

## 2,4-二取代-5-(三氟甲基)吡啶类 FAK 抑制剂的 设计合成及生物活性研究

赵相欣,于思佳,秦桥花,吴天啸,王瑞峰,赵冬梅\*

(沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 设计合成 2,4-二取代-5-(三氟甲基)吡啶类局部黏着斑激酶(FAK)抑制剂,并对其酶抑制活性进行评价。方法 以 3-氟基-2-氟吡啶为起始原料,经过取代、还原、环合、酯化和偶联反应得到目标化合物 Z1~Z8。采用 HTRF 技术测试目标化合物对 FAK 的体外酶抑制活性,以 MTT 法检测细胞增殖抑制活性。结果与结论 合成了 8 个 2,4-二取代-5-(三氟甲基)吡啶类化合物,目标化合物的结构经  $^1\text{H-NMR}$  和 MS 谱确证;初步体外酶活性测试和 MTT 法检测细胞增殖抑制活性结果表明,8 个化合物均有良好的酶抑制活性和细胞增殖抑制活性,其中化合物 Z6 的体外酶抑制活性和细胞增殖抑制活性较强[FAK:IC<sub>50</sub> = 6.6 nmol·L<sup>-1</sup>, U87-MG:IC<sub>50</sub> = (6.66 ± 0.19) μmol·L<sup>-1</sup>, A549:IC<sub>50</sub> = (7.68 ± 3.41) μmol·L<sup>-1</sup>],具有进一步研究价值。

**关键词:**黏着斑激酶;FAK 抑制剂;吡啶类衍生物

**中图分类号:**R914 **文献标志码:**A

癌症是影响人类健康的第二大疾病,仅次于心脏病<sup>[1]</sup>。在过去的几十年里,医疗事业迅速发展,但发现新型有效的抗癌药仍然是一项艰巨的任务,需要针对癌症的靶标进行有目的性的药物研发<sup>[2]</sup>。

局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种大小为 125 kDa 非受体酪氨酸激酶,可调节细胞粘附、迁移、增殖和存活,从而影响细胞结构和功能<sup>[3]</sup>。FAK 需要依赖细胞表面跨膜蛋白整合素去发挥它的蛋白功能。在它的蛋白一级结构中主要包含 3 个区域,N 端区域、中心激酶区域和 C 端区域。N 端区域包括 4.1-埃兹蛋白-根蛋白-莫桑蛋白(4.1-Ezrin-Radixin-Moesin, FERM)区、脯氨酸富集区 1 以及自然磷酸化位点,FAK 主要通过该结构域来发挥其脚手架功能,调控蛋白与蛋白的相互作用,触发下游一系列的信号转导通路。中心激酶区包含两个重要的 FAK 磷酸化位点 Tyr576 和 Tyr577,它们能够在整合素的介导下活化,通过 Src 在 FAK 的中心激酶区催化激活。当两个酪氨酸位点被完全激活时,FAK 被完全激活。C 端的局部粘附靶向结构域(focal adhesion target, FAT)是 FAK 有效定位

于黏着斑区域所必需的结构<sup>[4-5]</sup>。FAK 除了调节正常细胞活动(如粘附、迁移和存活)外,还与癌细胞的侵袭、转移和存活有关<sup>[6]</sup>。已在临床上观察到原发性人肝细胞癌、人大肠癌、人卵巢癌和人乳腺癌中 FAK 的过度表达,这些都表明 FAK 在癌症发展中的作用<sup>[7-10]</sup>。因此,以 FAK 为靶点的抗癌药物研究具有重要的意义。

### 1 目标化合物的设计及合成路线

目前已经有多家公司和研究机构以 FAK 为靶点进行的研究,一些选择性 FAK 抑制剂已经进入临床或临床前研究,如图 1 所示,TAE-226、VS-4718、VS-6063 和 PF-562271 都是 FAK 的 ATP 竞争性抑制剂,其对 FAK 表现出高效的抑制活性,且具有有效的抗肿瘤效果。

如图 2 所示,目前报道的大部分 FAK 抑制剂为二氨基嘧啶母核,通过分子对接模拟显示,嘧啶 N 和苯胺 NH 与铰链区 Cys502 形成氢键相互作用而锚定在铰链区,同时右侧的 N-甲基磺酰胺片段朝向活化环区域并且与 DFG 基序的 Asp564 形成氢键相互作用,可见同铰链区结合的药效团片段和与 DFG 基序结合的药效团片段是 FAK

收稿日期:2020-09-22

作者简介:赵相欣(1995-),男(汉族),陕西汉中,硕士研究生, Tel:13201849369, E-mail:zhaoxx95@163.com;  
\*通信作者:赵冬梅(1967-),女(汉族),辽宁黑山人,教授,博士生导师,主要从事抗肿瘤和心血管系统药物的设计与合成研究, Tel:13386833267, E-mail:dongmeiz-67@163.com。

抑制剂最重要的两个药效团特征。因此,本文作者在该类化合物的设计中,将保持 2,4-二氨基吡啶母核和 *N*-甲基-*N*-苯基甲磺酰胺片段。文献中报导的 FAK 抑制剂中伸向溶剂区的部分大多都

