

含吲哚的吡唑并[3,4-*d*]嘧啶衍生物的设计合成及其生物活性研究

孙晓阳^{a,b} 冯思冉^a 董金娇^a 冯佳佳^a 刘振明^c
宋亚丽^{*,a} 乔晓强^{*,a,d}

(^a 河北大学药学院 河北省药物质量分析控制重点实验室 河北保定 071000)

(^b 沧州市中心医院 国家药物临床试验机构 河北沧州 061000)

(^c 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室药物设计中心 北京 100191)

(^d 河北大学 药物化学与分子诊断教育部重点实验室 河北保定 071000)

摘要 利用药物设计中的生物活性基团拼接原理, 设计合成了 13 个含吲哚的吡唑并[3,4-*d*]嘧啶衍生物. 目标化合物均经核磁共振氢谱(¹H NMR), 核磁共振碳谱(¹³C NMR)和高分辨质谱仪(HRMS)进行了结构确证. 对 4 株肿瘤细胞(HeLa、MGC-803、MCF-7、BEL-7404)的体外抗增殖活性实验结果表明, 目标化合物均表现出一定的抗肿瘤活性, MCF-7、MGC-803 肿瘤细胞株敏感度高于 HeLa 和 BEL-7404. 其中, 6-[(6-甲氧羰基吲哚-3-基)硫基]-1-苯基-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**5m**)表现出较好的体外肿瘤抑制活性, 对 MCF-7、MGC-80 和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 均小于 30 μmol·L⁻¹, 对 MCF-7 的 IC₅₀ 值为(4.02±0.92) μmol·L⁻¹, 优于对照药物依托泊苷(10.1±0.62 μmol·L⁻¹)和羟喜树碱(5.93±0.56 μmol·L⁻¹). 拓扑异构酶抑制实验结果表明, 此类化合物对 TopoII 有选择性抑制活性, 所有化合物对 Topo II 表现出不同程度抑制活性, 对 Topo I 未表现出抑制活性.

关键词 吲哚; 吡唑并[3,4-*d*]嘧啶; 抗肿瘤; 拓扑异构酶; 分子对接

Design, Synthesis and Biological Activity of Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine Derivatives Containing Indole Moiety

Sun, Xiaoyang^{a,b} Feng, Siran^a Dong, Jinjiao^a Feng Jiajia^a Liu, Zhenming^c
Song, Yali^{*,a} Qiao, Xiaoqiang^{*,a,d}

(^a Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071000)

(^b National Drug Clinical Trial Institution, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei 061000)

(^c Drug Design Center, State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191)

(^d Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education, Hebei University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract Based on the combination principle in drug design, thirteen pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives containing indole moiety were designed and synthesized. The target compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. Their *in vitro* cytotoxicity against four human cancer cell lines (HeLa, MGC-803, MCF-7, BEL-7404) has been investigated and most of the tested compounds displayed moderate antiproliferative activity. Especially, compound **5m** exhibited the highest level of antiproliferative activity with an IC₅₀ value <30 μmol·L⁻¹ for HeLa, MGC-803 and MCF-7. IC₅₀ value of methyl 3-((4-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-6-yl)thio)-1*H*-indole-6-carboxylate (**5m**) to MCF-7 was (4.02±0.92) μmol·L⁻¹, which was better than etoposide (10.1±0.62 μmol·L⁻¹) and camptothecin (5.93±0.56 μmol·L⁻¹). Further biological evaluation of these compounds suggested that these compounds showed selective inhibitory activity against Topo II

* Corresponding authors. E-mail: yalisong@hbu.edu.cn; xiaoqiao@hbu.edu.cn

Received July 3, 2019; revised September 11, 2019; published online November 1, 2019.

Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. B2018201269), the Research Award Fund Scientific and Technological in Higher Education Institutions of Hebei Province (No. ZD2019060), the National Natural Science Foundation of China (No. 21675039), and the Young Talent of Hebei Province.

河北省自然科学基金(No. B2018201269)、河北省高等学校科学技术研究项目(No. ZD2019060)、国家自然科学基金(No. 21675039)、河北省青年拔尖人才资助项目.

as a possible intracellular target, and all compounds didn't show inhibitory activity against Topo I.

Keywords indole; pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine; anticancer; topoisomerase; molecular docking

吡唑并[3,4-*d*]嘧啶由吡唑环与嘧啶环稠合而成, 作为结构类似嘌呤的融合杂环系统具有重要的化学和药理学意义^[1~3], 本身具有抗炎^[4]、抗菌^[5~7]、抗病毒^[8,9]、抗心血管病^[10,11]、抗肿瘤^[12~15]等多种生物活性。吡唑并[3,4-*d*]嘧啶类化合物作为潜在的抗肿瘤化合物具有体外肿瘤抑制活性强、靶点多等优点^[16,17]。近年来, 设计合成不同基团修饰的吡唑并[3,4-*d*]嘧啶衍生物, 进而筛选具有高效生物活性的化合物, 是广大科研人员研究热点之一。

吡唑类衍生物由于其天然产物的丰富性和药理作用的广泛性, 在药物合成中引起了广泛的关注^[18,19]。吡唑核可以通过色氨酸的形式构建蛋白质, 经常用作抗肿瘤药物的母核或修饰基团, 成为国内外药物开发领域的研究热点^[20,21]。

