

# 蛋白质精氨酸甲基转移酶5抑制剂的设计、合成及活性评价

朱康乐<sup>1,2</sup>, 王亚洲<sup>2\*</sup>, 尤启冬<sup>1\*</sup>

(1. 江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 中国药科大学, 江苏 南京 210009;

2. 南京圣和药业股份有限公司, 江苏 南京 210000)

**摘要:** 蛋白质精氨酸甲基转移酶5 (PRMT5) 是人体中重要的II型甲基转移酶, 可以催化多种组蛋白及非组蛋白的对称性双甲基化, 并在多种肿瘤中高表达, 是一种潜在的治疗癌症的新靶点。本文根据已报道的EPZ015666与PRMT5复合物晶型, 并分析其相互作用模式, 开展对GSK3326595 (原为EPZ015938) 的结构改造, 使用构象限制原理设计合成了16个化合物, 经过生物学评价发现化合物B8和C系列6个化合物均具备与GSK3326595相当的PRMT5抑制活性。Caco-2细胞透膜性实验表明化合物C3、C4的透膜性较差, 可能是细胞抗增殖活性较差的一个原因, 为下一步结构设计提供思路。

**关键词:** PRMT5; 结构优化; 癌症; GSK3326595

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1859-13

## Design, synthesis and activity evaluation of protein arginine methyltransferase 5 inhibitor

ZHU Kang-le<sup>1,2</sup>, WANG Ya-zhou<sup>2\*</sup>, YOU Qi-dong<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210000, China)

**Abstract:** Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is an important type II human methyltransferase. It catalyzes the symmetrical double-methylation of many histones and non-histones, and it is highly expressed in many kinds of tumors. PRMT5 has been proven to be a potential new target for cancer treatment. Based on the reported crystal complex of EPZ015666 with PRMT5, a series of new compounds was designed using GSK3326595 (EPZ015938) as the lead compound and using the conformational restriction approach. We found that compounds B8 and the C series of derivatives displayed enzyme inhibitory activity comparable to that of GSK3326595. Compounds C3 and C4 showed poor permeability in Caco-2 cells, and that might be one of the reasons for their poor anti-proliferative activity against Z-138 cells. These data provide insights for further structural optimization.

**Key words:** PRMT5; structural optimization; cancer; GSK332659

蛋白质精氨酸甲基化由蛋白质精氨酸甲基转移酶家族 (protein arginine methyltransferase, PRMT) 催化, 已成为最常见的翻译后修饰之一。在哺乳动物中

PRMT5 作为主要的 II 型甲基转移酶, PRMT5 与 MEP50 形成异八聚体<sup>[1]</sup>, 通过催化 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 上的甲基转移到精氨酸残基胍基的氮原子上, 并释放一当量的 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH), 实现甲基化修饰作用<sup>[2]</sup>。现已证明其可以催化多种组蛋白 (H4R3、H3R8) 及非组蛋白 (NF- $\kappa$ B、p53 等) 的甲基化从而参与生物调控过程<sup>[3]</sup>, 包括转录调控、RNA 代谢、核糖体生物过程和细胞周期调亡<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2020-04-17; 修回日期: 2020-05-14.

基金项目: “重大新药创制”科技部重大专项 (2018ZX09301014-006, 2019ZX09201001-003-005).

\*通讯作者 Tel: 86-25-81066791, E-mail: wangzyf@sanhome.com;

Tel: 13801580597, E-mail: youqd@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0568

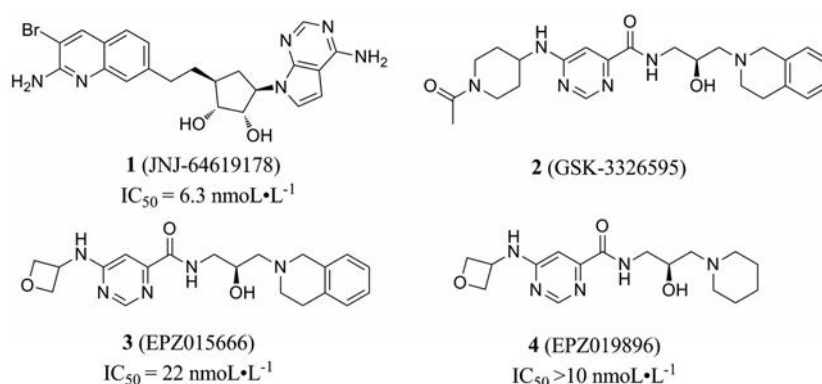


Figure 1 Structures of PRMT5 inhibitors

PRMT5在许多类型的癌症中上调,包括淋巴瘤<sup>[5,6]</sup>、肺癌<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>和结直肠癌<sup>[9]</sup>。此外,PRMT5在套细胞淋巴瘤(MCL)中也有重要作用<sup>[10]</sup>。PRMT5不仅在MCL患者样本中表达上调,而且在MCL细胞系中,当PRMT5基因敲除后,具备抗增殖作用。PRMT5也可以抑制一些抑癌基因的转录,包括致瘤性抑制因子7(ST7)、非转移性基因23(NM23)、视网膜母细胞瘤(RB)家族和程序性细胞死亡4(PDCD4)<sup>[4,11]</sup>。总之,这些发现表明PRMT5是一种潜在的治疗癌症的靶点。

另外,通过检测人类的PRMT5序列,发现当发生F327M突变后PRMT5失去了对称双甲基化的活性,这表明Phe327在PRMT5发挥对称双甲基化功能中占据了重要作用,这为选择性小分子抑制剂的研究提供了思路<sup>[12]</sup>。

近年来,越来越多的研究表明,敲除PRMT5可以抑制肿瘤细胞的生长,改善癌症患者的预后,表明PRMT5可能成为治疗某些癌症的一个新的、有希望的靶点<sup>[13]</sup>,但目前还没有抑制剂被批准上市<sup>[14]</sup>。已知的处于临床研究的抑制剂有**1**(JNJ-64619178)<sup>[15]</sup>、**2**(GSK-3326595)<sup>[16]</sup>、PF-06939999、PRT811。结构如图1所示,PF-06939999和PRT811的结构暂未披露<sup>[2]</sup>。JNJ-64619178是SAM竞争性抑制剂,而GSK-3326595是非SAM竞争性抑制剂。

GSK-3326595(原为EPZ015938)是由化合物**3**(EPZ015666)经过进一步结构优化得到的。EPZ015666是报道的第一个口服且具有细胞生物活性的高选择性PRMT5抑制剂, $IC_{50}$ 值为 $22 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,在Z-138人套细胞淋巴瘤细胞和Maver-1人淋巴细胞中 $IC_{50}$ 值分别为96和 $450 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[10]</sup>。

由EPZ015666与PRMT5:MEP50:SAM复合物的晶体结构(PDB: 4X61)可以看出(图2):EPZ015666结构中的羟基与PRMT5的Glu444、Leu437形成氢键作用;酰胺羰基氧与Phe580、Ser439形成氢键作用;THIQ

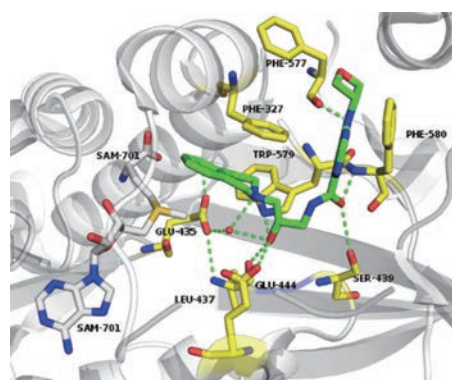


Figure 2 The binding mode of EPZ015666 and PRMT5:MEP50

(四氢异喹啉)上的N原子与Glu435形成水分子介导的氢键;THIQ能与Phe327形成 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用,与SAM形成独特的阳离子- $\pi$ 相互作用,这是保持活性的关键。当移去THIQ中的苯环时化合物**4**(EPZ019896)的活性基本消失( $IC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。根据EPZ015666与PRMT5相互作用,对GSK3326595进行结构改造设计了一类新型的PRMT5选择性抑制剂,保留活性亚结构THIQ环(A区域)不变,对B区域部分采用构象限制策略,利用杂原子(N/NH、O/OH)模拟原手性羟基形成的氢键作用,设计合成了B系列化合物(**B1**~**B10**)(图3),其中**B8**的酶抑制活性与GSK3326595相当。为了改善化合物**B8**的理化性质及细胞抗增殖活性,对C区域设计合成了C系列化合物(**C1**~**C6**)(图4)。

