

# 4,6-二芳基-2-氨基嘧啶类衍生物的合成与生物活性

江银枝\* 周俊 梁大伟 蒋玲波 刘正江

(浙江理工大学化学系 杭州 310018)

**摘要** 合成并表征了5种4,6-二芳基-2-氨基嘧啶类化合物。测试了它们对大肠杆菌甲硫酰胺肽酶(EcMetAP)的抑制作用及对CXCR4受体的拮抗作用。发现5种化合物均对EcMetAP酶活有抑制作用,除化合物2外均对CXCR4受体有拮抗作用。利用FieldTemplater和FieldAlign软件对化合物1~5的上述活性构效关系进行了分析,初步认为化合物的嘧啶环3位N原子及4位取代苯环上若引入给电子基团,可增强这类化合物的EcMetAP酶抑制活性;在嘧啶环2位引入负电性较强的基团取代,改造2个苯环和嘧啶环的4,5,6位C原子的结构可增强其CXCR4受体拮抗活性。

**关键词** 嘧啶,合成,大肠杆菌甲硫酰胺肽酶,CXCR4,构效关系

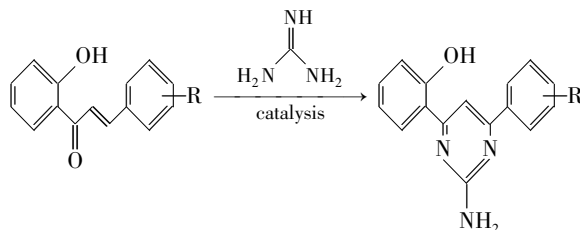
中图分类号:O626.4

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2011)02-0209-05

DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00248

嘧啶类衍生物是一类具有抗疟<sup>[1]</sup>、抗菌<sup>[2,4]</sup>、治疗关节炎<sup>[5]</sup>、杀虫、除草及植物生长调节<sup>[6]</sup>活性的化合物,还可以用作染料<sup>[7]</sup>等。2005年,Agarwal等<sup>[1,8]</sup>报道了一系列1,4-二取代-2-取代氨基嘧啶化合物合成与抗疟活性。关于嘧啶类衍生物的合成已有很多报道,均是通过 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基化物与胍的反应来合成。本文以查尔酮为原料,与胍环合得嘧啶类衍生物(Scheme 1)。对其进行了表征,考察了化合物1~5的生物活性及构效关系。



R: 1. H; 2. 4'-OH; 3. 4'-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 4. 4'-OCH<sub>3</sub>; 5. 3',4'-OCH<sub>2</sub>O<sup>-</sup>

Scheme 1 Synthesis routes of the compound 1~5

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

邻羟基苯乙酮(Aladdin);苯甲醛(国药集团化学试剂有限公司);邻羟基苯甲醛(国药集团化学试剂有限公司);对羟基苯甲醛(国药集团化学试剂有限公司);胡椒醛(阿拉丁试剂);水杨醛(Fisher Scientific(HongKong) Ltd.),盐酸胍(国药集团化学试剂有限公司),以上试剂均为分析纯;中间体查尔酮类衍生物参照文献<sup>[9-10]</sup>自行合成。

Avatar 370型FT-IT(Nicolet)红外光谱仪,KBr压片;Bruker 400型UltraShield™(400 MHz)核磁共振仪,TMS内标;Saturn 2200型Mass质谱仪;XT-1型显微熔点测定仪,温度未校正。

### 1.2 化合物1~5的合成

向100 mL圆底烧瓶中依次加入10 mmol查尔酮类化合物、10 mmol盐酸胍和15 mL乙醇,室温搅拌后,加热回流,缓慢滴加3 mL质量分数为50%氢氧化钾溶液,大约2 h滴加完毕。继续回流9 h,将反应

混合物倒入 100 mL 冰水中,搅拌下滴加质量分数为 10% HCl 中和至 pH 值在 6.0 ~ 7.0 之间。静置,待析出大量沉淀,抽滤,甲醇重结晶,得嘧啶类衍生物 **1** ~ **5**。

### 1.3 对大肠杆菌甲硫酰胺肽酶的抑制活性实验

大肠杆菌甲硫酰胺肽酶(EcMetAP)可以水解底物 Met-S-C-Phe 的硫脂键,产生 Met-SH,后者可快速与过量的 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)反应,生成在 412 nm 处有吸收的 3-羟基-4-硝基硫代苯酚盐,通过测定 412 nm 处的吸光度的降低来确定酶抑制剂对酶的抑制活性。

