

BTK/JAK3 双靶点抑制剂的设计合成和生物活性评价

岑丽芳^{1#}, 程 铭^{1#}, 任玮杰¹, 叶 柳¹, 王禄华¹, 郭维博^{1,2}, 张 强², 徐云根^{1*}

(¹ 中国药科大学药物化学系, 南京 210009; ² 西安新通药物研究股份有限公司, 西安 710077)

摘 要 以课题组前期发现的 **XL-12** 为先导化合物, 通过末端苯环的结构修饰, 进一步提高化合物的抗炎活性。设计并合成了 12 个目标化合物。所有目标化合物的结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 确证。体外活性测试结果显示大部分化合物对布鲁顿型酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine, BTK) 和 Janus 激酶 3 (JAK3) 具有较好的酶抑制活性, 化合物 **I-3** 对 Daudi 细胞和 BaF3-JAK3 细胞显示中等的细胞增殖抑制活性。在体外抗炎活性评价中, 化合物 **I-3** 能有效抑制炎症因子 IL-6 的产生。此外, 在小鼠二甲苯致耳廓肿胀模型中, 化合物 **I-3** 显示出优于阳性药依鲁替尼 (ibrutinib) 的抗炎活性。

关键词 类风湿性关节炎; BTK 抑制剂; JAK3 抑制剂; 双靶点抑制剂; 抗炎

中图分类号 R914.2; R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)01-0073-14

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024010201

引用本文 岑丽芳, 程铭, 任玮杰, 等. BTK/JAK3 双靶点抑制剂的设计合成和生物活性评价 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(1): 73–86.

Cite this article as: CEN Lifang, CHENG Ming, REN Weijie, *et al.* Design, synthesis and biological study of BTK/JAK3 dual-target inhibitors[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(1): 73–86.

Design, synthesis and biological study of BTK/JAK3 dual-target inhibitors

CEN Lifang^{1#}, CHENG Ming^{1#}, REN Weijie¹, YE Liu¹, WANG Luhua¹, GUO Weibo^{1,2}, ZHANG Qiang², XU Yungen^{1*}

¹Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Xi'an Xintong Pharmaceutical Research Co., Ltd, Xi'an 710077, China

Abstract In the present study, the compound **XL-12** from our previous work was utilized as a lead compound. Through the optimization of the terminal phenyl ring, 12 target compounds were designed and synthesized. The structures of all target compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR, and H RMS. *In vitro* enzyme activity assay showed that most compounds demonstrated significant inhibitory activity toward Bruton's tyrosine kinase (BTK) and Janus kinase 3 (JAK3). Among them, compound **I-3** exhibited moderate cell proliferation inhibitory activity toward Daudi cells and BaF3-JAK3 cells. In the evaluation of anti-inflammatory activity *in vitro*, compound **I-3** could effectively inhibit the production of inflammatory factors IL-6; besides, it exhibited superior anti-inflammatory activity compared to ibrutinib in xylene-induced ear swelling model in mice.

Key words rheumatoid arthritis; BTK inhibitor; JAK3 inhibitor; dual-target inhibitors; anti-inflammatory

[#]CEN Lifang and CHENG Ming contributed equally to this work

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以炎性滑膜炎为主的慢性、持久性自身免疫性疾病^[1]。目前治疗 RA 的药物主要分为非甾体抗炎药^[2]、糖皮质激素类^[3]、改善病情类药物 (DMARDs) (包括 bDMARDs、csDMARDs、tsDMARDs)^[4]。非

甾体抗炎药和糖皮质激素类药物可以减缓疾病的进展, 但在长期使用中会引起多种不良反应^[5-6]; 生物制剂类 DMARDs (bDMARDs), 如 TNF- α 抑制剂阿达木单抗 (adalimumab) 和 IL-6 抑制剂托珠单抗 (tocilizumab), 疗效和耐受性较好, 但顺应性与小

收稿日期 2024-01-02 * 通信作者 Tel: 13505155520 E-mail: xyg64@126.com

[#]岑丽芳和程铭为共同第一作者

分子药物相比较差;传统合成类抗风湿药物(csDMARDs),如甲氨蝶呤,是目前治疗 RA 的金标准,但由于起效缓慢、毒性较大,因此在使用中需要监测血药浓度。靶向合成类抗风湿药物(tsDMARDs),比如托法替尼(tofacitinib)、巴瑞克替尼(baricitinib),这类药物疗效好、成本低,但大多数是非选择性 JAK 抑制剂,可能会存在一些安全性问题。

研究发现多种信号通路与 RA 的发生发展密切相关,包括磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)信号通路、JAK-信号转导与转录激活因子(JAK-STAT)信号通路、BCR 信号通路等^[7]。抑制这些信号通路中关键

的酶,比如 JAK、PI3K、BTK 等,可以阻断信号通路的传导,减少炎症因子的产生,从而达到治疗 RA 的目的^[8]。

JAK 激酶是细胞内非受体酪氨酸激酶,与细胞的增殖、存活与分化以及基因的表达等生物学功能有关^[9-10]。研究表明多种与炎症性疾病有关的细胞因子大多是通过 JAK-STAT 信号通路进行传导的,JAK 已经成为治疗自身免疫性疾病的热门药物靶点。此外,选择性 JAK3 抑制剂可能规避由于抑制 JAK2 而带来的副作用,具有更好的安全性。目前已有 10 个 JAK 抑制剂先后被批准上市,结构式见图 1。

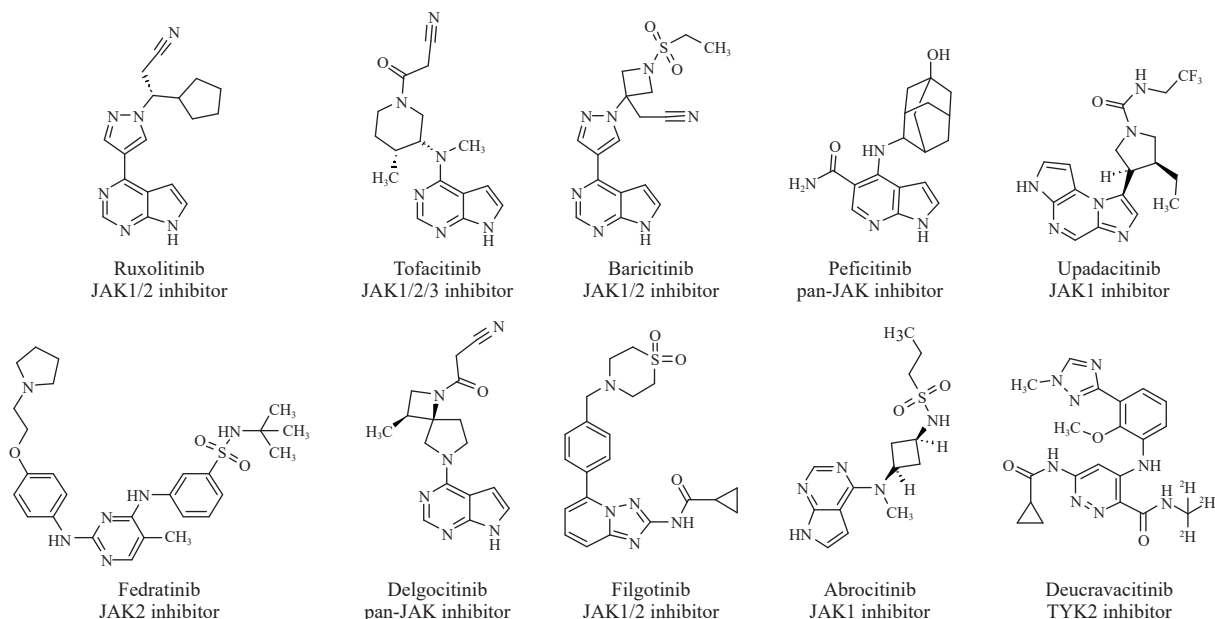


Figure 1 JAK inhibitors on the market

BTK 是非受体酪氨酸激酶 TEC 家族的一员^[11],仅在 B 细胞和髓样细胞中表达,主要通过参与 BCR 信号通路调节 B 细胞的增殖、分化和凋亡^[12-13]。BTK 抑制剂主要用于治疗 B 细胞淋巴瘤和各种恶性血液病,同时,也是治疗自身免疫性疾病中一个十分有吸引力的靶点。目前多款 BTK 抑制剂被批准上市,如图 2 所示。

有文献报道,使用 BTK 和 JAK1 的药物组合物 ABBV-59^[14] 或 SYK/JAK 双靶点抑制剂 PRT-2070^[15],可以有效解决 RA 治疗过程中,药物疗效较低、安全性差以及适应性耐药等问题。因此,通过组合疗法或多靶点小分子抑制剂治疗 RA 是目前该领域研究的热点。课题组前期研究得到了对 BTK 和 JAK3

都具有较强抑制活性的化合物 XL-12^[16],本研究在化合物 XL-12(如图 3 所示)的基础上,进一步研究其构效关系,设计并合成了 12 个目标化合物。

1 合成路线

1.1 中间体 5a~5l 的合成

化合物 1^[16] 与不同的羧酸 2a~2l 经酸胺缩合反应制得中间体 3a~3l。随后和中间体 4^[16] 在 1,1'-二(二苯膦基)二茂铁二氯化钯(II)催化下,经 Suzuki 偶联反应制得中间体 5a~5l(图 4)。

