新型FLT3抑制剂的设计、合成及活性评价

侯有丽[1,2], 赵鹏娟[1,2], 刘 举[3], 廖伟科[1,2], 汤 磊[1,2*]

(1. 贵州医科大学, 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘要: 本研究设计并合成了一系列含咪唑-4-甲酰胺基和1,2,4-三氮唑的4-苯氧基吡啶类衍生物, 作为新型的Fms样酪氨酸激酶3 (Fms-like tyrosine kinase 3, FLT3) 抑制剂。结果表明, 该系列化合物具有良好的抗增殖活性, 其中, 优选化合物**10c**在含Fms样酪氨酸激酶3-内部串联重复 (Fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication, FLT3-ITD) 突变的两个细胞系即人髓性单核细胞白血病细胞 (MV4-11) 和人急性髓性白血病细胞 (Molm-13) 的抑制生长50%所需的浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值分别为1.90和5.78 μmol·L^{-1}。细胞凋亡和周期结果表明, 化合物**10c**能够促进细胞凋亡并将细胞阻止在S期。分子对接结果表明, 化合物**10c**与FLT3的PHE691和HIS809形成两个π-π堆积作用, 吡啶母核和Linker部分分别与FLT3的LYS644和CYS694形成重要的氢键作用。综上, 化合物**10c**在体外体现出较好的抗增殖活性, 具有进一步深入研究的价值, 同时也为开发出更多结构新颖的新型FLT3抑制剂奠定基础。

关键词: Fms样酪氨酸激酶; 增殖活性; Fms样酪氨酸激酶3抑制剂; 分子对接; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1767-11

Design, synthesis and activity evaluation of novel FLT3 inhibitors

HOU You-li[1,2], ZHAO Peng-juan[1,2], LIU Ju[3], LIAO Wei-ke[1,2], TANG Lei[1,2*]

(*1. Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China*)

Abstract: In this study, a series of 4-phenoxypyridine derivatives containing imidazole-4-formamido and 1,2,4-triazole were designed and synthesized as novel inhibitors of Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3). The results showed that the series of compounds had good antiproliferative activity. Among them, the preferred compound **10c** was in two cell lines containing FLT3-ITD (internal tandem duplication, ITD) mutations, namely human myeloid core solo leukemia cells (MV4-11) and human acute myeloid leukemia cells (Molm-13), with IC_{50} values of 1.90 and 5.78 μmol·L^{-1}, respectively. Apoptosis and cycle results showed that compound **10c** could promote apoptosis and prevent cells in S phase. Molecular docking results showed that compound **10c** formed two π-π stacking effects with PHE691 and HIS809 of FLT3, and the pyridine parent nucleus and Linker part formed important hydrogen bonds with LYS644 and CYS694 of FLT3, respectively. In summary, compound **10c** exhibited good anti-proliferation activity *in vitro*, which is of value for further in-depth research, and also lays the foundation for the development of more novel FLT3 inhibitors with novel structures.

Key words: Fms-like tyrosine kinase; proliferation activity; Fms-like tyrosine kinase 3 inhibitor; molecular docking; apoptosis; cell cycle

收稿日期: 2025-01-16; 修回日期: 2025-03-21.

基金项目: 贵州省科技重大专项项目 (黔科合重大专项字[2024]015); 贵州省高层次创新型人才项目 (黔科合平台人才)-GCC[2023]002.

*通讯作者 E-mail: tlei1974@gmc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0053

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是一种由于造血干细胞恶性克隆而导致的肿瘤性疾病[1,2], 根据主要涉及的细胞类别, 临床上将急性白血病分为急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 与急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)。其中, 急性髓性白血病在成年患者中, 约占急性白血病患者的80%, 且急性髓性白血病的发病率与死亡率呈现出逐年上升的趋势[3]。

据相关报道, 在急性髓性白血病患者中, 约有30%的患者存在Fms样酪氨酸激酶3 (Fms-like tyrosine kinase 3, FLT3) 突变[4,5]。FLT3主要分布在造血细胞与神经组织, 在造血细胞的存活、增殖和分化中起着重要的作用。而FLT3蛋白的过度表达, 激活FLT3蛋白及相关的信号通路, 促进细胞增殖分化, 抑制细胞凋亡, 扰乱正常的造血干细胞的分化过程, 导致急性髓性白血病的发生或复发[6-8]。同时, 这也是目前急性髓性白血病难以根治的重要因素之一。因此, 研究人员为抑制FLT3蛋白的过度表达, 开发出许多结构新颖的FLT3抑制剂, 用于治疗急性髓性白血病。根据小分子与Fms样酪氨酸激酶的结合构象, 可将FLT3抑制剂分为两类: I型抑制剂 (Type I) 和II型抑制剂 (Type II)。

I型抑制剂常常结合激酶的活性构象 (aspartic acid-phenylalanine-glycine motif in the “in” conformation, DFG-in), 直接竞争ATP结合口袋。此类小分子常为平面杂环结构 (如喹唑啉、吲哚咔唑), 与激酶的铰链区形成氢键, 代表药物有sorafenib、tandutinib、midoataurin、lestaurtinib、sunitinib (图1)。该类化合物通过结构优化降低对Kit原癌基因受体酪氨酸激酶 (Kit proto-oncogene receptor tyrosine kinase, c-Kit) 等脱靶激酶的亲和力, 但耐药性 (如FLT3-F691L突变) 仍为主要挑战。

II型抑制剂靶向FLT3激酶的非活性构象 (aspartic acid-phenylalanine-glycine motif in the “out” conformation, DFG-out), 通过占据疏水后口袋增强选择性, 该类小分子结构中常含柔性连接基团 (如苯胺基嘧啶), 可诱导DFG基团外翻, 代表药物有quizartinib、gilteritinib、crenolanib[9-13](图2)。

根据化合物的骨架可将目前文献中报道的化合物分为以下几种: 首先, 是嘧啶类衍生物, 包括吡啶并嘧啶、苯胺基嘧啶、三唑并嘧啶, 这类结构常具有高激酶选择性, 适用于Type I/II设计, 代表药物有gilteritinib (II型)、crenolanib (I型); 其次, 是大环类化合物, 该类

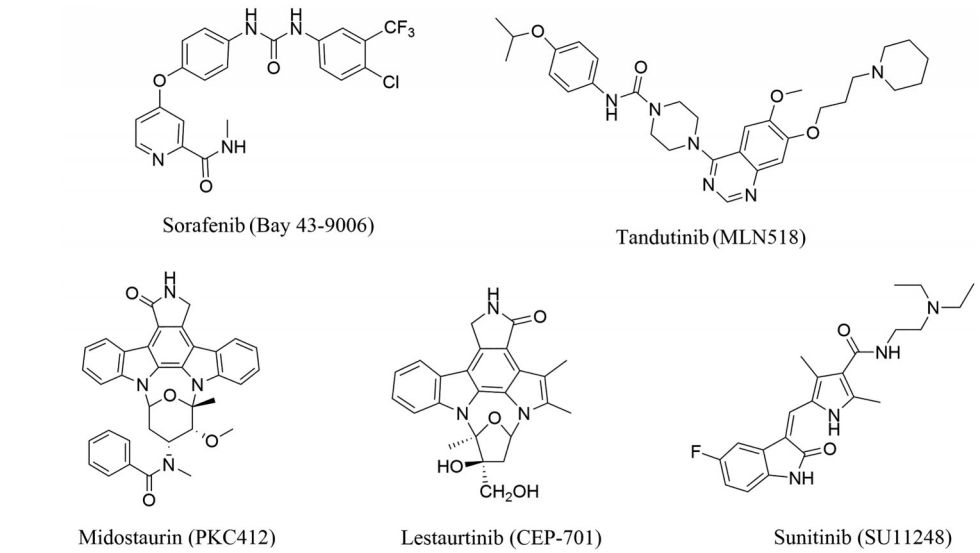


Figure 1 The representative drugs of the first-generation Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) inhibitors

