

噁二唑类化合物的设计、合成及黄嘌呤氧化酶抑制活性研究

王宏占^{1,2}, 杨亚军², 杨颖², 叶菲³, 田金英³, 张传明^{1*}, 肖志艳²

(1. 内蒙古科技大学包头医学院药学院, 内蒙古 包头 014040; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 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) 是高尿酸血症及痛风治疗药物的重要靶点。基于前期获得的高活性 XO 抑制剂 **1**, 采用生物电子等排策略, 设计并合成了噁二唑类化合物及其开环类似物共 17 个。其中, 化合物 **2l**、**2n**、**3b** 在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下具有显著的 XO 抑制活性; 化合物 **3b** 抑制 XO 的 IC_{50} 值达到 1.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 黄嘌呤氧化酶; 黄嘌呤氧化酶抑制剂; 噁二唑类化合物; 高尿酸血症; 痛风

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0164-08

Design, synthesis and evaluation of oxadiazoles as novel XO inhibitors

WANG Hong-zhan^{1,2}, YANG Ya-jun², YANG Ying², YE Fei³, TIAN Jin-ying³,
ZHANG Chuan-ming^{1*}, XIAO Zhi-yan²

(1. School of Pharmacy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; 2. Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. 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 an important therapeutic target for the treatment of hyperuricemia and gout. Based on the previously identified potent XO inhibitor **1**, seventeen oxadiazoles and their ring-opening analogues were designed and synthesized *via* the bioisostere replacement strategy. Among them, compounds **2l**, **2n**, and **3b** showed obvious XO inhibitory activity at the concentration of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and compound **3b** exhibited an IC_{50} value of 1.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: xanthine oxidase; xanthine oxidase inhibitor; oxadiazole; hyperuricemia; gout

尿酸作为人体嘌呤代谢的最终产物, 在维持人体内环境稳态中具有关键作用^[1]。高尿酸血症是体内嘌呤代谢紊乱造成的代谢性疾病, 表现为血清尿酸水平过高 (男性: > 7.0 $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$; 女性: > 6.0 $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)。持续

的血尿酸水平过高导致尿酸钠晶体沉积在关节、组织中, 造成痛风, 严重者还可并发高血压、糖尿病、慢性肾脏病、心脑血管疾病等多种疾病^[2,3]。

外源性的富含嘌呤食物及内源性的体内核蛋白在磷酸核糖焦磷酸、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶、腺嘌呤磷酸核糖转移酶、黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 等嘌呤代谢相关酶的作用下产生尿酸^[4]。XO 是一种含钼离子的黄素蛋白酶, 其催化中心包含两个铁-硫氧化还原中心、一个黄素腺嘌呤二核苷酸

收稿日期: 2024-08-26; 修回日期: 2024-11-04.

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2021MS08006); 包头医学院博士科研启动基金项目 (BYJJ-BSJJ 202007); 包头医学院科研创新项目 (BYKYCX202415).

*通讯作者 Tel: 18947221989, E-mail: chuanming_zhang@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0820

和一个钼蝶呤中心, 其中钼蝶呤中心是催化尿酸生成的关键催化中心^[5]。抑制 XO 能够有效减少尿酸的产生, 从而降低血尿酸水平。

目前已上市的 XO 抑制剂有: 别嘌呤醇 (allopurinol)、非布索坦 (febuxostat) 和托匹司他 (topiroxostat) (图 1)。别嘌呤醇 1966 年经 FDA 批准上市, 作为嘌呤类似物, 别嘌呤醇竞争性地抑制了嘌呤类底物与钼蝶呤的配位结合, 阻断了尿酸的体内代谢途径, 从而减少了尿酸的生成^[6,7]。别嘌呤醇临床使用剂量大, 且会导致药物超敏反应及严重皮肤不良反应^[7]。非嘌呤类药物非布索坦于 2009 年经美国 FDA 批准上市, 托匹司他于 2013 年在日本上市, 与嘌呤类药物相比, 非布索坦和托匹司他临床使用剂量低, 在药效方面更具优势^[6,8]。因此, 非嘌呤类 XO 抑制剂成为近年来降尿酸药物研

