

吡咯并嘧啶类化合物的合成及其抑制 JAK3 激酶活性的研究

支爽^{1,2}, 杨妙³, 商倩⁴, 陶遵威¹, 刘登科^{4*}

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津大学 化工学院, 天津 300072

3. 天津医科大学总医院, 天津 300052

4. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 设计合成吡咯并嘧啶类化合物并研究其抑制 JAK3 激酶的活性。方法 以 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶为原料, 经过取代、氨基脱保护和 N-酰化反应合成两类 (I_a 和 I_b) 吡咯并嘧啶类化合物, 经体外细胞试验测定其对 JAK3 激酶的抑制活性。结果 设计并合成了 8 个新化合物, 结构经 ¹H-NMR 和 HR-MS 确证。初步活性测试结果显示 I_{a-1} 和 I_{b-3} 对 JAK3 的抑制强度与阳性对照药 tofacitinib 相近。结论 目标化合物对 JAK3 依赖的 DAUDI 细胞抑制活性较好, 对非 JAK3 依赖的 BT-20 细胞抑制作用弱。

关键词: JAK3 激酶抑制剂; 吡咯并嘧啶; 合成

中图分类号: R914; R973

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2017)04-0557-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.04.002

Synthesis of pyrrolopyrimidines and their JAK3 inhibitory activities

ZHI Shuang^{1,2}, YANG Miao³, SHANG Qian⁴, TAO Zun-wei¹, LIU Deng-ke⁴

1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3. General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

4. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To design and synthesize pyrrolopyrimidines and study their JAK3 inhibitory activities. **Methods** The two kinds of pyrrolopyrimidines (I_a and I_b) were synthesized from 4-chloro-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine via substitution reaction, amino deprotection, and N-acetylation reaction. Their JAK3 inhibitory activities were tested by *in vitro* cell assay. **Results** Eight novel compounds were synthesized and their structures were confirmed by ¹H-NMR and HR-MS. The *in vitro* activity experiments showed that compounds I_{a-1} and I_{b-3} had good inhibition against JAK3, and it was near to control drug tofacitinib. **Conclusion** Target compounds had good inhibition on JAK3-dependent DAUDI cells, and rarely inhibition on non-JAK3-dependent BT-20 cells.

Key words: JAK3 inhibitor; pyrrolopyrimidine; synthesis

JAK3 特异性分布于骨髓细胞和淋巴细胞中, 通过 JAK3-STAT 途径将细胞外信号传导入细胞核, 调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡以及免疫调节等生理过程。选择性地抑制 JAK3 可以抑制器官移植产生的排异反应和自身免疫疾病, 同时避免其他组织、器官受损。

tofacitinib 作为第 1 个口服 JAK3 激酶抑制剂于 2012 年上市, 结构见图 1, 用于治疗类风湿性关节

炎的药物, 但后续研究显示: 该药对 JAK3 的选择性并不高, 对 JAK1、JAK2、JAK3 和 Tyk2 的 IC₅₀ 分别为 3.2、4.1、1.6、34.0 nmol/L^[2-3], 更像是一个广泛 JAK 激酶抑制剂。通过分析 tofacitinib 与 JAK 家族 4 个激酶的共晶结构^[4-5]发现: (1) 吡咯并嘧啶的氮原子与 JAK 活性位点的氨基酸残基形成较强的氢键, 对其活性空腔有强识别作用; (2) 两个手性中心的存在并没有显著提高化合物对 JAK3 的选

收稿日期: 2016-12-20

作者简介: 支爽 (1986—), 女, 河北辛集人, 主要从事化学药物的开发及工艺研究。E-mail: zhishuang0110@126.com

*通信作者 刘登科, 研究员。E-mail: liudk@tjipr.com

择性。所以,本文在保留吡咯并嘧啶母核的基础上,根据先导化合物优化原则中非手性改造原则^[6],将 tofacitinib 中的(4*R*)-CH₃和(3*R*)-NCH₃基团末端环合为哌啶环,分别得到 I_{a-1}和 I_{a-2}。

另外,从 tofacitinib 与 JAK3 共晶结构模型^[4]可知:哌啶所处的疏水区和氰乙酰氨基所处的甘氨酸富集区都仍有很大的修饰空间。所以本文根据空间匹配原则设计了含取代哌嗪的吡咯并嘧啶类化合物,使用 Schrödinger 软件对该系列化合物虚拟筛

选,根据打分函数的分析结果,筛选出 I_{b-1}~I_{b-6}。目标化合物的合成路线见图2。

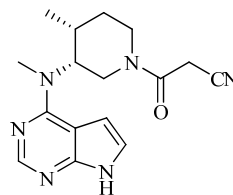


图1 tofacitinib 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of tofacitinib

