

嘧啶并二氮革类化合物作为 L3MBTL3 抑制剂的设计、
合成与构效关系研究

周 皓 车 鑫 鲍国臣 王 娜 柏 旭*

(吉林大学药学院 吉林大学组合化学与创新药物研究中心 长春 130021)

摘要 组蛋白甲基化是表观遗传学的标志之一,其调节紊乱与许多疾病有联系.恶性脑瘤域(MBT)家族蛋白是一类能够识别组蛋白赖氨酸甲基化信号的蛋白, L3MBTL3 是该家族中代表性的蛋白之一,它与染色质转录抑制、造血功能、肿瘤形成等都有关系.开发 L3MBTL3 小分子抑制剂可以辅助阐明其生物学作用和验证其靶点成药性.首先通过筛选嘧啶并二氮革化合物库,得到了 L3MBTL3 的活性化合物 **1**,接着按照已报道 L3MBTL3 抑制剂的结构特点进行构效关系研究,最终得到了四个 IC_{50} 值小于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 新颖的 L3MBTL3 抑制剂.

关键词 嘧啶并二氮革; L3MBTL3; 抑制剂; 构效关系研究

Design, Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Pyrimidine-Fused Diazepine Derivatives as L3MBTL3 Inhibitors

Zhou, Hao Che, Xin Bao, Guochen Wang, Na Bai, Xu*

(Center for Combinatorial Chemistry and Drug Discovery of Jilin University, School of Pharmaceutical Sciences, Changchun 130021)

Abstract Histone methylation is one of epigenetic marks and its deregulation is linked to many diseases. Malignant brain tumor (MBT) domain protein is one of proteins that could read methylated lysine (Kme) of histones. L3MBTL1, a representative member of the MBT family, is related to transcriptional repression, hematopoietic function and tumor formation. Developing a potent and selective inhibitor of L3MBTL1 can help explain the regulatory mechanisms and validate its drugability. Active compound **1** for L3MBTL3 from a library of pyrimidine-fused diazepines was initially obtained. By incorporating the structural features of reported binders, the structure-activity relationship (SAR) studies were conducted, which led to four novel L3MBTL3 inhibitors with IC_{50} values under $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords pyrimidine-fused diazepine; L3MBTL3; inhibitor; SAR study

近年来,越来越多的证据表明表观遗传学相关蛋白调节紊乱与癌症、神经系统疾病和自身免疫病等多种疾病有关^[1~3].组蛋白甲基化修饰是表观遗传学的一种重要机制,它与染色体的转录、蛋白质的表达和细胞的功能均有密切关系^[4].恶性脑瘤域(Malignant brain tumor, MBT)蛋白是组蛋白甲基化的一类识别蛋白,这类蛋白能够识别组蛋白上单甲基化或二甲基化赖氨酸残基^[5].人类的 MBT 域蛋白共有 9 种, L3MBTL3 (Lethal 3 malignant brain tumor 3)蛋白是其中之一,它能够识别二甲基化的赖氨酸残基,例如: H4K20me2(组蛋白 H4 赖氨酸

20 二甲基化残基), H3K4me2 和 H3K9me2^[6]. L3MBTL3 的编码基因 *L3MBTL3* 能够作为肿瘤抑制基因阻断染色体的转录,髓母细胞瘤患者体内 L3MBTL3 缺失.同时,研究表明 L3MBTL3 蛋白与造血功能有关^[7],特别是骨髓细胞的生成有重要作用^[8].

开发高效高选择性的 L3MBTL3 小分子探针能够帮助研究其靶蛋白功能和疾病的关系.最近, Frye 课题组^[9]报道了第一个高效 L3MBTL3 小分子探针 UNC-1215.通过对 UNC1215 的构效关系研究,开发了高选择性 L3MBTL3 小分子探针 UNC1679^[10]和结构差异较

* E-mail: xbai@jlu.edu.cn

Received July 1, 2016; revised August 3, 2016; published online August 12, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072526) and the Science and Technology Development Plan of Jilin Province (No. 20140309010YY).

国家自然科学基金(No. 81072526)和吉林省科技发展计划重点(No. 20140309010YY)资助项目.

大的 L3MBTL3 小分子探针 UNC2533^[11] (如图 1a 所示)。

UNC1215-L3MBTL3 (pdb 4FL6) 的共晶结构图(图 1b)表明这些抑制剂与蛋白是以独特的 2:2 复合物形式结合。如图 1 所示, L3MBTL3 抑制剂均含有两个氨基片段, 与蛋白作用时它们的一个氨基可嵌入到 L3MBTL3 的口袋中产生氢键作用, 另一个氨基基团进入到另一分子 L3MBTL3 的识别口袋中, 使得小分子与两个蛋白形成复合物^[9]。另外, Frye 课题组^[12]证明了 L3MBTL3 在细胞中是以二聚体的形式识别组蛋白甲基化赖氨酸。因此, 可同时与两个 L3MBTL3 作用的二氨基化合物更易产生良好的活性。

本实验室前期构建了含有 6 位、7 位、8 位和 9 位不同取代的嘧啶并二氮萘库^[13]。我们将 UNC1215 的关键作用基团 4-吡咯烷基哌啶连接到不同的嘧啶并二氮萘的 4 位上, 得到供筛选 L3MBTL3 蛋白活性的小分子

化合物库, 发现了 L3MBTL3 活性化合物 **1**(图 2 所示)。

由已报道的 L3MBTL3 抑制剂的结构特点可知, L3MBTL3 可与抑制剂的两个氨基基团结合。本文以此基础上, 将化合物 **1** 作为苗头化合物展开了构效关系研究: 固定嘧啶并二氮萘母核 4 位为 4-吡咯烷基哌啶, 分别在其 6 位和 9 位引入另外一个氨基基团(R¹ 或 R²)来研究对活性的影响。最终, 找到了四个 IC₅₀ 值(半数抑制浓度)小于 1 μmol·L⁻¹ 的 L3MBTL3 抑制剂。

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

我们以前期工作^[13]中的中间体 **2a** 为起始原料, 在酸性条件下与不同的胺发生关环反应, 合成了嘧啶并二氮萘类化合物 **3a~3g**。然后分别在化合物 **3** 的 4-位或

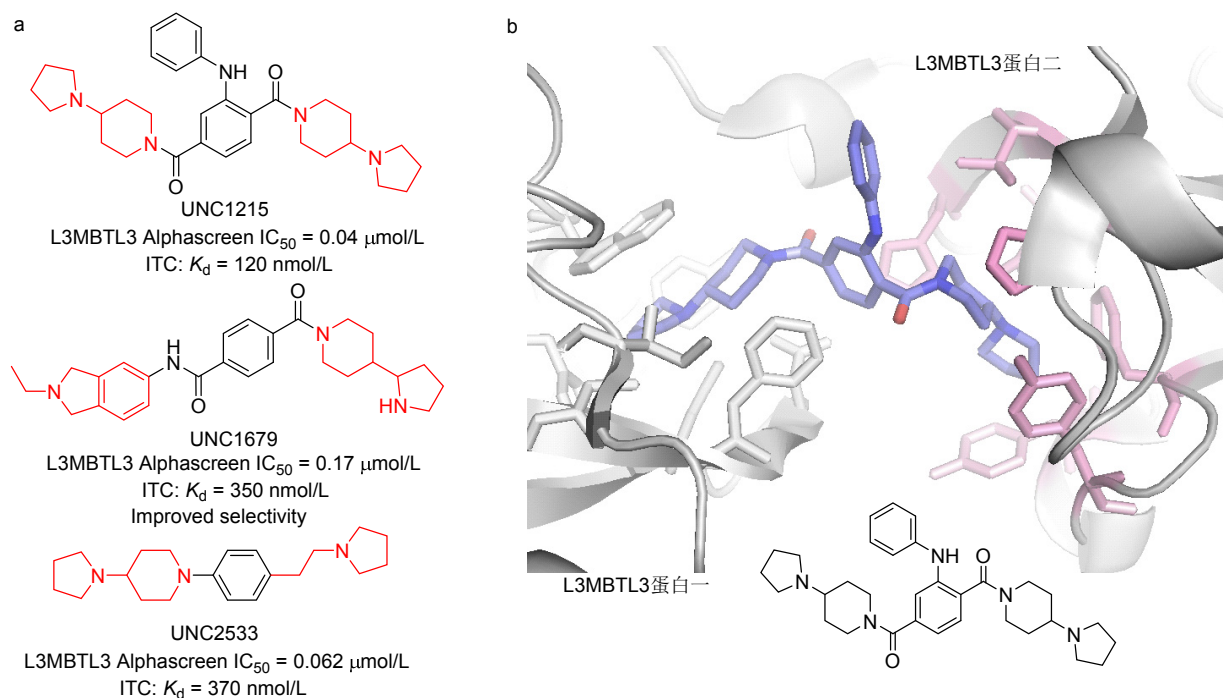


图 1 已报道的 L3MBTL3 抑制剂结构(a)及 UNC1215-L3MBTL3 (pdb 4FL6)的共晶结构图(b)
Figure 1 Structure of reported L3MBTL3 binders (a) and X-ray crystal structure of the UNC1215-L3MBTL3 (b)