1.2 目标化合物 I-1 和 I-2 的合成

中间体 5a 和 5b 在 10%Pd/C 和氢气作用下进行还原反应得到中间体 6a 和 6b。6a 和 6b 在饱和

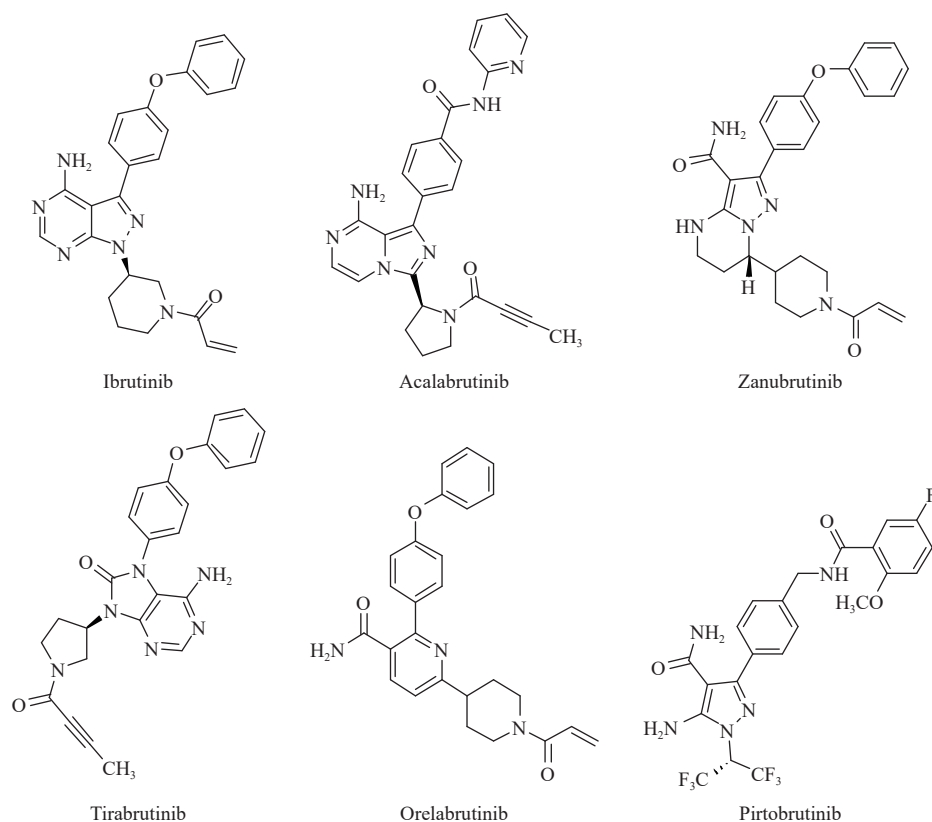


Figure 2 BTK inhibitors on the market

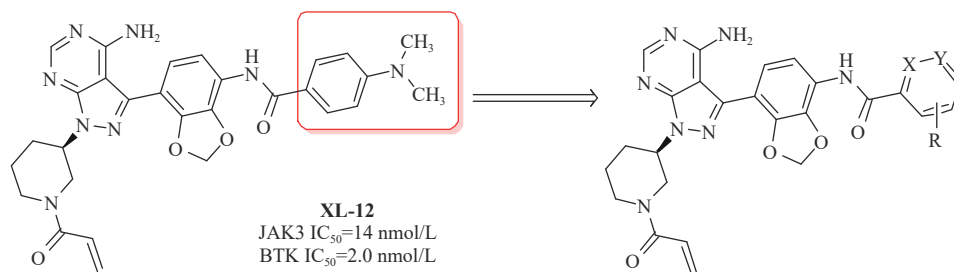


Figure 3 Structure of compound XL-12

氯化氢/乙酸乙酯溶液中脱除叔丁氧羰基(Boc)后得到中间体 **7a** 和 **7b**, 随后在冰浴条件下与丙烯酰氯反应得到目标化合物 **I-1** 和 **I-2**(图 5)。

1.3 目标化合物 **I-3~I-12** 的合成

化合物 **5c~5l** 在饱和氯化氢/乙酸乙酯溶液中脱除 Boc 后得到中间体 **6c~6l**, 随后在冰浴条件下与丙烯酰氯经酰化反应得到目标化合物 **I-3~I-12**(图 6)。

2 实验部分

2.1 材料

Micros Q-TOF 型高分辨分析仪器(美国 Waters

公司); Bruker AV-300 型核磁共振仪, Avance NEO 400 MHz 核磁共振仪(美国 Bruker 公司); RY-1 型熔点仪(天津市分析仪器厂); 200~300 目硅胶(山西诺泰生物科技有限公司); HSG F254 型号 TLC 硅胶板(山东青岛海洋化工有限公司); 常用试剂均为市售分析纯试剂。JAK3、BTK 蛋白(北京华新康信生物科技有限公司); BaF3-JAK3 细胞(中科普瑞昇生物医药科技有限公司); Daudi 细胞(上海青旗生物技术发展公司); 胎牛血清(北京沃卡威生物技术); 小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(上海优宁维生物科技股份有限公司); RAW264.7 细胞(中国科学院上海细胞库); ICR 小鼠(南京市江宁区青龙山动物繁

殖中心)。

2.2 化学合成

2.2.1 中间体 **3a~3l** 的合成

甲基 (4-*N*-((7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基) 氨基甲酰基) 苯基) 氨基甲酸苄酯 (**3a**) 将化合物 **2a** (1.31 g, 4.59 mmol) 和无水二氯甲烷 (20 mL) 混合, 冰浴下滴加草酰氯 (1.16 g, 9.19 mmol), 加入三滴 DMF, 转为室温反应 30 min, TLC (石油醚-乙酸乙酯, 2:1) 监测原料反应完全。减压蒸除溶

剂, 残留物用无水二氯甲烷 (15 mL) 溶解, 待用。于 50 mL 三颈瓶中, 加入化合物 **1** (1.00 g, 3.80 mmol)、二氯甲烷 (15 mL) 和三乙胺 (113 μ L, 8.2 mmol), 冰浴搅拌下, 滴入预先制备的酰氯溶液, 加毕, 室温反应 2 h, TLC (石油醚-乙酸乙酯, 3:1) 监测原料反应完全。有机相分别用水 (10 mL $\times$ 3)、饱和氯化钠水溶液 (10 mL $\times$ 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥。抽滤, 滤液减压浓缩。粗品经柱色谱纯化 (石油醚-乙酸乙酯, 10:1~3:1), 得黄色固体 1.09 g, 收率 49.4%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.67 (1H, s), 8.42~8.38 (2H,

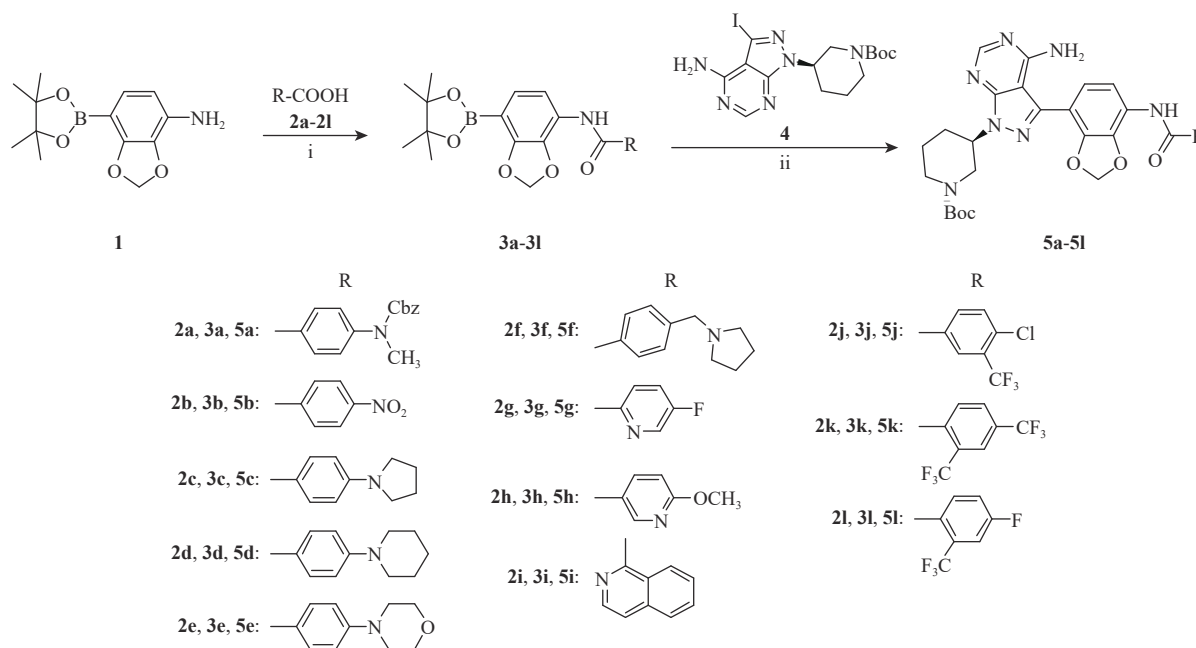


Figure 4 Synthetic routes of compounds **5a–5l**

Reagents and conditions: (i) COCl₂, TEA, dichloromethane, 0 °C–r.t., 2 h; (ii) Pd(dppf)Cl₂, Na₂CO₃ (2 mol/L), dioxane-H₂O (4:1), N₂, 80 °C, 3 h

