

合成与应用

选择性 JAK2&JAK3 双重抑制剂的设计和合成

凌珍,张洁,黄艳琴,张敏,韦理莎,罗佳媛,何林洪*

(广西医科大学 药学院,广西 南宁 530021)

摘要:为了探索选择性 JAK1&JAK3 或 JAK2&JAK3 双重抑制剂的设计,采用不同的非亲电碎片替换高效共价选择性 JAK3 抑制剂(R)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-((1-(乙烯基磺酰基)哌啶-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶的亲电碎片,共合成 16 个目标化合物(A1~A16),并经核磁共振波谱和质谱鉴定结构正确。体外活性研究表明,碎片为短链的酰基(A2~A4)和磺基取代基(A5)的化合物可获得 JAK3 抑制活性,当替换为大体积的基团如苯基酰基(A9~A12)或苯基磺基(A13、A14),化合物活性将下降或完全失去。其中,最优 JAK3 抑制剂 A3 ($IC_{50} = (178.7 \pm 23.6)$ nmol/L) 还能选择性抑制 JAK2 ($IC_{50} = (4.2 \pm 0.6)$ μ mol/L) 而非 JAK1 ($IC_{50} > 25$ μ mol/L),而且在 10 μ mol/L 浓度下有效抑制小鼠脾脏淋巴细胞的增殖($54.9\% \pm 6.1\%$)。因此,A3 可作为研发该系列骨架选择性 JAK2&JAK3 双重抑制剂的先导化合物,为自身免疫性疾病的安全治疗提供更多选择。

关键词:JAK2;JAK3;抑制剂;非亲电碎片;选择性

中图分类号:R914;O621 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2025)04-0105-07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0467

Design and Synthesis of Selective JAK2&JAK3 Dual Inhibitors LING Zhen,ZHANG Jie,HUANG Yan-qin,ZHANG Min,WEI Li-sha,LUO jia-yuan,HE Lin-hong* (Pharmaceutical College,Guangxi Medical University,Nanning 530021,China)

Abstract:To explore the design of selective JAK1&JAK3 or JAK2&JAK3 dual inhibitors,the electrophilic group on the highly potent and selective JAK3 inhibitor (R)-5-(benzo [d] [1,3] dioxolan-5-yl)-4-((1-(vinylsulfonyl) piperidin-3-yl) oxy)-7H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidine was replaced with different non-electrophilic fragments leading to the obtaining 16 targeted compounds (A1~A16),whose structures were verified by nuclear magnetic resonance spectrum and mass spectrum.Results of in vitro assays revealed that compounds introduced with short chains including acyl (A2~A4) and sulfone (A5) substituents as the fragments could achieve enzymatic activity towards JAK3,while replaced with large volume groups such as phenylacetyl (A9~A12) or phenylsulfone (A13,A14),activity of the compounds could be decreased or totally lost.Among them,the optimal JAK3 inhibitor A3 ($IC_{50} = (178.7 \pm 23.6)$ nmol/L) not only selectively suppress JAK2 ($IC_{50} = (4.2 \pm 0.6)$ μ mol/L) rather than JAK1 ($IC_{50} > 25$ μ mol/L),but also effectively inhibit the proliferation of mice spleen lymphocytes ($54.9\% \pm 6.1\%$) at the concentration of 10 μ mol/L.Therefore,A3 could be regarded as a potent lead compound to develop selective JAK2&JAK3 dual inhibitors bearing this scaffold,which maybe provide more safe options for the treatment of autoimmune diseases.

Key words:Janus kinase 2 (JAK2);JAK3;inhibitors;non-electrophilic fragments;selectivity

两面神激酶(JAK)属于细胞内非受体酪氨酸蛋白激酶家族,包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 这 4 个成员^[1],被 60 余种细胞因子(图 1)激活,参与信号传导与转录激活因子(STAT)信号通路,影响多种免疫细胞的增殖、分化和存活,不仅与炎症疾病关系密切,而且是多种自身免疫性疾病治疗的明星靶点^[1-6]。但由于 JAK 各亚型间的高度同源性,目前,临床使用的 JAK 抑制剂多为泛 JAK 抑制剂(如托伐替尼和迪高替尼等)和 JAK1&JAK2 双重抑制剂(如鲁索替尼和巴瑞克替尼等),因为它们所作用的细胞因子受体如出一

辙(图 1),均可增加感染、恶性肿瘤和不良心血管事件风险,于是,被 FDA 要求增加安全性警告,研究者们也开始重视并尝试选择性失活 JAK 亚型以规避多细胞因子抑制来获取药物安全性^[7-9]。

