

## 6-氮杂吡啶类化合物的合成及抗胰腺癌活性评价

曹 阳<sup>1,2</sup>, 李 前<sup>2</sup>, 王亚玲<sup>2</sup>, 崔文慧<sup>2</sup>, 钱晨亮<sup>2</sup>, 司鑫鑫<sup>2\*</sup>

(1. 南京大学化学化工学院, 江苏 南京 210093; 2. 江苏海洋大学, 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005)

**摘要:** 通过筛选内部化合物库, 鉴定出了具有一定抗胰腺癌活性的片段。经系统改造合成了4类共计18个化合物, 并进行了抗胰腺癌活性评价。化合物II-1 ( $IC_{50} = 6.40 \pm 0.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和II-2 ( $IC_{50} = 7.15 \pm 0.51 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 活性表现突出。随后用细胞划痕实验及侵袭实验评价了II-1的抗迁移能力及侵袭能力, 结果显示, II-1具有良好的抗迁移能力及突出的抗侵袭能力。利用分子对接技术及分子动力学模拟技术, 锁定了II-1的靶点为双特异性酪氨酸磷酸化调控激酶1A (DYRK1A)。经酶活测试II-1和II-2分别有48%及32%酶抑制能力。

**关键词:** 6-氮杂吡啶; 抗胰腺癌; 双特异性酪氨酸磷酸化调控激酶1A; 合成; 抗增殖

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2828-08

## Synthesis and activity evaluation of 6-azaindole derivatives for pancreatic cancer therapy

CAO Yang<sup>1,2</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, WANG Ya-ling<sup>2</sup>, CUI Wen-hui<sup>2</sup>, QIAN Chen-liang<sup>2</sup>, SI Xin-xin<sup>2\*</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** Fragment with some anti-pancreatic cancer activity was identified by screening our internal chemical library. Eighteen compounds in 4 classes were synthesized by systematic modification and their anti-pancreatic cancer activity were evaluated. II-1 ( $IC_{50} = 6.40 \pm 0.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and II-2 ( $IC_{50} = 7.15 \pm 0.51 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) exhibited outstanding activity. Subsequently, the anti-migration ability and invasion ability of II-1 was evaluated by wound healing assay and invasion assay, II-1 exhibited good anti-migration ability and outstanding anti-invasion ability. Using molecular docking technology and molecular dynamics simulation technology, the potential target was locked on bispecific tyrosine phosphorylation regulates kinase 1A (DYRK1A). By enzyme activity testing, the inhibitory capacity of II-1 and II-2 was 48% and 32%, respectively.

**Key words:** 6-azaindole; anti-pancreatic cancer; bispecific tyrosine phosphorylation regulates kinase 1A; synthesis; anti-proliferation

胰腺癌是最具侵袭性和致命性的癌症之一, 死亡率与发病率相近, 病死率极高<sup>[1]</sup>。常见的治疗手段包括手术治疗、化疗、免疫疗法、放疗等<sup>[2]</sup>。化疗是治疗难以切除和转移性胰腺癌的主要方法, 常用的药物包

括氟尿嘧啶类、吉西他滨、金属铂类、伊立替康类、紫杉醇等<sup>[3]</sup>。然而, 这些药物在提高总生存率方面发挥的作用依然有限。因此, 广泛开发具有抗胰腺的药物, 特别是能提高生存率的药物非常关键。

常见的药物发现手段包括小分子化合物库和高通量筛选、计算机辅助药物设计 (CADD)、天然产物、基因工程、已上市药物开发新疗效等<sup>[4]</sup>手段。利用小分子化合物库和高通量技术发现先导化合物并进行深入研

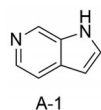
收稿日期: 2024-02-14; 修回日期: 2024-07-19.

基金项目: 江苏海洋大学研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX2022-31); 中国博士后科学基金 (2023M741444).

\*通讯作者 E-mail: sixx@jou.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0135

究,是制药工业开发药物的主要方法之一<sup>[5]</sup>。利用该方法,筛选了课题组化合物库,发现了一种具有一定活性的化合物片段,即 A-1,化学名 6-氮杂吡啶(图 1)。



**Figure 1** Fragment of 6-azaindole compound with certain activity

该骨架类化合物在抗胰腺癌方面未见报道,作为一种具有较大潜力的结构母核,有必要探究其在抗胰腺癌活性方面的表现。希望通过在母核上多个位点修饰发现具有良好活性的抗胰腺癌化合物。

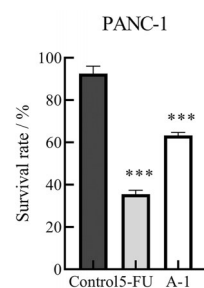
## 结果与讨论

### 1 6-氮杂吡啶母核抗胰腺癌活性的测试

采用 CCK-8 法(细胞增殖毒性检测)对所筛选出的活性片段 A-1(图 1)进行抗胰腺癌活性测试,进行了三组平行实验,结果显示(图 2)该母核结构能够抑制胰腺癌细胞(PANC-1)的存活,具有一定的抗胰腺癌活性,接下来将对该母核片段进行结构修饰,希望发现更多且抗胰腺癌活性更强的化合物。

