

二苯氨基硫脲类索拉菲尼衍生物的合成及抗肿瘤活性评价

管道坤[†] 孙少峰[†] 陈 静 何作鹏 孔祥凯
王宁宁 姚建文* 王洪波*

(烟台大学分子药理和药物评价教育部重点实验室 烟台 264005)

摘要 以 2-吡啶甲酸和取代苯胺为原料, 设计合成了 17 个新型二苯氨基硫脲类索拉菲尼衍生物. 目标化合物均经过 NMR 和 HRMS 进行结构表征. 采用人结肠癌细胞 HCT116、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人前列腺癌细胞 PC-3 和小鼠黑色素瘤细胞 B16BL6 对目标化合物的体外抗肿瘤活性进行了研究. 结果表明 1-(4-氯-3-三氟甲基苯基)-3-{4-[2-(异丙基氨基甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9g**)对四种细胞株的抑制活性均优于阳性药物索拉菲尼, 1-(3-三氟甲基-4-氯苯基)-3-{4-[2-(甲基氨基甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9b**)和 1-(3-三氟甲基-4-氟苯基)-3-{4-[2-(异丙基氨基甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9j**)对 MDA-MB-231 细胞株、PC-3 细胞株和 B16BL6 细胞株具有优于索拉菲尼的抑制活性, 同时探讨了新化合物 **9j** 与 B-Raf 受体的三维晶体结构(5HI2)活性位点的结合模式, 为今后新型索拉菲尼衍生物的设计合成提供了有用参考.

关键词 B-Raf; 分子对接; 抗肿瘤活性; 二苯氨基硫脲; 索拉菲尼衍生物

Synthesis and Evaluation of Antitumor Activity of Sorafenib Derivatives Possessing Diphenylamine and Thiourea Structures

Guan, Daokun[†] Sun, Shaofeng[†] Chen, Jing He, Zuopeng Kong, Xiangkai
Wang, Ningning Yao, Jianwen* Wang, Hongbo*

(Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Yantai University, Yantai 264005)

Abstract 17 novel sorafenib derivatives possessing diphenylamine and thiourea structures were designed and synthesized using 2-picolinic acid and substituted anilines as raw materials. The structures of the target compounds were all characterized by NMR and HRMS. In addition, the *in vitro* antiproliferation activity of the target compounds was studied in human colon cancer cell HCT116, human breast cancer cell line MDA-MB-231, human prostate cancer cell line PC-3 and mouse melanoma cell line B16BL6. The results showed that 1-(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)-3-(4-(2-(isopropylcarbamoyl)pyridine-4-amino)phenyl)thiourea (**9g**) had better inhibitory activity against four cell lines than the positive drug sorafenib, and 1-(3-trifluoromethyl-4-chlorophenyl)-3-{4-[2-(methylcarbamoyl)pyridine-4-amino]phenyl}thiourea (**9b**) and 1-(3-trifluoromethyl-4-fluorophenyl)-3-{4-[2-(isopropylcarbamoyl)pyridine-4-amino]phenyl}thiourea (**9j**) had better inhibitory activity against MDA-MB-231, PC-3 and B16BL6 cell lines. The molecular docking of the active small molecule **9j** was further studied, and its binding mode with the active site of the 3-D crystal structure (5HI2) of B-Raf receptor was discussed, which provided a useful reference for the design and synthesis of novel sorafenib derivatives in the future.

Keywords B-Raf; molecular docking; anti-tumor activity; diphenylamine and thiourea; sorafenib derivatives

Ras/Raf/MEK/ERK 信号转导通路在调节细胞周期、细胞的增殖、分化、凋亡和肿瘤的形成过程中发挥重要作用, 而 A-Raf、B-Raf 和 C-Raf 是丝氨酸/苏氨酸激酶家族的三个成员, 参与 Ras/Raf/MEK/ERK 信号转导通

路的调节, 是 Ras/Raf/MEK/ERK 信号转导通路中的关键酶^[1,2]. A-Raf 和 C-Raf 在肿瘤形成过程中很少发生突变, 而 B-Raf 的突变却普遍存在于多种肿瘤中, 有报道表明, 约 11% 的结肠直肠癌、41% 的肝细胞癌、50~80%

* Corresponding authors. E-mail: jwyao@ytu.edu.cn; hongbowangwt@gmail.com

Received February 2, 2018; revised March 22, 2018; published online April 13, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81728020), the Key Research Project of Shandong Province (No. 2017GSF18177), and the Key Technology Development Plan of Yantai City (No. 2017ZH075).