收稿日期:2024-11-25;修回日期:2025-01-06

基金项目:广西自然科学基金青年基金项目(2023GXNSFAA026343);国家自然科学基金青年基金项目(82260673)。

作者简介:凌珍(2000-),女,广西玉林人,硕士生,主要研究方向为抗肿瘤小分子的设计及合成。

通讯作者:何林洪,E-mail:hlhongedu@163.com。

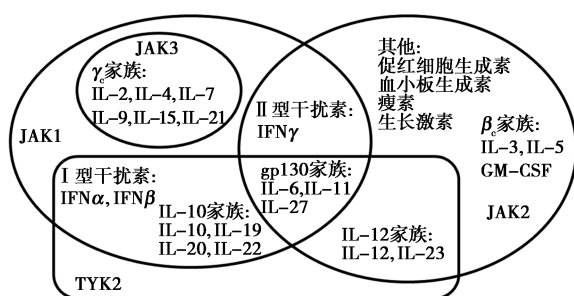


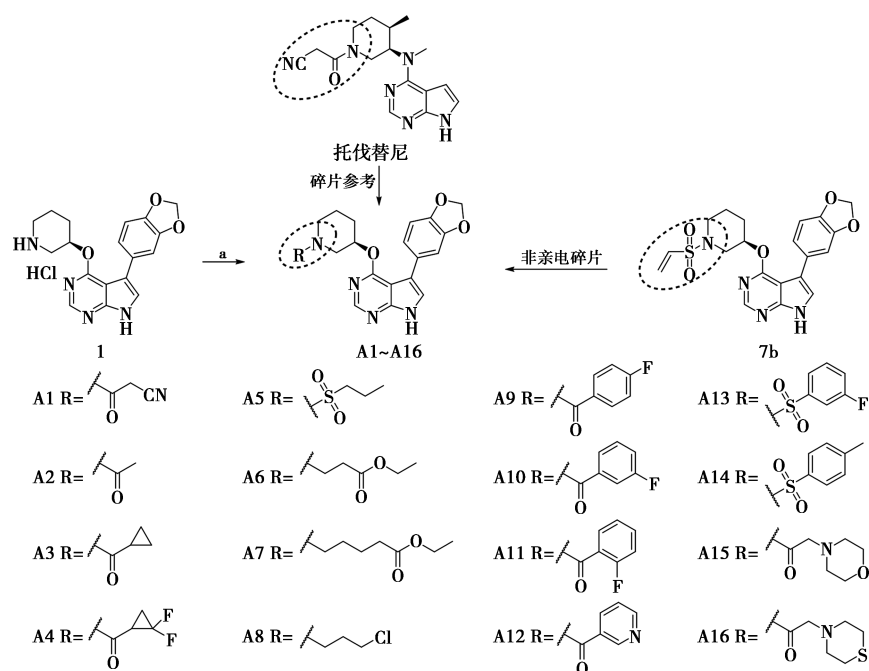
图 1 JAK 亚型和选择性作用的细胞因子受体家族^[2]

Fig.1 Corresponding JAK isoforms and their selective interaction with cytokine receptor families

其中,通过在活性骨架的适当位置引入亲电碎片,特异性地与 JAK3 蛋白活性口袋结构域中的半胱氨酸 909 (Cys909) 形成共价键的高选择性 JAK3 抑制剂的报道层出不穷,但鲜有进入临床研究,甚至上市^[9-11]。源于自身免疫性疾病是细胞因子的瀑布级联反应,选择性 JAK3 抑制剂虽然拥有极高的用药安全性,但生物效应难以充分响应细胞因子的风暴压制^[12-15]。因此,开发 JAK3

多靶点抑制剂依然是该领域的研究热点之一,如辉瑞公司研发的 JAK3/TEC 双靶点抑制剂利特替尼于 2023 年被 FDA 批准用于斑秃治疗,其安全性方面较泛 JAK 抑制剂和 JAK1&JAK2 双重抑制剂更具优势^[12]。

在课题组的前期研究中,通过共价设计理念获得了高选择性 JAK3 抑制剂 (*R*)-5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-((1-(乙烯基磺酰基)哌啶-3-基)氧基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (7b, JAK3 IC_{50} = 0.29 nmol/L; JAK1 IC_{50} > 1 000 nmol/L; JAK2 IC_{50} = 656 nmol/L)^[9], 于是,本文设想使用不同的非亲电碎片替换该结构骨架的亲电碎片(图 2),以获得选择性 JAK1&JAK3 或 JAK2&JAK3 双重抑制剂,减少泛 JAK 或 JAK1&JAK2 双重抑制所导致的多细胞因子失活和相关不良反应的发生。经过初步的构-效关系研究,苗头化合物 A3 可为后期高效安全的非共价选择性 JAK2&JAK3 双重抑制剂的研发提供数据基础和先导化合物。



a: ①ROH, 二氯甲烷, 1*H*-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐, *N,N*-二异丙基乙胺;
②RX, *N,N*-二甲基甲酰胺, *N,N*-二异丙基乙胺

图 2 化合物 A1~A16 的设计思路和合成路线

Fig.2 Design strategy and synthetic route of compounds A1~A16

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

DF-101S 型磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);AL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多公司);ZF-I 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器

厂);Waters Acquity UPLC I-Class/Vevo TQ-XS 型超高效液相色谱串联三重四极杆质谱联用仪(美国 Waters 公司);AVANCE NEO 600M 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

无水硫酸钠、*N,N*-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、

甲醇、硅胶(200~300 目)(分析纯,上海泰坦科技股份有限公司);氰乙酸、环丙甲酸、2,2-二氟环丙羧酸、3-溴丙酸乙酯、5-溴戊酸乙酯、1*H*-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐(上海毕得医药科技有限公司);N,N-二异丙基乙胺、乙酰氯、对氟苯甲酰氯、丙基磺酰氯、间氟苯甲酰氯(萨恩化学技术(上海)有限公司);ICR 小鼠(长沙市天勤生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

