三氮唑并噻二唑类 DOT1L 抑制剂的结构修饰及活性

徐晓明^{†,a} 郭思岐^{†,b,c} 张 静^a 陈彦韬^b 康亚青^a
 刘 娜^a 刘俊芳^a 罗 成^b 陈示洁^{*,b} 陈 华^{*,a}

(^a 河北大学化学与环境科学学院 河北省化学生物学重点实验室 河北保定 071002)

(^b 中国科学院上海药物研究所 新药研究国家重点实验室 上海 201203)

(^c 南昌大学药学院 南昌 330006)

摘要 以 DOT1L (Disruptor of telomeric silencing 1-like) 抑制剂(**8**)为母体结构, 对其核心骨架三氮唑并噻二唑两端的取代基进行结构修饰, 设计合成了两个系列的三氮唑并噻二唑类结构衍生物, 并测试了化合物在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时的 DOT1L 酶抑制活性。结果表明, 所测化合物均表现出一定的酶抑制活性, 其中 *N,N*-二甲基-4-(6-甲基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-3-基)苯胺(**14b**)和(*R*)-1-((3-(4-(二甲基氨基)苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基叔丁基)甲基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯(**16a**)具有显著的 DOT1L 抑制活性, IC_{50} 值分别为 7.37 和 7.84 $\mu\text{mol/L}$, 与阳性对照化合物 **8** 的酶抑制活性相当。构效分析表明, 当苯基连三氮唑并噻二唑部分占据 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸(SAM)结合位点时, R^1 为 4-*N,N*-二甲基、分子尾部 R^2 基团为疏水基团, 适宜于分子与酶的结合, 且其体积对活性影响较小。

关键词 DOT1L 抑制剂; 三氮唑并噻二唑; 结构改造; 疏水基团; 构效关系

Structural Modifications of the Triazolo-thiadiazole Derivatives as DOT1L Inhibitors and Their Activities

Xu, Xiaoming^{†,a} Guo, Siqi^{†,b,c} Zhang, Jing^a Chen, Yantao^b Kang, Yaqing^a
 Liu, Na^a Liu, Junfang^a Luo, Cheng^b Chen, Shijie^{*,b} Chen, Hua^{*,a}

(^a Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002)

(^b State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203)

(^c School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract A series of novel derivatives containing triazolo-thiadiazole moiety have been synthesized by structural modifications on a lead disruptor of telomeric silencing 1-like (DOT1L) inhibitor **8**. All the compounds have been evaluated for their DOT1L inhibitory activities at the concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$. The results showed that the tested compounds showed certain DOT1L inhibitory activities. Among them, *N,N*-dimethyl-4-(6-methyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-3-yl)aniline (**14b**) and (*R*)-*tert*-butyl 1-((3-(4-(dimethylamino)phenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-6-yl)methyl)-piperidin-3-yl)carbamate (**16a**) were the best ones with IC_{50} values of 7.37 and 7.84 $\mu\text{mol/L}$, respectively, near that of the positive control **8**. The structure-activity analysis showed that when the triazolo-thiadiazole moiety occupied the binding-site of *S*-adenosylmethionine (SAM) in DOT1L and R^1 group was 4-*N,N*-dimethyl, the hydrophobic substituents as the tailed R^2 groups would be accommodated into the DOT1L binding site, and the sizes of the substituents seemed no effects on their DOT1L inhibitory activities of the compounds.

Keywords DOT1L inhibitor; triazolo-thiadiazole; structural modification; hydrophobic substituent; structure-activity analysis

* Corresponding authors. E-mail: shijiechen@sim.ac.cn; hua-todd@163.com

Received November 7, 2019; revised December 25, 2019; published online January 15, 2020.

Project supported by the Natural Science Interdisciplinary Research Program of Hebei University (No. DXK201903).

河北大学自然科学基金交叉研究计划(No. DXK201903)资助项目.

[†] 共同第一作者 (These authors contributed equally to this work).

DOT1L (Disruptor of telomeric silencing 1-like)是一类组蛋白赖氨酸甲基转移酶(HKMTs)^[1]. 它以 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 特异性将甲基转移至位于核小体中的组蛋白 H3 赖氨酸 79 (H3K79)上, 使其单、双和三甲基化, 并生成相应的酶促反应产物 *S*-腺苷-*L*-高半光氨酸(SAH) (图 1)^[2]. DOT1L 的活性异常, 可以导致致癌因子 HOXA9 与 MEIS1 的高表达, 诱发混合谱系白血病(Mixed Lineage Leukemia, MLL), 被认为是导致 MLL 白血病发生的催化驱动因子^[3,4]. 因此, 通过靶向 DOT1L, 抑制其催化域或干扰它与融合蛋白的结合, 有望实现混合谱系白血病 MLL 的治疗^[5~7].

现有的 DOT1L 抑制剂按其结构可分为两大类, 一类是核苷类 DOT1L 抑制剂^[8~15], 如化合物 **1~4**(图 1), 其结构是基于 SAM 和 SAH 结构设计的; 另一类则是非核苷类 DOT1L 抑制剂^[16~24], 如化合物 **5~8**(图 1), 多通过高通量筛选获得, 化合物 **6** 是目前报道活性最好的 DOT1L 抑制剂, 其 K_i (DOT1L SPA)为 0.002 nmol/L^[19]. 化合物 **8**^[23]是中国科学院上海药物研究所最近报道的三氮唑并噻二唑类 DOT1L 抑制剂. 分子模拟结果表明, 化合物 **8** 中的三氮唑并噻二唑部分可以有效占据 SAM

的结合位点, 且咪唑环与酶活性中心的酪氨酸残基 Y136 有 Pi-Pi (π - π)作用, 从而表现出良好的 DOT1L 抑制活性. 此外, 构效分系表明, 当苯环上含吸电子取代基时, 该类化合物酶抑制活性降低^[23]. 基于以上前期研究信息, 为进一步完善构效、寻找发现高效的 DOT1L 抑制剂, 对三氮唑并噻二唑类结构进行优化修饰(图 2), 设计合成了系列新衍生物, 并测试了化合物的 DOT1L 酶抑制活性.