国家自然科学基金(No. 81728020)、山东省重点研究项目(2017GSF18177)和烟台市重点科技发展计划(No. 2017ZH075)资助项目.

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

的黑色素瘤、100%的发样细胞白血病均发生了 B-Raf 的突变^[3]。其中, 约 90%的活化性突变是由于缬氨酸替代谷氨酸引起的(V600E), 导致 MEK 的磷酸化速率比野生型增加了 500 倍, 促进了肿瘤细胞的生长和 VEGFR 的分泌^[4]。然而, 野生型的 A-Raf、B-Raf 和 C-Raf 通过形成同源二聚体或异源二聚体发挥功能, 当二聚体中的一个单体和抑制剂结合后, 另一个单体随之激活, 在这种情况下选择性的 B-Raf 抑制剂无法发挥作用, 而 B-Raf 的 V600E 位点发生突变后, B-Raf 抑制剂可以和突变单体结合阻断下游信号的过度激活。因此, 突变型的 B-Raf^{V600E} 成为了肿瘤治疗的理想靶点^[5-8]。

含有二芳基脲类的索拉菲尼是首个多靶点口服酪氨酸激酶抑制剂, 可以有效地抑制 B-Raf、VEGFR-2、PDGFR 等多种受体酪氨酸激酶, 属于 II 型 Raf 抑制剂^[9,10]。它通过高效抑制 Ras/Raf/MEK/ERK 特异性级联磷酸化信号, 减慢细胞增殖的速率。它对分化型甲状腺癌、肾细胞癌、晚期肝细胞癌等有显著的抗肿瘤活性^[11-14]。虽然索拉菲尼可以减少肿瘤恶化的时间, 但是同时也存在肝毒性的副反应和溶出性质差等缺点, 影响治疗效果^[15]。为了提高索拉菲尼的抗肿瘤活性同时降低其毒副反应, 各大跨国药企和科研单位对其结构进行了改造。化合物 **2** 是由诺华公司对索拉菲尼进行结构改造得到的 B-Raf 抑制剂, 连接苯并咪唑和苯环之间的氮原子更易与靶蛋白形成氢键, 具有阻断 B-Raf 和 VEGFR-2 活性的能力。它对黑色素瘤的 I、II 期试验已经完成, B-Raf 突变型总缓解率为 16%, B-Raf 野生型为 13%^[16]。Justin 等^[17]报道了化合物 **3** 与 B-Raf 的 DFG-out 构象分子对接模型, 分子对接结果表明苯环与喹唑啉酮之间的仲胺与 Asp594 形成了一个重要的氢键, 使化合物 **3** 与构象分子结合更加稳定, 抑制活性增强。对 B-Raf^{V600E} 的 IC₅₀ 值达到了 21.4 nmol·L⁻¹。优于阳性对照药索拉菲尼的 IC₅₀ 值 120.1 nmol·L⁻¹。因此, 喹唑啉环和苯环之间仲胺的存在对于提高化合物对 B-Raf 的抑制活性非常重要。为了开发新型的 B-Raf 抑制剂, 同时提高索拉菲尼的抗肿瘤活性, 本课题组以二苯胺为基础对索拉菲尼进行了结构改造。

本课题组之前对索拉菲尼进行了结构改造, 利用生物电子等排和骨架跃迁原理, 对多靶点抗肿瘤药物索拉菲尼进行了结构改造, 将索拉菲尼结构中的脲基团变换成硫脲基团, 增大了原子半径, 所得目标化合物显示出较好的体外抑制肿瘤细胞增殖的活性^[18,19]。笔者在前人的基础上, 保留了硫脲结构, 利用仲胺连接替换了氧连接形成二苯胺结构, 以期使二苯胺结构中的氮原子与靶蛋白形成氢键, 得到对 B-Raf^{V600E} 抑制活性更好、结构新颖的小分子抑制剂。因此设计合成了 17 个具有二苯胺