是含不同取代基的苯环,并未对五元芳香杂环和芳香稠环进行构效考察,因此本文作者在 R 部位引入 *N*-取代吡啶或者苯并咪唑等结构来进行构效考察。

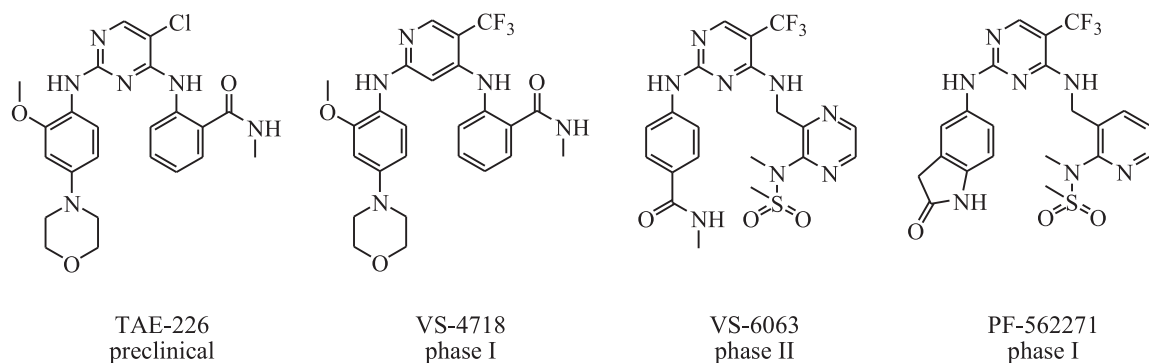


Figure 1 Structures of some potent and selective FAK inhibitors

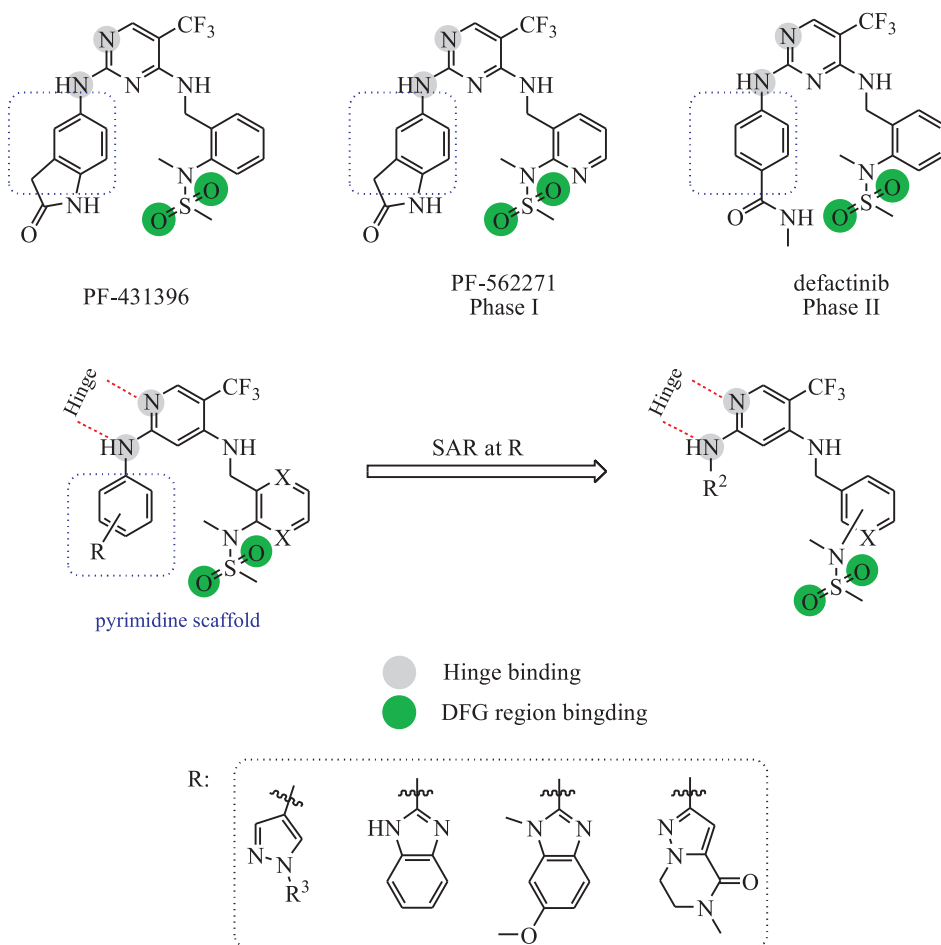


Figure 2 Designing strategy of the 2,4-disubstituted pyridine FAK inhibitors

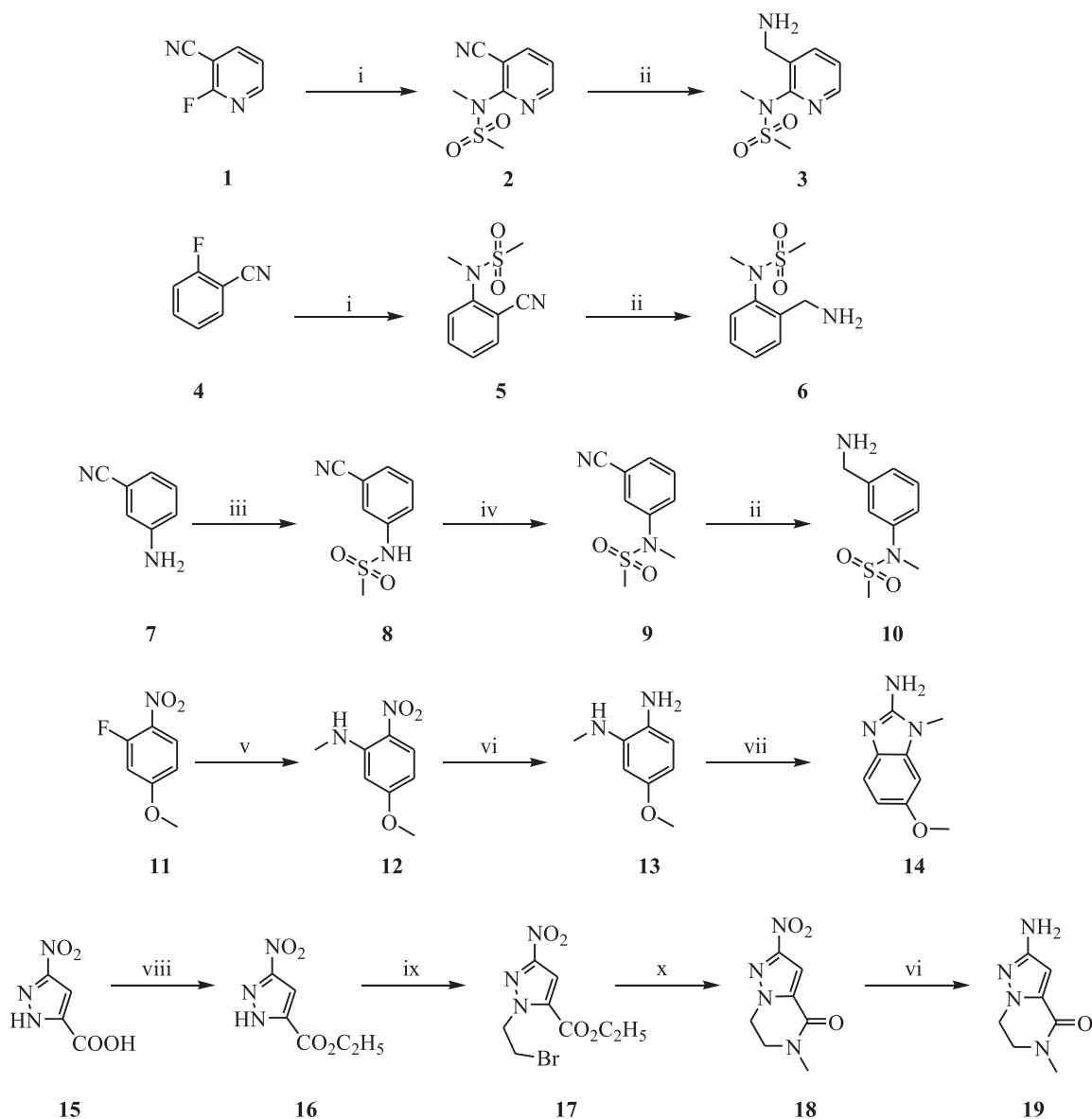
中间体 3、6、10、14 和 19 的合成路线如图 3 所示:以 3-氰基-2-氟吡啶(1)为起始原料,与 *N*-