1 结果与讨论

1.1 三氮唑并噻二唑类结构衍生物 12、14、16 和 17 的合成

设计了两类三氮唑并噻二唑类衍生物, 其结构模型如图 2 所示. 其中 Model A 结构与化合物 **8** 相似, 重点探讨不同的芳环及取代基对化合物抑酶活性的影响; Model B 类结构保留了占据 SAM 结合位点的苯基连三氮唑并噻二唑部分, 用于探讨尾部 R^2 基团为其它疏水基团时对化合物活性的影响. 化合物的合成按常规方法进行, 简述如下: 以含不同取代的苯甲酸 **9** 为起始原料,

图 1 SAM、SAH 以及 DOT1L 抑制剂结构

Figure 1 Structures of SAM, SAH, and known DOT1L inhibitors

图2 三氮唑并噻类结构修饰

Figure 2 Structural modification of the triazolothiadiazole derivatives

经酯化、腈解、二硫化碳(CS₂)成盐及水合肼关环四步反应, 得到化合物 4-氨基-5-巯基-1,2,4-三唑衍生物 **10**^[25]. 在三氯氧磷条件下, 化合物 **10** 与芳基丙烯酸 **11** 脱水环合, 得到结构如 Model A (图2)所示的目标化合物 **12a~12l** (Scheme 1).

图式1 化合物 **12a~12l** 的合成Scheme 1 Synthesis of compounds **12a~12l**

相同条件下, 化合物 **10** 与脂肪脂肪酸 **13** 缩合得到结构如 Model B (图2)所示的目标化合物 **14a~14o** (Scheme 2). 进一步, 分别以含苄氯结构的化合物 **14a**、**14f** 和 **14k** 为原料, 与叔丁氧羰基(Boc)保护的 3-氨基哌啶(**15**)发生取代反应, 得到化合物 **16a~16c**, 酸性条件下, 脱除 Boc 基团化合物 **17a~17c** (Scheme 3).

图式2 化合物 **14a~14o** 的合成Scheme 2 Synthesis of compounds **14a~14o**1.2 化合物 **12**、**14**、**16** 和 **17** 的 DOT1L 抑制活性

对所合成的化合物 **12a~12l**、**14a~14o**、**16a~16c** 和 **17a~17c** 进行了 DOT1L 酶抑制活性测试^[24], 化合物 **8** 为阳性对照. 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时抑制率 75%以上的化合物, 进一步测试了其 IC₅₀ 值, 结果见表 1~3. 由表 1 可知, 结构如 Model A 所示化合物 **12a~12l** 中, R^1 为间甲氧基的化合物 **12g~12i** 普遍表现为中等的酶抑制活性, 在测试浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 DOT1L 的抑制率在 70% 以上. 抑制活性最好的是 R^1 为 2-甲基、芳基为苯基的化合物 **12j**, 其半数抑制浓度(IC₅₀)值为 12.88 $\mu\text{mol/L}$, 但

图式3 化合物 **16a~16c** 和 **17a~17c** 的合成Scheme 3 Synthesis of compounds **16a~16c** and **17a~17c**

表1 化合物 **12a~12l** 的 DOT1L 抑制活性^a
 Table 1 DOT1L inhibitory activities of compounds **12a~12l**

Compd.	R^1	Aryl	Inhibition rate/%	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Compd.	R^1	Aryl	Inhibition rate/%	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
12a	H	Ph	19.03	—	12g	$m\text{-OCH}_3$	Ph	74.31	—
12b	H	2-Thienyl	3.46	—	12h	$m\text{-OCH}_3$	2-Thienyl	79.34	32.25
12c	H	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	58.18	—	12i	$m\text{-OCH}_3$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	77.06	>50
12d	$p\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	Ph	10.71	—	12j	$o\text{-CH}_3$	Ph	100.48	12.88
12e	$p\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	2-Thienyl	22.91	—	12k	$o\text{-CH}_3$	2-Thienyl	49.03	—
12f	$p\text{-N}(\text{CH}_3)_2$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	29.64	—	12l	$o\text{-CH}_3$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	12.07	—
8	H	Furyl	86.71	7.25					

^a The tested concentration is 50 $\mu\text{mol/L}$, "—": Not determined.

仍低于阳性对照化合物 **8** 的酶抑制活性($IC_{50} = 7.25 \mu\text{mol/L}$). 其它化合物 **12a~12f**、**12k** 和 **12l** 的抑酶活性较弱.

表 2 是结构如 Model B 所示化合物 **14a~14o** 的活性测试结果. 其中, DOT1L 抑制活性最高的两个化合物均是 R^1 为 4-*N,N*-二甲基、 R^2 分别为甲基和正丁基的化合物 **14b** 和 **14e**, IC_{50} 值分别为 7.37 和 11.74 $\mu\text{mol/L}$, 且 **14b** 与阳性对照化合物 **8** 的活性相当, 表现出显著的 DOT1L 抑制活性. R^1 为 3-甲氧基、 R^2 为氯原子的化合物 **14f**, 50 $\mu\text{mol/L}$ 时对 DOT1L 的抑制率为 85%、 IC_{50} 值为 32.50 $\mu\text{mol/L}$, 活性中等. 该系列其它化合物活性中等偏弱. 构效分析表明当苯基连三氮唑并噻二唑部分占据 SAM 结合位点时, 以简单的烷基(Model B)代替芳基乙烯基(Model A), 可以得到高活性的 DOT1L 抑制剂(**14b**), 即分子尾部 R^2 为疏水基团适宜于分子与酶的结合, 但受到 R^1 基团(电性及位置)的影响; 而疏水基链 R^2

的长短对活性影响不大.

