文章编号:1005 - 0108(2026)04 - 0249 - 15 DOI:10.14142/j.cnki.cn21 - 1313/r.20250022

吡莫地韦衍生物的设计、合成及抗甲型流感病毒活性研究

杨 莹[1],刘淑娟[1],包 欢[1],李 飞[1*],李行舟[2*]
(1. 辽宁石油化工大学 石油化工学院,辽宁 抚顺 113001;
2. 军事医学研究院 国家安全特需药品全国重点实验室,北京 100850)

摘 要:目的 设计合成一系列含有磺酰二胺基团的甲型流感病毒 PB2 抑制剂,并评价其对 H1N1 和 H3N2 两种病毒的抑制活性。**方法** 以吡莫地韦为先导化合物,对其吡咯并吡啶片段进行优化,对双环[2.2.2]辛烷部分进行衍生化,并将羧基转化为磺酰二胺基团,设计合成了一系列新型 PB2 抑制剂。选取 H1N1 和 H3N2 两种病毒株,采用 MDCK 细胞病变效应抑制实验,对目标化合物进行体外抗流感病毒活性评价。**结果与结论** 共合成了 7 个目标化合物 **A** ~ **G**,其结构均经 ESI-MS 和 ^{1}H-NMR 谱确证。活性测试结果表明化合物 **A** ~ **C** 和 **G** 具有较强的抗流感病毒活性;其中 **G** 细胞毒性较低,安全性良好,可作为优选化合物进行深入研究。

关键词:PB2 抑制剂;吡莫地韦;甲型流感病毒
中图分类号:R914 **文献标志码:**A

流行性感冒简称流感,是由流感病毒感染引起的传染性疾病。流感病毒具有高致病性,临床表现轻重不一,严重可导致重症肺炎甚至死亡[1]。

全球范围内,季节性流感病毒每年可导致 300 ~ 500 万人感染,死亡人数达 25 ~ 50 万[2]。新型变异流感病毒还易引发全球性流感大流行,造成大规模人员伤亡[3]。

目前,美国疾病控制与预防中心批准的抗流感药物主要包括神经氨酸酶(neuraminidase,NA)抑制剂扎那米韦、奥司他韦、帕拉米韦,以及酸性聚合酶(polymerase acidic,PA)亚基抑制剂巴洛昔韦等[4]。虽然神经氨酸酶抑制剂可以有效治疗多种流感病毒,但存在明显耐药问题,且需在感染后 24 ~ 48 h 内及时用药才能发挥药效[5]。此外,临床中已陆续发现巴洛昔韦耐药流感毒株[6]。因此,开发作用机制新颖、疗效显著、耐药风险低且安全性良好的新型抗流感药物,具有十分重要的现实意义。

流感病毒包括甲、乙、丙、丁四种分型,其中甲型流感病毒是重症感染、季节性流行和偶发全球大流行的主要诱因。甲型流感病毒 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp)是由 PA、PB1 和 PB2 三个亚基组成的异源三聚体[7]。其中,PB2 亚基被认为是开发抗流感药物的理想靶点,原因主要有四点:1)PB2 的氨基酸序列在不同流感病毒株中高度保守,即使病毒发生抗原漂移或抗原转变,其结构和功能仍相对稳定,该特性使得靶向 PB2 的药物对 H1N1、H3N2 等多种流感病毒亚型具有广泛抑制活性[8];2)PB2 在人类细胞中没有同源蛋白,因此针对 PB2 的药物可以选择性地抑制病毒复制,对宿主细胞的生理功能影响较小,可有效降低药物的毒性和不良反应[9];3)PB2 可通过其帽结合结构域(cap-binding domain,CBD)介导的“夺帽”机制,抢夺宿主细胞 mRNA 的 5′端帽子结构以启动病毒 mRNA 合成,这一过程是流感病毒转录和复制的关键步骤,使得 PB2 成为病毒生命周期中不可或缺的组成部分[10];4)PB2 的氨基酸序列高度保守且功能关键,流感病毒难以通过基因突变产生耐药性。综上,PB2 抑制剂不仅具有较高的抗病毒活性,且不易引发病毒耐药[11]。

吡莫地韦(pimodivir,图 1)是由杨森制药公司研发的甲型流感病毒聚合酶 PB2 抑制剂,其具有很好的体外抗病毒活性,IC_{50} 值为 0.000 13 ~ 0.003 2 μmol·L^{-1}[9]。早期临床试验结果显示,吡莫地韦可有效缓解流感相关症状,并可显著缩短症状持续时间[12]。

收稿日期:2025 - 02 - 12
作者简介:杨莹(1999 -),女(汉族),四川成都人,硕士研究生; * 通信作者:李飞(1981 -),男(汉族),辽宁辽中人,博士,教授,主要从事精细化学品合成与开发; 李行舟(1970 -),男(汉族),河北迁安人,博士,研究员,主要从事抗病毒药物研究。

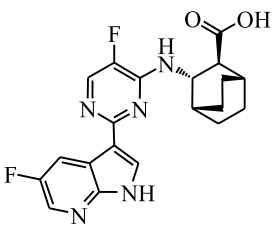


Figure 1 Structure of pimodivir

磺酰二胺基团(-NHSO$_2$NH-)是药物化学领域一类重要的药效团。该结构可同时作为氢键供体和受体,能够显著增强化合物与靶蛋白的相互作用。通过取代修饰可产生多种衍生物,如环状磺酰胺、磺酰亚胺、*N*-酰基磺酰胺等。相比酯类或酰胺类,磺酰胺具有更强的抗酶解能力,有助于改善药物代谢动力学特性。本研究将磺酰二胺基团引入吡莫地韦分子进行结构修饰,以期提高化合物与靶蛋白的结合能力。

1 目标化合物的设计

吡莫地韦可划分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三个结构片段(图2A)。对吡莫地韦与PB2蛋白(PDB ID:5WL0)的共晶结构(图2B)进行分析,可以发现片段Ⅰ的吡咯并吡啶环上的氮原子和亚氨基分别作为氢键受体和供体与Glu361和Lys376形成氢键作用[13],该芳香环还可与PB2帽结构域的His357、Phe404形成π-π堆积作用(图2C)[14]。片段Ⅲ的嘧啶环同样与PB2帽结构域的Phe323形成π-π堆积作用(图2D)[15]。片段Ⅱ中的双环[2.2.2]辛烷部分嵌入由Phe323、Phe325、Phe404和Met431形成的疏水空腔内(图2D)[16]。分子末端的羧基与Arg355形成盐桥,其氧原子分别与PB2帽结构域的His357和Gln406形成氢键作用(图2C)。但是羧基部分与PB2的结合作用力相对较弱,周围仍有较大空余空间(图2B)[14-15]。

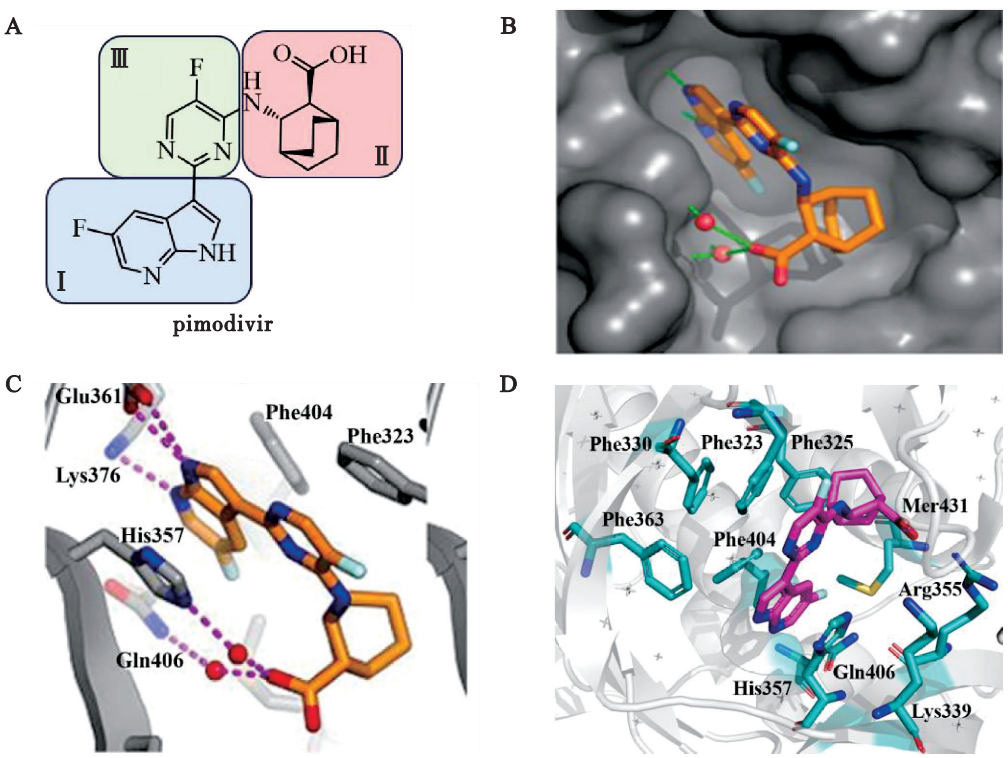


Figure 2 Docking diagrams of pimodivir and PB2 crystal complex(PDB ID:5WL0)

基于上述研究,本文作者保留了吡莫地韦结构中的片段Ⅲ,尝试对片段Ⅰ的吡咯并吡啶环和片段Ⅱ进行结构优化,主要设计思路如下:1)吡莫地韦的羧酸基团与PB2帽结构域的His357和Gln406发生相互作用时需要两个水分子[14],并且羧酸基团周边存在较大空余空间[15]。本研究将羧基替换为电子等排体磺酰二胺,其结构中氮上的氢原子易解离并维持负电荷,同时磺酰二胺空间体积大于羧基,可使化合物更好地与PB2帽结构域紧密结合,如化合物**A**~**C**(图3);2)片段Ⅰ的吡咯并吡啶环2位易被醛氧化酶氧化[17],进而生成活性氧与毒性代谢产物,引发肝肾损