原料(*R*)-5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-(哌啶-3-基氧基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶盐酸盐(1)的制备为课题组常用的合成路线,详细步骤和操作可参考文献[4,9]。

1.2.1 目标化合物 A1、A3 和 A4 的制备

往反应瓶中加入 2.2 mmol 羧酸原料和 8 mL 二氯甲烷溶剂,于室温中搅拌,再依次加入 1.14 g (2.2 mmol) 肽偶联剂 1*H*-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐和 0.52 g (4 mmol) N,N-二异丙基乙胺;10 min 后滴加 0.56 g (1.5 mmol) 原料 1、0.77 g (6 mmol) N,N-二异丙基乙胺和 8 mL 二氯甲烷的混合溶液,反应过夜,停止反应。使用二氯甲烷/水体系萃取反应液,收集二氯甲烷层,无水硫酸钠干燥,过滤收集二氯甲烷,减压浓缩滤液,残留物使用硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇梯度洗脱)分离纯化得到目标化合物 A1、A3 和 A4,产率约为 32%。

(*R*)-3-(3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)-3-氧代丙腈(A1): HNMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 12.23 (s, 1H); 8.38 (s, 1H); 7.52 (d, 1H, $J=2.4$ Hz); 7.17 (dd, 1H, $J=15.0, 1.3$ Hz); 7.11 (d, 1H, $J=8.0$ Hz); 7.00~6.86 (m, 1H); 6.04 (s, 2H); 5.48~5.44 (m, 1H); 3.57~3.49 (m, 2H); 3.41~3.38 (m, 1H); 3.36 (s, 2H); 3.29~3.22 (m, 1H); 2.04~1.95 (m, 1H); 1.87~1.78 (m, 1H); 1.71~1.64 (m, 1H); 1.63~1.55 (m, 1H)。CNMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 162.34, 161.81, 153.73, 150.77, 147.39, 146.19, 128.63, 122.34, 116.19, 109.45, 108.43, 102.61, 101.33, 69.32, 69.05, 49.48, 45.18, 28.77, 22.01。ESI-MS, m/z : 404.38 [M-H]⁻。

(*R*)-3-(3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)(环丙基)甲酮(A3): HNMR (DMSO-*d*₆, 600

MHz), δ : 12.19 (s, 1H); 8.37 (s, 1H); 7.51 (d, 1H, $J=17.7$ Hz); 7.19 (s, 1H); 7.13 (dd, 1H, $J=15.3, 7.9$ Hz); 6.95~6.84 (m, 1H); 6.02 (s, 2H); 5.44~5.42 (m, 1H); 4.27 (t, 1H, $J=14.5$ Hz); 4.03~3.92 (m, 1H); 3.78~3.45 (m, 1H); 3.11~2.94 (m, 1H); 1.99~1.96 (m, 1H); 1.88~1.82 (m, 2H); 1.72 (d, 1H, $J=7.6$ Hz); 1.59~1.54 (m, 1H); 0.74~0.60 (m, 3H); 0.55~0.50 (m, 1H)。CNMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 171.80, 162.76, 161.79, 153.68, 150.78, 147.51, 146.09, 128.68, 122.37, 116.18, 109.44, 108.34, 102.62, 101.24, 69.51, 48.41, 44.91, 29.29, 21.15, 10.71, 7.48, 6.97。ESI-MS, m/z : 407.71 [M+H]⁺, 405.82 [M-H]⁻。

((*R*)-3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)(2,2-二氟环丙基)甲酮(A4): HNMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 12.14 (d, 1H, $J=18.2$ Hz); 8.40~8.32 (m, 1H); 7.48 (dd, 1H, $J=12.3, 4.9$ Hz); 7.22~7.13 (m, 1H); 7.12 (dd, 1H, $J=8.0, 1.6$ Hz); 6.86 (dt, 1H, $J=13.8, 6.9$ Hz); 6.02 (s, 2H); 5.44~5.31 (m, 1H); 3.90~3.81 (m, 1H); 3.61~3.57 (m, 2H); 3.12~3.09 (m, 2H); 2.07~1.98 (m, 1H); 1.88~1.72 (m, 4H); 1.62~1.47 (m, 2H)。CNMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 162.85, 161.86, 153.73, 150.70, 147.48, 146.11, 128.68, 122.33, 116.13, 109.68, 109.46, 108.25, 102.54, 101.26, 54.04, 49.07, 48.52, 29.29, 22.94, 21.72, 19.79。ESI-MS, m/z : 443.23 [M+H]⁺, 441.12 [M-H]⁻。

1.2.2 目标化合物 A2、A5~A16 的制备

往反应瓶中加入 0.56 g (1.5 mmol) 原料 1 和 6 mL N,N-二甲基甲酰胺溶剂,于室温中搅拌,依次加入 0.58 g (4.5 mmol) N,N-二异丙基乙胺和 1.6 mmol 溴化试剂, TLC 监测反应完全,停止反应。使用二氯甲烷/水体系萃取反应液,收集二氯甲烷层,无水硫酸钠干燥,过滤收集二氯甲烷,减压浓缩滤液,残留物使用硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇梯度洗脱)分离纯化得到目标化合物 A2、A5~A16,产率约为 57%。