表 3 是结构如 Model B 所示, R^2 为 Boc 保护的 3-氨基哌啶及其脱保护的化合物 **16a~16c** 和 **17a~17c** 的活性测试结果. 其中, DOT1L 抑制活性最高的化合物是 R^1 为 4-*N,N*-二甲基、 R^2 分别为 Boc 保护的 3-氨基哌啶的化合物 **16a** 的 IC_{50} 值为 7.84 $\mu\text{mol/L}$, 与阳性对照化合物 **8** 的活性相当, 具有显著的酶抑制活性. 其它化合物活性较弱. 初步的构效分析提示, R^1 基团相同时, R^2 疏水基团上适度引入亲水性原子, 如哌啶环上的氮原子, 对化合物的酶抑制活性影响不大, 如 **16a**、**17a** 与 **14a~14e** 比较.

1.3 化合物 **12j**、**14b**、**14e**、**16a** 和 DOT1L 的结合模式分析

为进一步阐明化合物 **12j**、**14b**、**14e**、**16a** 和 DOT1L 的可能结合模式, 测试了化合物与 DOT1L (PDB ID: 3QOW) 的分子对接^[26~28], 结果见图 3.

表 2 化合物 **14a~14o** 的 DOT1L 抑制活性^a
Table 2 DOT1L inhibitory activities of compounds **14a~14o**

Compd.	R^1	R^2	Inhibition rate/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Compd.	R^1	R^2	Inhibition rate/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
14a	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	Cl	40.25	—	14i	<i>m</i> -OCH ₃	CH ₂ CH ₃	52.67	—
14b	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	H	83.14	7.37	14j	<i>m</i> -OCH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	21.48	—
14c	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	CH ₃	67.87	—	14k	<i>o</i> -CH ₃	Cl	22.28	—
14d	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₃	53.25	—	14l	<i>o</i> -CH ₃	H	39.67	—
14e	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	79.62	11.74	14m	<i>o</i> -CH ₃	CH ₃	47.99	—
14f	<i>m</i> -OCH ₃	Cl	85.50	32.50	14n	<i>o</i> -CH ₃	CH ₂ CH ₃	59.66	—
14g	<i>m</i> -OCH ₃	H	69.47	—	14o	<i>o</i> -CH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	33.97	—
14h	<i>m</i> -OCH ₃	CH ₃	49.47	—					

^a The tested concentration is 50 $\mu\text{mol/L}$, “—”: Not determined.

表 3 化合物 **16a~16c** 和 **17a~17c** 的 DOT1L 抑制活性^a
Table 3 DOT1L inhibitory activities of compounds **16a~16c** and **17a~17c**

Compd.	R^2	R^1	Inhibition rate/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Compd.	R^2	R^1	Inhibition rate/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
16a		<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	88.90	7.84	17a		<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	53.79	—
16b		<i>m</i> -OCH ₃	18.37	—	17b		<i>m</i> -OCH ₃	4.24	—
16c		<i>o</i> -CH ₃	27.32	—	17c		<i>o</i> -CH ₃	5.04	—

^a The tested concentration is 50 $\mu\text{mol/L}$, “—”: Not determined.

图3 活性化合物可能的结合模式

Figure 3 Putative binding poses of the active compounds

(A) Compounds **12j**, **14b**, **14e** and **16a** were aligned with SAM (salmon) in the SAM binding pocket of DOT1L (3QOW), (B) **12j**, (C) **14b**, (D) **14e**, (E) **16a**

如图 3A, 化合物 **12j**、**14b**、**14e** 和 **16a** 均能较好地占据 DOT1L 的 SAM 结合口袋. 其中, **12j** 和 **14b** 的结构在口袋中的延伸方向与 SAM 的相同. 化合物 **12j** 结构中的苯/杂环与 F233、F245 以及 P133 的侧链之间, 可能存在 π - π 相互作用及疏水相互作用. 化合物 **14b** 结构中的苯/杂环能与 DOT1L 的 F223 侧链苯环形成 π - π 相互作用, 同时 **14b** 与 F223 之间能形成极性相互作用. 极性相互作用较 π - π 相互作用强, 这与实验测得的 **14b** 活性优于 **12j** 的结果一致. **14e** 和 **16a** 在口袋中的延伸方向与 SAM 的延伸方向不同, 其 R^2 基团伸入 DOT1L 的底物结合口袋. 与 **14b** 和 **12j** 类似, **14e** 和 **16a** 均可能与 F223 和 F245 等的侧链形成 π - π 相互作用. **16a** 与 V135 之间还能形成氢键相互作用. 从 **16a**、**14e** 与 DOT1L 可能的结合模式可得出 **16a** 的活性较 **14e** 的强, 这也同我们的实验结果一致. 由此可见, 我们通过对接得到的结合模式是合理的, 能够为构效关系分析提供比较直观的依据.