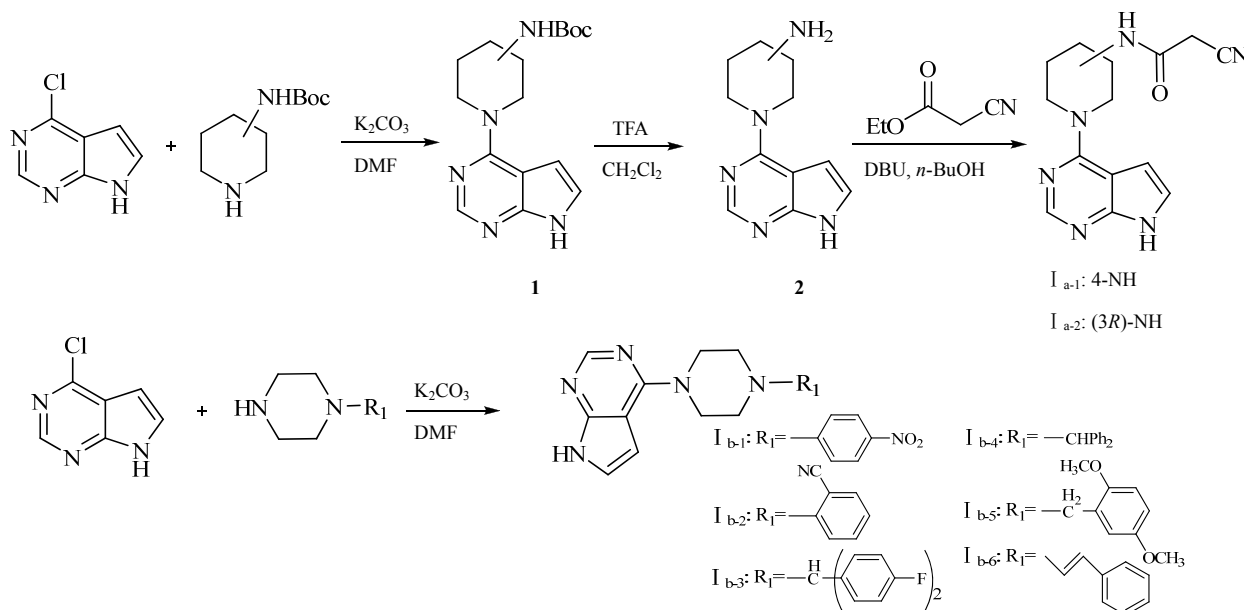


图2 目标化合物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of target compounds

1 仪器与试剂

Bruker 400 型核磁共振仪; VG ZAB-HS 型质谱仪; 薄层层析硅胶板 GF-254 (青岛海洋化工厂); YRT-3 型数字熔点仪 (天津大学精密仪器厂); 超净工作台 (苏州净化设备厂); MCO-18AIC (UV) 型 CO₂ 细胞培养箱 (三洋公司); BDS200 型倒置显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司); RT6100 型酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司); LD5-2A 型离心机 (北京京立离心机有限公司); 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

化学合成部分的所有试剂均为市售化学纯或分析纯,除特别说明外,不经处理直接使用。采用 Schrödinger 软件 Glide 模块进行虚拟筛选。自制 PBS (NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, NaH₂PO₄·H₂O 1.56 g, KH₂PO₄ 0.2 g); 自制消化试剂 (胰蛋白酶 0.5 g 和 EDTA 0.2 g, D-Hanks 加至 1.0 L, 滤过除菌, 分装

成小瓶,于-20℃保存); 胎牛血清 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); MEM、RPMI 1640 培养基 (Gibco Life Technologies); 人急性 B 细胞型淋巴细胞性白血病细胞 DAUDI 和人乳腺癌细胞 BT-20 均购自中国医学科学院基础医学研究所。阳性对照药物 tofacitinib 由本实验室合成^[7],质量分数>99%。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 4-叔丁氧羰基氨基-1-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-基)哌啶 (1) 的合成 在装有温度计、搅拌装置的反应瓶中加入 4-叔丁氧羰基氨基哌啶 (0.20 g, 1.00 mmol)、4-氯-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (0.15 g, 1.00 mmol)、K₂CO₃ (0.16 g, 1.20 mmol) 和 DMF (20 mL), 60℃反应 8 h, 石油醚-醋酸乙酯 (1:2) 为展开剂, TLC 检测反应完全, 将反应液倒入 30 mL 冷水