**B1**~**B4**的合成采用合成路线1,使用不同卤代的芳环母核与四氢异喹啉进行亲核取代反应、硝基还原反应得到不同芳环的氨基取代产物(**11**),然后再依次与6-氯嘧啶-4-羰基氯、1-乙酰基-4-氨基哌啶进行亲核取代反应得到**B1**~**B4**。**B5**使用吡咯烷酮(**13**)经过Wittig反应生成烯烃,再经过环氧化后与四氢异喹啉进行亲核取代反应、脱保护基得到吡咯烷醇(**17**),然后再依次与6-氯嘧啶-4-羰基氯、1-乙酰基-4-氨基哌啶进行亲核取代反应得到**B5**(合成路线2)。**B6**~**B10**采用

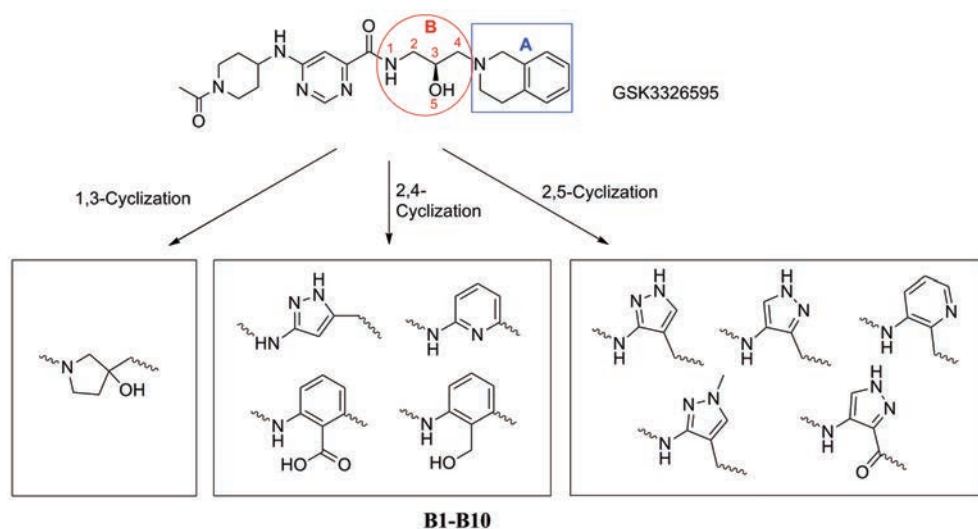


Figure 3 Molecular structure design based on the concept of conformational restriction

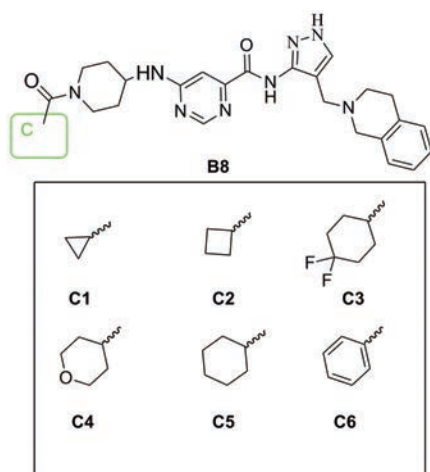


Figure 4 Structural modifications based on compound B8

取代位置不同的吡唑酸或酯与四氢异喹啉缩合得到酰胺, 再经过硼氢化、氢气还原得到胺 (26), 然后再依次与 6-氯嘧啶-4-羰基氯、1-乙酰基-4-氨基哌啶进行亲核取代反应, 得到 B6~B10 (合成路线 3)。C 系列的合成如合成路线 4 所示, 胺的合成通式如酰氯 29 与 4-叔丁氧羰基氨基哌啶经过酰化反应、脱保护基, 然后再与化合物 27c 进行亲核取代反应得到 C1~C6。

## 结果与讨论

### 1 化合物的结构确证

所有目标化合物经检索均未见文献报道, 并采用  $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、HR-ESI-MS 进行结构确证, 纯度使用 HPLC 进行测定, 具体数据见实验部分。

### 2 化合物的生物活性评价

如表 1 所示, 在所设计的 10 个化合物中发现化合物 B8 对 PRMT5 酶抑制活性与阳性药相当, 其他的化

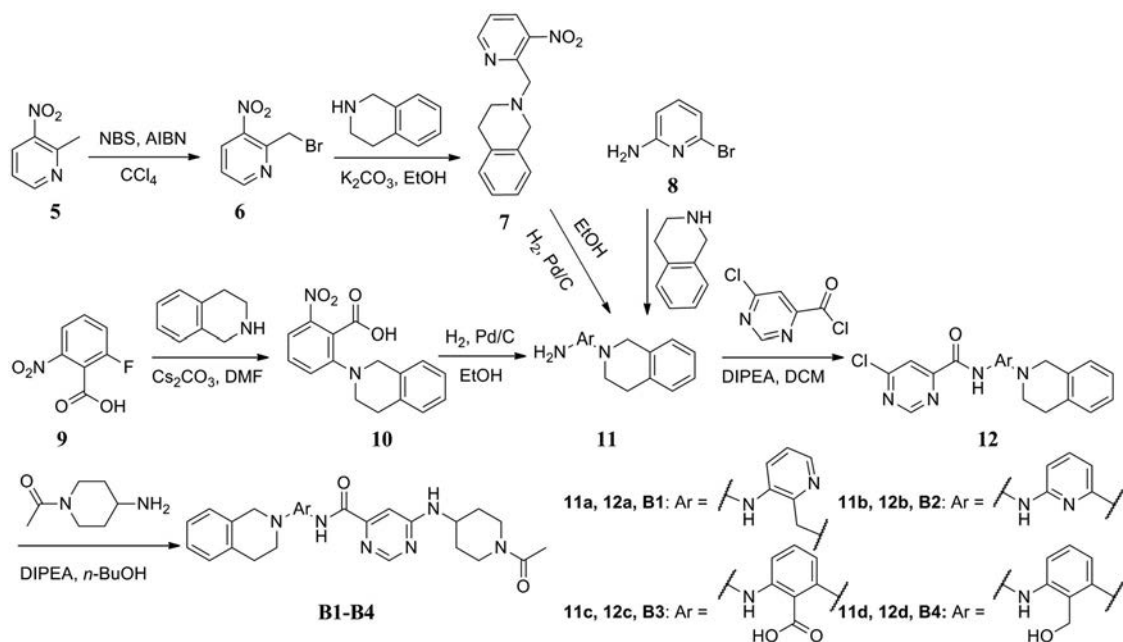
合物活性较差 (大于  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。根据结构分析: B1、B2 两个化合物以杂环作为连接链, 希望能以氮原子模拟氢键受体作用, B3、B4 希望以苯环羧基及苯环羟基模拟氢键给体作用, B5 把柔性链固定构象变成吡咯烷环, 这三类化合物的活性都基本消失, 可能均失去了原手性羟基与 Glu444 的氢键作用; B6、B7、B8 使用吡唑作为连接基团, 发现连接位置不同, 导致吡唑环中 NH 在结合腔中所处的空间位置不同, 对活性影响很大, 只有 B8 具有较好的活性。B9 将吡唑环中 NH 甲基化后, 活性基本消失, 说明了吡唑环中 NH 的重要性。B10 将吡唑环与 THIQ 之间用羰基连接, 活性基本消失。可能原因是二面角改变, 使吡唑 NH 的朝向发生改变, 失去了关键的相互作用。

对化合物 B8 进行人套细胞淋巴瘤细胞 Z-138 抗增殖活性测试发现,  $\text{IC}_{50}$  为  $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比阳性药弱很多。希望改善化合物 B8 的理化性质, 以提高细胞活性, 使用不同大小的脂肪环或芳香环替换甲基, 得到化合物 C1~C6。生物测试发现, 这些化合物对 PRMT5 的抑制活性基本保持, 对 Z-138 细胞的抗增殖活性随着环的增大显示出有规律的提高, 化合物 C6 比 B8 活性提高 5.3 倍, 但依然弱于阳性对照药 GSK3326595 (表 2)。