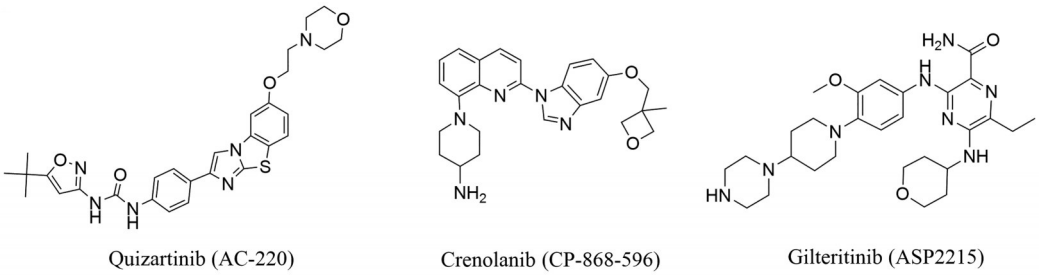


Figure 2 The representative drugs of the second-generation FLT3 inhibitors

骨架的环状结构限制构象自由度, 增强结合稳定性及选择性, 通过结构优化降低对c-Kit等脱靶激酶的亲和力; 最后, 是天然产物衍生骨架, 比如黄酮类、香豆素类、生物碱衍生物[14-16]。

在2004年的研究中发现, 索拉非尼可抑制FLT3-ITD和Fms样酪氨酸激酶3酪氨酸激酶结构域突变(Fms-like tyrosine kinase 3-tyrosine kinase domain, FLT3-TKD)的自磷酸化(IC_{50} = 10 nmol·L^{-1}), 是首个被发现的具有FLT3抑制活性的多靶点药物。索拉非尼是由拜耳和Onyx公司共同开发[17,18]的FLT3抑制剂。相关的实验结果方面表明, 索拉非尼的口服吸收一般, 生物利用度不高, 从某种程度上造成了药物的损失及药效的充分发挥[19,20]。另一方面索拉非尼在临床具有皮肤毒性反应、消化道反应及心脏毒性等不良反应, 且患者用药后易产生耐药性[21,22]。基于此, 本研究以索拉非尼为先导化合物, 对其结构进行化学修饰, 旨在提高口服生物利用度、增强代谢稳定性及降低毒副作用, 以期能够获得类药性质良好、活性显著、口服生物利用度高的优选化合物, 为后续开发安全、有效的FLT3抑制剂奠定基础。

结果

1 目标化合物的设计思路

含氮杂环, 易与受体或酶形成氢键, 并且结构稳定, 不易被代谢, 还可以增加化合物的溶解性。含氮杂环结构是药物分子设计中的优势结构, 被广泛应用于抗肿瘤化合物的设计中。基于含氮杂环的理化特性, 本研究以索拉非尼为先导化合物, 利用生物电子等排原理和拼合原理将活性药效团脲结构替换为结构类似片段“5原子连接体”4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1,2,4-三唑-3-甲酰胺, 此外, 将*N*-甲基-4-苯氧基吡啶-2-甲酰胺这一重要的药效团结构的酰胺部分进行结构翻转。同时, 通过在苯环上引入不同的取代基, 研究它们对目标化合物活性的影响(图3)。因此, 作者设计并合成了一系列含氮杂环的4-苯氧基吡啶类衍生物, 并对其构效关系进行了探讨, 以期为后续开发安全有效的FLT3抑制剂奠定基础。

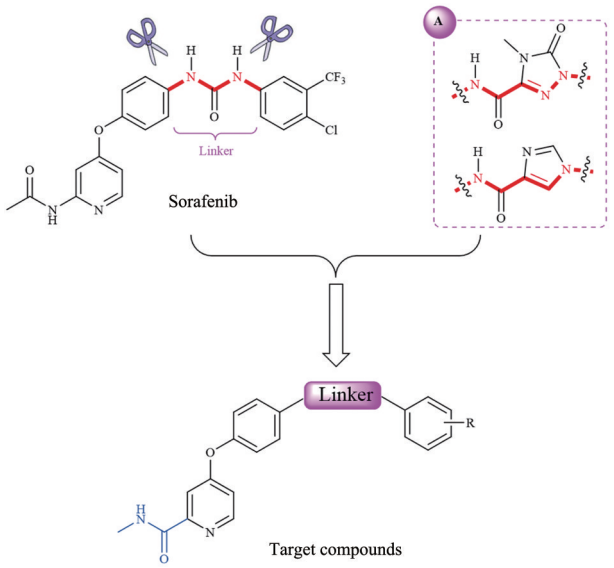


Figure 3 The design strategy for target compounds

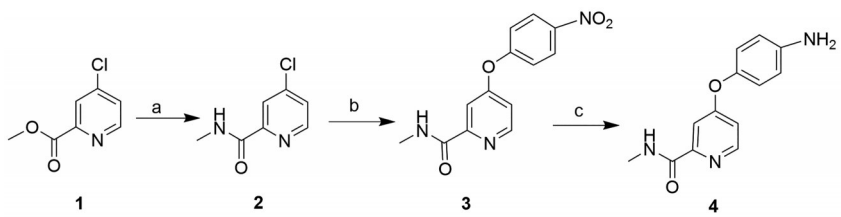
2 目标化合物的合成路线

关键中间体和所有目标化合物的合成路线如合成路线1、2、3所示。以4-氯吡啶甲酸甲酯为原料经过胺解、取代、还原反应得到关键中间体**4**, 以取代苯胺、2-氯-3-氧代丁酸乙酯为原料经过重氮化、取代、环化、水解等反应得到中间体**9a**～**i**, 最后中间体**4**与**9a**～**i**、**13a**～**f**通过缩合反应得到目标化合物**10a**～**i**与**14a**～**f**。