伤[18]。所以本研究对该片段进行结构优化,将吡咯并吡啶环替换为 2 位羟基或氨基取代的咪唑并吡啶结构,该修饰可在保留原有与 PB2 相互作用的同时,阻断醛氧化酶介导的代谢途径[4]。其中,1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-醇可异构化为 1,3-二氢-2*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-酮,1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-胺会异构化为 1,3-二氢-2*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-亚胺。为统一表述,下文均以 1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-醇和 1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-胺指代上述两种结构,如化合物 **D** ~ **G**(图 3);3) 片段 Ⅱ 中的双环[2.2.2]辛烷部分可与 PB2 形成较强疏水作用,因此该结构予以保留,本研究通过引入其他环结构增大其空间体积,进一步增强与受体的疏水作用,如化合物 **D** 和 **E**。

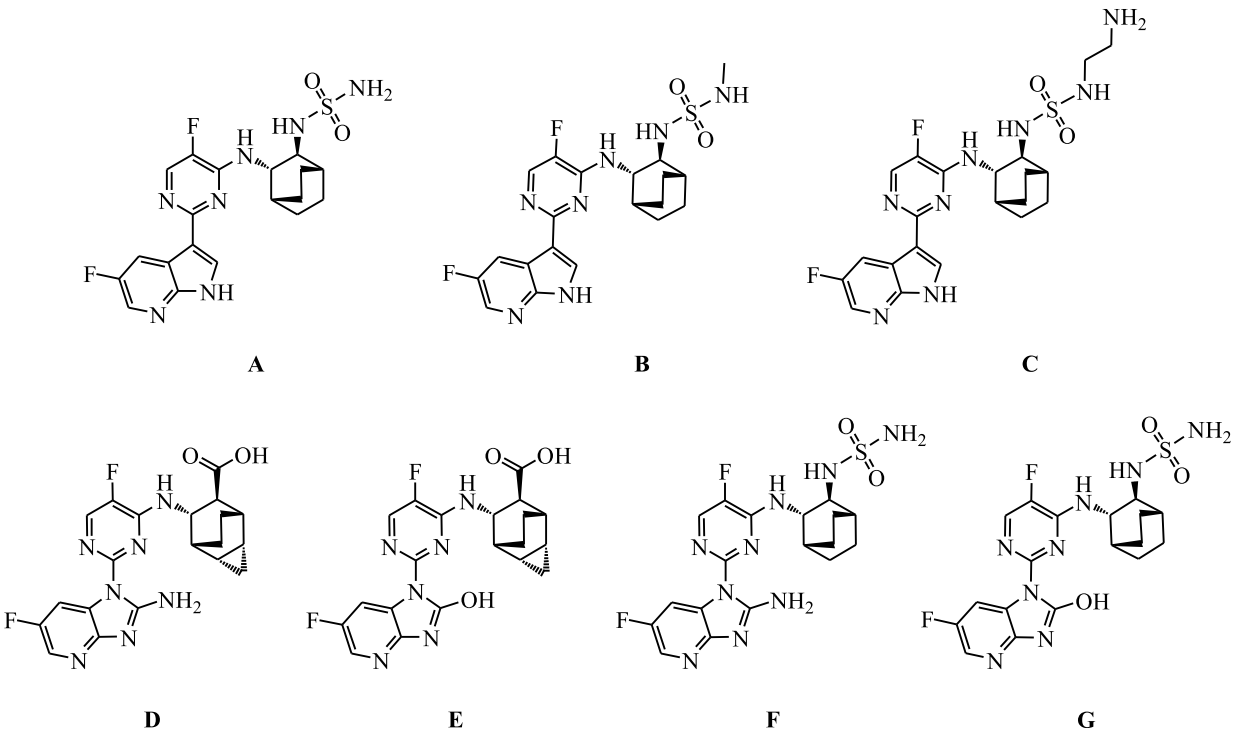


Figure 3　Structures of the target compounds A – G

本研究将化合物 **G** 与 PB2(PDB ID:5WL0)进行分子对接(图 4),结果显示化合物 **G** 中的磺酰氧原子与 Arg355、Asn510 和 Val511 形成氢键,末端氨基与 His357 形成氢键,磺酰二胺是形成氢键的核心位点;母核吡咯并吡啶环与 Arg332、Glu361 和 Lys376 形成氢键;此外,化合物 **G** 还可与 Phe323、His357 形成 π-π 堆积作用;结构中的氟原子与 Phe404 和 Gln406 产生关键极性作用。

2　目标化合物的合成路线

目标化合物 **A** 的合成见图 5:以 3-溴-5-氟-1-对甲苯磺酰基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶(**1**)为起始原料,经 Miyaura 硼化反应得到硼酸频哪醇酯中间体 **2**;以 2-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-氨基双环[2.2.2]辛烷-2-基]异吲哚啉-1,3-二酮(**3**)和 2,4-二氯-5-氟嘧啶(**4**)为起始原料,经亲核取代、肼解、磺酰化反应得到中间体 **7**;中间体 **2** 与 **7** 经 Suzuki 偶联反应得到中间体 **8**,**8** 脱除对甲苯磺酰基得到中间体 **9**,**9** 脱除 Boc 保护基得到目标化合物 **A**[19]。

目标化合物 **B** 的合成见图 6:以 *N*-甲基氯磺酰胺(**10**)与中间体 **6** 为起始原料,经磺酰化反应得到中间体 **11**,**11** 与 **2** 经 Suzuki-Miyaura 偶联反应得到中间体 **12**,**12** 脱除对甲苯磺酰基得到目标化合物 **B**。

目标化合物 **C** 的合成见图 7:以 *N*-[2-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)乙基]氨磺酰氯(**13**)和中间体 **6** 为起始原料,经磺酰化反应得到中间体 **14**,**14** 和 **2** 发生 Suzuki-Miyaura 偶联反应得到中间体 **15**,**15** 脱除对甲苯磺酰基得到中间体 **16**,**16** 经肼解反应脱除邻苯二甲酰亚胺保护基得到目标化合物 **C**。

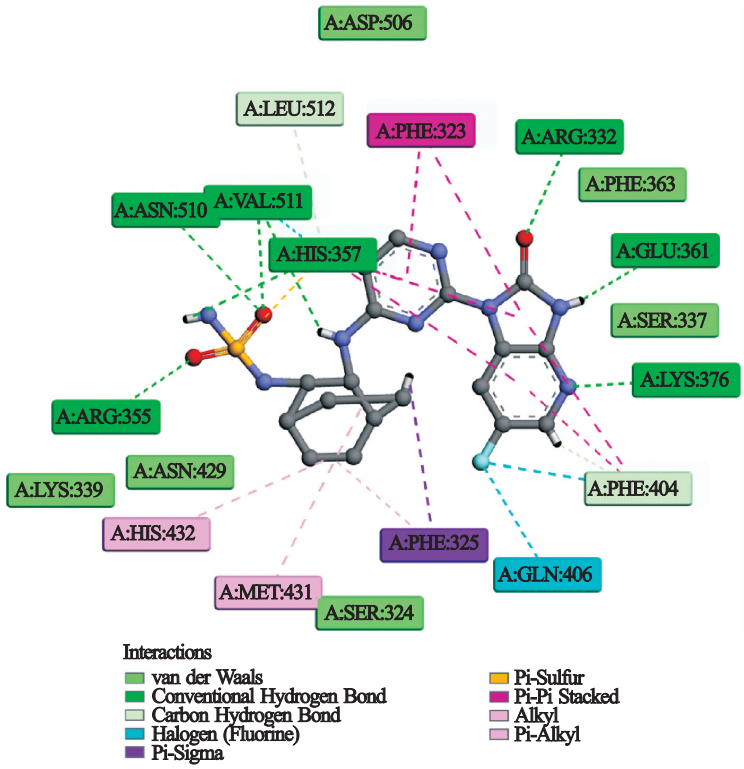
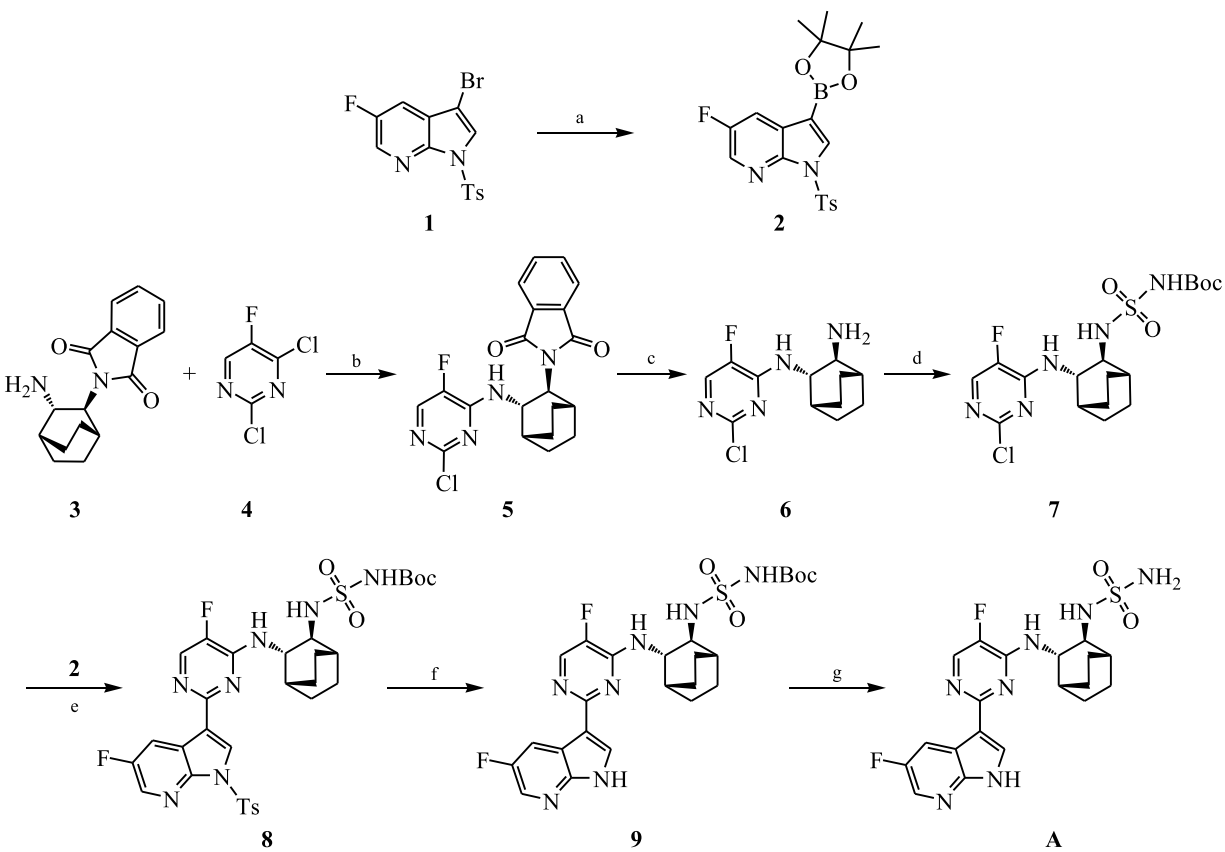
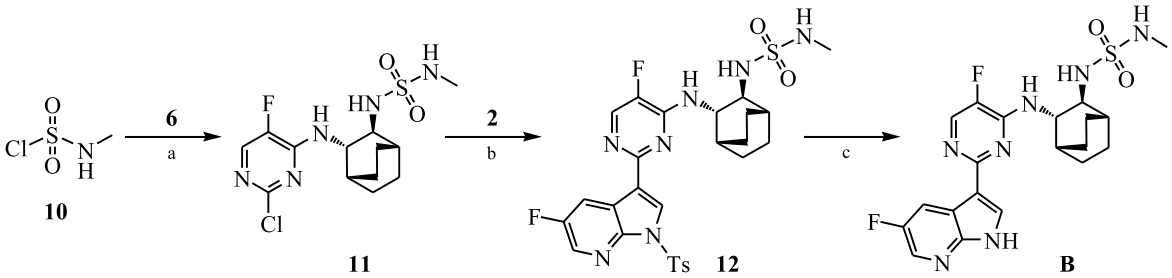