鉴于吡唑并[3,4-*d*]嘧啶类化合物和吡唑类化合物的抗肿瘤作用, 本文根据药物设计中的生物活性基团拼接原理^[22], 将吡唑和吡唑并[3,4-*d*]嘧啶引入同一分子中, 设计合成 13 个目标化合物。目标化合物的结构均通过核磁共振氢谱、碳谱和高分辨质谱进行确证, 同时利用 4 种人源肿瘤细胞(HeLa、MGC-803、MCF-7、BEL-7404)对目标化合物进行了抗肿瘤活性测试, 结果表明目标化合物对 4 株肿瘤细胞表现出中等程度的抑制活性。分子对接研究表明, 目标化合物与 Topo II 有较强的结合力。

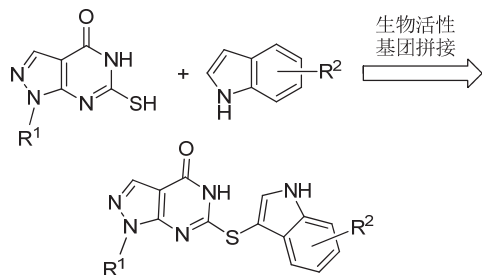


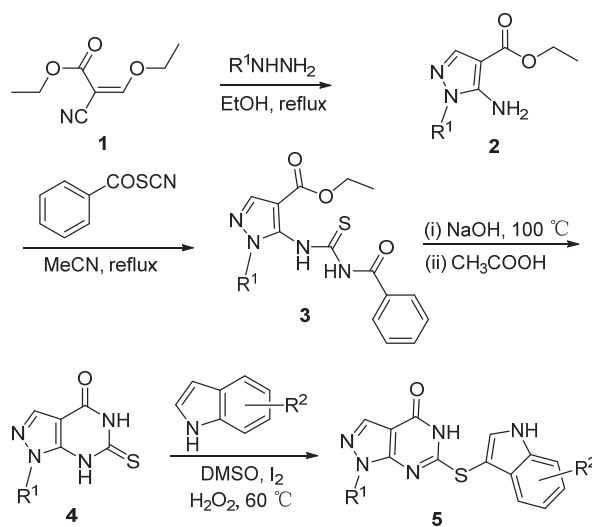
图 1 含吡唑的吡唑并[3,4-*d*]嘧啶衍生物设计

Figure 1 Design of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives possessing indole moiety

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

本研究以 2-氰基-3-乙氧基丙烯酸乙酯(**1**)为起始原料, 首先与苯肼(水合肼)环合生成吡唑类化合物 **2**^[23,24], 然后在无水乙醇中与苯甲酰异硫氰酸酯反应生成化合物 **3**^[25]。化合物 **3** 在 2 mol/L NaOH 溶液中 100 °C 下回流 20 min 后, 乙酸酸化, 环化生成中间化合物 **4**^[26,27]。最后化合物 **4** 与含不同取代基的吡唑发生亲电取代得到目标化合物 **5**^[28]。



5a: R¹ = Ph, R² = 5-OCH₃; **5b:** R¹ = H, R² = H; **5c:** R¹ = H, R² = 5-OCH₃; **5d:** R¹ = H, R² = 1-CH₃; **5e:** R¹ = Ph, R² = 6-F; **5f:** R¹ = H, R² = 5-CH₃; **5g:** R¹ = H, R² = 6-COOCH₃; **5h:** R¹ = H, R² = 6-F; **5i:** R¹ = Ph, R² = H; **5j:** R¹ = Ph, R² = 5-Cl; **5k:** R¹ = Ph, R² = 1-CH₃; **5l:** R¹ = Ph, R² = 5-CH₃; **5m:** R¹ = Ph, R² = 6-COOCH₃

图式 1 目标化合物的合成

Scheme 1 Synthetic route of target compound

1.2 化合物的波谱解析

目标化合物均经核磁共振氢谱、碳谱、高分辨质谱表征确认。以化合物 **5m** 为例进行波谱分析, 解析结果如下: ¹H NMR 谱图中在 δ 12.91 (s, 1H) 为嘧啶环氮上的质子峰, δ 12.22 (s, 1H) 为吡唑环氮上的质子峰, δ 8.19 (s, 1H) 为吡唑环碳上质子峰, δ 8.27 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.10~7.13 (m, 1H), 6.93~6.95 (m, 2H) 处为苯环与吡唑环上的质子峰, 3.90 (s, 3H) 为甲氧基上质子峰。 ¹³C NMR 谱图中碳原子信号的化学位移分别为 δ: 167.0, 161.1, 157.6, 151.4, 138.0, 137.0, 136.1, 136.0, 132.8, 128.4, 126.1, 123.3, 121.0, 120.0, 118.6, 114.0, 104.6, 95.6, 51.7。其中酯羰基与嘧啶环上酮羰基碳的信号峰分别为 δ: 167.0, 161.1, 与硫原子相连的嘧啶环碳的信号峰为 δ 157.6, 酯基中甲氧基碳原子的信号峰为 δ 51.7, 其余分别为苯环、吡唑环、吡唑环碳原子的信号峰, 其中 δ 132.8, 120.0 分别为苯环上两两对称的碳的重叠碳信号峰。HRMS 谱图显示 C₂₁H₁₅N₅O₃S [M-H]⁻ 计算值 416.0817, 测量值 416.0820, 可以确认为化合物 **5m** 的分子离子峰。