2 结论

设计合成了两个系列 Models A 和 B 的三氮唑并噻二唑类结构衍生物 **12a**~**12l**、**14a**~**14o**、**16a**~**16c** 和 **17a**~**17c**, 并测试了化合物的 DOT1L 酶抑制活性. 部分化合物表现出显著的 DOT1L 抑制活性, 如 Model B 系列的化合物 **14b** 和 **16a**, 其 IC_{50} 值分别为 7.37 和 7.84 $\mu\text{mol/L}$, 与阳性对照化合物 **8** 的酶抑制活性相当. Model A 系列的化合物活性最高的为 **12j**, IC_{50} 值为 12.88 $\mu\text{mol/L}$. 构效分析表明, 当苯基连三氮唑并噻二唑部分占据 SAM 结合位点时, R^1 为 4- N,N -二甲基、分子尾部 R^2 为疏水基团时, 可能更适于分子与酶的结合, 且体积

影响较小, 这为进一步的高效 DOT1L 抑制剂的设计提供思路.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点由 SGW[®] X-4 显微熔点仪(温度计未校正)测定; 核磁共振谱用 BRUKER AC-P600 (600 MHz)型核磁共振仪、Bruker advance II 400 FT-NMR 型核磁共振仪, 内标为 TMS; 质谱(ESI)用 Agilent G6300 离子阱液相质谱联用仪; 高分辨质谱(ESI)用 FTICR-MS (Ionspec 7.0T)型质谱仪测定; 层析用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂产品. 本文所用其他试剂均为分析纯, 无水试剂均按常规方法处理, 水为二次蒸馏水.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 **12a**~**12l** 和 **14a**~**14o** 的合成

化合物 **10**^[25] (3.8 g, 20 mmol)和 60 mL 三氯氧磷置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 1.2 equiv 苯丙烯酸 **11** 升温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 h. 待薄层色谱(TLC)检测反应完全, 加 50 mL 水淬灭三氯氧磷, 然后用 40%氢氧化钠溶液中和溶液至中性, 析出棕黄色固体, 减压抽滤. 滤饼用水 (10 mL $\times$ 2)洗涤, 然后柱层析分离(乙酸乙酯/二氯甲烷, $V:V=1:10$), 得到化合物 **13a**.

按相同的方法, 分别以不同的芳基丙烯酸 **11** 和脂肪酸 **13** 为原料, 得到了相应的产物 **12b**~**12l** 和 **14a**~**14o**.

苯基-6-苯乙烯基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑(**12a**): 白色固体, 产率 54.9%. m.p. 185.4~186.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (d, $J=7.2$ Hz, 2H),

7.54~7.52 (m, 2H), 7.49 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 7.45 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=6.0$ Hz, 3H), 7.30 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J=16.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.8, 153.3, 146.6, 140.9, 134.0, 130.7, 130.3, 129.2, 128.9, 127.7, 126.3, 125.7, 117.9; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{SNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 327.0680, found 327.0683.

3-苯基-6-[2-(噻吩-2-基)乙烯基]-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑(**12b**): 白色固体, 产率 61.8%. m.p. 191.0~192.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.51 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.48~7.41 (m, 3H), 7.28 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.07 (t, $J=4.8$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J=16.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.3, 153.3, 146.6, 139.2, 133.3, 130.9, 130.3, 129.1, 128.9, 126.4, 125.7, 116.6; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2\text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 333.0244, found 333.0248.

6-(4-氯苯乙烯基)-3-苯基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*]-[1,3,4]噻二唑(**12c**): 白色固体, 产率 62.3%. m.p. 230.8~231.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.54~7.48 (m, 5H), 7.41 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=16.8$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=16.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.5, 153.3, 146.7, 139.4, 136.7, 132.5, 130.4, 129.5, 128.9, 128.9, 126.4, 125.6, 118.6; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{SNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 361.0291, found 361.0286.

N,N-二甲基-4-(6-苯乙烯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*]-[1,3,4]噻二唑-3-基)苯胺(**12d**): 白色固体, 产率 64.5%. m.p. 150.4~152.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.58~7.55 (m, 3H), 7.42 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 3.07 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 163.3, 152.4, 137.7, 135.1, 129.65, 129.0, 128.4, 127.4, 111.6, 110.5, 40.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{SNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 370.1102, found 370.1107.

N,N-二甲基-4-{6-[2-(噻吩-2-基)乙烯基]-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-3-基}苯胺(**12e**): 白色固体, 产率 69.1%. m.p. 183.3~184.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.94 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J=4.8, 3.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J=9.0$ Hz), 3.06 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 164.7, 163.0, 152.4, 140.4, 130.3, 129.2, 128.4, 128.1, 127.5, 111.6, 110.9, 109.4, 40.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}_2\text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 376.0666, found 376.0662.

4-[6-(4-氯苯乙烯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-

噻二唑-3-基]-*N,N*-二甲基苯胺(**12f**): 白色固体, 产率 68.7%. m.p. 208.7~209.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.19 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=3.6$ Hz, 2H), 6.79 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 3.04 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 164.7, 151.5, 147.3, 138.8, 136.4, 132.7, 129.4, 128.8, 127.6, 118.8, 113.0, 111.7, 40.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{SNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 404.0712, found 404.0715.

3-(3-甲氧基苯基)-6-苯乙烯基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑(**12g**): 白色固体, 产率 52.5%. m.p. 187.2~188.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ : 7.91 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.52 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 7.40~7.38 (m, 4H), 7.27 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=16.8$ Hz, 3H), 6.98 (dd, $J=1.8, 7.8$ Hz, 1H), 3.85(s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 135.8, 159.9, 153.4, 146.5, 140.9, 140.0, 134.0, 130.7, 130.0, 127.7, 126.8, 118.7, 118.0, 116.6, 111.2, 55.5; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OSNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 357.0786, found 357.0791.

