

酰胺类黄嘌呤氧化酶抑制剂的设计合成及活性评价

张 蕾¹, 严定安¹, 田金英², 叶 菲², 肖志艳^{1*}

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所 1. 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室,
2. 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 是尿酸代谢中的关键酶, 其抑制剂在降尿酸治疗中发挥着重要的作用。本文以非布索坦 (febuxostat) 和托匹司他 (topiroxostat) 为模板, 设计合成了 18 个酰胺类化合物, 其中 6 个化合物在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下显示出一定的黄嘌呤氧化酶抑制活性。分子对接研究初步阐明了此类化合物的作用模式, 为后续结构优化提供了依据。

关键词: 黄嘌呤氧化酶; 高尿酸血症; 痛风; 酰胺衍生物

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0952-07

Design, synthesis and biological evaluation of amide derivatives as xanthine oxidase inhibitors

ZHANG Lei¹, YAN Ding-an¹, TIAN Jin-ying², YE Fei², XIAO Zhi-yan^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, 2. Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Xanthine oxidase (XO) is a key enzyme in the synthesis of uric acid. Therefore, XO inhibitors play an important role in the antihyperuricemic therapy. Based on the template structures of febuxostat and topiroxostat, 18 amide derivatives were designed and synthesized. Among them, six showed apparent inhibitory activity against XO under the concentration of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Molecular docking revealed the possible interaction mode of this compound class, which may provide a clue for further molecular design.

Key words: xanthine oxidase; hyperuricemia; gout; amide derivative

高尿酸血症是体内嘌呤代谢紊乱造成的代谢性疾病, 主要表现为由于尿酸生成增多或排泄减少所致的血清尿酸浓度过高, 尿酸盐出现结晶化, 沉积在软组织或关节, 引起炎症反应, 继而诱发痛风^[1]。持续的高尿酸水平可引起诸多并发症, 如肾炎、心脏病、慢性肾病等, 甚至会引发尿毒症、肾衰竭而导致死亡, 严重威胁人类的健康。因此, 控制血尿酸水平 (正常人群维持在 $6 \text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ 以下, 严重痛风患者, 则

应维持在 $5 \text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ 以下) 是预防痛风及相关并发症的重要手段^[2]。

黄嘌呤氧化酶 (XO) 是一种多功能的黄素蛋白酶, 可催化次黄嘌呤在钼嘌呤中心氧化生成黄嘌呤, 进而生成尿酸, 是体内尿酸代谢的关键酶^[3,4]。抑制 XO 的活性能够有效减少尿酸的产生, 从而达到降低血尿酸水平的目的。

嘌呤类抑制剂别嘌呤醇是 FDA 于 1966 年批准上市的第一个 XO 抑制剂, 广泛用于痛风及高尿酸血症患者的临床治疗。但严重皮肤不良反应 (severe cutaneous adverse reactions, SCARs) 等药物超敏反应以及较高的使用剂量, 限制了它的临床应用^[5,6]。

收稿日期: 2017-03-22; 修回日期: 2017-04-11.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2014TD02).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63189228, E-mail: xiaoz@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0251

非嘌呤类 XO 抑制剂非布索坦 (febuxostat, **1**) 和托匹司他 (topiroxostat, **2**) 分别于 2009 年和 2013 年经美国 FDA 批准上市, 用于慢性痛风的治疗。与嘌呤类抑制剂相比, 非嘌呤类 XO 抑制剂临床使用剂量低, 作用更为持久且具有较高的选择性^[7]。此类抑制剂通过肝脏代谢, 可避免别嘌呤醇经肾脏排泄而引起的不良反应, 因此可用于对别嘌呤醇不耐受患者及肾病患者的治疗。非嘌呤类 XO 抑制剂在药效、安全性等方面的独特优势, 使其成为近年来的研究热点。

虽然 **1** 和 **2** 都作用于 XO 的黄嘌呤结合位点, 但它们的作用机制和结合模式却不相同^[8]。**1** 通过占据酶的疏水空腔来阻止钼蝶呤中心对底物的催化作用^[9]; **2** 则在占据通往钼离子疏水通道的同时, 还与 XO 的钼离子形成 Mo-O-C 共价键^[10]。为了充分探究非嘌呤类 XO 抑制剂的构效关系, 进一步扩充此类抑制剂的结构多样性, 本研究基于 **1** 和 **2** 设计了两个系列酰胺类化合物 (图 1)。系列 **I** 在 **1** 的噻唑环与苯环之间插入酰胺键, 使化合物在有效地占据 XO 狭长的疏水空腔的同时, 向腔内进一步延伸, 期望噻唑羧酸部分与钼离子形成配位作用, 从而增强对 XO 的抑制活性。系列 **I** 中的化合物 **3a~3n** 主要考察了苯环上不同的 R₂、R₃ 取代基对抑酶活性的影响, 化合物 **3o** 则探索了酰胺氮甲基化带来的分子构象变化对活性的影响。系列 **II** 参照 **2** 的结构, 将系列 **I** 中的取代苯环替换为取代吡啶环, 以进一步研究非嘌呤类 XO 抑制剂的构效关系。