(*R*)-1-(3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)乙-1-酮(A2): HNMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 12.21 (d, 1H, $J=19.7$ Hz); 8.40~8.36

(m, 1H); 7.52 (dd, 1H, $J = 16.8, 2.4$ Hz); 7.17 (dd, 1H, $J = 10.7, 1.5$ Hz); 7.11 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 6.96 ~ 6.86 (m, 1H); 6.03 (s, 2H); 5.45 ~ 5.39 (m, 1H); 4.22 ~ 3.77 (m, 1H); 3.69 ~ 3.62 (m, 1H); 3.33 (s, 1H); 3.31 ~ 3.04 (m, 1H); 2.02 ~ 1.92 (m, 3H); 1.83 ~ 1.77 (m, 1H); 1.73 ~ 1.64 (m, 2H); 1.56 ~ 1.46 (m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 168.85, 161.95, 153.72, 150.81, 147.50, 146.14, 128.70, 122.30, 116.13, 109.55, 108.37, 102.56, 101.28, 69.48, 49.56, 44.21, 29.04, 22.05, 21.34。ESI-MS, m/z : 381.15 $[M+H]^+$, 379.10 $[M-H]^-$ 。

(*R*)-5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-((1-(丙磺酰基)哌啶-3-基)氧基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(A5): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.23 (s, 1H); 8.38 (s, 1H); 7.55 ~ 7.52 (m, 1H); 7.30 ~ 7.25 (m, 1H); 7.22 ~ 7.15 (m, 1H); 6.94 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz); 6.02 (s, 2H); 5.46 ~ 5.43 (m, 1H); 4.05 ~ 3.55 (m, 1H); 3.48 ~ 3.38 (m, 1H); 3.13 ~ 2.99 (m, 2H); 2.94 ~ 2.86 (m, 1H); 1.92 (dd, 1H, $J = 10.6, 6.4$ Hz); 1.85 ~ 1.74 (m, 2H); 1.70 ~ 1.55 (m, 3H); 0.93 ~ 0.87 (m, 3H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 162.45, 161.73, 153.66, 150.80, 147.51, 146.15, 128.59, 122.50, 116.10, 109.62, 108.41, 102.48, 101.26, 69.03, 58.00, 50.51, 45.60, 28.54, 21.73, 16.89, 13.21。ESI-MS, m/z : 445.78 $[M+H]^+$, 443.57 $[M-H]^-$ 。

(*R*)-3-(3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)丙酸乙酯(A6): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.17 (s, 1H); 8.35 (s, 1H); 7.52 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz); 7.35 (s, 1H); 7.24 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 6.90 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz); 6.02 (s, 2H); 5.39 ~ 5.36 (m, 1H); 3.92 (td, 2H, $J = 17.5, 10.6$ Hz); 2.81 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz); 2.59 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz); 2.48 ~ 2.44 (m, 2H); 2.41 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz); 2.37 ~ 2.35 (m, 1H); 1.94 ~ 1.90 (m, 1H); 1.80 ~ 1.76 (m, 1H); 1.54 ~ 1.47 (m, 2H); 1.06 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 172.33, 162.03, 153.73, 150.86, 147.53, 146.03, 128.71, 122.25, 116.20, 109.87, 108.27, 102.56, 101.19, 70.72, 60.12, 56.84, 53.71, 52.96, 29.50, 22.59, 14.35。ESI-MS, m/z : 439.25 $[M+H]^+$, 437.10 $[M-H]^-$ 。

(*R*)-5-(3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)戊酸乙酯(A7): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.19 (s, 1H); 8.36 (s, 1H); 7.53 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz); 7.36 (s, 1H); 7.25 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz); 6.92 (t, 1H, $J = 10.8$ Hz); 6.02 (s, 2H); 5.40 ~ 5.38 (m, 1H); 4.00 (dq, 2H, $J = 14.1, 7.0$ Hz); 2.89 ~ 2.84 (m, 1H); 2.51 ~ 2.40 (m, 2H); 2.37 ~ 2.18 (m, 5H); 1.98 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz); 1.82 ~ 1.78 (m, 1H); 1.68 ~ 1.65 (m, 2H); 1.54 ~ 1.50 (m, 2H); 1.16 ~ 1.07 (m, 3H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 173.24, 161.99, 153.72, 150.85, 147.53, 146.04, 128.71, 122.28, 116.13, 109.84, 108.30, 102.50, 101.22, 70.70, 60.10, 57.19, 53.08, 31.60, 29.61, 26.80, 22.51, 14.49。ESI-MS, m/z : 453.27 $[M+H]^+$, 451.40 $[M-H]^-$ 。

(*R*)-5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-((1-(3-氯丙基)哌啶-3-基)氧基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(A8): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.18 (s, 1H); 8.35 (s, 1H); 7.53 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz); 7.36 (s, 1H); 7.25 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 6.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 6.03 (s, 2H); 5.42 ~ 5.39 (m, 1H); 3.72 ~ 3.59 (m, 2H); 2.83 ~ 2.81 (m, 1H); 2.49 ~ 2.37 (m, 4H); 2.33 (s, 1H); 1.99 ~ 1.80 (m, 4H); 1.55 ~ 1.51 (m, 2H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 161.99, 161.12, 153.72, 150.86, 147.55, 146.06, 128.72, 122.62, 116.13, 109.83, 108.41, 102.67, 101.23, 70.68, 55.19, 53.20, 43.91, 41.23, 34.65, 29.55, 22.92。ESI-MS, m/z : 415.23 $[M+H]^+$, 413.33 $[M-H]^-$ 。