中, 醋酸乙酯 (30 mL×3) 萃取, 萃取液用无水硫酸镁干燥, 滤过, 减压蒸馏除去有机溶剂, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到化合物 **1** (0.27 g), 收率 85.17%。

2.1.2 1-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-基)哌啶-4-胺 (**2**) 的合成 在装有温度计、搅拌装置的反应瓶中加入 CH₂Cl₂ (12 mL) 和三氟乙酸 (4 mL), 向该混合液中加入化合物 **2** (0.32 g, 1.00 mmol), 搅拌, 于 30 °C 反应 3 h, 反应结束后减压蒸馏除去有机溶剂, 残留物直接投入下一步反应。

2.1.3 *N*-(1-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-基)哌啶-4-基)-2-氰基乙酰胺 (**I_{a-1}**) 的合成 向装有温度计、搅拌装置的反应瓶中依次加入化合物 **2** (0.33 g, 1.00 mmol)、DBU (0.30 g, 2.00 mmol)、氰基乙酸乙酯 (0.23 g, 2.00 mmol) 和正丁醇 15 mL, 搅拌, 40 °C 反应 18 h, 将反应液倒入冷水 (30 mL) 中, 醋酸乙酯萃取, 萃取液用无水硫酸镁干燥, 减压蒸馏除去有机溶剂, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到化合物 **I_{a-1}** (0.17 g), 收率 65.11%。HR-ESI-MS m/z : 285.145 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.34~1.43 (m, 2H, CH₂), 1.87 (d, J =12.8 Hz, 2H, CH₂), 3.23~3.26 (m, 2H, CH₂CN), 3.59 (d, J =3.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.90 (t, J =3.6 Hz, 1H, NCH), 4.52 (d, J =11.2 Hz, 2H, NCH₂), 6.57 (s, 1H, pyrrole-CH), 7.17 (s, 1H, NHCH), 8.13 (d, J =3.6 Hz, 1H, CONH), 8.22 (d, J =5.2 Hz, 1H, NCHN), 11.66 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.4 (*R*)-*N*-(1-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-基)哌啶-3-基)-2-氰基乙酰胺 (**I_{a-2}**) 的合成 参照化合物 **I_{a-1}** 的合成方法, 由 4-氯-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (0.15 g) 与(*R*)-3-叔丁氧羰基氨基哌啶 (0.33 g) 反应制得目标化合物 **I_{a-2}** (0.16 g), 收率 62.39%。HR-ESI-MS m/z : 285.145 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.53 (t, J =9.2 Hz, 2H, CH₂), 1.79 (s, 1H, CH₂), 1.92 (s, 1H, CH₂), 3.10~3.16 (m, 1H, NCH₂), 3.25~3.29 (m, 1H, NCH₂), 3.56~3.67 (m, 2H, CH₂CN), 3.72 (s, 1H, (*R*)-CH), 4.31 (d, J =12.8 Hz, 1H, NCH₂), 4.44~4.47 (m, 1H, NCH₂), 6.63 (d, J =1.6 Hz, 1H, pyrrole-CH), 7.17 (s, 1H, NHCH), 8.12 (s, 1H, CONH), 8.32 (d, J =6.8 Hz, 1H, NCHN), 11.65 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.5 4-(4-(4-硝基苯基)哌啶-1-基)-7*H*-吡咯[2,3-*d*]