如路线 **1** 所示, 目标化合物 **3a~3n**、**3p~3r** 均由羧酸类化合物 (**4**) 和 2-噻唑胺衍生物 (**5**) 在 HATU [2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate] 及 DIEA (*N,N*-diisopropylethylamine) 催化下缩合, 并进一步水解得到。化合物 **4** 由 3 种不同途径获得 (合成路线 1): **4a~4j** 由 4-羟基苯甲醛 (**7a~7i**) 或 4-巯基苯甲醛 (**7j**) 经烷基化、高锰酸钾

氧化两步反应得到; **4k**、**4l** 直接购得; **4m**、**4n** 参考文献方法^[11], 分别由 **4k**、**4l** 在 DMSO 及氢溴酸作用下溴化得到。目标化合物 **3o** 由中间体 **6a** 经 *N*-烷基化及水解得到。

结果与讨论

1 化合物 **3a~3r** 的结构确证

采用上述合成路线共合成了 18 个酰胺类化合物, 全部结构均经 ¹H NMR 和 HR-ESI-MS 确证且未见文献报道, 其理化性质和谱学数据见表 1 和表 2。

Table 1 Physical data of compounds **3a~3r**

Compd.	Yield/%	mp/°C	Compd.	Yield/%	mp/°C
3a	46	224–226	3j	56	238–240
3b	60	289–291	3k	51	248–250
3c	59	245–247	3l	64	253–255
3d	67	249–251	3m	50	233–235
3e	52	248–250	3n	57	254–256
3f	83	233–235	3o	54	234–236
3g	72	217–219	3p	62	246–248
3h	67	242–244	3q	50	168–170
3i	78	243–245	3r	75	263–265

2 化合物 **3a~3r** 的 XO 抑制活性及结果讨论

在 10 μmol·L⁻¹ 浓度下, 测定了化合物 **3a~3r** 对 XO 的抑制活性。如表 3 所示, 化合物 **3a**、**3f**、**3g**、**3i**、**3q** 和 **3r** 在测试浓度下对 XO 表现出一定的抑制作用。其中, 化合物 **3a** 对 XO 具有明显的抑制作用, 在 10 μmol·L⁻¹ 浓度下对 XO 的抑制率达到 57.1%。化合物 **3a~3r** 的抑酶活性结果揭示了初步的构效关系。在系列 **I** 化合物中, 苯环上 R₂ 取代基对抑酶活性具有明显影响, 化合物的活性顺序为: -Br>-Cl>-F, -NO₂ (**3a** vs **3e**、**3d**、**3f**); 苯环上 R₃ 取代基对抑酶活性亦有一定的影响: R₃ 为取代氨基或吗啉环对活性不利 (**3a** vs **3m**、**3n**), R₃ 为硫醚取代时, 可能使活性