(*R*)-3-(3-((5-(苯并[*d*][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)(4-氟苯基)甲酮(A9): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.22 (s, 1H); 8.41 ~ 8.12 (m, 1H); 7.54 (d, 1H, $J = 12.8$ Hz); 7.28 (t, 1H, $J = 16.3$ Hz); 7.21 ~ 7.18 (m, 2H); 7.11 (s, 1H); 6.99 ~ 6.91 (m, 2H); 6.85 ~ 6.74 (m, 1H); 6.02 (t, 2H, $J = 12.8$ Hz); 5.66 ~ 5.53 (m, 1H); 4.40 ~ 4.15 (m, 1H); 3.80 ~ 3.54 (m, 2H); 3.23 ~ 3.13 (m, 1H); 1.98 (d, 2H, $J = 13.8$ Hz); 1.88 ~ 1.75 (m, 1H); 1.62 ~ 1.49 (m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 169.30, 161.62, 153.79, 147.57, 146.11, 129.41, 122.47, 122.28, 116.06, 115.66, 114.92, 109.88, 108.60, 102.67, 101.38, 101.29,

67.18, 47.26, 42.40, 28.95, 20.73。ESI-MS, m/z : 461.06 $[M+H]^+$, 459.23 $[M-H]^-$ 。

(R)-(3-((5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)(3-氟苯基)甲酮(A10): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.31(s, 1H); 8.51~8.20(m, 1H); 7.65(d, 1H, $J=14.7$ Hz); 7.49~7.25(m, 3H); 7.20~7.09(m, 1H); 7.05~6.73(m, 3H); 6.16~6.02(m, 2H); 5.67~5.41(m, 1H); 4.52~4.22(m, 1H); 3.64~3.57(m, 1H); 3.46~3.43(m, 1H); 3.30~3.20(m, 1H); 2.08(d, 2H, $J=10.0$ Hz); 2.03~1.81(m, 1H); 1.75~1.60(m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 170.82, 168.59, 161.55, 153.68, 150.29, 147.61, 146.21, 138.64, 130.63, 128.77, 122.38, 116.20, 113.95, 109.66, 108.45, 102.61, 101.29, 60.23, 50.09, 47.57, 28.90, 20.90。ESI-MS, m/z : 461.18 $[M+H]^+$, 459.12 $[M-H]^-$ 。

(R)-(3-((5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)(2-氟苯基)甲酮(A11): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.36~12.30(m, 1H); 8.53~8.13(m, 1H); 7.66(t, 1H, $J=5.6$ Hz); 7.55(d, 1H, $J=6.0$ Hz); 7.43~7.18(m, 4H); 7.04(dd, 1H, $J=13.2, 8.2$ Hz); 6.68~6.51(m, 1H); 6.12(t, 2H, $J=23.2$ Hz); 5.66~5.39(m, 1H); 4.64~4.42(m, 1H); 3.79(d, 1H, $J=11.3$ Hz); 3.66(d, 1H, $J=12.7$ Hz); 3.39~3.24(m, 1H); 2.08(d, 2H, $J=8.9$ Hz); 1.99~1.81(m, 1H); 1.75~1.55(m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 164.99, 162.00, 153.58, 150.55, 147.58, 146.18, 131.76, 131.31, 128.76, 125.08, 124.21, 122.40, 122.22, 116.13, 115.65, 108.45, 102.67, 101.31, 60.23, 49.39, 47.06, 31.23, 22.53。ESI-MS, m/z : 461.25 $[M+H]^+$, 459.03 $[M-H]^-$ 。

(R)-(3-((5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)(吡啶-3-基)甲酮(A12): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.20(s, 1H); 8.67~8.03(m, 3H); 7.66~7.53(m, 1H); 7.46~7.34(m, 1H); 7.33~7.01(m, 3H); 6.96~6.85(m, 1H); 6.02(s, 2H); 5.61~5.59(m, 1H); 4.38~4.15(m, 1H); 3.75~3.52(m, 2H); 3.27~3.13(m, 1H); 1.98(d, 2H, $J=10.2$ Hz); 1.92~1.73(m, 1H); 1.70~1.50(m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ :

167.82, 161.54, 153.76, 150.71, 150.34, 147.60, 146.22, 134.69, 123.78, 123.13, 122.36, 116.00, 109.67, 108.38, 103.14, 101.34, 60.21, 50.38, 47.73, 29.46, 22.54。ESI-MS, m/z : 444.13 $[M+H]^+$, 442.23 $[M-H]^-$ 。