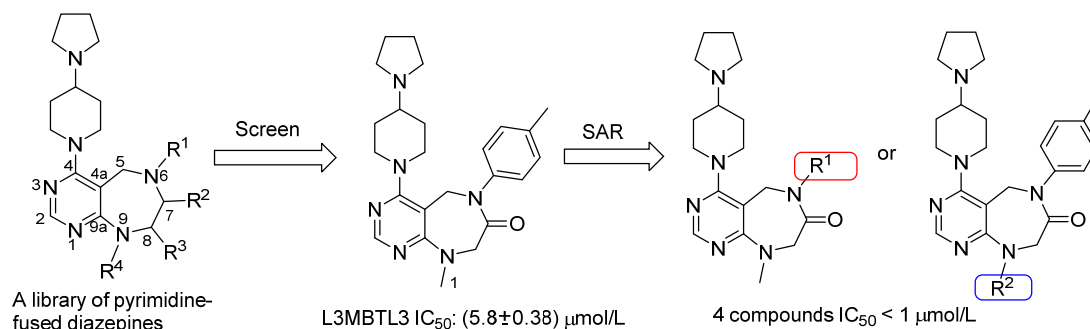


图 2 L3MBTL3 抑制剂的设计策略
Figure 2 Design strategy of L3MBTL3 binders

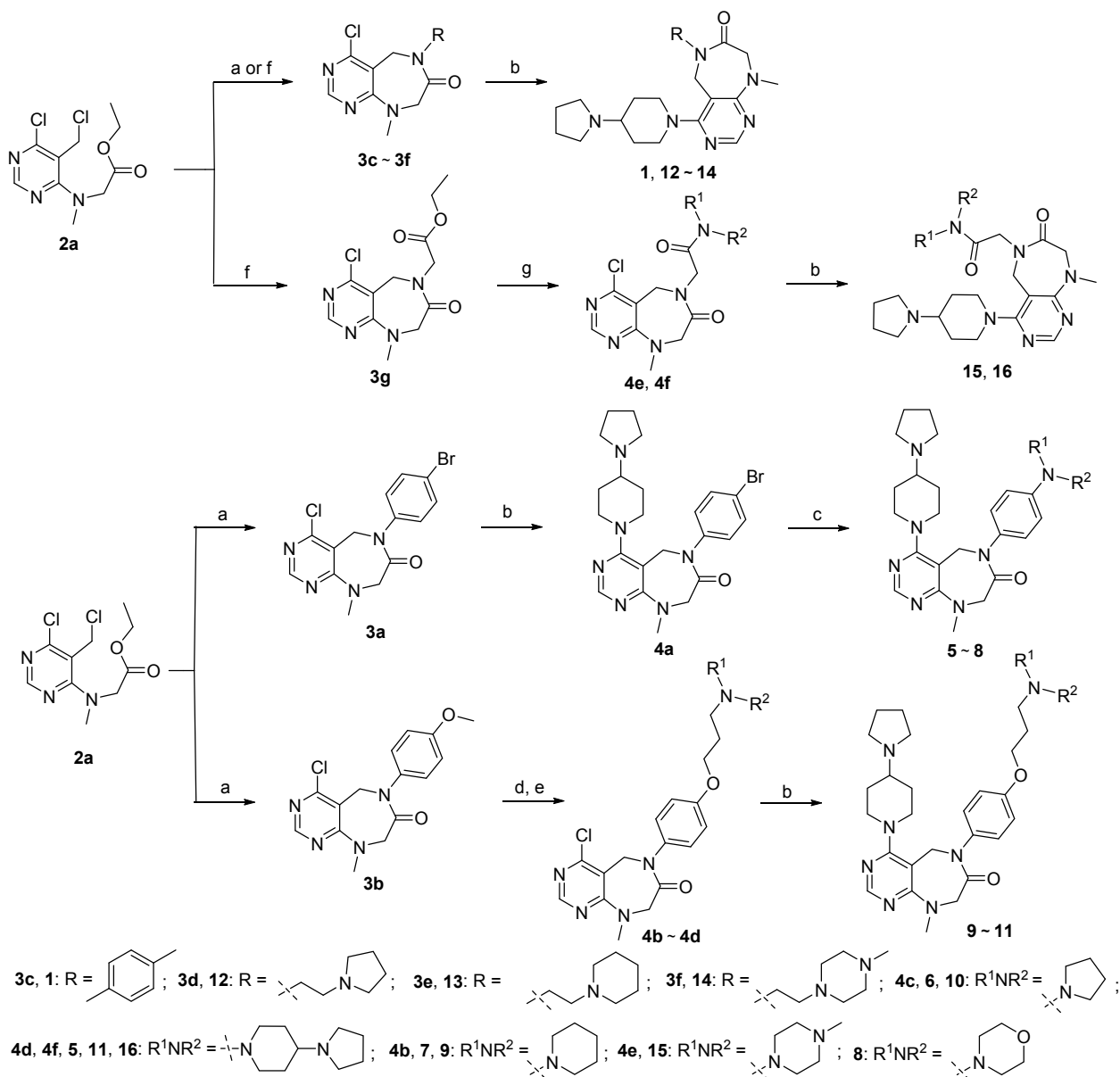
6-位进行亲核取代或酰胺化反应得到终产物 **1**, **5~16** (合成路线如 Scheme 1 所示). 另外我们采用前期报道的合成方法^[13]得到了中间体 **2b** 和 **2c**, 同样分别在其母核 4-位和 9-位进行取代或酰胺化反应得到终产物 **17~22** (合成路线如 Scheme 2 和 Scheme 3 所示). 总共合成了 19 个嘧啶并二氮革衍生物, 这些未见文献报道的化合物其结构均经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 确证.

1.2 活性结果与讨论

生物活性测试由合作方美国北卡罗来纳大学教堂

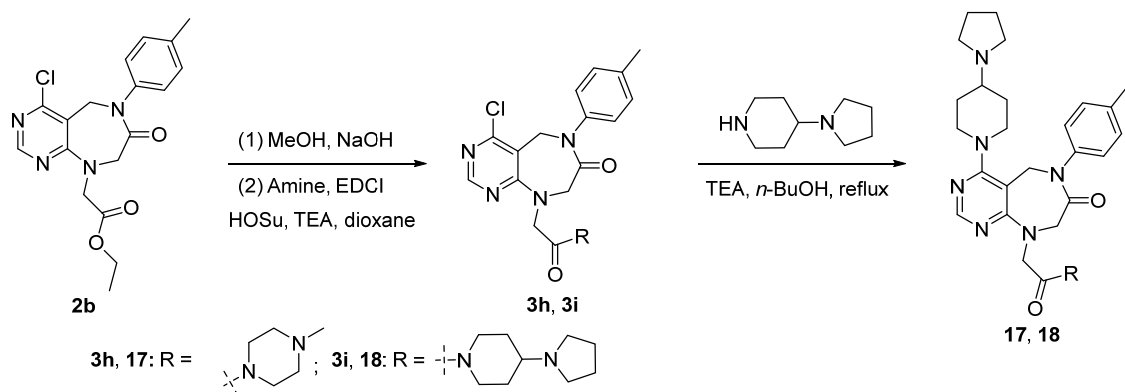
山分校(University of North Carolina at Chapel Hill)的 Frye 课题组完成. 为探索化合物的选择性, 除 L3MB-TL3 蛋白外, 另外选择了 6 种不同家族的甲基化赖氨酸识别蛋白进行测试: L3MBTL3 的同源蛋白 L3MB-TL1^[14], MBTD1^[15], chromodomain 家族成员 CBX7^[16], PHD 家族成员 JARID1A^[17]和 PHF23^[18], 串联 Tudor 域蛋白 53BP1^[19].