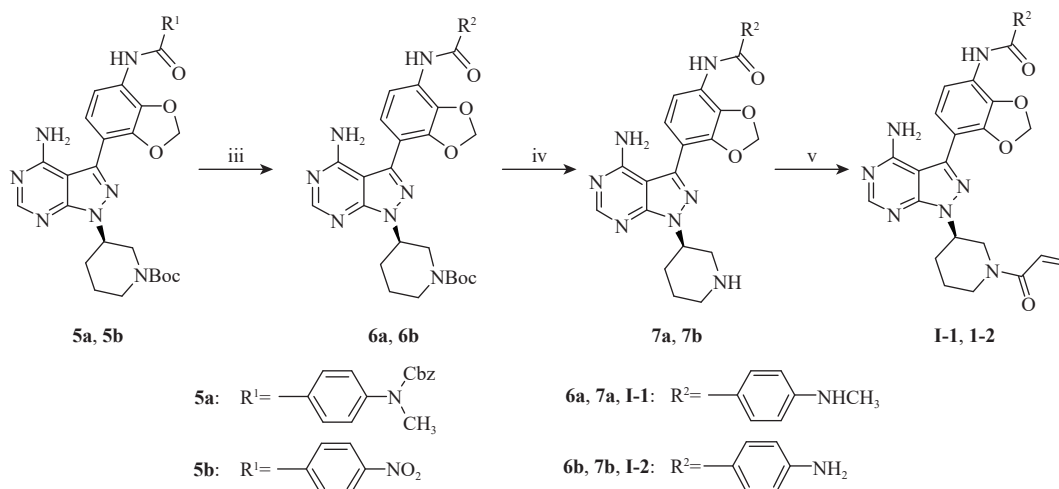


Figure 5 Synthetic routes of compounds **I-1–I-2**

Reagents and conditions: (iii) H₂, 10% Pd/C, methanol-acetic acid(2:1), r.t., 20 h; (iv) HCl/EA, 20 °C, 1 h; (v) acryloyl chloride, TEA, anhydrous dichloromethane/DMF, 0 °C then r.t., 3 h

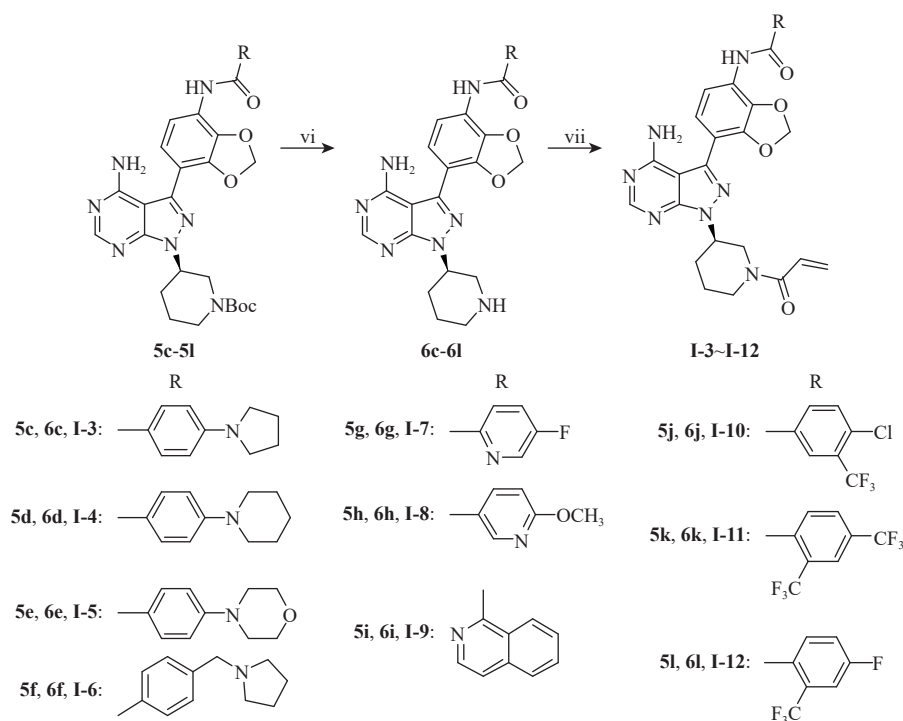


Figure 6 Synthetic routes of compounds **1-3-12**

Reagents and conditions: (vi) HCl/ethyl acetate, 20 °C, 1 h; (vii) acryloyl chloride, TEA, anhydrous dichloromethane/DMF, 0 °C then r.t., 3 h

m), 7.95 (1H, s), 7.93 (1H, s), 7.52 (1H, s), 7.50 (1H, s), 7.38-7.32 (5H, m), 6.03 (2H, s), 1.27 (12H, s)。

4-硝基-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酰胺 (**3b**) 以化合物 **2b** (0.76 g, 4.55 mmol) 和化合物 **1** (1.00 g, 3.80 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得黄色固体 1.39 g, 收率 88.7 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 413.1[M+H]⁺。

4-(吡咯烷-1-基)-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酰胺 (**3c**) 以化合物 **2c** (0.61 g, 3.19 mmol) 和化合物 **1** (0.76 g, 2.89 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得白色固体 1.03 g, 收率 81.7 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.68 (s, 1H), 7.83 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.02 (2H, s), 6.56 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.03 (2H, s), 3.31~3.26 (4H, m), 1.98~1.94 (4H, m), 1.27 (12H, s)。

4-(哌啶-1-基)-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酰胺 (**3d**) 以化合物 **2d** (0.69 g, 3.37 mmol) 和化合物 **1** (0.80 g, 3.04 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得褐色固体 1.18 g, 收率 86.2 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 451.2[M+H]⁺。

4-吗啉基-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酰胺 (**3e**) 以化合物 **2e** (0.75 g, 3.62 mmol) 和化合物 **1** (0.80 g, 3.04 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得浅褐色固体 1.37 g, 收率 99.7 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 453.2[M+H]⁺。

4-(吡咯烷-1-基)-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酰胺 (**3f**) 以化合物 **2f** (0.75 g, 3.67 mmol) 和化合物 **1** (0.80 g, 3.04 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得白色固体 0.83 g, 收率 60.6 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 453.2[M+H]⁺。

5-氟-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)吡啶-2-甲酰胺 (**3g**) 以化合物 **2g** (0.64 g, 4.54 mmol) 和化合物 **1** (1.00 g, 3.80 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得白色固体 1.04 g, 收率 70.9 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 387.1[M+H]⁺。

6-甲氧基-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)吡啶-3-甲酰胺 (**3h**) 以化合物 **2h** (0.52 g, 3.40 mmol) 和化合物 **1** (0.80 g, 3.04 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得 0.78 g

白色固体, 收率 64.4 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) m/z : 399.2[M+H]⁺。

N-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基) 异喹啉-1-甲酰胺 (**3i**) 以化合物 **2i** (0.55 g, 3.18 mmol) 和化合物 **1** (0.70 g, 2.66 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得褐色固体 0.92 g, 收率 82.7 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) m/z : 419.2[M+H]⁺。

4-氯-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-3-(三氟甲基) 苯甲酰胺 (**3j**) 以化合物 **2j** (0.80 g, 3.56 mmol) 和化合物 **1** (0.80 g, 3.04 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得白色固体 1.32 g, 收率 92.5 %。产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) m/z : 470.1[M+H]⁺。

N-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-2,4-双(三氟甲基) 苯甲酰胺 (**3k**) 以化合物 **2k** (0.94 g, 3.64 mmol) 和化合物 **1** (0.80 g, 3.04 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得白色固体 1.26 g, 收率 82.4 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) m/z : 504.1[M+H]⁺。

4-氯-*N*-(7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊环-2-基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-2-(三氟甲基) 苯甲酰胺 (**3l**) 以化合物 **2l** (0.96 g, 4.60 mmol) 和化合物 **1** (1.00 g, 3.80 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **3a** 的合成, 得白色固体 0.98 g, 收率 56.9 %, 产物不经进一步纯化, 直接投下一步反应。MS (ESI⁺70 V) m/z : 439.1[M+H]⁺。