(R)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-((1-((3-氟苯基)磺酰基)哌啶-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(A13): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.24(s, 1H); 8.39(s, 1H); 7.69~7.64(m, 1H); 7.59~7.54(m, 4H); 7.28(dt, 2H, $J=4.5, 1.5$ Hz); 6.94(d, 1H, $J=7.9$ Hz); 6.03(s, 2H); 5.50~5.43(m, 1H); 3.45(td, 2H, $J=7.0, 5.1$ Hz); 3.18(d, 1H, $J=10.3$ Hz); 2.83~2.79(m, 1H); 1.86~1.78(m, 2H); 1.73~1.68(m, 1H); 1.60~1.57(m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 163.08, 161.61, 153.82, 150.75, 147.54, 146.13, 138.68, 132.18, 128.61, 123.97, 122.53, 120.65, 116.20, 114.72, 109.48, 108.35, 102.59, 101.21, 68.80, 48.91, 46.22, 28.07, 21.25。ESI-MS, m/z : 497.29 $[M+H]^+$, 495.35 $[M-H]^-$ 。

(R)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-((1-甲苯磺酰基哌啶-3-基)氧基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(A14): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.24(s, 1H); 8.38(s, 1H); 7.60(d, 2H, $J=8.1$ Hz); 7.57(d, 1H, $J=2.3$ Hz); 7.39(d, 2H, $J=8.1$ Hz); 7.29(d, 2H, $J=9.9$ Hz); 6.94(d, 1H, $J=7.9$ Hz); 6.03(s, 2H); 5.47~5.44(m, 1H); 3.36(s, 1H); 3.24~3.22(m, 1H); 3.09(d, 1H, $J=10.8$ Hz); 2.73(t, 1H, $J=8.5$ Hz); 2.38(s, 3H); 1.86~1.76(m, 2H); 1.66(d, 1H, $J=9.4$ Hz); 1.58(d, 1H, $J=6.0$ Hz)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 161.63, 153.77, 150.77, 147.53, 146.10, 143.93, 133.08, 130.25, 128.58, 127.84, 122.56, 115.64, 109.47, 108.41, 102.55, 101.24, 68.81, 48.92, 46.20, 28.29, 21.30。ESI-MS, m/z : 493.61 $[M+H]^+$, 491.20 $[M-H]^-$ 。

(R)-1-(3-((5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氧基)哌啶-1-基)-2-吗啉代乙醇-1-酮(A15): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.22(d, 1H, $J=11.2$ Hz); 8.46~8.35(m, 1H); 7.58~7.49(m, 1H); 7.26~7.18(m, 1H); 7.17~7.11(m, 1H); 6.95~6.87(m, 1H); 6.03(s, 2H); 5.45~5.37(m, 1H); 4.14~3.87(m, 1H); 3.73~3.68(m, 1H); 3.47~

3.41 (m, 4H); 3.21 ~ 3.19 (m, 2H); 3.15 ~ 3.05 (m, 1H); 2.95 ~ 2.84 (m, 1H); 2.30 (d, 2H, $J = 19.1$ Hz); 2.15 ~ 1.20 (m, 2H); 2.02 ~ 1.87 (m, 1H); 1.85 ~ 1.70 (m, 2H); 1.59 ~ 1.47 (m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 168.11, 162.76, 162.08, 153.75, 150.73, 147.46, 146.16, 129.72, 122.25, 116.09, 109.53, 108.36, 102.73, 101.26, 69.77, 66.38, 56.20, 53.47, 48.57, 45.63, 29.27, 21.47。ESI-MS, m/z : 466.30 [M + H]⁺, 464.44 [M - H]⁻。

(R)-1-(3-((5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氧)哌啶-1-基)-2-硫代吗啉乙烷-1-酮 (A16): HNMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 12.21 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz); 8.38 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz); 7.53 (dd, 1H, $J = 13.2, 2.4$ Hz); 7.21 ~ 7.17 (m, 1H); 7.14 (td, 1H, $J = 8.1, 1.5$ Hz); 6.96 ~ 6.87 (m, 1H); 6.03 (s, 2H); 5.45 ~ 5.38 (m, 1H); 3.95 ~ 3.77 (m, 1H); 3.71 (dd, 1H, $J = 13.8, 2.3$ Hz); 3.44 (qd, 2H, $J = 7.0, 5.1$ Hz); 3.17 ~ 3.08 (m, 1H); 2.91 ~ 2.83 (m, 1H); 2.62 ~ 2.58 (m, 2H); 2.50 (s, 2H); 2.44 ~ 2.41 (m, 1H); 2.39 ~ 2.36 (m, 1H); 2.32 ~ 2.27 (m, 2H); 2.01 ~ 1.94 (m, 1H); 1.82 ~ 1.70 (m, 2H); 1.57 ~ 1.47 (m, 1H)。CNMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 168.76, 162.02, 153.77, 150.72, 147.56, 146.44, 129.02, 122.42, 116.09, 109.54, 108.28, 102.55, 101.27, 69.79, 54.56, 48.59, 45.55, 44.79, 29.27, 27.14, 21.58。ESI-MS, m/z : 482.34 [M + H]⁺, 480.38 [M - H]⁻。

1.3 JAK3 激酶活性的测试

目标化合物对 JAK 的激酶活性测试由上海睿智化学研究有限公司完成。首先测试各化合物在指定浓度下对 JAK 的抑制率, 对于抑制率 > 50% 的化合物, 则继续检测其在不同浓度梯度下的抑制率, 通过 Graphpad prism 8.0 拟合浓度-抑制率曲线以得到 IC₅₀ 值。