甲基磺酰胺发生取代反应得到中间体 2,2 与硼烷发生还原反应得到中间体 3。以 2-氟苯腈(4)

为起始原料,与 *N*-甲基甲磺酰胺发生亲核取代反应得到中间体 **5**,**5** 在四氢呋喃 (THF) 中与硼烷发生还原反应得到中间体 **6**。以 3-氨基苯腈 (**7**) 为起始原料,与甲基磺酰氯发生取代反应得到中间体 **8**,然后与碘甲烷经取代反应得到中间体 **9**,**9** 与硼烷发生还原反应得到中间体 **10**。2-氟-4-甲氧基-1-硝基苯 (**11**) 与甲胺发生取代反应得到中间体 **12**,然后在钯炭、氢气的条件下发生还原反应得到中间体 **13**,**13** 与溴化氰发生环合反应得到中间体 **14**。以 3-硝基-1*H*-吡啶-5-羧酸 (**15**)

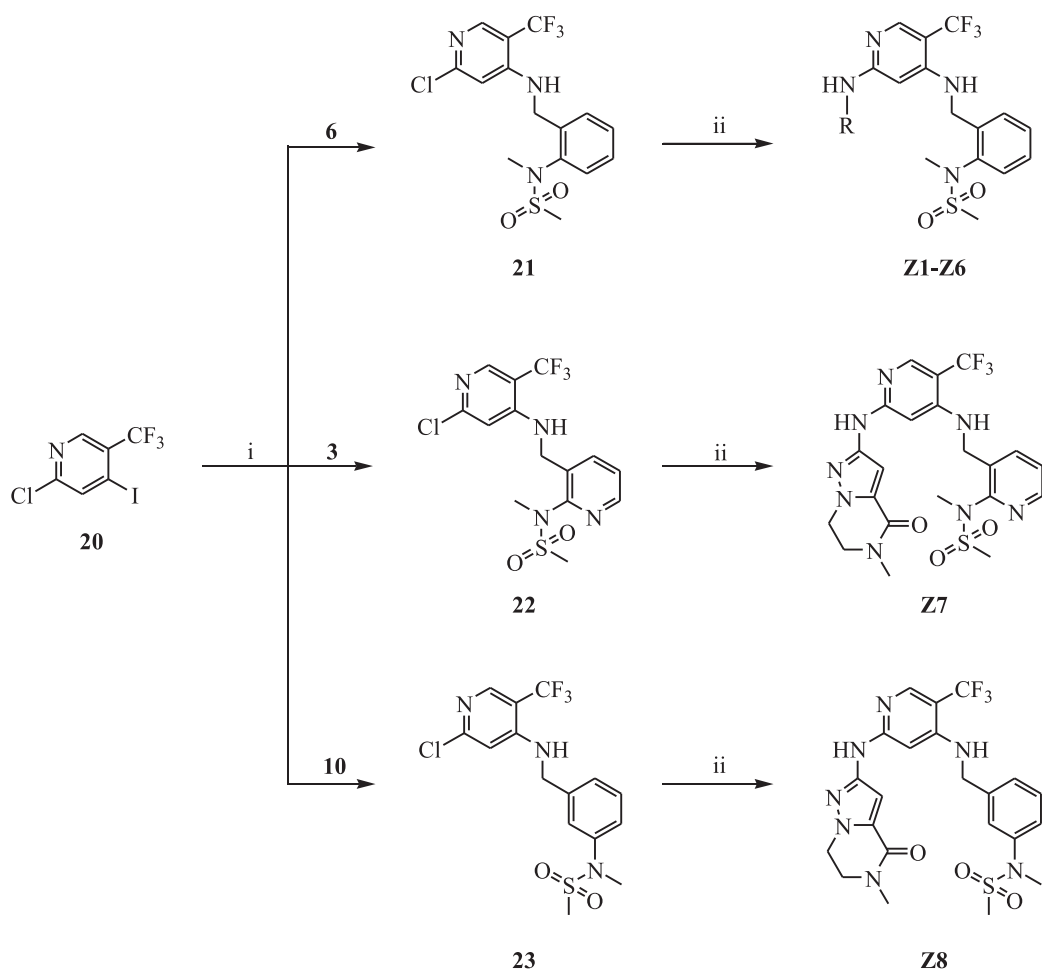
为起始原料,与乙醇发生酯化反应得到中间体 **16**,**16** 与 1,2-二溴乙烷发生取代反应得到中间体 **17**,**17** 与甲胺发生环合反应得到中间体 **18**,然后经还原反应得到中间体 **19**。

目标化合物的合成路线如图 4 所示:以 2-氯-4-碘-5-(三氟甲基)吡啶 (**20**) 为起始原料,与相应的芳香胺经 Buchwald 偶联反应得到中间体 **21**~**23**。**21**~**23** 分别与相应的芳香胺发生 Buchwald 偶联反应得到目标化合物 **Z1**~**Z8**。



Reagents and conditions: (i) *N*-methylsulfamide,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , MeCN,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ; (ii)  $\text{BH}_3/\text{Me}_2\text{S}$ , THF,  $45\text{ }^\circ\text{C}$ ; (iii) MsCl, DCM, pyridine,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; (iv)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; (v)  $\text{MeNH}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; (vi) Pd/C,  $\text{H}_2$ , MeOH,  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ; (vii) BrCN, MeOH:  $\text{H}_2\text{O} = 10:1$ ,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ ; (viii)  $\text{SOCl}_2$ , EtOH,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; (ix) ethylene dibromide,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetone,  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ; (x)  $\text{MeNH}_2$ , r. t.