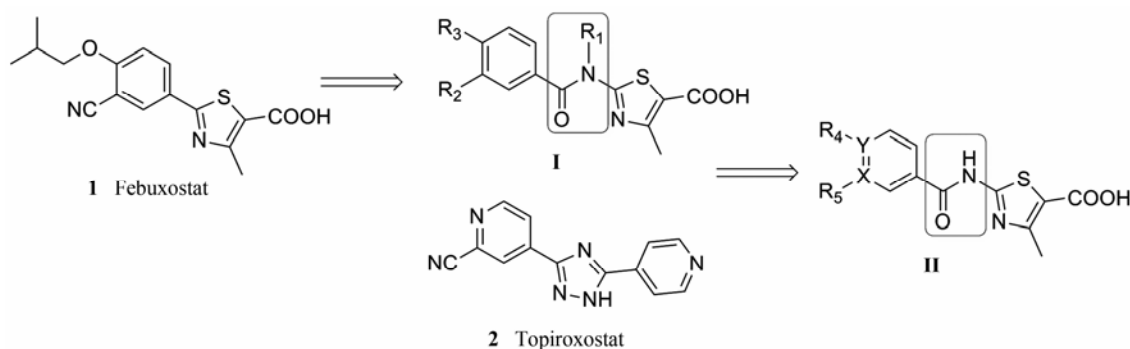
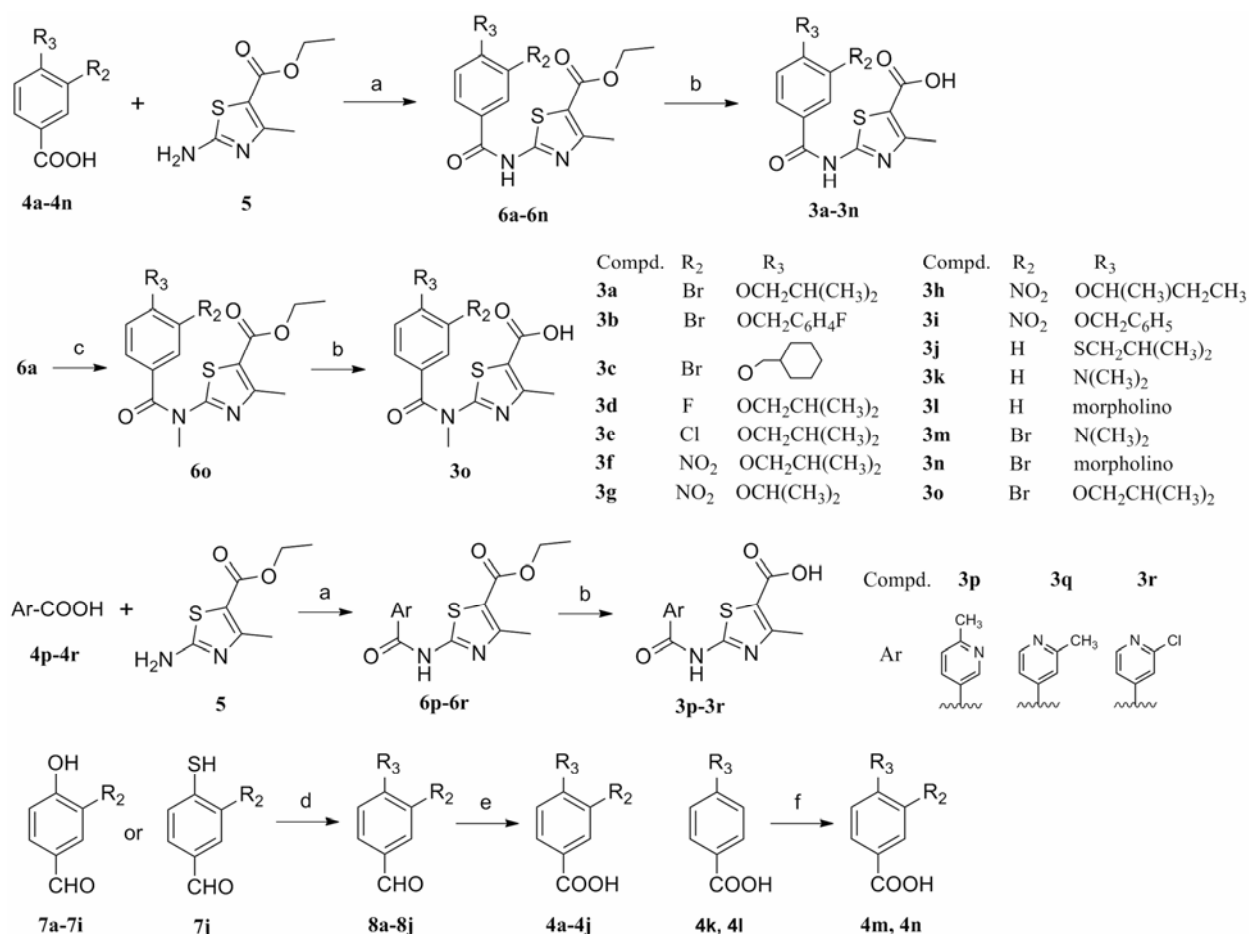


Figure 1 Molecular design of amide derivatives



Scheme 1 Synthesis of compounds **3** and **4**. Reagents and conditions: a: HATU, DIEA, DMF, r.t.; b: NaOH, EtOH, 55 °C, then 1 mol·L⁻¹ aq. HCl; c: CH₃I, NaH, r.t.; d: R₃Br, K₂CO₃, KI, DMF, 80 °C; e: KMnO₄, DMF, H₂O, r.t.; f): Hydrobromic acid, DMSO, ethyl acetate

降低 (**3a** vs **3j**); 酰胺氮甲基化后活性明显下降 (**3a** vs **3o**), 可能与氮甲基化带来的分子构象变化及分子形状变化有关。在系列 **II** 化合物中, 4-取代吡啶环的抑酶活性优于 3-取代吡啶环 (**3p** vs **3q**, **3r**)。

3 分子对接结果分析

通过分子对接, 研究了非布索坦 (**1**)、化合物 **3a** 与黄嘌呤氧化酶 (PDB ID: 1N5X) 作用模式的差异。如图 2a 所示, **1** 的噻唑环可以与 Phe914、Phe1009