2.2.2 中间体 **5a**~**5l** 的合成

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-((苄氧基) 羰基)(甲基) 氨基) 苯甲酰胺基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*] 嘧啶-1-基) 嘧啶-1-甲酸叔丁酯 (**5a**) 向 50 mL 三颈瓶中加入化合物 **3a** (1.00 g, 1.89 mmol)、化合物 **4** (0.76 g, 1.71 mmol)、1,4-二氧六环(15 mL)、2 mol/L Na₂CO₃ (1.9 mL) 和 Pd(dppf)Cl₂ (73 mg, 0.10 mmol), 氮气保护, 于 75 °C 反应 3 h, TLC (二氯甲烷-甲醇, 15:1) 监测反应完全。经硅藻土抽滤, 滤液减压蒸除溶剂, 用二氯甲烷 (30 mL) 溶解, 分别用水 (10 mL × 3)、饱和氯化钠水溶液 (10 mL × 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥。抽滤, 滤液减压浓缩, 经柱色谱纯化 (二氯甲烷-甲醇, 200:1~50:1) 得淡黄色固体 0.92 g, 收率 74.6 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.30 (1H, s), 8.24 (1H, s), 8.01 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.46~7.27 (5H, m), 7.19 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.03 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.15 (2H, s), 5.19~5.10 (2H, m), 4.73~4.65 (1H,

m), 4.19~3.64 (3H, m), 3.33 (3H, s), 3.12~2.86 (1H, m), 2.31~1.86 (3H, m), 1.69~1.53 (1H, m), 1.34 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-硝基苯甲酰胺基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*] 嘧啶-1-基) 嘧啶-1-甲酸叔丁酯 (**5b**) 以化合物 **3b** (0.90 g, 2.18 mmol) 和化合物 **4** (0.80 g, 1.80 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得白色固体 0.37 g, 收率 34.1 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.52 (1H, s), 8.21 (1H, s), 8.12 (2H, d, J = 8.2 Hz), 8.04 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.19 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.02 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.13 (2H, s), 4.72~4.60 (1H, m), 4.10~3.94 (1H, m), 3.89~3.76 (1H, m), 3.18~3.14 (1H, m), 3.09~2.91 (1H, m), 2.24~2.15 (1H, m), 2.13~2.02 (1H, m), 2.02~1.81 (1H, m), 1.62~1.51 (1H, m), 1.32 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-(吡咯烷-1-基) 苯甲酰胺基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*] 嘧啶-1-基) 嘧啶-1-甲酸叔丁酯 (**5c**) 以化合物 **3c** (1.12 g, 2.57 mmol) 和化合物 **4** (1.03 g, 2.32 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得白色固体 0.42 g, 收率 28.9 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.73 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.78 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.12 (s, 2H), 4.70~4.65 (m, 1H), 4.17~4.02 (m, 1H), 3.87~3.78 (m, 1H), 3.57~3.43 (m, 1H), 3.35~3.29 (m, 4H), 3.00~2.92 (m, 1H), 2.69~2.54 (m, 1H), 2.23~2.15 (m, 1H), 2.12~2.07 (m, 1H), 2.00~1.95 (m, 4H), 1.60~1.54 (m, 1H), 1.34 (s, 9H)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-(嘧啶-1-基) 苯甲酰胺基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*] 嘧啶-1-基) 嘧啶-1-甲酸叔丁酯 (**5d**) 以化合物 **3d** (0.90 g, 2.00 mmol) 和化合物 **4** (0.80 g, 1.80 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得白色固体 0.37 g, 收率 32.1 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.85 (1H, s), 8.24 (1H, s), 7.87 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.19 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.00 (3H, d, J = 8.6 Hz), 6.14 (2H, s), 4.74~4.64 (1H, m), 4.08~3.99 (1H, m), 3.93~3.78 (1H, m), 3.35~3.29 (4H, m), 3.06~2.92 (1H, m), 3.00~2.92 (1H, m), 2.69~2.52 (1H, m), 2.27~2.15 (1H, m), 2.13~2.07 (1H, m), 1.61~1.57 (7H, m), 1.37 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-(吗啉苯甲酰胺基) 苯并[d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*] 嘧啶-1-基) 嘧啶-1-甲酸叔丁酯 (**5e**) 以化合物 **3e** (1.27 g, 2.81 mmol) 和化合物 **4** (1.00 g, 2.26 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得褐色固体 0.37 g, 收率 25.5 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.91 (1H, s), 8.23 (1H, s), 7.90 (2H, d, J = 8.7

Hz), 7.18 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.01 (3H, m), 6.13 (2H, s), 4.71~4.61 (1H, m), 4.19~4.01 (1H, m), 3.98~3.87 (1H, m), 3.76~3.72 (4H, m), 3.38~3.37 (1H, m), 3.27~3.23 (4H, m), 3.05~2.92 (1H, m), 2.24~2.16 (1H, m), 2.11~2.04 (1H, m), 1.97~1.87 (1H, m), 1.59~1.51 (1H, m), 1.28 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-(吡咯烷-1-基甲基)苯甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**5f**) 以化合物 **3f** (0.80 g, 1.78 mmol) 和化合物 **4** (0.80 g, 1.80 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得淡黄色固体 0.84 g, 收率 72.8%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.22 (1H, s), 8.24 (1H, s), 7.96 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.48 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.15 (2H, s), 4.76~4.61 (1H, s), 4.22~4.01 (1H, m), 3.99~3.85 (1H, m), 3.72 (2H, s), 3.52~3.25 (4H, m), 3.09~2.91 (1H, m), 2.31~2.14 (1H, m), 2.14~2.03 (1H, m), 2.02~1.83 (1H, m), 1.81~1.69 (4H, m), 1.66~1.51 (2H, m), 1.29 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(5-氟吡啶-2-甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**5g**) 以化合物 **3g** (0.83 g, 2.15 mmol) 和化合物 **4** (0.89 g, 2.00 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得淡黄色固体 0.38 g, 收率 33.0%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.37 (1H, s), 8.67 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 8.27 (1H, dd, $J = 8.5, 1.3$ Hz), 8.19 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 8.14 (1H, dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz), 7.96~7.90 (2H, m), 7.81~7.76 (1H, m), 7.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.18 (2H, s), 4.70~4.61 (1H, m), 4.03~3.94 (1H, m), 3.90~3.72 (1H, m), 3.56~3.57 (1H, m), 3.04~2.90 (1H, m), 2.22~2.12 (1H, m), 2.10~2.02 (1H, m), 1.94~1.83 (1H, m), 1.61~1.51 (1H, m), 1.33 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(6-甲氧基吡啶-3-甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**5h**) 以化合物 **3h** (0.80 g, 2.01 mmol) 和化合物 **4** (0.87 g, 1.96 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得褐色固体 1.06 g, 收率 91.9%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.16 (1H, s), 8.77 (1H, s), 8.27 (1H, dd, $J = 8.7, 4.6$ Hz), 8.22 (1H, s), 8.04~7.98 (1H, m), 7.71 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.20 (2H, s), 4.73~4.60 (1H, m), 4.20~3.95 (1H, m), 3.90~3.70 (1H, m), 3.09~2.82 (2H, m), 2.29~2.12 (1H, m), 2.11~2.01 (1H, m), 1.99~1.84 (1H, m), 1.60~1.50 (1H, m), 1.34 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(异喹啉-2-甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-

甲酸叔丁酯 (**5i**) 以化合物 **3i** (0.74 g, 1.76 mmol) 和化合物 **4** (0.74 g, 1.67 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得褐色固体 0.95 g, 收率 93.5%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.28 (1H, s), 8.81 (1H, s), 8.28~8.22 (2H, m), 7.19 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.15 (2H, s), 4.72~4.61 (1H, m), 4.22~4.08 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.84~3.72 (1H, m), 3.59~3.45 (1H, m), 3.07~2.90 (1H, m), 2.28~2.16 (1H, m), 2.12~2.02 (1H, m), 1.99~1.87 (1H, m), 1.60~1.50 (1H, m), 1.34 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-氯-3-(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**5j**) 以化合物 **3j** (1.10 g, 2.34 mmol) 和化合物 **4** (0.99 g, 2.23 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得淡黄色固体 1.16 g, 收率 75.1%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.62 (1H, s), 8.42 (1H, s), 8.27 (1H, dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz), 8.22 (1H, s), 7.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.21 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.16 (2H, s), 4.73~4.62 (1H, m), 4.05~3.97 (1H, m), 3.93~3.75 (1H, m), 3.57~3.56 (1H, m), 3.06~2.91 (1H, m), 2.24~2.15 (1H, m), 2.12~2.02 (1H, m), 1.96~1.85 (1H, m), 1.62~1.50 (1H, m), 1.34 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(2,4-双(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**5k**) 以化合物 **3k** (1.17 g, 2.33 mmol) 和化合物 **4** (0.98 g, 2.21 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得淡黄色固体 1.24 g, 收率 80.9%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.71 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.20 (2H, s), 7.94 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.48 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.16 (2H, s), 4.72~4.62 (1H, m), 4.20~4.00 (1H, m), 3.94~3.75 (1H, m), 3.57~3.56 (1H, m), 2.77~2.69 (1H, m), 2.23~2.17 (1H, m), 2.12~2.03 (1H, m), 1.98~1.85 (1H, m), 1.61~1.51 (1H, m), 1.33 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-氟-2-(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**5l**) 以化合物 **3l** (0.78 g, 1.73 mmol) 和化合物 **4** (0.73 g, 1.64 mmol) 为原料, 操作过程同中间体 **5a** 的合成, 得褐色固体 0.92 g, 收率 82.6%。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.16 (1H, s), 8.77 (1H, s), 8.29~8.26 (1H, m), 8.22 (1H, s), 8.04~8.00 (1H, m), 7.71 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.20 (2H, s), 4.73~4.60 (1H, m), 4.20~3.95 (1H, m), 3.90~3.70 (1H, m), 3.09~2.82 (2H, m), 2.29~2.12 (1H, m), 2.11~2.01 (1H, m), 1.99~1.84 (1H, m), 1.60~1.50 (1H, m), 1.34 (9H, s)。