Figure 3 Synthesis of intermediates **3**, **6**, **10**, **14** and **19**



Reagents and conditions: (i) different aromatic amines,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ , X-phos, dioxane,  $85^\circ\text{C}$ ; (ii) 14 or 19,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ , X-phos, dioxane,  $85^\circ\text{C}$ .

Figure 4 Synthesis route of compounds Z1 - Z8

## 2 合成实验

实验中所使用的试剂未经注明均为分析纯, 所用有机溶剂均经常规方法纯化保存。柱色谱硅胶为 200 ~ 300 目(50 ~ 71  $\mu\text{m}$ ), 薄层色谱用硅胶为 GF<sub>254</sub> 板(0.5 mm, 烟台江友硅胶开发有限公司)。核磁共振谱采用 Bruker Avance III - 400 测定(TMS 为内标, DMSO-*d*<sub>6</sub> 或  $\text{CDCl}_3$  为溶剂); 低分辨液相质谱(HPLC-MS)采用 Agilent 1100 - LC - MSD - Trap/SL 测定(电喷雾离子源, Agilent 公司); HRMS 采用 Bruker Micromass Time of Flight 测定(电喷雾离子源, Bruker 公司), 熔点选用 B - 540 熔点仪测定(瑞士 BUCHI 公司)。

### 2.1 *N*-(3-氰基吡啶-2-基)-*N*-甲基甲磺酰胺(2)的合成

将 *N*-甲基甲磺酰胺(0.04 mol)和碳酸铯(0.12 mol)加入到 250 mL 茄形瓶中, 加入乙腈

50 mL, 再加入 3-氰基-2-氟吡啶(1, 0.04 mol), 升温至  $80^\circ\text{C}$ , TLC 监测反应完全。反应液冷却至室温, 加入 25 mL 水, 二氯甲烷萃取(50 mL  $\times$  3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(30 mL  $\times$  3), 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化(石油醚-乙酸乙酯, 体积比 40:1), 得到黄色固体(2) 5.47 g, 收率 63.2%。

### 2.2 *N*-(3-(氨基甲基)吡啶-2-基)-*N*-甲基甲磺酰胺(3)的合成

将中间体 2(5.00 g, 0.02 mol)和  $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼烷( $\text{BH}_3$ )的四氢呋喃溶液(30 mL, 0.06 mol)加入到 250 mL 两颈瓶中, 氩气保护, 升温至  $45^\circ\text{C}$  反应过夜, TLC 监测反应完全。加入 40 mL 水淬灭反应, 二氯甲烷萃取(40 mL  $\times$  3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(30 mL  $\times$  3), 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 100:1), 得到白色粉末状固体

(3) 2.23 g, 收率 44.7%。

### 2.3 *N*-(2-氰基苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(5)的合成

将 2-氟苯腈(4, 5.00 g, 0.04 mol)、*N*-甲基甲磺酰胺(4.51 g, 0.04 mol)、碳酸铯(16.03 g, 0.05 mol)加入到 250 mL 茄形瓶中, 加入乙腈(50 mL), 升温至 80 °C 反应 10 h, TLC 监测反应完全, 加入 40 mL 水, 二氯甲烷萃取(40 mL × 3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(30 mL × 3), 无水硫酸钠干燥。抽滤后, 蒸除溶剂, 得到黄色固体(5) 7.94 g, 收率 92.1%。

### 2.4 *N*-(2-(氨基甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(6)的合成

将 *N*-(2-氰基苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(5, 7.94 g, 0.04 mol)和无水四氢呋喃(30 mL)加入到 250 mL 两颈瓶中, 氩气保护。随后加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 的硼烷四氢呋喃溶液(30 mL, 0.06 mol), 升温至 45 °C, TLC 监测反应完全。加入 40 mL 水淬灭反应, 二氯甲烷萃取(40 mL × 3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(30 mL × 3), 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 100:1), 得到淡黄色粉末固体(6) 6.98 g, 收率 85.7%。MS (ESI) *m/z*: 215.3 [M+H]<sup>+</sup>。

### 2.5 *N*-(3-氰基苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(9)的合成

将 3-氨基苄腈(7, 5.00 g, 0.05 mol)与吡啶(7.66 mL, 0.09 mol)加入到 250 mL 茄形瓶中, 加入二氯甲烷(50 mL), 然后向反应液中滴加甲磺酰氯(3.72 mL, 0.05 mol), 0 °C 下反应完全。蒸除溶剂, 加入乙酸乙酯(50 mL), 用盐酸和饱和氯化钠溶液 40 mL 洗涤, 收集乙酸乙酯层, 蒸除溶剂, 得到中间体 8, 无须纯化进行下一步反应。将中间体 8(9.40 g, 0.05 mol)、碳酸钾(19.90 g, 0.14 mol)加入到 250 mL 茄形瓶中, 加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺 20 mL, 在 0 °C 条件下, 滴加碘甲烷(3.29 mL, 0.05 mol), 反应 3 h, TLC 监测反应完全。加入 40 mL 水, 有白色固体析出, 抽滤, 得到白色固体(9) 4.21 g, 收率 41.7%。