1.3 反应机理

含吡唑的吡唑并[3,4-*d*]嘧啶类化合物的反应机

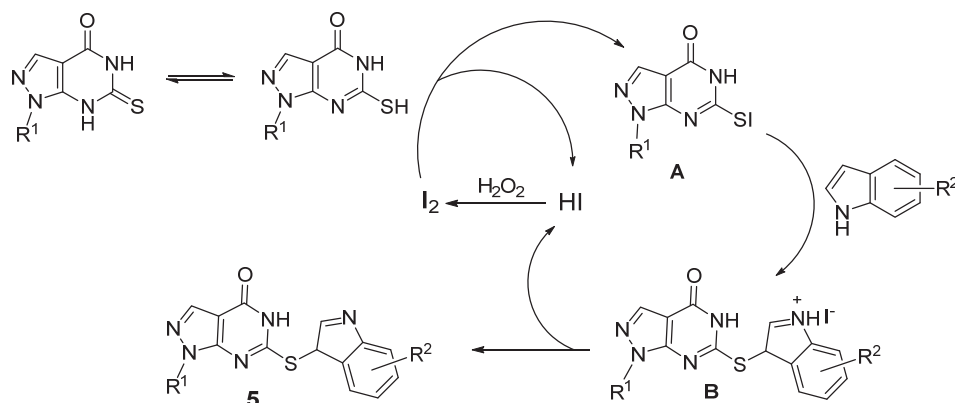


图2 反应机理

Figure 2 Proposed mechanism

理^[28](图2)推测如下: 首先, 吡唑并[3,4-*d*]嘧啶母环上的硫代羰基互变为烯醇巯基, 巯基与 I_2 反应生成亲电中间产物 **A**, **A** 与吲哚反应得到中间体 **B**, **B** 重排脱去 HI 得到目标化合物 **5**, 反应生成的 HI 被 H_2O_2 氧化成 I_2 继续参与反应。

1.4 化合物的抗肿瘤活性研究

以 HeLa, MGC-803, MCF-7, BEL-7404 四种肿瘤细胞为受试细胞, 采用噻唑蓝(MTT)法对 13 个化合物进行了肿瘤抑制活性评价. 羟基喜树碱(CPT)和依托泊苷(Etoposide)作为阳性对照. 测试结果如表 1 所示. 通过分析比较其 IC_{50} 值发现: 目标化合物均对 MGC-803 和 MCF-7 肿瘤细胞表现出较好的抑制活性, 对 HeLa 和 BEL-7404 肿瘤细胞抑制活性较差, 且当目标化合物 R_1 基团为 Ph 时肿瘤抑制活性强于 H. 其中, 化合物 **5i**, **5l** 对 MGC-803 肿瘤细胞有较好活性, 其 IC_{50} 值分别为 $(7.82 \pm 1.06) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $(14.5 \pm 0.47) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 化合物 **5m** 抗肿瘤活性最好, 对 HeLa, MGC-803 和 MCF-7 三种肿瘤细胞 IC_{50} 值均小于 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 MCF-7 的 IC_{50} 值为 $(4.02 \pm 0.92) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 优于对照药物依托泊苷 $[(10.1 \pm 0.62) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 和羟基喜树碱 $[(5.93 \pm 0.56) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$. 化合物 **5m** 可以作为一个潜力抗癌分子进行进一步研究。

1.5 拓扑异构酶活性测试

1.5.1 拓扑异构酶 I 活性测试

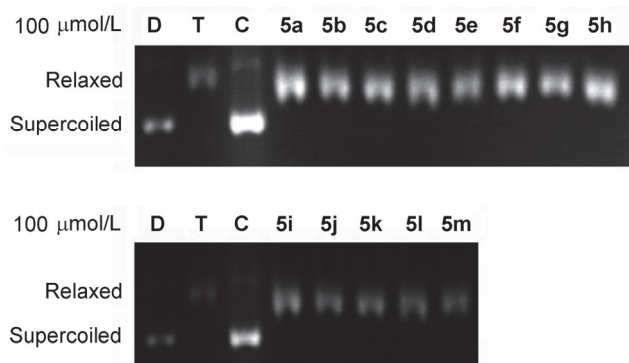
适当实验条件下, Topo I 可以使 DNA 解旋, 变成松弛状态的 DNA, 若化合物 **5a~5m** 能抑制 Topo I 活性, 超螺旋态的 pBR322 质粒 DNA 将无法解旋成松弛型 DNA. 由图 3 可知, 化合物 **5** 在浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 Topo I 没有表现出抑制活性。

1.5.2 拓扑异构酶 II 活性测试

适当实验条件下, Topo II 可以使 DNA 解旋, 变成松弛状态的 DNA, 同理, 若化合物 **5a~5m** 能抑制 Topo II

表 1 化合物 **5a~5m** 体外肿瘤抑制活性 IC_{50} 值Table 1 Anticancer activity of compounds **5a** to **5m** as IC_{50}