2.2.3 中间体 **6a** 和 **6b** 的合成

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-(甲氨基)苯甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**6a**) 将化合物 **5a** (0.90 g, 1.25 mmol)、甲醇 (8 mL) 和乙酸 (4 mL) 混合, 加入 10 % Pd/C (0.09 g), 通入氢气于室温反应 20 h, TLC (二氯甲烷-甲醇, 15:1) 监测反应完全。抽滤, 滤液减压蒸除溶剂, 粗品经柱色谱纯化 (二氯甲烷-甲醇, 150:1~50:1) 得黑褐色固体 0.64 g, 收率 87.3 %。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.81 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.09 (1H, s), 7.88 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.76 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.13 (2H, s), 4.78~4.58 (1H, m), 4.29~4.18 (1H, m), 3.97~3.68 (1H, m), 3.04~2.95 (4H, m), 2.29~2.16 (1H, m), 2.13~2.06 (1H, m), 1.94~1.80 (1H, m), 1.60~1.50 (1H, m), 1.48~1.43 (1H, m), 1.29 (9H, s)。

(*R*)-3-(4-氨基-3-(7-(4-氨基苯甲酰胺基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-1-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯 (**6b**) 以化合物 **5b** (0.35 g, 0.58 mmol) 和 10 % Pd/C 为原料, 操作过程同 **6a** 的合成, 得褐色固体 0.32 g, 收率 96.4 %。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 573.3[M+H]⁺。

2.2.4 中间体 **7a**、**7b**、**6c**~**6l** 的合成

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-(甲氨基)苯甲酰胺 (**7a**) 化合物 **6a** (0.64 g, 1.09 mmol) 和无水二氯甲烷 (10 mL) 混合, 冰浴搅拌下加入约 2 mL 饱和氯化氢/乙酸乙酯溶液, 有大量固体析出, 加毕, 撤去冰浴。室温搅拌反应 2 h, TLC (二氯甲烷-甲醇, 20:1) 监测反应完全, 抽滤, 滤饼用乙酸乙酯洗涤, 真空干燥, 得淡黄色固体 0.52 g, 收率 98.1 %。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 487.2[M+H]⁺。

(*R*)-4-氨基-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酰胺 (**7b**) 以化合物 **6b** (0.30 g, 0.52 mmol), 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得褐色固体 0.22 g, 收率 91.3 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 473.2[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-(吡咯烷-1-基)苯甲酰胺 (**6c**) 以化合物 **5c** (0.38 g, 0.61 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得白色固体 0.27 g, 收率 84.0 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 527.3[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧

啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-(哌啶-1-基)苯甲酰胺 (**6d**) 以化合物 **5d** (0.38 g, 0.60 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得白色固体 0.27 g, 收率 82.1 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 541.3[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-吗啉基苯甲酰胺 (**6e**) 以化合物 **5e** (0.37 g, 0.58 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得白色固体 0.26 g, 收率 82.6 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 543.3[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-(吡咯烷-1-基)苯甲酰胺 (**6f**) 以化合物 **5f** (0.84 g, 1.31 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得淡黄色固体 0.68 g, 收率 96.0 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 541.3[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-5-氟吡啶-2-甲酰胺 (**6g**) 以化合物 **5g** (1.22 g, 2.12 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得黄色固体 0.97 g, 收率 96.1 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 477.2[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-6-甲氧基吡啶-3-甲酰胺 (**6h**) 以化合物 **5h** (0.94 g, 1.60 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得褐色固体 0.66 g, 收率 84.4 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 489.2[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-异喹啉-1-甲酰胺 (**6i**) 以化合物 **5i** (0.38 g, 0.62 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得白色固体 0.31 g, 收率 98.3 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 509.2[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-氯-3-(三氟甲基)苯甲酰胺 (**6j**) 以化合物 **5j** (1.11 g, 1.68 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得淡黄色固体 0.86 g, 收率 91.4 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺70 V) *m/z*: 561.1[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(哌啶-3-基)-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧

啉-3-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-2,4-双 (三氟甲基) 苯甲酰胺 (**6k**) 以化合物 **5k** (1.10 g, 1.59 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得白色固体 0.93 g, 收率 98.6 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺ 70 V) m/z : 594.2[M+H]⁺。

(*R*)-*N*-(7-(4-氨基-1-(啉-3-基)-1*H*-吡唑并 [3,4-*d*] 啉-3-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-4-氟-2-(三氟甲基) 苯甲酰胺 (**6l**) 以化合物 **5l** (1.11 g, 1.72 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **7a** 的合成, 得淡黄色固体 0.86 g, 收率 92.0 %。不经进一步纯化, 直接投下一步。MS (ESI⁺ 70 V) m/z : 544.2[M+H]⁺。

2.2.5 目标化合物 **I-1**~**I-12** 的合成

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基啉-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并 [3,4-*d*] 啉-3-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-4-(甲氨基) 苯甲酰胺 (**I-1**) 将化合物 **7a** (0.51 g, 1.05 mmol) 加入无水二氯甲烷 (3 mL) 中, 加 Et₃N (0.22 g, 2.17 mmol), 室温搅拌 1 h, 冰浴条件下缓慢滴加丙烯酰氯 (0.086 g, 0.95 mmol) 的无水二氯甲烷 (1 mL) 溶液, 滴加完毕, 室温搅拌约 3 h。TLC (二氯甲烷-甲醇, 15 : 1) 监测反应完全。向反应液中加入二氯甲烷 (7 mL) 稀释, 再分别用水 (10 mL × 3) 和饱和氯化钠水溶液 (10 mL × 3) 洗涤, 有机层减压浓缩得粗品。粗品经柱色谱纯化 (二氯甲烷-甲醇, 100:1~50:1) 得白色固体 0.07 g, 收率 12.3 %。mp 158.5~160.4 °C。纯度: 96.86 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.68 (s, 1H), 8.23 (1H, s), 7.80 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.19 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.00 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.91~6.76 (1H, m), 6.58 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.38~6.33 (1H, m), 6.17~6.05 (3H, m), 5.73~5.57 (1H, m), 4.75~4.64 (1H, m), 4.59~4.49 (1H, m), 4.27~4.17 (1H, m), 4.13~3.96 (1H, m), 3.24~3.16 (1H, m), 2.77~2.71 (3H, d, J = 5.0 Hz), 2.29~2.21 (1H, m), 2.15~2.08 (1H, m), 1.96~1.88 (1H, m), 1.63~1.53 (1H, m)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 165.25, 165.03, 158.55, 156.16, 154.13, 153.21, 146.13, 141.07, 139.02, 129.97 (2C), 128.85, 127.87, 122.79, 122.43, 120.51, 119.35, 111.44, 111.23, 110.90 (2C), 101.95, 99.09, 53.40 (0.5C), 52.61 (0.5C), 49.72 (0.5C), 46.18 (0.5C), 45.61 (0.5C), 42.05 (0.5C), 30.09 (0.5C), 29.88 (0.5C), 29.77, 25.41 (0.5C), 23.88 (0.5C)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₈H₂₉N₈O₄: 541.2312; Found: 541.2309。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基啉-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并 [3,4-*d*] 啉-3-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-4-氨基苯甲酰胺 (**I-2**) 以化合物 **7b** (0.24 g, 0.51 mmol) 和