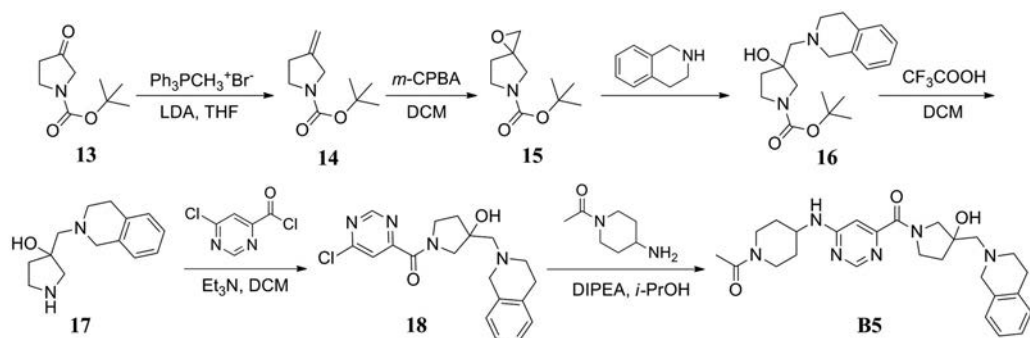
为了研究细胞活性差的原因, 对 C3、C4 进行了 Caco-2 透膜性实验 (表 3), 实验结果表明化合物 C3、C4 对 Caco-2 的透膜性很差, 外排率比较大, 可能是 P-糖蛋白的底物。通过改善化合物的透膜性可能会提高化合物的细胞活性。

### 3 分子对接结果分析

采用分子对接的方法, 将化合物 B8 与 PRMT5: MEP50: SAM 复合物进行分子对接及分子叠合 (PDB:



Scheme 1 Synthetic route of target compounds B1–B4



Scheme 2 Synthetic route of target compound B5

4X61)。从图 5B 中可以看出, **B8** 在 SAM 存在时与酶结合, 与 EPZ015666 的结合位点基本一致, 二者的 THIQ 部分基本重叠。由图 5A 可以看出, **B8** 吡啶环上的 NH 与 Glu444 形成氢键, 并且吡啶环与 Tyr579 形成  $\pi$ - $\pi$  堆积作用; 噻啉羰基与 Phe580 形成氢键; THIQ 亦能与 Phe327 形成  $\pi$ - $\pi$  堆积作用, 与 SAM 形成独特的阳离子- $\pi$  相互作用。分子对接结果说明 **B8** 基本维持了 EPZ015666 与 PRMT5 关键的相互作用。

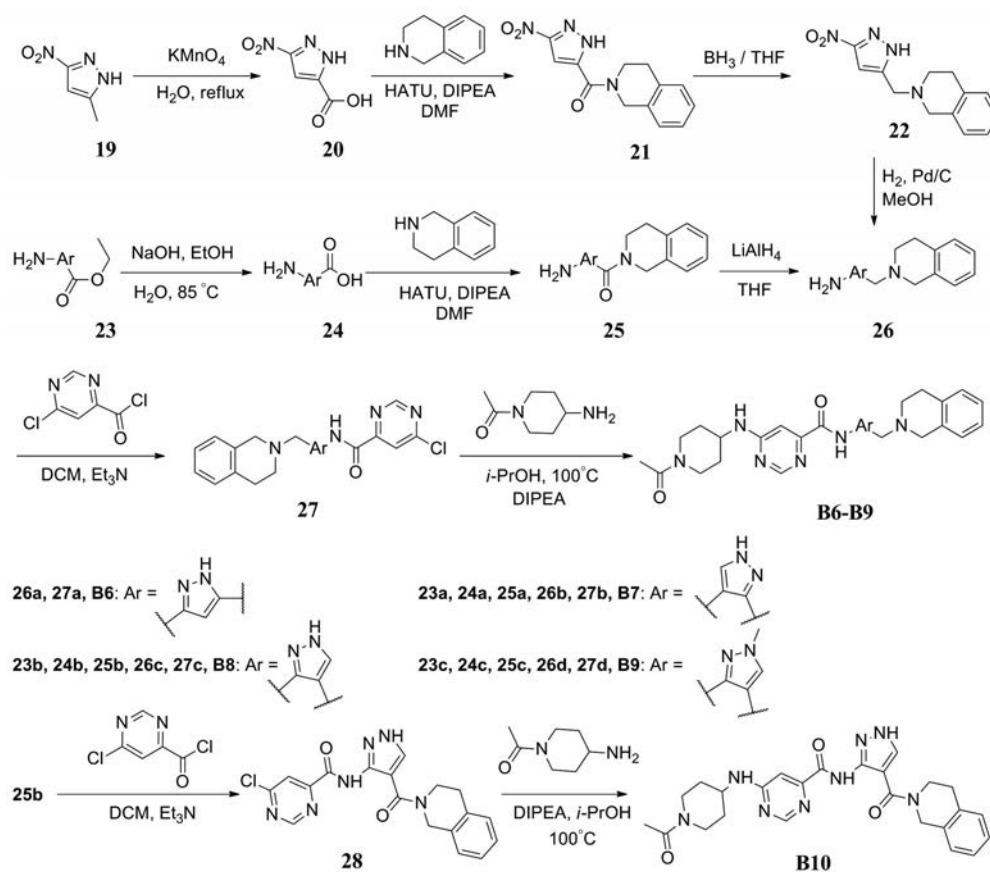
#### 4 小结

根据 EPZ015666 与 PRMT5 的作用模式, 针对 GSK3326595 的手性醇柔性链, 采用构象限制策略, 首先设计合成了 **B1**~**B10** 共 10 个结构新颖的化合物, 并分别测试了对 PRMT5 的抑制活性, 发现化合物 **B8** 对 PRMT5 的抑制活性与阳性对照药相当, 但抗细胞增殖活性较弱。然后对该化合物进一步结构优化设计了 6 个化合物 **C1**~**C6**, 这些化合物的酶活性得以保持, 化合物 **C6** 的抗细胞增殖活性比 **B8** 提高 5 倍, Caco-2 细

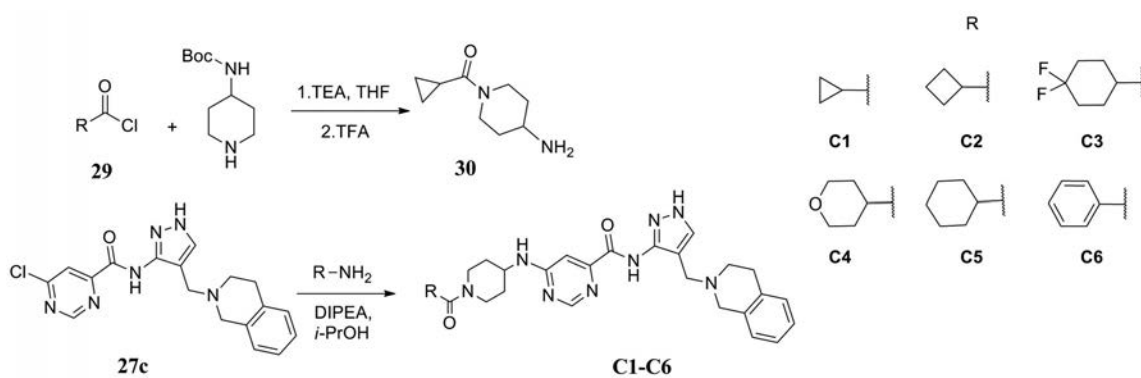
胞透膜性实验表明此类化合物的透膜性较差, 为该类型 PRMT5 小分子抑制剂的进一步设计提供参考。

#### 实验部分

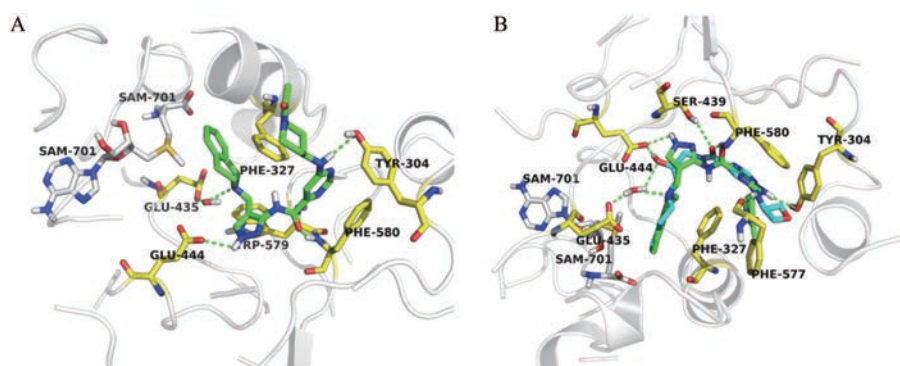
本文化合物的  $^1\text{H}$  NMR 使用 Bruker Avance III HD 400 MHz 型核磁共振仪测定, 以四甲基硅烷 (tetramethylsilane, TMS) 为内标;  $^{13}\text{C}$  NMR 使用 Bruker Avance III HD 100 MHz 型核磁共振仪测定; LC-MS 采用 Agilent 1290 Infinity-Agilent 6130 Quadrupole LC/MS system 质谱联用仪测定; HR-ESI-MS 使用 Q Exactive 高分辨质谱仪测定; 柱色谱均使用青岛海洋化工厂的促控 (ZCX-II) 型 200~300 目柱色谱硅胶; TLC 使用烟台江友有限公司生产的 HSGF254 型薄层色谱硅胶板, 用 ZF-2007 型暗箱式紫外分析仪 254 显色; 熔点由梅特勒-托利多 MP70 精密熔点仪测定; HPLC 经 Waters 2695 型高效液相色谱仪测定 (流动相是乙腈:水-0.1% 甲酸=10%~90%:1; 流速 1.2 mL·min<sup>-1</sup>, 总时长: 25 min;