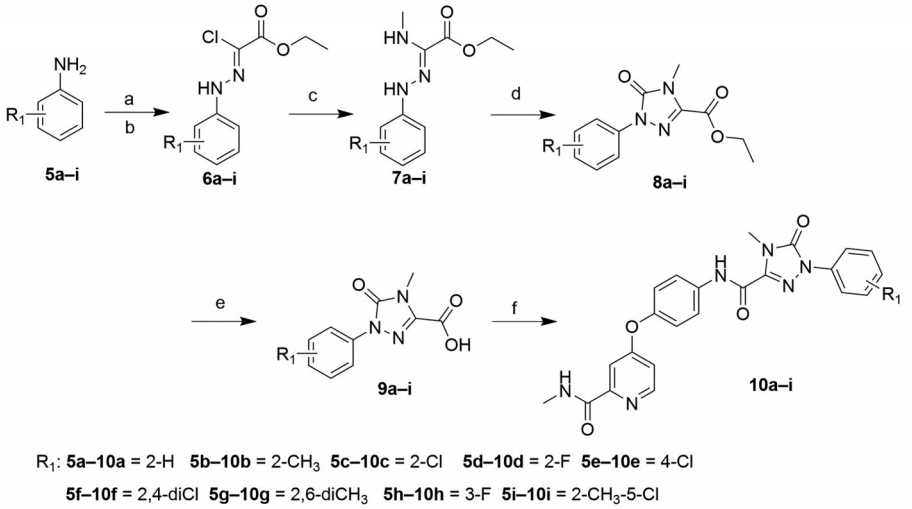
3 体外抗增殖活性

采用CCK-8法(细胞增殖毒性检测)对所合成的目标化合物进行抗(MV4-11细胞)和(Molm-13细胞)增殖活性测试, 进行了3次平行实验, 结果如表1所示。

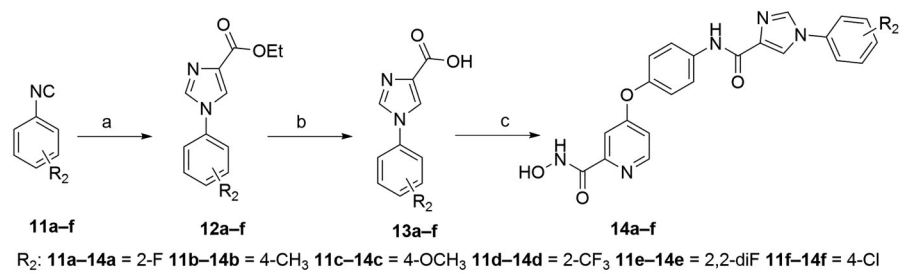
由表1中数据可知, 在咪唑-4-甲酰胺基和1,2,4-三氮唑的4-苯氧基吡啶类中大部分均展现出一定的抗增殖活性, 所合成的化合物对MV4-11细胞更敏感, 其中, 化合物**10c**的抗增殖活性最好, 对MV4-11细胞和Molm-13细胞的IC_{50}值分别为1.90和5.78 μmol·L^{-1}。构效关系研究表明, 苯环上不同的取代基对MV4-11细胞和Molm-13细胞的抗增殖活性有显著影响, 与**10a**相比, 苯环单取代引入甲基(**10b**, IC_{50} = 36.43 μmol·L^{-1})使活性降低, 但是苯环上甲基双取代(**10g**, IC_{50} =



Scheme 1 The synthetic route for compound **4**. a: Acetyl chloride, 40% aqueous methylamine, MeOH, 0 ℃, 3 h; b: 4-Nitrophenol, PhCl, 140 ℃, 36 h; c: Fe (powder), HOAc, EA/Water (10∶1, *v*/*v*), 50 ℃, 2 h



Scheme 2 The synthetic route for compounds **10a**−**i**. a: $NaNO_2$, HCl, H_2O, 0 ℃, 30 min; b: Ethyl-2-chloro-3-oxobutanoate, CH_3COONa, EtOH/H_2O, 0−25 ℃, 2 h; c: 40% Aqueous methylamine, H_2O, 0 ℃, 5 h; d: *p*-Nitrophenyl chloroformate, THF, RT, 2 h, then reflux, 2 h; e: LiOH, MeOH/H_2O, RT, 0.5 h. f: **4**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 12 h



Scheme 3 The synthetic route for compound **14a**−**f**. a: 1,10-Phenanthroline, Cu_2O, reflux; b: LiOH, H_2O; c: **4**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 12 h

Table 1 Anti-proliferative activities of target compounds against MV4-11 cells and Molm-13 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Compound	IC_{50}/μmol·L^{-1}	
	MV4-11	Molm-13
10a	10.48 ± 0.92	> 30
10b	36.43 ± 5.37	19.31 ± 4.57
10c	1.90 ± 0.21	5.78 ± 0.89
10d	> 30	> 30
10e	6.93 ± 0.29	5.92 ± 0.51
10f	15.67 ± 1.20	22.10 ± 3.89
10g	5.20 ± 0.93	29.80 ± 4.49
10h	7.05 ± 1.36	7.16 ± 1.32
10i	4.92 ± 0.01	7.75 ± 1.34
14a	8.83 ± 0.28	9.79 ± 1.14
14b	20.15 ± 4.44	> 30
14c	> 30	> 30
14d	13.99 ± 0.49	20.02 ± 2.43
14e	9.47 ± 0.20	7.43 ± 0.59
14f	> 30	> 30
Sorafenib	0.33 ± 0.04 (nmol·L^{-1})	1.18 ± 0.01 (nmol·L^{-1})

5.20 μmol·L^{-1}) 时活性提高 (Molm-13 细胞则相反), 引入卤素原子 (Cl、F) 整体上会提高活性, 但当苯环的 2 位用 F 取代 (**10d**, IC_{50} > 30 μmol·L^{-1}) 使活性明显降低。在苯环的 2 位与 4 位同时用 Cl 取代时 (**10f**, IC_{50} = 15.67 μmol·L^{-1}) 活性比 Cl 单取代 (**10c**, IC_{50} = 1.90 μmol·L^{-1}) 活性有所降低, 并且作者发现 Cl 原子的引入可对活性的影响较大。在含咪唑-4-甲酰胺的 4-苯氧基吡啶类目标结构中, 对于 MV4-11 细胞系, **14a** 的抗增殖活性最好, 其 IC_{50} 为 8.83 μmol·L^{-1}, 与 **14a** 相比, 在苯环的 4 位引入甲氧基或者是 Cl 时活性均会下降 (IC_{50} > 30 μmol·L^{-1}), 对于 Molm-13 细胞, **14e** 的抗增殖活性为 7.43 ± 0.59 μmol·L^{-1}, 与 **14e** 相比, 苯环单取代引入甲基与氯活性均会下降。

4 细胞凋亡与周期检测

在细胞抗增殖的活性检测中, 发现 **10c** 对肿瘤细胞 MV4-11 的抗增殖活性最强, 为了进一步研究化合物 **10c** 抗增殖活性, 选择 MV4-11 细胞探究 **10c** 对细胞的周期与凋亡的影响。将 MV4-11 细胞分为空白溶剂组、DMSO 组、**10c** 处理组进行研究, 并用流式细胞仪器检测细胞凋亡和周期的情况。结果显示, DMSO 组与对照组相比, 周期和凋亡值几乎相同, 表示用 DMSO 配制化合物不会对细胞产生毒性, 此外, 给药组与空白

溶剂组相比, 细胞的凋亡率大大提升 (图4), 且将细胞阻止在S期 (图5)。

5 分子对接研究

为了进一步验证设计思路, 选取活性最优化合物**10c**与FLT3 (PDB: 4RT7) 进行分子模拟, 结果如图6所示, 化合物**10c**的4-苯氧基吡啶部分的苯环和取代苯基分别与FLT3的PHE691和HIS809形成两个π-π堆积作用, 吡啶母核和Linker分别与FLT3的LYS644和CYS694形成较丰富的氢键作用, 其中CYS694是影响FLT3活性的关键氨基酸[23]。

6 分子动力学模拟

为了研究化合物**10c**/FLT3加合物的结合稳定性, 使用AMBER12软件包进行了分子动力学模拟。如图7所示, 均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)