丙烯酰氯 (0.04 g, 0.44 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.04 g, 收率 14.9 %。mp 171.8~173.8 °C。纯度: 96.56 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.65 (1H, s), 8.23 (1H, s), 7.72 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.19 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.00 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.90~6.72 (1H, m), 6.60 (2H, d, J = 8.4 Hz), 6.16~6.04 (3H, m), 5.77 (2H, br), 5.73~5.57 (1H, m), 4.74~4.64 (1H, m), 4.57~4.50 (1H, m), 4.27~4.19 (1H, m), 4.10~3.91 (1H, m), 3.24~3.14 (1H, m), 2.31~2.22 (1H, m), 2.16~2.08 (1H, m), 1.97~1.87 (1H, m), 1.65~1.54 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₇H₂₇N₈O₄: 527.2155; Found: 527.2147。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基啉-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并 [3,4-*d*] 啉-3-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-4-(吡咯烷-1-基) 苯甲酰胺 (**I-3**) 以化合物 **6c** (0.25 g, 0.47 mmol) 和丙烯酰氯 (0.04 g, 0.44 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.06 g, 收率 22.0 %。mp 158.1~160.5 °C。纯度: 97.98 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.76 (1H, s), 8.19 (1H, s), 7.81 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.11 (1H, d, J = 7.9 Hz), 6.98 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.83~6.60 (1H, m), 6.56 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.13~5.97 (3H, m), 5.73~5.55 (1H, m), 4.76~4.61 (1H, m), 4.50~4.44 (1H, m), 4.15~4.06 (1H, m), 4.04~3.87 (1H, m), 3.30~3.22 (4H, m), 3.12~3.03 (1H, m), 2.26~2.17 (1H, m), 2.12~2.05 (1H, m), 1.96~1.89 (5H, m), 1.60~1.49 (1H, m)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.75, 164.55, 158.05, 155.68, 153.66, 149.88, 145.66, 140.64, 138.54, 129.46 (2C), 128.37, 127.48, 122.30, 121.96, 119.54, 118.93, 110.99, 110.61 (2C), 101.47, 98.62, 52.92 (0.5C), 52.14 (0.5C), 49.25 (0.5C), 47.24 (2C), 45.70 (0.5C), 45.14 (0.5C), 41.57 (0.5C), 29.62 (0.5C), 29.41 (0.5C), 24.97 (2C), 24.75 (0.5C), 23.40 (0.5C)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₃₁H₃₃N₈O₄: 581.2625; Found: 581.2626。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基啉-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并 [3,4-*d*] 啉-3-基) 苯并 [d][1,3] 二氧杂环戊烯-4-基)-4-(啉-1-基) 苯甲酰胺 (**I-4**) 以化合物 **6d** (0.35 g, 0.65 mmol) 和丙烯酰氯 (0.05 g, 0.55 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.05 g, 收率 12.9 %。mp 157.2~158.8 °C。纯度: 95.27 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.20 (1H, s), 7.81 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.12 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.98 (1H, d, J = 8.9 Hz), 6.94 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.84~6.59 (1H, m), 6.14~6.07 (3H, m), 5.74~5.57 (1H, m), 4.75~4.64 (1H, m), 4.52~4.47 (1H, m), 4.15~4.08 (1H, m), 4.05~3.92 (1H, m), 3.28 (4H, s), 3.23~3.14 (1H, m), 2.26~2.18

(1H, m), 2.13~2.07 (1H, m), 1.96~1.85 (1H, m), 1.45 (7H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₃₂H₃₅N₈O₄: 595.2781; Found: 595.2774。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基咪唑-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]咪唑-3-基)苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-吗啉基苯甲酰胺 (**I-5**) 以化合物 **6e** (0.25 g, 0.46 mmol) 和丙烯酰氯 (0.04 g, 0.44 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.06 g, 收率 21.9 %。mp 156.4~158.2 °C。纯度: 97.79 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.90 (1H, s), 8.23 (1H, s), 7.90 (2H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.04~7.00 (3H, m), 6.85~6.73 (1H, m), 6.17~6.04 (3H, m), 5.72~5.58 (1H, m), 4.75~4.64 (1H, m), 4.59~4.46 (1H, m), 4.29~4.18 (1H, m), 4.11~4.00 (1H, m), 3.77~3.72 (4H, m), 3.28~3.23 (4H, m), 3.22~3.15 (1H, m), 2.32~2.20 (1H, m), 2.14~2.08 (1H, m), 1.96~1.88 (1H, m), 1.65~1.52 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₃₁H₃₃N₈O₅: 597.2574; Found: 597.2562。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基咪唑-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]咪唑-3-基)苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-(吡咯烷-1-基甲基)苯甲酰胺 (**I-6**) 以化合物 **6f** (0.50 g, 0.93 mmol) 和丙烯酰氯 (0.08 g, 0.88 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.04 g, 收率 7.2 %。mp 175.1~177.6 °C。纯度: 96.26 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.24 (1H, s), 8.24 (1H, s), 7.97 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.49 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.87 (1H, dd, *J* = 15.2, 9.1 Hz), 6.84~6.69 (1H, m), 6.18~6.02 (4H, m), 5.75~5.58 (1H, m), 4.82~4.65 (1H, m), 4.62~4.49 (1H, m), 4.30~4.17 (1H, m), 4.13~3.99 (1H, m), 3.72 (2H, s), 3.45~3.29 (4H, m), 3.26~3.14 (1H, m), 3.03~2.91 (1H, m), 2.36~2.20 (1H, m), 2.19~2.00 (1H, m), 1.97~1.87 (1H, m), 1.74 (4H, m), 1.61 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₃₂H₃₅N₈O₅: 595.2781; Found: 595.2780。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基咪唑-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]咪唑-3-基)苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-5-氟吡啶-2-甲酰胺 (**I-7**) 以化合物 **6g** (0.81 g, 1.70 mmol) 和丙烯酰氯 (0.14 g, 1.54 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.25 g, 收率 27.7 %。mp 167.2~169.4 °C。纯度: 98.36 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.15 (1H, s), 8.75 (1H, s), 8.26 (1H, m), 8.22 (1H, s), 8.02 (1H, td, *J* = 8.7, 2.8 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.90~6.71 (1H, m), 6.20 (2H, s), 6.16~6.03 (1H, m), 5.73~5.58 (1H, m), 4.77~4.63 (1H, m),

4.60~4.52 (1H, m), 4.28~4.17 (1H, m), 4.11~4.05 (1H, m), 3.26~3.15 (1H, m), 2.32~2.20 (1H, m), 2.16~2.07 (1H, m), 1.96~1.89 (1H, m), 1.66~1.53 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₆H₂₄FN₈O₄: 531.1905; Found: 531.1909。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基咪唑-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]咪唑-3-基)苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-6-甲氧基吡啶-3-甲酰胺 (**I-8**) 以化合物 **6h** (0.60 g, 1.23 mmol) 和丙烯酰氯 (0.10 g, 1.10 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.12 g, 收率 18.0 %。mp 156.3~158.4 °C。纯度: 96.38 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.27 (1H, s), 8.81 (1H, s), 8.28~8.21 (2H, m), 7.20 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.83~6.72 (1H, m), 6.15 (2H, s), 6.12~6.04 (1H, m), 5.74~5.57 (1H, m), 4.75~4.64 (1H, m), 4.59~4.51 (1H, m), 4.29~4.18 (1H, m), 4.12~4.04 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.25~3.15 (1H, m), 2.30~2.20 (1H, m), 2.15~2.08 (1H, m), 1.96~1.88 (1H, m), 1.64~1.52 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₇H₂₇N₈O₅: 543.2104; Found: 543.2098。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基咪唑-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]咪唑-3-基)苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)异喹啉-1-甲酰胺 (**I-9**) 以化合物 **6i** (0.28 g, 0.55 mmol) 和丙烯酰氯 (0.045 g, 0.50 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.14 g 白色固体, 收率 45.2 %。mp 195.7~197.6 °C。纯度: 97.92 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.42 (1H, s), 8.69 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.31 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.25 (1H, s), 8.22 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.94 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.85 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.79 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.91~6.72 (1H, m), 6.27 (2H, s), 6.20~6.05 (1H, m), 5.77~5.58 (1H, m), 4.78~4.65 (1H, m), 4.62~4.54 (1H, m), 4.31~4.19 (1H, m), 4.13~4.06 (1H, m), 3.34~3.16 (1H, m), 2.36~2.21 (1H, m), 2.17~2.08 (1H, m), 2.02~1.90 (1H, m), 1.66~1.53 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₃₀H₂₇N₈O₄: 563.2155; Found: 563.2149。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基咪唑-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]咪唑-3-基)苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-氯-3-(三氟甲基)苯甲酰胺 (**I-10**) 以化合物 **6j** (0.86 g, 1.54 mmol) 和丙烯酰氯 (0.13 g, 1.44 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.22 g, 收率 24.9 %。mp 164.6~166.4 °C。纯度: 98.83 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.62 (1H, s), 8.43 (1H, s), 8.28 (1H, dd, *J* =

8.4, 2.2 Hz), 8.24 (1H, s), 7.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.90~6.71 (1H, m), 6.17 (2H, s), 6.15~6.04 (1H, m), 5.75~5.66 (1H, m), 4.79~4.61 (1H, m), 4.61~4.53 (1H, m), 4.29~4.17 (1H, m), 4.12~4.01 (1H, m), 3.25~3.16 (1H, m), 2.32~2.22 (1H, m), 2.16~2.09 (1H, m), 1.96~1.89 (1H, m), 1.64~1.53 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₈H₂₄ClF₃N₇O₄: 614.1530; Found: 614.1526。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基吡啶-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-2,4-双(三氟甲基)苯甲酰胺 (**I-11**) 以化合物 **6k** (0.93 g, 1.57 mmol) 和丙烯酰氯 (0.14 g, 1.55 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体的 0.31 g 白色固体, 收率 30.5 %。mp 160.2~162.2 °C。纯度: 97.38 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.71 (1H, s), 8.24~8.18 (3H, m), 7.94 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.48 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.76~6.84 (1H, m), 6.17 (2H, s), 6.12~6.05 (1H, m), 5.74~5.58 (1H, m), 4.75~4.65 (1H, m), 4.59~4.53 (1H, m), 4.29~4.17 (1H, m), 4.12~4.04 (1H, m), 3.24~3.14 (1H, m), 2.32~2.21 (1H, m), 2.16~2.08 (1H, m), 1.98~1.89 (1H, m), 1.65~1.53 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₉H₂₄F₆N₇O₄: 648.1794; Found: 648.1789。