发的热点。

虽然非布索坦和托匹司他都是非嘌呤类 XO 抑制剂, 二者的结合模式却不相同。非布索坦通过占据 XO 的疏水空腔来阻止钼蝶呤中心对次黄嘌呤和黄嘌呤的催化作用^[9]; 托匹司他则不仅占据 XO 的疏水空腔, 还与钼蝶呤中心形成共价结合^[10]。前期研究中, 作者采用分子拼接策略, 结合非布索坦与托匹司他的作用模式, 获得了一系列对 XO 具有显著抑制作用的新化合物^[11]。其中, 化合物 **1** (图 2) 对 XO 的 IC₅₀ 值达 0.20 nmol·L⁻¹。本文基于化合物 **1**, 采用生物电子等排策略, 设计、合成了化合物 **2a~2n** 及其开环类似物 **3a~3c**, 并初步研究了该类化合物对 XO 的抑制作用。

如合成路线 1 所示, 化合物 **2a~2n** 以化合物 **4** 为起始原料, 与相应的卤代烷烃反应得到化合物 **5**。化合物 **5** 经盐酸羟胺还原得到化合物 **6**。化合物 **6** 与芳香羧酸在 HATU 作用下缩合得到化合物 **7**, 化合物 **7** 经过加热环化得到化合物 **2a~2n**。如合成路线 2 所示, 化合物 **3a~3c** 分别以化合物 **8, 11** 为原料, 与 4-(3-氯丙基)吗啉反应分别得到中间体化合物 **9** 和 **12**。化合物 **9** 经盐酸羟胺还原得到化合物 **10**, 化合物 **10** 分别与 4-吡啶甲醛和 4-吡啶甲亚胺酸甲酯反应得到化合物 **3a** 和 **3b**, 化合物 **12** 与异烟肼反应得到化合物 **3c**。