### 2.6 *N*-(3-(氨基甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(10)的合成

以中间体 9 为原料, 合成方法同中间体 3, 经硅胶柱色谱纯化, 得到白色固体(10) 3.79 g, 收率

40.9%。

### 2.7 6-甲氧基-1-甲基-1*H*-苯并[*d*]咪唑-2-胺(14)的合成

将 2-氟-4-甲氧基-1-硝基苯(11, 5.00 g, 0.03 mol)加入到 100 mL 茄形瓶中, 加入质量比为 28% 的甲胺水溶液(30 mL), 0 °C 下反应完全。有白色固体析出, 抽滤, 烘干, 得到中间体 12。将 12(4.00 g, 0.02 mol)加入 50 mL 茄形瓶中, 加入甲醇(25 mL), 加入钯炭, 通入氢气, 升温至 40 °C 反应 6 h, TLC 监测反应完全。抽滤, 蒸除溶剂, 得到中间体 13。将 13(3.50 g, 0.02 mol)和溴化氰(2.10 g, 0.02 mol)加入到 100 mL 茄形瓶中, 再加入甲醇和水的混合液(甲醇-水, 体积比 10:1)(20 mL), 升温至 60 °C, TLC 监测反应完全。加入 20 mL 水, 二氯甲烷萃取(30 mL × 3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(25 mL × 3), 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 100:1), 得到白色固体(14) 2.24 g, 收率 43.3%。

### 2.8 2-氨基-5-甲基-6,7-二氢吡啶并[1,5-*a*]吡嗪-4(5*H*)-酮(19)的合成

将 5-硝基-3 吡啶甲酸(15, 5.00 g, 0.03 mol)和氯化亚砷(2.77 mL, 0.04 mol)加入到 100 mL 茄形瓶中, 加入无水乙醇(30 mL), 0 °C 条件下反应完全。抽滤, 收集滤饼, 烘干, 得到中间体 16。将 16(7.00 g, 0.03 mol)、碳酸钾(12.42 g, 0.09 mol)、1,2-二溴乙烷(5.61 g, 0.03 mol)加入 250 mL 茄形瓶中, 加入丙酮(60 mL), 升温至 40 °C, TLC 监测反应完全。加入 30 mL 水, 二氯甲烷萃取(40 mL × 3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(30 mL × 3), 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇, 体积比 150:1), 得到中间体 17。将 17(3.00 g, 0.01 mol)加入到 100 mL 茄形瓶中, 加入 28% (质量比)的甲胺水溶液(15 mL), 室温下反应完全。加入 20 mL 水, 用二氯甲烷萃取(30 mL × 3), 合并有机层, 饱和氯化钠溶液洗涤(25 mL × 3), 无水硫酸钠干燥。抽滤, 蒸除溶剂, 得到中间体 18。将 18(2.00 g, 0.01 mol)加入到 50 mL 茄形瓶中, 加入甲醇(15 mL), 再加入钯炭, 通氢气, 升温至 40 °C, 反应 6 h。抽滤, 蒸除溶剂, 得到白色固体(19) 1.68 g, 收率 31.7%。

## 2.9 *N*-(2-(((2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(**21**)的合成

将2-氯-4-碘-5-(三氟甲基)吡啶(**20**, 5.00 g, 16.29 mmol)、*N*-(2-(氨基甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(**6**, 3.43 g, 11.35 mmol)、2-二环己基磷-2,4,6-三异丙基联苯(X-Phos, 0.76 g, 1.60 mmol)、碳酸铯(15.60 g, 0.05 mol)、醋酸钡(0.18 g, 0.80 mmol)加入到250 mL茄形瓶中,加入1,4-二氧六环(50 mL),氩气保护,升温至85℃,TLC监测反应完全。加入30 mL水,用二氯甲烷萃取(50 mL×3),合并有机层,饱和氯化钠溶液洗涤(30 mL×3),无水硫酸钠干燥。抽滤,蒸除溶剂,经硅胶柱色谱纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比50:1),得到白色固体(**21**)2.65 g,收率42.1%。

## 2.10 *N*-(3-(((2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)吡啶-2-基)-*N*-甲基甲磺酰胺(**22**)的合成

以2-氯-4-碘-5-(三氟甲基)吡啶(**20**)、中间体**3**为原料,合成方法同中间体**21**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色固体(**22**)2.78 g,收率43.3%。

## 2.11 *N*-(3-(((2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(**23**)的合成

以2-氯-4-碘-5-(三氟甲基)吡啶(**20**)、中间体**10**为原料,合成方法同中间体**21**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色固体(**23**)2.56 g,收率40.4%。

## 2.12 *N*-甲基-*N*-(2-(((2-((1-甲基-1*H*-吡啶-4-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)甲磺酰胺(**Z1**)的合成

将中间体**21**(0.50 g, 1.00 mmol)、1-甲基-1*H*-吡啶-4-胺(0.12 g, 1.00 mmol)、2-二环己基磷-2,4,6-三异丙基联苯(X-Phos, 0.06 g, 0.13 mmol)、碳酸铯(1.26 g, 4.00 mmol)、醋酸钡(0.01 g, 0.06 mmol)加入20 mL微波管中,加入1,4-二氧六环(3 mL),并用氩气进行保护,于85℃微波反应30 min。加入10 mL水,用乙酸乙酯萃取(20 mL×3),合并有机层,饱和氯化钠溶液洗涤(20 mL×3),无水硫酸钠干燥。抽滤,蒸除溶剂,经硅胶柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比60:1),得到淡黄色粉末状固体(**Z1**)0.21 g,收率36.3%。

## 2.13 *N*-甲基-*N*-(2-(((2-((1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)甲磺酰胺(**Z2**)的合成

以中间体**21**、1-四氢-2*H*-吡喃-4-基-1*H*-吡啶-

4-胺为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到淡黄色粉末固体(**Z2**)0.19 g,收率32.9%。

## 2.14 *N*-甲基-*N*-(2-(((2-((1-(1-哌啶-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)甲磺酰胺(**Z3**)的合成

以中间体**21**、1-(哌啶-4-基)-1*H*-吡啶-4-胺为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色粉末状固体(**Z3**)0.21 g,收率36.1%。

## 2.15 *N*-(2-(((2-((1*H*-苯并[*D*]咪唑-2-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶基-4-基)氨基)甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(**Z4**)的合成

以中间体**21**、1*H*-苯并[*D*]咪唑-2-胺为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色粉末状固体(**Z4**)0.23 g,收率45.6%。

## 2.16 *N*-(2-(((2-((6-甲氧基-1-甲基-1*H*-苯并[*d*]咪唑-2-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)-*N*-甲基甲磺酰胺(**Z5**)的合成

以中间体**21**、中间体**14**为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色粉末状固体(**Z5**)0.21 g,收率42.7%。