(*R*)-*N*-(7-(1-(1-丙烯酰基吡啶-3-基)-4-氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)-4-氟-2-(三氟甲基)苯甲酰胺 (**I-12**) 以化合物 **6l** (0.60 g, 1.10 mmol) 和丙烯酰氯 (0.10 g, 1.10 mmol) 为原料, 操作过程同化合物 **I-1** 的合成, 得白色固体 0.16 g 白色固体, 收率 24.3 %。mp 161.9~163.8 °C。纯度: 98.30 %。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.55 (1H, s), 8.23 (1H, s), 7.79~7.74 (2H, m), 7.68~7.63 (1H, m), 7.41 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.92~6.70 (1H, m), 6.17 (2H, s), 6.13~6.02 (1H, m), 5.76~5.59 (1H, m), 4.78~4.64 (1H, m), 4.62~4.52 (1H, m), 4.31~4.18 (1H, m), 4.15~4.07 (1H, m), 3.26~3.16 (1H, m), 2.34~2.20 (1H, m), 2.18~2.06 (1H, m), 2.00~1.88 (1H, m), 1.68~1.51 (1H, m)。HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺: Calcd for C₂₈H₂₄F₄N₇O₄: 598.1286; Found: 598.1287。

2.3 酶抑制活性测试

BTK 和 JAK3 酶抑制活性测试分别以星形孢菌素 (staurosporine) 和依鲁替尼 (ibrutinib) 为阳性对照。取激酶溶液 10 μ L 加至 384 孔检测板; 1000 r/min, 离心 30 s, 振荡混匀后室温孵育 10 min。在激酶基础缓冲液中添加 FAM 标记的短肽、ATP、MgCl₂, 并配制成 2.5 倍终浓度的短肽溶液, 取 10 μ L

加至 384 孔测定板各孔。恒温 28 °C 下 JAK3 孵育 30 min, BTK 孵育 20 min。加入终止检测液 25 μ L 停止激酶反应。用 Caliper EZ Reader 读取转化率, 采用分析软件 GraphPad Prism 5 拟合量效曲线, 从而得出各个化合物的 IC₅₀。

2.4 细胞增殖抑制活性测试

BaF3-JAK3 细胞和 Daudi 细胞增殖抑制活性测试分别以托法替尼 (tofacitinib) 和紫杉醇为阳性对照。

通法如下: 将细胞重悬, 使用自动细胞计数器计数; 根据播种密度每孔 2 $\times$ 10³ 个细胞, 将细胞悬浮液稀释至所需密度; 每个 96 孔铺 95 μ L 细胞悬液, 37 °C 培养。将化合物配成终浓度 1000 倍的母液; 用培养基稀释化合物, 配成终浓度 20 倍的化合物溶液, 每孔加 5 μ L, 以加入同样体积的 DMSO 的孔作为阴性对照, 培养 72 h。将 96 孔细胞板平衡到室温; 每孔加 Cell Titer-Glo[®] 试剂 40 μ L, 振摇 2 min, 静置 10 min; 用 MD SpectraMax Paradigm 酶标仪检测化学发光信号, 计算 IC₅₀。

2.5 体外抗炎活性评价

2.5.1 ELISA 法检测细胞培养液中促炎因子 IL-6 的含量 取处于对数生长期的第 3~5 代 RAW264.7 细胞, 制成单细胞悬液, 用血球计数板进行计数。使 24 孔板中每孔培养基 2 mL, 细胞数为 2.5 $\times$ 10⁴ 个。种板后培养过夜 (8~12 h), 细胞完全贴壁。次日施药, 设置空白对照组、模型组与给药组, 每组设置 3 个复孔。给药组的化合物 **I-3** 终浓度为 1, 2, 4, 8 μ mol/L, 模型组与给药组均加入 LPS 共孵育 24 h, LPS 终浓度为 1 μ g/mL。取细胞培养液, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上层清液, ELISA 法检测化合物 **I-3** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 IL-6 含量表达的影响。

2.5.2 qPCR 法检测 RAW264.7 细胞 IL-6 的 mRNA 表达水平 取处于对数生长期的第 3~5 代 RAW264.7 细胞, 制成单细胞悬液, 种于 6 孔板中, 通过血球计数板计数控制每孔细胞数为 2 $\times$ 10⁵ 个。培养至细胞密度达到 50%~60% 时施药。设置空白对照组、模型组与给药组。给药组的化合物 **I-3** 终浓度为 1, 2, 4, 8 μ mol/L, 孵育 24 h 后, 模型组与给药组加入 LPS (1 μ g/mL) 刺激细胞 6 h, 提取各组细胞 RNA, 检测化合物 **I-3** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 IL-6 的 mRNA 表达水平的影响。

2.6 体内抗炎活性测试

2.6.1 材料实验药品 依鲁替尼和化合物 **I-3**。ICR 雄性小鼠: 18 g~22 g, 由南京市江宁区青龙山动物繁殖中心提供, 合格证号: SCXK (浙) 2019-0002。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2.6.2 方法 ICR 雄性小鼠, 体重 18~22 g, 在中国药科大学药理学动物实验中心适应性饲养 3 d, 自由食水。按照随机数字法分组, 模型组和各受试药组每组各 8 只。阳性药依鲁替尼给药剂量 10 mg/kg, 化合物 **I-3** 给药剂量分别为 5、10 和 20 mg/kg。化合物用 10%DMSO 溶解, 加入 30%PEG 涡旋至澄清, 最后加入 60% 生理盐水, 所有药物均现配现用, 腹腔注射给药。给药 30 min 后在小鼠右耳前后两面均匀涂抹二甲苯 25 μ L, 30 min 后处死小鼠, 沿耳廓基线剪下双耳, 用打孔器分别在两耳同一位置打孔, 称重。肿胀率(%)=(右耳重量-左耳重量)/左耳重量 $\times$ 100; 肿胀抑制率(%)=(模型组肿胀率-受试组肿胀率)/模型组肿胀率 $\times$ 100。

3 生物活性实验结果与讨论

为了研究目标化合物对 BTK 和 JAK3 的抑制活性, 本研究测试了化合物 **I-1**~**I-12** 的酶抑制活性。实验结果见表 1。

Table 1 Enzyme inhibition of **I-1**–**I-12** against BTK and JAK3

Compd.	IC ₅₀ /(nmol/L)		Compd.	IC ₅₀ /(nmol/L)	
	BTK	JAK3		BTK	JAK3
I-1	0.3	22.5	I-9	2.2	22.2
I-2	<0.1	99.2	I-10	(98.3%)	(66.5%)
I-3	1.6	16.2	I-11	(96.9%)	(17.1%)
I-4	0.2	25.8	I-12	(94.8%)	(17.9%)
I-5	1.5	69.6	XL-12	2.0	14.0
I-6	25.9	1131	Staurosporine	NT	0.12
I-7	(93.8%)	(50.6%)	Ibrutinib	0.29	NT
I-8	(99.0%)	(42.0%)			

NT: no test; Figures in brackets are inhibition rate at 100 nmol/L

根据前期研究中^[16]总结的构效关系以及该类分子在 BTK 和 JAK3 中的相互作用模式, 末端苯环的改造有利于活性的提高。因此, 为了进一步探索苯环上不同取代基对活性的影响, 将 **XL-12** 结构中 *N,N*-二甲氨基结构去单甲基化以及去双甲基化, 设计并合成了化合物 **I-1**~**I-2**。结果发现, 去一个甲基化的化合物 **I-1** 保留了两个靶点的抑制活性, 而氨基取代的化合物 **I-2** 对 JAK3 的抑制活性大幅下

降。本研究模拟 **XL-12** 中的 *N,N*-二甲氨基结构, 将其替换为吡咯-1-基、哌啶-1-基、吗啉-1-基和吡咯-1-甲基, 设计合成了化合物 **I-3**~**I-6**, 其中吡咯取代的化合物 **I-3** 对 BTK 和 JAK3 的抑制活性均稍有提高(BTK IC₅₀ = 1.6 nmol/L; JAK3 IC₅₀ = 16.2 nmol/L); 哌啶取代的化合物 **I-4** 基本保留了 JAK3 的抑制活性(IC₅₀ = 25.8 nmol/L), 但对 BTK 的抑制活性(IC₅₀ = 0.2 nmol/L)进一步提高; 吗啉取代的化合物 **I-5** 保留了对 BTK 抑制活性(IC₅₀ = 1.5 nmol/L), 但对 JAK3 的抑制活性(IC₅₀ = 69.6 nmol/L)下降。化合物 **I-6** 对 JAK3 的抑制活性基本丧失, 可能是由于苯环末端取代基的体积过大, 导致化合物不能很好地与 JAK3 蛋白结合。

本研究探索了不同芳香环对化合物活性的影响, 将苯环替换为吡啶环和异喹啉环, 设计并合成了化合物 **I-7**~**I-9**。酶抑制活性筛选显示, 当用 5-氟-吡啶-2-基(**I-7**)和 6-甲氧基吡啶-3-基(**I-8**)取代时, 化合物对 JAK3 的抑制活性均有不同程度的下降。而用异喹啉-1-基取代的化合物(**I-9**)则显示出较好的 JAK3 抑制活性。本研究进一步探索了当苯环进行双取代时对化合物活性的影响, 设计并合成了化合物 **I-10**~**I-12**。酶抑制活性筛选结果显示, 苯环上存在两个取代基时, 能够保持对 BTK 的抑制活性, 但是却显著降低了对 JAK3 的抑制活性。