采用 LANCE[®] TR-FRET 测试方法初筛化合物对 L3MBTL3 的活性; 同时, 采用同质邻近发光放大法



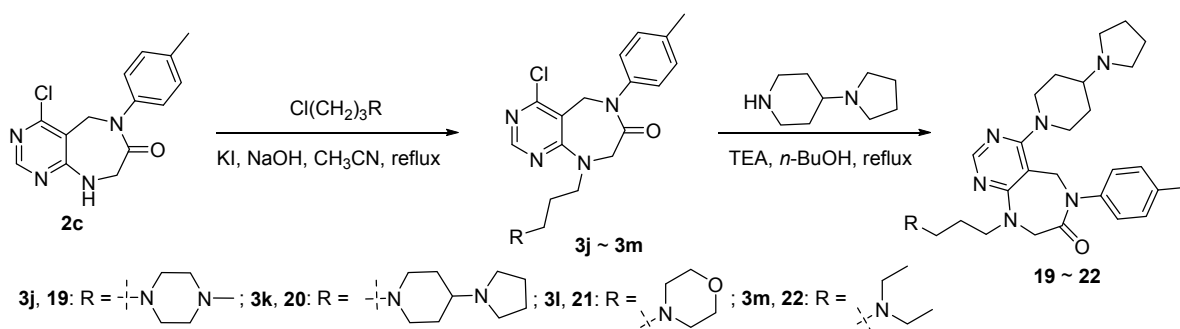
Reaction conditions: (a) 1) TFA, CH₃CN, reflux; 2) HOAc, toluene, reflux. (b) 4-(pyrrolidin-1-yl)piperidine, TEA, *n*-BuOH, reflux. (c) CuI, L-proline, K₃PO₄, DMSO, 100 °C. (d) BBr₃, dry DCM. (e) Cl(CH₂)₃ R¹NR², KI, NaOH, CH₃CN, reflux. (f) NH₂R, TEA, CH₃CN, reflux. (g) 1) MeOH, NaOH; 2) R¹NHR², EDCI, HOBT · TEA, DMF

图式 1 目标化合物 **1** 和 **5~16** 的合成方法
Scheme 1 Syntheses of target compounds **1** and **5~16**



图式2 目标化合物 17 和 18 的合成方法

Scheme 2 Syntheses of target compounds 17 and 18



图式3 目标化合物 19~22 的合成方法

Scheme 3 Syntheses of target compounds 19~22

(AlphaScreen[®])^[20]对 L3MBTL1、53BP1、MBTD1、CBX7、JARID1A、PHF23 这 6 种蛋白进行活性初筛, 实验结果

见表 1. LANCE[®] TR-FRET 测试方法与 AlphaScreen 测试方法线性相关($R^2=0.8$)^[10].

表 1 LANCE TR-FRET 试验和 AlphaScreen[®]试验测定的 IC_{50} 值($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^a
Table 1 IC_{50} values ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) determined by LANCE TR-FRET assay and AlphaScreen[®] Assay

No.	L3MBTL3 (LANCE)	L3MBTL1	MBTD1	53BP1	CBX7-F	Jarid1A	PHF23
UNC1215	0.066±0.03	4.2±2.9	46±29	33±22	>100	>100	>100
1	5.8±0.38	16±8.7	>100	>100	>100	>100	>100
5	0.18±0.015	16±8.7	>100	>100	>100	>100	>100
6	28±0.31	51±25	>100	>100	>100	>100	>100
7	0.37±0.024	11±15	>100	62±8.4	>100	>100	52±0.66
8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
9	>100	44	59.5±0.5	50±2.5	66	69	54
10	42	>100	>100	>100	>100	>100	>100
11	>100	7.5±0.4	>100	86±0.5	>100	>100	>100
12	32	>100	>100	>100	>100	>100	>100
13	>100	21±15	>100	>100	>100	>100	>100
14	17	35±25	>100	>100	>100	>100	>100
15	48±0.76	>100	>100	>100	>100	>100	>100
16	6.9	4.1±2.4	>100	55±0.45	>100	>100	>100
17	24±10.0	37±1.2	>100	>100	>100	>100	>100
18	2.0±1.5	32±20	>100	>100	>100	>100	>100
19	0.73	45±6.0	>100	>100	>100	>100	>100
20	>100	20±2.0	55±22	21±1.5	>100	>100	>100
21	14	32±0.5	>100	>100	>100	>100	>100
22	0.12	20±9.5	>100	>100	>100	>100	>100

^a IC_{50} values are the average of at least 2 values ± the standard deviation.

按照上述筛选方法, 我们通过测试连接有 4-吡咯烷基哌啶的嘧啶并二氮草化合物库, 得到了活性化合物 **1**, 其对 L3MBTL3 的 IC_{50} 值达到了 $(5.8 \pm 0.38) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 考虑已报道 L3MBTL3 抑制剂的结构特点, 我们尝试在化合物 **1** 的 6-位和 9-位引入另一个氨基基团探究构效关系.

首先, 我们在化合物 **1** 的 6-位苯环上引入不同的氨基取代基团 **5~8**, 其中化合物 **5** 和 **7** 对 L3MBTL3 表现出了不错的抑制活性(**5**: $IC_{50}=0.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, **7**: $IC_{50}=0.37 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时这两个化合物对 L3MBTL3 表现出良好的选择性[**5**: $IC_{50}(\text{L3MBTL1})/IC_{50}(\text{L3MBTL3}) > 88$, **7**: $IC_{50}(\text{L3MBTL1})/IC_{50}(\text{L3MBTL3}) > 30$]. 然后, 我们在 6-位苯环上引入带柔性链的氨基基团(**9~11**), 化合物活性大幅地降低. 接着在 6-位上直接引入带柔性链的氨基基团(**12~16**), 化合物的活性仍然没有改善, 其中仅带有酰胺基团的化合物 **16** 有一定的活性($IC_{50}=6.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 最后我们将带柔性链的氨基基团引入至母核的 9 位, 发现了三个对 L3MBTL3 有较好活性的化合物 **18** ($IC_{50}=2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), **19** ($IC_{50}=0.73 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **22** ($IC_{50}=0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其中化合物 **19** [$IC_{50}(\text{L3MBTL1})/IC_{50}(\text{L3MBTL3}) > 61$] 和 **22** [$IC_{50}(\text{L3MBTL1})/IC_{50}(\text{L3MBTL3}) > 166$] 同样对 L3MBTL3 具有良好的选择性. 综上所述, 我们通过构效关系的研究筛选得到了四个 IC_{50} 小于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的活性化合物 **5**, **7**, **19** 和 **22**. 另外, 这四个化合物对 L3MBTL3 同样具有良好的选择性, 其中化合物 **22** 对 L3MBTL3 的活性至少是其他蛋白 166 倍.

2.3 分子对接研究

为了研究活性化合物与 L3MBTL3 蛋白的作用方式, 我们挑选了活性最好的 6 位(**5**)和 9 位(**22**)衍生物与蛋白晶体(pdb 4FL6)在 Autodock4.2 程序上进行分子对接. 如图 3 所示, 化合物 **5** 和 **22** 均能采用类似 UNC1215 的方式与 L3MBTL3 作用: 其中化合物 **5** 的 4 位上的 4-吡咯烷基哌啶基嵌入到一个 L3MBTL1 的芳香口袋中, 其吡咯烷基与 Asp274 距离为 $3.44 \text{ \AA}$, 该分子母核 6 位苯环上的 4-吡咯烷基哌啶插入到另外一个 L3MBTL3 蛋白的芳香口袋当中, 其吡咯烷基与氨基酸 Asp381 距离为 $2.65 \text{ \AA}$, 这两个位点均十分有可能产生氢键和静电作用. 另外, 由此结合模式可以看出 6 位苯环起到了支撑氨基片段到活性位点的作用, 这可能是 6 位没有苯环直接连接带柔性链的氨基基团的化合物 **12~16** 活性较差的原因之一. 如图 3b 所示, 化合物 **22** 的母核 4 位 4-吡咯烷基哌啶和 9 位 *N,N*-二乙基丙氨基同样分别插入到两个 L3MBTL3 蛋白的芳香口袋当中, 这两个基团与氨基酸 Asp381 和 Asp274 的距离分别为 $2.95, 2.99 \text{ \AA}$, 形成氢

键和静电作用可能也非常大. 总的来说, 化合物 **5** 和 **22** 对接的结果能够与其活性结果一致, 说明两种衍生物可能采用了对接呈现的构象与蛋白结合, 另外也说明在分子母核 6 位和 9 位上引入大小和形状合适的氨基基团均可能找到活性化合物.