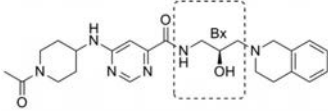
Scheme 3 Synthetic route of target compounds B6–B10














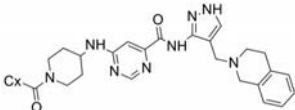
Scheme 4 Synthetic route of target compounds C1–C6










**Figure 5** (A) The predicted key interactions of between **B8** and PRMT5:MEP50:SAM complex by molecular docking, (B) The overlap of **B8** and EPZ015666 in PRMT5; **B8** colored in green, EPZ015666 in olive, residues involved in interactions colored in yellow

**Table 1** PRMT5 inhibition of target compounds


Compd.	Bx	PRMT5 IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Compd.	Bx	PRMT5 IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
B1		>10	B6		>10
B2		>10	B7		>2.1
B3		>10	B8		0.037
B4		>10	B9		>10
B5		>10	B10		>10
GSK3326595		0.045			

**Table 2** PRMT5 inhibition and anti-proliferative activity of target compounds in Z-138 cells


Compd.	Cx	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	
		PRMT5	Z-138 cells
B8		0.037	2.2
C1		0.084	1.38
C2		0.034	0.733
C3		0.043	0.651
C4		0.029	0.565
C5		0.026	0.609
C6		0.022	0.413
GSK3326595		0.030	0.025

检测波长: 254 nm)。所有试剂均为市售分析纯, 除特别说明外, 一般均不经纯化处理直接使用。

生物活性测试所用 PRMT5 购自 BPS 公司; [<sup>3</sup>H]-SAM 购自 PerkinElmer 公司; SAM、SAH 购自 Sigma 公司; Z-138 细胞株和 Caco-2 细胞购自 ATCC 细胞库; CellTiter-Glo 发光法细胞活力检测试剂盒购自

Promega 公司; 阳性对照化合物 GSK3326595 参照专利 WO201410071 9A2 自制, 纯度 100%。

## 1 化学合成

**1.1 2-(溴甲基)-3-硝基吡啶 (6)** 将 2-甲基-3-硝基吡啶 (5) (4 g, 29.0 mmol) 溶于四氯化碳 (60 mL) 中, 加入 *N*-溴代丁二酰亚胺 (6.7 g, 37.6 mmol) 与偶氮二异丁腈 (0.71 g, 4.33 mmol), 80 °C 搅拌回流反应过夜。LC-MS 检测反应完全后过滤, 减压浓缩滤液, 用乙酸乙酯和水萃取 3 次, 乙酸乙酯层减压浓缩得到黄色液体产物 (4.5 g, 71.8%)。ESI-MS (*m/z*): 217.1/219.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.2 2-((3-硝基吡啶-2-基)甲基)-1,2,3,4-四氢异喹啉 (7)** 将化合物 6 (4.32 g, 20.0 mmol) 溶于乙醇 (60 mL) 中, 加入 1,2,3,4-四氢异喹啉 (2.94 g, 20.0 mmol) 与碳酸钾 (5.52 g, 40.0 mmol), 室温搅拌反应过夜后, LC-MS 检测原料基本消失。过滤, 减压浓缩滤液, 柱色谱 (*V*<sub>石油醚</sub>:*V*<sub>乙酸乙酯</sub>=5:1) 分离得到黄色固体 (1.9 g, 35.3%)。ESI-MS (*m/z*): 270.1 [M+H]<sup>+</sup>。

采用类似的方法由化合物 9 合成化合物 10, 产率 92.0%。ESI-MS (*m/z*): 299.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.3 2-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)吡啶-3-胺 (11a)** 将化合物 7 (1 g, 3.72 mmol) 溶于乙醇 (20 mL) 中, 加入钯碳 (30 mg, 0.372 mmol), 氢气球存在下室温搅拌反应过夜, LC-MS 检测原料基本消失。抽滤后减压浓缩滤液, 得到黄色油状产物 (920 mg, 粗品)。ESI-

**Table 3** Experimental results of membrane permeability of **C3**, **C4** to Caco-2. <sup>a</sup>Low permeability:  $P_{app} \leq 0.5 (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$ , Moderate permeability:  $0.5 < P_{app} < 2.5 (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$ , High permeability:  $P_{app} \geq 2.5 (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$ ; <sup>b</sup>No detection

Compd.	Mean $P_{app}/10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$		Efflux ratio	Mean Recovery/%		Rank <sup>a</sup>	
	A to B	B to A		A to B	B to A	$P_{app}$	Efflux transporter substrate
Nadolol	0.10	ND	-	101.57	ND <sup>b</sup>	Low	-
Metoprolol	21.40	ND	-	97.79	ND	High	-
Digoxin	<0.02	10.36	>441.98	<91.77	93.73	Low	Likely
<b>C3</b>	0.04	23.64	546.46	89.34	91.86	Low	Likely
<b>C4</b>	<0.04	19.58	4 951.21	<105.57	104.53	Low	Likely

MS ( $m/z$ ): 240.2 [M+H]<sup>+</sup>.

化合物 **11c** 的合成方法与 **11a** 类似, 直接用于下一步. ESI-MS ( $m/z$ ): 269.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**1.4 6-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)吡啶-2-胺 (11b)** 将化合物 **8** (3.46 g, 20.0 mmol) 溶于 1,2,3,4-四氢异喹啉 (7.5 mL) 中, 油浴 140 °C 搅拌过夜后, LC-MS 检测原料完全反应. 停止加热, 冷却至室温, 加入乙酸乙酯稀释, 抽滤, 减压浓缩滤液, 柱色谱 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=5:1$ ) 分离得到黄色液体产物 (3.82 g, 84.9%). ESI-MS ( $m/z$ ): 226.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**1.5 (2-氨基-6-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)苯基)甲醇 (11d)** 将化合物 **11c** (1 g, 3.73 mmol) 溶于无水四氢呋喃 (10 mL) 中, 冰浴下滴加氢化铝锂/四氢呋喃溶液 (2.5 mol·L<sup>-1</sup>) 抽滤, 浓缩滤液, 得到深红色油状液体 (800 mg, 84.4%). ESI-MS ( $m/z$ ): 255.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**1.6 6-氯-N-(2-(((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)吡啶基-3-基)嘧啶-4-羧酰胺 (12a)** 将化合物 **11a** (920 mg, 3.85 mmol) 溶于无水二氯甲烷 (15 mL) 中, 加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (1 g, 7.75 mmol), 冰浴下滴加 6-氯嘧啶-4-羧基氯无水二氯甲烷溶液 (800 mg, 4.54 mmol) 室温搅拌反应过夜, LC-MS 检测原料基本消失. 加入二氯甲烷与水萃取 3 次, 有机层干燥浓缩, 柱色谱 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ ) 分离得到白色固体产物 (550 mg, 37.7%). ESI-MS ( $m/z$ ): 379.1 [M+H]<sup>+</sup>.

化合物 **12b**、**12c**、**12d** 的合成方法与 **12a** 类似, 产率分别为 38.5%、118%、90.2%. **12b**: ESI-MS ( $m/z$ ): 366.1 [M+H]<sup>+</sup>; **12c**: ESI-MS ( $m/z$ ): 409.1 [M+H]<sup>+</sup>; **12d**: ESI-MS ( $m/z$ ): 395.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**1.7 6-((1-乙酰基嘧啶-4-基)氨基)-N-(2-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)吡啶-3-基)嘧啶-4-羧酰胺 (B1)** 将化合物 **12a** (300 mg, 0.79 mmol)、1-乙酰基-4-氨基嘧啶 (224.8 mg, 1.58 mmol) 溶于正丁醇 (20 mL) 中, 加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (510.5 mg, 3.96 mmol), 140 °C 微波反应 2 h, LC-MS 监测反应完全后, 减压除去溶剂. 加入水和乙酸乙酯萃取 3 次, 有机相经无水硫酸钠干燥后, 减压浓缩, HPLC 制备分离 (乙腈/水, 0.1% 甲酸) 得到白色固体 (70 mg, 23.4%). mp: 144~146 °C. ESI-MS

( $m/z$ ): 486.3 [M+H]<sup>+</sup>.

