

· 论 文 ·

4-苯基-吡咯并[2,3-d]嘧啶类 JAK2 激酶抑制剂的设计、合成和抗肿瘤活性

刘晓飞, 王庭芳, 鞠曹云, 张 灿*

(江苏省代谢性疾病重点实验室, 中国药科大学新药研究中心, 南京 210009)

摘要 以 JAK2 激酶抑制剂鲁索替尼(ruxolitinib)为先导化合物, 应用分子杂交的药物设计原理, 通过结构修饰改造, 设计、合成了一系列新的4-苯基-吡咯并[2,3-d]嘧啶类衍生物并进行初步的体外活性评价。以4,6-二羟基嘧啶为起始原料, 依次通过 Vilsmeier-Haack 反应、 S_NAr 取代、成环、脱水、Suzuki 偶联、酰基化等多步反应最终合成得到12个目标化合物(**12a~12l**), 其结构经 1H NMR、 ^{13}C NMR、HRMS 确证。对目标化合物进行体外 JAK2 激酶活性、GM-CSF 诱导的 TF-1 细胞活性测试, 结果表明, 部分化合物(**12b**、**12e** 和 **12h**)具有一定程度的 JAK2 抑制活性; 采用 MTT 法测试目标化合物对 JAK2 非依赖性 A549 细胞的抗增殖能力, 结果显示, 该类化合物 A549 细胞表现出良好的增殖抑制活性, 尤其是化合物 **12c** ($IC_{50} = 0.12 \mu\text{mol/L}$) 活性最强, 表明该类化合物具有潜在的研究开发价值。

关键词 骨髓增殖性肿瘤; JAK2 抑制剂; 吡咯并[2,3-d]嘧啶类; 合成

中图分类号 R914.5; R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)02-0150-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170204

引用本文 刘晓飞, 王庭芳, 鞠曹云, 等. 4-苯基-吡咯并[2,3-d]嘧啶类 JAK2 激酶抑制剂的设计、合成和抗肿瘤活性[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2): 150-156.

Cite this article as: LIU Xiaofei, WANG Tingfang, JU Caoyun, et al. Synthesis and JAK2 inhibitory activities of 4-phenyl-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(2): 150-156.

Synthesis and JAK2 inhibitory activities of 4-phenyl-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives

LIU Xiaofei, WANG Tingfang, JU Caoyun, ZHANG Can*

Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A series of 4-phenyl-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives were synthesized through modifying the structure of the lead compound ruxolitinib by molecular hybridization strategy. It was synthesized from pyrimidine-4,6-diol by Vilsmeier-Haack reaction, S_NAr reaction, cyclized, dehydrated, Suzuki coupling and finally acylated to give 12 new compounds(**12a-12l**). All structures of the synthesized compounds were confirmed by 1H NMR, ^{13}C NMR, and HRMS analysis. The biological activities were evaluated *in vitro*. Their JAK2 inhibitory activities were studied using JAK2 enzymatic and TF1-GMCSF cellular assays. The results indicated that compounds **12b**, **12e** and **12h** showed moderate activity. The anti-tumor activities were studied against JAK2-independent A549 cell line by the MTT assay. Results showed that the title compounds exhibited potent antiproliferative effect on A549, especially compound **12c** ($IC_{50} = 0.12 \mu\text{mol/L}$), suggesting that this series compounds might be promising anti-tumor agents for further investigation.

Key words myeloproliferative neoplasms (MPNs); JAK2 inhibitors; pyrrolo[2,3-d]pyrimidine; synthesis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81503003)

JAK2激酶是一种非受体型酪氨酸蛋白激酶,介导多种与造血相关的细胞因子的信号传导,与造血系统的发育及一些血液系统疾病的发生密切相关^[1]。近年来JAK2 V617F突变的发现吸引了越来越多的研究者对JAK2的关注,JAK2 V617F突变位于JAK2激酶的JH2假激酶区,造成JAK2激酶的持续活化和超敏化^[2]。文献报道JAK2 V617F突变在大多数骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPNs)患者中如真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)、原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)和原发性骨髓纤维化(primary myelofibrosis, PMF)等普遍存在(50%~97%),这一发现使JAK2成为MPNs疾病治疗的重要靶点^[3-5]。