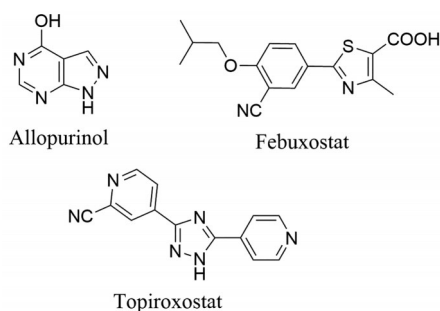


Figure 1 The structures of allopurinol, febuxostat and topiroxostat

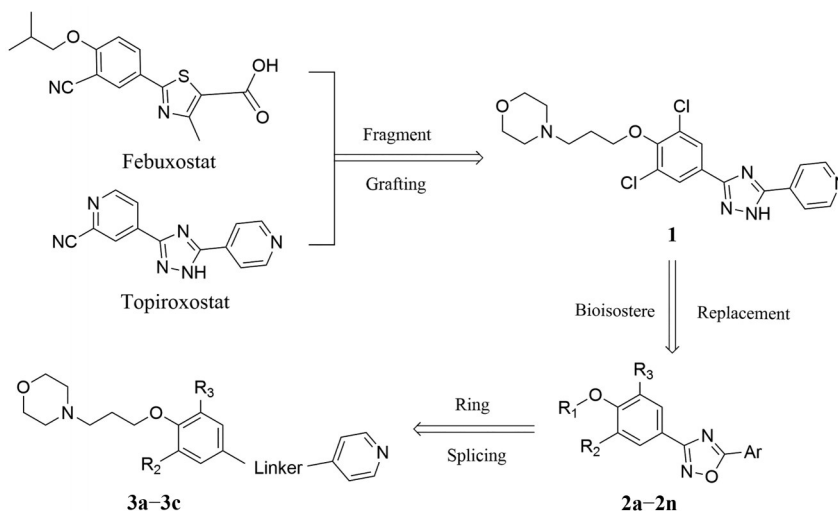
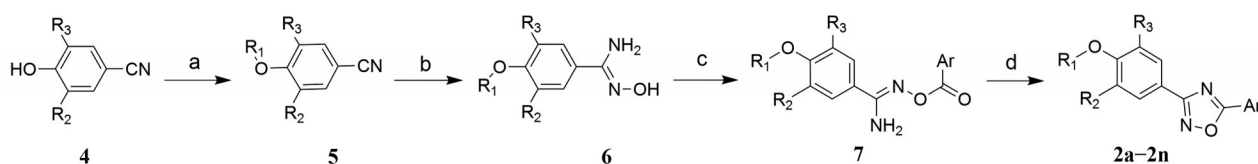
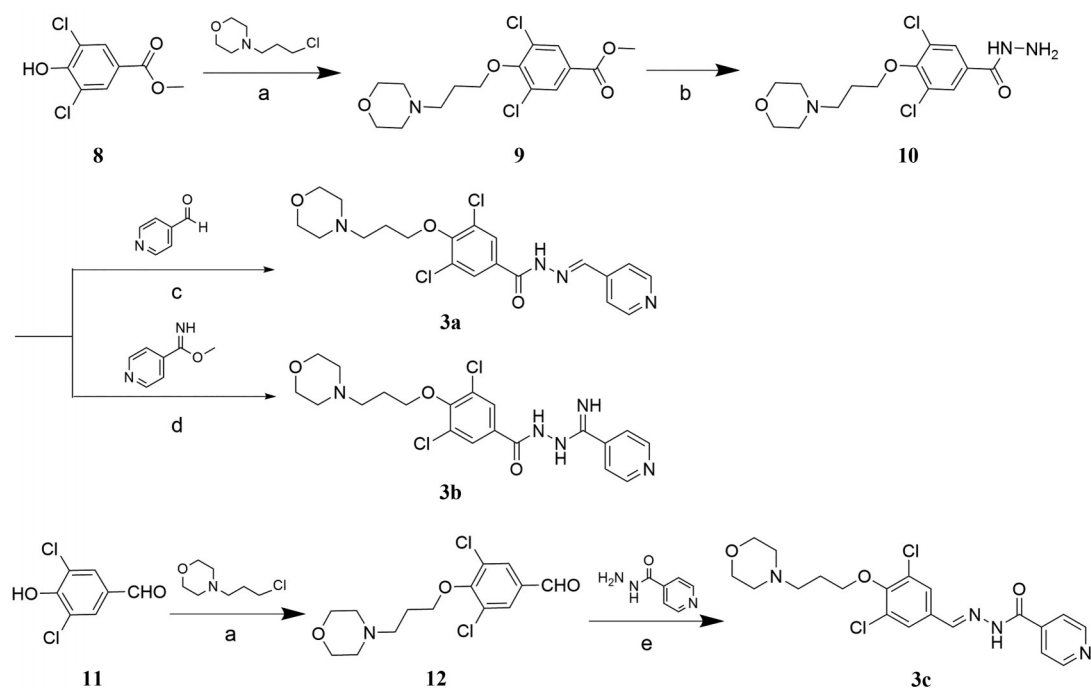


Figure 2 Molecular design of novel oxadiazoles based on febuxostat and topiroxostat



Scheme 1 Synthesis of compounds **2a-2n**. Reagents and conditions: a. R₁Cl, K₂CO₃, KI, DMF, 80 °C; b. NH₂OH, NaHCO₃, EtOH, 95 °C; c. HATU, DIPEA, ArCOOH, DMF, rt; d. DMF, 110 °C. HATU: 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate; DIPEA: *N,N*-Diisopropylethylamine



Scheme 2 Synthesis of compounds **3a–3c**. Reagents and conditions: a. K_2CO_3 , KI, DMF, 80 °C; b. NH_2OH , $NaHCO_3$, EtOH, 95 °C; c. MeOH, rt; d. EtOH, CH_3COOH , Reflux; e. EtOH, CH_3COOH , Reflux

结果与讨论

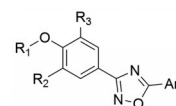
1 XO 抑制活性评价结果

在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 测定了化合物 **2a~2n** 和 **3a~3c** 对 XO 的抑制活性, 结果见表 1 和表 2。与化合物 **1** 相比, 化合物 **2a~2n** 和 **3a~3c** 对 XO 的抑制活性显著减弱, 仅化合物 **2l**、**2n**、**3b** 表现出明显的 XO 抑制作用, 其中化合物 **3b** 的 IC_{50} 值为 $1.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 所示的噁二唑类化合物对 XO 的抑制活性明显弱于化合物 **1**, 仅化合物 **2l** 和 **2n** 具有一定的 XO 抑制作用, 提示以噁二唑环替代化合物 **1** 中的三氮唑环可能造成抑制剂缺失了与 XO 活性腔的重要相互作用。托匹司他与 XO 的共晶结构显示其结构中三氮唑环上的 N4 作为氢键给予体与 XO 催化活性区的 Glu802 存在氢键相互作用^[10]; 前期对化合物 **1** 的分子对接研究也提示三氮唑的 N4 与 Glu802 的羰基存在氢键相互作用^[9]。以噁二唑环替代了托匹司他和化合物 **1** 中的三氮唑环, 导致环上氢键给予体的缺失, 这可能是造成噁二唑类化合物 XO 抑制活性显著下降 (**2a** vs **1**) 的主要原因, 同时也提示三氮唑环的 N4 与 Glu802 的羰基之间的氢键相互作用可能是维持 XO 抑制活性的关键作用力。