Figure 4 The 2D interaction diagram of compound G with PB2(PDB ID:5WL0)



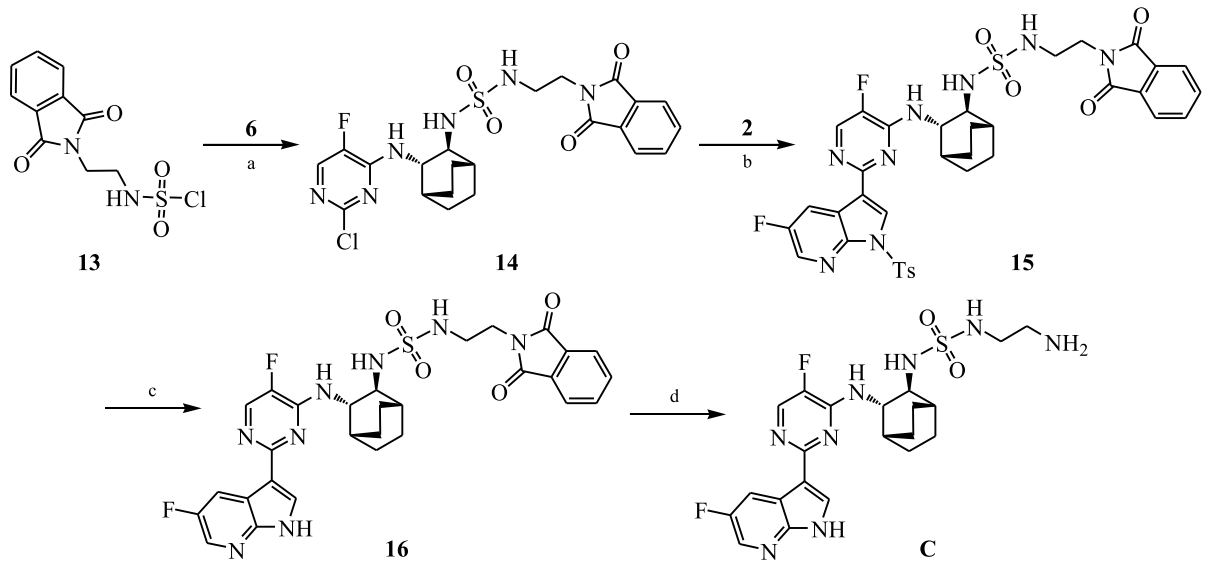
Reagents and conditions: a) $(Bpin)_2$, KOAc, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, dioxane, 50 ℃, 1 h; b) DIPEA, THF, 50 ℃, 4 h; c) $N_2H_4 \cdot H_2O$, EtOH, 55 ℃, 3 h; d) Et_3N, DCM, *t*-butyl chlorosulfonylcarbamate, r. t., 10 h; e) $Pd(OAc)_2$, X-Phos, H_2O, dioxane, 120 ℃, 3 h; f) LiOH, THF, 60 ℃, 8 h; g) THF, HCl, r. t., 10 h.

Figure 5 The synthetic route to compound A



Reagents and conditions: a) DCM, Et_3N, r. t. , 10 h; b) $Pd(OAc)_2$, X-Phos, H_2O, dioxane, 120 ℃, 3 h; c) LiOH, THF, 60 ℃, 8 h.

Figure 6　The synthetic route to compound B

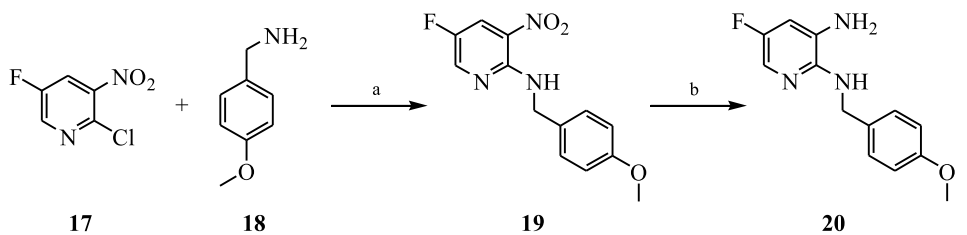


Reagents and conditions: a) DCM, Et_3N, r. t. , 10 h; b) $Pd(OAc)_2$, X-Phos, H_2O, dioxane, 120 ℃, 3 h; c) LiOH, THF, 60 ℃, 8 h; d) $N_2H_4 \cdot H_2O$, MeOH, r. t. , 10 h.

Figure 7　The synthetic route to compound C

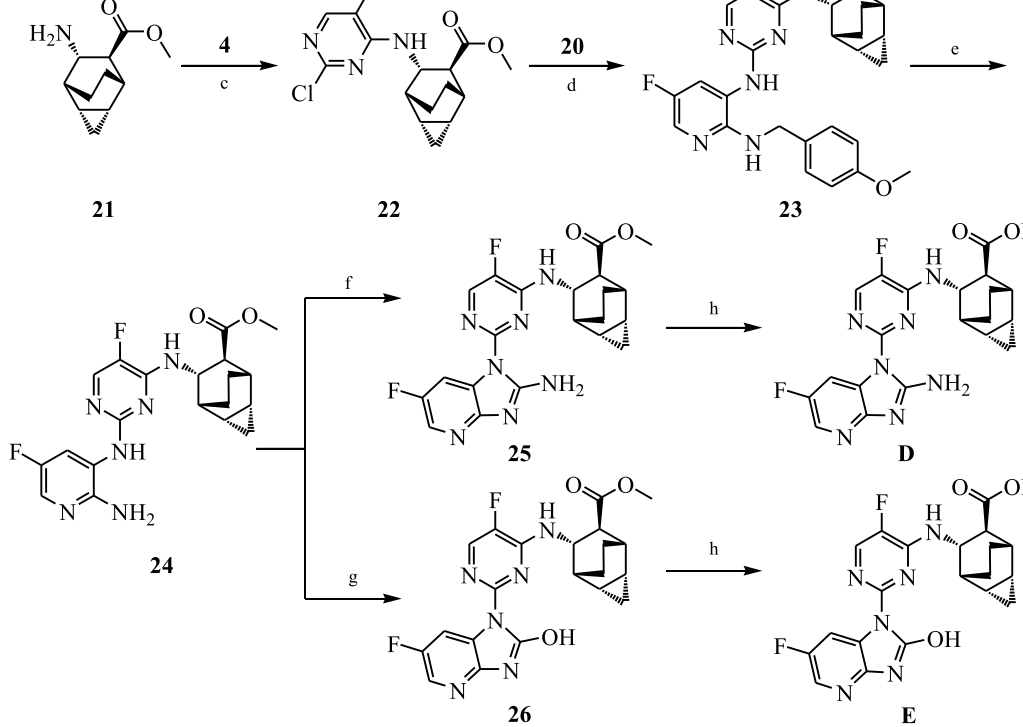
目标化合物 **D**、**E** 的合成见图 8:以 5-氟-2-氯-3-硝基吡啶(**17**)与 4-甲氧基苄胺(**18**)为起始原料,经取代、还原反应得到中间体 **20**;以(1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-氨基三环[3.2.2.$0^{2,4}$]壬烷-6-甲酸甲酯(**21**)与中间体 **4** 为起始原料,经亲核取代反应得到中间体 **22**;中间体 **20** 与 **22** 发生 Buchwald 偶联反应后脱除对甲氧基苄基得到中间体 **24**,**24** 分别经溴化氰环合、三光气(BTC)环合得到对应的中间体 **25**、**26**,二者分别经酯水解反应得到目标化合物 **D**、**E**。