1.4 脾脏淋巴细胞的抗增殖活性^[9,10]

提取 8 周龄 ICR 雄性小鼠的脾脏淋巴细胞, 以 1×10^6 个细胞每孔的密度种于 96 孔板中, 除空白组外, 其余组均使用刀豆蛋白 A (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激增殖 2 h, 随后加入待测试化合物共孵育 72 h, 使用 MTT 法检测细胞的生存率。

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的波谱分析

所有的终产物均使用了核磁共振波谱

(HNMR 和 CNMR) 和质谱 (ESI-MS) 进行了结构鉴定, 现以化合物 A1 为例予以说明。根据 HNMR 展示, 化学位移 δ 12.23, 积分 1 个氢, 单峰, 为吡咯烷基氮上的氢 (—NH—); 化学位移 δ 8.38, 积分 1 个氢, 单峰, 为嘧啶环上的氢 (Ar—H); 化学位移 δ 7.52、7.17 和 7.11, 积分均为 1 个氢, 为苯环氢 (Ar—H); 化学位移 δ 7.00 ~ 6.86, 积分 1 个氢, 双重峰, 为吡咯烷基碳上氢 (Ar—H); 化学位移 δ 6.04, 积分 2 个氢, 单峰, 为二氧杂环戊烯的氢 (—CH₂—); 化学位移 δ 5.48 ~ 5.44, 积分 1 个氢, 多重峰, 为与氧相连嘧啶碳上的氢 (—C₅H₉N—); 化学位移 δ 3.36, 积分 2 个氢, 单峰, 为烷烃链亚甲基的氢 (—CH₂—); 化学位移 δ 3.57 ~ 3.49 (积分 2 个氢)、3.41 ~ 3.38 (积分 1 个氢)、3.29 ~ 3.22 (积分 1 个氢)、2.04 ~ 1.95 (积分 1 个氢)、1.87 ~ 1.78 (积分 1 个氢)、1.71 ~ 1.64 (积分 1 个氢) 和 1.63 ~ 1.55 (积分 1 个氢) 均为哌啶碳上的氢 (—C₅H₉N—)。根据 CNMR 分析, 除了哌啶基和亚甲基的碳出峰位于高峰, 其余碳的出峰均位于低场, 与化合物的分子式相符。此外, ESI-MS 在负离子模式下检出的分子离子峰为 404, 符合该分子质量, 因此该结构鉴定正确。

2.2 目标化合物对 JAK3 的抑制活性分析

由于目标化合物的设计源于共价选择性 JAK3 抑制剂 7b, 因此, 首先评价它们对 JAK3 的抑制活性。如表 1 所示, 化合物 A1 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下可温和抑制 JAK3, 抑制率接近 50%。当去掉氰基官能团, 化合物 A2 的活性显著提高; 将氰基替换为环丙基 (A3), 活性得到进一步的提高; 但当环丙基使用含氟原子的生物电子等排体 (A4) 替换时, 对 JAK3 的抑制活性有所下调; 当侧链为丙基砜基 (A5) 时, 可只留 JAK3 的抑制活性, 而当侧链是以供电子效应为主的基团 (A6 ~ A8) 时, 难以保持生物活性。基于上述清晰的构-效关系, 即该结构哌啶环连接含羰基和砜基的取代基者, 可以获得更优的 JAK3 抑制活性, 因此, 接着探讨苯基酰基 (A9 ~ A12)、苯基砜基 (A13、A14) 或者其他体积较大酰基取代基 (A15/A16), 遗憾的是, 除了 A9 保留了对 JAK3 的失活作用, 其余化合物均失去效力, 推测这些取代基体积较大, 难以进入 JAK3 蛋白 ATP 结合区域的甲基口袋。综上, 短链的酰基取代基或者砜基取代基更有利于该骨架获得 JAK3 的抑制活性。

表 1 目标化合物的对 JAK3 的酶抑制活性^注

Tab.1 Enzymatic activity towards JAK3 of target compounds

化合物	抑制率%/ (1 μmol·L ⁻¹)	IC ₅₀ / (nmol·L ⁻¹)
A1	46.7±2.5	—
A2	82.6±4.7	286.2±29.1
A3	91.5±6.2	178.7±23.6
A4	69.3±6.0	206.8±42.4
A5	74.6±4.5	346.7±54.2
A6	26.4±2.9	—
A7	21.7±3.9	—
A8	40.5±1.3	—
A9	67.9±3.2	512.4±75.3
A10	6.5±0.4	—
A11	8.0±2.1	—
A12	1.8±0.2	—
A13	25.3±4.2	—
A14	2.8±1.5	—
A15	13.9±2.1	—
A16	18.2±3.3	—
托伐替尼	99.1±1.2	—