虽然由于缺失了与 Glu802 的羰基之间的氢键相互作用, 噁二唑类化合物对 XO 的抑制活性明显减弱, 但表 1 数据提示, R_2 和 R_3 的体积和电性均对抑制剂的活性有一定影响。当 R_2 和 R_3 为体积较小的取代基时,

Table 1 Inhibitory activity of compounds **2a–2n** against xanthine oxidase (XO) at the concentration of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Feb: Febuxostat



No.	R_1	R_2	R_3	Ar	Inhibition/%
2a		Cl	Cl		35.4
2b		F	H		22.8
2c		Cl	H		8.8
2d		Br	H		30.7
2e		I	H		33.1
2f		F	F		7.5
2g		H	H		20.7
2h		Br	Br		34.1
2i		CH_3	H		10.3
2j		OCH_3	H		23.3
2k		CF_3	H		31.0
2l		CF_3	H		50.5
2m		CF_3	H		26.5
2n		NO_2	H		52.3
Feb	-	-	-	-	97.0
1	-	-	-	-	101.6

2.5 mmol) 溶于 15 mL 无水 DMF 中, 室温搅拌 2 min 后, 加入 (Z)-3,5-二氯-*N'*-羟基-4-(3-吗啉基丙氧基)苯并脒 (174 mg, 0.5 mmol), 室温搅拌 10 h。待反应完全后, 蒸除部分 DMF, 向残余物中加入乙酸乙酯和水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸除溶剂后柱层析 (石油醚-乙酸乙酯 3:1~1:1) 得到白色固体 94 mg, 收率 42%。mp: 69~71 °C。

1.1.4 4-(3-(2,6-二氯-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2a) 于 100 mL 茄形瓶中, 将 (Z)-3,5-二氯-*N'*-(异烟酰氧基)-4-(3-吗啉基丙氧基)苯并脒 (45 mg, 0.1 mmol) 溶于 4 mL 无水 DMF 中, 110 °C 下加热回流 5 h。待反应完全后, 蒸除部分 DMF, 向残余物中加入乙酸乙酯和水萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸除溶剂后用乙醚洗, 过滤, 得到白色粉末状固体 37 mg, 收率 87%。mp: 113~115 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.95 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.15 (s, 2H), 8.14 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.18 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.55 (m, 2H), 2.40 (m, 4H), 1.99 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. For C₂₀H₂₁O₃N₄Cl₂ [M+H]⁺ 435.098 52, found 435.099 49。

采用类似方法合成了化合物 **2b**~**2n**。

1.2 4-(3-(2-氟-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2b)

以 3-氟-4-羟基苯脒为起始原料, 采用 **2a** 类似合成方法。得到黄色粉末, 收率: 70%。mp: 72~74 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 8.92 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 8.08 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.94 (m, 2H), 7.14 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.25 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.81 (m, 4H), 2.57 (m, 6H), 2.12 (m, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₂O₃N₄F [M+H]⁺ 385.167 05, found 385.167 24。

1.3 4-(3-(2-氯-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2c)

以 3-氯-4-羟基苯脒为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 68%。mp: 175~177 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.95 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.15~8.08 (m, 4H), 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.15 (br, s, 4H), 2.55 (m, 2H), 2.22 (m, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₂O₃N₄Cl [M+H]⁺ 401.137 49, found 401.138 09。

1.4 4-(3-(2-溴-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2d)

以 3-溴-4-羟基苯脒为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 75%。mp: 199~200 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.94 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.16 (m, 1H), 8.13 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz,