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$			
	HeLa	MGC-803	MCF-7	BEL-7404
5a	48.11 ± 0.83	27.97 ± 0.88	38.42 ± 0.92	>60
5b	>60	>60	59.55 ± 0.67	>60
5c	>60	>60	>60	>60
5d	47.17 ± 1.34	>60	>60	>60
5e	>60	42.81 ± 1.14	31.12 ± 0.77	>60
5f	>60	48.68 ± 0.53	49.48 ± 1.07	>60
5g	>60	44.01 ± 1.13	52.90 ± 1.65	>60
5h	>60	34.76 ± 0.55	59.92 ± 0.80	>60
5i	41.86 ± 0.58	7.82 ± 1.06	56.66 ± 0.75	>60
5j	>60	37.51 ± 0.71	>60	>60
5k	>60	>60	40.89 ± 0.92	>60
5l	43.27 ± 1.65	14.5 ± 0.47	26.26 ± 0.83	>60
5m	14.85 ± 1.17	28.11 ± 3.60	4.02 ± 0.92	>60
CPT	3.26 ± 0.30	4.35 ± 0.47	5.93 ± 0.56	13.64 ± 0.39
Etoposide	3.02 ± 0.80	2.61 ± 0.74	10.1 ± 0.62	9.45 ± 1.38

图3 化合物 **5a~5m** 对 Topo I 的抑制活性Figure 3 Enzymatic inhibitory activities of compounds **5a~5m** against Topo I

D: pBR322 DNA; T: pBR322 DNA+Topo I; C: pBR322 DNA+Topo I+CPT; **5a~5m**: pBR322 DNA+Topo I+compounds **5a~5m**

活性, 超螺旋态的 pBR322 质粒 DNA 将无法解旋成松弛型 DNA. 由图 4 可知, 化合物 **5a~5m** 在浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 Topo II 表现出较强抑制活性. 化合物 **5a~5m** 系列为 Topo II 选择性抑制剂。

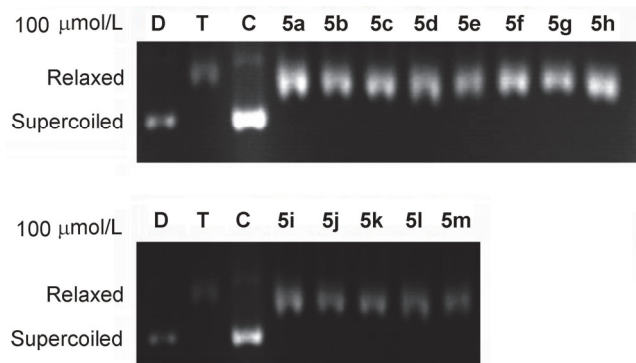


图4 化合物 **5a**~**5m** 对 Topo II 的抑制活性

Figure 4 Enzymatic inhibitory activities of compounds **5a**~**5m** against Topo II

D: pBR322 DNA; T: pBR322 DNA + Topo II; E: pBR322 DNA + Topo II + Etoposide; **5a**~**5m**: pBR322 DNA + Topo II + compounds **5a**~**5m**

1.6 分子对接研究

考察了化合物 **5m** 和 Etoposide 与人类 Topo II (PDB ID: 3QX3) 的对接研究结果, 从理论角度分析了化合物 **5m** 与 Topo II 的活性位点关键残基的结合模式。

图5为DNA-Etoposide-Topo II复合物的配体0.5 nm范围内的2D结构图, 从图中可以看出: Etoposide 被 DC7、DG11、DG13、GLN778 和 ASP479 等残基包围, 位于 Topo II 活性位点中心。其中, B 环与 E 环上的羟基分别与 DG13 和 ASP479 残基通过氢键相互作用, B 环中氧原子可以与 GLN778 残基形成氢键相互作用, C 环与 DG13 残基形成 $\pi-\pi$ 相互作用。

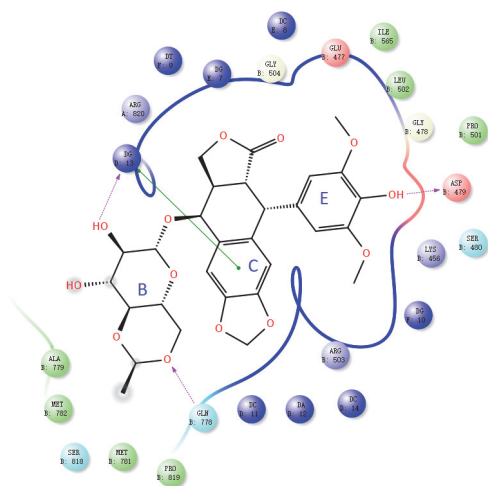


图5 Etoposide-Topo II 的结合模式图

Figure 5 Proposed binding mode of Etoposide with Topo II

图6为DNA-化合物 **5m**-Topo II复合物的配体0.5 nm范围内的2D结构图, 图中可以看出: 化合物 **5m** 上的吡啶环可以与 AGR503、DA12、DG13、DG10 等关键残基形成 $\pi-\pi$ 相互作用, 吡啶环上酯基与 LYS456 形成氢键相互作用, 另外吡啶并[3,4-*d*]嘧啶也可以与 Topo

II 产生疏水作用力。由此可知, 化合物 **5m** 可以进入 Topo II 的活性口袋, 与 Topo II-DNA 共价复合物结合稳定该复合物, 从而表现出 Topo II 的抑制活性。