### 1.4 对趋化因子 CXCR4 受体的拮抗活性实验

通过建立共转 CXCR4 与 Ga16 的细胞系,使得受体被激活后能引起 Ga16 蛋白的活化,进而激活磷脂酶 C(PLC)产生 IP3 和 DAG。IP3 可与细胞内内质网和线粒体上的 IP3 受体结合而引起细胞内钙的释放。因此,可通过测定细胞内钙的变化来检测 CXCR4 的活化状态。Fluo-4/AM 是一种钙荧光探针指示剂,用来测量钙离子,作为非极性脂溶性的化合物,进入细胞后,在细胞脂解酶的作用下,AM 基团解离,释出 Fluo-4;由于 Fluo-4 是极性分子,不易通过脂质双分子膜,它可以使 Fluo-4 长时间保留在细胞内。最终可以通过测量被激发的荧光强度来反映 Gα 蛋白被激活的水平。如果筛选的化合物能够使 CXCR4 受体激动引起的钙流反应大大降低,从而筛选获得该受体的新型拮抗剂。

### 1.5 生物活性构效关系的计算处理

使用生物分子结构分析软件 FieldTemplater 以已知生物活性较好的化合物为模板,分析较好活性的分子空间构型,然后使用生物分子结构分析软件 FieldAlign 计算目标化合物与它的空间区域相似度,从而判定其构效关系。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物的性状及结构表征

4-(2-羟基苯基)-6-苯基-2-氨基嘧啶(**1**),黄色针状晶体,产率 40%,熔点 170 ~ 172 °C(文献值<sup>[10]</sup>: 171 ~ 173 °C); IR(KBr),  $\sigma/\text{cm}^{-1}$ : 3509, 3353(NH<sub>2</sub>), 3200(—OH), 1625(C=N), 1567(C=C); <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.27(2H, s, —NH<sub>2</sub>), 7.57(1H, s, pyrimidine-C<sub>5</sub>—H), 6.93 ~ 8.07(9H, m, Ar—H), 13.69(1H, s, —OH); CI-MS(CH<sub>3</sub>OH)  $m/z$ : 264(M + 1, 100.00%)。

4-(2-羟基苯基)-6-(4'-羟基苯基)-2-氨基嘧啶(**2**),黄色固体,产率 26%,熔点 > 280 °C; IR(KBr),  $\sigma/\text{cm}^{-1}$ : 3478, 3338(NH<sub>2</sub>), 3210(—OH), 1633(C=N), 1575(C=C); <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 7.12(2H, s, —NH<sub>2</sub>), 7.72(1H, s, pyrimidine-C<sub>5</sub>—H), 6.85 ~ 8.27(9H, m, Ar—H), 10.02(1H, s, 6-phenyl—OH), 14.15(1H, s, 4-phenyl—OH); CI-MS(CH<sub>3</sub>OH)  $m/z$ : 280(M + 1, 100.00%)。

4-(2-羟基苯基)-6-(4'-二甲氨基苯基)-2-氨基嘧啶(**3**),黄色固体,产率 45%,熔点 197 ~ 199 °C(文献值<sup>[11]</sup>: 196 ~ 198 °C); IR(KBr),  $\sigma/\text{cm}^{-1}$ : 3459, 3334(NH<sub>2</sub>), 3200(—OH), 1606(C=N), 1567(C=C); <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.08(2H, s, —NH<sub>2</sub>), 7.50(1H, s, pyrimidine-C<sub>5</sub>—H), 6.76-8.02(9H, m, Ar—H), 13.92(1H, s, —OH); CI-MS(CH<sub>3</sub>OH)  $m/z$ : 307(M + 1, 100.00%)。

4-(2-羟基苯基)-6-(4'-甲氧基苯基)-2-氨基嘧啶(**4**),黄色固体,产率 38%,熔点 206 ~ 207 °C(文献值<sup>[12]</sup>: 206 ~ 208 °C); IR(KBr),  $\sigma/\text{cm}^{-1}$ : 3494, 3322(NH<sub>2</sub>), 3200(—OH), 1602(C=N), 1579(C=C), 1248, 1026(—OCH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 3.89(3H, s, —OCH<sub>3</sub>), 5.24(2H, s, —NH<sub>2</sub>), 7.52(1H, s, pyrimidine-C<sub>5</sub>—H), 6.92 ~ 8.07(9H, m, Ar—H), 13.68(1H, s, —OH); CI-MS(CH<sub>3</sub>OH)  $m/z$ : 294(M + 1, 100.00%)。