### 2 化合物的合成

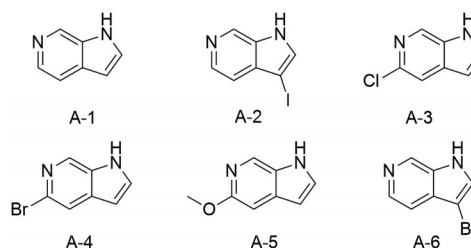
所有化合物通过合成路线 1 所示获得,其结构经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、HR-MS 确认为目标结构。理化性



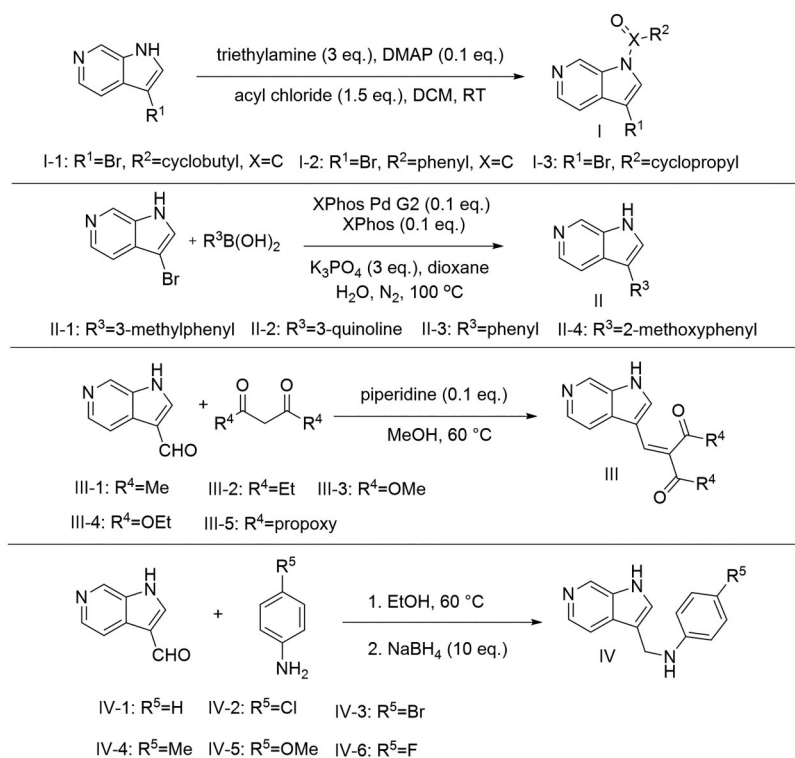
**Figure 2** The effect of A-1 on the survival rate of PANC-1. Univariate analysis of variance (ANOVA) and Dunnett comparison test were used to calculate statistical significance: \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; A-1: A fragment of a compound with certain activity, chemically called 6-azaindole; PANC-1: Pancreatic cancer cell; 5-FU: 5-Fluorouracil, positive control group

