904 [M + Na] ⁺ C ₂₂ H ₂₃ N ₉ O ₂ Na 468.1915	^② 8.64 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.90 (s, 3H), 6.98 (s, 1H), 4.93 – 4.87 (m, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.09 – 4.06 (m, 2H), 3.54 – 3.50 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.89 – 2.81 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.62 – 1.59 (m, 2H)	^② 157.3, 157.2, 152.5, 151.6, 136.5, 135.3 (2C), 134.2, 132.7, 124.8, 123.7, 116.1, 103.7, 102.1, 67.2 (2C), 51.3, 45.3, 34.7, 28.8(2C), 17.5	97.25

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	mp/°C	ESI-HR-MS <i>m/z</i> found calcd. for	¹ H-NMR(600 MHz)δ	¹³ C-NMR(150 MHz)δ	Purity/%
HB6	195.5 – 196.6	468.1897 [M + Na] ⁺ C ₂₂ H ₂₃ N ₉ O ₂ Na 468.1875	² 8.73 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.91 – 4.87 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 4.07 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 2H), 3.52 – 3.48 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.83 – 2.76 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.60 – 1.57 (m, 2H)	² 157.2, 157.1, 152.4, 151.9, 151.2, 142.2, 137.3, 133.7, 132.1, 125.9, 124.6, 115.2, 103.9, 103.5, 67.1 (2C), 51.4, 45.3, 34.8, 28.7 (2C), 17.5	97.58
HB7	209.9 – 211.1	467.1949 [M + Na] ⁺ C ₂₃ H ₂₄ N ₈ O ₂ Na 467.1933	² 9.05 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.59 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 4.74 – 4.68 (m, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.86 (dd, <i>J</i> = 11.3, 4.5 Hz, 2H), 3.31 – 3.26 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.44 – 1.42 (m, 2H)	² 158.7, 156.4, 153.2, 152.6, 138.9, 137.9, 136.7, 133.7, 128.8, 127.5 (2C), 119.8, 115.7, 104.2, 102.9, 66.7 (2C), 50.4, 44.7, 34.5, 28.6 (2C), 17.7	99.06

Note: ①DMSO-*d*₆, ②CDCl₃

4 活性测试

4.1 目标化合物的酶活性测试

在 384 PP Plate 化合物稀释板中用 DMSO 对化合物进行梯度稀释,使用 Echo(贝克曼库尔特公司非接触式声波移液仪器)转移 0.05 μL 化合物至 384 反应微孔板(Greiner 784075)中,确保 DMSO 终浓度为 1% (双重复)。向 384 反应微孔板每孔中加入 2.5 μL 2X DNA-PK 溶液, 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 25 °C 孵育 10 min。向每孔中加入 2.5 μL 2X ATP 与 DNA-PK substrate 溶液, 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 25 °C 孵育 60 min。向每孔中加入 4 μL ADP-Glo Reagent, 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 25 °C 孵育 40 min。向每孔中加入 8 μL ADP-Glo Detection buffer, 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 25 °C 孵育 40 min。在

BMG (PHERAstar FSX) 酶标仪上读取 RLU (relative luminescence unit) 信号(试剂最终工作浓度: DNA-PK 2 nmol·L⁻¹, ATP 15 μmol·L⁻¹, DNA-PK substrate 0.1 mg·mL⁻¹)。含有 1% DMSO 和酶的孔作为 High Control, 含有 1% DMSO 和缓冲液的孔作为 Low Control。化合物处理孔的抑制百分比在 High Control 和 Low Control 之间标准化

$$\text{Inhibition\%} = \frac{\text{RLU}_{\text{High Control}} - \text{RLU}_{\text{sample}}}{\text{RLU}_{\text{High Control}} - \text{RLU}_{\text{Low Control}}} \times 100\%$$

曲线拟合,以小分子抑制剂浓度取 Log 作为 *x* 轴,均相时间分辨荧光比值作为 *y* 轴,进行非线性拟合,使用 GraphPad prism 中 Log (inhibitor) vs. response-Variable slope 算法计算 IC₅₀ 值。初步测试了 16 个目标化合物在不同浓度下对 DNA-PK 的抑制率,数据见表 2。