## 2.17 *N*-甲基-*N*-(2-(((2-((5-甲基-4-氧代-4,5,6,7-四氢吡啶并[1,5-*a*]吡嗪-2-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)甲磺酰胺(**Z6**)的合成

以中间体**21**、中间体**19**为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色粉末状固体(**Z6**)0.15 g,收率31.2%。

## 2.18 *N*-甲基-*N*-(3-(((2-((5-甲基-4-氧代-4,5,6,7-四氢吡啶并[1,5-*a*]吡嗪-2-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)吡啶-2-基)甲磺酰胺(**Z7**)的合成

以中间体**22**、中间体**19**为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到白色粉末状固体(**Z7**)0.28 g,收率52.1%。

## 2.19 *N*-甲基-*N*-(3-(((2-((5-甲基-4-氧代-4,5,6,7-四氢吡啶并[1,5-*a*]吡嗪-2-基)氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基)氨基)甲基)苯基)甲磺酰胺(**Z8**)的合成

以中间体**23**、中间体**19**为原料,合成方法同目标化合物**Z1**,经硅胶柱色谱纯化,得到淡黄色粉末状固体(**Z8**)0.27 g,收率50.7%。

8个目标化合物的理化及波谱数据见表1。

Table 1 Physical and spectral data of target compounds Z1 – Z8

Compd.	mp/°C	ESI-MS or HRMS $m/z[M+H]^+$	$^1\text{H-NMR}(400\text{ MHz})\delta$
Z1	150 – 155	455. 1	8. 18(s,1H), 7. 47(dd, $J=6. 8, 2. 1$ Hz, 1H), 7. 36 – 7. 31(m, 4H), 7. 15(s, 1H), 5. 92(s, 1H), 5. 56(s, 1H), 5. 27(s, 1H), 4. 81(s, 1H), 4. 59(s, 1H), 3. 43(s, 3H), 2. 97(s, 3H), 2. 13(s, 3H)
Z2	163 – 167	525. 1	8. 18(s, 1H), 7. 47(dd, $J=6. 8, 2. 1$ Hz, 1H), 7. 36 – 7. 31(m, 4H), 7. 15(s, 1H), 5. 92(s, 1H), 5. 56(s, 1H), 5. 27(s, 1H), 4. 81(s, 1H), 4. 59(s, 1H), 3. 43(s, 3H), 2. 97(s, 3H), 2. 13(s, 3H)
Z3	170 – 172	524. 2	8. 07(s, 1H), 7. 52(s, 1H), 7. 38 – 7. 33(m, 3H), 7. 29 – 7. 27(m, 1H), 7. 20(s, 1H), 6. 31(s, 1H), 5. 70(s, 1H), 5. 16(s, 1H), 4. 57(d, $J=5. 7$ Hz, 2H), 4. 15 – 4. 07(m, 1H), 3. 22 – 3. 16(m, 5H), 2. 97(s, 3H), 2. 72(td, $J=12. 5, 2. 2$ Hz, 2H), 2. 08(d, $J=13. 7$ Hz, 2H), 1. 87 – 1. 77(m, 2H)
Z4	180 – 183	491. 1	11. 87(s, 1H), 10. 49(s, 1H), 8. 21(s, 1H), 7. 59(dd, $J=7. 3, 1. 8$ Hz, 1H), 7. 38 – 7. 34(m, 4H), 7. 28 – 7. 24(m, 1H), 7. 00(dd, $J=5. 8, 3. 1$ Hz, 2H), 6. 96(t, $J=5. 7$ Hz, 1H), 6. 24(s, 1H), 4. 61(dd, $J=18. 7, 3. 6$ Hz, 2H), 3. 35(s, 3H), 3. 12(s, 3H)
Z5	187 – 189	535. 1	8. 16(s, 1H), 7. 56 – 7. 50(m, 1H), 7. 37(dd, $J=5. 7, 3. 6$ Hz, 2H), 7. 32(dd, $J=6. 3, 2. 7$ Hz, 1H), 7. 24 – 7. 16(m, 2H), 6. 74(d, $J=7. 7$ Hz, 1H), 6. 68(s, 1H), 5. 26(s, 1H), 4. 67(s, 2H), 3. 86(s, 3H), 3. 66(s, 3H), 3. 34(s, 3H), 2. 98(s, 3H)
Z6	175 – 177	524. 1	9. 45(s, 1H), 8. 09(s, 1H), 7. 56(d, $J=5. 5$ Hz, 1H), 7. 38 – 7. 33(m, 2H), 7. 26(d, $J=5. 0$ Hz, 1H), 6. 70(s, 1H), 6. 66(s, 1H), 6. 17(s, 1H), 4. 56(d, $J=7. 1$ Hz, 2H), 4. 15(s, 2H), 3. 72(t, $J=5. 8$ Hz, 2H), 3. 26(s, 3H), 3. 11(s, 3H), 2. 97(s, 3H)
Z7	205 – 208	525. 1639	8. 42(d, $J=3. 2$ Hz, 1H), 8. 13(s, 1H), 7. 77(d, $J=6. 9$ Hz, 1H), 7. 62(s, 1H), 7. 32(dd, $J=7. 7, 4. 8$ Hz, 1H), 6. 62(s, 1H), 6. 52(s, 1H), 5. 33(s, 1H), 4. 70(d, $J=5. 8$ Hz, 2H), 4. 27 – 4. 22(m, 2H), 3. 74 – 3. 70(m, 2H), 3. 25(s, 3H), 3. 10(d, $J=3. 8$ Hz, 3H), 3. 07(s, 3H)
Z8	220 – 224	524. 1686	8. 18 – 8. 11(m, 2H), 7. 42 – 7. 37(m, 2H), 7. 28(d, $J=5. 7$ Hz, 2H), 6. 62(s, 1H), 6. 55(s, 1H), 5. 27(s, 1H), 4. 46(d, $J=5. 1$ Hz, 2H), 4. 26(t, $J=5. 9$ Hz, 2H), 3. 75(t, $J=6. 0$ Hz, 2H), 3. 28(s, 3H), 3. 12(s, 3H), 2. 78(s, 3H)

### 3 活性评价

#### 3.1 体外酶抑制活性测试

HTRF KinEASE™ – TK 试剂盒购自 Cisbio Bioassays; 384 孔低体积微量培养板购自 ThermoFisher Scientific, FAK 的纯化酶购自 Carna Biosciences。