4-(2-羟基苯基)-6-芳杂环-2-氨基嘧啶(**5**),黄色固体,产率 50%,熔点 250 ~ 251 °C; IR(KBr),  $\sigma/\text{cm}^{-1}$ : 3300(—OH), 1703(C=O), 1575(C=C), 1610, 1565, 1500, 1455(Ph-ring), 1056(C—O); <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.36(2H, s, —OCH<sub>2</sub>O—), 6.93 ~ 7.87(9H, m, Ar—H, —C=CH), 13.61(1H, s, —OH); CI-MS(CH<sub>3</sub>OH)  $m/z$ : 308(M + 1, 100.00%)。

### 2.2 化合物 **1** ~ **5** 对 EcMetAP 的抑制活性及对 CXCR4 受体的拮抗活性

对化合物 **1** ~ **5** 进行了 EcMetAP 的抑制活性和 CXCR4 受体拮抗活性测试,实验结果见表 1。

表1 化合物1~5对EcMetAP的抑制活性及对CXCR4受体的拮抗活性

Table 1 EcMetAP inhibit-activities and the CXCR4 receptor antagonists activities of the five compounds

Compound	EcMetAP inhibit-activities/%	CXCR4 receptor antagonists activities/%
1	33.94	20.01
2	26.94	0.00
3	13.77	8.91
4	34.41	7.52
5	43.07	3.98

$\rho(\text{EcMetAP1}) = 20 \text{ mg/L}$ ,  $\rho(\text{CXCR4}) = 10 \text{ mg/L}$ , solvent: DMSO.

表1数据说明,化合物1~5对EcMetAP均有一定程度的抑制作用,其中化合物5的抑制活性最强,化合物3的抑制活性最弱,且化合物1、4、5的抑制活性超过30%。

表1数据也说明,化合物1、3、4、5对CXCR4受体具有一定的拮抗作用,其中化合物1的拮抗作用超过20%,而化合物2无拮抗作用。说明化合物1具有作为抗癌、抗菌、抗病毒药物先导物的潜在价值。

### 2.3 化合物1~5生物活性的构效关系处理

假设2个分子与靶体之间的作用力场区域构型是相似的,那么它们作用于靶体的同一位点,从而具有相似的药物活性。基于这种假设,在无需蛋白质结构条件下,研究不同分子与靶体之间的作用力场区域相似性对于新药开发有重要意义。这种方法成功运用于胆囊收缩素2拮抗剂<sup>[13]</sup>的结合形式的研究。将图1给出的3个化合物<sup>[14]</sup>的二维结构图输入软件FieldTemplater,计算其具有EcMetAP抑制活性的最优空间力场(与靶体作用的电荷区、氢键区、 $\pi$ 电子堆积区)(图2)。以此空间力场为模板输入FieldAlign软件,将化合物1~5的空间力场与之进行比较(看它们与靶体作用的电荷区、氢键区、 $\pi$ 电子堆积区是否重叠)(图3);将图4给出的3种化合物的二维结构<sup>[15]</sup>输入软件FieldTemplater,计算其具有CXCR4受体拮抗活性的最优空间力场(图5),以此空间力场为模板导入FieldAlign软件,比较化合物1~5的空间力场(图6)。

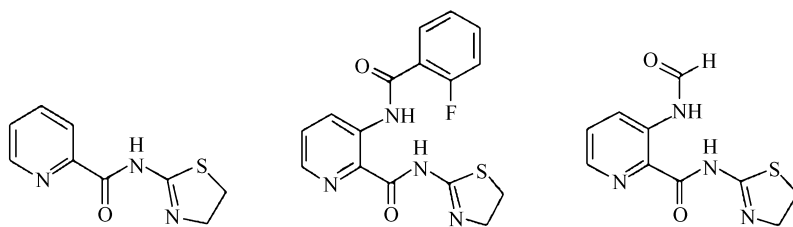


图1 EcMetAP抑制剂结构图

Fig. 1 Compounds used as EcMetAP inhibitor

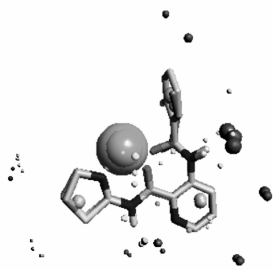


图2 EcMetAP抑制剂的空间结构模板

Fig. 2. Template for EcMetAP inhibitor

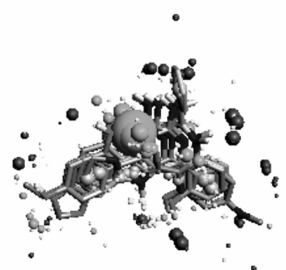


图3 化合物1~5的空间结构与已知抑制剂的空间结构模板的叠加图

Fig. 3 Field overlay of the compounds 1~5 with the template for EcMetAP inhibitor