Table 2 Inhibitory activity of target compounds against DNA-PK enzyme

Compd.	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)	Compd.	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)
HA1	10.18	HB1	3.40
HA2	12.84	HB2	76.33
HA3	39.16	HB3	9.15
HA4	>1 000	HB4	1.93
HA5	73.66	HB5	4.06
HA6	>1 000	HB6	44.76
HA7	1 854	HB7	39.86
HA8	1 420	AZD7648	0.42
HA9	72.44		

DNA-PK 酶活性测试结果表明,开环策略所设计的 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类化合物(**HA1** ~ **HA9**)酶活性弱于扩环策略所设计的 3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮类化合物(**HB1** ~ **HB7**),推测原因可能是将 AZD7648 结构中嘌呤酮母核的五元环打开,导致化合物丢失了与 ATP 结合位点 Trp-3805 的 π - π 相互作用。且 HA 系列化合物随着开环引入的取代基体积增大,化合物对 DNA-PK 的抑制活性呈下降趋势。通过骨架跃迁策略设计得到的化合物中,**HB1** 和 **HB4** 对 DNA-PK 的 IC_{50} 值分别为 $3.40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.93 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,活性较好。

4.2 目标化合物的细胞活性测试

以 AZD7648 为阳性对照药,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测试 16 个化合物中酶活性较好的 **HB1**、**HB4**、**HB5** 三个化合物在不同浓度下对 DNA-PK 高表达的人结肠癌细胞系 HCT-116 的

生长抑制作用,具体实验方法如下:

(1)细胞培养:HCT-116 细胞培养于 RPMI-1640 培养基,培养基中加入 10% (体积分数)加热灭活的胎牛血清、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的链霉素和 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的青霉素。细胞于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% (体积分数) CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。

(2)生长抑制活性测试:取 $100 \mu\text{L}$ 处于对数生长期的密度为每毫升 8×10^3 个的细胞悬液埋入 96 孔板中,培养 24 h 使细胞贴壁。加入 $100 \mu\text{L}$ 特定浓度的待测药物,培养 96 h。每孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液,继续培养 3 h。弃去 96 孔板中的液体,将板倒扣在滤纸上充分吸干,每孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 的 DMSO,于微型振荡器震荡 10 min。用酶标仪测定每孔于 570 nm 波长下的吸光度,计算出不同浓度下的抑制率,目标化合物的细胞活性测试结果见表 3。

Table 3 The antiproliferative activities of target compounds against HCT-116 cell lines

Compd.	Inhibitory rate/%		
	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
HB1	79.00 ± 1.33	70.03 ± 1.87	56.11 ± 3.53
HB4	94.29 ± 0.94	90.55 ± 0.56	88.14 ± 0.75
HB5	93.84 ± 0.03	88.46 ± 1.04	81.66 ± 2.07
AZD7648	78.78 ± 1.31	69.13 ± 3.49	51.82 ± 2.13

结果显示这三个化合物对 HCT-116 细胞系表现出中等的抗增殖作用,优于阳性对照 AZD7648。其中化合物 **HB4**、**HB5** 对 HCT-116 细胞系的抗增殖作用较好,推测其原因是取代基苯环上的氰基增强了化合物与 DNA-PK 蛋白 Lys-3753 之间的氢键作用。

5 结果与讨论

本文作者基于 AZD7648 与 DNA-PK 的共晶结构,采用开环策略和扩环策略设计并合成了 16 个未见文献报道的 4-氨基嘧啶-5-甲酰胺类(**HA1** ~ **HA9**)及 3,4-二氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2(1*H*)-酮类(**HB1** ~ **HB7**)DNA-PK 抑制剂,结构均经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 MS 谱确证。采用 ADP-Glo 法测试 HA 系列和 HB 系列化合物对 DNA-PK 的抑制活性。结果表明,扩环策略所得化合物的活性要优于开环策略的化合物,其中化合物 **HB1** 和 **HB4** 对 DNA-PK 的抑制活性较优,对 DNA-PK 的 IC_{50} 值分别为 $3.40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和

$1.93 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

通过分析目标化合物的结构及对 DNA-PK 的抑制率,初步得到该系列化合物的构效关系:1)嘌呤酮骨架可被其他含氮杂环替代,合适的骨架结构可能会更好的将分子定位到 DNA-PK 的活性位点,以获得有利的结合构象,从而提高活性。2)将双芳杂环替换为联芳杂环或取代芳环可提高化合物对 DNA-PK 的抑制活性。