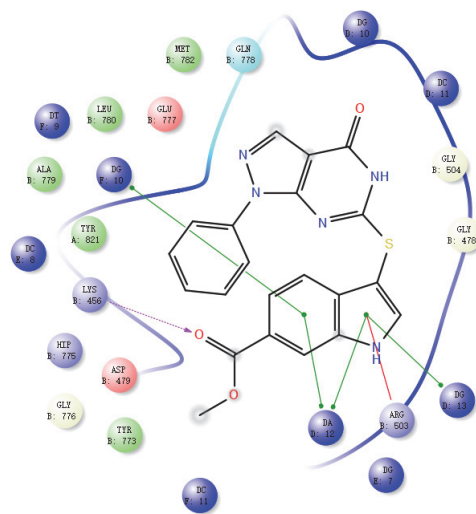


图6 化合物 **5m**-Topo II 的结合模式图

Figure 6 Proposed binding mode of compounds **5m** with Topo II

2 结论

本文利用药物设计中的生物活性基团拼接原理, 设计合成了13个含吡啶的吡啶并[3,4-*d*]嘧啶类衍生物。细胞抗增殖实验测试结果表明: 目标化合物整体表现出中等程度的抗肿瘤活性, 对 MCF-7、MGC-803 肿瘤细胞株敏感度高于 HeLa 和 BEL-7404。其中, 化合物 **5m** 表现出较好的体外抗肿瘤抑制活性, 对 MCF-7、MGC-80 和 HeLa 细胞的 IC_{50} 均小于 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 MCF-7 的 IC_{50} 达到了 $(4.02 \pm 0.92) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 优于对照药物依托泊苷 $[(10.1 \pm 0.62) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$ 和 羟喜树碱 $[(5.93 \pm 0.56) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$ 。化合物 R^1 基团为 Ph 时肿瘤抑制活性活性强于 H。拓扑异构酶抑制实验结果表明, 所有化合物在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 Topo I 未表现出抑制活性, 对 Topo II 表现出不同程度抑制活性, 此类化合物对 Topo II 有选择性抑制活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

SGW X-4 显微熔点仪(上海精密仪器科技有限公司, 未校正); Bruker AVIII-600 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker); Q EXACTIVE 高分辨质谱分析仪(Thermo Fisher Scientific); LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); W-CJ-ZDF 型超净台(上海贺德实验设备厂); HF90 型 CO_2 培养箱(河南力康仪器设备有限公司); Synergy HT 型酶标仪(美国 BioTek 公司);

DYY-12 型电泳仪(北京市六一仪器厂); Tanon-1600 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司). 其它试剂和溶剂未经特别说明均为国产或进口分析纯与生物级, 无水试剂均按常规方法处理.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 2 的合成

5-氨基-1*H*-吡唑-4-甲酸乙酯或 5-氨基-1-苯基-1*H*-吡唑-4-甲酸乙酯(**2**)合成方法路线参考文献[23, 24], 表征数据与文献一致.

3.2.2 化合物 3 的合成

向溶有 0.97 g (10 mmol) KSCN 的 20 mL 无水乙腈溶液中, 慢慢滴加苯甲酰氯(12 mmol)的乙腈溶液, 搅拌回流 45 min, 除去 KCl 得到黄色的苯甲酰异硫氰酸酯的乙腈溶液, 直接用于下一步反应.

将上述苯甲酰异硫氰酸酯的乙腈溶液缓慢滴至化合物 **2** 的乙腈溶液中, 80 °C 回流反应, 薄层色谱(TLC)监测反应进程, 约 6~8 h 反应结束. 将反应体系回收溶剂至干, 得到 5-[(3-苯甲酰基)硫脒基]-1*H*-吡唑-4-甲酸乙酯或 5-[(3-苯甲酰基)硫脒基]-1-苯基-1*H*-吡唑-4-甲酸乙酯(**3**), 直接用于下步反应.

3.2.3 化合物 4 的合成

称取 10 mmol 化合物 **3** 溶于 40 mL 2 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液中, 升温 100 °C 回流 30 min, 冷至室温后加入等体积水, 醋酸酸化得大量白色沉淀, 过滤后水洗, 晾干后乙醇重结晶, 得 6-硫代-1,5,6,7-四氢-4*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮或 1-苯基-6-硫代-1,5,6,7-四氢-4*H*-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**4**). 化合物 **4** 表征数据与文献值一致^[26,27], 产率 68%~79%.

3.2.4 化合物 5 的合成

将 1 mmol 化合物 **4**、1.1 mmol 取代吡啶、1.2 mmol H₂O₂ 放入 25 mL 圆底烧瓶, 加入 6 mL DMSO 溶解. 加热至 60 °C 后加入 0.2 mmol 的 I₂, TLC 监测反应进程约 0.5 h 反应结束. 将反应体系冷却至室温, 倒入饱和硫代硫酸钠水溶液中, 乙酸乙酯萃取(20 mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后回收溶剂, 二氯甲烷/甲醇体系(*V*:*V*=60:1)柱色谱分离得化合物 **5**. 产率 53%~75%.