形成 π - π 相互作用, 噻唑环上的羧基能够与 Arg880、Thr1010 形成氢键相互作用, 噻唑环上的氮原子可与 Glu802 形成氢键相互作用, 与文献报道的关键相互作用一致^[9]。化合物 **3a** 保持了噻唑环与 Phe914、Phe1009 的 π - π 相互作用以及羧基与 Arg880 的氢键相互作用, 并且酰胺键上的氮原子也与 Glu802 存在氢键相互作用 (图 2b)。然而, 化合物 **3a** 在结合腔内占据的位置以及构象与非布索坦略有不同 (图 2c)。在

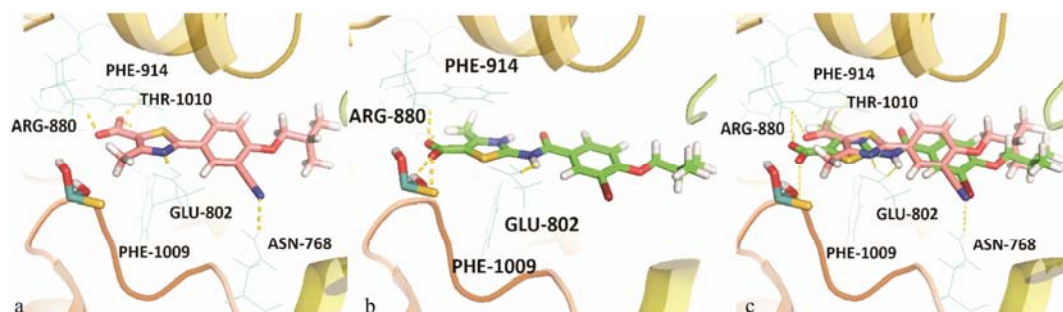


Figure 2 The interaction modes of **1** and **3a** suggested by docking study (Hydrogen bonding interactions are showed with dotted lines). a: Febusostat (**1**); b: Compound **3a**; c: Overlap of **1** and compound **3a**