质及谱图数据见表 1。

为了研究的全面性,对具有该母核的简单取代衍生物也进行了抗胰腺癌活性研究(图 3)。



**Figure 3** Substituted 6-azaindole derivatives



**Scheme 1** Synthetic routes of 6-azaindole derivatives

**Table 1** Physical and spectral data of compounds I-1 to IV-6

Compd.	mp, <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, HRMS-ESI
I-1	mp: 159–162 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 9.72 (s, 1H, ArH), 8.54 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.46 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H, ArH), 3.78 (p, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, -CH), 2.61–2.53 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.45–2.38 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.19–2.00 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 172.0, 143.5, 138.7, 134.9, 132.0, 126.5, 113.9, 98.4, 39.0, 25.2, 18.3. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for 279.012 8; found 279.013 8.
I-2	mp: 102–105 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 9.64 (s, 1H, ArH), 8.49 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H, ArH), 7.77–7.74 (m, 2H, ArH), 7.67–7.63 (m, 1H, ArH), 7.57–7.54 (m, 3H, ArH), 7.49 (d, <i>J</i> = 3.7 Hz, 1H, ArH), 6.64 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 168.4, 143.4, 138.8, 136.6, 133.9, 133.4, 132.9, 131.0, 129.6, 129.2, 115.9, 107.8. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for 223.086 6; found 223.086 9.
I-3	mp: 119–121 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 9.25 (s, 1H, ArH), 8.56 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.55–7.53 (m, 1H, ArH), 2.67–2.62 (m, 1H, CH), 1.48–1.44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1.15–1.10 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 142.7, 135.7, 135.2, 131.5, 128.1, 114.2, 97.3, 32.0, 6.6. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for 300.964 1; found 300.963 5.
II-1	mp: 215–217 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.74 (s, 1H, ArH), 8.15–8.14 (m, 1H, ArH), 7.87 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H, ArH), 7.79–7.78 (m, 1H, ArH), 7.50–7.46 (m, 2H, ArH), 7.34–7.31 (m, 1H, ArH), 7.11 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, ArH), 2.42 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 138.5, 137.9, 135.0, 134.7, 129.0, 128.8, 127.2, 127.0, 126.4, 124.1, 115.2, 113.8, 113.4, 21.7. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 209.107 3; found: 209.108 4.
II-2	mp: 214–217 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 12.12 (s, 1H, NH), 9.35 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.86 (s, 1H, ArH), 8.67 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H, ArH), 8.33 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.27 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 8.08 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H, ArH), 8.02 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.72–7.69 (m, 1H, ArH), 7.64–7.60 (m, 1H, ArH); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 150.6, 147.0, 139.1, 135.7, 135.5, 133.8, 131.8, 130.3, 130.0, 129.9, 129.7, 129.1, 128.9, 128.4, 115.3, 114.0. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 246.102 6; found: 246.102 2.
II-3	mp: 211–213 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.74 (s, 1H, ArH), 8.14 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H, ArH), 7.89–7.87 (m, 1H, ArH), 7.80 (s, 1H, ArH), 7.69–7.67 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H, ArH), 7.31–7.26 (m, 1H, ArH). HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 195.091 7; found: 195.091 2.
II-4	mp: 218–220 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.71 (s, 1H, ArH), 8.08 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, ArH), 7.79 (s, 1H, ArH), 7.68 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H, ArH), 7.31–7.27 (m, 1H, ArH), 7.10 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H, ArH), 7.06–7.02 (m, 1H, ArH), 3.85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 156.1, 137.7, 134.5, 133.3, 130.3, 129.5, 129.2, 127.4, 123.0, 120.6, 114.5, 111.6, 111.5, 55.3. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 225.102 2; found: 225.101 7.
III-1	mp: 214–216 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 12.36 (s, 1H, NH), 8.83 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.28 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.94 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 7.75 (s, 1H, ArH), 2.48 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.32 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 206.7, 197.7, 140.0, 137.9, 135.80, 133.8, 132.5, 132.4, 132.0, 113.9, 109.0, 31.4, 26.5. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 229.097 2; found: 229.097 1.
III-2	mp: 165–168 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 12.27 (s, 1H, NH), 8.82 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.92 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 2H, ArH), 7.60 (s, 1H, ArH), 2.92 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.58 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1.06–1.02 (m, 6H, CH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 209.2, 199.6, 139.4, 136.9, 135.3, 133.3, 131.8, 131.3, 130.3, 113.4, 108.6, 36.0, 30.2, 8.4, 7.7. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 257.128 5; found: 257.129 1.
III-3	mp: 180–181 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 12.41 (s, 1H, NH), 8.83 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.99 (s, 1H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.72–7.71 (m, 1H, ArH), 3.84 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.77 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 167.6, 164.9, 140.0, 135.6, 134.5, 133.6, 133.1, 131.6, 118.9, 113.2, 108.4, 52.8, 52.4. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 261.087 0; found: 261.087 0.
III-4	mp: 171–173 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.75 (s, 1H, ArH), 8.23 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H, ArH), 8.04–7.99 (m, 2H, ArH), 7.77–7.76 (m, 1H, ArH), 4.38 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 4.31 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 1.36–1.32 (m, 6H, CH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 169.1, 166.7, 140.0, 135.7, 135.0, 134.9, 134.5, 134.2, 122.2, 114.7, 110.6, 62.9, 62.6, 14.7, 14.5. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 289.118 3; found: 289.118 6.
III-5	mp: 163–164 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 12.38 (s, 1H, NH), 8.83 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, ArH), 7.95 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 2H, ArH), 7.72–7.71 (m, 1H, ArH), 4.24 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 4.14 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 1.67–1.62 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 0.92 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ), 0.87 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 167.1, 164.3, 139.7, 135.4, 133.7, 133.4, 132.7, 131.4, 119.6, 113.0, 108.3, 66.7, 66.2, 21.6, 21.3, 10.2. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 317.149 6; found: 317.150 4.
IV-1	mp: 129–135 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.64 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.04 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, ArH), 7.66–7.65 (m, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.11–7.07 (m, 2H, ArH), 6.73–6.71 (m, 2H, ArH), 6.63–6.60 (m, 1H, ArH), 4.45 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 150.4, 137.7, 135.4, 134.7, 133.5, 130.1, 129.7, 118.4, 115.3, 115.0, 114.5, 40.4. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 224.118 2; found: 224.119 0.
IV-2	mp: 155–156 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.64 (s, 1H, ArH), 8.04 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, ArH), 7.65–7.63 (m, 1H, ArH), 7.49 (s, 1H, ArH), 7.05–7.02 (m, 2H, ArH), 6.66–6.63 (m, 2H, ArH), 4.42 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 149.0, 137.6, 135.3, 134.6, 133.3, 129.7, 129.6, 122.3, 117.5, 115.2, 114.5, 40.2. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 258.079 3; found: 258.080 1.
IV-3	mp: 156–160 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 8.60 (s, 1H, ArH), 8.00 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.61–7.59 (m, 1H, ArH), 7.45 (s, 1H, ArH), 7.14–7.11 (m, 2H, ArH), 6.58–6.55 (m, 2H, ArH), 4.38 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 149.4, 137.6, 135.3, 134.7, 133.3, 132.6, 129.6, 115.7, 115.1, 114.4, 109.1, 40.1. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 302.028 7; found: 302.029 0.
IV-4	mp: 143–145 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 8.72 (s, 1H, ArH), 8.07 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.54 (s, 1H, ArH), 6.85 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, ArH), 6.58 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, ArH), 4.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.11 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 146.7, 137.3, 134.4, 133.6, 131.1, 129.4, 127.8, 124.4, 113.9, 113.2, 112.8, 38.7, 20.2. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 238.133 9; found: 238.134 7.