此外,采用 MTT 法,以 AZD7648 为阳性对照药测试化合物 **HB1**、**HB4**、**HB5** 在 50 、 25 、 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三个浓度下对人结肠癌细胞系 HCT-116 的抗增殖活性,结果显示三个化合物对 DNA-PK 的抑制率略优于阳性对照药 AZD7648。综上所述,本研究初步探索了 AZD7648 结构改造与其 DNA-PK 抑制活性之间的关系,为后续 DNA-PK 抑制剂的开发奠定了基础。

参考文献:

[1] GROELLY F J, FAWKES M, DAGG R A, et al.

- Targeting DNA damage response pathways in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(2):78–94.
- [2] PEAKE J D, NOGUCHI E. Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair [J]. *Hum Gent*, 2022, 141(12):1811–1836.
- [3] GEORGE V C, ANSARI S A, CHELAKKOT V S, et al. DNA-dependent protein kinase: epigenetic alterations and the role in genomic stability of cancer [J]. *Mutat Res-Rev Mutat*, 2019, 780:92–105.
- [4] CHEN X M, XU X, CHEN Y, et al. Structure of an activated DNA-PK and its implications for NHEJ [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(4):801–810.
- [5] SAXENA S, ZOU L. Review hallmarks of DNA replication stress [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12):2298–2314.
- [6] LIANG S, THOMAS S E, CHAPLINA K, et al. Structural insights into inhibitor regulation of the DNA repair protein DNA-PKcs [J]. *Nature*, 2022, 601(7894):643–648.
- [7] ARANDA C S, GOUVEIA-PEREIRA M P, DA SILVA C J M, et al. Severe combined immunodeficiency diagnosis and genetic defects [J]. *Immunol Rev*, 2024, 322(1):138–147.
- [8] POSPISILOVA M, SEIFRTOVA M, REZOCEVA M. Small molecule inhibitors of DNA-PK for tumor sensitization to anticancer therapy [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2017, 68(3):337–344.
- [9] DING Z B, PAN W, XIAO Y, et al. Discovery of novel 7,8-dihydropteridine-6(5H)-one-based DNA-PK inhibitors as potential anticancer agents via scaffold hopping strategy [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 237:114401.
- [10] LIU K J, YUAN X, YANG T, et al. Discovery, optimization, and evaluation of potent and selective DNA-PK inhibitors in combination with chemotherapy or radiotherapy for the treatment of malignancies [J]. *J Med Chem*, 2023, 67(1):245–271.
- [11] CHEN S L, TAN J, WANG D Y, et al. Macrocyclic compounds in drug design and synthetic strategies [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2021, 31(6):447–459.

Design, synthesis and biological activity of AZD7648 derivatives of DNA-PK inhibitors

LIU Rulong, QIN Huanhuan, CAI Tian, ZHAO Linxiang*, HUANG Min*

(Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery (Shenyang Pharmaceutical University), Ministry of Education, Shenyang 110016, China)

Abstract: In order to investigate the role of AZD7648 scaffold, a series of 4-aminopyrimidine-5-formamides and 3,4-dihydropyrimidinocyclo[4,5-*d*]pyrimidin-2(1*H*)-one derivatives as the DNA-PK inhibitors were designed and synthesized. The inhibitory activities of the target compounds against DNA-PK were tested by ADP-Glo method using AZD7648 as the positive control drug. The antiproliferative activities of compounds **HB1**, **HB4** and **HB5** against human colon cancer cell line HCT-116 were evaluated by MTT method at the concentrations of 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ with AZD7648 as positive control. The DNA-PK inhibitory activities of compounds **HA1**–**HA9** were weaker than that of compounds **HB1**–**HB7**, and the activities of promising compounds **HB1**, **HB4** and **HB5** were comparable to AZD7648. The MTT assay results showed that the three compounds showed moderate anti-proliferation effect on HCT-116 cell line, which were better than that of AZD7648. This study preliminarily investigates the impact of structural modification of AZD7648 on its DNA-PK inhibitory activity, thereby laying a theoretical and experimental foundation for the subsequent development of DNA-PK inhibitors.

Key words: DNA-PK inhibitor; AZD7648; antitumor activity; structural modification