目标化合物 **F**、**G** 的合成路线见图 9:以中间体 **7** 与 **20** 为起始原料,经 Buchwald-Hartwig 偶联反应得到中间体 **27**,**27** 脱除保护基得到中间体 **28**,**28** 分别经溴化氰环合、三光气环合得到对应的目标化合物 **F**、**G**。

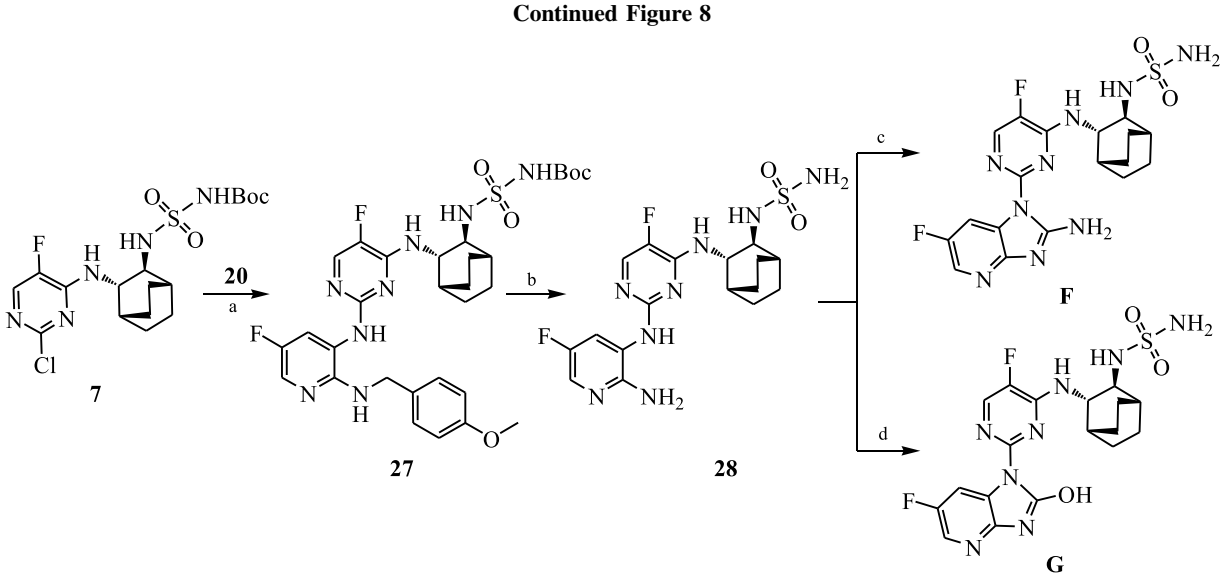


Reagents and conditions: a) Cs_2CO_3, dioxane, 100 ℃, 3 h; b) ammonium formate, Fe, K_2CO_3, EtOH, H_2O, 80 ℃, 5 h; c) DIPEA, THF, 35 ℃, 6 h; d) $Pd(OAc)_2$, Xantphos, Cs_2CO_3, dioxane, 130 ℃, 3 h; e) TFA, anisole, DCM, r. t. , 24 h; f) CNBr, MeOH, H_2O, r. t. , 24 h; g) BTC, anisole, THF, 90 ℃, 5 h; h) LiOH, THF, 50 ℃, 7 h.

Figure 8　The synthetic route to compounds D and E



Continued Figure 8



Reagents and conditions: a) $Pd(OAc)_2$, Xantphos, Cs_2CO_3, 130 ℃, 3 h; b) TFA, anisole, DCM, r. t., 24 h; c) CNBr, MeOH, H_2O, r. t., 24 h; d) BTC, anisole, THF, 90 ℃, 5 h.

Figure 9 The synthetic route to compounds F and G

3 合成实验

质谱采用美国 ABI 公司 API 3000 三重四极杆串联质谱仪测定；核磁共振波谱采用德国 Bruker 公司 Avance NEO 400 MHz 核磁共振波谱仪测定(TMS 为内标)。实验所用试剂未经特殊说明均为市售化学纯或分析纯。

3.1 5-氟-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1-对甲苯磺酰基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶(2)的合成

将 11.00 g(30.0 mmol)3-溴-5-氟-1-对甲苯磺酰基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶(**1**)溶于 500 mL 二氧六环中，加入 23.00 g(90.0 mmol)联硼酸频哪醇酯和 9.00 g(90.0 mmol)乙酸钾，氮气保护

下,加入 0.40 g(0.6 mmol)双三苯基膦二氯化钯,升温至 50 ℃反应 1 h,TLC 监测反应完全。将反应液冷却至室温,加水稀释,用二氯甲烷(50 mL×3)萃取,合并有机相,减压浓缩得到黑色粘稠物,加入 50 mL 正己烷搅拌过滤,滤饼依次用 15 mL 二氯甲烷和 45 mL 正己烷洗涤,得到白色固体(**2**)10.73 g,收率为 86%。ESI-MS *m/z*: 417.1[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ:8.26(s,1H),8.17(s,1H),8.08 ~ 8.04(m,2H),7.88(dd,*J* = 8.5,2.8 Hz,1H),7.29 ~ 7.26(m,2H),2.37(s,3H),1.35(s,12H)。

3.2　2-{(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-[(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)氨基]双环[2.2.2]辛烷-2-基}异吲哚啉-1,3-二酮(5)的合成

将 2.50 g(9.2 mmol)2-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-氨基双环[2.2.2]辛烷-2-基]异吲哚啉-1,3-二酮(**3**)溶于 80 mL 四氢呋喃中,加入 1.79 g(13.9 mmol)*N*,*N*-二异丙基乙胺(DIPEA)搅拌 0.5 h,加入 1.85 g(11.1 mmol)2,4-二氯-5-氟嘧啶(**4**),升温至 50 ℃反应 4 h,TLC 监测反应完全。向反应液中加入 100 mL 饱和碳酸钠水溶液,用乙酸乙酯(50 mL×3)萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比 4∶1),得到淡黄色油状物(**5**)3.28 g,收率为 88%。ESI-MS *m/z*: 401.1[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.85 ~ 7.80(m,2H),7.78(d,*J* = 2.6 Hz,1H),7.74 ~ 7.69(m,2H),5.43(d,*J* = 5.6 Hz,1H),5.26 ~ 5.20(m,1H),4.24 ~ 4.18(m,1H),2.27 ~ 2.12(m,2H),1.97 ~ 1.92(m,1H),1.88 ~ 1.82(m,1H),1.80 ~ 1.75(m,2H),1.72(dd,*J* = 7.3,4.5 Hz,1H),1.69 ~ 1.62(m,2H),1.56 ~ 1.45(m,1H)。

3.3　(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-N^2-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)双环[2.2.2]辛烷-2,3-二胺(6)的合成

将 3.20 g(8.0 mmol)中间体 **5** 溶于 100 mL 乙醇中,加入 0.61 g(12.0 mmol)水合肼,55 ℃反应 3 h,TLC 监测反应完全。将反应液减压浓缩,加入 200 mL 水,用乙酸乙酯(50 mL×3)萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比 4∶1),得到淡黄色油状物(**6**)1.59 g,收率为 74%。ESI-MS *m/z*:271.1[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ:7.87(d,*J* = 2.8 Hz,1H),5.36(s,1H),3.68 ~ 3.63(m,1H),2.85 ~ 2.78(m,1H),1.89 ~ 1.86(m,1H),1.82 ~ 1.76(m,4H),1.67 ~ 1.59(m,2H),1.58 ~ 1.54(m,3H),1.53 ~ 1.48(m,1H),1.45 ~ 1.38(m,1H)。

3.4　*N*-(叔丁氧羰基)-*N*′-{(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-[(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)氨基]双环[2.2.2]辛烷-2-基}磺酰二胺(7)的合成

将 0.50 g(1.8 mmol)中间体 **6** 溶于 20 mL 无水二氯甲烷中,冰水浴中在氮气保护下缓慢滴加 0.27 g(2.7 mmol)三乙胺,再滴加 10 mL 含有 0.78 g(3.6 mmol)氯磺酰基氨基甲酸叔丁酯的二氯甲烷溶液,滴毕,室温反应 10 h,TLC 监测反应完全。反应液用饱和碳酸氢钠溶液(30 mL×3)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比 4∶1),得到白色固体(**7**)0.48 g,收率为 54%。ESI-MS *m/z*: 450.1[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, CD_3OD) δ:7.89(d,*J* = 3.5 Hz,1H),4.10(d,*J* = 6.3 Hz,1H),3.58(d,*J* = 6.3 Hz,1H),1.90 ~ 1.82(m,2H),1.80 ~ 1.66(m,4H),1.65 ~ 1.54(m,2H),1.47 ~ 1.43(m,2H),1.39(s,9H)。

3.5　*N*-(叔丁氧羰基)-*N*′-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1-对甲苯磺酰基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(8)的合成

将 2.90 g(10.0 mmol)中间体 **7**、5.40 g(13.0 mmol)中间体 **2**、0.20 g(1.0 mmol)醋酸钯和 1.00 g(2.0 mmol)2-二环己基膦-2′,4′,6′-三异丙基联苯(X-Phos)加入到三颈瓶中,氮气进行置换保护,用注射器注入 100 mL 二氧六环和 10 mL 水,升温至 120 ℃反应 3 h,TLC 监测反应完全。将反应液垫硅藻土过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比 4∶1),得到白色固体(**8**)3.20 g,收率为 82%。ESI-MS *m/z*: 704.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ:10.76(s,1H),8.61(dd,*J* = 9.1,2.8 Hz,1H),8.52 ~ 8.47(m,1H),8.46(s,1H),8.23(d,*J* = 3.9 Hz,1H),8.13(d,*J* = 8.2 Hz,1H),8.06 ~ 8.03(m,2H),8.01(s,1H),7.46 ~ 7.41(m,2H),4.31(t,*J* = 6.1 Hz,1H),3.74 ~ 3.68(m,1H),2.35(s,3H),1.94 ~ 1.83(m,2H),1.77(s,2H),1.72 ~ 1.63