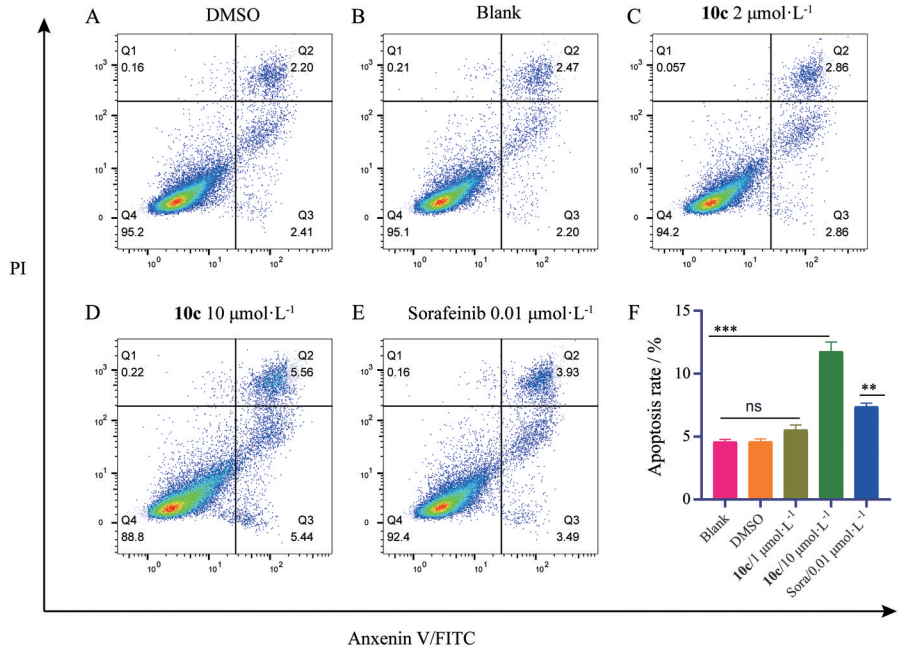


Figure 4 Apoptosis rate of MV4-11 cells detected by flow cytometry. A: DMSO; B: Blank; C: 2 μmol·L^{-1} **10c**; D: 10 μmol·L^{-1} **10c**; E: 0.01 μmol·L^{-1} sorafenib; F: Quantitative statistical analysis of the apoptosis proportion of MV4-11 cells after treatment with drugs at different concentrations. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

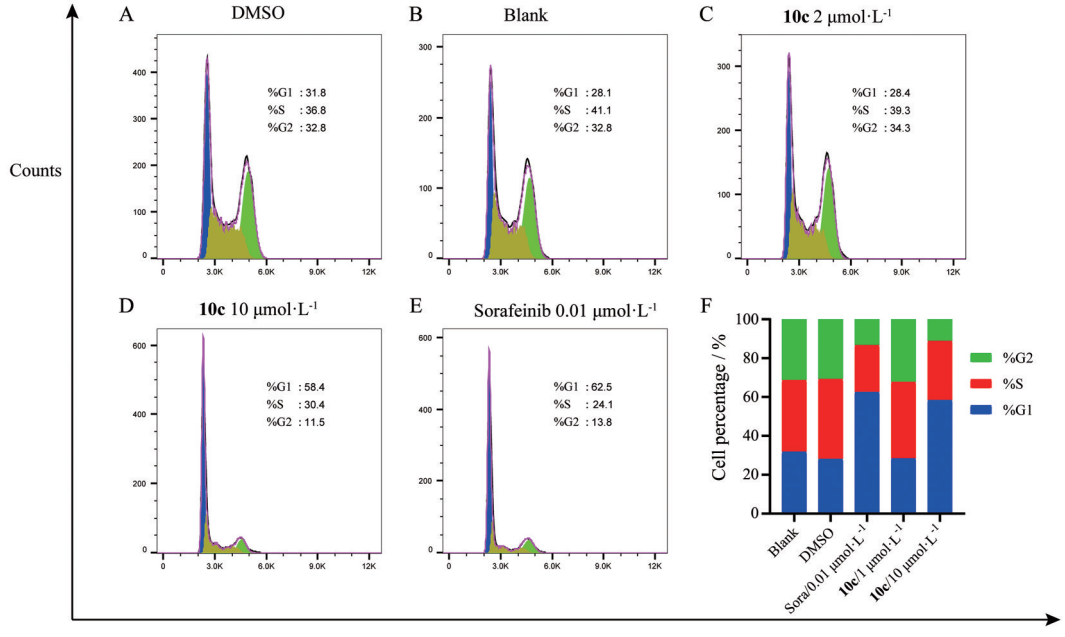


Figure 5 Cycle rate of MV4-11 cells detected by flow cytometry. A: DMSO; B: Blank; C: 2 μmol·L^{-1} **10c**; D: 10 μmol·L^{-1} **10c**; E: 0.01 μmol·L^{-1} sorafenib; F Quantitative statistical analysis of the proportion of cells in different phases

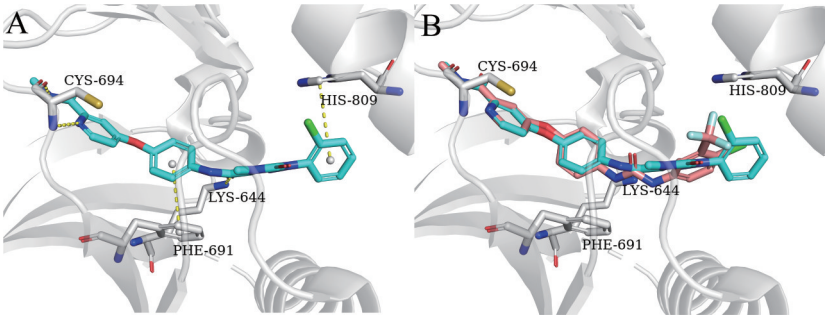


Figure 6 Analysis of the binding mode of compounds with FLT3 (PDB: 4RT7). A: Schematic diagram of the docking mode between compound **10c** and FLT3 protein; B: The overlapping of compound **10c** (blue) with sorafenib (pink)

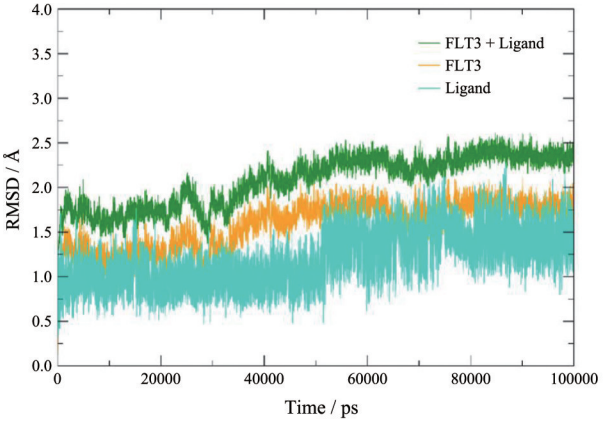


Figure 7 Molecular dynamics simulation of compound **10c** with FLT3 (PDB: 4RT7)

显示了微小的波动, RMSD值在100 ns时收敛到约2.0 Å, 表明蛋白质在长时间模拟中的稳定性。

结论

本研究以索拉非尼为先导化合物, 用“5原子连接体”4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1,2,4-三唑-3-甲酰胺与含咪唑-4-甲酰胺的4-苯氧基吡啶替代原型药物的酰脲基团, 同时结合酰胺结构翻转策略, 成功构建了含1,2,4-三氮唑及咪唑甲酰胺结构与咪唑-4-甲酰胺的4-苯氧基吡啶的新型衍生物。在抗肿瘤活性筛选中, 化合物**10c**对FLT3-ITD突变型白血病细胞系MV4-11和Molm-13表现出显著抗增殖活性, IC_{50}值分别达到1.90和5.78 μmol·L^{-1}。机制研究表明, **10c**可通过诱导细胞凋亡和S期阻滞发挥抗肿瘤作用。分子对接研究显示该化合物能与FLT3激酶ATP结合口袋中的关键氨基酸残基CYS694形成氢键相互作用, 提示其可能通过靶向调控FLT3信号通路发挥作用。该研究不仅验证了基于结构修饰的药物设计策略的有效性, 也为开发新型FLT3抑制剂提供了先导化合物和理论依据, 但需进一步开展药代动力学和体内药效评价以推进临床转化研究。