根据酶抑制活性测定结果显示, 选择了对两个靶点抑制活性均较好的化合物 **I-1** 和 **I-3**, 测试了它们对 Daudi 细胞和 BaF3-JAK3 细胞的增殖抑制活性, 实验结果如图所示。化合物 **I-3** 对 Daudi 细胞和 BaF3-JAK3 细胞都显示出了中等的增殖抑制活性(表 2)。

根据细胞水平的活性测定结果, 本研究选取了化合物 **I-3**, 分别采用 ELISA 法和 qPCR 法检测了

Table 2 Effect of compound **I-1** and **I-3** against Daudi and BaF3-JAK3 cell

Compd.	IC ₅₀ /(μ mol/L)	
	Daudi	BaF3-JAK3
I-1	3.91	2.65
I-3	1.43	0.93
XL-12	0.69	0.37
Paclitaxel	0.0057	NT
Tofacitinib	NT	0.65

NT: no test

I-3 对 LPS 刺激后的 RAW264.7 细胞释放的促炎因子 IL-6 的浓度以及 mRNA 表达水平的影响, 实验结果(图 7)显示, 与空白对照组相比, LPS(1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后, 培养液中 IL-6 的浓度以及 mRNA 表达水平极显著高于空白对照组

($P<0.01$), 表明了细胞受到刺激后出现明显的炎症反应; 与单独孵育 LPS 的模型组相比, **I-3** 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放炎症因子 IL-6 表现出显著的抑制作用, 并能有效抑制 IL-6 的 mRNA 的表达, 呈现一定的剂量依赖性。

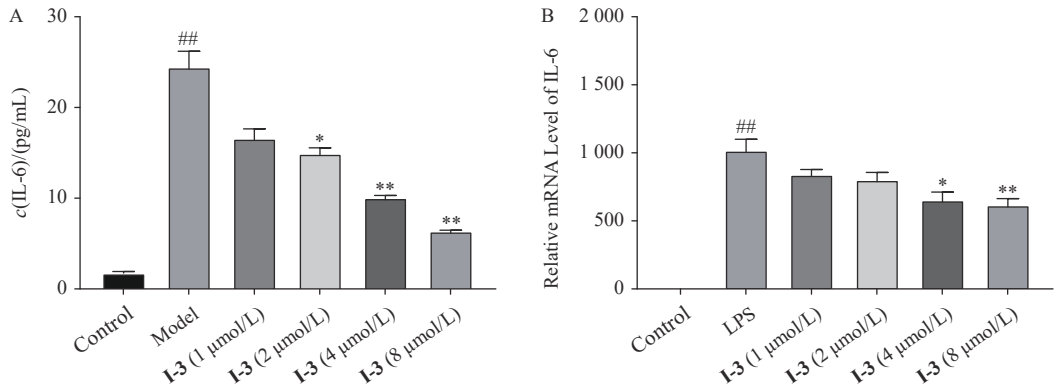


Figure 7 Compound I-3 inhibited the productions and mRNA levels of cytokines IL-6 in RAW264.7 cell treated with LPS($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
A: Intracellular concentrations of IL-6; B: mRNA transcription levels of IL-6
$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group

根据酶活性和细胞活性数据测定结果, 本研究选择化合物 **I-3** 进行初步抗炎活性评价。用小鼠耳廓肿胀率及肿胀抑制率为指标对药物进行评价, 实验结果见表 3。

Table 3 Effect of compound **I-3** on mouse ear swelling

Group	Dose/(mg/kg)	Swelling rate /%	Swelling inhibition rate/%
Model	-	145.98	-
Ibrutinib	10	98.19	32.74
I-3	5	107.18	26.58
I-3	10	77.16*	47.15
I-3	20	72.51*	50.33

* $P<0.05$ vs model group

结果显示, 化合物 **I-3** 对二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀表现出一定的抑制活性。与模型组相比, 化合物 **I-3** 表现出明显的抗炎活性。中剂量(10 mg/kg)和高剂量(20 mg/kg)的肿胀率与模型组相比有显著性差异, 且抗炎活性优于阳性药依鲁替尼(ibrutinib)。

4 总结与展望

类风湿性关节炎发病机制复杂, 其发生与发展与多种信号通路和细胞因子密切相关, 单独抑制其中一条信号通路往往不能达到理想的治疗效果。BTK 和 JAK3 都与 RA 的发生发展密切相关, 而且两者都能调节下游 STAT5 的磷酸化, 进而调节炎

症因子的产生。因此, 开发 BTK/JAK3 双靶点抑制剂有望发挥协同作用, 增强对 RA 的疗效。

本研究以课题组前期研究获得的 BTK/JAK3 双靶点化合物 **XL-12** 为先导化合物, 进一步探索其构效关系, 共设计合成了 12 个目标化合物。通过体外酶抑制活性评价和细胞增殖抑制活性测定。选取化合物 **I-3** 进行抗炎活性评价。结果显示, 化合物 **I-3** 能有效抑制 RAW264.7 细胞中 IL-6 的释放及表达。此外, 化合物 **I-3** 在小鼠二甲苯致耳廓肿胀模型中显示出一定的抗炎活性, 且优于阳性药 Ibrutinib。本研究为进一步开发抑制活性强和抗炎活性较优的 BTK/JAK3 双靶点抑制剂提供了实验依据。

References

[1] Karami J, Aslani S, Jamshidi A, *et al.* Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review[J]. *Gene*, 2019, **702**: 8-16.

[2] Kean WF, Buchanan WW. The use of NSAIDs in rheumatic disorders 2005: a global perspective[J]. *Inflammopharmacology*, 2005, **13**(4): 343-370.

[3] Moreland LW, O'dell JR. Glucocorticoids and rheumatoid arthritis: back to the future[J]? *Arthritis Rheum*, 2002, **46**(10): 2553-2563.

[4] Goodman SM. Rheumatoid arthritis: perioperative management

- of biologics and DMARDs[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2015, 44(6): 627-632.
- [5] Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, *et al*. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly[J]. *Aging Dis*, 2018, 9(1): 143-150.
- [6] Kirwan JR, Gunasekera W. Is there a renaissance of glucocorticoids in rheumatoid arthritis[J]? *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(4): 574-577.
- [7] Ding Q, Hu W, Wang R, *et al*. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 68.
- [8] Chen CJ, Lu DX, Sun T, *et al*. JAK3 inhibitors for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases: a patent review (2016-present)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2022, 32(3): 225-242.
- [9] Miyazaki Y, Nakano K, Nakayamada S, *et al*. Efficacy and safety of tofacitinib versus baricitinib in patients with rheumatoid arthritis in real clinical practice: analyses with propensity score-based inverse probability of treatment weighting[J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(9): 1130-1136.
- [10] Lai KS, Jin Y, Graham DK, *et al*. A kinase-deficient splice variant of the human JAK3 is expressed in hematopoietic and epithelial cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(42): 25028-25036.
- [11] Smith CI, Islam TC, Mattsson PT, *et al*. The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species[J]. *Bioessays*, 2001, 23(5): 436-446.
- [12] Good L, Benner B, Carson WE. Bruton's tyrosine kinase: an emerging targeted therapy in myeloid cells within the tumor microenvironment[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(9): 2439-2451.
- [13] Bond DA, Woyach JA. Targeting BTK in CLL: beyond ibrutinib[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, 14(3): 197-205.
- [14] Fleischmann R, Friedman A, Drescher E, *et al*. Safety and efficacy of elsubrutinib or upadacitinib alone or in combination (ABBV-599) in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response or intolerance to biological therapies: a multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet Rheumatol*, 2022, 4(6): e395-e406.
- [15] Coffey G, Betz A, DeGuzman F, *et al*. The novel kinase inhibitor PRT062070 (Cerdulatinib) demonstrates efficacy in models of autoimmunity and B-cell cancer[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351(3): 538-548.
- [16] Liang TT, Cen LF, Wang JJ, *et al*. Discovery of novel dual Bruton's tyrosine kinase (BTK) and Janus kinase 3 (JAK3) inhibitors as a promising strategy for rheumatoid arthritis[J]. *Bioorg Med Chem*, 2023, 96: 117354.



[专家介绍] 徐云根, 教授, 博士生导师, 中国药科大学江苏省药物设计与成药性优化重点实验室副主任, 江苏省第六届十大杰出专利发明人, 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人。兼任中国药学会药物化学专业委员会委员, 全国卫生产业企业管理协会精准医疗分会理事, 江苏省药学会药物化学专业委员会副主任委员。主要从事靶向和免疫治疗药物的设计、合成和结构优化研究。先后主持完成国家“重大新药创制”科技重大专项、国家自然科学基金等国家级科研项目 10 余项; 主持成果转化项目 3 项。获得国内外授权发明专利 70 余件, 多项专利技术与产品已实施产业化。发表 SCI 论文 150 余篇。获得安徽省科学技术奖二等奖 1 项、江苏省教育教学与研究成果一等奖 1 项。担任《中国药科大学学报》《中国药物化学杂志》《中国现代应用药学》等期刊编委。主编或参编教材和专著 9 本。