6-[(5-甲氧基吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**5a**): 白色粉末, 收率 61%. m.p. 167.6~170.7 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.77 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.68 (s, 1H, Indole-NH), 8.18 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.74 (d, *J*=2.6 Hz, 1H, ArH), 7.54 (d, *J*=8.1 Hz, 2H, ArH), 7.50 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH), 7.12~7.14 (m, 1H, ArH), 7.01~7.04 (m, 3H, ArH), 6.92 (dd, *J*=8.8, 2.2 Hz, 1H, ArH), 3.68 (s, 3H, OCH₃); ¹³C

NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 161.6, 157.6, 154.5, 151.5, 138.1, 135.9, 133.8, 131.6, 129.2, 128.5, 126.0, 119.9, 113.1, 112.3, 104.6, 100.3, 94.1, 55.4. HRMS (ESI⁻) calcd for C₂₀H₁₄N₅O₂S [M-H]⁻ 388.0868, found 388.0867.

6-[(吡啶-3-基)硫基]吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**5b**): 白色粉末, 收率 68%. m.p. 247.6~249.8 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.42 (s, 1H, Pyrazole-NH), 12.32 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.79 (s, 1H, Indole-NH), 7.90 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.83 (s, 1H, Indole-CH), 7.48~7.51 (m, 2H, ArH), 7.19~7.22 (m, 1H, ArH), 7.10~7.12 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.3, 158.2, 153.8, 136.4, 135.3, 133.7, 129.1, 122.0, 120.1, 118.1, 112.2, 102.6, 94.2. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₃H₈N₅OS [M-H]⁻ 282.0450, found 282.0451.

6-[(5-甲氧基吡啶-3-基)硫基]吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**5c**): 白色粉末, 收率 62%. m.p. 193.7~196.2 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.45 (s, 1H, Pyrazole-NH), 12.28 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.67 (s, 1H, Indole-NH), 7.92 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.78 (s, 1H, ArH), 7.40 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 6.85 (dd, *J*=8.8, 2.1 Hz, 1H, ArH), 3.73 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.2, 157.7, 154.5, 153.6, 135.1, 134.2, 131.2, 129.6, 113.4, 112.5, 102.4, 100.2, 93.7, 55.3. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₄H₁₀N₅O₂S [M-H]⁻ 312.0555, found 312.0557.

6-[(1-甲基吡啶-3-基)硫基]吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**5d**): 白色粉末, 收率 72%. m.p. 281.3~284.4 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.44 (s, 1H, Pyrazole-NH), 12.33 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 7.91 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.84 (s, 1H, ArH), 7.57 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, ArH), 7.50 (d, *J*=7.9 Hz, 1H, ArH), 7.26~7.29 (m, 1H, ArH), 7.14~7.17 (m, 1H, ArH), 3.88 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.0, 157.8, 153.5, 147.2, 137.2, 135.2, 129.5, 122.2, 120.7, 118.6, 110.7, 102.5, 92.9, 32.7. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₄H₁₀N₅OS [M-H]⁻ 296.0606, found 296.0605.

6-[(6-氟吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡唑并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮(**5e**): 白色粉末, 收率 60%. m.p. 283.1~285.7 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.86 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.87 (s, 1H, Indole-NH), 8.19 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.83 (d, *J*=2.5 Hz, 1H, ArH), 7.55 (dd, *J*=8.6, 5.4 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, *J*=7.9 Hz, 2H, ArH), 7.42 (dd, *J*=9.8, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.14~7.17 (m, 1H, ArH), 7.01~7.04 (m, 2H, ArH), 6.97~7.00 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 161.3, 159.3 (d, *J*=

235.7 Hz), 157.5, 151.4, 137.9, 136.6 (d, $J=12.9$ Hz), 136.0, 134.1, 128.4, 126.0, 125.7, 120.0 (d, $J=10.4$ Hz), 119.8, 108.8 (d, $J=24.4$ Hz), 104.5, 98.3 (d, $J=25.6$ Hz) 95.2. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₉H₁₁FN₅OS [M-H]⁻ 376.0668, found 376.0667.

6-[(5-甲基吡啶-3-基)硫基]吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5f**): 白色粉末, 收率 67%. m.p. 232.5~235.4 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.46 (s, 1H, Pyrazole-NH), 12.23 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.67 (s, 1H, Indole-NH), 7.95 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.76 (d, $J=2.3$ Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, ArH), 7.28 (s, 1H, ArH), 7.02 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, ArH), 2.36 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 162.8, 158.5, 153.8, 135.0, 133.6, 129.4, 129.2, 123.8, 117.8, 112.1, 99.9, 93.4, 54.9, 20.9. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₄H₁₀N₅OS [M-H]⁻ 296.0606, found 296.0605.

6-[(6-甲氧羰基吡啶-3-基)硫基]吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5g**): 白色粉末, 收率 53%. m.p. 270.5~272.9 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.41 (s, 1H, Pyrazole-NH), 12.45 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 12.17 (s, 1H, Indole-NH), 8.16 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 8.08 (s, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.73 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 7.59 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 3.88 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.9, 159.6, 157.7, 153.5, 137.2, 135.9, 135.1, 132.9, 123.4, 121.0, 118.4, 114.3, 102.6, 95.3, 51.9. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₅H₁₀N₅O₃S [M-H]⁻ 340.0504, found 340.0503.