目前JAK1/2抑制剂鲁索替尼(ruxolitinib)(1)已被FDA批准为用于骨髓纤维化(myelofibrosis, MF)患者的治疗,并有多个JAK2抑制剂处于临床研究中^[6]。这些抑制剂能明显改善患者的脾脏大小和全身症状。然而,这些抑制剂仅限用于中、高危的MPNs患者,同时由于对JAKs家族其他激酶的抑制会导致血小板减少、贫血及免疫抑制等副作用^[7]。因此寻找高效且低毒的JAK2抑制剂成为当前研究的重点。

Schenkel等^[8]通过高通量筛选(high-throughput screening, HTS)发现噻吩并吡啶类先导物,围绕该类化合物上可与JAK相互作用的苯环和酰胺两个基团进行结构改造,得到了一系列高选择性JAK2抑制剂,其中化合物2显现出高活性和良好

的药代动力学性质。因此,本课题采用分子杂交(molecular hybridization)的药物设计原理保留ruxolitinib(1)结构中吡咯并嘧啶结构片段,选取高选择性JAK2抑制剂2的结构片段,将吡咯并嘧啶骨架和化合物2侧链有机融合,设计合成出一系列新的4-苯基-吡咯并[2,3-d]嘧啶类JAK2抑制剂。

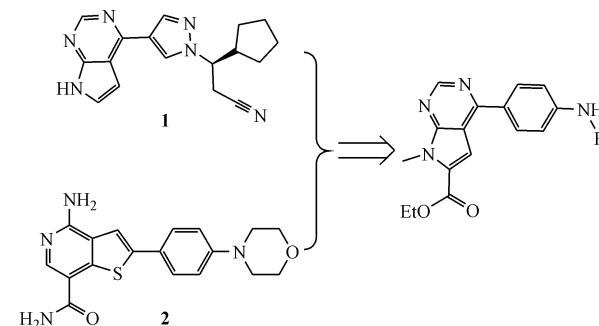
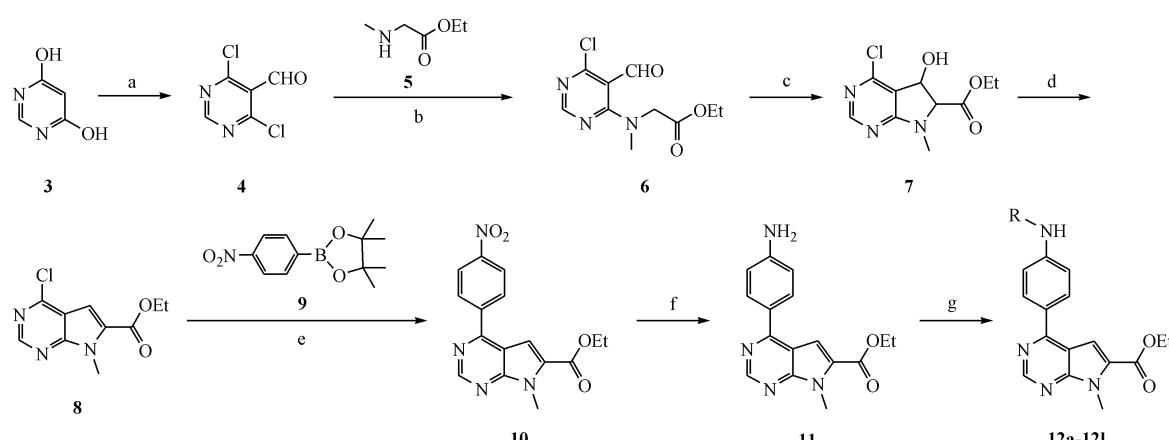


Figure 1 Design strategy for pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-phenylamide derivatives

1 合成路线

目标化合物的合成见路线1。以4,6-二羟基嘧啶(3)为起始原料,经Vilsmeier-Haack反应得到中间体4,6-二氯-5-嘧啶甲醛(4),在三乙胺条件下中间体4与肌氨酸乙酯(5)在碱性条件下进行S_NAr取代反应得到中间体6,中间体6在碱性条件下成环得到中间体7,中间体7在二氯亚砜的作用下脱去一分子水得到中间体8,8与对硝基苯硼酸频哪醇酯9在Pd(PPh₃)₄和Cs₂CO₃催化下经Suzuki偶联反应得到关键中间体10,化合物10经氢化还原、缩合得到目标化合物12a~12l。