实验部分

所有试剂和溶剂未经说明的均为分析纯。化学材料购自毕得医药有限公司。所有反应均在0.25 mm硅胶板 (60GF-254) 上进行薄层色谱监测, 并用紫外光显色。本实验中所有^{1}H NMR和^{13}C NMR图谱通过Bruker DRX光谱仪测定 (600 MHz), 内标为四甲基硅烷 (TMS)。高分辨质谱 (HR-MS) 采用UPLC-Q-TOF (Xveo G2-XS型, 美国Waters公司) 仪器测定。

1 化学合成

1.1 4-氯-*N*-甲基吡啶酰胺 (2) 将4-氯吡啶甲酸甲酯 (6.88 g, 40 mmol) 溶于20 mL的甲醇中, 冰浴条件下加入2 mol·L^{-1}甲胺, 0 ℃下搅拌3 h, TLC监测反应完毕后, 减压蒸馏除去甲醇, 残留物用20 mL乙酸乙酯溶解, 饱和食盐水洗涤 (20 mL×2), 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏得无色油状物5.13 g, 收率为75%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_7H_8ClN_2O$ $[M+H]^+$ 172.032 5, found 172.033 0。

1.2 *N*-甲基-4-(4-硝基苯氧基)吡啶酰胺 (3) 将4-氯-*N*-甲基吡啶酰胺 (8.00 g, 40.68 mmol)、4-硝基苯酚 (15.98 g, 101.71 mmol) 溶于100 mL氯苯中, 加入吡啶 (1.60 g, 20.34 mmol), 140 ℃回流40 h, TLC监测反应完毕, 冷却至室温, 减压蒸馏除去氯苯, 残留物用DCM溶解, 分别用饱和碳酸氢钠洗涤 (50 mL×3), 饱和食盐水洗涤 (50 mL×2), 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏得粗产物, 硅胶柱色谱分离得黄色固体7.13 g, 收率为64%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{13}H_{12}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 275.082 8, found 275.082 0。

1.3 4-(4-氨基苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (4) *N*-甲基-4-(4-硝基苯氧基)吡啶酰胺 (6.00 g, 18.91 mmol) 溶解于乙酸乙酯∶水 (10∶1, *v/v*) 的混合溶剂中, 加入铁粉 (5.28 g, 19.56 mmol), 冰醋酸 (11.36 g, 189.10 mmol), 50 ℃回流3 h, TLC监测反应完全后, 减压抽滤, 得黄色滤液, 分液漏斗分液, 有机层用无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏得黄色固体2.76 g, 收率为60%。HR-MS-ESI

(*m/z*) Calcd. for $C_{13}H_{14}N_3O_2$ $[M+H]^+$ 245.108 6, found 245.109 0。

1.4 (*Z*)-2-氯-2-(2-苯基亚肼基)乙酸乙酯 (6a) 冰浴条件下, 将苯胺 (6.00 g, 63.40 mmol) 溶解于浓盐酸∶乙醇∶水 (13∶20∶7, *v/v/v*) 的混合溶剂中。向反应体系中滴加0～5 ℃的$NaNO_2$ (4.69 g, 69.7 mmol) 水溶液 (15 mL)。加毕, 将反应混合物在0 ℃下搅拌30 min, 然后在90 mL的水中加入2-氯乙酰乙酸乙酯 (10.88 g, 63.40 mmol)、无水乙酸钠 (15.60 g, 190.10 mmol)。将反应混合物在0 ℃下搅拌10 min, 然后在室温下搅拌4 h。TLC监测反应完全后, 减压抽滤, 收集沉淀的固体, 并从乙醇中重结晶, 得到浅黄色固体10.74 g, 收率为75%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{10}H_{12}ClN_2O_2$ $[M+H]^+$ 228.058 7, found 228.058 1。

中间体**6b**～**6i**的合成方法参考**6a**。

1.5 (*Z*)-2-(甲氨基)-2-(2-苯肼亚胺)乙酸酯 (7a) 将(*Z*)-2-氯-2-(2-苯肼亚胺) 乙酸酯 (8.00 g, 35.00 mmol) 溶于20 mL THF中, 将反应体系置于0 ℃下, 向体系中加入脂肪胺 (3.00 g, 105.00 mmol), 于0 ℃反应5 h, 监测反应完全后, 减压蒸馏除去溶剂, 将残留物倒入冰水 (20 mL) 中搅拌, 然后抽滤。滤饼用水洗涤, 用甲醇重结晶, 得到黄色固体4.73 g, 收率: 61%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{11}H_{16}N_3O_2$ $[M+H]^+$ 223.124 3, found 223.124 5。

中间体**7b**～**7i**的合成方法参考**7a**。

1.6 4-甲基-5-氧代-1-苯基-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酸乙酯 (8a) 将 (*Z*)-2-(甲氨基)-2-(2-苯肼亚胺) 乙酸酯 (4.42 g, 20.00 mmol) 溶解于20 mL 1,4-二氧六环中, 加入K_2CO_3 (8.30 g, 60.00 mmol) 冷却至0 ℃, 向反应体系中缓慢加入对硝基苯基氯甲酸酯 (6.00 g, 30.00 mmol) 的1,4-二氧六环溶液。室温搅拌反应2 h, 然后回流6 h, TLC监测反应完全后, 减压蒸馏浓缩反应混合物, 加水溶解, 用二氯甲烷萃取, 有机层分别用饱和碳酸氢钠溶液 (50 mL×2) 洗涤, 饱和氯化钠洗涤 (50 mL×3), 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏, 使用石油醚/乙酸乙酯混合物 (3∶1) 通过硅胶柱色谱纯化残留物, 得到白色固体2.72 g, 收率为55%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{12}H_{14}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 249.103 5, found 249.104 0。

中间体**8b**～**8i**的合成方法参考**8a**。

1.7 4-甲基-5-氧代-1-苯基-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酸 (9a) 将4-甲基-5-氧代-1-苯基-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酸乙酯 (1.87 g, 7.56 mmol) 溶于1,4-二氧六环∶水 (4∶1, *v/v*) 的混合溶剂中, 加入2 mol·L^{-1}氢氧化锂调pH = 12, 室温搅拌反应1 h, TLC监测反应完全后, 减压蒸馏除去溶剂, 残留物加30 mL水溶解, 用乙酸乙酯萃取所得水溶液 (20 mL×2), 水层用6 mol·L^{-1}盐酸调pH = 3, 有固体析出, 减压抽滤, 得白色固体即为产物1.18 g。收率: 73%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{10}H_{10}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 221.072 2, found 221.072 5。

中间体**9b**～**9i**的合成方法参考**9a**。

1.8 1-(2-氟苯基)-1*H*-咪唑-4-羧酸乙酯 (12a) 将4-氟苯腈 (0.30 g, 2.48 mmol)、4-甲氧基-3-氧代丁腈 (0.40 g, 3.54 mmol)、氧化亚铜 (0.05 g, 0.35 mmol)、1,10-邻菲咯啉 (0.09 g, 0.51 mmol) 溶于30 mL的四氢呋喃中, N_2保护, 80 ℃回流3 h, TLC监测反应完全, 旋除溶剂, 加入30 mL的乙酸乙酯溶解, 抽滤, 滤饼用甲醇洗涤, 乙酸乙酯∶石油醚 (1∶1, *v/v*) 柱层析纯化即得黄色固体0.44 g。收率: 75%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{12}H_{12}FN_2O_2$ $[M+H]^+$ 235.080 5, found 235.081 0。