嘧啶 (**I_{b-1}**) 的合成 参照合成化合物 **1** 的法, 由 4-氯-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (0.15 g) 与 4-硝基苯基哌啶 (0.20 g) 反应, 将反应液冷却后倒入水中, 析出的固体滤过, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到 **I_{b-1}** (0.29 g), 收率 90.61%。HR-ESI-MS m/z : 325.141 0 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.70 (t, J =5.2 Hz, 4H, NCH₂), 4.07 (d, J =5.2 Hz, 4H, NCH₂), 6.63 (t, J =1.6 Hz, 1H, pyrrole-CH), 7.00 (d, J =9.2 Hz, 2H, PhCH), 7.20 (t, J =2.8 Hz, 1H, NHCH), 8.09 (d, J =9.2 Hz, 2H, Ph-CH), 8.17 (s, 1H, NCHN), 11.71 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.6 2-(4-(7*H*-吡咯[2,3-*d*]嘧啶-4-基)哌啶-1-基)苯甲腈 (**I_{b-2}**) 的合成 参照化合物 **I_{b-1}** 的合成方法, 由 4-氯-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (0.15 g) 与 2-氰基苯基哌啶 (0.18 g) 反应, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到 **I_{b-2}** (0.26 g), 收率 87.29%。HR-ESI-MS m/z : 305.151 2 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.30 (t, J =4.8 Hz, 5H, NCH₂), 4.06 (t, J =4.8 Hz, 4H, NCH₂), 6.67 (q, J =1.6 Hz, 1H, pyrrole-CH), 7.12 (t, J =7.2 Hz, 1H, Ph-CH), 7.19~7.21 (m, 2H, Ph-CH、NHCH), 7.59~7.63 (m, 1H, Ph-CH), 7.73 (dd, J =1.2、7.6 Hz, 1H, Ph-CH), 8.18 (s, 1H, NCHN), 11.72 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.7 4-(4-(双(4-氟苯基)甲基)哌啶基-1-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (**I_{b-3}**) 的合成 由 4-氯-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (0.15 g) 与 1-(双(4-氟苯基)甲基)哌啶 (0.29 g) 反应, 向反应液中加入水, 固体滤过, 水、乙醇洗涤 (10 mL×3), 干燥后制得 **I_{b-3}** (0.37 g), 收率 92.40%。HR-ESI-MS m/z : 406.184 3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.40 (t, J =4.4 Hz, 4H, NCH₂), 3.85 (s, 4H, NCH₂), 4.41 (s, 1H, NCH), 6.57 (d, J =3.2 Hz, 1H, pyrrole-CH), 7.12~7.16 (m, 5H, PhCH、NHCH), 7.46~7.49 (m, 4H, PhCH), 8.11 (s, 1H, NCHN), 11.64 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.8 4-(4-二苯甲基哌啶基-1-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (**I_{b-4}**) 的合成 由 4-氯-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (0.15 g) 与 1-二苯基甲基哌啶 (0.25 g) 反应, 将反应液冷却后倒入水中, 析出的固体滤过, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到 **I_{b-4}** (0.32 g), 收率 91.22%。HR-ESI-MS m/z : 370.202 0

$[M+H]^+$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.49 (t, $J=4.4$ Hz, 4H, NCH_2), 3.77 (s, 4H, NCH_2), 4.62 (s, 1H, NCH), 6.55 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, pyrrole-CH), 7.14~7.17 (m, 5H, PhCH), 7.42~7.51 (m, 6H, Ph-CH, NHCH), 8.11 (s, 1H, NCHN), 11.66 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.9 4-(4-(2,5-二甲氧基苄基)哌嗪-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (I_{b-5}) 的合成 由 4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (0.15 g) 与 1-(2,5-二甲氧基苄基)哌嗪 (0.24 g) 反应, 将反应液冷却后倒入水中, 析出的固体滤过, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到 I_{b-5} (0.30 g), 收率 85.62%。HR-ESI-MS m/z : 354.192 1 $[M+H]^+$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.44 (t, $J=7.2$ Hz, 4H, NCH_2), 3.71~3.74 (m, 6H, NCH_2 , PhCH₂), 3.85 (s, 6H, OCH_3), 6.55 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, pyrrole-CH), 7.14~7.17 (m, 3H, PhCH), 7.41 (s, 1H, NHCH), 8.12 (s, 1H, NCHN), 11.52 (s, 1H, Ar-NH)。

2.1.10 (*E*)-4-(4-肉桂基哌嗪-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (I_{b-6}) 的合成 由 4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (0.15 g) 与 1-肉桂基哌嗪 (0.20 g) 反应, 将反应液冷却后倒入水中, 析出的固体滤过, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1) 洗脱, 柱色谱分离得到 I_{b-6} (0.27 g), 收率 84.55%。HR-ESI-MS m/z : 320.186 5 $[M+H]^+$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.48~2.54 (m, 4H, NCH_2), 3.14 (d, $J=6.4$ Hz, 2H, $=\text{CHCH}_2$), 3.87 (t, $J=4.8$ Hz, 4H, NCH_2), 6.31~6.37 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.54 (s, 1H, PhCH), 6.58~6.59 (m, 2H, pyrrole-CH), 7.15~7.17 (m, 1H, PhCH), 7.23~7.25 (m, 1H, PhCH), 7.30~7.34 (m, 2H, PhCH), 7.43~7.45 (m, 2H, PhCH, NHCH), 8.13 (s, 1H, NCHN), 11.67 (s, 1H, Ar-NH)。

2.2 活性测试部分

精密称取阳性对照药物 tofacitinib 和所有新化合物, 分别溶于一定量 DMSO, 置于超声仪中 5 min, 使样品充分溶解, 配制成 20 mmol/L 的溶液。精确吸取上述样品液 10 μL , 加入 90 μL DMSO、900 μL 无血清培养基, 稀释成 200 $\mu\text{mol/L}$, 备用。