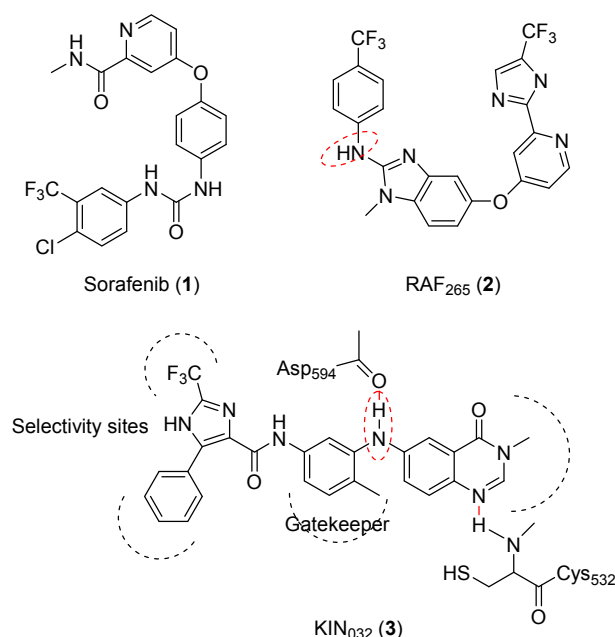


图 1 一些 B-Raf 分子的设计思路

Figure 1 Design proposition of some B-Raf inhibitor molecules

结构的索拉菲尼衍生物, 并评价了其体外抗肿瘤活性, 同时运用分子对接的方法对其中活性较好的化合物 **9j** 与 B-Raf 的结合模式进行了模拟。

1 结果与讨论

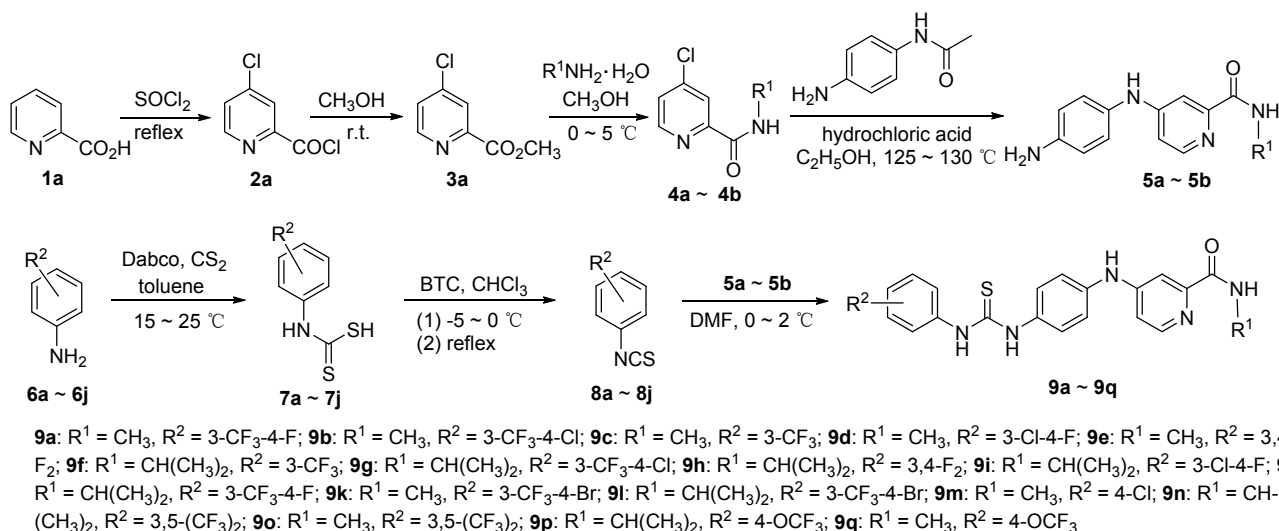
1.1 目标化合物 9a~9u 的化学合成

以 2-吡啶甲酸为起始原料, 通过与氯化亚砷反应得到中间体 **2a**, 再发生甲酯化、氨解反应得到中间体 **4a** 和 **4b**, **4a** 和 **4b** 与 4-氨基乙酰苯胺反应得到二苯胺基中间体 **5a**、**5b**。在此步反应中, 我们选择 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)作为反应溶剂的原因是, 二苯胺中间体 **5a**、**5b** 在 DMF 的溶解度优于二氯甲烷、氯仿等其它溶剂, 在 DMF 介质中此反应更易进行, 缩短了反应时间。取代苯基异氰酸酯(**8a~8j**)是经两步反应制备得到。以取代苯胺为起始原料, 与三乙烯二胺(TED)和 CS₂ 反应得到 **7a~7j**, 再与三光气(BTC)反应得到 **8a~8j**。最后, **5a**、**5b** 与 **8a~8j** 反应生成二苯胺基硫脲类目标化合物。目标化合物的合成路线见 Scheme 1。

1.2 生物活性及毒性评价

以索拉菲尼为阳性对照药, 采用噻唑蓝(MTT)法测试目标化合物 **9a~9q** 对肿瘤细胞 TC116, MDA-MB-231, PC-3 和 B16BL6 的体外活性研究, 结果如表 1。

实验结果表明: 在所有测试的化合物中, 化合物 **9b**、**9g** 和 **9j** 对 MDA-MB-231, PC-3 和 B16BL6 细胞株的抑制活性均优于阳性对照药索拉菲尼。**9j** 和 **9g** 对