6-[(6-氟吡啶-3-基)硫基]吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5h**): 白色粉末, 收率 66%. m.p. 231.5~235.2 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.45 (s, 1H, Pyrazole-NH), 12.11 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.84 (s, 1H, Indole-NH), 7.99 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.84 (s, 1H, ArH), 7.46~7.48 (m, 1H, ArH), 7.30 (dd, $J=9.8, 2.1$ Hz, 1H, ArH), 6.95~6.99 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.5, 159.3 (d, $J=235.8$ Hz), 158.0, 154.0, 139.1, 136.4 (d, $J=13.0$ Hz), 134.3, 125.7, 119.6 (d, $J=10.1$ Hz), 108.9 (d, $J=24.5$ Hz), 102.8, 98.5 (d, $J=26.0$ Hz), 94.9. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₃H₇FN₅OS [M-H]⁻ 300.0355, found 300.0356.

6-[(吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5i**): 白色粉末, 收率 56%. m.p. 250.3~253.3 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.81 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.81 (s, 1H, Indole-NH), 8.18 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.81 (d, $J=2.6$ Hz, 1H, Indole-CH), 7.62 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (d,

$J=7.9$ Hz, 2H, ArH), 7.27~7.30 (m, 1H, ArH), 7.10~7.15 (m, 2H, ArH), 6.96~6.98 (m, 2H, ArH). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.5, 157.6, 151.4, 138.0, 136.6, 135.9, 133.4, 129.0, 128.4, 126.0, 122.1, 120.3, 119.8, 118.6, 112.3, 104.6, 94.7. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₉H₁₂N₅OS [M-H]⁻ 358.0762, found 358.0762.

6-[(5-氯吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5j**): 白色粉末, 收率 65%. m.p. 259.4~261.3 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.86 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 12.00 (s, 1H, Indole-NH), 8.19 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.89 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, Indole-CH), 7.63 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.29 (dd, $J=8.7, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.12 - 7.15 (m, 1H, ArH), 7.00~7.03 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.2, 157.6, 151.4, 138.1, 136.0, 135.0, 130.4, 129.2, 128.5, 126.1, 125.2, 122.3, 119.9, 118.0, 114.0, 104.7, 94.7. HRMS (ESI⁻) calcd for C₁₉H₁₁ClN₅OS [M-H]⁻ 392.0373, found 392.0372.

6-[(1-甲基吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5k**): 白色粉末, 收率 65%. m.p. 234.1~236.2 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.79 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 8.18 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.81 (s, 1H, ArH), 7.68 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, ArH), 7.33~7.35 (m, 1H, ArH), 7.17~7.19 (m, 1H, ArH), 7.10~7.13 (m, 1H, ArH), 6.98~7.00 (m, 2H, ArH), 3.89 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.4, 157.6, 151.4, 138.1, 137.3, 137.0, 135.9, 129.4, 128.5, 126.1, 122.2, 120.5, 119.9, 118.8, 110.6, 104.6, 93.5, 32.9. HRMS (ESI⁻) calcd for C₂₀H₁₄N₅OS [M-H]⁻ 372.0919, found 372.0917.

6-[(5-甲基吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5l**): 白色粉末, 收率 69%. m.p. 254.8~256.6 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.78 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 11.69 (s, 1H, Indole-NH), 8.18 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 7.74 (d, $J=2.6$ Hz, 1H, Indole-CH), 7.49 (d, $J=7.6$ Hz, 3H, ArH), 7.36 (s, 1H, ArH), 7.10~7.14 (m, 2H, ArH), 7.00~7.02 (m, 2H, ArH), 2.35 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.4, 157.4, 151.4, 138.0, 135.9, 135.0, 133.4, 129.3, 129.1, 128.5, 126.0, 123.7, 119.9, 118.1, 112.0, 104.6, 93.6, 21.1. HRMS (ESI⁻) calcd for C₂₀H₁₄N₅OS [M-H]⁻ 372.0919, found 372.0925.

6-[(6-甲氧羰基吡啶-3-基)硫基]-1-苯基-吡啶并[3,4-*d*]嘧啶-4-酮 (**5m**): 白色粉末, 收率 75%. m.p.

295.4~296.5 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.91 (s, 1H, Pyrimidine-NH), 12.22 (s, 1H, Indole-NH), 8.27 (s, 1H, ArH), 8.19 (s, 1H, Pyrazole C=CH), 8.07 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, ArH), 7.75 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.10~7.13 (m, 1H, ArH), 6.93~7.95 (m, 2H, ArH), 3.90 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.0, 161.1, 157.6, 151.4, 138.0, 137.0, 136.1, 135.9, 132.8, 128.4, 126.1, 123.3, 121.0, 119.9, 118.6, 114.0, 104.6, 95.6, 51.7. HRMS (ESI^-) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ 416.0817, found 416.0820.

3.2.5 抗肿瘤活性测试

抗肿瘤活性测试采用 MTT 染色法测定^[29,30]. 于 96 孔板接种细胞悬液, 90 μL /孔, 细胞密度 2×10^4 个/mL, 37 °C, 5% CO_2 浓度的培养箱中过夜, 加 10 μL /孔相应浓度药物(100 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 44 h, 加噻唑蓝(MTT) 10 μL /孔培养 4 h, 从培养箱中取出, 吸出培养液, 加二甲基亚砜(DMSO) 100 μL /孔溶解 MTT, 酶标仪检测各孔 490 nm 波长处吸光值, 重复测量三次, 按照公式: 抑制率(%) = $1 - (\text{OD}_{\text{化合物}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{阴性}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$ 计算 IC_{50} 值.