1H), 4.30 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.04 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H), 3.69 (t, *J* = 12.2 Hz, 2H), 3.55 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H), 3.33 (m, 2H), 3.16 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 2.25 (m, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₂O₃N₄Br [M+H]⁺ 445.086 98, found 445.088 04。

1.5 4-(3-(2-碘-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2e)

以 3-碘-4-羟基苯脒为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 65.3%。mp: 126~128 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.93 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 8.44 (s, 1H), 8.15~8.06 (m, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.60 (m, 4H), 2.52 (m, 2H), 2.41 (m, 4H), 1.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₂O₃N₄I [M+H]⁺ 493.073 11, found 493.073 12。

1.6 4-(3-(2,6-二氟-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2f)

以 3,5-二氟-4-羟基苯脒为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 51%。mp: 177~179 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.95 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.36 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.12~3.94 (m, 4H), 3.73~3.59 (m, 2H), 3.59~3.46 (m, 2H), 3.15 (brs, 2H), 2.27~2.04 (m, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₁O₃N₄F₂ [M+H]⁺ 403.157 62, found 403.157 90。

1.7 4-(3-(4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2g)

以 4-羟基苯脒为起始原料, 得到白色粉末, 收率: 90%。mp: 84~86 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.97 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 8.16~8.12 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.16 (m, 2H), 3.65 (s, 4H), 2.58 (s, 2H), 2.44 (s, 4H), 2.01~1.94 (m, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₃O₃N₄ [M+H]⁺ 367.176 47, found 367.176 85。

1.8 4-(3-(2,6-二溴-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2h)

以 3,5-二溴-4-羟基苯脒为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 55%。mp: 123~125 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.94 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.32 (s, 2H), 8.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H), 2.56 (m, 2H), 2.41 (m, 4H), 2.02 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₁O₃N₄Cl₂ [M+H]⁺ 522.997 49, found 522.998 54。

1.9 4-(3-(2-甲基-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2i)

以 3-甲基-4-羟基苯脒为起始原料, 得到红褐色晶

体, 收率: 37%。mp: 83~85 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 8.91 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.00 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.16 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.81 (m, 4H), 2.57 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 2.11 (m, 2H), 1.29 (brs, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₁H₂₅O₃N₄ [M+H]⁺ 381.192 12, found 381.192 23。

1.10 4-(3-(2-甲氧基-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2j)

以3-甲氧基-4-羟基苯腈为起始原料, 得到白色粉末, 收率: 68%。mp: 126~128 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.94 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.90 (m, 3H), 3.60 (m, 4H), 2.46 (m, 2H), 2.39 (m, 4H), 1.95 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₁H₂₅O₄N₄ [M+H]⁺ 397.187 03, found 397.187 16。

1.11 4-(3-(2-三氟甲基-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2k)

以3-三氟甲基-4-羟基苯腈为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 76%。mp: 137~139 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.94 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.31 (m, 2H), 3.59 (m, 4H), 2.47 (m, 2H), 2.38 (m, 4H), 1.96 (m, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₁H₂₂O₃N₄F₃ [M+H]⁺ 435.163 85, found 435.163 97。

1.12 4-(3-(4-(5-(2-甲基吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)-2-(三氟甲基)苯氧基)丙基)吗啉 (2l)

采用类似反应, 不同之处在于, 采用2-甲基-4-羧基吡啶代替异烟酸, 得到黄色晶体, 收率: 58.2%。mp: 102~104 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.79 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.35 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.92 (dd, *J* = 5.1, 1.7 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.65 (s, 3H), 2.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 1.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₂H₂₄O₃N₄F₃ [M+H]⁺ 449.179 50, found 449.179 38。

1.13 4-(2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)-2-(三氟甲基)苯氧基)乙基)吗啉 (2m)

采用类似反应, 不同之处在于, 采用4-(2-氯乙基)吗啉代替4-(3-氯丙基)吗啉, 得到黄色粉末, 收率: 57%。mp: 165~167 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.94 (dd, *J* = 4.5, 1.7 Hz, 2H), 8.36 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 4.5, 1.7 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.39 (t, *J* = 5.6 Hz,

2H), 3.62~3.56 (m, 4H), 2.79 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.51 (m, 4H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₂O₃N₅ [M+H]⁺ 412.161 55, found 412.160 92。

1.14 4-(3-(2-硝基-4-(5-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑-3-基)苯氧基)丙基)吗啉 (2n)