Table 2 Spectral data of compounds **3a–3r**

Compd.	¹ H NMR (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	HR-ESI-MS [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>) Calcd. (Found)
3a	12.86 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.38 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.13 (dd, <i>J</i> = 8.4, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.24 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 3.95 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H, OCH ₂ CH), 2.57 (s, 3H, CH ₃), 2.16–2.05 (m, 1H, OCH ₂ CH), 1.03 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H, CH(CH ₃) ₂).	C ₁₆ H ₁₈ BrN ₂ O ₄ S 413.016 5 (413.015 6)
3b	12.88 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.39 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.13 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.53 (dd, <i>J</i> = 8.8, 6.0 Hz, 2H, ArH), 7.35 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.25 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, ArH), 5.29 (s, 2H, OCH ₂), 2.56 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₉ H ₁₅ BrFN ₂ O ₄ S 464.991 4 (464.991 0)
3c	12.87 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.36 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.11 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 3.96 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H, OCH ₂), 2.56 (s, 3H, CH ₃), 1.88–1.57 (m, 6H, cyclohexyl-H), 1.33–1.00 (m, 5H, cyclohexyl-H).	C ₁₉ H ₂₂ BrN ₂ O ₄ S 453.047 8 (453.047 4)
3d	12.85 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.13–7.76 (m, 2H, ArH), 7.31 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 3.92 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H, OCH ₂ CH), 2.56 (s, 3H, CH ₃), 2.12–1.99 (m, 1H, OCH ₂ CH), 0.98 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H, CH(CH ₃) ₂).	C ₁₆ H ₁₈ FN ₂ O ₄ S 353.096 6 (353.096 2)
3e	12.84 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.36 (s, 1H, ArH), 8.11 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 3.93 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H, OCH ₂ CH), 2.55 (s, 3H, CH ₃), 2.15–1.82 (m, 1H, OCH ₂ CH), 1.01 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H, CH(CH ₃) ₂).	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₂ O ₄ S 369.067 0 (369.065 9)
3f	13.02 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.67 (s, 1H, ArH), 8.37 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.51 (dd, <i>J</i> = 8.8, 3.2 Hz, 1H, ArH), 4.04 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H, OCH ₂ CH), 2.57 (s, 3H, CH ₃), 2.11–2.00 (m, 1H, OCH ₂ CH), 0.99 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 6H, CH(CH ₃) ₂).	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₆ S 380.091 1 (380.092 0)
3g	13.01 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.63 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.35 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H, ArH), 5.01–4.95 (m, 1H, OCH(CH ₃) ₂), 2.57 (s, 3H, CH ₃), 1.33 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 6H, OCH(CH ₃) ₂).	C ₁₅ H ₁₆ N ₃ O ₆ S 366.075 4 (366.074 7)
3h	12.99 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.62 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.33 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.54 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H, ArH), 4.82–4.72 (m, 1H, OCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃), 2.55 (s, 3H, CH ₃), 1.71–1.60 (m, 2H, OCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃), 1.28 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 3H, OCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃), 0.91 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, OCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃).	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₆ S 380.091 1 (380.091 8)
3i	13.01 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.69 (s, 1H, ArH), 8.39 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H, ArH), 7.43 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H, ArH), 7.37 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H, ArH), 5.43 (s, 2H, OCH ₂), 2.57 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₉ H ₁₆ N ₃ O ₆ S 414.075 4 (414.074 5)
3j	12.84 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.01 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, ArH), 2.96 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H, OCH ₂ CH), 2.56 (s, 3H, CH ₃), 1.91–1.76 (m, 1H, OCH ₂ CH), 1.00 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 6H, CH(CH ₃) ₂).	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₃ S ₂ 351.083 2 (351.082 9)
3k	12.79 (s, 1H, COOH), 12.45 (s, 1H, CONH), 7.99 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H, ArH), 6.74 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H, ArH), 3.01 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 2.55 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₃ S 306.090 7 (306.089 3)
3l	12.85 (s, 1H, COOH), 12.54 (s, 1H, CONH), 8.01 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H, ArH), 7.00 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H, ArH), 3.76–3.67 (m, 4H, morpholino-H), 3.32–3.22 (m, 4H, morpholino-H), 2.55 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S 348.101 3 (348.099 6)
3m	12.83 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.32 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.05 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 2.83 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 2.55 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₄ H ₁₅ BrN ₃ O ₃ S 384.001 2 (384.001 2)
3n	12.90 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.35 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.10 (dd, <i>J</i> = 8.4, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.24 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 3.83–3.57 (m, 4H, morpholino-H), 3.12–2.87 (m, 4H, morpholino-H), 2.56 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₆ H ₁₇ BrN ₃ O ₄ S 426.011 8 (426.011 3)
3o	12.88 (s, 1H, COOH), 8.06 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.91 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 3.93 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H, OCH ₂ CH), 3.32 (s, 3H, NCH ₃), 2.52 (s, 3H, CH ₃), 2.14–2.01 (m, 1H, OCH ₂ CH), 1.03 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H, CH(CH ₃) ₂).	C ₁₇ H ₂₀ BrN ₂ O ₄ S 427.032 2 (427.033 0)
3p	13.00 (brs, 2H, COOH, CONH), 9.09 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.30 (dd, <i>J</i> = 8.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 2.56 (s, 3H, CH ₃), 2.54 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₂ H ₁₂ N ₃ O ₃ S 278.059 4 (278.058 0)
3q	13.09 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.64 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H, ArH), 7.86 (s, 1H, ArH), 7.76 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H, ArH), 2.57 (s, 3H, CH ₃), 2.55 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₂ H ₁₂ N ₃ O ₃ S 278.059 4 (278.058 2)
3r	13.19 (brs, 2H, COOH, CONH), 8.62 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 1H, ArH), 8.09 (s, 1H, ArH), 7.96 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.2 Hz, 1H, ArH), 2.56 (s, 3H, CH ₃).	C ₁₁ H ₉ ClN ₃ O ₃ S 298.004 8 (298.003 8)

Table 3 Inhibitory activity of selected compounds against XO.

*The percentage inhibition was measured under the concentration of 10 μmol·L⁻¹

Compd.	Inhibition/%*	Compd.	Inhibition/%*
Febuxostat	95.6	3j	-7.0
3a	57.1	3k	-1.8
3b	-3.2	3l	-3.0
3c	-3.4	3m	-2.5
3d	-6.3	3n	-2.3
3e	-3.2	3o	9.6
3f	26.4	3p	-3.4
3g	31.0	3q	34.4
3h	-2.1	3r	19.7
3i	26.0		

噻唑环和苯环之间插入酰胺键后, **3a** 中的噻唑羧酸部分并未如预期向腔内延伸, 进而与铝离子形成配位作用, 而是 **3a** 中噻唑环的取向发生了翻转, 导致羧基缺失了与 Thr1010 的氢键相互作用。因此, 化合物 **3a** 虽仍具有较好的 XO 抑制活性, 但其活性弱于非布索坦。近期, 亦有文献报道式 **I** 所示化合物具有显著的 XO 酶抑制活性^[12], 并且高活性化合物与 **1** 在 XO 结合腔内的构象及相互作用模式一致, 羧基与 Arg880、Thr1010 的氢键相互作用得以保留, 提示 R₂ 及 R₃ 对此类化合物的活性构象及抑酶作用影响显著。