(3-甲氧基苯基)-6-[2-(噻吩-2-基)乙烯基]-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑(**12h**): 白色固体, 产率 56.3%. m.p. 180.2~182.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.91 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.44~7.38 (m, 3H), 7.26 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 7.05~6.95 (m, 3H), 3.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.3, 159.8, 153.3, 146.3, 139.2, 133.2, 130.9, 129.9, 129.1, 128.4, 126.7, 118.6, 116.5, 116.5, 111.2, 55.4; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}_2\text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 363.0350, found 363.0354.

(4-氯苯乙烯基)-3-(3-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑(**12i**): 淡黄色固体, 产率 56.8%. m.p. 182.0~183.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.81 (d, $J=7.8$ Hz, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.64 (dd, $J=16.2$ Hz, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.51~7.48 (m, 3H), 7.11 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.4, 159.5, 153.4, 145.2, 139.6, 134.9, 133.3, 130.3, 129.8, 129.0, 126.6, 119.0, 118.0, 115.7, 112.3, 55.3; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{OSNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) 391.0396, found 391.0395.

苯乙烯基-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑(**12j**): 浅黄色固体, 产率 53.9%. m.p. 124.2~125.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.86 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.55~7.54 (m, 2H), 7.42~7.40 (m, 4H), 7.38~7.32 (m, 3H), 7.22 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 2.59 (s, 3H); ^{13}C

NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.7, 152.8, 147.3, 140.8, 138.2, 134.0, 131.3, 130.6, 130.3, 129.5, 129.2, 127.7, 125.9, 124.8, 118.1, 21.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 341.0837, found 341.0834.

6-[2-(噻吩-2-基)乙烯基]-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]-三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑 (**12k**): 深棕色固体, 产率 44.7%. m.p. 167.8~168.3 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.84 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.43~7.34 (m, 4H), 7.29 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.09~7.07 (m, 1H), 7.01 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 2.58 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 165.1, 152.8, 147.3, 139.3, 138.2, 133.2, 131.3, 130.8, 130.3, 129.5, 129.0, 128.4, 125.9, 124.8, 116.7, 21.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{S}_2\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 347.0401, found 347.0396.

6-(4-氯苯乙烯基)-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑 (**12l**): 深棕色固体, 产率 52.5%. m.p. 193.5~194.7 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.85 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.43~7.36 (m, 5H), 7.30 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 2.59 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 156.3, 152.7, 147.3, 139.2, 138.2, 136.6, 132.5, 131.3, 310.3, 129.5, 128.8, 125.9, 124.7, 118.6, 21.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 375.0447, found 375.0442.

N,N-二甲基-4-(6-甲基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑-3-基)苯胺 (**14b**): 白色固体, 产率 67.6%. m.p. 189.8~192.5 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.13 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.75 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 3.00 (s, 6H), 2.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 163.9, 154.0, 151.5, 147.0, 127.5, 13.2, 112.0, 111.7, 40.1, 18.3; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 282.0789, found 282.0794.

(6-乙基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-3-基)-*N,N*-二甲基苯胺 (**14c**): 白色固体, 产率 68.8%. m.p. 91.2~92.3 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.10 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.71 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 2.98 (t, $J=9.0$ Hz, 2H), 2.96 (s, 6H), 1.39 (t, $J=6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 170.3, 153.6, 151.4, 146.9, 127.5, 113.1, 111.9, 111.7, 40.1, 26.1, 12.6; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 296.0946, found 296.0943.

N,N-二甲基-4-(6-丙基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑-3-基)苯胺 (**14d**): 浅黄色固体, 产率 64.2%. m.p. 134.7~136.3 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.16 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.96 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.86~1.82 (m, 2H), 1.06 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 169.0, 153.7, 151.5,

146.9, 127.5, 113.3, 111.8, 40.1, 34.3, 22.0, 13.5; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 310.1102, found 310.1105.

N,N-二甲基-4-(6-戊基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑-3-基)苯胺 (**14e**): 浅黄色固体, 产率 61.8%. m.p. 88.3~89.8 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.17 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.79 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 3.08~2.97 (m, 8H), 1.87~1.82 (m, 2H), 1.40 (br s, 4H), 0.93 (t, $J=7.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 169.2, 153.7, 151.5, 156.0, 127.6, 113.3, 111.8, 40.2, 32.4, 31.0, 28.2, 22.2, 13.8; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 338.1415, found 338.1416.

(3-甲氧基苯基)-6-甲基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑 (**14g**): 浅黄色固体, 产率 61.4%. m.p. 168.9~170.2 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.81 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.32 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.67 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 159.7, 155.1, 146.0, 129.8, 126.7, 118.5, 116.4, 111.14, 55.3, 18.3; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{OSNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 269.0473, found 269.0477.

6-乙基-3-(3-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑 (**14h**): 白色固体, 产率 62.8%. m.p. 101.8~102.3 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.30~7.26 (m, 1H), 6.88 (dd, $J=8.4$, 2.4 Hz, 1H), 3.85 (d, $J=16.8$ Hz, 3H), 2.96 (d, $J=7.2$, 7.8 Hz, 2H), 1.36 (t, $J=7.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 171.2, 159.7, 154.6, 145.9, 129.8, 126.7, 118.4, 116.3, 110.9, 55.3, 26.0, 12.4; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OSNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 283.0629, found 283.0632.

3-(3-甲氧基苯基)-6-丙基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑 (**14i**): 白色固体, 产率 62.5%. m.p. 106.8~108.1 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.93 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.42 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.02 (dd, $J=8.4$, 6.0 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.01 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 1.93~1.87 (m, 2H), 1.09 (t, $J=7.2$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 169.9, 159.9, 154.8, 146.2, 130.0, 126.9, 118.7, 116.6, 111.2, 55.5, 34.3, 22.0, 13.5; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OSNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 297.0786, found 297.0783.