从图2和图3可见,化合物1~5的空间作用构型分布与已知活性较好化合物的空间作用构型具有

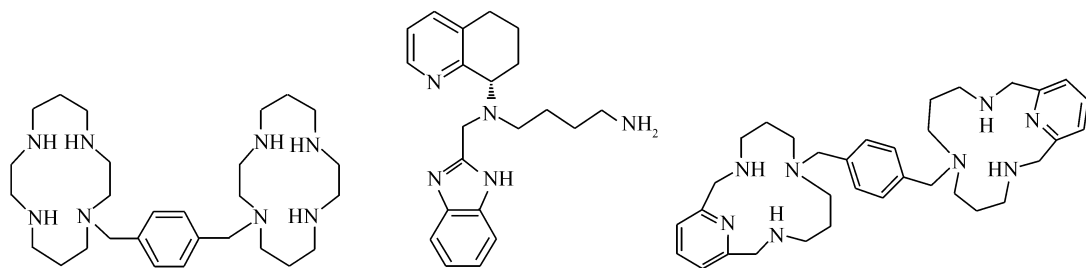


图4 CXCR4受体拮抗剂结构图

Fig. 4 Compounds used as CXCR4 receptor antagonist

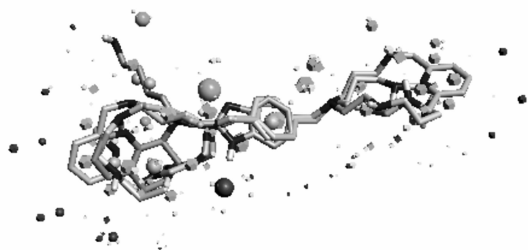


图5 CXCR4受体拮抗剂的空间结构模板

Fig. 5 Template for CXCR4 receptor antagonist

blue is negative ionic fields, red is positive ionic fields, yellow is hydrophobic fields, orange is  $\pi(\text{Ar})\text{-H}$  bond or  $\pi(\text{Ar})\text{-}\pi(\text{Ar})$  stack

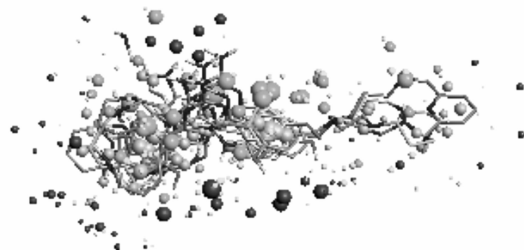


图6 化合物1~5的空间结构与已知拮抗剂的空间结构模板的叠加图

Fig. 6 Field overlay of the compounds 1~5 with the template for CXCR4 receptor antagonist

blue is negative ionic fields, red is positive ionic fields, yellow is hydrophobic fields, orange is  $\pi(\text{Ar})\text{-H}$  bond or  $\pi(\text{Ar})\text{-}\pi(\text{Ar})$  stack

一定程度的相似性,5个化合物与之的相似度分别为0.649、0.632、0.599、0.614和0.604。发现在嘧啶环3位N原子与4位取代苯环上引入给电子基团可增强这类化合物的EcMetAP抑制活性。

从图5和图6可见,化合物1~5的空间作用构型分布与已知活性较好化合物的空间作用构型分布具有一定的相似性,5种化合物与之的相似度分别为0.491、0.477、0.524、0.484和0.500。发现在嘧啶环2位引入负电性较强的基团取代可增强这类化合物的CXCR4受体拮抗活性。

### 3 结论

合成表征了5种4,6-二芳基-2-氨基嘧啶类化合物。测试了它们对EcMetAP酶的抑制作用及对CXCR4受体的拮抗作用。发现5个化合物均对EcMetAP酶活有抑制作用,除化合物2均对CXCR4受体有拮抗作用。利用FieldTemplater和FieldAlign软件对化合物1~5的上述活性构效关系进行了分析,初步认为化合物的嘧啶环3位N原子及4位取代苯环上若引入给电子基团,可增强这类化合物的EcMetAP酶抑制活性;在嘧啶环2位引入负电性较强的基团取代,改造2个苯环和嘧啶环的4、5、6位C原子的结构可增强其CXCR4受体拮抗活性。

感谢Cresset公司免费提供的生物分子结构分析软件FieldTemplater与FieldAlign;感谢上海国家药物筛选中心免费进行的活性筛选。

### 参 考 文 献

- [1] Agarwal A, Srivastava K, Purib S K, *et al.* Antimalarial Activity and Synthesis of New Trisubstituted Pyrimidines[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15**(12):3130-3132.
- [2] Boehm J C, Adams J L. New Inhibitors of p38 Kinase[J]. *Expert Opin Ther Patents*, 2000, **10**(1):25-37.