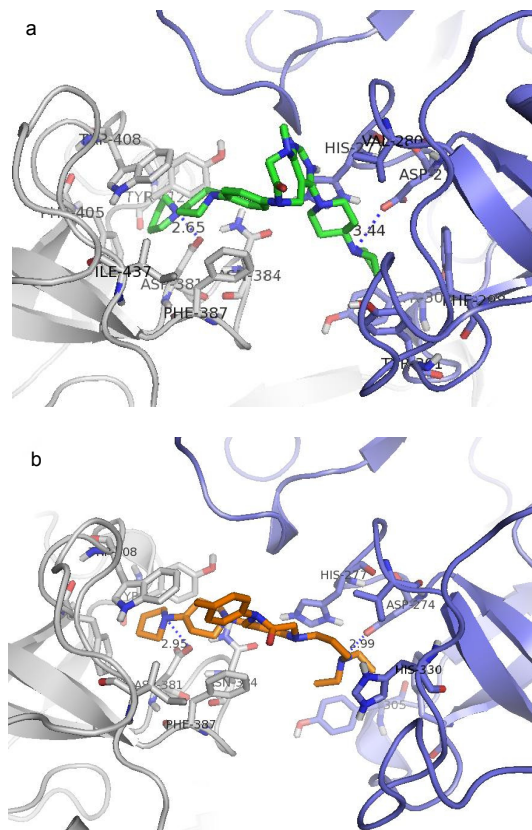


图 3 化合物 **5** 与 L3MBTL3 对接结构(a)及化合物 **22** 与 L3MBTL3 对接结构(b)

Figure 3 Docking structure of **5** with L3MBTL3 (a) and docking structure of **22** with L3MBTL3 (b)

2 结论

把 L3MBTL3 抑制剂 UNC1215 的关键作用基团 4-吡咯烷基哌啶连接到多位点不同取代的嘧啶并二氮草母核的 4 位上, 获得初筛化合物库, 筛选得到 L3MBTL3 活性化合物 **1** [$IC_{50}=(5.8 \pm 0.38) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]. 然后根据已报道 L3MBTL3 抑制剂的结构特点, 设计并合成了一系列含两个氨基基团的嘧啶并二氮草类活性化合物, 初步探索了这系列化合物的构效关系, 找到了四个对 L3MBTL3 具有良好选择性的活性化合物 **5**, **7**, **19** 和 **22** (IC_{50} 值小于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

合成实验中所用到的仪器为 Varian 300 MHz 核磁

共振仪(TMS 为内标, 氘代氯仿、氘代 DMSO 为溶剂); 高分辨液相色谱质谱联用仪 Brucker Agilent1290-microTOF Q II; Agilent 1100 型液质联机(LC/MS); Thermo Finnigan LCQ DECA XP plus 和 SGW X-4 显微熔点仪(未校准). 生物实验中所用到的仪器为 Nanoscreen Multitek 机器人吸样器, PerkinElmer EnVision®多标记微孔板检测仪, 384 孔 PerkinElmer ProxiPlate 浅孔微孔板, Thermo 多道加样器. 合成中所用到的原料均为市售的国产试剂, 纯度为 96%~99%; 反应溶剂为分析纯, 未经处理直接使用. 快速柱层析采用青岛海洋化工厂生产柱硅胶 H (200~300 目), 或者薄层层析硅胶 H.

3.2 化合物的合成

3.2.1 中间体 **3a**~**3g** 的合成

中间体 **3a**~**3g** 参考文献[13]合成方法完成, 其中化合物 **3b**, **3c** 和 **3g** 文献[13]已报道.

9-甲基-6-对溴苯基-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3a**): 产率 67%. 黄色粉末, m.p. 247~248 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.33 (s, 1H), 7.51 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.14 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 3.39 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 166.7, 162.0, 157.8, 157.0, 140.7, 132.5, 127.3, 120.8, 110.0, 56.3, 50.2, 40.5; ESI-MS *m/z*: 367.0 [M+H]⁺.

9-甲基-6-(1-吡咯烷基)-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3d**): 产率 82%. 黄色粉末, m.p. 85~87 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.26 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.63 (t, *J*=6.3 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.60 (t, *J*=6.3 Hz, 2H), 2.45 (s, 4H), 1.70 (s, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.6, 162.0, 157.4, 156.4, 110.7, 55.8, 54.2, 54.1, 47.3, 46.2, 40.3, 23.6; ESI-MS *m/z*: 310.0 [M+H]⁺.

9-甲基-6-(1-哌啶基)-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3e**): 产率 85%. 黄色粉末, m.p. 120~121 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.26 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.61 (t, *J*=6.0 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.42 (t, *J*=6.0 Hz, 2H), 2.28 (s, 4H), 1.50~1.30 (m, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.6, 162.0, 157.2, 156.3, 110.7, 57.0, 55.7, 54.6, 47.2, 44.3, 40.3, 26.0, 24.3; ESI-MS *m/z*: 324.1 [M+H]⁺.

9-甲基-6-[1-(*N*-甲基)哌啶]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3f**): 产率 65%. 黄色粉末, m.p. 130~132 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.26 (s, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.62 (t, *J*=6.0 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.48 (t, *J*=6.0 Hz, 3H), 2.45~2.25 (m, 7H), 2.25~2.17 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.7, 162.0,

157.1, 156.3, 110.7, 55.9, 55.6, 54.9, 52.7, 47.0, 45.8, 43.9, 40.3; ESI-MS *m/z*: 339.1 [M+H]⁺.

3.2.2 中间体 **3h** 和 **3i** 的合成

取 **2b** (2.5 g, 6.67 mmol)溶于 27 mL 甲醇, 加入 1 N 的氢氧化钠溶液 13 mL, 室温下反应 0.5 h 后, 浓缩反应液, 用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸调 pH 至 3, 过滤, 少量水洗, 干燥得水解的酸中间体(白色粉末, 2.270 g). 取此固体 (123 mg, 0.5 mmol), 用 5 mL 二氧六环溶解, 加入 *N*-羟基琥珀酰亚胺(86 mg, 0.75 mmol), 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(96 mg, 0.5 mmol)和三乙胺 (142 μL, 1 mmol), 室温搅拌 10 min, 加入相应的胺(1 mmol). 液质监测反应完全后. 蒸干溶剂, 加 15 mL 饱和碳酸氢钠溶液稀释, 然后用 15 mL 二氯甲烷萃取三遍, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 柱层析分离 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=100:1]得到产物.

4-氯-9-[2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-氧代乙基]-6-对甲基-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3h**): 产率 80%. 白色粉末, m.p. 183~185 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.27 (s, 1H), 7.20 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.13 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 3.77~3.60 (m, 2H), 3.60~3.48 (m, 2H), 2.55~2.38 (m, 4H), 2.36~2.25 (m, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.3, 166.0, 162.0, 158.0, 156.4, 139.3, 137.1, 129.9, 125.3, 110.59, 55.9, 54.9, 54.6, 53.2, 50.2, 46.0, 44.7, 42.1, 27.2, 21.0; ESI-MS *m/z*: 429.2 [M+H]⁺.

6-对甲基-9-[2-氧代-2-(4-吡咯烷基哌啶基)乙基]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3i**): 产率 94%. 白色粉末, m.p. 218~220 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.26 (s, 1H), 7.16 (q, *J*=8.4 Hz, 4H), 5.21 (s, 2H), 4.76~4.57 (m, 2H), 4.55 (s, 2H), 4.41 (d, *J*=13.6 Hz, 1H), 3.77 (d, *J*=13.6 Hz, 1H), 3.16 (t, *J*=11.4 Hz, 1H), 2.94~2.81 (m, 1H), 2.67~2.57 (s, 4H), 2.40~2.24 (m, 4H), 2.05~1.90 (m, 2H), 1.87~1.78 (m, 4H), 1.70~1.44 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.5, 165.9, 162.1, 158.0, 156.6, 139.3, 137.3, 130.0, 125.5, 110.6, 61.3, 56.0, 53.5, 51.5, 50.4, 43.5, 41.0, 31.8, 31.0, 23.4, 21.1; ESI-MS *m/z*: 438.3 [M+H]⁺.

3.2.3 中间体 **3j**~**3m** 的合成

将相应的氯丙基胺侧链(2 mmol)溶于 15 mL 乙腈中, 加入碘化钾(398 mg, 2.4 mmol), 室温搅拌 12 h 后, 加入 **2c** (289 mg, 1 mmol)和氢氧化钠(60 mg, 1.5 mmol), 反应升温至回流, 反应完全后蒸除溶剂, 加 20 mL 水稀释, 用 15 mL 二氯甲烷萃取三遍, 经快速柱层析分离 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇): *V*(氨水)=100:1:5]得到产物.