利用均相时间分辨荧光技术(HTRF)测试目标化合物对 FAK 的酶抑制活性,以 FAK 抑制剂 TAE-226 作为阳性对照化合物<sup>[13]</sup>。测试结果见表 2。

进行体外酶活性测试时,选取含有铕( $\text{Eu}^{3+}$ )的穴状化合物作为能量供体,该供体连接在可以识

别底物上磷酸基团的特异性抗体(TK Antibody)上,能量受体 XL-665 与底物蛋白通过链霉亲和素-生物素发生特异性的结合。当酶使底物蛋白磷酸化后,特异性抗体识别磷酸基团并结合在底物蛋白上,此时, XL-665 可以被受体发射的 620 nm 的发射光激发,发射出 665 nm 的发射光<sup>[11-12]</sup>。

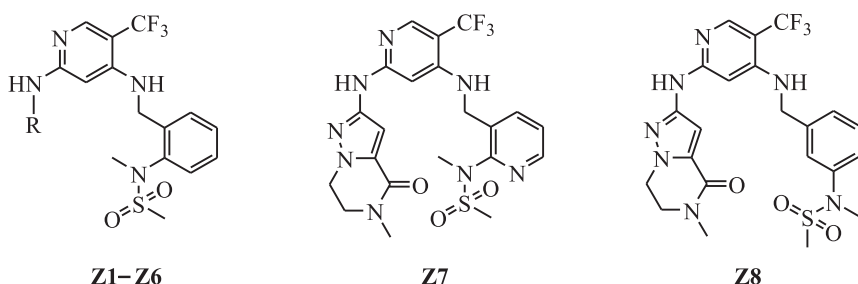
实验操作中,用激酶反应缓冲液从  $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的 DMSO 储备液中逐步稀释化合物。IC<sub>50</sub> 的测量是重复进行的,对于每一个试验,将  $4\text{ }\mu\text{L}$  化合物、 $4\text{ }\mu\text{L}$  混合物 1(ATP + 底物 TK)和  $2\text{ }\mu\text{L}$  的激酶( $0.111\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )添加到测定孔中,将测定板在  $25\text{ }^\circ\text{C}$  下孵育 50 min,然后通过添加  $10\text{ }\mu\text{L}$

混合物 2 (Sa-XL665 + TK-Antibody-Cryptate) 终止反应, 在最终孵育 (室温下 60 min) 后, 使用 Infinite® F500 微孔板读数器 (瑞士 Tecan) 在 620 nm (Cryptate) 和 665 nm (XL665) 处测量荧光, 获得 HTRF 信号, 计算 665 nm 和 620 nm 下每个孔的信号比率 (665/620)。对  $IC_{50}$  的测量值使用 Prism 软件 (GraphPad 软件) 进行归一化和拟合。

如表 2 所示, 当 R 为 *N*-甲基吡唑环取代时 (Z1), 对 FAK 有较强的酶抑制活性 ( $IC_{50} = 20.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 将甲基替换为四氢吡喃基 (Z2) 活性保持 ( $IC_{50} = 24.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 替换为哌啶基

(Z3) 活性提升 ( $IC_{50} = 8.7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。当 R 为苯并咪唑结构 (Z4) 时, 酶抑制活性  $IC_{50} = 19.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当 R 为 6-甲氧基-1-甲基-1*H*-苯并[*d*]咪唑 (Z5) 时, 活性相对较差 ( $IC_{50} = 61.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。当 R 为 5-甲基-6,7-二氢吡唑并[1,5-*a*]吡嗪-4(5*H*)-酮 (Z6) 时, 活性较强 ( $IC_{50} = 6.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。因此, 认为化合物 Z6 的 R 基团为优势片段, 对右侧片段进行结构修饰, 在苯环上引入 N 原子, 或者将苯环上的取代基从邻位换到间位, 得到化合物 Z7 和 Z8。从测试结果可以看出, 化合物 Z6、Z7 和 Z8 的酶抑制活性和阳性对照相当。

Table 2 The results of enzyme inhibitory activity of target compounds *in vitro*



Compd.	R	$IC_{50}/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Compd.	R	$IC_{50}/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$
Z1		20.6	Z5		61.3
Z2		24.9	Z6		6.6
Z3		8.7	Z7		9.3
Z4		19.6	Z8		14.2
TAE-226		7.0			

The  $IC_{50}$  values were presented as the mean ( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) values from two separate experiments.

### 3.2 细胞增殖抑制活性测试

将 A549 (人肺癌细胞)、MDA-MB-231 (人乳腺癌细胞) 和 U-87MG (人胶质瘤细胞) 细胞在 96 孔板中以 4000 ~ 5000 个每孔的密度培养, 并在 37 °C、体积分数 5% 的  $\text{CO}_2$  湿润环境中培养 24 h。将测试的化合物以指示的最终浓度添加到培养基中, 孵育 72 h, 加入新鲜的 MTT 溶液并孵育 4 h。将每个孔中的甲臞晶体溶解在 150  $\mu\text{L}$

DMSO 中, 并使用 Thermo Reade (Multiskan GO) 在  $\lambda = 490 \text{ nm}$  处测量每个测试孔的吸光度。化合物 Z2、Z3、Z4 和 Z6 对 FAK 高表达的 U87-MG 和 A549 肿瘤细胞株的增殖抑制活性如表 3 所示。其中, 化合物 Z4 对 U87-MG ( $IC_{50} = 6.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 A549 ( $IC_{50} = 7.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 这两种肿瘤细胞的抑制作用最强。



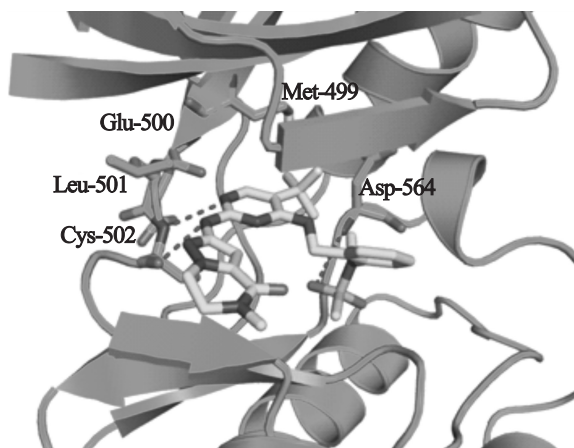
**Table 3** The results of antiproliferative activity of target compounds *in vitro*

Compd.	IC <sub>50</sub> / (μmol·L <sup>-1</sup> )	
	U-87MG	A549
<b>Z2</b>	12.47 ± 0.21	14.61 ± 0.51
<b>Z3</b>	11.75 ± 0.18	24.87 ± 0.77
<b>Z4</b>	6.66 ± 0.15	7.68 ± 0.24
<b>Z6</b>	8.68 ± 0.19	34.02 ± 3.41
TAE-226	1.57 ± 0.11	1.60 ± 0.03

Cell proliferation was measured using the MTT assay after incubation with the compounds for 72 h. The mean values of three independent experiments ± SD are reported.