Continued

Compd.	mp, <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, HRMS-ESI
IV-5	mp: 146–148 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 8.71 (s, 1H, ArH), 8.07 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.54 (s, 1H, ArH), 6.68 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H, ArH), 6.62 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, ArH), 4.32 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.63 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 153.9, 144.2, 137.5, 135.2, 134.5, 133.4, 129.8, 116.3, 115.7, 115.2, 114.9, 56.2, 41.5. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 254.128 8; found: 254.129 6.
IV-6	mp: 134–136 °C. <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 8.71 (s, 1H), 8.07 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, ArH), 7.55 (s, 1H, ArH), 6.87 (t, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, ArH), 6.65–6.63 (m, 2H, ArH), 4.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 154.5 (d, <i>J</i> = 230.8 Hz), 145.7, 137.4, 134.5, 133.6, 131.1, 127.9, 115.3 (d, <i>J</i> = 21.8 Hz), 113.9, 113.3 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 112.8, 38.9. HRMS: (ESI, <i>m/z</i> ); [M+H] <sup>+</sup> calcd for: 242.108 8; found: 242.109 1.

### 3 体外抗胰腺癌活性评价

对所有化合物的抗胰腺癌活性进行了评价,结果显示, II-1 和 II-2 在 10 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度下对胰腺癌细胞展现出显著的抑制活性。随后对 2 个化合物的 IC<sub>50</sub> (24 h) 进行了研究, II-1 和 II-2 的 IC<sub>50</sub> 分别为 6.40 ± 0.34 和 7.15 ± 0.51 μmol·L<sup>-1</sup> (图 4)。

### 4 构效关系分析

I 类化合物抗胰腺癌活性较差,推测 6-氮杂吡啶母核氮上活泼氢对活性影响较大。II 类化合物活性差异性大,芳环或杂环及其环上的取代基及位置十分重要,对比 4 个化合物可以得出芳环的 3 位取代基可能是提高活性关键。III 类化合物虽然有富含氧元素的支链,但活性未见明显提高。IV 类化合物引入的亚甲基未能提升活性。

### 5 抗迁移和侵袭能力评价

癌细胞的迁移和侵袭与肿瘤的发展密切相关<sup>[6,7]</sup>。利用划痕实验与侵袭实验评估了 II-1 在抵抗癌细胞迁移和侵袭方面的能力。图 5 展示了 II-1 不同时间 (24 和 48 h) 不同浓度 (1、5、10 μmol·L<sup>-1</sup>) 抑制癌细胞迁移情况,结果显示, II-1 展现出良好的抗迁移能力。图 6 展示了 II-1 在 48 h 不同浓度下 (1、5、10 μmol·L<sup>-1</sup>) 的抗侵袭情况,结果显示, II-1 展现出显著的抗侵袭能力,较低浓度 (1 μmol·L<sup>-1</sup>) 下也表现出强的抗侵袭能力。

### 6 分子对接

II-1 和 II-2 结构上与 Liu 等<sup>[8]</sup>报道的 DYRK1A 抑制剂具有一定相似性。利用分子对接技术将 II-1、II-2

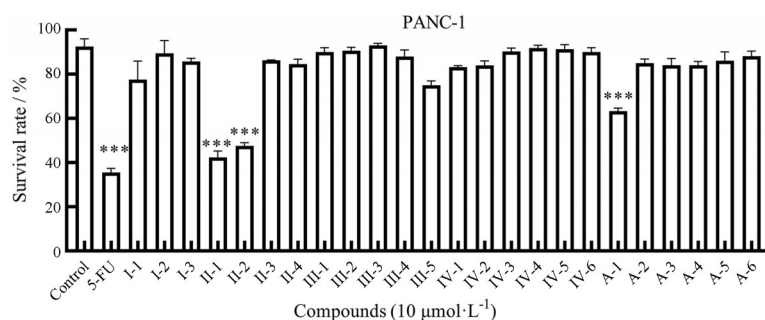
与 DYRK1A (PDB 代码: 7aj2) 蛋白对接以评估化合物与蛋白的亲合力,去氢骆驼蓬碱 (harmine, 是一种具有抗癌和抗炎活性的天然 DYRK 抑制剂) 为阳性对照。II-1、II-2 和去氢骆驼蓬碱与 DYRK1A 的亲合力分别为 -8.976 7、-9.386 6、-8.920 3, II-1 和 II-2 与 DYRK1A 蛋白之间表现出良好的结合力,甚至优于去氢骆驼蓬碱。上述结果表明, II-1 和 II-2 与 DYRK1A 之间有相互作用。