9-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基]-6-对甲苯基-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3j**): 产率 42%. 白色粉末, m.p. 157~158 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.28 (s, 1H), 7.19 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.10 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 4.15~3.61 (m, 2H), 2.52~2.44 (m, 4H), 2.44~2.36 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 1.94~1.81 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.1, 161.6, 157.8, 156.8, 139.2, 137.2, 130.0, 125.4, 110.1, 55.1, 55.0, 54.9, 52.8, 50.9, 50.3, 45.9, 24.8, 21.1; ESI-MS *m/z*: 429.2 [M+H]⁺.

9-[3-(4-吡咯烷基哌啶基)丙基]-6-对甲苯基-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3k**): 产率 31%. 白色粉末, m.p. 70~72 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.27 (s, 1H), 7.18 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.13~7.08 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 3.94~3.66 (m, 2H), 2.98~2.84 (m, 2H), 2.65~2.50 (s, 4H), 2.40~2.30 (m, 5H), 2.00~1.91 (m, 2H), 1.90~1.82 (m, 5H), 1.81~1.75 (m, 4H), 1.58 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.2, 161.7, 157.7, 156.8, 139.2, 137.3, 130.0, 125.5, 110.1, 62.1, 55.2, 54.9, 52.6, 51.4, 51.1, 50.4, 31.2, 25.1, 23.3, 21.1; ESI-MS *m/z*: 483.2 [M+H]⁺.

9-[3-(吗啡啉-1-基)丙基]-6-对甲苯基-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3l**): 产率 32%. 黄色粉末, m.p. 156~157 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.28 (s, 1H), 7.19 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.10 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.94~3.82 (m, 2H), 3.79~3.65 (m, 4H), 2.51~2.37 (m, 6H), 2.35 (s, 3H), 1.94~1.81 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.1, 161.6, 157.8, 156.9, 139.2, 137.3, 130.0, 125.4, 110.1, 67.0, 55.7, 54.9, 53.7, 50.9, 50.4, 24.5, 21.1; ESI-MS *m/z*: 416.2 [M+H]⁺.

9-[3-(二乙胺基)丙基]-6-对甲苯基-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**3m**): 产率 40%. 黄色粉末, m.p. 129~132 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.28 (s, 1H), 7.18 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.11 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.89~3.81 (m, 2H), 2.59~2.51 (m, 4H), 2.51~2.46 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.90~1.77 (m, 2H), 1.02 (t, *J*=7.2 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.2, 161.6, 157.9, 156.5, 139.0, 137.2, 129.8, 125.3, 110.7, 54.8, 50.2, 49.5, 49.1, 46.9, 22.5, 21.0, 8.8; ESI-MS *m/z*: 402.1 [M+H]⁺.

3.2.4 中间体 **4a** 的合成

参考文献[13]合成方法, 得到中间体 **4a**.

9-甲基-6-对溴苯基-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**4a**): 产率 91%. 黄

色粉末, m.p. 170~171 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.31 (s, 1H), 7.47~7.40 (m, 2H), 7.08~7.02 (m, 2H), 4.88 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.37 (m, 5H), 2.89 (t, *J*=11.7 Hz, 2H), 2.66~2.53 (s, 4H), 2.14 (s, 1H), 2.05~1.90 (m, 2H), 1.85~1.75 (m, 4H), 1.64~1.46 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.4, 165.9, 161.8, 156.1, 141.1, 132.0, 126.6, 119.8, 99.6, 61.7, 55.4, 51.5, 49.9, 49.2, 39.0, 31.7, 23.1; ESI-MS *m/z*: 485.2 [M+H]⁺.

3.2.5 中间体 **4b**~**4d** 的合成

将化合物 **3b** (3.19 g, 10 mmol)溶于处理的二氯甲烷(100 mL)溶解, 冰浴下滴加 15 mL 的 2 mol·L⁻¹ 三溴化硼的二氯甲烷溶液, 然后室温下反应 24 h. 蒸除溶剂, 加 20 mL 水稀释, 用饱和碳酸氢钠调节 pH 至 7, 过滤烘干得脱甲基产物 3.0 g. 将相应的氯丙基胺侧链(2 mmol)溶于 15 mL 乙腈中, 加入碘化钾(398 mg, 2.4 mmol), 室温搅拌 12 h, 加入脱甲基产物(305 mg, 1 mmol)和氢氧化钠(60 mg, 1.5 mmol), 反应升温至回流, 反应完全后蒸除溶剂, 加 20 mL 水稀释, 并用 20 mL 二氯甲烷萃取三遍, 经快速柱层析分离[V(二氯甲烷): V(甲醇): V(氨水)=100:1:5]得到产物.

9-甲基-6-[4-(3-哌啶基)丙氧基苯基]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**4b**): 产率 74%. 白色粉末, m.p. 175~177 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H), 7.19~7.06 (m, 2H), 6.99~6.82 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.00 (t, *J*=6.3 Hz, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.53~2.33 (m, 6H), 2.03~1.89 (m, 2H), 1.65~1.56 (m, 4H), 1.50~1.38 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 166.8, 161.8, 157.9, 157.5, 156.7, 134.4, 126.8, 115.1, 110.3, 66.6, 56.2, 54.2, 53.0, 50.4, 40.4, 28.8, 23.5; ESI-MS *m/z*: 430.2 [M+H]⁺.

9-甲基-6-[4-[3-(1-吡咯烷基)丙氧基]苯基]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**4c**): 产率 53%. 白色粉末, m.p. 151~153 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H), 7.12 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.89 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.02 (t, *J*=6.3 Hz, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.68~2.60 (m, 2H), 2.55 (s, 4H), 2.06~1.97 (m, 2H), 1.85~1.74 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 166.9, 161.9, 158.1, 157.7, 156.9, 134.5, 126.9, 115.2, 110.3, 66.8, 56.3, 56.0, 54.7, 50.6, 40.5, 26.8, 26.0, 24.5; ESI-MS *m/z*: 416.2 [M+H]⁺.

9-甲基-6-[4-[3-(4-吡咯烷基哌啶基)丙氧基]苯基]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**4d**): 产率 29%. 白色粉末, m.p. 188~190 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H), 7.21~7.05 (m, 2H), 6.95~6.82 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.00 (t, *J*=6.3 Hz, 2H),

3.39 (s, 3H), 2.92 (d, $J=11.8$ Hz, 2H), 2.60 (s, 4H), 2.47 (t, 2H), 2.02~1.78 (m, 11H), 1.58 (d, $J=11.1$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 166.9, 162.0, 158.1, 157.7, 156.9, 156.2, 134.5, 126.9, 115.2, 110.4, 66.7, 62.2, 56.3, 55.1, 52.8, 51.5, 50.6, 40.5, 31.4, 27., 23.4; ESI-MS m/z : 499.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.6 中间体 **4e** 和 **4f** 的合成

取 **3g** (2 g, 6.696 mmol)溶于 27 mL 甲醇中, 加入 13 mL 的 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 室温反应 0.5 h, 浓缩反应液, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液调 pH 至 3, 过滤, 少量水洗, 得到酯水解产物 1.58 g. 取该产物(200 mg, 0.74 mmol)溶于的 5 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 加入 1-羟基苯并三唑(200 mg, 1.48 mmol)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(142 mg, 0.74 mmol)和三乙胺(205 μL , 1.48 mmol), 搅拌 20 min 后, 加入相应的胺(0.89 mmol). 反应结束后, 加入 15 mL 饱和碳酸氢钠溶液稀释, 20 mL 二氯甲烷萃取三遍, 经快速柱层析分离 [V (二氯甲烷): V (甲醇)=100:1]得到产物.

9-甲基-6-[2-氧代-2-(*N*-甲基哌嗪-1-基)乙基]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**4e**): 产率 92%. 白色粉末, m.p. 114~116 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 8.28 (s, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.69~3.58 (m, 2H), 3.52~3.37 (m, 2H), 3.33 (s, 3H), 2.46~2.36 (m, 4H), 2.32 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 168.4, 165.7, 162.1, 157.9, 156.5, 110.2, 55.5, 54.9, 54.6, 48.5, 48.1, 46.0, 45.0, 42.2, 40.3, 27.3; ESI-MS m/z : 353.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

9-甲基-6-[2-氧-2-(4-吡咯烷基哌啶基)]-4-氯-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**4f**): 产率 97%. 白色粉末, m.p. 204~206 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 8.27 (s, 1H), 4.91~4.71 (m, 2H), 4.44 (d, $J=15.0$ Hz, 2H), 4.36 (d, $J=3.0$ Hz, 2H), 4.27 (t, $J=15.0$ Hz, 1H), 3.78~3.66 (m, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.16~3.02 (m, 1H), 2.92~2.81 (m, 1H), 2.64~2.51 (m, 4H), 2.31~2.21 (m, 1H), 2.02~1.88 (m, 2H), 1.86~1.75 (m, 4H), 1.61~1.43 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 168.4, 165.4, 162.0, 157.8, 156.5, 110.1, 61.1, 55.4, 51.5, 48.5, 48.1, 43.5, 40.9, 40.3, 31.7, 30.9, 23.4; ESI-MS m/z : 407.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.7 目标化合物 **5~8** 的合成

将化合物 **4a** (243 mg, 0.5 mmol)、磷酸钾(212 mg, 1 mmol)、碘化亚铜(9.5 mg, 0.05 mmol)、*L*-脯氨酸(1 mg, 0.01 mmol)混悬于 3.5 mL 二甲亚砜中, 加入相应的胺 (0.75 mmol), 升温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应, 氮气保护下反应. 反

应完全后, 蒸干反应液, 加饱和 20 mL 碳酸氢钠溶液稀释, 25 mL 二氯甲烷萃取三遍, 经快速柱层析分离 [V (二氯甲烷): V (甲醇)=100:1]得到目标化合物.