HPLC: 98.96%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.81 (d,  $J = 23.7$  Hz, 1H), 8.68 (dd,  $J = 8.2, 1.3$  Hz, 1H), 8.27 (dd,  $J = 4.7, 1.3$  Hz, 1H), 7.83 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.38 (dt,  $J = 18.0, 9.0$  Hz, 1H), 7.21~7.04 (m, 5H), 4.21 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.82~3.67 (m, 3H), 3.16 (t,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 2.94 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 2.78 (t,  $J = 9.6$  Hz, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.84 (dd,  $J = 29.8, 13.0$  Hz, 2H), 1.46~1.14 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  168.48, 162.91, 162.70, 157.61, 154.12, 147.44, 144.07, 134.92, 134.87, 134.64, 128.83, 127.43, 126.78, 126.47, 125.89, 123.44, 104.23, 100.00, 63.56, 55.62, 50.25, 47.38, 44.82, 32.09, 31.35, 28.92, 21.74. HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>) 486.261 2, Found 486.260 2.

化合物 **B2**、**B3**、**B4** 的合成方法与 **B1** 类似. **B2** 产率 13.3%. mp: 125~126 °C. ESI-MS ( $m/z$ ): 472.2 [M+H]<sup>+</sup>. HPLC: 100%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.00 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.03 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.64 (t,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.20 (d,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 6.69 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.32~4.06 (m, 2H), 3.89~3.71 (m, 3H), 3.20 (t,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.91 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 2.82 (t,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.98~1.81 (m, 2H), 1.42 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 1.35~1.19 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  168.52, 157.80, 148.85, 140.36, 135.52, 134.68, 128.80, 127.05, 126.78, 126.49, 104.24, 103.76, 101.41, 47.56, 46.88, 44.85, 42.40, 32.08, 31.35, 28.46, 21.80. HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>) 472.245 5, Found 472.245 7.

**B3** 产率 24.0%. mp: 238~240 °C. ESI-MS ( $m/z$ ): 515.2 [M+H]<sup>+</sup>. HPLC: 99.95%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.77 (s, 1H), 8.74~8.52 (m, 2H), 8.07 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.94 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.25 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 7.23~7.19 (m, 2H), 7.16 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 4.25 (d,  $J = 20.0$  Hz, 3H), 4.14

(s, 1H), 3.80 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.40 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 3.20 (t,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.07 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 2.82 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.99~1.83 (m, 2H), 1.35 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.01, 166.63, 162.76, 161.63, 157.77, 146.56, 136.83, 132.28, 132.02, 129.09, 127.38, 126.57, 126.50, 126.10, 124.97, 123.68, 122.85, 55.92, 51.71, 45.16, 40.39, 32.42, 31.59, 29.09, 21.48。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_4$ ) 515.240 1, Found 515.240 2。

**B4** 产率 9.2%。ESI-MS ( $m/z$ ): 501.2 [M+H]<sup>+</sup>。mp: 75~76 °C。HPLC: 99.61%。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10.35 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.91 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.18~7.09 (m, 5H), 5.13 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.24 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.80 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.21 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 3.14 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 2.93 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 2.81 (t,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.97~1.85 (m, 2H), 1.81 (s, 1H), 1.47~1.22 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  168.53, 162.96, 161.83, 158.19, 154.58, 146.86, 137.51, 135.60, 134.51, 133.91, 129.17, 126.80, 126.59, 126.04, 120.84, 119.81, 104.29, 59.20, 54.74, 51.27, 47.48, 44.87, 32.13, 31.40, 29.59, 21.78。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_3$ ) 501.260 9, Found 501.260 3。

**1.8 3-亚甲基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (14)** 将溴化三苯基甲基磷 (14.5 g, 40.5 mmol) 溶于无水四氢呋喃中, 冰浴下缓慢加入二异丙基氨基锂 (20 mL, 2 mol·L<sup>-1</sup> in THF), 冰浴反应 1 h 后, 加入化合物 **13** (5 g, 27 mmol), 室温反应 2 h, TLC 监测反应完全后 (高锰酸钾显色), 缓慢滴加乙酸乙酯和饱和氯化钠水溶液淬灭, 有大量不溶物生成, 过滤, 滤液用乙酸乙酯萃取 3 次, 有机层干燥浓缩。柱色谱 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=10:1$ ) 得到白色固体产物 (1.5 g, 30.0%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 184.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.9 叔丁基-1-氧杂-5-氮杂螺[2.4]庚烷-5-甲酸甲酯 (15)** 将化合物 **14** (1.5 g, 8.29 mmol) 溶于二氯甲烷 (15 mL) 中, 加入间氯过氧苯甲酸 (1.7 g, 9.94 mmol)。室温反应 2 h, LC-MS 监测反应完全后, 加乙酸乙酯和饱和碳酸氢钠萃取 3 次, 合并有机相, 减压浓缩后直接进行下一步。ESI-MS ( $m/z$ ): 200.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.10 叔丁基-1-氧杂-5-氮杂螺[2.4]庚烷-5-甲酸甲酯 (16)** 将化合物 **15** (1.5 g, 7.5 mmol) 溶于甲醇 (15 mL) 中, 加入四氢异喹啉 (2 g, 15 mmol), 室温反应 2 h, LC-MS 监测反应完全后, 减压浓缩, 柱色谱 (100%  $V_{\text{石油醚}}$ ) 得到黄色油状产物 2.4 g (粗品)。ESI-MS ( $m/z$ ): 333.2

[M+H]<sup>+</sup>。

**1.11 叔丁基-3-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-3-羟基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯 (17)** 将化合物 **16** (2.4 g, 7.21 mmol) 溶于无水二氯甲烷 (20 mL) 中, 加入三氟乙酸 (5 mL), 室温反应过夜。LC-MS 监测反应完全后, 加入水和乙酸乙酯萃取 3 次, LC-MS 监测产物在水相, 合并水相, 减压浓缩冻干, 得到油状产物 3.9 g (粗品)。ESI-MS ( $m/z$ ): 233.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.12 (6-氯嘧啶-4-基)-(3-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-3-羟基吡咯烷-1-基)甲酮 (18)** 将化合物 **17** (500 mg, 2.16 mmol) 溶于无水二氯甲烷 (20 mL) 中, 加入三乙胺 (870 mg, 8.64 mmol), 冰浴下加入 6-氯嘧啶-4-羰基氯 (1 g, 5.6 mmol), 室温反应 3 h, LC-MS 监测反应完成后, 浓缩柱色谱 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=2:1$ ) 得到产物 (400 mg, 49.8%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 373.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.13 1-(4-((6-(3-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-3-羟基吡咯烷-1-羰基)嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)乙-1-酮 (B5)** 将化合物 **18** (200 mg, 0.54 mmol) 溶于异丙醇 (4 mL) 中, 加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (139 mg, 1.08 mmol)、1-乙酰基-4-氨基哌啶 (276 mg, 1.08 mmol), 100 °C 回流反应过夜, LC-MS 监测反应完全后, 减压浓缩后, HPLC 制备分离 (乙腈/水, 0.1% 甲酸) 得到白色固体产物 (58 mg, 22.5%)。mp: 59~60 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 479.3 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC: 93.41%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.44 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.62 (dd,  $J = 8.0, 4.0$  Hz, 1H), 7.13~7.05 (m, 3H), 7.04~6.97 (m, 1H), 6.70 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 4.84 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.23 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.78 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 3.73 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 3.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 3.64~3.53 (m, 2H), 3.44 (s, 1H), 3.17 (t,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 2.82 (dd,  $J = 8.0, 4.0$  Hz, 2H), 2.79~2.74 (m, 2H), 2.64 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 2.57 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 2.51 (s, 1H), 2.50 (s, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.97~1.76 (m, 4H), 1.37 (dd,  $J = 24.0, 12.0$  Hz, 1H), 1.31~1.19 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  167.43, 164.52, 161.26, 157.95, 156.94, 134.63, 133.49, 127.80, 125.71, 125.27, 124.80, 103.93, 78.91, 63.03, 62.78, 56.65, 51.70, 46.26, 44.36, 43.84, 31.14, 30.40, 28.11, 20.67。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_3$ ) 479.276 5, Found 479.276 0。