### 7 分子动力学模拟

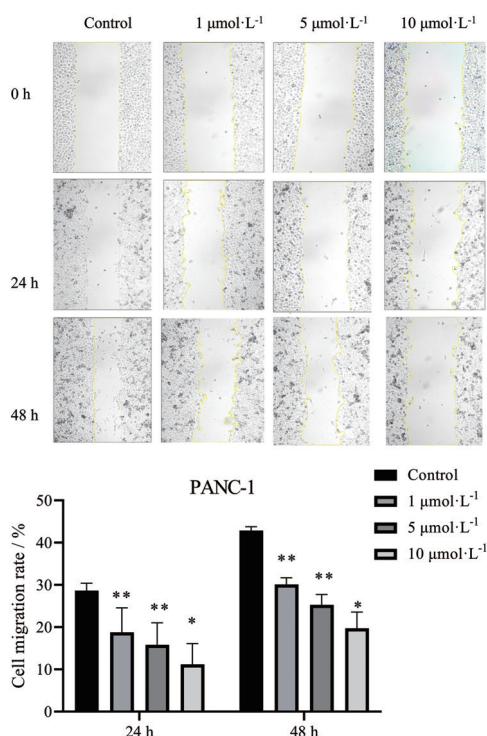
为了进一步阐明 DYRK1A 与化合物 II-1 之间的相互作用,利用 GROMACS 对 DYRK1A 与 II-1 进行了 100 ns 的分子动力学模拟 (MD)。图 7A 模拟了 DYRK1A 蛋白 C-α 原子与 II-1 重原子在 100 ns 内的 RMSD (均方根误差) 变化, DYRK1A~II-1 配合物在约 90 ns 后趋于稳定。图 7B 展示了 II-1 与 DYRK1A 的结合模式。II-1 的核心骨架 6-氮杂吡啶环与 Lys188 有氢键相互作用,与 Val173、Ile165、Ala186、Met240、Phe238、Leu241、Leu294 和 Val306 有疏水键作用。利用分子力学泊松-玻尔兹曼表面积法 (MM-PBSA) 基于最后 5 ns 模拟的结合构象计算平均结合能,化合物 II-1 的结合自由能为 -137.08 ± 11.12 kJ·mol<sup>-1</sup>。进一步验证了 II-1 与 DYRK1A 有强相互作用,推测 DYRK1A 可能是靶点之一。

### 8 DYRK1A 活性评价

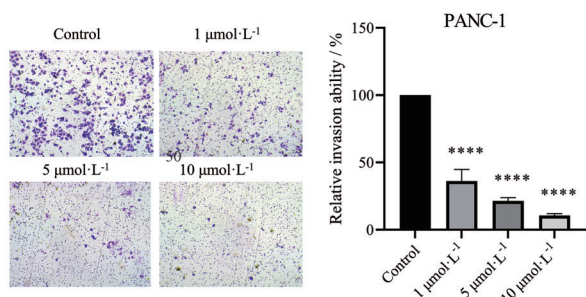
对 II-1 和 II-2 进行了 DYRK1A 酶活测试。II-1 能将 DYRK1A 酶活力降低 48%, II-2 能降低 35%, 说



**Figure 4** The inhibitory activity of the compound on PANC-1 cells at 10 μmol·L<sup>-1</sup> concentration. Univariate analysis of variance (ANOVA) and Dunnett comparison test were used to calculate statistical significance. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\**P* < 0.001 vs control group



**Figure 5** Representative microscope photographs of cell scratch experiments at different time and concentrations and the anti-migration ability of II-1 to PANC-1 cells at different time and concentration; Univariate analysis of variance (ANOVA) and Dunnett comparison test were used to calculate statistical significance.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group



**Figure 6** Representative microscope photographs of cell invasion assay at different concentrations and the invasion resistance of II-1 to PANC-1 cells at different concentration. Univariate analysis of variance (ANOVA) and Dunnett comparison test were used to calculate statistical significance.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs control group

明DYRK1A是II-1和II-2的靶点之一。

## 9 小结

通过筛选内部化合物库的方法鉴定出了具有一定抗胰腺癌活性的6-氮杂吡啶母核,合成了一系列6-氮杂吡啶衍生物,并进行了抗胰腺癌活性评价。II-1和II-2表现出优异的抗胰腺癌活性。对II-1的抗迁移能

力及侵袭能力进行了深入研究,发现具有较好的抵抗作用。利用分子对接、分子动力学将靶点锁定为DYRK1A,酶活测试证实化合物II-1和II-2具有酶抑制作用。

## 实验部分

核磁共振波谱仪, Avance III 500 MHz型, 内标为TMS; 液质联用仪, Q Exactive HF型; 薄层色谱硅胶, 山西诺泰生物; 柱色谱硅胶(200~300目), 烟台新诺; 中性氧化铝(100~200目), 上海盛亚; 实验所用试剂均为化学纯或分析纯, 购自毕得医药与上海泰坦公司。