9-甲基-6-[4-(4-吡咯烷基哌啶基)苯基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**5**): 产率 13%. 黄色粉末, m.p. 159~160 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H), 7.00 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.70~3.60 (m, 2H), 3.43~3.32 (m, 5H), 2.95~2.70 (m, 4H), 2.66~2.53 (m, 8H), 2.21~2.07 (m, 2H), 2.05~1.90 (m, 4H), 1.85~1.75 (m, 8H), 1.75~1.61 (m, 2H), 1.59~1.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.1, 165.9, 160.2, 156.0, 149.8, 134.0, 126.0, 116.8, 100.0, 61.9, 61.7, 55.5, 51.4, 51.1, 49.2, 48.5, 39.2, 31.3, 30.3, 27.2, 23.4, 23.3; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 280.1970, found 280.1983.

9-甲基-6-[4-(吡咯烷-1-基)苯基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**6**): 产率 60%. 黄色粉末, m.p. 196~197 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H), 6.96 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.46 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.71~3.59 (m, 2H), 3.43~3.30 (m, 5H), 3.26 (t, $J=6.6$ Hz, 4H), 2.85 (t, $J=11.7$ Hz, 2H), 2.66~2.52 (m, 4H), 2.15~2.05 (m, 1H), 2.03~1.90 (m, 6H), 1.85~1.75 (m, 4H), 1.60~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.2, 166.0, 162.0, 155.9, 146.8, 130.6, 126.3, 111.8, 100.0, 62.0, 55.6, 51.6, 51.0, 49.2, 47.8, 39.2, 31.7, 27.2, 25.6, 23.3; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 476.3132, found 476.3128.

9-甲基-6-[4-(哌啶-1-基)苯基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**7**): 产率 30%. 黄色粉末, m.p. 247~248 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H), 7.03~6.96 (m, 2H), 6.87~6.79 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.42~3.33 (m, 5H), 3.17~3.10 (m, 4H), 2.85 (t, $J=12.6$ Hz, 2H), 2.61~2.55 (m, 4H), 2.12 (s, 1H), 2.00~1.90 (m, 2H), 1.84~1.76 (m, 4H), 1.72~1.64 (m, 4H), 1.62~1.50 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.0, 165.8, 162.3, 156.1, 150.8, 133.7, 126.0, 116.7, 100.4, 61.8, 55.8, 50.9, 50.6, 49.2, 39.3, 29.8, 27.4, 25.9, 24.4, 23.5, 14.2; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 245.6681, found 245.6690.

9-甲基-6-[4-(吗啡啉-1-基)苯基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**8**): 产率 54%. 黄色粉末, m.p. 194~197 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (s, 1H), 7.04 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.85 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.90~3.78 (m,

4H), 3.44~3.32 (m, 5H), 3.18~3.10 (m, 4H), 2.86 (t, $J=11.7$ Hz, 2H), 2.57 (s, 4H), 2.10 (s, 1H), 2.05~1.90 (m, 2H), 1.85~1.75 (m, 4H), 1.62~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.0, 166.0, 162.0, 156.0, 149.8, 134.5, 126.1, 116.1, 100.0, 66.9, 62.0, 55.6, 51.7, 50.5, 49.3, 39.2, 31.7, 27.3, 23.3; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. 492.3081, found 492.3088.

3.2.8 目标化合物 1 和 9~22 的合成

参考文献[13]合成方法, 得到目标化合物 1, 9~22.

9-甲基-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-6-对甲苯基-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**1**): 产率 94%. 白色粉末, m.p. 198~200 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (s, 1H), 7.12 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.06~6.99 (m, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.42~3.32 (m, 5H), 2.86 (t, $J=12.6$ Hz, 2H), 2.62~2.54 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.21~2.06 (m, 1H), 2.01~1.90 (m, 2H), 1.82~1.76 (m, 4H), 1.61~1.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.8, 166.1, 162.0, 156.1, 139.8, 136.5, 129.8, 125.1, 100.1, 62.0, 55.6, 51.7, 50.4, 49.3, 39.2, 31.9, 23.3, 21.1; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 421.2710, found 421.2719.

9-甲基-6-[4-(3-哌啶基丙氧)苯基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**9**): 产率 91%. 黄色粉末, m.p. 171~173 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (s, 1H), 7.03 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.99 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.42~3.31 (m, 5H), 2.86 (t, $J=11.8$ Hz, 2H), 2.61~2.52 (m, 4H), 2.51~2.37 (m, 6H), 2.18~2.05 (m, 1H), 1.99~1.92 (m, 4H), 1.79 (s, 4H), 1.65~1.49 (m, 6H), 1.47~1.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.9, 166.1, 162.0, 157.6, 156.1, 135.2, 126.5, 115.0, 100.0, 66.8, 62.0, 56.0, 55.6, 54.7, 51.7, 50.6, 49.3, 39.2, 31.9, 26.9, 26.1, 24.5, 23.3; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_7\text{O}_2$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 274.6890, found 274.6905.

9-甲基-6-{4-[3-(1-吡咯烷基丙氧)苯基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**10**): 产率 83%. 黄色粉末, m.p. 162~163 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (s, 1H), 7.03 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.01 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.42~3.31 (m, 5H), 2.86 (t, $J=12.0$ Hz, 2H), 2.73~2.62 (m, 2H), 2.61~2.53 (m, 8H), 2.15~2.00 (m, 3H), 2.00~1.91 (m, 2H), 1.85~1.75 (m, 8H), 1.59~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.0, 166.1, 162.0, 157.5, 156.1, 135.3, 126.5, 115.0, 100.0, 66.7, 62.0, 55.6, 54.3, 53.2, 51.7, 50.6, 49.3, 39.2,

31.9, 28.8, 23.5, 23.3; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_2$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 267.6812, found 267.6818.

9-甲基-6-{4-[3-(4-吡咯烷基哌啶基)丙氧]苯基}-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**11**): 产率 81%. 黄色粉末, m.p. 64~66 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (s, 1H), 7.03 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.99 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.42~3.31 (m, 5H), 2.98~2.79 (m, 4H), 2.62~2.54 (m, 8H), 2.48 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 2.07~1.86 (m, 10H), 1.82~1.75 (m, 8H), 1.66~1.44 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.9, 166.0, 161.9, 157.5, 156.0, 135.2, 126.4, 115.0, 99.9, 66.7, 62.0, 61.9, 55.5, 55.1, 52.7, 51.6, 51.3, 50.6, 49.3, 39.2, 31.8, 31.2, 27.0, 23.3, 23.2; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_2$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 309.2179, found 309.2191.

9-甲基-6-[2-(吡咯烷基-1-基)乙基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**12**): 产率 90%. 黄色粉末, m.p. 88~90 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.26 (s, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 3.52 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.45~3.35 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.89 (t, $J=12.7$ Hz, 2H), 2.66~2.58 (m, 4H), 2.45 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 2.41~2.31 (m, 4H), 2.34~2.12 (m, 1H), 2.06~1.98 (m, 2H), 1.86~1.78 (m, 4H), 1.70~1.58 (m, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.4, 165.6, 161.7, 155.4, 100.0, 61.6, 54.6, 53.8, 53.5, 51.4, 49.0, 47.0, 46.2, 38.9, 31.6, 23.3, 23.0; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 428.3132, found 428.3143.

9-甲基-6-[2-(哌啶-1-基)乙基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**13**): 产率 86%. 黄色粉末, m.p. 103~104 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.49 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.44~3.35 (m, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.89 (t, $J=11.6$ Hz, 2H), 2.73~2.55 (m, 4H), 2.35~2.10 (m, 7H), 2.08~1.99 (m, 2H), 1.89~1.80 (m, 4H), 1.75~1.60 (m, 2H), 1.45~1.26 (m, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.5, 165.7, 162.0, 155.5, 100.4, 61.7, 56.6, 54.7, 54.4, 51.5, 49.2, 47.0, 44.6, 39.1, 31.9, 25.9, 24.2, 23.2; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.3289, found 442.3273.