3 小结

根据非布索坦 (**1**) 和托匹司他 (**2**) 与黄嘌呤氧

化酶的作用模式, 设计合成了 18 个结构新颖的酰胺类化合物, 并测定了它们对 XO 的抑制活性。其中, 6 个化合物显示出一定的抑酶活性, 初步总结了此类化合物的构效关系, 并通过分子对接揭示了化合物 **3a** 与 XO 可能的作用模式, 为酰胺类 XO 抑制剂的进一步结构优化提供了参考。

实验部分

熔点采用 Fisher Scientific 显微熔点仪测定, 温度未校正, 核磁氢谱采用 Varian Mercury 400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标。质谱采用 LC/MDC-MS 串联质谱仪 (Thermo, USA) 测定。柱色谱分离采用硅胶 H (200~300 目), 薄层色谱硅胶为烟台江友硅胶开发有限公司所产的 HSGF 254 型硅胶板。实验所用试剂为化学纯或分析纯, 购买后未作进一步处理, 直接使用。所用溶剂均为分析纯, 其中无水溶剂均经美国创新科技 (Innovative Technology) 所产的水溶剂纯化系统除水后使用, 其他溶剂未特别指出则未经处理。

1 化合物的合成

1.1 3-溴-4-异丁氧基苯甲醛的制备 (8a) 将 3-溴-4-羟基苯甲醛 (**7a**, 9.3 g, 47.5 mmol) 溶于 50 mL DMF 中, 加入溴代异丁烷 (13.0 g, 95 mmol)、碳酸钾 (13.0 g, 95 mmol)、碘化钾 (157.7 mg, 0.1 mmol), 80 °C 加热搅拌 10 h。待反应完全后, 蒸除部分 DMF, 残余物加入 20 mL 水, 乙酸乙酯萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸除溶剂后柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 30 : 1) 得到无色液体 **8a**, 收率: 95.2%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.83 (s, 1H, CHO), 8.07 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.79 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H, ArH), 6.97 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 3.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, OCH₂CH), 2.16~2.05 (m, 1H, OCH₂CH), 1.09 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂); HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for C₁₁H₁₄BrO₂ [M+H]⁺ 257.0172, Found 257.0165。

采用类似方法合成了 **8b**~**8j**。

1.2 3-溴-4-异丁基苯甲酸的制备 (4a) 将 **8a** (9.0 g, 35 mmol) 溶于 30 mL DMF 中, 将 KMnO₄ (10.0 g, 60 mmol) 溶于 10 mL 水中。冰浴下将高锰酸钾水溶液缓慢滴入到 **8a** 的 DMF 溶液中, 室温反应 12 h。反应后用加硅藻土的漏斗过滤掉反应残渣, 滤液浓缩后, 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液溶解浓缩后的固体, 加入少量乙酸乙酯萃取, 水相加入 1 mol·L⁻¹ HCl 调节 pH 至 4~5, 有大量白色固体析出, 过滤干燥后得到白色固体 **4a**, 收率: 86.3%。mp: 178~180 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.96 (s, 1H, ArH), 7.74 (d, $J =$

8.2 Hz, 1H, ArH), 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 3.79 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, OCH₂CH), 2.13~1.94 (m, 1H, OCH₂CH), 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂); HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for C₁₁H₁₄BrO₃ [M+H]⁺ 273.0121, Found 273.0111。

采用类似方法合成了 **4b**~**4j**。

1.3 3-溴-4-二甲氨基苯甲酸的制备 (4m) 将 **4k** (666.0 mg, 4 mmol) 溶于 10 mL 乙酸乙酯中, 加入氢溴酸 (971.0 mg, 5.8 mmol)、DMSO (937.0 mg, 12 mmol), 60 °C 下加热搅拌 24 h。待反应完全后, 蒸除溶剂, 乙酸乙酯萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸除乙酸乙酯后柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 10 : 1) 得到白色固体 **4m**, 收率: 51%。mp: 172~174 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.28 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.97 (dd, $J = 8.6, 1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 2.94 (s, 6H, N(CH₃)₂); HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for C₉H₁₁BrNO₂ [M+H]⁺ 243.9968, Found 243.9960。

采用类似方法合成了 **4n**。

1.4 2-(3-溴-4-异丁基苯甲酰氨基)-4-甲基噻唑-5-羧酸乙酯的制备 (6a) 将 **4a** (1.1 g, 4 mmol)、HATU (1.6 g, 4.2 mmol)、DIEA (780 mg, 6 mmol) 溶于 15 mL DMF 中, 室温搅拌反应 30 min, 然后加入 2-氨基-4-甲基噻唑-5-羧酸乙酯 (745.0 mg, 4 mmol), 室温反应 12 h。反应结束后, 蒸除大部分 DMF, 乙酸乙酯萃取, 有机相分别用 1 mol·L⁻¹ HCl、10% NaHCO₃、饱和食盐水洗后柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯 10 : 1), 得白色固体 **6a**, 收率: 53.4%。mp: 200~202 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.92 (brs, 1H, CONH), 8.38 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, ArH), 8.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, OCH₂CH), 2.59 (s, 3H, CH₃), 2.14~2.02 (m, 1H, OCH₂CH), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂); HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for C₁₈H₂₂BrN₂O₄S [M+H]⁺ 441.0478, Found 441.0482。