Scheme 1 Synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives 12a-12l

Reagents and conditions: (a) POCl₃, DMF, 80 °C, 94.0%; (b) triethylamine, CH₃CN, 84.3%; (c) triethylamine, CH₃CN, reflux, 91.9%; (d) pyridine, SOCl₂, CH₂Cl₂, 92.7%; (e) Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, 90 °C, DME, 90.2%; (f) H₂, 10% Pd/C, EA, 1 h, 99.7%; (g) Et₃N, CH₂Cl₂/EDCI, HOBr, DIPEA, CH₂Cl₂, 65.1%~94.5%

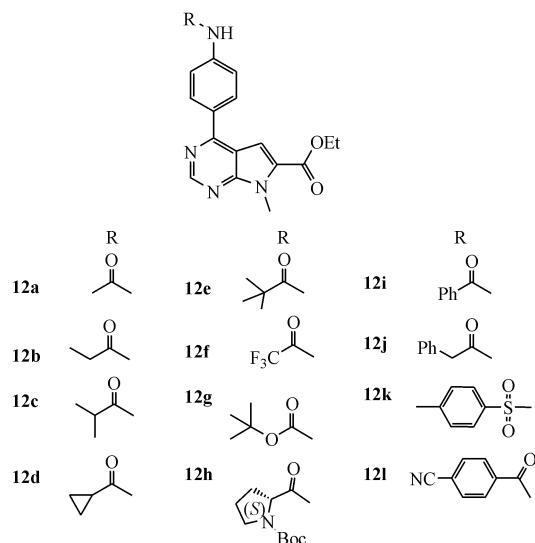


Figure 2 Structures of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives 12a-12l

2 实验部分

2.1 材料

RY-1 熔点仪(天津市分析仪器厂); Bruker AV-300 核磁共振仪(TMS 为内标); MAT95XP 型高分辨质谱仪(美国 Thermo 公司); 酶标仪(瑞士 Tecan Infinite M1000 Pro 多功能酶标仪); SW-CJ-IFD 型超净工作台(苏净集团安泰公司)。

Z'-LYTE™ Kit-Tyr 06 Peptide 试剂盒(Catalog No. PV4316, 美国 Invitrogen 公司); 384 孔黑板(25 cm², Corning Part#3676, 美国 Corning Costar 公司); JAK2 激酶(Catalog No. PV4210, 美国 Invitrogen 公司); 人血液白血病细胞株 TF-1、A549 细胞株(中国科学院上海细胞库); FBS、0.25% 胰蛋白酶、青霉素 + 链霉素双抗(美国 Gibco 公司); 非必需氨基酸(美国 Thermo 公司); Anti-human/Mouse phosphor-STAT5(Y694) PE(美国 Bioscience 公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司); 二甲亚砜(DMSO, 上海凌峰化学试剂有限公司); 托法替尼(自制, 纯度大于 99%); 所用化学试剂均为市售分析纯产品。

2.2 化合物的合成与表征

4,6-二氯嘧啶-5-醛(4) 取 POCl₃(91.4 mL, 1.12 mol)加入 250 mL 三颈烧瓶中剧烈搅拌并降温至-10 ℃, 用恒压滴液漏斗缓慢滴加 DMF(30 mL, 0.446 mmol), 30 min 之内滴加完毕, 反应体系形成白色凝胶状固体。加入 4,6-二羟基嘧啶(3)(25 g,

0.223 mol), 混合均匀, 体系缓慢升温至室温, 待其白色固体溶解后缓慢升温至 70 ℃ 反应 24 h。反应结束后降温至室温, 将反应液倾入冰水 1 000 mL 中, 搅拌 30 min 后用乙酸乙酯萃取(600 mL × 3), 合并有机层, 饱和食盐水 600 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得粗品。经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 10:1)纯化, 得白色固体(37.1 g, 94.0%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 10.48(1H, s, CHO), 8.91(1H, s, pyrimidine-H)。

N-(6-氯-5-甲酰基嘧啶-4-基)-N-甲基甘氨酸乙酯(6) 将化合物 4(37.1 g, 209.62 mmol) 溶解于乙腈 300 mL 中, 依次加入三乙胺(31.8 g, 314.44 mmol)、肌氨酸乙酯(5)(24.5 g, 209.62 mmol), 室温搅拌反应 3 h。反应结束后蒸除溶剂, 加入乙酸乙酯萃取(300 mL × 2), 合并有机层, 饱和食盐水 300 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得粗品。经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 4:1)纯化, 得淡黄色固体(48.5 g, 89.8%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 10.43(1H, s, CHO), 8.36(1H, s, pyrimidine-H), 4.35(2H, s, N-CH₂-CO), 4.24(2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 3.01(3H, s, N-CH₃), 1.30(3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂)。