中间体**12b**～**f**的合成步骤参考**12a**。

1.9 1-(2-氟苯基)-1*H*-咪唑-4-羧酸 (13a) 将1-(2-氟苯基)-1*H*-咪唑-4-羧酸乙酯 (0.44 g, 1.88 mmol) 溶于20 mL 1,4-二氧六环∶水 (4∶1, *v/v*) 的混合溶剂中, 加入2 mol·L^{-1}氢氧化锂调pH = 12, 室温搅拌反应1 h, TLC监测反应完全后, 减压蒸馏除去溶剂, 残留物加20 mL水溶解, 用乙酸乙酯萃取所得水溶液 (20 mL×2), 水层用6 mol·L^{-1}盐酸调pH = 3, 有固体析出, 减压抽滤, 得白色固体即为产物0.32 g。收率: 84%。HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{10}H_8FN_2O_2$ $[M+H]^+$ 207.049 2, found 207.049 0。

中间体**13b**～**f**的合成步骤参考**13a**。

1.10 *N*-甲基-4-[4-(4-甲基-5-氧代-1-苯基-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酰胺) 苯氧基]吡啶酰胺 (10a) 将4-(4-氨基苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (0.20 g, 0.82 mmol)、4-甲基-5-氧代-1-苯基-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酸 (0.21 g, 0.98 mmol) 溶于5 mL的DMF中, 加入HATU (0.47 g, 1.23 mmol)、DIPEA (0.15 g, 1.23 mmol), 室温搅拌过夜反应, TLC监测反应完全后, 向反应体系中加入冰水 (20 mL) 搅拌, 有固体析出, 减压抽滤, 即得黄色固体, 使用CH_2Cl_2∶MeOH (25∶1, *v/v*) 的混合溶剂通过硅胶色谱纯化得到的粗品, 得到淡黄色固体0.26 g, 收率为73%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.84 (s, 1H), 8.81～8.79 (m, 1H), 8.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.07～8.01 (m, 2H), 7.95～7.91 (m, 2H), 7.56～7.51 (m, 2H), 7.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 2.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.17, 164.24, 155.58, 152.96, 152.36, 150.95, 149.99, 139.85, 137.69, 135.88, 129.63 (2C), 126.56, 123.19 (2C), 121.86 (2C),

119.38 (2C), 114.65, 109.32, 29.71, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{20}N_6O_4$ $[M+H]^+$ 445.154 6, found 445.155 0。

化合物**10b**～**10j**与**14a**～**14f**按照**10a**的合成方法进行合成。

1.11 *N*-甲基-4-(4-(4-甲基-5-氧代-1-(邻甲苯基)-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-甲酰胺) 苯氧基)吡啶酰胺 (10b) 收率: 72%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.85 (s, 1H), 8.81～8.87 (m, 1H), 8.51 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.41～7.44 (m, 3H), 7.40～7.34 (m, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.18～7.14 (m, 1H), 3.54 (s, 3H), 2.78 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 2.25 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.18, 164.24, 155.74, 153.05, 152.95, 150.95, 149.88, 140.09, 135.97, 135.71, 135.54, 131.39, 129.78, 128.08, 127.14, 123.17 (2C), 121.80 (2C), 114.63, 109.28, 29.96, 26.49, 18.05; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{24}H_{22}N_6O_4$ $[M+H]^+$ 459.170 3, found 459.170 0。

1.12 4-(4-(1-(2-氯苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酰胺) 苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10c) 收率: 74%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.85 (s, 1H), 8.81～8.87 (m, 1H), 8.51 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.41～7.44 (m, 3H), 7.40～7.34 (m, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.18～7.14 (m, 1H), 3.54 (s, 3H), 2.78 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 2.25 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.17, 164.23, 155.56, 152.99, 152.95, 150.94, 149.92, 140.57, 135.91, 133.95, 131.93, 131.91, 130.80, 130.72, 128.74, 123.21 (2C), 121.80 (2C), 114.64, 109.27, 30.03, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{19}ClN_6O_4$ $[M+H]^+$ 479.115 6, found 479.116 0。

1.13 4-(4-(1-(2-氟苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-甲酰胺) 苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10d) 收率: 75%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.87 (s, 1H), 8.81～8.87 (m, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 3.51 (s, 3H), 2.78 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.15, 164.23, 155.46, 152.96, 152.28, 150.95, 150.01, 140.03, 136.58, 135.84, 130.44, 129.64 (2C), 123.20 (2C), 121.85 (2C), 120.70 (2C), 114.65, 109.33, 29.75, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{19}FN_6O_4$ $[M+H]^+$ 463.145 2, found 463.145 5。

1.14 4-(4-(1-(4-氯苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酰胺) 苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10e) 收率: 72%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.92 (s, 1H), 8.81～8.76 (m, 1H), 8.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.67 (td, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.60～7.55 (m, 1H), 7.50～7.47 (m, 1H), 7.40 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 3.53 (s, 3H), 2.78 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.17, 164.23, 157.74, 156.07, 155.54, 152.94, 150.95, 149.93, 140.99, 135.93, 131.69, 129.28, 125.59, 124.20, 124.12, 123.16 (2C), 121.82 (2C), 117.23, 114.63, 109.29, 29.99, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{19}ClN_6O_4$ $[M+H]^+$ 479.115 6, found 479.115 0。

1.15 4-(4-(1-(2,4-二氯苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酰胺) 苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10f) 收率: 76%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.94 (s, 1H), 8.81～8.78 (m, 1H), 8.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.93 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 2.78 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.16, 155.48, 152.95, 152.90, 150.94, 149.95, 140.86, 135.88, 133.05, 132.96, 131.92, 130.38, 128.99, 123.22 (2C), 121.81 (2C), 114.65, 109.27, 30.07, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{18}Cl_2N_6O_4$ $[M+H]^+$ 513.076 7, found 513.077 0。

1.16 4-(4-(1-(2,6-二甲基苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-甲酰胺基)苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10g) 收率: 74%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.94 (s, 1H), 8.81～8.78 (m, 1H), 8.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.93 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 2.78 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.18, 164.23, 155.70, 153.06, 152.95, 150.94, 149.86, 140.26, 137.25 (2C), 135.95, 134.37, 130.17, 128.74 (2C), 123.20 (2C), 121.78 (2C), 114.64, 109.27, 30.09, 26.49, 17.93 (2C); HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{25}H_{24}N_6O_4$ $[M+H]^+$ 473.185 9, found 473.186 0。

1.17 4-(4-(1-(3-氟苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-羧酰胺) 苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10h) 收率: 76%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.82 (s, 1H), 8.81～8.79 (m, 1H), 8.52 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.96 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.93～7.90 (m, 3H), 7.62～7.54 (m, 1H), 7.41～7.40 (m, 1H), 7.30～7.26 (m, 2H), 7.18～7.15 (m, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.79 (d, J = 4.7 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.15, 164.22, 163.54, 161.92, 155.40, 152.97, 152.29, 150.95, 150.05, 140.04, 139.16, 135.77, 131.63, 123.23 (2C), 121.87 (2C), 114.67, 113.04, 109.33, 106.12, 29.75, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{19}FN_6O_4$ [M+H]$^+$ 463.145 2, found 463.145 8。