以3-硝基-4-羟基苯腈为起始原料, 得到黄色粉末, 收率: 68.5%。mp: 83~85 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.94 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 8.55 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.36 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.46 (m, 2H), 2.39 (m, 4H), 1.96 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H)。ESI-HR-MS *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₀O₃N₄F₃ [M+H]⁺ 421.148 20, found 421.147 52。

1.15 (E)-3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)-N'-(吡啶-4-基亚甲基)苯并酰肼 (3a)

1.15.1 3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯甲酸甲酯 于250 mL 茄形瓶中, 称取3,5-二氯-4-羟基苯甲酸甲酯 (4.42 g, 20 mmol) 和4-(3-氯丙基)吗啉 (3.94 g, 10 mmol) 及碳酸钾 (2.07 g, 15 mmol) 加入40 mL DMF, 80 °C 油浴中反应, TLC 监测反应完成后, 减压蒸除部分溶剂, 加入饱和食盐水、乙酸乙酯萃取, 保留有机相, 减压浓缩得黄色油状物。收率: 76%。

1.15.2 3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯并酰肼 于100 mL 茄形瓶中, 称取中间体3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯甲酸甲酯 (348 mg, 1 mmol) 用甲醇 (6 mL) 溶解, 加入水合肼 (80%, 80 mg, 2 mmol) 加热回流。TLC 监测反应, 反应完全后, 蒸干溶剂, 加水过滤, 得中间体。收率: 82%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 9.91 (s, 1H), 7.91 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.08 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.68~3.50 (m, 4H), 2.48 (overlap, 2H), 2.36 (brs, 4H), 1.93 (m, 2H)。

1.15.3 (E)-3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)-N'-(吡啶-4-基亚甲基)苯并酰肼 于100 mL 茄形瓶中, 称取中间体3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯并酰肼 (398 mg, 1 mmol) 和4-吡啶甲醛 (118 mg, 1.1 mmol), 加入无水乙醇 (10 mL), 滴加两滴冰醋酸, 加热回流反应。TLC 监测反应, 待反应完成, 蒸干溶剂, 加入碳酸氢钠溶液, 析出固体, 抽滤得到棕色固体。收率: 19%。mp: 96~98 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.64~8.58 (m, 2H), 8.36 (s, 1H), 7.99 (s, 2H), 7.62 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.08 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.47 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 1.91 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 161.81, 153.71, 150.65, 146.35, 142.22, 131.92, 129.11, 128.94, 121.46, 72.66, 66.69, 55.00, 53.77, 27.16。ESI-HR-MS

m/z : calcd. for $C_{20}H_{23}O_3N_4Cl_2$ $[M+H]^+$ 437.114 17, found 437.115 60.

1.16 3,5-二氯-*N'*-(亚氨基(吡啶-4-基)甲基)-4-(3-吗啉基丙氧基)苯并酰肼 (3b)

于 100 mL 茄形瓶中,称取中间体 3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯并酰肼 (348 mg, 1 mmol)、4-吡啶甲亚胺酸甲酯 (136 mg, 1 mmol)、加入到 MeOH (10 mL) 溶液中,室温搅拌 2 h,析出固体,过滤得白色固体。收率: 64%。mp: 191~192 °C。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 10.22 (s, 1H), 8.66 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 8.01 (s, 2H), 7.79 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 4.10 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.68~3.51 (m, 4H), 2.53 (overlap, 2H), 2.38 (brs, 4H), 1.95 (m, 2H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{20}H_{24}O_3N_5Cl_2$ $[M+H]^+$ 452.125 07, found 452.125 00.

1.17 (*E*)-*N'*-(3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)亚苄基)异烟酰肼 (3c)

1.17.1 3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯甲醛 于 250 mL 茄形瓶中,称取 3,5-二氯-4-羟基苯甲醛 (1.91 g, 10 mmol) 与 4-(3-氯丙基)吗啉 (1.64 g, 10 mmol) 及碳酸钾 (2.07 g, 15 mmol) 加入 50 mL 乙腈溶液中,回流反应 12 h。反应完毕,蒸干溶剂,加入饱和食盐水、乙酸乙酯萃取,有机相减压浓缩得到中间体。收率: 82%。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 9.86 (s, 1H), 7.97 (s, 2H), 4.10 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.52 (m, 4H), 2.33 (m, 6H), 1.91 (m, 2H)。