4-氯-5-羟基-7-甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(7) 将化合物 6(48.5 g, 188.22 mmol) 溶解于乙腈 500 mL 中, 加入三乙胺(28.6 g, 282.33 mmol), 升温至 82 ℃ 回流反应 12 h。反应结束后冷却至室温, 蒸除溶剂, 加入乙酸乙酯萃取(500 mL × 2), 合并有机层, 饱和食盐水 500 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得黄色固体(47.9 g, 98.8%), 不经处理直接投入下一步反应。

4-氯-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(8) 将化合物 7(47.9 g, 149.81 mmol) 溶解于乙腈 500 mL 中, 依次加入氯化亚砜(35.6 g, 299.61 mmol)、吡啶(23.7 g, 299.61 mmol), 室温搅拌反应 12 h。反应结束后减压蒸除溶剂, 加入乙酸乙酯萃取(500 mL × 2), 合并有机层, 饱和食盐水 500 mL 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得粗品, 经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 4:1)纯化, 得白色固体(41.2 g, 91.2%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.73(1H, s, pyrimidine-H), 7.33(1H, s, pyr-H), 4.42(2H, q, J = 7.2 Hz, CH₂-

CH_3), 4.14 (3H, s, N-CH₃), 1.43 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH₃-CH₂)。

7-甲基-4-(4-硝基苯)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(10) 将化合物**8**(41.2 g, 171.91 mmol)溶解于乙二醇二甲醚(DME)500 mL中,依次加入对硝基苯硼酸频哪醇酯(**9**) (42.82 g, 171.91 mmol)、碳酸钾(35.64 g, 257.87 mmol)、氟化铯(0.41 g, 2.70 mmol)、四三苯基磷钯(0.41 g, 0.36 mmol),氮气保护,升温至90 °C回流反应24 h。反应结束后冷却至室温,蒸除溶剂,加入二氯甲烷溶解(500 mL),抽滤,收集滤液,减压浓缩得粗品。经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,4:1)纯化,得黄色固体(50.9 g, 90.7%):¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 8.55 (1H, s, pyrimidine-H), 8.37 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.46 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.44 (1H, s, pyr-H), 4.45 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.19 (3H, s, N-CH₃), 1.46 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂)。

4-(4-氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(11) 将化合物**10**(50.9 g, 155.99 mmol)溶解于乙酸乙酯500 mL中,加入钯碳催化剂(10%, 5 g),反应体系通入足量氢气,室温搅拌4 h。反应结束后抽滤除钯碳,滤液减压浓缩得到黄色固体(46.0 g, 99.5%),不经处理直接投入下一步反应。

4-(4-乙酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12a) 将化合物**11**(150.0 mg, 506.19 μmol)溶解于二氯甲烷20 mL中,依次加入乙酸酐(103.3 mg, 1.01 mmol)、三乙胺(76.8 mg, 759.29 μmol),室温搅拌过夜。反应结束后,减压蒸除溶剂,经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,2:1)纯化,得白色固体(140.0 mg, 81.7%):mp 172 ~ 174 °C; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ : 8.41 (1H, s, pyrimidine-H), 7.50 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.41 (1H, s, pyr-H), 7.08 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 4.31 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.04 (3H, s, N-CH₃), 2.09 (3H, s, CO-CH₃), 1.32 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂);¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.8, 163.5, 160.7, 153.8, 152.9, 148.1, 135.1, 127.5, 114.1, 106.3, 104.2, 60.6, 30.6, 29.2, 24.0, 13.8; HRMS for C₁₈H₁₈N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 339.141 2; Found 339.145 5。