**1.14 3-硝基-1H-吡啶-5-羧酸 (20)** 将化合物 **19** (4 g, 31.47 mmol)、高锰酸钾 (15 g, 94 mmol) 置于烧瓶中, 加入 50 mL 水, 搅拌均匀, 回流反应 5 h。LC-MS 检测原料反应完全, 抽滤, 滤掉黑色固体, 滤液在冰浴下缓慢滴加 1 mol·L<sup>-1</sup> 的稀盐酸调 pH 至 3~4, 减压浓缩除去大部分水, 然后用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 无

水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到白色固体 (2.8 g, 57.2%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 156.0 [M-H]<sup>-</sup>。

**1.15 (3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)(3-硝基-1H-吡唑-5-基)甲酮 (21)** 将化合物 **20** (1 g, 6.37 mmol)、1,2,3,4-四氢异喹啉 (1.02 g, 7.64 mmol)、2-(7-氧化苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐 (4.84 g, 12.7 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺 (1.65 g, 12.7 mmol) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (15 mL), 然后室温搅拌过夜。LC-MS 监测原料反应完全。将反应液倒入水中, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥。柱色谱 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=5:1$ ) 分离纯化得到白色固体 (1.7 g, 98.2%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 273.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.16 2-((3-硝基-1H-吡唑-5-基)甲基)-1,2,3,4-四氢异喹啉 (22)** 将化合物 **21** (1.7 g, 6.24 mmol) 溶于 20 mL 四氢呋喃, 冰浴下加入硼烷-四氢呋喃溶液 (18 mL, 1.0 mol·L<sup>-1</sup>), 80 °C 反应过夜。TLC 监测反应完成后, 加入 20 mL 甲醇淬灭剩余的硼烷, 搅拌 30 min, 然后加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠水溶液回流 1 h, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩直接用于下一步。ESI-MS ( $m/z$ ): 259.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.17 4-氨基-1H-吡唑-3-羧酸 (24a)** 将化合物 **23a** (6.0 g, 38.7 mmol) 溶于乙醇 (80 mL) 中, 加入氢氧化钠 (2.5 g, 62.5 mmol) 的水溶液 (20 mL), 80 °C 回流反应过夜, LC-MS 监测原料基本消失。减压除去溶剂, 加入浓盐酸调 pH = 3~4, 冰浴下析出晶体, 抽滤, 用冰水洗涤 3 次滤饼, 得到白色滤饼 (3.7 g, 75.3%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 128.0 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **24b**、**24c** 的合成方法与 **24a** 类似, 产率分别为 80.7%、74.0%。**24b**: ESI-MS ( $m/z$ ): 128.0 [M+H]<sup>+</sup>; **24c**: ESI-MS ( $m/z$ ): 142.0 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.18 (4-氨基-1H-吡唑-3-基)(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲酮 (25a)** 将化合物 **24a** (3 g, 23.6 mmol) 与四氢异喹啉 (4.7 g, 35.3 mmol) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (30 mL) 中, 加入 2-(7-氧化苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐 (10.7 g, 26.6 mmol) 与 *N,N*-二甲基乙二胺 (6.1 g, 42.3 mmol), 室温搅拌反应过夜, LC-MS 监测原料基本消失。加水和乙酸乙酯萃取 3 次, 饱和食盐水洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱色谱分离 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ ) 得到黄色油状液体产物 (420 mg, 7.4%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 243.1 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **25b**、**25c** 的合成方法与 **25a** 类似, 产率分别为 7.6% 和 9.2%。**25b**: ESI-MS ( $m/z$ ): 243.1 [M+H]<sup>+</sup>; **25c**: ESI-MS ( $m/z$ ): 257.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.19 5-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-1H-吡唑-3-胺 (26a)** 将上一步未经纯化的化合物 **22** 溶于 10 mL

甲醇, 加催化量的 Pd/C, 在氢气球存在下室温反应过夜。LC-MS 监测无原料剩余, 停止反应, 抽滤除去固体不溶物, 滤液减压浓缩得到产物 (1.38 g, 95.0%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 229.1 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **26b**、**26c**、**26d** 的合成与 **26a** 类似, 分别由 **25a**、**25b**、**25c** 还原得到, 产率分别为 37.8%、37.8%、42.3%。**26b**: ESI-MS ( $m/z$ ): 229.1 [M+H]<sup>+</sup>; **26c**: ESI-MS ( $m/z$ ): 229.1 [M+H]<sup>+</sup>; **26d**: ESI-MS ( $m/z$ ): 243.1 [M+H]<sup>+</sup>。**1.20 6-氯-N-(5-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酰胺 (27a)** 将化合物 **26a** (1.38 g, 6.04 mmol)、三乙胺 (1.22 g, 12 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷, 将 6-氯嘧啶-4-羧基氯 (1.18 g, 6.65 mmol) 溶于二氯甲烷 (10 mL), 冰浴下滴加到上述体系, 然后室温反应 1 h, LC-MS 检测反应完成。将反应液加到水中, 乙酸乙酯萃取, 有机相用饱和食盐水洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 柱色谱分离 ( $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}=20:1$ ) 得到黄色固体 (660 mg, 29.7%)。ESI-MS ( $m/z$ ): 369.1 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **27b**、**27c**、**27d**、**28** 的合成与 **27a** 类似, 分别由 **26b**、**26c**、**26d** 与 6-氯嘧啶-4-羧基氯经过亲核取代反应得到, **27b**、**27c**、**27d** 产率分别为 29.7%、30.7%、26.5%。化合物 **28** 产率为 31.6%。**27b**: ESI-MS ( $m/z$ ): 369.1 [M+H]<sup>+</sup>; **27c**: ESI-MS ( $m/z$ ): 369.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.73 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.15 (s, 3H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 2.89 (s, 2H), 2.75 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H)。**27d**: ESI-MS ( $m/z$ ): 383.1 [M+H]<sup>+</sup>; **28**: ESI-MS ( $m/z$ ): 383.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.21 6-((1-乙酰基嘧啶-4-基)氨基)-N-(5-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-1H-吡唑-3-基)嘧啶-4-羧酰胺 (B6)** 将化合物 **27a** (300 mg, 0.813 mmol)、1-乙酰基-4-氨基嘧啶 (0.416 g, 1.63 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺 (0.54 mL) 溶于异丙醇 (10 mL), 100 °C 搅拌过夜, LC-MS 检测反应完成, 冷却至室温。浓缩反应液后经 HPLC 制备色谱 (乙腈/水, 0.1% 甲酸) 得到白色固体 (110 mg, 28.5%)。mp: 77~78 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 475.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC: 97.73%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.53 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.10 (s, 3H), 7.03 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.23 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.79 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.19 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.82 (s, 3H), 2.69 (s, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.98~1.84 (m, 2H), 1.40 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.28 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  168.51, 162.90, 160.91, 158.31, 153.57, 146.27, 135.03, 134.41, 128.91, 126.83, 126.48, 125.97, 104.20,

96.74, 55.53, 52.74, 50.48, 47.49, 44.85, 32.10, 31.37, 29.06, 21.77。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) 475.256 4, Found 475.255 3。

化合物**B7**、**B8**、**B9**、**B10**的合成与**B6**类似,由**27b**、**27c**、**27d**、**28**分别与1-乙酰基-4-氨基哌啶经过亲核取代反应得到。**B7**:产率16.3%。mp:131~132 °C。ESI-MS ( $m/z$ ):475.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC:99.13%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.51 (s, 1H), 11.38 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.80 (s, 2H), 7.25~6.91 (m, 5H), 4.21 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.77 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.15 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.99 (s, 2H), 2.89~2.70 (m, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.94~1.78 (m, 2H), 1.34 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.23 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168.50, 162.85, 160.00, 157.51, 153.79, 134.88, 128.72, 126.80, 126.59, 125.77, 103.71, 55.93, 55.36, 50.97, 47.39, 44.85, 32.09, 31.35, 29.22, 21.72。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) 475.256 4, Found 475.255 5。