1.17.2 (*E*)-*N'*-(3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)亚苄基)异烟酰肼 于 100 mL 茄形瓶中,称取中间体 3,5-二氯-4-(3-吗啉基丙氧基)苯甲醛 (159 mg, 0.5 mmol) 和异烟酰肼 (69 mg, 0.5 mmol) 加入无水乙醇 (10 mL) 溶液中,滴加两滴冰醋酸,加热回流反应。TLC 监测反应,待反应完成,蒸干溶剂,加入碳酸氢钠溶液,析出固体,抽滤得到粉色固体。收率: 30%。mp: 90~92 °C。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 12.28 (s, 1H), 8.79 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 7.86 (s, 2H), 7.84~7.80 (m, 2H), 4.09 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.60~3.53 (m, 4H), 2.37 (s, 4H), 1.94 (p, J = 6.6 Hz, 2H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 162.34, 152.49, 150.83, 146.13, 140.64, 132.45, 129.54, 127.94, 122.03, 72.64, 66.68, 55.01, 53.77, 27.14。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{20}H_{23}O_3N_4Cl_2$ $[M+H]^+$ 437.114 17, found 437.115 66。

2 分子模拟实验

采用 Accelrys 公司的 Discovery Studio 2.1 软件包完成分子模拟工作。由 Diverse Conformation Generation 模块产生分子构象, Conformation Method 设置为“BEST”,其他参数采用缺省值;采用 Dock ligands

(CDocker) 程序进行分子对接, Input Receptor: 1N5X; Conformation Method 设置为“NONE”;其他参数采用缺省值。

3 XO 的体外抑酶活性实验

采用前期建立的方法测定各化合物对 XO-催化黄嘌呤 (XAN) 水解作用的影响^[11]。将待测样品溶于 DMSO 中,配制成 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液。反应体系中含缓冲液 ($3.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 $15.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ EDTA}$, pH = 7.4)、 $3 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1} \text{ XO}$ 、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ XAN}$ 及不同浓度的化合物 (含终浓度 0.01% DMSO)。以不含 XO 的反应体系作为空白对照。在 37 °C 下反应 20 min,采用酶标仪 (Multiskan Spectrum Microboard, Thermo Scientific) 检测 293 nm 波长下吸光度 (OD 值),计算 XO 催化 XAN 水解生成的尿酸量及化合物对 XO 活性的抑制百分率。采用 Prism 5.0 软件 sigmoidal dose response curve (various slope) 拟合 IC_{50} 值。

作者贡献: 王宏占完成部分化学工作及文章初稿撰写; 杨亚军完成部分化学工作; 杨颖完成分子模拟部分; 叶菲、田金英完成生物活性测试工作; 张传明、肖志艳负责实验设计及文章修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Copur S, Demiray A, Kanbay M. Uric acid in metabolic syndrome: does uric acid have a definitive role? [J]. Eur J Intern Med, 2022, 103: 4-12.
- [2] Johnson RJ, Bakris GL, Borghi C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the National Kidney Foundation [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71: 851-865.
- [3] Bernal JA, Quilis N, Andrés M, et al. Gout: optimizing treatment to achieve a disease cure [J]. Ther Adv Chronic Dis, 2016, 7: 135-144.
- [4] Salway JG. The Krebs uric acid cycle: a forgotten Krebs cycle [J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43: 847-849.
- [5] Enroth C, Eger BT, Okamoto K, et al. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 10723-10728.
- [6] Zeng XY, Liu YJ, Fan YX, et al. Agents for the treatment of gout: current advances and future perspectives [J]. J Med Chem, 2023, 66: 14474-14493.
- [7] Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol [J]. Pharmacol Rev, 2006, 58: 87-114.
- [8] Borghi C, Desideri G. Urate-lowering drugs and prevention of cardiovascular disease: the emerging role of xanthine oxidase

- inhibition [J]. *Hypertension*, 2016, 67: 496-498.
- [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, Matsumoto K, Hille R, et al. The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 7931-7936.
- [11] Yang YJ, Yan DA, Cheng HZ, et al. Discovery of novel 1,2,4-triazole derivatives as xanthine oxidoreductase inhibitors with hypouricemic effects [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 129: 106162.