4-(4-丙酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12b) 制备方法同化合物**12a**,将乙酸酐换成丙酸酐,得到白色固体(148.8 mg, 83.4%):mp 182 ~ 184 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.04 (1H, s, pyrimidine-H), 8.14 (2H, d, J = 7.7 Hz, Ar-H), 7.77 (2H, d, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.58 (1H, s, pyr-H), 4.44 (2H, q, J = 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 4.19 (3H, s, N-CH₃), 2.47 (2H, q, J = 7.5 Hz, CO-CH₂), 1.45 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH₃-CH₂), 1.29 (3H, t, J = 7.8 Hz);¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.8, 160.6, 158.6, 153.3, 152.8, 140.2, 129.6, 122.6, 119.3, 113.3, 108.1, 60.9, 30.3, 29.2, 13.8, 9.1; HRMS for C₁₉H₂₀N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 353.156 9; Found 353.160 7。

4-(4-异丁酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12c) 制备方法同化合物**12a**,将乙酸酐换成异丁酸酐,得白色固体(139.5 mg, 75.2%):mp 188 ~ 191 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.04 (1H, s, pyrimidine-H), 8.15 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.80 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.58 (1H, s, pyr-H), 4.45 (2H, q, J = 5.4 Hz, CH₂-CH₃), 4.20 (3H, s, N-CH₃), 2.71 ~ 2.60 (1H, m, J = 5.2 Hz, CH), 1.46 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH₃-CH₂), 1.31 (6H, d, J = 6.8 Hz, CH₃);¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 179.7, 161.7, 160.8, 153.1, 152.9, 140.0, 129.6, 121.8, 120.6, 119.3, 108.0, 60.8, 36.4, 30.2, 19.1, 13.8; HRMS for C₂₀H₂₂N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 367.172 5; Found 367.175 9。

4-(4-环丙甲酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12d) 将化合物**11**(100.0 mg, 337.46 μmol)溶解于四氢呋喃20 mL中,冰浴下缓慢滴加环丙甲酰氯(35.3 mg, 337.46 μmol),室温搅拌1 h。反应结束后,减压蒸除溶剂,经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯,2:1)纯化,得白色固体(79.6 mg, 64.8%):mp 183 ~ 184 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.02 (1H, s, pyrimidine-H), 8.12 (2H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.75 (2H, d, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.56 (1H, s, pyr-H), 4.43 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.18 (3H, s, N-CH₃), 1.44 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂), 1.26 ~ 1.15 (1H, m, cyclopropyl-CH), 1.14 ~ 1.12 (2H, m, cyclopropyl-CH₂), 0.90 ~ 0.88 (2H, m, cyclopropyl-CH₂);¹³C NMR (75

MHz, CDCl₃) δ : 172.3, 161.2, 159.3, 153.5, 152.6, 140.5, 130.0, 122.3, 119.8, 117.3, 108.5, 61.4, 30.8, 14.3, 13.8, 9.6; HRMS for C₂₀H₂₀N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 365.1569; Found 365.1621。

4-(4-特戊酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12e) 制备方法同化合物12d, 将环丙甲酰氯换成特戊酰氯, 得白色固体(111.7 mg, 87.0%): mp 176 ~ 178 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.51 (1H, s, pyrimidine-H), 7.65 (2H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.37 (1H, s, pyr-H), 7.20 (2H, d, J = 8.5 Hz, Ar-H), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.15 (3H, s, N-CH₃), 1.42 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂), 1.33 (9H, s, CCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 176.1, 163.5, 160.7, 152.9, 148.0, 135.3, 127.4, 121.7, 120.8, 106.3, 60.6, 39.1, 30.6, 27.1, 13.8; HRMS for C₂₁H₂₄N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 381.1882; Found 381.1926。

4-(4-三氟乙酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12f) 制备方法同化合物12d, 将环丙甲酰氯换成三氟乙酰氯, 得白色固体(99.4 mg, 75.1%): mp 200 ~ 204 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.52 (1H, s, pyrimidine-H), 7.67 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.40 (1H, s, pyr-H), 7.28 (2H, d, J = 9.8 Hz, Ar-H), 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.16 (3H, s, N-CH₃), 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 163.3, 160.7, 154.0, 152.8, 149.8, 132.3, 127.8, 122.3, 121.5, 115.6, 106.2, 60.7, 30.7, 13.9; HRMS for C₁₈H₁₅F₃N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 393.1130; Found 393.1107。