MTS 法测定细胞抑制率: 取对数生长期的 DAUDI 细胞和 BT-20 细胞分别悬浮于培养基中, 用玻璃滴管轻轻吹打成单细胞悬液, 显微镜下血细胞计数板计数活细胞。96 孔板每孔接种细胞悬液 180 μL (细胞浓度为 1×10^4 个/孔), 在 37 $^\circ\text{C}$ 、100%相

对湿度、含 5% CO_2 的培养箱预培养 24 h 后, 离心, 小心吸出培养基, 换成没有血清的培养基, 并在每孔中加 20 μL 样品溶液 (200 $\mu\text{mol/L}$)^[8]。并设阴性对照 (等浓度 DMSO) 及空白本底 (不加细胞), 各组均设 3 个复孔。再连续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTS 溶液, 继续培养 30 min 后。用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 从而计算化合物对细胞的抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

初步活性测试结果显示 I_{a-1} 和 I_{a-2} 对 JAK3 有较强的抑制活性, 且 I_{a-1} 和 I_{b-3} 对 JAK3 的抑制强度与阳性对照药 tofacitinib 相近。见表 1。

表 1 化合物对细胞的抑制率

Table 1 Suppression rate of compounds against cells

化合物	抑制率/%	
	DAUDI 细胞	BT-20 细胞
tofacitinib	97.6	3.5
I_{a-1}	92.1	2.7
I_{a-2}	81.9	1.9
I_{b-1}	80.2	10.1
I_{b-2}	65.8	6.7
I_{b-3}	95.4	3.3
I_{b-4}	77.1	7.2
I_{b-5}	58.3	1.7
I_{b-6}	49.7	9.1

3 讨论

3.1 合成部分

在化合物 2 合成目标化合物 I_{a-1} 和 I_{a-2} 的过程中使用酰氯作为 *N*-酰基化反应的酰化试剂, 反应容易进行, 然而需要使用氯化亚砷, 对仪器设备要求高, 并产生大量废酸, 本文参照 Price 等^[9]开发的 *N*-氰基乙酰化方法, 以氰基乙酸乙酯为酰化试剂, DBU 为催化剂, 正丁醇为溶剂, 该反应条件温和、产生的杂质少、反应收率较高。

3.2 生物活性测试

初步细胞活性测试显示: 大多数化合物对 DAUDI 有抑制作用, 而对非 JAK3 依赖的 BT-20 细胞抑制作用弱, 说明所设计的化合物对 JAK3 有较明显的选择性。

I_{a-1} 和 I_{b-3} 对 JAK3 的抑制强度与阳性对照药 tofacitinib 相近, 推测是由于 I_{a-1} 与蛋白的结合模式

与 tofacitinib 相近, 而 I_{b-3} 则充分体现了空间匹配的优势。 I_{a-1} 和 I_{a-2} 对 JAK3 有较强的抑制活性, 说明手性中心的存在对化合物的活性有促进作用, 但并非必须存在的。 I_{a-2} 活性不如 I_{a-1} , 推测是由于分子构型的影响, 使得氰基与甘氨酸富集区的作用力变弱, 结合不稳定容易断裂。另外, 初步活性测试还提示, 分子末端是强极性的富电子基团时, 有助于增加化合物的活性。

参考文献

- [1] Seavey M M, Dobrzanski P. The many faces of Janus kinase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(9): 1136-1145.
- [2] Meyer D M, Jesson M I, Li X, *et al.* Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690550, in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *J Inflammation*, 2010, 7(1): 41.
- [3] Clark J D, Flanagan M E, Telliez J B. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(12): 5023-5038.
- [4] Chrencik J E, Patny A, Leung I K, *et al.* Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domains in complex with CP-690550 and CMP-6 [J]. *J Mol Biol*, 2010, 400(3): 413-33.
- [5] Williams NK, Bamert RS, Patel O, *et al.* Dissecting specificity in the Janus kinases: the structures of JAK-specific inhibitors complexed to the JAK1 and JAK2 protein tyrosine kinase domains [J]. *J Mol Biol*, 2009, 387(1): 219-232.
- [6] 仇缀百. 药物设计学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 1-251.
- [7] Zhi S, Liu D, Liu Y, *et al.* An efficient method for synthesis of tofacitinib citrate [J]. *J Heterocyclic Chem*, 2016, 53(4): 1259-1263.
- [8] Sudbeck E A, Liu X P, Narla R K, *et al.* Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(6): 1569-1582.
- [9] Price K E, Larrivée-Aboussafy C, Lillie B M, *et al.* Mild and efficient DBU-catalyzed amidation of cyanoacetates [J]. *Org Lett*, 2009, 11(9): 2003-2006.