- [3] Pargellis C A, Tong L, Churchill L, *et al.* Inhibition of p38 MAP Kinase by Utilizing a Novel Allosteric Binding Site[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, **9**(4):268-272.
- [4] Lee M R, Dominguez C. MAP Kinase p38 Inhibitors: Clinical Results and an Intimate Look at Their Interactions with p38 Protein[J]. *Curr Med Chem*, 2005, **12**(25):2979-2994.
- [5] Bolo's J. Structure - Activity Relationships of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors[J]. *Mini-Rev Med Chem* [J], 2005, **5**(9):857-868.
- [6] Rich S, Reinhard H, Hilmar M. Hilmar M. Phenykpyrazolcarboxylic Acid Derivative Preparation. Ger Offen DE 3633840 [P], 19886-10-04.
- [7] Peter B, Guenter S, Paul G. Transparent Greenish Yellow Pyrazolone Pigment. WO 2002048266 [P], 2002-10-24.
- [8] Agarwal A, Srivastava K, Purib S K, *et al.* Synthesis of 2,4,6-Trisubstituted Pyrimidines as Antimalarial Agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, **13**(15):4645-4650.
- [9] Tran T Dao, Park H, Kim H P, *et al.* Inhibitory Activity of Prostaglandin E2 Production by the Synthetic 2'-Hydroxychalcone Analogues: Synthesis and SAR Study[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**(6):1650-1653.
- [10] Stirrett K L, Ferreras J A, Jayaprakash V, *et al.* Small Molecules with Structural Similarities to Siderophores as Novel Antimicrobials Against Mycobacterium Tuberculosis and Yersinia Pestis[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(8):2662-2668.
- [11] Jhala Y S, Gahlot U S, Dulawat S S, *et al.* A Facile One Pot Microwave - assisted Solid Phase Synthesis of 2-Amino-4,6-diaryl-pyrimidines and Their Antibacterial Activity[J]. *Heterocycl Commun*, 2006, **12**(3/4):253-258.
- [12] Ramajayam R, Giridhar R, Yadav M R, *et al.* Identification of Novel Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Using Fragment-based Lead Generation[J]. *Med Chem Res*, 2006, **14**(8/9):475-487
- [13] Low C M R, Vinter J G. Rationalizing the Activities of Diverse Cholecystokinin 2 Receptor Antagonists Using Molecular Field Points[J]. *J Med Chem*, 2008, **51**(3):565-573.
- [14] LUO Qunli. The Study on the Design, Synthesis and Structure-activity Relationship of Methionine Aminopeptidase Inhibitors[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Material Medical Chinese Academic of Sciences, 2004 (in Chinese). 罗群力. 甲硫氨酰氨肽酶抑制剂设计合成及构效关系研究[D]. 上海:中国科学院上海药物研究所, 2004.
- [15] Bridger G J, Mawr B, Padmanabhan S. Antiviral Compounds. US 5817807 [P], 1995-06-06.

## Synthesis and Biological Activities of 4,6-Diaryl-2-aminopyrimidine Derivatives

JIANG Yinzi\*, ZHOU Jun, LIANG Dawei, JIANG Lingbo, LIU Zhengjiang  
(Department of Chemistry, Zhejiang Science-Technique University, Hangzhou 310018)

**Abstract** Five kinds of 4,6-diaryl-2-aminopyrimidine derivatives were synthesized and characterized by IR, MS and  $^1\text{H}$  NMR. The *Escherichia coli* methionine aminopeptidase (EcMetAP) inhibit-activities and the CXCR4 receptor antagonists activities of the five compounds were determined. The results show that all the five compounds have the EcMetAP inhibit-activities, and they also have CXCR4 receptor antagonists activities except the compound **2**. The structure-activity relationships were studied by the FieldTemplater and FieldAlign software through molecular field analysis. The results show that the pharmacophore could be 3-N atom and 4,6-bencycles used as the EcMetAP inhibitor, and the EcMetAP inhibit-activities could be increased by addition of electron-donating groups at 6-benzyl. It also shows that the pharmacophore could be 2-C atom and 4,6-bencycles used as the CXCR4 receptor antagonists. The CXCR4 receptor antagonists could be increased by addition of electron-donating substituent at 2-C.

**Keywords** pyrimidine, synthesis, EcMetAP, CXCR4, structure-activity relationship