4-(4-叔丁基氧羰基氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12g) 制备方法同化合物12a, 将乙酸酐换成二碳酸二叔丁酯, 得白色固体(104.8 mg, 52.2%): mp 146 ~ 148 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.53 (1H, s, pyrimidine-H), 7.46 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.36 (1H, s, pyr-H), 7.17 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.16 (3H, s, N-CH₃), 1.54 (9H, s, CCH₃), 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 163.7, 160.8, 153.8, 153.0, 152.2, 147.3, 135.7, 127.4, 121.8, 119.4, 106.4,

80.2, 60.7, 30.6, 27.9, 13.9; HRMS for C₂₁H₂₄N₄O₄ [M + H]⁺: Calcd. 397.1831; Found 397.1868。

4-(4-苯甲酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12h) 制备方法同化合物12e, 将环丙甲酰氯换成苯甲酰氯, 得白色固体(172.3 mg, 85.0%): mp 210 ~ 212 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.53 (1H, s, pyrimidine-H), 7.88 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.76 (2H, d, J = 7.7 Hz, Ar-H), 7.38 (1H, s, pyr-H), 7.24-7.57 (5H, m, Ph-H), 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.15 (3H, s, N-CH₃), 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 165.2, 163.5, 153.8, 152.9, 148.4, 135.2, 134.4, 131.4, 128.3, 127.5, 126.6, 121.9, 121.0, 106.3, 60.6, 30.6, 13.8; HRMS for C₂₃H₂₀N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 401.1569; Found 401.1596。

4-(4-苯乙酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12i) 制备方法同化合物12e, 将环丙甲酰氯换成苯乙酰氯, 得白色固体(158.5 mg, 75.6%): mp 242 ~ 244 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.50 (1H, s, pyrimidine-H), 7.53 (2H, d, J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.37 ~ 7.32 (5H, m, Ph-H), 7.21 (1H, s, pyr-H), 7.16 (2H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.15 (3H, s, N-CH₃), 3.77 (2H, s, CH₂-Ph), 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 168.5, 163.4, 160.7, 152.8, 148.2, 134.9, 133.9, 129.0, 128.8, 127.5, 127.2, 121.8, 120.5, 106.3, 60.6, 44.4, 30.6, 13.8; HRMS for C₂₄H₂₂N₄O₃ [M + H]⁺: Calcd. 415.1725; Found 415.1709。

4-(4-甲基苯磺酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12j) 制备方法同化合物12e, 将环丙甲酰氯换成4-甲基苯磺酰氯, 得白色固体(99.9 mg, 65.7%): mp 250 ~ 252 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.51 (1H, s, pyrimidine-H), 7.69 (2H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.33 (1H, s, pyr-H), 7.27 (2H, d, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.14-7.03 (4H, m, PhSO₂-H), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.15 (3H, s, N-CH₃), 2.41 (3H, s, PhCH₃-H), 1.42 (3H, t, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 163.1, 152.7, 149.5,

143.5, 135.7, 133.5, 129.2, 127.6, 126.8, 122.9, 122.1, 106.1, 60.7, 30.7, 21.1, 13.8; HRMS for $C_{23}H_{22}N_4O_4S$ [M + H]⁺: Calcd. 451.1395; Found 451.1369。

4-(4-氟基苯甲酰氨基苯)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12k) 制备方法同化合物**12e**, 将环丙甲酰氯换成对氟基苯甲酰氯, 得白色固体(79.0 mg, 55.0%): mp 237 ~ 239 °C; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.51(1H, s, pyrimidine-H), 7.99(2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 7.77 ~ 7.68(4H, m, Ph-H), 7.40(1H, s, pyr-H), 7.27(2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 4.42(2H, q, *J* = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.15(3H, s, N-CH₃), 1.43(3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₃-CH₂); ¹³C NMR(75 MHz, CDCl₃) δ: 163.5, 160.7, 153.8, 152.8, 148.8, 138.3, 134.5, 132.2, 127.4, 122.0, 121.3, 117.4, 115.0, 106.2, 60.7, 30.6, 13.8; HRMS for $C_{23}H_{22}N_4O_4S$ [M + H]⁺: Calcd. 426.1521; Found 426.1549。