注:数据呈现为平均值±SEM,“—”表示没有检测。

2.3 化合物 A3 和 A4 的其他体外活性研究

基于化合物 A3 和 A4 温和的 JAK3 抑制活性,还检测了其高同源性亚型 JAK1 和 JAK2 的失活效力。结果如表 2 所示,两者均能选择性地抑制 JAK2 (IC₅₀<10 μmol/L),而无法失活 JAK1 (IC₅₀>25 μmol/L);其中化合物 A3 对 JAK2 的抑制作用更优。众所周知,脾脏是各哺乳动物最大的免疫器官^[9,10]。与酶活效力一致,化合物 A3 在 10 μmol/L 浓度下可有效抑制刀豆蛋白 A 刺激的小鼠脾脏淋巴细胞的增殖,并优于 A4,表明化合物 A3 为颇具潜力的免疫调节剂。

表 2 化合物 A3 和 A4 的体外活性数据^注

Tab.2 Bioactivity data of compounds A3 and A4 in vitro

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		抑制率%/(10 μmol·L ⁻¹)
	JAK1	JAK2	脾脏淋巴细胞
A3	>25	4.2±0.6	54.9±6.1
A4	>25	9.2±2.1	45.5±8.0

注:数据呈现为平均值±SEM。

3 结论

本文通过使用多种非亲电碎片替换高选择性共价 JAK3 抑制剂 7b 的亲电碎片,成功获得多个非共价 JAK3 抑制剂,如 A2~A5 和 A9。其中,最优化合物 A3 不仅选择性地抑制 JAK2,而且在 10 μmol/L 浓度下能有效抑制小鼠脾脏淋巴细胞的增殖,可作为该系列骨架的先导化合物用以开发

非共价选择性 JAK2&JAK3 双重抑制剂,为自身免疫性疾病的安全治疗提供更多方向。

参考文献:

[1] Clark J D, Flanagan M E, Telliez J. *J. Med. Chem.*, 2014, **57**(12): 5 023-5 038.

[2] Tanaka Y, Luo Y, O'shea J J, Nakayamada S. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2022, **18**: 133-145.

[3] Cen L F, Cheng M, Ren W J, Ye L, Wang L H, Guo W B, Zhang Q, Xu Y G. *J. China Pharm. Univ.*, 2024, **55**(1): 73-86.

岑丽芳,程铭,任玮杰,叶柳,王禄华,郭维博,张强,徐云根. *中国药科大学学报*, 2024, **55**(1): 73-86.

[4] Zhang J, Ling Z, Qin T S, Xie X, Zeng X X, Qiao Y N, He L H. *Chem. Reagents*, 2024, **46**(4): 114-120.

张洁,凌珍,覃廷胜,谢鑫,曾宪霞,谯艳妮,何林洪. *化学试剂*, 2024, **46**(4): 114-120.

[5] Cao S S, Zhang J, Zeng X X, Huang H Z, Yue X Y, He L H. *Chem. Reagents*, 2021, **43**(1): 22-27.

曹思思,张洁,曾宪霞,黄怀征,岳晓阳,何林洪. *化学试剂*, 2021, **43**(1): 22-27.

[6] Wang A X, Liu B N, Liu Y, Liu D K, Liu M, Chu D Q. *Drug Evaluation Res.*, 2014, **37**(2): 169-172.

王澳轩,刘冰妮,刘颖,刘兢科,刘默,储德清. *药物研究评价*, 2014, **37**(2): 169-172.

[7] Liu L, Liu Z J, Tang J, He G W, Liu W Z. *J. China Pharm. Univ.*, 2022, **53**(6): 685-689.

刘丽,刘资进,汤君,何广卫,刘为中. *中国药科大学学报*, 2022, **53**(6): 685-689.

[8] Yu Q Q, Jiang Y M, Xu L, Zhu J Y, Chen Y, Jin J. *Chem. Bull.*, 2021, **84**(10): 1 102-1 107.

郁倩倩,蒋颖敏,许磊,朱景宇,陈蕴,金坚. *化学通报*, 2021, **84**(10): 1 102-1 107.

[9] He L, Zhang J, Ling Z, Zeng X, Yao H, Tang M, Huang H, Xie X, Qin T, Feng X, Chen Z, Deng F, Yue X. *Bioorg. Chem.*, 2024, **149**: 107 499.

[10] Yin Y, Chen C, Yu R, Shu L, Wang Z, Zhang T, Zhang D. *Bioorg. Chem.*, 2020, **98**: 103 720.

[11] Xu P, Shen P, Yu B, Xu X, Ge R, Cheng X, Chen Q, Bian J, Li Z, Wang J. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, **192**: 112 155.

[12] Thorarensen A, Dowty M E, Banker M E, Juba B, Jussif J, Lin T, Vincent F, Czerwinski R M, Casimiro-garcia A, Unwalla R, Trujillo J I, Liang S, Balbo P, Che Y, Gilbert A M, Brown M F, Hayward M, Montgomery J, Leung L, Yang X, Soucy S, Hegen M, Coe J, Langille J, Vajdos F, Chrencik J, Telliez J B. *J. Med. Chem.*, 2017, **60**: 1 971-1 993.

[13] Thoma G, Druches P, Zerwes H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**(19): 4 617-4 621.

[14] Shi L, Zhong Z, Li X, Zhou Y, Pan Z. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(2): 1 054-1 066.

[15] Forster M, Chaikuad A, Dimitrov T, Döring E, Holstein J, Berger B T, Gehringer M, Ghoreschi K, Müller S, Knapp S, Laufer S A. *J. Med. Chem.*, 2018, **61**(12): 5 350-5 366.