9-甲基-6-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**14**): 产率 93%. 黄色油状物. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 3.52 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.44~3.34 (m, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.90 (t, $J=11.7$ Hz, 2H), 2.71~2.61 (m, 4H), 2.36~2.12 (m, 13H), 2.11~

1.98 (m, 2H), 1.89~1.80 (m, 4H), 1.76~1.60 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.6, 165.6, 161.9, 155.5, 100.4, 61.7, 55.6, 54.8, 54.6, 52.7, 51.5, 49.2, 46.7, 45.9, 44.2, 39.2, 31.8, 26.9, 23.1; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 457.3398, found 457.3395.

9-甲基-6-[2-氧代-2-(*N*-甲基哌嗪-1-基)乙基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**15**): 产率 83%. 黄色粉末, m.p. 179~181 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 8.25 (s, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 3.65~3.56 (m, 2H), 3.46~3.35 (m, 4H), 3.29 (s, 3H), 2.86 (t, $J=12.6$ Hz, 2H), 2.67~2.53 (m, 4H), 2.45~2.37 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.25~2.10 (m, 1H), 2.05~1.94 (m, 2H), 1.87~1.78 (m, 4H), 1.72~1.57 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 169.5, 165.7, 161.5, 155.3, 99.0, 61.4, 54.3, 54.0, 51.3, 51.1, 49.0, 48.7, 47.9, 45.7, 44.5, 42.5, 41.6, 38.8, 31.5, 22.9; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 471.3190, found 471.3183.

9-甲基-6-[2-氧-2-(4-吡咯烷基哌啶基)]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**16**): 产率 96%. 白色粉末, m.p. 117~120 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 8.24 (s, 1H), 4.59 (d, $J=16.8$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J=16.8$ Hz, 1H), 4.40~4.23 (m, 4H), 4.12 (dd, $J=15.6, 10.5$ Hz, 2H), 3.74~3.61 (m, 1H), 3.57~3.46 (m, 1H), 3.43~3.32 (m, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.06 (t, $J=12.2$ Hz, 1H), 2.93~2.82 (m, 2H), 2.70~2.48 (m, 8H), 2.35~2.17 (m, 2H), 2.08~1.87 (m, 4H), 1.87~1.75 (m, 8H), 1.71~1.41 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 170.0, 166.0, 165.8, 161.8, 155.5, 99.1, 61.7, 60.8, 54.4, 51.5, 51.2, 49.5, 49.4, 48.6, 48.6, 43.3, 40.8, 39.0, 31.7, 31.3, 30.6, 27.1, 23.3, 23.2; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 525.3660, found 525.3659.

9-[2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-6-对甲基-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**17**): 产率 69%. 黄色粉末, m.p. 151~153 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 8.23 (s, 1H), 7.13 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.55~3.46 (m, 2H), 3.42~3.30 (m, 2H), 2.91~2.80 (m, 2H), 2.70~2.55 (m, 4H), 2.70~2.55 (m, 4H), 2.49~2.37 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.20~2.08 (s, 1H), 2.04~1.90 (m, 2H), 1.85~1.70 (m, 4H), 1.62~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 168.4, 167.3, 166.2, 161.4, 155.8, 139.8, 136.6, 129.8, 125.1, 116.6, 100.1,

62.0, 55.0, 54.9, 54.6, 52.1, 51.7, 50.2, 49.3, 46.1, 44.7, 42.1, 31.7, 27.1, 23.2, 21.1; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 547.3503, found 547.3498.

9-[2-氧代-(吡咯烷-1-基)哌啶-1-基]乙基]-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-6-对甲基-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**18**): 产率 87%. 黄色粉末, m.p. 115~117 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 8.22 (s, 1H), 7.12 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.04 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.47 (m, 4H), 3.87~3.72 (m, 1H), 3.40~3.25 (m, 2H), 3.13 (t, $J=11.7$ Hz, 1H), 2.91~2.80 (m, 2H), 2.66~2.53 (m, 8H), 2.32 (s, 3H), 2.29~2.21 (m, 1H), 2.18~2.05 (m, 1H), 2.02~1.89 (m, 4H), 1.85~1.78 (m, 8H), 1.64~1.43 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (both of rotamers) δ : 168.4, 167.2, 166.4, 161.6, 155.9, 140.0, 136.6, 129.8, 125.1, 100.3, 62.0, 61.2, 55.2, 52.2, 51.7, 51.4, 50.2, 49.4, 43.5, 41.0, 31.8, 31.7, 30.9, 27.3, 23.4, 23.3, 21.1; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{O}_2$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 301.2023, found 301.2026.

9-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基]-6-对甲基-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**19**): 产率 67%. 黄色粉末, m.p. 91~92 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.26 (s, 1H), 7.12 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.07~6.95 (m, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.81 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.43~3.29 (m, 2H), 2.86 (t, $J=11.8$ Hz, 2H), 2.65~2.56 (m, 4H), 2.54~2.36 (m, 9H), 2.32 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.18~2.05 (m, 2H), 2.00~1.93 (m, 2H), 1.90~1.83 (m, 2H), 1.83~1.76 (m, 4H), 1.62~1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.4, 166.2, 161.5, 156.1, 139.8, 136.5, 129.7, 125.1, 99.8, 62.0, 55.6, 55.2, 54.2, 53.2, 51.7, 50.3, 49.8, 49.4, 46.1, 31.9, 25.5, 23.2, 21.0; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 274.1970, found 274.1989.

9-[3-(4-吡咯烷基哌啶基)丙基]-6-对甲基-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5*H*-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**20**): 产率 79%. 黄色油状物. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (s, 1H), 7.11 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.80 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.43~3.28 (m, 2H), 2.97~2.77 (m, 4H), 2.71~2.48 (m, 8H), 2.40~2.29 (m, 5H), 2.12~2.04 (m, 2H), 1.99~1.89 (m, 5H), 1.86~1.76 (m, 11H), 1.62~1.48 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.5, 166.1, 161.5, 156.1, 139.8, 136.5, 129.8, 125.0, 99.7, 62.0, 61.9, 55.5, 54.1, 52.4, 51.7, 51.2, 50.3, 49.8, 49.4, 31.8, 30.6, 25.5, 23.4, 23.2, 21.1; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 301.2205, found 301.2209.

9-[3-(吗啡喃-1-基)丙基]-6-对甲苯基-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**21**): 产率 70%. 白色粉末, m.p. 163~164 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (s, 1H), 7.12 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.88~3.78 (m, 2H), 3.75~3.66 (m, 2H), 3.42~3.30 (m, 2H), 2.86 (t, $J=11.7$ Hz, 2H), 2.69~2.51 (m, 4H), 2.49~2.36 (m, 6H), 2.32 (s, 3H), 2.24~2.08 (m, 1H), 2.04~1.92 (m, 2H), 1.91~1.77 (m, 6H), 1.73~1.42 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.4, 166.3, 161.6, 156.1, 139.9, 136.5, 129.8, 125.1, 99.9, 67.1, 62.0, 56.1, 54.4, 53.8, 51.7, 50.4, 49.9, 49.4, 31.8, 25.1, 23.3, 21.1; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_2$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 267.6812, found 367.6825.

9-[3-(二乙胺基)丙基]-6-对甲苯基-4-(4-吡咯烷基哌啶基)-8,9-四氢-5H-嘧啶[4,5-*e*][1,4]二氮草-7-酮(**22**): 产率 71%. 黄色粉末, m.p. 129~131 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.26 (s, 1H), 7.11 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 3.87~3.72 (m, 2H), 3.45~3.26 (m, 2H), 2.86 (t, $J=12.0$ Hz, 2H), 2.62~2.44 (m, 10H), 2.32 (s, 3H), 2.14~2.04 (m, 1H), 2.03~1.90 (m, 2H), 1.89~1.72 (m, 6H), 1.62~1.42 (m, 2H), 1.02 (t, $J=7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 168.3, 166.2, 161.5, 156.1, 139.8, 136.4, 129.7, 125.0, 99.7, 62.0, 54.0, 51.7, 50.3, 50.2, 50.0, 49.4, 46.8, 31.9, 25.5, 23.2, 21.0, 11.7; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}$ $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ 260.6916, found 260.6930.

3.3 生物实验

本实验采用的生物测试方法在文献[10]已报道.