(S)-4-(4-(1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-甲酰胺)苯基)-7-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(12l) 将 Boc-PRO-OH(217.9 mg, 1.01 mmol) 溶解于二氯甲烷 20 mL 中, 冰浴下加入 EDCl(193.6 mg, 1.01 mmol)、HOBr(136.5 mg, 1.01 mmol)、DIPEA(130.5 mg, 1.01 mmol), 0 °C 搅拌 30 min, 然后加入化合物**11**(150.0 mg, 506.19 μmol), 升至室温搅拌过夜。反应结束后, 减压蒸除溶剂, 经柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 2:1)纯化, 得白色固体(230.5 mg, 92.3%): mp 136 ~ 138 °C; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 9.00(1H, s), 8.08(2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.74(2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.48(1H, s), 4.44(2H, q, *J* = 7.1 Hz), 4.41 ~ 4.32(1H, m), 4.16(3H, s), 3.45 ~ 3.30(2H, m), 1.95 ~ 1.78(4H, m), 1.51(9H, s), 1.46(3H, t, *J* = 7.1 Hz); ¹³C NMR(75 MHz, CDCl₃) δ: 170.5, 162.3, 159.4, 157.6, 156.4, 153.5, 138.6, 130.0, 129.6, 129.5, 122.2, 120.9, 119.7, 108.5, 81.2, 71.9, 61.3, 47.3, 30.7, 29.6, 28.4, 24.6, 14.3; HRMS for $C_{23}H_{22}N_4O_4S$ [M + H]⁺: Calcd. 494.2359; Found 494.2386。

2.3 体外活性评价

本研究对所合成的目标化合物进行了体外 JAK2 激酶活性测试、GM-CSF 诱导 TF-1 细胞活性和 A549 细胞抗增殖活性测试。托法替尼(tofac-

itinib)是一种强效非选择性 JAK 抑制剂, 其 JAK1 IC₅₀ 为 3.2 nmol/L, JAK2 IC₅₀ 为 4.1 nmol/L, JAK3 IC₅₀ 为 3.6 nmol/L^[9]。研究中选择它作为所合成 JAK2 抑制剂的阳性对照药物以考察化合物对 JAK2 激酶的抑制活性。

2.3.1 JAK2 激酶抑制活性 化合物的 JAK2 激酶活性使用 Invitrogen 公司 Z'-Lyte™ 激酶测试平台检测。具体实验方法参照 Z'-Lyte kit 说明书及相关文献^[10]。结果见表 1。

2.3.2 TF1-GMCSF 细胞活性 本研究对 JAK2 激酶抑制活性 IC₅₀ 小于 0.5 μmol/L 的化合物**12b**、**12e** 和 **12h** 进行了粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)诱导 TF-1 细胞活性测试。TF-1 是 JAK2 依赖性的人血液白血病细胞系, GM-CSF 可诱导激活细胞中 JAK2-STATs 通路, 测试 JAK2 激酶下游 STAT5 蛋白的水平可间接反映化合物对 JAK2 的抑制活性。参照文献^[10]的方法, 以托法替尼作为阳性对照, 实验结果见表 1。

Table 1 IC₅₀ of the target compounds **12a**–**12l** against JAK2 enzyme and TF1-GMCSF cell

Compd.	IC ₅₀ /(μmol/L)	
	JAK2 ^a	TF1-GMCSF
Tofacitinib	0.005	0.095 ± 0.002
12a	0.724	ND ^b
12b	0.368	>20
12c	0.542	ND ^b
12d	0.861	ND ^b
12e	0.257	18.4 ± 1.53
12f	0.849	ND ^b
12g	0.995	ND ^b
12h	0.096	10.5 ± 0.29
12i	>1	ND ^b
12j	>1	ND ^b
12k	>1	ND ^b
12l	>1	ND ^b

^aAssays done in replicates (*n* ≥ 3). Mean values are shown and the standard deviations are <30% of the mean. ^bND; Not determined

激酶活性测试结果显示, 阳性对照托法替尼对 JAK2 有显著抑制作用, 其 IC₅₀ 与文献报道一致。其中有 3 个化合物(**12b**、**12e** 和 **12h**)表现出对 JAK2 激酶具有一定的抑制活性, IC₅₀ 均小于 0.5 μmol/L。化合物**12a**、**12c**、**12d**、**12f** 和 **12g** 表现出微弱的抑制活性, IC₅₀ 在 0.5 ~ 1 μmol/L。化合物**12i** ~ **12l** 抑酶活性最差, IC₅₀ 均大于 1 μmol/L。分析活性化合物的结构可知, 具有较大空间位阻的