**B8**:产率1.6%。ESI-MS ( $m/z$ ):475.2 [M+H]<sup>+</sup>。mp:124~125 °C。HPLC:100%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.41 (s, 1H), 11.02 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.21 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.77 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 12.0 Hz, 4H), 3.22~3.12 (m, 1H), 2.88 (s, 2H), 2.83~2.74 (m, 1H), 2.69 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.95~1.78 (m, 2H), 1.36 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.23 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168.48, 162.88, 161.18, 157.82, 154.04, 135.30, 134.86, 128.77, 126.78, 126.34, 125.79, 107.45, 104.19, 55.83, 52.06, 50.56, 47.39, 44.84, 32.11, 31.37, 29.23, 21.76。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) 475.256 4, Found 475.255 9。

**B9**:产率19.6%。mp:55~56 °C。ESI-MS ( $m/z$ ):489.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC:99.4%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.53 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 7.01 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.78 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.20 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.98 (s, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.96 (s, 1H), 1.81 (s, 1H), 1.49~1.37 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.91, 162.72, 160.77, 157.31, 145.31, 134.64, 129.36, 128.48, 126.41, 126.15, 125.52, 107.43, 70.61, 55.99, 51.99, 50.29, 47.58, 45.21, 40.44, 39.23, 32.11, 31.22, 29.16, 21.44。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) 489.272 1, Found 489.271 1。

**B10**:产率29.5%。mp:245~246 °C。ESI-MS ( $m/z$ ):489.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC:95.07%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.46 (s, 1H), 12.18 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 20.0 Hz, 5H), 4.82 (s, 2H), 4.24 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.80 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.19 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.92 (s, 2H), 2.81 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.98~1.80 (m, 2H), 1.40 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.28 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO) δ 168.50, 164.37, 162.98, 162.86, 161.39, 159.04, 158.55, 152.99, 135.44, 133.88, 128.66, 127.00, 126.91, 126.64, 119.99, 104.59, 47.56, 44.86, 32.09, 31.36, 28.95, 21.72, 14.71。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for (C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) 489.235 7, Found 489.236 9。

**1.22 (4-氨基哌啶-1-基)(环丙基)甲酮 (30-C1)** 将4-叔丁氧羰基氨基哌啶(2 g, 10 mmol)溶于四氢呋喃(20 mL)中,加入三乙胺(1.5 g, 15 mmol),室温搅拌0.5 h,将环丙酰氯(1.25 g, 12 mmol)溶于二氯甲烷中,缓慢注入上述反应体系中,室温反应1 h。LC-MS监测反应完全后,减压除去溶剂,加入二氯甲烷和饱和碳酸氢钠溶液萃取3次,减压浓缩得到白色固体2 g,然后溶于二氯甲烷(10 mL)中,加入三氟乙酸(3 mL),室温搅拌6 h。LC-MS监测反应完全后,减压除去溶剂,加入二氯甲烷减压除去多余的三氟乙酸,得到黄色油状粗品(1.05 g, 62.5%)。ESI-MS ( $m/z$ ):169.1 [M+H]<sup>+</sup>。

其余胺的合成与此方法类似。**30-C2**:产率60.5%;ESI-MS ( $m/z$ ):183.1 [M+H]<sup>+</sup>。**30-C3**:产率40.1%;ESI-MS ( $m/z$ ):247.1 [M+H]<sup>+</sup>。**30-C4**:产率73.5%;ESI-MS ( $m/z$ ):213.1 [M+H]<sup>+</sup>。**30-C5**:产率76.2%;ESI-MS ( $m/z$ ):211.1 [M+H]<sup>+</sup>。**30-C6**:产率46.7%;ESI-MS ( $m/z$ ):205.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.23 6-((1-(环丙烷羰基)哌啶-4-基)氨基)-N-(4-((3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)甲基)-1H-吡啶-3-基)嘧啶-4-羧酰胺 (C1)** 将化合物**27c**(120 mg, 0.32 mmol)溶于异丙醇(3 mL)中,加入化合物**30-C1**(109 mg, 0.65 mmol)与*N,N*-二异丙基乙胺(168 mg, 1.30 mmol),100 °C回流过夜,LC-MS监测原料基本消失。减压浓缩,经HPLC制备(乙腈/水,0.1%甲酸)分离得到白色固体产物(19 mg, 11.9%)。mp:112~113 °C。ESI-MS ( $m/z$ ):501.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC:100%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.45 (s, 1H), 10.83 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.20~6.85 (m, 5H), 4.16 (d, *J* = 32.0 Hz, 3H), 3.60 (d, *J* = 32.0 Hz, 4H), 2.86 (s, 4H), 2.68 (s, 2H), 2.06~1.78 (m, 3H), 1.30 (d, *J* = 48.0 Hz, 2H), 0.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ

171.34, 162.82, 161.08, 157.83, 135.29, 134.85, 128.78, 126.78, 126.35, 125.80, 104.15, 55.83, 52.04, 50.56, 47.51, 44.03, 32.42, 31.40, 29.22, 10.71, 7.36。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $C_{27}H_{33}N_8O_2$ ) 501.272 1, Found 501.271 5。

化合物 **C2**~**C6** 的合成方法与 **C1** 类似。**C2**: 产率 24.5%。mp: 122~123 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 515.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC: 99.64%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.45 (s, 1H), 10.84 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.10 (s, 4H), 7.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.21 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.61 (dd,  $J = 36.0, 12.0$  Hz, 6H), 3.07 (t,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.82 (dd,  $J = 28.0, 16.0$  Hz, 3H), 2.69 (s, 2H), 2.22~2.02 (m, 4H), 1.95~1.82 (m, 3H), 1.80~1.66 (m, 1H), 1.24 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  172.28, 162.82, 161.12, 157.82, 135.26, 134.83, 128.77, 126.78, 126.35, 125.80, 104.15, 55.81, 52.04, 50.55, 47.47, 43.46, 36.75, 32.27, 31.45, 29.20, 25.11, 25.05, 17.85。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd for ( $C_{28}H_{35}N_8O_2$ ) 515.287 7, Found 515.287 2。

**C3**: 产率 19.6%。mp: 144~145 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 579.3 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.50 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.10 (s, 4H), 7.02 (s, 1H), 4.24 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.95 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.58 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 3.22 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 2.85 (d,  $J = 20.0$  Hz, 4H), 2.69 (s, 2H), 2.05 (d,  $J = 20.0$  Hz, 2H), 1.98~1.80 (m, 4H), 1.72 (d,  $J = 12.0$  Hz, 2H), 1.67~1.49 (m, 2H), 1.35 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 1.25 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  172.53, 162.83, 161.08, 157.83, 135.28, 134.85, 128.77, 126.78, 126.34, 125.79, 124.27, 121.89, 104.15, 55.83, 52.06, 50.57, 47.43, 43.89, 36.80, 32.91, 32.68, 32.56, 32.44, 31.47, 29.22, 26.10, 26.04。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $C_{30}H_{37}F_2N_8O_2$ ) 579.300 2, Found 579.299 0。

**C4**: 产率 14.2%。mp: 80~81 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 545.3 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC: 98.92%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.52 (s, 1H), 10.92 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.09 (s, 4H), 7.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.24 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.94 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 3.84 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 3.58 (d,  $J = 12.0$  Hz, 4H), 3.38 (t,  $J = 12.0$  Hz, 2H), 3.20 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.79 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 2.69 (s, 2H), 1.91 (s, 2H), 1.70~1.54 (m, 2H), 1.50 (d,  $J = 12.0$  Hz, 2H), 1.30 (dd,  $J = 24.0, 12.0$  Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  172.58, 163.72, 162.85, 161.92, 157.95,

153.83, 143.15, 133.95, 133.39, 131.97, 128.81, 126.87, 126.14, 106.25, 104.38, 66.74, 54.54, 51.11, 49.89, 47.46, 43.79, 36.71, 32.56, 31.46, 29.44, 28.07。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $C_{29}H_{37}N_8O_3$ ) 545.298 3, Found 545.297 2。

**C5**: 产率 18.6%。mp: 83~84 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 543.3 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC: 98.20%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.51 (s, 1H), 11.01 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.10 (s, 4H), 7.02 (s, 1H), 4.26 (s, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.89 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.58 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 3.19 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 2.88 (s, 2H), 2.76 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.69 (s, 2H), 2.59 (s, 1H), 1.90 (d,  $J = 16.0$  Hz, 2H), 1.70 (s, 2H), 1.62 (d,  $J = 12.0$  Hz, 3H), 1.31 (s, 6H), 1.08 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  173.77, 164.13, 162.84, 161.29, 157.85, 153.88, 142.75, 134.81, 134.62, 131.26, 128.77, 126.80, 126.46, 125.87, 107.06, 104.21, 55.52, 51.82, 50.39, 47.50, 43.86, 32.60, 31.52, 29.70, 29.66, 28.94, 26.07, 25.63。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd. for ( $C_{29}H_{37}N_8O_3$ ) 543.319 0, Found 543.318 4。