1.18 4-(4-(1-(5-氯-2-甲基苯基)-4-甲基-5-氧代-4,5-二氢-1*H*-1,2,4-三唑-3-甲酰胺基)苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (10i) 收率: 71%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.82 (s, 1H), 8.79～8.77 (m, J = 4.7 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.64～7.54 (m, 2H), 7.39 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.26～7.21 (m, 2H), 7.16 (dd, J = 5.7, 2.8 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.17, 164.24, 155.62, 154.64, 153.13, 152.97, 150.93, 149.94, 140.28, 135.92, 131.23, 129.47, 125.93, 124.16, 123.21 (2C), 121.76 (2C), 114.83, 114.64, 109.31, 56.78, 29.93, 26.47; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{24}H_{21}ClN_6O_4$ [M+H]$^+$ 493.131 3, found 493.130 0。

1.19 4-(4-(1-(2-氟苯基)-1*H*-咪唑-4-甲酰胺基)苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (14a) 收率: 69%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.25 (s, 1H), 8.81～8.78 (m, 1H), 8.51 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.27 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 8.6, 7.2 Hz, 1H), 7.56～7.53 (m, 2H), 7.43～7.39 (m, 2H), 7.22 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.38, 164.27, 160.78, 155.79, 154.14, 152.93, 150.90, 149.03, 138.32, 137.53, 137.20, 130.72, 130.67, 126.68, 126.07, 126.04, 124.89, 124.81, 124.29, 122.44, 121.69, 117.62, 117.49, 114.52, 109.21, 26.49; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{18}FN_5O_3$ [M+H]$^+$ 432.139 4, found 432.139 6。

1.20 *N*-甲基-4-(4-(1-(对甲苯基)-1*H*-咪唑-4-甲酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺 (14b) 收率: 71%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.19 (s, 1H), 8.79～8.77 (m, 1H), 8.50 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 (s, 2H), 8.02～8.00 (m, 2H), 7.72～7.69 (m, 2H), 7.40 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.22～7.19 (m, 2H), 7.15 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.11～7.08 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.39, 164.29, 160.98, 159.08, 152.94, 150.88, 148.98, 137.73, 137.27, 136.43, 130.08, 122.91 (2C), 122.34 (2C), 122.29, 121.65 (2C), 115.40 (2C), 114.51, 109.24, 56.01, 26.48; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{24}H_{21}N_5O_3$ [M+H]$^+$ 428.164 4, found 428.164 1。

1.21 4-(4-(1-(4-甲氧基苯基)-1*H*-咪唑-4-甲酰胺基)苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (14c) 收率: 66%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.21 (s, 1H), 8.80～8.78 (m, 1H), 8.51 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.42 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.03～7.99 (m, 2H), 7.69～7.65 (m, 2H), 7.40 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.23～7.20 (m, 2H), 7.16 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.39, 164.27, 160.94, 152.92, 150.88, 148.96, 137.90, 137.68, 137.26, 136.31, 134.44, 130.75 (2C), 122.36 (2C), 122.01, 121.68 (2C), 121.12 (2C), 114.51, 109.20, 26.49, 20.94; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{24}H_{21}N_5O_4$ [M+H]$^+$ 444.159 4, found 444.159 0。

1.22 *N*-羟基-4-(4-(1-(2-(三氟甲基)苯基)-1*H*-咪唑-4-甲酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺 (14d) 收率: 72%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.26 (s, 1H), 8.81～8.78 (m, 1H), 8.51 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 12.6 Hz, 2H), 8.02～7.98 (m, 3H), 7.92～7.89 (m, 1H), 7.82～7.80 (m, 1H), 7.74 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.24～7.20 (m, 2H), 7.16 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.37, 164.27, 160.85, 152.93, 150.89, 149.04, 139.50, 137.18, 137.13, 134.69, 134.52, 130.93, 130.70, 127.63, 126.23, 125.91, 125.71, 122.48 (2C), 121.67 (2C), 114.54, 109.21, 26.48; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{16}F_3N_5O_4$ [M+H]$^+$ 484.136 2, found 484.136 7。

1.23 4-(4-(1-(2,6-二氟苯基)-1*H*-咪唑-4-甲酰胺基)苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (14e) 收率: 72%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.24 (s, 1H), 8.78～8.76 (m, J = 4.8 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 8.01～7.98 (m, 2H), 7.67～7.62 (m, 1H), 7.46～7.40 (m, 3H), 7.23～7.20 (m, 2H), 7.16 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.37, 164.28, 160.65, 157.72, 156.06, 152.95, 150.89, 149.12, 139.34, 137.49, 137.12, 131.58, 125.45, 122.51 (2C), 121.66 (2C), 114.70, 114.52, 113.32,

113.19, 109.27, 26.48; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{17}F_2N_5O_3$ $[M+H]^+$ 450.129 9, found 450.129 3。

1.24 4-(4-(1-(4-氯苯基)-1*H*-咪唑-4-甲酰胺基)苯氧基)-*N*-甲基吡啶酰胺 (14f) 收率: 68%。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 10.22 (s, 1H), 8.78～8.76 (s, 1H), 8.51～8.50 (m, 2H), 8.49 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.03～7.99 (m, 2H), 7.87～7.84 (m, 2H), 7.64～7.61 (m, 2H), 7.40 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.23～7.19 (m, 2H), 7.16 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 166.37, 164.28, 160.81, 152.95, 150.88, 149.05, 138.16, 137.18, 136.49, 135.65, 132.43, 130.26 (2C), 123.04 (2C), 122.41 (2C), 122.06, 121.66 (2C), 114.52, 109.24, 26.47; HR-MS-ESI (*m/z*) Calcd. for $C_{23}H_{18}ClN_5O_3$ $[M+H]^+$ 448.109 8, found 448.109 6。

2 抗增殖实验

2.1 化合物浓度设置 将待测化合物溶于DMSO中配置成60 μmol·L^{-1}的母液, 按照3倍梯度稀释为7个浓度, 分别为60.00、20.00、6.66、2.22、0.74、0.25、0.08、0.03 μmol·L^{-1}共8个浓度, 每个浓度设置3个复孔, 同时设置空白对照组, 只加培养基。阳性药溶于DMSO中配成100.00 nmol·L^{-1}的母液, 按照3倍稀释为7个浓度, 分别为100.00、33.33、11.11、3.70、1.23、0.41、0.13、0.05 μmol·L^{-1}。

2.2 实验方法 取对数生长期的MV4-11细胞和Molm-13细胞, 用移液枪吸打混合均匀制成细胞悬液, 加入IMDM培养基和1640培养基稀释并吹打均匀后以每孔3×10^{3}个细胞接种于96孔板, 在含5% CO_2、37 ℃的培养箱中培养12 h, 加入一定浓度的阳性药和待测化合物样品溶液, 72 h后, 在96孔板的每个孔中加入10 μL CCK-8试剂, 放在培养箱中孵育2 h (Molm-13细胞3 h), 用酶标仪450 nm波长下检测每孔的吸光度值, 根据公式 (1) 计算细胞的抑制率, 将实验得到的数据通过GraphPad Prism 10计算分析, 计算出IC_{50}和统计学数据。

$$抑制率\ (\%) = (A_{对照孔} - A_{实验孔})/(A_{对照孔} - A_{空白孔}) \times 100\% \quad (1)$$

其中, $A_{对照孔}$、$A_{实验孔}$、$A_{空白孔}$分别为对照组孔 (细胞 + CCK-8 + DMSO) 的吸光度值、实验孔 (细胞 + CCK-8 + 待测化合物) 的吸光度值、空白孔 (CCK-8 + 不加细胞的培养基) 的吸光度值。