3.3.1 同质邻近发光放大法(AlphaScreen)

化合物板(1 μL 最高浓度为 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 稀释 3 倍, DMSO 稀释 10 次)通过 Multimek 机器人吸样器用 1 $\times$ 检测缓冲液(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷, pH 8.0, 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇和 0.05% 吐温 20)稀释至 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 取 1 μL 稀释后溶液加入到 384 孔 ProxiPlate 浅孔微孔板中. 用多道加样器取 9 μL 蛋白-肽混合物 1 $\times$ 检测缓冲液加入到这些孔板内, 室温下孵育 30 min. 接着加入 2 μL 链霉亲和素-结合供体磁珠和镍螯合受体磁珠 1:1 混合的 1X 检测缓冲液(45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 室温避光条件下孵育 30 min. 孵育结束后, 使用配备 HTS AlphaScreen 激光的 EnVision 多标记微孔板检测仪扫描孔板得到响应值. 通过软件 GraphPad Prism 5 和四参数曲线回归拟合算法计算得到 IC_{50} 值.

3.3.2 LANCE[®] TR-FRET 检测

化合物板(1 μL 最高浓度为 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 稀释 3 倍, DMSO 稀释 10 次)通过 Multimek 机器人吸样器用 1 $\times$ 检

测缓冲液(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷, pH 8.0, 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇和 0.05% 吐温 20)稀释至 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 取 1 μL 稀释后溶液加入到 384 孔 ProxiPlate 浅孔微孔板中. 用多道加样器取 4.5 μL 1:1 的 L3MBTL3/H4K20me2 混合物(555 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 $\times$ 检测缓冲液加入到这些孔板内, 室温下孵育 30 min. 接着加入 4.5 μL Eu-W1024-Anti6His (2.2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 ULight-链霉亲和素(137.5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)混合液, 室温避光条件下孵育 30 min. 孵育结束后, 使用 EnVision 多标记微孔板检测仪扫描孔板得到响应值, 该检测仪配备有 LANCE/DELTA D400/630 双镜头, UV2(TRF) 320 nm 感光滤色片和两个发射滤光片(APC 665 nm 和 615 nm). 通过软件 GraphPad Prism 5 和四参数曲线回归拟合算法计算得到 IC_{50} 值.

3.4 分子对接

L3MBTL3 蛋白晶体结构(4FL6)下载自蛋白数据库 (<http://www.rcsb.org>). 分子对接试验在 Autodock4.2 程序上进行, 以 MGLTools-1.5.4 为对接的图像显示软件. 蛋白的预处理包括加氢及电荷均在 MGLTools-1.5.4 上进行. 分子对接采取半柔性对接, 即以蛋白作刚性处理, 配体可自由转动. 在对接过程中, grid box 的大小为 $64\times 60\times 60$ grid points, grid spacing 设置约为碳碳单键长度的四分之一 0.375 Å, 设置蛋白的甲基化赖氨酸识别位点为活性位点中心. 对接算法采用 Lamarckian 遗传算法, 最大迭代次数为 2500000, 其他为采用默认设置. 最终的复合物结构选取能量最低的构象的结构, 其图像显示采用 PyMOL v1.7 处理.

致谢 感谢北卡罗来纳大学教堂山分校(University of North Carolina at Chapel Hill)的 Stephen V. Frye 课题组的 Lindsey Ingerman James, Brandi Baughman 和 Jacqueline Norris 在生物活性测试上的帮助, 同时感谢吉林大学药学院的江梦南同学在分子对接研究上的帮助.

辅助材料(Supporting Information) 所有化合物的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 MS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Brueckner, B.; Garcia Boy, R.; Siedlecki, P.; Musch, T.; Kliem, H. C.; Zielenkiewicz, P.; Suhai, S.; Wiessler, M.; Lyko, F. *Cancer Res.* **2005**, 65(14), 6305
- [2] Kubicek, S.; O'sullivan, R. J.; August, E. M.; Hickey, E. R.; Zhang, Q.; Teodoro, M. L.; Rea, S.; Mechtler, K.; Kowalski, J. A.; Homon, C. A.; Kelly, T. A.; Jenuwein, T. *Mol. Cell* **2007**, 25(3), 473.
- [3] Manel, E. *Carcinogenesis* **2010**, 31(1), 27.

- [4] Zhang, Y.; Reinberg, D. *Genes Dev.* **2001**, *15*(18), 2343.
- [5] Maurer-Stroh, S.; Dickens, N. J.; Hughes-Davies, L.; Kouzarides, T.; Eisenhaber, F.; Ponting, C. P. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*(2), 69.
- [6] Nady, N.; Krichevsky, L.; Zhong, N.; Duan, S.; Tempel, W.; Amaya, M. F.; Ravichandran, M.; Arrowsmith, C. H. *J. Mol. Biol.* **2012**, *423*(5), 702.
- [7] Northcott, P. A.; Nakahara, Y.; Wu, X.; Feuk, L.; Ellison, D. W.; Croul, S.; Mack, S.; Kongkham, P. N.; Peacock, J.; Dubuc, A.; Ra, Y. S.; Zilberberg, K.; Mcleod, J.; Scherer, S. W.; Sunil Rao, J.; Eberhart, C. G.; Grajkowska, W.; Gillespie, Y.; Lach, B.; Grundy, R.; Pollack, I. F.; Hamilton, R. L.; Van Meter, T.; Carlotti, C. G.; Boop, F.; Bigner, D.; Gilbertson, R. J.; Rutka, J. T.; Taylor, M. D. *Nat. Genet.* **2009**, *41*(4), 465.
- [8] Satoko, A.; Toru, M. *EMBO J.* **2005**, *24*(10), 1863.
- [9] James, L. I.; Barsyte-Lovejoy, D.; Zhong, N.; Krichevsky, L.; Korboukh, V. K.; Herold, J. M.; Macnevin, C. J.; Norris, J. L.; Sagum, C. A.; Tempel, W.; Marcon, E.; Guo, H.; Gao, C.; Huang, X. P.; Duan, S.; Emili, A.; Greenblatt, J. F.; Kireev, D. B.; Jin, J.; Janzen, W. P.; Brown, P. J.; Bedford, M. T.; Arrowsmith, C. H.; Frye, S. V. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*(3), 184.
- [10] James, L. I.; Korboukh, V. K.; Krichevsky, L.; Baughman, B. M.; Herold, J. M.; Norris, J. L.; Jin, J.; Kireev, D. B.; Janzen, W. P.; Arrowsmith, C. H.; Frye, S. V. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*(18), 7358.
- [11] Camerino, M. A.; Zhong, N.; Dong, A.; Dickson, B. M.; James, L. I.; Baughman, B. M.; Norris, J. L.; Kireev, D. B.; Janzen, W. P.; Arrowsmith, C. H.; Frye, S. V. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*(11), 1501.
- [12] Baughman, B. M.; Pattenden, S. G.; Norris, J. L.; James, L. I.; Frye, S. V. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*(3), 722.
- [13] Xiang, J.; Wen, D.; Xie, H.; Dang, Q.; Bai, X. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*(4), 503.
- [14] West, L. E.; Roy, S.; Lachmi-Weiner, K.; Hayashi, R.; Shi, X. B.; Appella, E.; Kutateladze, T. G.; Gozani, O. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(48), 37725.
- [15] Eryilmaz, J.; Pan, P.; Amaya, M. F.; Allali-Hassani, A.; Dong, A.; Adams-Cioaba, M. A.; Mackenzie, F.; Vedadi, M.; Min, J. *PLoS One* **2009**, *4*(10), e7274.
- [16] Yap, K. L.; Li, S.; Munoz-Cabello, A. M.; Raguz, S.; Zeng, L.; Mujtaba, S.; Gil, J.; Walsh, M. J.; Zhou, M. M. *Mol. Cell* **2010**, *38*(5), 662.
- [17] Ditacchio, L.; Le, H. D.; Vollmers, C.; Hatori, M.; Witcher, M.; Secombe, J.; Panda, S. *Science* **2011**, *333*(6051), 1881.
- [18] Reader, J. C.; Leng, Q.; Rassool, F. V.; Ning, Y. *Leukemia Res.* **2010**, *34*(8), 1094.
- [19] Botuyan, M. V.; Lee, J.; Ward, I. M.; Kim, J. E.; Thompson, J. R.; Chen, J.; Mer, G. *Cell* **2006**, *127*(7), 1361.
- [20] Wigle, T. J.; Herold, J. M.; Senisterra, G. A.; Vedadi, M.; Kireev, D. B.; Arrowsmith, C. H.; Frye, S. V.; Janzen, W. P. *J. Biomol. Screening* **2010**, *15*(1), 62.

(Li, L.; Fan, Y.)