(m,2H),1.52 ~ 1.46(m,2H),1.34(s,9H),1.30 ~ 1.19(m,2H)。

3.6 *N*-(叔丁氧羰基)-*N'*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(9)的合成

将0.20 g(0.33 mmol)中间体**8**溶于10 mL四氢呋喃中,室温搅拌下缓慢滴加2 mL浓度为2 mol·L^{-1}的氢氧化锂水溶液,滴毕,升温至60 ℃反应8 h,TLC监测反应完全。将反应液减压蒸馏除去四氢呋喃,加入2 mL无水甲醇搅拌洗涤,过滤,得到白色固体(**9**)90 mg,收率为65%。ESI-MS *m/z*: 550.2 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ:12.24(s,1H),10.74(s,1H),8.55(dd,*J* = 9.7,2.9 Hz,1H),8.30 ~ 8.25(m,1H),8.20(d,*J* = 2.8 Hz,1H),8.19 ~ 8.14(m,1H),8.12(d,*J* = 4.0 Hz,1H),7.74(d,*J* = 7.4 Hz,1H),4.37 ~ 4.35(m,1H),3.73 ~ 3.66(m,1H),1.93(d,*J* = 8.5 Hz,2H),1.80(d,*J* = 16.0 Hz,2H),1.73 ~ 1.62(m,2H),1.56 ~ 1.46(m,2H),1.35(s,9H),1.28 ~ 1.23(m,2H)。

3.7 *N*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(A)的合成

将0.20 g(0.4 mmol)中间体**9**溶于10 mL四氢呋喃中,室温搅拌下缓慢滴加2 mL浓度为4 mol·L^{-1}的盐酸,滴毕,室温反应10 h,TLC监测反应完全。用饱和碳酸氢钠水溶液调节反应液pH值至8.0 ~ 9.0,用乙酸乙酯(30 mL×3)萃取,合并有机相,减压浓缩,得到黄色油状液体,加入甲醇重结晶,得到白色固体(**A**)10 mg,收率为62%。ESI-MS *m/z*:450.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ:12.96(s,1H),9.31(s,1H),8.99(s,1H),8.49 ~ 8.46(m,2H),8.43 ~ 8.38(m,1H),7.18(s,1H),6.51 ~ 6.47(m,2H),4.38 ~ 4.36(m,1H),3.80(s,1H),1.92 ~ 1.87(m,4H),1.78 ~ 1.67(m,2H),1.62 ~ 1.48(m,2H),1.43 ~ 1.28(m,2H)。

3.8 *N*-甲基-*N'*-{(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-[(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)氨基]双环[2.2.2]辛烷-2-基}磺酰二胺(11)的合成

将0.50 g(1.8 mmol)中间体**6**溶于20 mL无水二氯甲烷中,0 ℃氮气保护下,缓慢滴加0.28 g(2.8 mmol)三乙胺,再滴加0.48 g(3.7 mmol)*N*-甲基氯磺酰胺(**10**),滴毕,室温反应10 h,TLC监测反应完全。反应液用饱和碳酸氢钠水溶液(20 mL×3)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比20∶1),得到白色固体(**11**)0.36 g,收率为54%。ESI-MS *m/z*: 364.1 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ: 8.21(d,*J* = 7.9 Hz,1H),8.08(d,*J* = 3.5 Hz,1H),7.24(d,*J* = 8.2 Hz,1H),6.44(d,*J* = 5.0 Hz,1H),3.97 ~ 3.92(m,1H),3.49 ~ 3.44(m,1H),2.43 ~ 2.34(m,3H),1.87 ~ 1.77(m,1H),1.75(s,1H),1.65 ~ 1.62(m,4H),1.46 ~ 1.42(m,2H),1.36 ~ 1.21(m,2H)。

3.9 *N*-甲基-*N'*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1-对甲苯磺酰基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(12)的合成

中间体**12**的合成方法同中间体**8**,白色固体,收率为75%。ESI-MS *m/z*:618.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ: 8.58(dd,*J* = 9.1,2.9 Hz,1H),8.48(d,*J* = 2.0 Hz,1H),8.45(s,1H),8.25(d,*J* = 3.9 Hz,1H),8.05(d,*J* = 8.4 Hz,2H),7.90(d,*J* = 6.9 Hz,1H),7.44(d,*J* = 8.5 Hz,2H),7.37(d,*J* = 7.8 Hz,1H),6.49 ~ 6.45(m,1H),4.24 ~ 4.18(m,1H),3.57 ~ 3.50(m,1H),2.42 ~ 2.32(m,6H),1.82 ~ 1.76(m,2H),1.73 ~ 1.62(m,2H),1.57 ~ 1.45(m,2H),1.42 ~ 1.32(m,2H),1.31 ~ 1.22(m,2H)。

3.10 *N*-甲基-*N'*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基)磺酰二胺(B)的合成

目标化合物**B**的合成方法同中间体**9**,白色固体,收率为52%。ESI-MS *m/z*:464.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ: 12.26(d,*J* = 2.6 Hz,1H),8.52(dd,*J* = 9.7,2.9 Hz,1H),8.29 ~ 8.25(m,1H),8.20(d,*J* = 2.9 Hz,1H),8.15(d,*J* = 3.9 Hz,1H),7.63(d,*J* = 7.2 Hz,1H),7.41(d,*J* = 7.9 Hz,1H),6.47(t,*J* = 5.0 Hz,1H),4.29 ~ 4.22(m,1H),3.52(t,*J* = 7.3 Hz,1H),2.37(d,*J* = 5.2 Hz,3H),1.93 ~ 1.89(m,2H),1.88 ~ 1.79(m,1H),1.76 ~ 1.63(m,2H),1.59 ~ 1.44(m,2H),1.43 ~ 1.34(m,

1H),1.33 ~ 1.21(m,2H)。

3.11　*N*-[2-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)乙基]-*N*′-{(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-[(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)氨基]双环[2.2.2]辛烷-2-基}磺酰二胺(14)的合成

中间体 **14** 的合成方法同中间体 **11**,白色固体,收率为 55%。ESI-MS *m/z*:523.1[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ: 8.15 (d, *J* = 7.2 Hz,1H),8.00 (d, *J* = 3.5 Hz,1H),7.89 ~ 7.80(m,4H),7.30(d,*J* = 8.2 Hz,1H),6.86(t, *J* = 6.5 Hz,1H),3.91(t,*J* = 6.8 Hz,1H),3.70 ~ 3.59(m,2H),3.47 ~ 3.41(m,1H),3.03 ~ 2.98 (m,2H),1.79 ~ 1.75(m,1H),1.72 ~ 1.68(m, 1H),1.67 ~ 1.51(m,4H),1.45 ~ 1.31(m,2H), 1.22 ~ 1.19(m,2H)。

3.12　*N*-[2-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)乙基]-*N*′-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1-对甲苯磺酰基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(15)的合成

中间体 **15** 的合成方法同中间体 **8**,白色固体,收率为 78%。ESI-MS *m/z*:777.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ: 8.52 (dd, *J* = 9.0,2.9 Hz,1H),8.48 ~ 8.44(m,1H),8.42(s, 1H),8.17(d,*J* = 3.9 Hz,1H),8.07 ~ 8.02(m, 2H),7.85 ~ 7.78(m,6H),7.46 ~ 7.42(m,3H), 6.91 ~ 6.84(m,1H),4.19 ~ 4.15(m,1H),3.68 ~ 3.60(m,2H),3.54 ~ 3.49(m,1H),3.03 ~ 2.98 (m,2H),2.35(s,3H),1.89 ~ 1.77(m,2H), 1.76 ~ 1.72(m,2H),1.70 ~ 1.61(m,2H), 1.60 ~ 1.48(m,2H),1.23(d,*J* = 7.5 Hz,2H)。

3.13　*N*-[2-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)乙基]-*N*′-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(16)的合成

中间体 **16** 的合成方法同中间体 **9**,白色固体,收率为 45%。ESI-MS *m/z*:623.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, CD_3OD) δ: 8.59 (d, *J* = 9.3 Hz,1H),8.17 ~ 8.14(m,2H),7.99(d,*J* = 4.0 Hz,1H),7.70 ~ 7.66(m,1H),7.47 ~ 7.27 (m,4H),4.29(d,*J* = 6.5 Hz,1H),4.10(q,*J* = 7.1 Hz,1H),3.64(d,*J* = 6.5 Hz,1H),3.51 ~ 3.40(m,2H),3.19 ~ 3.15(m,2H),2.03 ~ 1.98 (m,5H),1.86 ~ 1.81(m,2H),1.76 ~ 1.67(m, 1H),1.66 ~ 1.58(m,1H),1.57 ~ 1.53(m,1H), 1.50 ~ 1.41(m,1H)。

3.14　*N*-(2-氨基乙基)-*N*′-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[5-氟-2-(5-氟-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-3-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(C)的合成

将 0.50 g(0.8 mmol)中间体 **16** 溶于 40 mL 甲醇中,加入 0.06 g(1.2 mmol)水合肼,室温反应 10 h,TLC 监测反应完全。将反应液减压浓缩,加入 30 mL 饱和碳酸氢钠水溶液,用乙酸乙酯(30 mL ×3)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比 20∶1),得到白色固体(**C**)0.19 g,收率为 48%。ESI-MS *m/z*: 439.2[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, CD_3OD) δ: 8.64 ~ 8.58(m,1H),8.20 ~ 8.16(m,2H), 8.05 ~ 8.00(m,1H),4.30(d,*J* = 6.3 Hz,1H), 3.54 ~ 3.50(m,1H),3.01 ~ 2.96(m,2H),2.73 ~ 2.69(m,2H),2.06 ~ 2.02(m,2H),1.97 ~ 1.93 (m,2H),1.83 ~ 1.79(m,2H),1.78 ~ 1.62(m, 3H),1.60 ~ 1.43(m,3H)。