采用类似方法合成了 **6b**~**6n**、**6p**~**6r**。

6b: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.16 (s, 1H, ArH), 7.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.45 (dd, $J = 7.6, 5.6$ Hz, 2H, ArH), 7.11 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH), 5.20 (s, 2H, CH₂), 4.34 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.59 (s, 3H, CH₃), 1.38 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH₂CH₃); mp: 235~237 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for C₂₁H₁₉BrFN₂O₄S [M+H]⁺ 493.0227, Found 493.0215。

6c: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.91 (s, 1H, CONH), 8.36 (s, 1H, ArH), 8.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H,

ArH), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 4.24 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.96 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.87~1.59 (m, 6H, cyclohexyl-H), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.25~0.98 (m, 5H, cyclohexyl-H); mp: 191~193 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 481.079 1, Found 481.077 5。

6d: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.90 (s, 1H, CONH), 8.04~7.91 (m, 2H, ArH), 7.31 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 4.24 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, OCH_2CH), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.05~2.02 (m, 1H, OCH_2CH), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); mp: 179~181 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{FN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 381.127 9, Found 381.127 0。

6e: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.89 (s, 1H, CONH), 8.21 (s, 1H, ArH), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 4.24 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.93 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, OCH_2CH), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.10~2.03 (m, 1H, OCH_2CH), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 0.99 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); mp: 193~195 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 397.098 3, Found 397.096 9。

6f: ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13.16 (s, 1H, CONH), 8.69 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, ArH), 8.38 (dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 4.27 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 4.06 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, OCH_2CH), 2.60 (s, 3H, CH_3), 2.14~2.00 (m, 1H, OCH_2CH), 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); mp: 201~203 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 408.122 4, Found 408.121 5。

6g: ^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 12.98 (s, 1H, CONH), 8.62 (s, 1H, ArH), 8.35 (dd, $J = 9.0, 1.0$ Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 4.97 (dt, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.25 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.34 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 183~185 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 394.106 7, Found 394.106 4。

6j: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.92 (s, 1H, CONH), 8.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 4.24 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, SCH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.89~1.77 (m, 1H, SCH_2CH), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); mp: 178~180 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 379.114 5, Found 379.113 3。

6k: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.52 (s, 1H, CONH), 7.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 4.23 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.00 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 241~243 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.122 0, Found 334.120 9。

6l: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.64 (s, 1H, CONH), 8.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 4.23 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.72~3.70 (m, 4H, morpholino-H), 3.29~3.27 (m, 4H, morpholino-H), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 202~204 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 376.132 6, Found 376.131 4。

6m: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.90 (s, 1H, CONH), 8.32 (s, 1H, ArH), 8.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 4.24 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.83 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 225~227 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 412.032 5, Found 412.031 4。

6n: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.94 (m, 1H, CONH), 8.35 (s, 1H, ArH), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 4.23 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.78~3.71 (m, 4H, morpholino-H), 3.08~3.02 (m, 4H, morpholino-H), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 220~222 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 454.043 1, Found 454.042 4。

6p: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13.11 (s, 1H, CONH), 9.09 (s, 1H, ArH), 8.29 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 4.25 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 210~212 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.090 7, Found 306.089 6。

6q: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.30 (s, 1H, CONH), 8.85 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, ArH), 8.24 (s, 1H, ArH), 8.15 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, ArH), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); mp: 190~192 °C; HR-MS (ESI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.090 7, Found 306.089 8。

6r: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13.34 (s, 1H, CONH), 8.62 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, ArH), 8.09 (s, 1H, ArH), 7.95 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, ArH), 4.25 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H,

OCH₂CH₃); mp: 220~222 °C; HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd. for C₁₃H₁₃ClN₃O₃S [M+H]⁺ 326.036 1, Found 326.034 7.