3.2.6 拓扑异构酶抑制活性测试

拓扑异构酶 I 测试方法参照文献[29]. 拓扑异构酶 II 的提取与测试方法参照文献[29].

3.2.7 分子对接研究

本文选取人源 DNA 拓扑异构酶 II 晶体(PDB ID: 3QX3)作为受体模型, 以依托泊苷所处的位置作为活性口袋. 使用 Schrödinger Suite 中 Maestro 10.2 软件的 Glide 模块(软件由北京大学分子设计研究室提供支持)进行分子对接. 首先, 利用 LigPrep 工具对配体优化准备; 然后利用 Protein Preparation Wizard 模块准备受体蛋白: 能量优化, 修复氨基酸残基和 Loop 区, 加电荷、去水、加氢; 再用 Glide 模块中 Receptor Grid Generation 工具以原始配体为中心进行受体格点设置, 尺寸为 1.5 nm $\times$ 1.5 nm $\times$ 1.5 nm; 最后利用 Glide 模块中的 Ligand Docking 工具以 Glide-XP 模式进行分子对接.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 5a~5m

的核磁共振氢谱和碳谱、高分辨质谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Kumar, A.; Ahmad, I.; Chhikara, B. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1342.
- [2] Piotrowska, D. G.; Cieślak, M.; Królewskan, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1382.
- [3] Hassan, G. S.; Kadry, H. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6808.
- [4] Amir, M.; Javed, S.; Kumar, H. *Indian J. Pharm. Sci.* **2007**, *69*, 337.
- [5] Bakavoli, M.; Bagherzadeh, G.; Vaseghifar, M.; Shiri, A.; Pordel, M.; Mashreghi, M.; Pordeli, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 647.
- [6] Ali, A.; Taylor, G. E.; Ellsworth, K.; Harris, G.; Painter, R.; Lynn, L.; Young K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1824.
- [7] Raffa, D.; Maggio, B.; Plescia, F.; Cascioferro, S.; Raimondi, M. V.; Plescia, S.; Cusimano, M. G. *Arch. Pharm.* **2009**, *42*, 321.
- [8] El-Bendary, E. R.; Badria, F. A. *Arch. Pharm.* **2000**, *333*, 99.
- [9] Chern, J. H.; Shia, K. S.; Hsu, T. A.; Tai, C. L.; Lee, C. C.; Lee, Y. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2519.
- [10] Guccione, S.; Modica, M.; Longmore, J.; Shaw, D.; Barretta, G. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 59.
- [11] Xia, Y.; Chackalamannil, S.; Czarniecki, M.; Tsai, H.; Vaccaro, H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4372.
- [12] Angelucci, A.; Schenone, S.; Gravina, G. L.; Muzi, P.; Festuccia, C. *Eur. J. Cancer.* **2006**, *42*, 2838.
- [13] Manetti, F.; Santucci, A.; Locatelli, G. A.; Maga, G.; Spreafico, A.; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5579.
- [14] Spreafico, A.; Schenone, S.; Serchi, T.; Orlandini, M. Angelucci. A. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1560.
- [15] Celano, M.; Schenone, S.; Cosco, D.; Navarra, M.; Puxeddu, E.; Racanicchi, L. *Endocr. Relat. Cancer.* **2008**, *15*, 499.
- [16] Ismail, N.; Ali, E.; Ibrahim, D.; Serya, R. *Future J. Pharm. Sci.* **2016**, *2*, 20.
- [17] Chauhan, M.; Kumar, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5657.
- [18] Humphrey, G. R.; Kuethe, J. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2875.
- [19] Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 893.
- [20] Sharma, V.; Kumar, P.; Pathak, D. *J. Heterocycl. Chem.* **2010**, *47*, 491.
- [21] Sravanthi, T. V.; Manju, S. L. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *91*, 1.
- [22] Han, X.-Y.; Li, S.-B.; Liang, G.-C.; Song, Y.-L. *Acta Pharm. Sin.* **2017**, *52*, 113 (in Chinese). (韩晓燕, 李生彬, 梁国超, 宋亚丽, 药学报, **2017**, *52*, 113.)
- [23] Li, J.-F.; Zhu, Y.-Q.; Wang, X. *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, *44*, 749.
- [24] Heravi, M. M.; Nami, N.; Seifi, N. *Phosphorus Sulfur* **2006**, *181*, 591.
- [25] Reeves, W. P.; Rudis, J. A. *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 781.
- [26] Schenone, S.; Bruno, O.; Ranise, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2511.
- [27] Fabrizio, M.; Annalisa, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5579.
- [28] Zhang, H.; Bao, X.; Song, Y. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8885.
- [29] Han, X.-Y. *M.S. Thesis*, Hebei University, Baoding, **2017** (in Chinese). (韩晓燕, 硕士论文, 河北大学, 保定, **2017**.)
- [30] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

(Li, L.; Fan, Y.)