3 细胞周期与凋亡检测

3.1 化合物浓度设置 将化合物**10c**配置成30 mmol·L^{-1}的母液, 按照3倍稀释得到10 mmol·L^{-1}的浓度, 再将10 mmol·L^{-1}进行5倍稀释得到2 mmol·L^{-1}的浓度。

3.2 细胞铺板 收集MV4-11细胞, 在6孔板中以每孔1×10^{5}细胞的密度离心, 在梯度稀释培养基中加入0.5 mL不同浓度的待测化合物, 同时向空白孔中加入DMSO, 在5% CO_2、37 ℃孵育48 h, 之后将细胞收集在EP管中, 离心除去上清液。

3.3 细胞周期与凋亡的检测 按照FITC Annexin V细胞凋亡检测试剂盒I的说明加入Annexin V/PI溶液, 在室温下将细胞染色15 min并避光, 按照联科生物细胞周期试剂盒说明书加入500 μL缓冲液重悬细胞, 并转移至流式上样管中, 加入5 μL的破膜剂避光孵育30 min后用流式细胞仪上机检测。

4 分子对接

具体流程如下: FLT3蛋白结构 (PDB: 4RT7) 从PCSB蛋白数据库中获得 (http://www.rcsb.org), 蛋白质输入文件的准备: ① 使用SYBYL-X-2.0软件对蛋白进行预处理, 删除所有的结晶水、配体、离子; ② 使用SYBYL-X-2.0固定侧链程序, 通过扭转角度寻找可旋转的键, 以释放残基和结合配体内部和之间的不良接触, 从而优化侧链的构象; ③ 在AutoDock Tools (v1.5.6)中对蛋白添加极性氢, 并且赋予蛋白AMBER ff99力场参数, Gasteiger-Huckel电荷用于计算部分原子电荷, 结构优化步骤的数量设置为10 000, 能量迭代为0.005 kcal·mol^{-1}·A^{-1}; ④ 准备蛋白质文件并以pdbqt格式保存, 以供进一步的分析。小分子同样采用SYBYL-X-2.0软件进行能量优化, 使用AutoDock Tools保存为pdbqt文件。最后使用AutoDock进行对接, 并在Pymol中进行展示。

5 统计学方法

数据以至少3个独立实验的平均值 ± 标准差表示, 结果采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), P < 0.05表明差异具有统计学意义。

作者贡献: 侯有丽负责后续化合物合成、生物评价 (CCK8+细胞流式) 和文章写作; 赵鹏娟负责部分化合物合成; 刘举负责设计研究方案, 指导研究开展; 廖伟科负责实验方案优化; 汤磊对本文提供指导性支持, 设计论文总纲, 终审论文。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2015, 373: 1136-1152.

[2] Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN [J]. Blood, 2022, 140: 1345-1377.

[3] Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: therapeutic paradigm beyond inhibitor development [J]. Cancer Sci, 2020, 111: 312-322.

[4] Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia [J]. Blood, 2002, 100: 1532-1542.

[5] Smith CC, Wang Q, Chin CS, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia [J]. Nature, 2012, 485: 260-263.

[6] Pratz KW, Levis M. How I treat FLT3-mutated AML [J]. Blood, 2016, 129: 565.

[7] Buchwald M, Pietschmann K, Müller JP, et al. Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation [J]. Leukemia, 2010, 24: 1412-1421.

[8] Knapper S, Russell N, Gilkes A, et al. A randomized assessment of adding the kinase inhibitor lestaurtinib to first-line chemotherapy for FLT3-mutated AML [J]. Blood, 2016, 129: 1143.

[9] Wang ZJ, Cai JH, Cheng J, et al. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: challenges and recent developments in overcoming resistance [J]. J Med Chem, 2021, 64: 2878-2900.

[10] Gucký T, Řezníčková E, Radošová Muchová T, et al. Discovery of N^2- (4-amino-cyclohexyl) -9-cyclopentyl-N^6- (4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine as a potent FLT3 kinase inhibitor for acute myeloid leukemia with FLT3 mutations [J]. J Med Chem, 2018, 61: 3855-3869.

[11] Tian T, Zhang SY, Luo BL, et al. Identification of the benzoimidazole compound as a selective FLT3 inhibitor by cell-based high-throughput screening of a diversity library [J]. J Med Chem, 2022, 65: 3597-3605.

[12] Wang JW, Pan X, Song Y, et al. Discovery of a potent and selective FLT3 inhibitor (*Z*)-*N*-[5-[(5-fluoro-2-oxoindolin-3-ylidene) methyl]-4-methyl-1*H*-pyrrol-3-yl]-3-(pyrrolidin-1-yl)propanamide with improved drug-like properties and superior efficacy in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia [J]. J Med Chem, 2021, 64: 4870-4890.

[13] Wang AL, Li XX, Chen C, et al. Discovery of 1-[4-[4-amino-3-[4-(2-morpholinoethoxy) phenyl]-1*H*-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]phenyl]-3-[5-(tert-butyl) isoxazol-3-yl]urea (CHMFL-FLT3-213) as a highly potent type II FLT3 kinase inhibitor capable of overcoming a variety of FLT3 kinase mutants in FLT3-ITD positive AML [J]. J Med Chem, 2017, 60: 8407-8424.

[14] Heng H, Zhi YL, Yuan HL, et al. Discovery of a highly selective FLT3 inhibitor with specific proliferation inhibition against AML cells harboring FLT3-ITD mutation [J]. Eur J Med Chem, 2019, 163: 195-206.

[15] Ma F, Liu P, Lei M, et al. Design, synthesis and biological evaluation of indolin-2-one-based derivatives as potent, selective and efficacious inhibitors of FMS-like tyrosine kinase3 (FLT3) [J]. Eur J Med Chem, 2017, 127: 72-86.

[16] Zhang LT, Lakkaniga NR, Bharate JB, et al. Discovery of imidazo[1,2-a] pyridine-thiophene derivatives as FLT3 and FLT3 mutants inhibitors for acute myeloid leukemia through structure-based optimization of an NEK2 inhibitor [J]. Eur J Med Chem, 2021, 225: 113776.

[17] Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, et al. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation [J]. Blood, 2013, 121: 4655-4662.

[18] Guo TH, Agaram NP, Wong GC, et al. Sorafenib inhibits the imatinib-resistant KIT T670I gatekeeper mutation in gastrointestinal stromal tumor [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13: 4874-4881.

[19] Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment [J]. Drugs Today (Barc), 2005, 41: 773-784.

[20] Jin WD, Chen L, Cai X, et al. Long non-coding RNA TUC338 is functionally involved in sorafenib-sensitized hepatocarcinoma cells by targeting RASAL1 [J]. Oncol Rep, 2017, 37: 273-280.

[21] Wu J, Wang J, Cao BW. Mechanisms of occurrence and management of adverse reactions of antitumor angiogenesis drugs [J]. Med Recapitulate (医学综述), 2016, 22: 3154-3157.

[22] Chen HL, Li W. Research progress on the mechanisms of sorafenib resistance in the treatment of primary hepatocellular carcinoma [J]. Tumor (肿瘤), 2021, 41: 435-443.

[23] Xu QL, Dai BZ, Li ZW, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 4- [(6, 7-dimethoxyquinoline-4-yl) oxy] aniline derivatives as FLT3 inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2019, 29: 126630.