**C6**: 产率 18.6%。mp: 135~136 °C。ESI-MS ( $m/z$ ): 537.2 [M+H]<sup>+</sup>。HPLC: 99.77%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.46 (s, 1H), 10.87 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.45 (s, 3H), 7.39 (s, 2H), 7.10 (d,  $J = 8.0$  Hz, 4H), 7.00 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 4.34 (s, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.58 (d,  $J = 12.0$  Hz, 5H), 3.17 (s, 1H), 3.10 (s, 1H), 2.87 (s, 2H), 2.69 (s, 2H), 1.92 (d,  $J = 32.0$  Hz, 2H), 1.39 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  169.51, 162.86, 161.10, 157.82, 136.67, 135.29, 134.85, 129.90, 128.93, 128.76, 127.12, 126.77, 126.33, 125.78, 104.18, 55.83, 52.05, 50.56, 47.38, 46.17, 32.04, 31.40, 29.22。HR-MS (ESI):  $m/z$  Calcd for ( $C_{30}H_{33}N_8O_2$ ) 537.272 1, Found 537.271 6。

## 2 分子模拟实验

采用 Maestro 10.2 处理蛋白 (PDB: 4x61), 力场 OPLS\_2005, 用 Discovery Studio 2.5 处理小分子, 使用 Glide Docking 进行对接, 采用 Pymol 2.0 作图。

## 3 生物活性评价

**3.1 化合物体外蛋白精氨酸甲基转移酶5 (PRMT5) 抑制实验<sup>[10]</sup>** 将制备的化合物和对照化合物 GSK3326595 用二甲基亚砜配制成 10 mmol·L<sup>-1</sup> 溶液。依次 3 倍稀释至 10.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>、3.33  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>、1.11  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>、370.4 nmol·L<sup>-1</sup>、123.5 nmol·L<sup>-1</sup>、41.2 nmol·L<sup>-1</sup>、13.7 nmol·L<sup>-1</sup>、4.6 nmol·L<sup>-1</sup>、1.5 nmol·L<sup>-1</sup>、0.5 nmol·L<sup>-1</sup>。实验组: 将 15  $\mu$ L 的酶溶液移至 384 孔板, 室温孵育 15 min; 对照组: 将 15  $\mu$ L 1x 反

应缓冲液移至384孔板,室温孵育15 min。向每个孔中添加5  $\mu\text{L}$ 底物溶液和5  $\mu\text{L}$  [ $^3\text{H}$ ]-SAM溶液开始反应,室温下孵育60 min。每孔添加5  $\mu\text{L}$ 终止溶液终止反应;将384孔板每孔转移25  $\mu\text{L}$ 溶液至Flashplate,室温至少孵育1 h,用 $\text{dH}_2\text{O}$  + 0.1% Tween-20洗涤Flashplate 3次,在Microbeta上读取数值,计算 $\text{IC}_{50}$ 。

**3.2 化合物体外 Z-138 细胞活性抑制实验<sup>[17]</sup>** 将化合物用二甲基亚砜配制成10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,依次稀释至33.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6.66  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1.33  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、267  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、53.3  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10.7  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2.13  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.43  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用胰蛋白酶消化并确定细胞密度,以每毫升2 000、4 000和6 000个细胞的密度将细胞浆稀释至所需的体积,每孔加入100  $\mu\text{L}$ 细胞浆液,在37  $^{\circ}\text{C}$ 潮湿条件下孵育24 h。用二甲基亚砜准备对照和测试化合物溶液(300 $\times$ ),用1640培养基将对照和待测化合物从300 $\times$ 稀释到3 $\times$ ,将50  $\mu\text{L}$ 化合物(3 $\times$ )转移至96孔板(最终浓度:1 $\times$ ),在37  $^{\circ}\text{C}$ 潮湿条件下孵育。将测定试剂在室温下平衡30 min后,在每个孔中加入75  $\mu\text{L}$ 试剂,室温孵育,震荡2 min,室温孵育10 min,检测化学发光信号。抑制率 =  $100 - [(\text{复合信号} - \text{最小信号}) / (\text{最大信号} - \text{最小信号}) \times 100]$ 。

**3.3 体外化合物对 Caco-2 细胞透膜性研究<sup>[18]</sup>** Caco-2细胞培养:将Caco-2细胞以 $1 \times 10^5$  cells/cm $^2$ 密度接种到96孔板的聚乙烯膜上,平均4~5天更新一次培养液,直到第21至28天形成融合细胞单层,使用荧光黄测定Caco-2细胞单层的完整性。

化合物的测试:地高辛稀释到10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 一式两份双向测试;纳多洛尔和美托洛尔稀释到2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 一式两份沿A至B方向测试;所测化合物稀释到2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 一式两份双向测试,最终DMSO浓度不小于1%。将板在(37  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$ 培养箱中以5%的 $\text{CO}_2$ 浓度不摇动的情况下孵育2 h。与含有内标的乙腈溶液混合后所有样品以4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。然后将100  $\mu\text{L}$ 上清液用100  $\mu\text{L}$ 蒸馏水稀释进行LC-MS/MS分析。使用分析物/内标物的峰面积比,通过LC/MS/MS方法对起始溶液、供试溶液和接收液中测试化合物和对照化合物的浓度进行定量。

**致谢:**感谢南京圣和药业药理部生物测试平台杨婷婷等对本文化合物的生物测试所做出的贡献,感谢姜春环博士、宋开南、陈晓禹、孙洪信等对本文化合物的合成做出的贡献。

**作者贡献:**王亚洲、尤启冬负责提出研究思路、设计实验方案、修改论文;朱康乐负责实施实验、整理数据及撰写论文。

**利益冲突:**本文研究内容无任何利益冲突。

## References

- [1] Antonysamy S, Bonday Z, Campbell RM, et al. Crystal structure of the human PRMT5: MEP50 complex [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109: 17960-17965.
- [2] Lin H, Luengo JI. Nucleoside protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2019, 29: 1264-1269.
- [3] Richters A. Targeting protein arginine methyltransferase 5 in disease [J]. Future Med Chem, 2017, 9: 2081-2098.
- [4] Ji S, Ma S, Wang WJ, et al. Discovery of selective protein arginine methyltransferase 5 inhibitors and biological evaluations [J]. Chem Biol Drug Des, 2017, 89: 585-598.
- [5] Chung J, Karkhanis V, Tae S, et al. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibition induces lymphoma cell death through reactivation of the retinoblastoma tumor suppressor pathway and polycomb repressor complex 2 (PRC2) silencing [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 35534-35547.
- [6] Wang L, Pal S, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28: 6262-6277.
- [7] Wei TY, Juan CC, Hisa JY, et al. Protein arginine methyltransferase 5 is a potential oncoprotein that upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling cascade [J]. Cancer Sci, 2012, 103: 1640-1650.
- [8] Powers MA, Fay MM, Factor RE, et al. Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4 [J]. Cancer Res, 2011, 71: 5579-5587.
- [9] Cho EC, Zheng S, Munro S, et al. Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1 [J]. EMBO J, 2012, 31: 1785-1797.
- [10] Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, et al. A selective inhibitor of PRMT5 with *in vivo* and *in vitro* potency in MCL models [J]. Nat Chem Biol, 2015, 11: 432-437.
- [11] Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, et al. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24: 9630-9645.
- [12] Sun L, Wang M, Lv Z, et al. Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108: 20538-20543.
- [13] Xiao W, Chen X, Liu L, et al. Role of protein arginine methyltransferase 5 in human cancers [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114: 108790.
- [14] Wang Y, Hu W, Yuan Y. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) as an anticancer target and its inhibitor discovery [J]. J Med Chem, 2018, 61: 9429-9441.
- [15] Wu TF, Brehmer D, Beke L, et al. Preparation of 6-6 bicyclic

- aromatic ring substituted nucleoside analogs for use as PRMT5 inhibitors, WO2017032840A1 [P]. 2017.
- [16] Gerhart SV, Kellner WA, Thompson C, et al. Activation of the p53-MDM4 regulatory axis defines the anti-tumour response to PRMT5 inhibition through its role in regulating cellular splicing [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 9711.
- [17] Yan Z, Xue NN, Ji M, et al. Effects of different stimulants on human lymphocyte activation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1863-1867.
- [18] Fan HR, Ci XY, Li W, et al. Study on the mechanism of *in vitro* transport of anti-hepatitis B candidate new drug fenfentine [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1233-1239.