1.5 2-(3-溴-4-异丁基-N-甲基苯甲酰氨基)-4-甲基噻唑-5-羧酸乙酯的制备 (6o) 将 **6a** (100.0 mg, 0.2 mmol) 溶于 DMF 中, 加入氢氧化钠 (28.0 mg, 0.7 mmol), 室温搅拌 10 min 后加入碘甲烷 (0.05 mL, 0.7 mmol), 室温搅拌 3 h。待完全反应后, 乙酸乙酯萃取, 依次用饱和氯化铵溶液、饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥。蒸除溶剂, 加入乙酸乙酯, 有不溶于乙酸乙酯的固体析出, 过滤, 少量乙酸乙酯洗, 得到白色固体 **6o**, 收率: 30%。mp: 208~210 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (s, 1H, ArH), 8.16 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 4.26 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, OCH₂CH), 3.80 (s, 3H, NCH₃), 2.67 (s, 3H, CH₃), 2.15~2.02 (m, 1H, OCH₂CH), 1.28 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.01 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, OCH₂CH(CH₃)₂); HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd. for C₁₉H₂₄BrN₂O₄S [M+H]⁺ 455.063 5, Found 455.062 5。

1.6 2-(3-溴-4-异丁基苯甲酰氨基)-4-甲基噻唑-5-甲酸的制备 (3a) 将 **6a** (50.0 mg, 0.1 mmol) 溶于 6 mL 乙醇水混合溶剂 (EtOH-H₂O 2:1) 中, 加入 NaOH (80.0 mg, 2 mmol), 55 °C 下反应 2 h。TLC 监测反应完全后, 蒸除乙醇, 加水稀释, 用少量二氯甲烷萃取, 分离出水相, 用 1 mol·L⁻¹ HCl 调节 pH 至 4 左右, 有大量白色固体析出, 过滤干燥得到白色粉末状固体 **3a**。

采用类似方法合成了 **3b~3r**。化合物 **3a~3r** 的理化性质和谱学数据见表 1 和 2。

2 分子模拟实验

分子对接采用 Accelrys 公司的 Discovery Studio 2016 程序, 所使用的蛋白质晶体结构的 PDB 编号为 1N5X。采用 Small Molecules 模块下的 Diverse Conformation enumeration 产生构象, Conformation Method 设置为 “BEST”, 其他参数采用缺省值; 利用 Receptor-Ligand Interactions 模块下的 Dock ligands (Libdock) 程序进行分子对接, Input Receptor: 1N5X, 其他参数采用缺省值。采用 PYMOL 1.5.0.3 软件作图。

3 XO 体外抑酶活性实验

样品溶解于 DMSO 中, 配制成 10 mmol·L⁻¹ 储备液。在 37 °C、pH 7.4 下, 采用 96 孔板测定各化合物对 XOD-催化黄嘌呤 (XAN) 水解作用的影响。反应体系中含 10 μmol·L⁻¹ 的化合物 (终浓度)、3 U·L⁻¹ XOD (对照组不加, 以 0.01% DMSO 代替), 及缓冲液 (3.5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄、15.2 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄、0.25

mmol·L⁻¹ EDTA 及 50 μmol·L⁻¹ XAN, pH 7.4)。采用分光光度计检测 293 nm 波长下产物尿酸的吸收, 测定 XOD-催化的黄嘌呤 (XAN) 水解作用, 依据 OD 值计算抑制率。

References

- [1] Bridgeman MB, Chavez B. Febuxostat for the treatment of gout [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16: 395–398.
- [2] Richette P, Doherty M, Pascual E, et al. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76: 29–42.
- [3] Ken O, Koji M, Russ H, et al. The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7931–7936.
- [4] Ojha R, Singh J, Ojha A, et al. An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout (2011–2015) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2017, 27: 311–345.
- [5] Bernal JA, Quilis N, Andrés M, et al. Gout: optimizing treatment to achieve a disease cure [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2016, 7: 135–142.
- [6] Wang CW, Dao RL, Chung WH. Immunopathogenesis and risk factors for allopurinol severe cutaneous adverse reactions [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2016, 16: 339–345.
- [7] Michael A, Becker MD, Schumacher HR, et al. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 2450–2461.
- [8] Okamoto K, Nishino T. Crystal structures of mammalian xanthine oxidoreductase bound with various inhibitors: allopurinol, febuxostat, and FYX-051 [J]. *J Nippon Med Sch*, 2008, 75: 1–3.
- [9] Okamoto K, Eger BT, Nishino T, et al. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 1848–1855.
- [10] Okamoto K, Kusano T, Nishino T. Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum cofactor of xanthine oxidoreductase [J]. *Curr Pharm Design*, 2013, 19: 2606–2614.
- [11] Song S, Sun X, Li X, et al. Efficient and practical oxidative bromination and iodination of arenes and heteroarenes with DMSO and hydrogen halide: amild protocol for late-stage functionalization [J]. *Org Lett*, 2015, 17: 2886–2889.
- [12] Ali R, Kumar S, Afzal O, et al. 2-Benzamido-4-methylthiazole-5-carboxylic acid derivatives as potential xanthine oxidase inhibitors and free radical scavengers [J]. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 2017, 350: e1600313.