## 化学实验

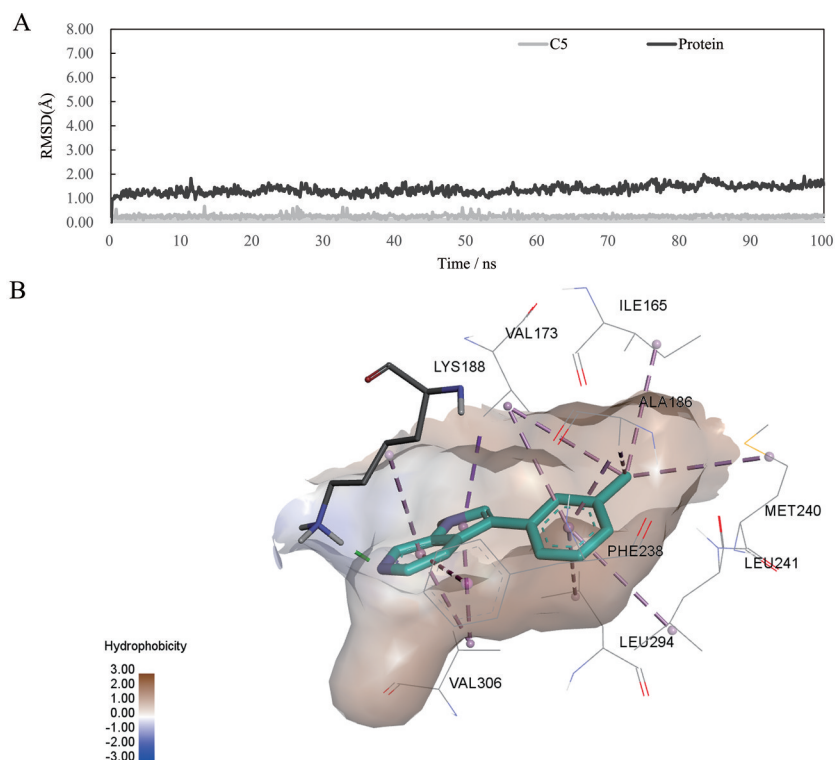
### 1.1 合成方法

**1.1.1 I类化合物的合成步骤** 以(3-溴-1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶)-1-环丁甲酰胺(I-1)为例。将化合物3-溴-6-氮杂吡啶100 mg (0.51 mmol) 溶解在4 mL二氯甲烷(DCM)中,加入4-二甲氨基吡啶(DMAP)6 mg (0.05 mmol), 环丁甲酰氯88  $\mu\text{L}$  (0.77 mmol) 用1 mL DCM稀释室温搅拌下缓慢加入反应体系(持续5 min), 加三乙胺212  $\mu\text{L}$  (1.53 mmol)。室温下反应12 h, TLC检测反应完成<sup>[9,10]</sup>。反应液用饱和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 水溶液淬灭, DCM(10 mL $\times$ 3)萃取3次, 合并有机相, 无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 旋干溶剂。用硅胶柱色谱纯化得I-1(乙酸乙酯-石油醚, 1:5)。

**1.1.2 II类化合物的合成步骤** 以3-苯基(3-甲基)-1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶(II-1)为例。取化合物3-溴-6-氮杂吡啶100 mg (0.51 mmol), 依次加入XPhos Pd G2 40 mg (0.05 mmol), XPhos 24 mg (0.05 mmol), 无水 $\text{K}_3\text{PO}_4$  324 mg (1.53 mmol), 水0.76 mL, 1,4-二氧六环2.4 mL,  $\text{N}_2$ 置换3次, 100  $^\circ\text{C}$ 下反应4 h<sup>[11]</sup>。旋干反应液, 乙酸乙酯(10 mL $\times$ 3)萃取3次, 合并有机相, 无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 旋干溶剂。用硅胶柱色谱纯化得到II-1(甲醇-二氯甲烷, 1:20)。

**1.1.3 III类化合物的合成步骤** 以3-((1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶)-3)-烯-2,4-戊二酮(III-1)为例。取化合物6-氮杂吡啶-3-羧醛100 mg (0.68 mmol), 5 mL甲醇(MeOH)溶解, 依次加入乙酰丙酮105  $\mu\text{L}$  (1.03 mmol), 哌啶7  $\mu\text{L}$  (0.07 mmol), 60  $^\circ\text{C}$ 反应3 h<sup>[12,13]</sup>。TLC检测反应结束, 旋干反应液, 硅胶柱色谱纯化得III-1(甲醇-二氯甲烷, 1:20)。

**1.1.4 IV类化合物的合成步骤** 以*N*-((1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶)-3)-亚甲基苯胺(IV-1)为例。取化合物6-氮杂吡啶-3-羧醛100 mg (0.68 mmol), 5 mL乙醇溶解, 加苯胺94  $\mu\text{L}$  (1.03 mmol), 50  $^\circ\text{C}$ 下反应3 h。TLC检测



**Figure 7** II-1 with the DYRK1A MD results. A: RMSD changes of protein atom and heavy atom of II-1 within 100 ns. B: Binding mode of the protein to II-1 after stabilization. The binding pattern map was drawn by Discovery studio 2019. Blue: II-1; Green: Hydrogen bond; Purple: Hydrophobic bond. RMSD: Root mean square deviation