3-(3-甲氧基苯基)-6-戊基-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑 (**14j**): 白色固体, 产率 61.9%. m.p. 66.1~67.0 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.93 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.42 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=2.4$, 8.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.03 (t, $J=7.8$ Hz,

2H), 1.88~1.83 (m, 2H), 1.46~1.38 (m, 4H), 0.93 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 170.2, 159.9, 154.8, 146.2, 130.0, 126.9, 118.7, 116.6, 111.2, 55.5, 32.5, 31.0, 28.2, 22.2, 13.8; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OSNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 325.1099, found 325.1097.

6-甲基-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑 (**14l**): 浅棕色固体, 产率 59.3%. m.p. 134.3~135.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.36~7.31 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.55 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 164.6, 154.5, 146.9, 138.1, 131.2, 130.2, 129.4, 125.9, 124.9, 21.0, 18.3; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 253.0524, found 253.0522.

6-乙基-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑 (**14m**): 浅棕色固体, 产率 60.8%. m.p. 116.4~117.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.78 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.29 (brs, 2H), 2.98 (d, $J=7.2$, 7.8 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.37 (t, $J=7.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 170.9, 154.1, 146.8, 138.0, 131.2, 130.1, 129.4, 125.8, 124.9, 26.1, 21.0, 12.7; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 267.0680, found 267.0678.

6-丙基-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑 (**14n**): 浅黄色固体, 产率 61.3%. m.p. 66.8~68.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.82 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.36~7.32 (m, 2H), 2.96 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 1.88~1.82 (m, 2H), 1.06 (t, $J=7.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 169.7, 154.2, 146.9, 138.1, 131.2, 130.2, 129.5, 125.9, 124.9, 34.3, 22.0, 21.1, 13.4; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 281.0837, found 281.0842.

6-戊基-3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑 (**14o**): 浅黄色油状, 产率 61.2%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.82 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.38~7.33 (m, 2H), 2.99 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.85~1.80 (m, 2H), 1.43~1.34 (m, 4H), 0.92 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 170.2, 138.0, 131.2, 130.2, 129.5, 125.8, 124.8, 32.3, 30.9, 28.1, 22.1, 21.0, 13.8; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 309.1150, found 309.1145.

3.2.2 化合物 **16a**~**16c** 和 **17a**~**17c** 的合成

于 50 mL 圆底烧瓶中, 称取 **14a** (0.3 g, 1.0 mmol) 溶于 15 mL 四氢呋喃(THF)中, 加入 DIPEA (661 μL , 4.0 equiv.) 为缚酸剂, 以及 *R*-3-(Boc 氨基)哌啶 **15** (0.2 g, 1.2 equiv.), 升温至 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 36 h. TCL 监测反应完全后,

旋蒸除去 THF. 残留物用 10 mL 乙酸乙酯溶解, 依次用 0.1 mol/L 盐酸(5 mL $\times$ 3)和水(5 mL $\times$ 3)洗. 以无水硫酸钠干燥, 浓缩得残留物经硅胶色谱柱分离(乙酸乙酯/二氯甲烷, $V:V=1:6$), 得到白色固体化合物 **16a**.

于 25 mL 圆底烧瓶中, 称取化合物 **16a** (0.5 g, 1 mmol) 溶于 4 mL 二氯甲烷, 加入 2 mL 三氟醋酸, 室温下搅拌. TCL 监测反应完全后, 旋蒸除去二氯甲烷及三氟醋酸. 经硅胶色谱柱分离(甲醇/二氯甲烷, $V:V=1:10$), 得到化合物无色油状化合物 **17a**.

按相同的方法, 分别以 **14f** 和 **14k** 和 *R*-3-(Boc 氨基)哌啶 **15** 为起始原料, 经中间体化合物 **16b**~**16c**, 脱 Boc 得到相应的产物 **16b**~**16c**.

(*R*)-1-{{3-[4-(二甲基氨基)苯基]-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基}甲基}哌啶-3-基}氨基甲酸叔丁酯 (**16a**): 浅黄色油状, 产率 75.6%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.12 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.76 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 3.84~3.77 (m, 3H), 3.01 (s, 6H), 2.81 (brs, 1H), 2.54 (brs, 1H), 2.46 (brs, 1H), 1.71 (d, $J=9.6$ Hz, 2H), 1.61 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 1.42 (s, 10H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 170.9, 155.1, 153.6, 151.5, 146.8, 127.5, 113.3, 111.8, 79.5, 58.9, 57.7, 53.9, 46.4, 40.1, 29.3, 28.4, 22.5; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 458.2338, found 458.2335.

(*R*)-1-{{3-[4-(二甲基氨基)苯基]-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基}甲基}哌啶-3-基}氨基甲酸叔丁酯 (**17a**): 浅黄色油状, 产率 90.7%. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.95 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.79 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.41 (brs, 1H), 3.06~3.07 (m, 1H), 2.99 (s, 6H), 2.72 (brs, 1H), 2.69~2.66 (m, 1H), 2.60 (brs, 1H), 1.98 (brs, 1H), 1.89 (brs, 1H), 1.68 (dd, $J=9.0$, 2.4 Hz, 1H), 1.60 (d, $J=8.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 174.3, 159.2, 155.7, 153.0, 147.6, 129.0, 115.1, 113.7, 57.9, 56.7, 54.3, 49.5, 40.9, 28.3, 23.3; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 358.1834, found 358.1833.

(*R*)-1-{{3-[3-(3-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]噻二唑-6-基]甲基}哌啶-3-基}氨基甲酸叔丁酯 (**16b**): 浅黄色油状, 产率 72.9%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.00 (dd, $J=8.4$, 2.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86~3.68 (m, 3H), 2.84 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 2.57 (brs, 2H), 2.45 (brs, 1H), 1.74 (brs, 2H), 1.67~1.60 (m, 1H), 1.42 (s, 10H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.2, 159.9, 155.1, 154.7, 146.0, 129.9, 126.8, 118.7, 116.5, 111.2, 79.5, 59.0, 57.6, 55.5, 53.9, 46.4, 29.3, 28.4, 22.6; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 445.2021,

found 445.2019.