叔丁基、Boc-Pro 取代的衍生物活性高于小位阻烷基取代的衍生物,而芳环取代的衍生物活性差。可能较大位阻的基团更有利于与靶点结合,进而增强对激酶的抑制活性。在此基础上选择 IC_{50} 小于 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **12b**、**12e** 和 **12h** 进行进一步的 TF1-GMCSF 细胞活性研究。实验结果表明,化合物 **12e** 和 **12h** 对 TF1-GMCSF 细胞具有一定的抑制活性,进一步证明在 4-苯基对位引入较大位阻的 Boc-Pro 基团,更有利于化合物与 JAK2 激酶的结合。

2.3.3 A549 细胞增殖抑制活性 根据参考文献 [12],本研究选择 JAK2 非依赖性细胞 A549 对目标化合物进行细胞增殖抑制活性测试,采用 MTT 法评价目标化合物对 A549 细胞的增殖抑制能力,以托法替尼为阳性对照,结果见表 2。

实验结果显示,化合物 **12a~12c**、**12e~12h** 和 **12k~12l** 抗增殖能力都比较强,其中化合物 **12c** 和 **12k** 的抑制活性最强, IC_{50} (0.12 和 0.29 $\mu\text{mol/L}$) 与阳性药托法替尼相当。推测该类化合物可能具有其他靶点活性,可作进一步研究。

Table 2 IC_{50} of the target compounds **12a~12l** against A549 cell

Compd.	IC_{50} /($\mu\text{mol/L}$)	Compd.	IC_{50} /($\mu\text{mol/L}$)
Tofacitinib	0.156 \pm 0.026	12g	1.26 \pm 0.38
12a	10.8 \pm 1.5	12h	2.57 \pm 0.21
12b	1.43 \pm 0.61	12i	>20
12c	0.12 \pm 0.014	12j	>20
12d	>20	12k	0.29 \pm 0.042
12e	10.2 \pm 2.4	12l	0.76 \pm 0.28
12f	5.03 \pm 0.28		

3 结果与讨论

本研究合成得到了 12 个新化合物,其结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HRMS 确证。对目标化合物进行体外 JAK2 激酶活性测试、GM-CSF 诱导的 TF-1 细胞活性和 A549 细胞抗增殖活性测试,结果显示部分化合物具有一定 JAK2 抑制活性,同时也表现出良好的 A549 细胞增殖抑制活性。A549 细胞中存在高表达的表皮生长因子受体,该受体与 JAK2 同属蛋白酪氨酸激酶^[13]。目标化合物对 A549 细胞的增殖抑制活性可能归因于化合物对该受体具有一定的抑制作用。其中化合物 **12c** 的

IC_{50} 达到 0.12 $\mu\text{mol/L}$,提示该类化合物可能具有抑制其他肿瘤靶点的活性,具有进一步研究开发成抗肿瘤药物的潜力。

参 考 文 献

- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4):387-397.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(17):1779-1790.
- Ma W, Zhang X, Wang X, et al. MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2011, 20(1):34-39.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders [J]. *Lancet*, 2005, 365(9464):1054-1061.
- James C, Ugo V, Lecouéédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera [J]. *Nature*, 2005, 434(7037):1144-1148.
- Rosenthal A, Mesa RA. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms [J]. *Exp Opin Pharmacother*, 2014, 15(9):1265-1276.
- Santos FP, Verstovsek S. Clinic JAK2 inhibitors: are they the solution [J]? *Clin Lymph Myelom Leuk*, 2011, 11(Suppl 1):s28-36.
- Schenkel LB, Huang X, Cheng A, et al. Discovery of potent and highly selective thienopyridine Janus kinase 2 inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(24):8440-8450.
- Changelian PS, Flanagan ME, Ball DJ, et al. Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor [J]. *Science*, 2003, 302(5646):875-878.
- Ning CQ, Lu C, Hu L, et al. Macrocyclic compounds as anti-cancer agents: design and synthesis of multi-acting inhibitors against HDAC, FLT3 and JAK2 [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 95:104-115.
- Hanan EJ, Van AA, Barrett K, et al. Discovery of potent and selective pyrazolopyrimidine janus kinase 2 inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(22):10090-10107.
- Zimmermann K, Sang X, Mastalerz HA, et al. 9H-Carbazole-1-carboxamides as potent and selective JAK2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(14):2809-2812.
- Zhang C, Lv F, Zhou L, et al. Effect of verapamil on the expression of EGFR and NM23 in A549 human lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1):27-32.