反应结束,加 $\text{NaBH}_4$  260 mg (6.8 mmol) 室温反应 2 h, TLC 检测反应结束<sup>[14,15]</sup>。加水至不再有气泡产生为止,乙酸乙酯 (10 mL $\times$ 3) 萃取 3 次,合并有机相,无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,旋干溶剂,用中性氧化铝柱色谱纯化得到 IV-1 (甲醇-二氯甲烷, 1:20)。

## 1.2 胰腺癌细胞存活率测试

采用 CCK-8 法测定化合物处理后的细胞存活率。在 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的环境下用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (改良杜氏伊格尔培养基) 培养胰腺癌细胞 (PANC-1)。收集对数期的细胞,以  $5\times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中,继续培养 24 h。更换为含  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  化合物的培养基或含 1% 对照溶剂的培养液 (DMSO 与培养基体积比 1:1 000) 继续培养 48 h。在每个孔中加入  $10\ \mu\text{L}$  CCK-8 溶液孵育 2 h。用 CCK-8 法测定化合物处理后的细胞存活率。根据吸光度计算细胞抑制率,存活率 = (给药组 - 空白组) / (阴性对照组 - 空白组)  $\times$  100%, 抑制率 = 100% - 存活率。显著性差异用  $P$  值来表示,  $P$  值利用 GraphPad Prism 9 制作及计算。

## 1.3 $\text{IC}_{50}$ 值测试

在 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的环境下用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 PANC-1 细胞。收集对数期的细

胞,以  $5\times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中,继续培养 24 h。更换为含 1% 对照溶剂的培养液 (DMSO 与培养基体积比 1:1 000) 或含不同浓度 (100、10、1、0.1、0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 化合物的培养液继续培养 48 h。然后在每个孔中加入  $10\ \mu\text{L}$  CCK-8 溶液孵育 2 h。最后,在酶标仪上 450 nm 波长下测定吸光度。根据吸光度计算细胞抑制率,存活率 = (给药组 - 空白组) / (阴性对照组 - 空白组)  $\times$  100%, 抑制率 = 100% - 存活率。使用 GraphPad Prism 9 软件基于抑制率计算  $\text{IC}_{50}$  值。

## 1.4 分子对接

人类 DYRK1A 蛋白 (PDB 代码: 7aj2) 的晶体结构从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载。DYRK1A 蛋白由 Discovery Studio (DS) 软件中的“Clean protein”模块进行准备。使用 Smina 进行分子对接,以活性配体坐标为中心,半径为 8 Å 为活性位点<sup>[16]</sup>。利用 Lamarckian Genetic 算法 (LGA) 实现蛋白与配体的对接。得分最高的位置是针对每个分子的。评分函数为“最小化亲和力”评分。

## 1.5 分子动力学模拟

使用 Smina 将 II-1 与 DYRK1A 蛋白重新对接,选择合适的构象作为动力学模拟复合物的初始结合构象。分子动力学模拟使用 GROMACS (2019.4 版本)

软件,并对每个DYRK1A配体复合物进行分子动力学模拟。配体的电荷和力场参数由CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>)生成,配体和蛋白的力场分别为GAFF2和AMBER ff19SB<sup>[17]</sup>。整个系统由27767水(TIP3P)溶剂化<sup>[18]</sup>。然后,水相在每个维度上从系统外围延伸10 Å。之后,向系统中分别加入78个K<sup>+</sup>和89个Cl<sup>-</sup>离子使系统总电荷为零。MD模拟包括能量最小化、平衡和生产。模拟开始于基于最速下降算法的5 000步能量最小化。在平衡阶段,包括NVT条件下的500 ps模拟和NPT条件下的500 ps模拟。使用Parrinello Rahman将系统保持在1 atm的压力下,运用V-rescale将系统维持在300 K的恒定温度。最后,在NPT下进行100 ns MD模拟,每500 ps保存一次复合物坐标。

采用MM/PBSA法估算配体与蛋白质之间的结合能<sup>[19]</sup>。从95~100 ns的MD模拟轨迹中每5 ps提取一次快照。以快照作为输入,实现MM/PBSA方法的g\_mmpbsa ([http://rashmikumari.github.io/g\\_mmpbsa/](http://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/))计算每个蛋白质-配体复合物的结合自由能。平均结合能表示蛋白质与配体的结合亲和力。

### 1.6 DYRK1A酶活性测试

使用Promega公司的ADP-Glo™ Max Assay试剂盒检测DYRK1A激酶活性。通过检测激酶反应中生成的ADP来反应激酶活性,在ADP生成反应完成后,加入等体积的ADP-Glo™试剂终止反应,并消耗尽剩余的ATP;加入ADP-Glo™ Max检测试剂,将ADP转变为ATP的同时,在偶联的萤光素酶/萤光素反应中将ATP转变为光信号。根据试剂盒操作说明书,向反应板中每孔加入2 μL DYRK1A激酶(0.2 ng·μL<sup>-1</sup>),加入1 μL待测化合物(终浓度10 μmol·L<sup>-1</sup>)彻底振荡混匀,离心1 min,共同在EP管中25 °C孵育30 min。加入2 μL ATP(30 μmol·L<sup>-1</sup>)和DYRK1A底物(0.1 mg·mL<sup>-1</sup>)混合液后,将反应混合物在25 °C下孵育60 min。之后,加入4 μL ADP-Glo激酶试剂以停止激酶反应,并在25 °C下孵育40 min。然后,加入8 μL激酶检测试剂并在25 °C下再孵育40 min。发光信号(相对发光单位)记录在读板器(BMG Labtech, PHERAstar FSX)上。