(*R*)-1-{[3-(3-甲氧基苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*]-[1,3,4]噻二唑-6-基]甲基}哌啶-3-胺(**17b**): 浅黄色油状, 产率 88.5%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.82 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.34 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 2.90~2.87 (m, 1H), 2.83 (d, $J=10.8$ Hz, 1H), 2.69~2.67 (m, 1H), 2.29 (t, $J=9.0$ Hz, 1H), 2.12 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 1.80~1.78 (m, 1H), 1.71~1.69 (m, 1H), 1.58~1.53 (m, 1H), 1.11~1.06 (m, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.9, 159.8, 154.8, 145.9, 129.9, 126.8, 118.6, 116.4, 111.2, 62.6, 57.5, 55.4, 53.9, 47.7, 33.2, 23.4; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{OS}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 345.1497, found 345.1502.

(*R*)-1-{1-[3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑-6-基]甲基}哌啶-3-基}氨基甲酸(**16c**): 浅黄色油状, 产率 79.6%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.75 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.34~7.26 (m, 3H), 3.78~3.71 (m, 3H), 2.78 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 2.51~2.47 (m, 5H), 2.39 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 1.70 (s, 2H), 1.59 (s, 1H), 1.39 (s, 10H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.0, 155.1, 154.1, 146.7, 138.0, 131.2, 130.1, 129.3, 125.8, 124.8, 79.4, 58.9, 57.5, 53.9, 46.5, 29.3, 28.4, 22.6, 21.1; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 429.2072, found 429.2078.

(*R*)-1-{[3-(邻甲苯基)-[1,2,4]三唑并[3,4-*b*][1,3,4]-噻二唑-6-基]甲基}哌啶-3-胺(**17c**): 浅黄色油状, 产率 86.8%. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.72 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.35~7.33 (m, 1H), 3.90~3.86 (m, 2H), 2.93 (d, $J=10.2$ Hz, 1H), 2.89~2.86 (m, 1H), 2.78 (d, $J=10.2$ Hz, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.36 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 2.17 (brs, 1H), 1.86 (dd, $J=12.6, 3.6$ Hz, 1H), 1.79~1.74 (m, 1H), 1.66~1.59 (m, 1H), 1.20 (d, $J=10.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 175.6, 156.1, 148.1, 139.2, 132.2, 131.8, 130.9, 127.1, 125.9, 62.3, 58.2, 54.9, 54.8, 33.3, 24.7, 20.9; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{S}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 329.1548, found 329.1546.

3.2.3 DOTIL 抑制活性测试

DOTIL 酶抑制活性通过 AlphaLISA 酶活实验进行检测. 实验缓冲溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 0.1%牛血清白蛋白, BSA)稀释后的化合物 **12a~12l**、**14a~14o**、**16a~16c** 和 **17a~17c** 50 $\mu\text{mol/L}$ 与纯化得到的 DOTIL 蛋白 80 nmol/L 先加入到 384 孔板(white opaque OptiPlate-384, PerkinElmer)中室温孵育 10min. 向反应体系中加入

1 $\mu\text{mol/L}$ SAM (AdoMet)和 0.25 ng 核小体(Reaction Biology), 室温孵育 30 min. 然后向反应体系中加入高盐缓冲溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mol/L NaCl, 0.1% Tween20, 0.3% poly-L-lysine)室温孵育 15 min 终止酶活反应. 向实验体系中加入组蛋白 H3 受体磁珠和 H3K79me2 抗体的混合物室温孵育 1 h. 最后向实验体系中加入链酶亲和素供体磁珠并室温孵育 30 min, 通过 PerkinElmer 的酶标仪进行信号检测.

用实验 buffer 梯度稀释化合物, 按相同的方法检测 DOTIL 酶抑制活性, 并通过 GraphPad Prism5 进行 IC_{50} 曲线拟合.

3.2.4 结合模式分析

化合物 **12j**、**14b**、**14e** 和 **16a** 与 DOTIL (PDB ID: 3QOW) 的对接通过 maestro (Maestro, version 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.)完成. 首先通过 maestro 相应模块对蛋白和小分子化合物进行处理与准备, 同时通过构象搜索为小分子化合物生成不同的构象. 然后采用 maestro 中 Glide 模块的 SP 模式进行对接 (Glide, Version 6.9. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2015.)^[27-29]. 对接结果用于结合模式的分析.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **12a~12l**、**14a~14o**、**16a~16c** 和 **17a~17c** 的核磁共振氢谱和碳谱; 化合物 **12j**、**14b**、**14e**、**16a** 和 DOTIL 的 2D 结合模式. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- Min, J. R.; Feng, Q.; Li, Z. Z.; Zhang, Y.; Xu, R. M. *Cell* **2003**, *112*, 711.
- Kim, W.; Choi, M.; Kim, J. E. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 726.
- Bernt, K. M.; Zhu, N.; Sinha, A. U.; Vempati, S.; Faber, J.; Krivtsov, A. V.; Feng, Z.; Punt, N.; Daigle, A.; Bullinger, L.; Pollock, R. M.; Richon, V. M.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 66.
- Lillico, R.; Lawrence, C. K.; Lakowski, T. M. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 2657.
- Anglin, J. L.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8972.
- Zhou, S. H.; Sun, P. J.; Zhao, Y. Q.; Zhang, Y.; Yu, N. F. *Acta Pharm. Sin.* **2018**, *53*, 500 (in Chinese). (周仕海, 孙朋举, 赵勇强, 张岩, 余聂芳, 药学报, **2018**, *53*, 500.)
- Ümit Kaniskan, H.; Martini, M. L.; Jin, J. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 989.
- Basavapathruni, A.; Jin, L.; Daigle, S. R.; Majer, C. R.; Therkelsen, C. A.; Wigle, T. J.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Pollock, R. M.; Scott, M. P.; Moyer, M. P.; Richon, V. M.; Copeland, R. A.; Olhava, E. J. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80*, 971.
- Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Majer, C. R.; Sneeringer, C. J.; Song, J.; Johnston, L. D.; Scott, M. P.; Smith, J. J.; Xiao, Y.; Jin, L.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Bernt, K. M.; Tseng, J. C.; Kung, A. L.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 53.
- Stein, E. M.; Garcia-Manero, G.; Rizzieri, D. A.; Savona, M.; Tibes,