3.15　5-氟-*N*-(4-甲氧基苄基)-3-硝基吡啶-2-胺(19)的合成

将 0.50 g(1.8 mmol)5-氟-2-氯-3-硝基吡啶(**17**)、1.17 g(3.6 mmol)碳酸铯加入 10 mL 二氧六环中,氮气保护下,缓慢滴加 1.23 g(5.4 mmol)4-甲氧基苄胺(**18**),滴毕,升温至 100 ℃,反应 3 h,TLC 监测反应完全。将反应液冷却至室温垫硅藻土过滤,将滤液减压浓缩得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比 20∶1),得到黄色固体(**19**)0.39 g,收率为 78%。ESI-MS *m/z*: 278.1[M + H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.40 (d, *J* = 2.9 Hz,1H),8.35(s,1H),8.20(dd,*J* = 8.0, 2.9 Hz,1H),7.31 ~ 7.27(m,2H),6.90 ~ 6.87 (m,2H),4.75(d,*J* = 5.5 Hz,2H),3.81(s,3H)。

3.16　5-氟-N^2-(4-甲氧基苄基)吡啶-2,3-二胺(20)的合成

将 0.50 g(1.8 mmol)中间体 **19**、1.13 g(18.0 mmol)甲酸铵、1.00 g(7.2 mmol)碳酸钾和 0.80 g(14.4 mmol)铁粉加入 10 mL 乙醇和 2 mL 水中,80 ℃反应 5 h,TLC 监测反应完全。将反应液冷却至室温垫硅藻土过滤,将滤液减压浓缩得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(石

油醚-乙酸乙酯,体积比4∶1),得到灰色固体(**20**)0.38 g,收率为86%。ESI-MS *m/z*:248.1[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:7.62(d,*J*=2.6 Hz,1H),7.35~7.30(m,2H),6.91~6.86(m,2H),6.73~6.67(m,1H),4.49(s,2H),4.02(s,1H),3.81(s,3H),3.38(s,2H)。

3.17 (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-[(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)氨基]三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸甲酯(22)的合成

将2.70 g(11.0 mmol)(1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-氨基三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-甲酸甲酯(**21**)溶于80 mL四氢呋喃中,加入2.00 g(12.0 mmol)2,4-二氯-5-氟嘧啶(**4**)和3.20 g(25.0 mmol)*N*,*N*-二异丙基乙胺,35 ℃反应6 h,TLC监测反应完全。将反应液过滤,滤饼用30 mL石油醚洗涤,得到白色固体(**22**)3.40 g,收率为95%。ESI-MS *m/z*:326.1[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:7.84(d,*J*=2.7 Hz,1H),7.56(d,*J*=7.3 Hz,1H),4.60(t,*J*=8.7 Hz,1H),3.68(s,3H),3.25~3.15(m,1H),2.32~2.28(m,1H),2.19~2.16(m,1H),1.57~1.55(m,2H),1.26~1.23(m,2H),1.18~1.16(m,1H),1.08~1.04(m,1H),0.83~0.79(m,1H),0.58~0.52(m,1H)。

3.18 (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-{[5-氟-2-({5-氟-2-[(4-甲氧基苄基)氨基]吡啶-3-基}氨基)嘧啶-4-基]氨基}三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸甲酯(23)的合成

将0.50 g(1.5 mmol)中间体**22**、0.74 g(3.0 mmol)中间体**20**、1.95 g(6.0 mmol)碳酸铯、0.04 g(0.2 mol)醋酸钯和0.06 g(0.1 mmol)4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(Xantphos)加入20 mL 1,4-二氧六环中,氮气保护下,130 ℃反应3 h,TLC监测反应完全。将反应液冷却至室温垫硅藻土过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比4∶1),得到棕色固体(**23**)0.32 g,收率为40%。ESI-MS *m/z*:537.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:7.86(d,*J*=2.8 Hz,1H),7.83(d,*J*=1.0 Hz,1H),7.69~7.66(m,1H),7.32(s,1H),7.30~7.27(m,2H),6.87~6.83(m,2H),6.73~6.66(m,1H),4.49~4.45(m,2H),3.79(s,3H),3.69~3.67(m,3H),3.15(dd,*J*=10.6,2.2 Hz,1H),2.31~2.27(m,1H),2.18~2.13(m,1H),1.60~1.57(m,2H),1.25~1.21(m,2H),1.09~1.04(m,2H),0.92~0.86(m,2H),0.83~0.78(m,2H)。

3.19 (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-({5-氟-2-[(2-氨基-5-氟吡啶-3-基)氨基]嘧啶-4-基}氨基)三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸甲酯(24)的合成

将0.32 g(0.6 mmol)中间体**23**溶于10 mL二氯甲烷中,缓慢滴加0.55 g(4.8 mmol)三氟乙酸和0.06 g(0.6 mmol)苯甲醚,室温反应24 h,TLC监测反应完全。将反应液减压浓缩,加入20 mL水、40 mL乙酸乙酯和40 mL饱和碳酸氢钠水溶液,分出有机相减压浓缩得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比20∶1),得到棕色固体(**24**)0.14 g,收率为55%。ESI-MS *m/z*:417.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ:8.35(s,1H),8.13(dd,*J*=11.2,2.8 Hz,1H),7.95(d,*J*=3.6 Hz,1H),7.60(d,*J*=2.8 Hz,1H),7.39(d,*J*=7.6 Hz,1H),5.92~5.87(m,2H),4.55~4.48(m,1H),3.55(s,3H),3.22(dd,*J*=10.6,2.0 Hz,1H),2.20(s,1H),2.10(s,1H),1.63~1.58(m,2H),1.17~1.13(m,2H),1.05~1.02(m,2H),0.85~0.79(m,1H),0.52~0.46(m,1H)。

3.20 (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-{[5-氟-2-(2-氨基-6-氟-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-1-基)嘧啶-4-基]氨基}三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸甲酯(25)的合成

冰浴条件下,将0.20 g(0.5 mmol)中间体**24**和0.16 g(1.5 mmol)溴化氰加入5 mL甲醇和5 mL水中,0 ℃搅拌15 min后升至室温反应24 h,TLC监测反应完全。将反应液减压浓缩得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比20∶1),得到白色固体(**25**)0.02 g,收率为10%。ESI-MS *m/z*:442.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ:8.29(d,*J*=3.3 Hz,1H),8.26~8.16(m,4H),8.09~8.05(m,1H),4.61~4.54(m,1H),3.59(s,3H),3.16(d,*J*=5.2 Hz,1H),2.28~2.26(m,2H),1.66~1.62(m,1H),1.58~1.52(m,1H),1.23~1.18(m,2H),1.17~1.11(m,2H),0.87~0.83(m,1H),0.58~0.52(m,1H)。

3.21 (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-{[5-氟-2-(2-氨基-6-氟-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-1-基)嘧啶-4-基]氨基}三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸(D)的合成

将0.05 g(0.1 mmol)中间体**25**溶于1.5 mL

四氢呋喃中,缓慢滴加 0.2 mL 浓度为 2 mol·L^{-1} 的氢氧化锂溶液,滴毕,升温至 50 ℃反应 7 h,TLC 监测反应完全。将反应液冷却至室温,用 2 mol·L^{-1}柠檬酸调节 pH 值至 7.0,用乙酸乙酯(20 mL×3)萃取,有机相用无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比 20∶1),得到白色固体(**D**)0.03 g,收率为 65%。ESI-MS *m/z*:428.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,CD_3OD)*δ*:8.47(dd,*J*=9.3,2.8 Hz,1H),8.01(d,*J*=3.3 Hz,1H),7.99~7.97(m,1H),4.39(d,*J*=10.8 Hz,1H),3.06(dd,*J*=10.5,1.9 Hz,1H),2.39(s,1H),2.33(s,1H),1.80~1.63(m,2H),1.25~1.17(m,4H),0.91~0.86(m,1H),0.57~0.53(m,1H)。

3.22　(1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-{[5-氟-2-(2-羟基-6-氟-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-1-基)嘧啶-4-基]氨基}三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸甲酯(26)的合成

冰浴条件下,将 0.20 g(0.5 mmol)中间体 **24** 加入 5 mL 苯甲醚中,氮气保护下,缓慢滴加 5 mL 含有 0.30 g(1.0 mmol)三光气的四氢呋喃溶液,滴毕,升温至 90 ℃反应 5 h,TLC 监测反应完全。加冰水淬灭反应,用乙酸乙酯(10 mL×3)萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩滤液得到粗品,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比 20∶1),得到白色固体(**26**)0.07 g,收率为 25%。ESI-MS *m/z*:443.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,CD_3OD)*δ*:8.28~8.23(m,2H),8.16~8.11(m,1H),4.78~4.73(m,1H),3.75(s,3H),3.41(dd,*J*=10.5,1.9 Hz,1H),2.44~2.39(m,2H),1.71~1.63(m,1H),1.58~1.50(m,1H),1.38~1.33(m,2H),1.26~1.24(m,2H),0.98~0.94(m,1H),0.66~0.64(m,1H)。

3.23　(1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-7-{[5-氟-2-(2-羟基-6-氟-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-1-基)嘧啶-4-基]氨基}三环[3.2.2.0^{2,4}]壬烷-6-羧酸(E)的合成

目标化合物 **E** 的合成方法同 **D**,白色固体,收率为 45%。ESI-MS *m/z*:429.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,CD_3OD)*δ*:7.97~7.90(m,2H),7.75~7.71(m,1H),4.44(d,*J*=10.3 Hz,1H),3.02(dd,*J*=10.5,2.3 Hz,1H),2.35(s,1H),2.28(s,1H),1.89(s,1H),1.81~1.65(m,2H),1.25~1.11(m,4H),0.88~0.84(m,1H),0.53~0.49(m,1H)。