### 1.7 划痕实验

将胰腺癌细胞放在6孔板中,培养至融合。使用无菌移液管尖端在细胞单层中创建一个划痕,确保伤口的大小和宽度相似,在形成伤口后,用培养基轻轻清洗细胞,以清除任何脱落的细胞或碎片。在各孔中加入化合物或DMSO,再孵育48 h,使用相衬显微镜定期间隔(0、24、48 h)拍摄初始受伤区域的图像,最后使用图像分析软件测量伤口闭合或迁移距离。

### 1.8 侵袭实验

上室预涂Matrigel(37 °C, 30 min),填充含5×10<sup>4</sup>个细胞的无血清DMEM,下室填充含10%胎牛血清的DMEM,37 °C孵育48 h后,收集下室细胞,室温0.5%结晶紫(质量分数)染色20 min。用倒置光学显微镜对染色细胞计数。

### 1.9 数据统计分析

实验数据采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析,所有实验数据以三个独立实验的平均值±SD表示,两组间数据的比较采用单因素方差分析和Dunnett比较检验进行差异分析,当P<0.05时,差异具有统计显著性。

**作者贡献:**曹阳完成化合物合成路线设计、结构解析、论文稿件润色;李前完成化合物合成、表征以及论文初稿撰写;王亚玲完成分子对接及分子动力学模拟;钱晨亮完成了细胞活性测试及酶活测试;崔文慧完成审核论文;司鑫鑫完成实验设计、提供学术指导、审核论文。

**利益冲突:**所有作者声明不存在利益冲突。

### References

- [1] Khalaf N, El-Serag HB, Abrams HR, et al. Burden of pancreatic cancer: from epidemiology to practice [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2021, 19: 876-884.
- [2] Zhang HY, Xing Y. Present situation of comprehensive treatment of pancreatic malignant tumor [J]. *Chin J Clin (中国临床医生杂志)*, 2023, 51: 631-633, 628.
- [3] Xu J. China Anti-Cancer Association guidelines for the holistic integrative management of pancreatic cancer (abridged version) [J]. *Chin J Clin Oncol (中国肿瘤临床)*, 2023, 50: 487-496.
- [4] Berdigaliyev N, Aljofan M. An overview of drug discovery and development [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12: 939-947.
- [5] Aljofan M, Porotto M, Moscona A, et al. Development and validation of a chemiluminescent immunodetection assay amenable to high throughput screening of antiviral drugs for Nipah and Hendra virus [J]. *J Virol Methods*, 2008, 149: 12-19.
- [6] Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, et al. *In vitro* cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 107.
- [7] Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, et al. Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137: e11-e16.
- [8] Liu YA, Jin Q, Zou Y, et al. Selective DYRK1A inhibitor for the treatment of type 1 diabetes: discovery of 6-azaindole derivative GNF2133 [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 2958-2973.
- [9] Hostier T, Ferey V, Ricci G, et al. TFA-promoted direct C-H sulfenylation at the C2 position of non-protected indoles [J].

- Chem Commun, 2015, 51: 13898-13901.
- [10] Cornella J, Lu PF, Larrosa I. Intermolecular decarboxylative direct C-3 arylation of indoles with benzoic acids [J]. *Org Lett*, 2009, 11: 5506-5509.
- [11] Malhotra S, Stivala C, Wei BQ, et al. Spirocyclic 2,3-dihydro-7-azaindole compounds and uses thereof: CN, 1130155262 [P]. 2021-06-22.
- [12] Sumathi S, Tharmaraj P, Sheela CD, et al. Synthesis and studies on Cu (II), Co (II), Ni (II) complexes of knoevenagel  $\beta$ -diketone ligands [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012, 97: 377-383.
- [13] McNab H, Tyas RG. A thermal cascade route to pyrroloisoindolone and pyrroloimidazolones [J]. *J Org Chem*, 2007, 72: 8760-8769.
- [14] Xu YY, Li SN, Yu GJ, et al. Discovery of novel 4-anilinoquinazoline derivatives as potent inhibitors of epidermal growth factor receptor with antitumor activity [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2013, 21: 6084-6091.
- [15] Ross NT, Deane R, Perry S, et al. Structure-activity relationships of small molecule inhibitors of RAGE- $\beta$  binding [J]. *Tetrahedron*, 2013, 69: 7653-7658.
- [16] Koes DR, Baumgartner MP, Camacho CJ. Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise [J]. *J Chem Inf Model*, 2013, 53: 1893-1904.
- [17] Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, et al. Development and testing of a general amber force field [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25: 1157-1174.
- [18] Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water [J]. *J Chem Phys*, 1983, 79: 926-935.
- [19] Kumari R, Kumar R, Open Source Drug Discovery Consortium, et al. g\_mmpbsa a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54: 1951-1962.