## 4 结果与讨论

初步的活性测试结果显示,化合物 **Z6** 的体外酶抑制活性和细胞增殖抑制活性较强,因此对化合物 **Z6** 与 FAK 蛋白 ATP 结合位点进行了分子对接研究。图 5 显示,吡啶母核与铰链区的 Cys-502 形成典型的供体-受体氢键相互作用,三氟甲基与门控残基 Met-499 形成疏水相互作用。*N*-甲基磺酰胺片段朝向活化环区域并且与 DFG 基序的 Asp-564 形成氢键相互作用,是关键的药效团片段。



**Figure 5** Molecular docking mode of compound **Z6** with the FAK active site

### 参考文献:

[1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(9): 43–66.  
 [2] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1): 57–70.  
 [3] HALL J E, FU W, SCHALLER M D. Focal adhesion kinase: exploring FAK structure to gain insight into

function[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2011, 288(23): 185–225.

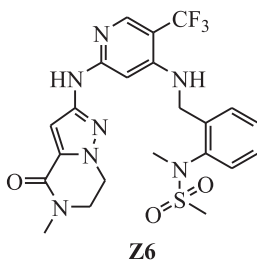
- [4] 何小蕾, 李洪娇, 方慧华, 等. 抗肿瘤新药靶——黏着斑激酶的研究进展[J]. 药学服务与研究, 2017, 17(2): 92–96.  
 HE X L, LI H J, FANG H H, et al. Advance in focal adhesion kinase, a new antitumor drug target[J]. Phram Care Res, 2017, 17(2): 92–96.  
 [5] 周孟, 邓连力, 廖祥明, 等. 局部黏着斑激酶抑制剂的研究进展[J]. 中南药学, 2017, 15(11): 1555–1562.  
 ZHOU M, DENG L L, LIAO X M, et al. Research progress in focal adhesion kinase inhibitors[J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(11): 1555–1562.  
 [6] GOLUBOVSKAYA V M, KWEH F A, CANCE W G, et al. Focal adhesion kinase and cancer[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(1): 503–510.  
 [7] CAI L, HAN J, ZHUO X L, et al. Overexpression and significance of focal adhesion kinase in hepatocellular carcinoma and its relationship with HBV infection[J]. Med Oncol, 2009, 26(4): 409–414.  
 [8] LARK A L, LIVASY C A, CALVO B, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases; immunohistochemistry and real-time PCR analyses[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 215–222.  
 [9] JUDSON P L, HE X, CANCE W G, et al. Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma[J]. Cancer, 1999, 86(8): 1551–1556.  
 [10] YAO L A, LI K A, PENG W A, et al. An aberrant spliced transcript of focal adhesion kinase is exclusively expressed in human breast cancer[J]. Transl Med, 2014, 12(1): 136.  
 [11] WANG R F, YU S J, ZHAO X X, et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking study of novel thieno[3,2-*d*]pyrimidine derivatives as potent FAK inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2020, 188(1): 112024.  
 [12] KARAMAN M W, HERRGARD S, TREIBER D K, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 127–132.  
 [13] LAHA J K, DAYAL N, JAIN R, et al. Palladium-catalyzed regiocontrolled domino synthesis of *N*-sulfonyl dihydrophenanthridines and dihydrodibenzo[*c*, *e*]azepines: control over the formation of biaryl sulfams in the intramolecular direct arylation[J]. J Org Chem, 2014, 79(22): 10899–10907.

# Design, synthesis and biological activity evaluation of 2,4-disubstituted-5-(trifluoromethyl) pyrimidine as FAK inhibitors

ZHAO Xiang-xin, YU Si-jia, QIN Qiao-hua, WU Tian-xiao,  
WANG Rui-feng, ZHAO Dong-mei\*

(Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery (Shenyang Pharmaceutical University),  
Ministry of Education, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** Eight 2,4-disubstituted-5-(trifluoromethyl) pyrimidine compounds were designed and synthesized, and the inhibitory activities against FAK were evaluated. Starting from 2-fluoronicotinonitrile, the target compounds were obtained *via* substitution, reduction, cyclization, esterification and coupling reaction. The structures of the compounds were confirmed by ESI-MS and  $^1\text{H-NMR}$ . The preliminary biological activity evaluation tests *in vitro* showed that compound **Z6** had strong enzyme inhibitory activity and cell proliferation inhibitory activity [FAK:  $\text{IC}_{50} = 6.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , U87-MG:  $\text{IC}_{50} = (6.66 \pm 0.19) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , A549:  $\text{IC}_{50} = (7.68 \pm 3.41) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], owning further research value.



**Key words:** focal adhesion kinase; FAK inhibitor; pyridine derivatives

## 《中国药物化学杂志》变更刊期通知

《中国药物化学杂志》创刊于1990年,由沈阳药科大学和中国药学会共同主办,是国内唯一专门报道药物化学领域科研成果的专业性学术期刊,于2018年入选《中国核心期刊要目总览》。为满足学科发展需要,进一步加快科研成果传播速度和报道时效,促进学术交流,缩短报道周期并增大信息量,《中国药物化学杂志》已于2020年由双月刊变更为月刊(每期64页),并将于2021年将页码增至每期80页。

本刊以报道原创性药物基础性研究文章为主,设有研究论文、研究简报、新药信息、科研快报、专家述评、合成路线图解、综述等栏目,欢迎广大读者踊跃投稿。

《中国药物化学杂志》编辑部