- R.; Altman, J. K.; Jongen-Lavrencic, M.; Dohner, H.; Armstrong, S.; Pollock, R. M.; Waters, N. J.; Legler, M.; Thomson, B.; Daigle, S.; McDonald, A.; Campbell, C.; Olhava, E.; Hedrick, E. E.; Lowenberg, B.; Copeland, R. A.; Tallman, M. S. *Blood* **2014**, *124*, 387.
- [11] Yao, Y.; Chen, P.; Diao, J.; Cheng, G.; Deng, L.; Anglin, J. L.; Prasad, B. V.; Song, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16746.
- [12] Anglin, J. L.; Deng, L.; Yao, Y.; Cai, G.; Liu, Z.; Jiang, H.; Cheng, G.; Chen, P.; Dong, S.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8066.
- [13] Yu, W.; Chory, E. J.; Wernimont, A. K.; Tempel, W.; Scopton, A.; Federation, A.; Marineau, J. J.; Qi, J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Yi, J.; Marcellus, R.; Jacob, R. E.; Engen, J. R.; Griffin, C.; Aman, A.; Wienholds, E.; Li, F.; Pineda, J.; Estiu, G.; Shatseva, T.; Hajian, T.; Al-Awar, R.; Dick, J. E.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Arrowsmith, C. H.; Bradner, J. E.; Schapira, M. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1288.
- [14] Yu, W.; Smil, D.; Li, F.; Tempel, W.; Fedorov, O.; Nguyen, K. T.; Bolshan, Y.; Al-Awar, R.; Knapp, S.; Arrowsmith, C. H.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Schapira, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1787.
- [15] Spurr, S. S.; Bayle, E. D.; Yu, W. Y.; Li, F. L.; Tempel, W.; Vedadi, M.; Schapira, M.; Fish, P. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4518.
- [16] Chen, J.; Park, H. J. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 873.
- [17] Scheufler, C.; Möbitz, H.; Gaul, C.; Ragot, C.; Be, C.; Fernández, C.; Beyer, K. M.; Tiedt, R.; Stauffer, F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 730.
- [18] Chao, C.; Zhu, H.; Stauffer, F.; Caravatti, G.; Vollmer, S.; Machauer, R.; Holzer, P.; Möbitz, H.; Scheufler, C.; Klumpp, M.; Tiedt, R.; Beyer, K. S.; Calkins, K.; Guthy, D.; Kiffe, M.; Zhang, J.; Gaul, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 735.
- [19] Möbitz, H.; Machauer, R.; Holzer, P.; Vaupel, A.; Stauffer, F.; Ragot, C.; Caravatti, G.; Scheufler, C.; Fernández, C.; Hommel, U.; Tiedt, R.; Beyer, K. S.; Chao, C.; Zhu, H.; Gaul, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 338.
- [20] Chen, S. J.; Wang, Y. L.; Zhou, W.; Li, S. S.; Peng, J. L.; Shi, Z.; Hu, J. C.; Liu, Y. C.; Ding, H.; Lin, Y. Y.; Li, L. J.; Cheng, S. F.; Liu, J. Q.; Lu, T.; Jiang, H. L.; Liu, B.; Zheng, M. Y.; Luo, C. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9028.
- [21] Chen, S.; Li, L.; Chen, Y.; Hu, J.; Liu, J.; Liu, Y. C.; Liu, R.; Zhang, Y.; Meng, F.; Zhu, K.; Lu, J.; Zheng, M.; Chen, K.; Zhang, J.; Jiang, H.; Yao, Z.; Luo, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 527.
- [22] Wang, Y. L.; Li, L. J.; Zhang, B. D.; Xing, J.; Chen, S. J.; Wan, W.; Song, Y. K.; Jiang, H.; Jiang, H. L.; Luo, C.; Zheng, M. Y. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2026.
- [23] Song, Y. K.; Li, L. J.; Chen, Y. T.; Liu, J. Q.; Xiao, S. H.; Lian, F. L.; Zhang, N. X.; Ding, H.; Zhang, Y. Y.; Chen, K. X.; Jiang, H. L.; Zhang, C. H.; Liu, Y. C.; Chen, S. J.; Luo, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1751.
- [24] Zhang, L.; Chen, Y. T.; Liu, N.; Li, L. J.; Xiao, S. H.; Li, X. L.; Chen, K. X.; Luo, C.; Chen, S. J.; Chen, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *80*, 649.
- [25] Cui, P. L.; Li, X. L.; Zhu, M. Y.; Wang, B. H.; Liu, J.; Chen, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 159.
- [26] Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739.
- [27] Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177.
- [28] Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Thomas Pollard, W.; Banks, J. L. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750.

(Lu, Y.)