3.24　*N*-(叔丁氧羰基)-*N*′-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-{[(5-氟-2-{[5-氟-2-(4-甲氧基苄基)氨基]吡啶-3-基}氨基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(27)的合成

中间体 **27** 的合成方法同中间体 **23**,棕色固体,收率为 32%。ESI-MS *m/z*:661.3[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,$CDCl_3$)*δ*:7.80(d,*J*=2.7 Hz,1H),7.78~7.69(m,2H),7.31(d,*J*=8.6 Hz,2H),6.88~6.79(m,3H),5.25~5.20(m,1H),5.07(s,1H),4.50(s,2H),3.84~3.79(m,1H),3.77(s,3H),3.17(s,1H),1.97(s,1H),1.85(s,1H),1.80~1.70(m,1H),1.66~1.62(m,5H),1.53~1.41(m,2H),1.33(s,9H)。

3.25　*N*-(叔丁氧羰基)-*N*′-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-3-({5-氟-2-[(2-氨基-5-氟吡啶-3-基)氨基]嘧啶-4-基}氨基)双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(28)的合成

中间体 **28** 的合成方法同中间体 **24**,棕色固体,收率为 65%。ESI-MS *m/z*:441.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,CD_3OD)*δ*:7.93(dd,*J*=10.1,2.8 Hz,1H),7.73(d,*J*=3.9 Hz,1H),7.60(d,*J*=2.7 Hz,1H),3.94~3.90(m,1H),3.52~3.46(m,1H),1.94(s,1H),1.83~1.77(m,2H),1.76~1.66(m,3H),1.62~1.51(m,2H),1.46~1.38(m,2H),1.30~1.26(m,1H)。

3.26　*N*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-7-{[5-氟-2-(2-氨基-6-氟-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-1-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基]磺酰二胺(F)的合成

目标化合物 **F** 的合成方法同中间体 **25**,白色固体,收率为 10%。ESI-MS *m/z*:466.2[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)*δ*:8.35~8.22(m,5H),8.09~8.05(m,1H),7.11(d,*J*=7.7 Hz,1H),6.46(s,2H),4.07~4.01(m,1H),3.72~3.66(m,1H),1.92~1.77(m,4H),1.74~1.62(m,2H),1.56~1.43(m,2H),1.39~1.25(m,2H)。

3.27　*N*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-7-{[5-氟-2-(2-羟基-6-氟-1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-1-基)嘧啶-4-基]氨基}双环[2.2.2]辛烷-2-基)磺酰二胺(G)的合成

目标化合物 **G** 的合成方法同中间体 **26**,白色

固体，收率为21%。ESI-MS m/z：467.1［M + H］$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：11.91（s，1H），8.23（d，J = 3.4 Hz，1H），8.05（d，J = 6.9 Hz，1H），8.03（dd，J = 2.6，1.8 Hz，1H），7.91（dd，J = 9.3，2.6 Hz，1H），6.96 ~ 6.88（m，1H），6.42（s，2H），3.99 ~ 3.93（m，1H），3.59（t，J = 6.7 Hz，1H），1.86 ~ 1.82（m，4H），1.70 ~ 1.61（m，2H），1.51 ~ 1.42（m，2H），1.33 ~ 1.27（m，2H）。

4 抗病毒活性评价及类药性评估

本研究采用流感病毒诱导犬肾MDCK细胞病变抑制法，以奥司他韦（oseltamivir）与吡莫地韦为阳性对照，选取A/Puerto Rico/8/34（H1N1）和A/Hong Kong/8/68（H3N2）两种流感病毒株，对7个目标化合物**A** ~ **G**进行体外抗流感病毒活性评价。

将目标化合物和阳性对照均用DMSO配制成100 mmol·L^{-1}母液，置于 -20 ℃保存。实验前将母液稀释至400 μmol·L^{-1}作为初始浓度，使用含2 μg·mL TPCK胰酶的DF-12完全培养基（DF-12 + TPCK + P/S）进行3倍梯度倍比稀释，共设置10个浓度梯度：100、33.33、11.11、3.70、1.23、0.41、0.14、0.05、0.02、0.001 μmol·L^{-1}。

将MDCK细胞以每孔1.5 × 10^{4}个的密度接种于96孔板中，置于37 ℃、体积分数为5%的CO_2培养箱中培养16 ~ 24 h。弃去培养液，每孔加入120 μL PBS洗涤细胞，重复3次。洗涤完成后，每孔加入100 μL DF-12完全培养基，按照浓度从低到高的顺序依次加入50 μL稀释好的药液。细胞对照组及病毒对照组不加药液。随后用DF-12完全培养基将病毒液稀释至100 $TCID_{50}$，每孔加入50 μL病毒液，每孔最终体积为200 μL，药物终浓度为预处理浓度的1/4。将上述96孔板置于37 ℃继续培养72 h。

将CellTiter-Glo发光细胞活力检测试剂盒的缓冲液和底物避光混匀配制成工作液，-80 ℃避光保存。检测前取出工作液避光解冻，与PBS按体积比4∶6混匀备用。

吸弃96孔板内培养液，每孔加入100 μL检测试剂，避光条件下利用轨道振荡器振荡8 min，以诱导细胞裂解。避光静置5 min，采用仪器预设的CellTiter-Glo程序检测化学发光值，实验结果见表1。

化合物细胞毒性检测方法与上述实验一致，仅以DF-12完全培养基代替病毒液即可，实验结果见表1。

Table 1 Antiviral activity and cytotoxicity of compounds A – G

Compd.	IC_{50}/(μmol·L^{-1})		CC_{50}/(μmol·L^{-1})
	H1N1	H3N2	MDCK cell
A	0.009 ± 0.002	0.004 ± 0.002	29.865 ± 3.630
B	0.040 ± 0.003	0.011 ± 0.003	45.402 ± 5.384
C	0.977 ± 0.020	0.233 ± 0.058	> 50
D	12.902 ± 7.988	7.185 ± 2.593	> 50
E	> 50	9.170 ± 10.245	> 50
F	41.268 ± 19.382	25.698 ± 8.634	> 50
G	0.958 ± 0.0591	0.787 ± 0.101	> 50
oseltamivir	0.809 ± 0.240	1.578 ± 0.389	> 50
pimodivir	< 0.003	< 0.003	> 50

本研究采用Discovery Studio软件的ADMET模块（预测药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性）及毒性预测扩展模块，对化合物**A** ~ **C**、**G**的ADMET性质与毒性概率进行预测，结果见表2和表3。同时对上述化合物进行类药性评估，结果见表4。

Table 2　The ADMET prediction results for compounds A – C and G

Compd.	Solubility level①	Blood-brain barrier penetration level②	Absorption level③	Plasma protein binding prediction④	CYP2D6 inhibition prediction⑤
A	1	4	1	false	false
B	2	4	0	true	false
C	1	4	2	false	false
G	1	4	3	false	false
pimodivir	2	3	0	true	false

①:Solubility level:0(extremely low),1(no,very low,but possible),2(yes,low),3(yes,good),4(yes,optimal),5(no,too soluble),6(warning:molecules with one or more unknown AlogP98 types).

②:Blood-brain barrier penetration level:0(very high penetrant),1(high),2(medium),3(low),4(undefined).

③:Absorption level:0(good absorption),1(moderate absorption),2(low absorption),3(very low absorption).

④:Plasma protein binding prediction:false≥90%,true≤90%.

⑤:CYP2D6 inhibition prediction:false means non-inhibitor,true means inhibitor.

Table 3　Toxicity prediction results for compounds A – C and G

Compd.	NTP carcinogenicity (male rat)	NTP carcinogenicity (female rat)	NTP carcinogenicity call(male mouse)	NTP carcinogenicity call(female mouse)	Ames mutagenicity	Rat oral LD_{50}/(g·kg^{-1})	Skin irritation
A	NC	NC	NC	NC	NM	0.583	none
B	NC	NC	NC	NC	NM	0.841	none
C	NC	NC	NC	NC	NM	0.666	none
G	NC	NC	NC	NC	NM	0.738	none
pimodivir	C	NC	C	NC	NM	0.147	none

Notes: C means carcinogen,NC means non-carcinogen,NM means non-mutagen.

Table 4　The results of Lipinski's rule calculation for compounds A – C and G

Compd.	AlogP	MW	H-bond acceptors	H-bond donors	Rotatable bonds
A	1.635	450.15	6	4	5
B	1.838	464.17	6	4	6
C	1.009	493.19	7	5	8
G	1.833	467.14	8	4	5
pimodivir	3.149	399.39	6	3	4

5　结果与讨论

本研究以吡莫地韦为先导化合物,设计并合成了一系列抗甲型流感病毒 PB2 的新型化合物 **A** ~ **G**,所有化合物的结构均经 ESI-MS 和 ^{1}H-NMR 谱确证。选取 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)和 A/Hong Kong/8/68(H3N2)两种病毒株,采用 MDCK 细胞病变效应抑制实验,以奥司他韦和吡莫地韦作为阳性对照,对目标合物进行了体外抗甲型流感病毒活性评价。

抗病毒活性实验结果显示,针对 H3N2 流感病毒亚型,化合物 **A** ~ **C** 和 **G** 均展现出强于阳性对照奥司他韦的抑制活性;对于 H1N1 亚型,化合物 **A** 和 **B** 的抗病毒活性虽优于奥司他韦,但二者 CC_{50}值均低于 50 μmol·L^{-1},提示其存在明显的细胞毒性;而化合物 **C**、**G** 对 H1N1 亚型的抑制效力与奥司他韦相当,且 CC_{50}值大于 50 μmol·L^{-1},细胞毒性较低,药物安全性能更佳。

ADMET 预测结果包括溶解度、血脑屏障穿透性、吸收、肝毒性、血浆蛋白结合率及毒性概率等参数。实验结果表明,化合物 **A** ~ **C** 和 **G** 的溶解性一般,整体安全性较高,但化合物 **C** 和 **G** 的吸收水平有待进一步提升。毒性预测结果表明,相较于先导化合物吡莫地韦(对雄性小鼠存在致癌风险),化合物 **A** ~ **C** 和 **G** 在雄性小鼠体内均无致癌风险,且大鼠口服 LD_{50}值均高于吡莫地韦,提示 **A** ~ **C** 和 **G** 比吡莫地韦更安全。Lipinski 类药五规则计算结果表明,这四种化合物均符合口服类药性标准。

构效关系初步分析如下:1)对比化合物 **A**、**F**

和 **G** 可见，当片段Ⅱ引入磺酰二胺基时，以吡咯并吡啶环为母核的化合物抗病毒活性最为显著，以 1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-醇为母核的化合物活性次之；2）对比化合物 **A**、**B**、**C** 和吡莫地韦可见，当母核为吡咯并吡啶环时，磺酰二胺基对流感病毒的抑制活性弱于羧酸，其中无取代磺酰二胺的活性优于甲基取代磺酰二胺，且磺酰二胺侧链越短，化合物的抗流感病毒活性越高。

化合物 **A**、**B**、**C** 的活性虽优于 **G**，但均保留了吡莫地韦中易被醛氧化酶代谢的吡咯并吡啶环结构，而化合物 **G** 以 1*H*-咪唑并[4,5-*b*]吡啶-2-醇代替吡咯并吡啶母核，并将其羧基转化为磺酰二胺基团，虽然其活性较吡莫地韦低，但对 H1H1 抑制活性与奥司他韦相当，对 H3N2 抑制活性略优于奥司他韦，因此化合物 **G** 具有进一步结构优化和深入研究的价值。

本研究为新型 PB2 抑制剂的开发提供了重要参考依据。通过系统性结构优化筛选得到的化合物 **G**，其抗病毒活性与临床药物奥司他韦相当。但药物代谢动力学模拟结果显示，化合物 **G** 的口服生物利用度仍有较大提升空间。基于药物化学理性设计原则，可通过在磺酰二胺基团引入环丙基、三氟乙基等亲脂性取代基，或采用 *N*-乙酰化等前药修饰策略进行结构优化，以期改善化合物的细胞膜渗透能力。

参考文献：

[1] WALDMANN M, JIRMANN R, HOELSCHER K, et al. A nanomolar multivalent ligand as entry inhibitor of the hemagglutinin of avian influenza[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(2): 783 – 788.

[2] WU X A, WU X L, SUN Q Z, et al. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents[J]. Theranostics, 2017, 7(4): 826 – 845.

[3] MURRAY C J, LOPEZ A D, CHIN B, et al. Estimation of potential global pandemic influenza mortality on the basis of vital registry data from the 1918-20 pandemic: a quantitative analysis[J]. Lancet, 2006, 368(9554): 2211 – 2218.

[4] LI X H, XU Y J, LI W, et al. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular dynamics simulation of influenza polymerase PB2 inhibitors[J]. Molecules, 2023, 28(4): 1849.

[5] MOSCONA A. Neuraminidase inhibitors for influenza[J]. N Engl J Med, 2005, 353: 1363 – 1372.

[6] DUFRASNE F. Baloxavir marboxil: an original new drug against influenza[J]. Pharmaceuticals, 2021, 15(1): 28.

[7] FERRON F, DECROLY E, SELISKO B, et al. The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs[J]. Antiviral Res, 2012, 96(1): 21 – 31.

[8] WJAV T T, ERVIN F. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(8): 479 – 493.

[9] BYRN R A, JONES S M, BENNETT H B, et al. Preclinical activity of VX-787, a first-in-class, orally bioavailable inhibitor of the influenza virus polymerase PB2 subunit[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(3): 1569 – 1582.

[10] KOUBA T, DRNCOVA P, CUSACK S. Structural snapshots of actively transcribing influenza polymerase[J]. Nat Struct Mol Biol, 2019, 26(6): 460 – 470.

[11] QI P, LUI Y Q, PENG R C, et al. Structural insight into RNA synthesis by influenza D polymerase[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(10): 1750 – 1759.

[12] TANG W P, JIN Z, WANG D N, et al. Progress in influenza virus RNA polymerase inhibitors[J]. Chin J Med Chem (中国药物化学杂志), 2017, 27(1): 78 – 83.

[13] FINBERG R W, LANNO R, ANDERSON D, et al. Phase 2b study of pimodivir (JNJ-63623872) as monotherapy or in combination with oseltamivir for treatment of acute uncomplicated seasonal influenza A: TOPAZ trial[J]. J Infect Dis, 2019, 219(7): 1026 – 1034.

[14] TAN X, SHEN H, WU J, et al. Pyrimidine and pyridine derivatives and their use in the treatment, amelioration or prevention of influenza: WO, 2016073637[P]. 2016 – 05 – 12.

[15] BOYD M J, BANDARAGE U K, BENNETT H, et al. Isosteric replacements of the carboxylic acid of drug candidate VX-787: effect of charge on antiviral potency and kinase activity of azaindole-based influenza PB2 inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(9): 1990 – 1994.

[16] ANNELIES S, LIEVE N. The influenza virus polymerase complex: an update on its structure, functions, and significance for antiviral drug design[J]. Med Res Rev, 2016, 36(6): 1127 – 1173.

[17] BANDARAGE U K, CLARK M P, PEROLA E, et al. Novel 2-substituted 7-azaindole and 7-azaindazole

analogues as potential antiviral agents for the treatment of influenza[J]. ACS Med Chem Lett,2017,8(2):261 – 265.

[18] PRYDE D C,DALVIE D,HU Q Y,et al. Aldehyde oxidase:an enzyme of emerging importance in drug discovery[J]. J Med Chem,2010,53(24):8441 – 8460.

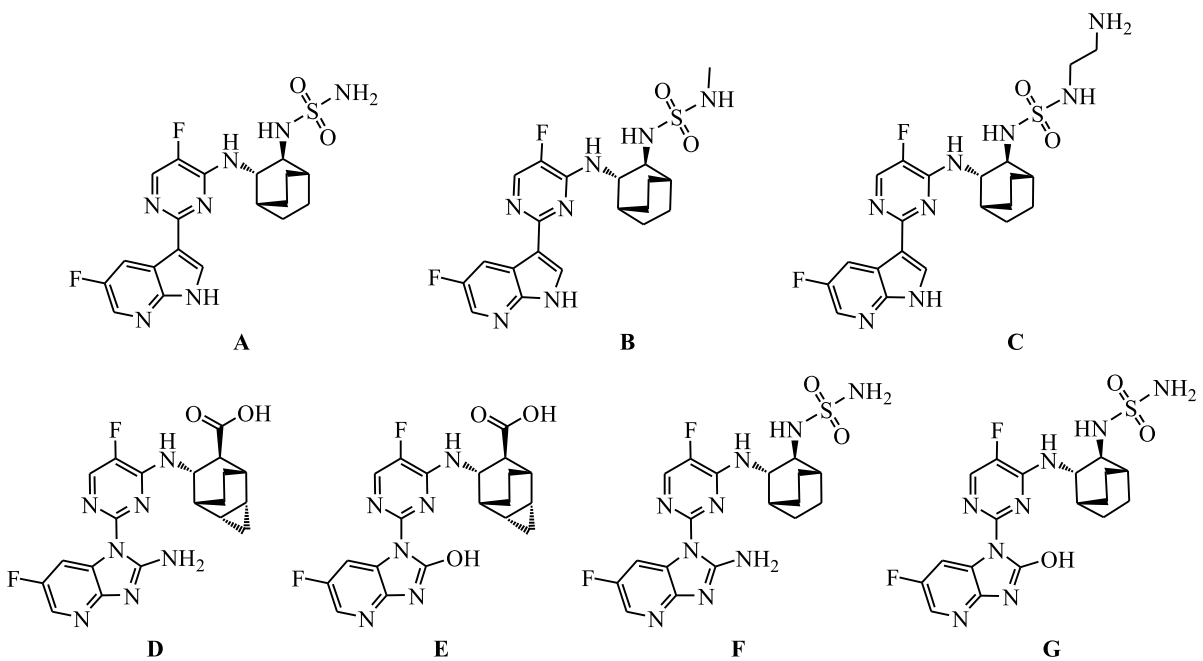
[19] LIU T,ZHOU Z X,ZHAN P,et al. Graphical synthetic routes of favipiravir[J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志),2018,28(1):77 – 79.

Design,synthesis and activity evaluation of pimodivir derivatives against influenza A virus

YANG Ying[1],LIU Shujuan[1],BAO Huan[1],LI Fei[1*],LI Xingzhou[2*]

(1. *College of Petrochemical Engineering,Liaoning Petrochemical University,Fushun* 113001,*China*;
2. *State Key Laboratory of National Security Specially Needed Medicines,Academy of Military Medical Sciences,Beijing* 100850,*China*)

Abstract:A series of novel influenza A virus PB2 inhibitors containing a sulfonyldiamide moiety were designed and synthesized,and their inhibitory activities against both H1N1 and H3N2 viral strains were evaluated. Using pimodivir as the lead compound,structural optimization of the pyrrolopyridine scaffold was carried out,derivatization of the bicyclo[2.2.2]octane moiety was implemented,and the carboxylic acid group was transformed into a sulfonyldiamide moiety,affording a series of novel PB2 inhibitors. A total of seven target compounds(**A** – **G**) were synthesized,and their structures were confirmed by ESI-MS and ^{1}H-NMR. The *in vitro* anti-influenza virus activities of the target compounds were assessed against H1N1 and H3N2 subtypes using a cytopathic effect inhibition assay in MDCK cells. Bioactivity evaluation revealed that compounds **A** – **C** and **G** exhibited potent anti-influenza virus activity. Notably,compound **G** displayed low cytotoxicity and a favorable safety profile,warranting further in-depth investigation as a promising candidate.



Key words:PB2 inhibitor; pimodivir; influenza A virus