图式 1 化合物 9a~9q 的合成
Scheme 1 Synthesis of compounds 9a~9q

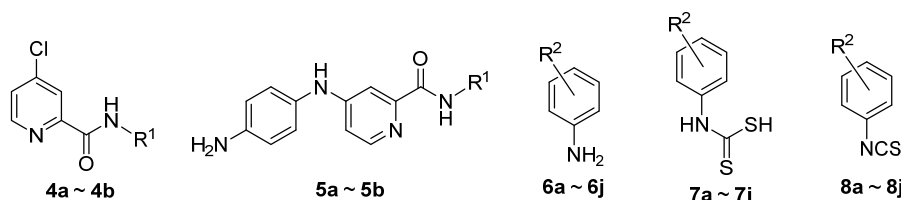


图 2 化合物 4a~4b, 5a~5b, 6a~6j, 7a~7j 和 8a~8j 的结构
Figure 2 Structures of compounds 4a~4b, 5a~5b, 6a~6j, 7a~7j and 8a~8j

表 1 9a~9q 的体外抗肿瘤活性
Table 1 The anti-proliferation activities of 9a~9q

Compd.	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	HCT116	MDA-MB-231	PC-3	B16BL6	Rat podocyte
9a	20.9±1.4	31.3±3.9	18.1±5.5	46.5±3.5	ND
9b	11.2±1.0	20.1±3.3	8.2±0.8	21.15±5.4	71.5±4.1
9c	24.0±2.7	41.6±4.1	18.9±4.3	55.0±4.2	ND
9d	23.2±0.8	24.8±2.9	17.5±3.6	47.5±2.1	ND
9e	86.0±2.8	>100	23.0±4.6	46.0±1.4	ND
9f	20.9±1.7	25.8±3.1	16.2±3.2	33.5±3.5	ND
9g	7.3±3.6	12.6±2.8	7.2±1.8	23.0±1.4	44.7±1.5
9h	24.3±1.9	27.1±2.7	13.7±1.5	38.7±2.1	ND
9i	16.0±3.1	20.3±3.7	9.8±0.9	80.5±3.5	ND
9j	13.4±3.1	9.8±0.9	7.6±0.9	24.0±4.0	43.5±3.6
9k	8.3±1.2	41.4±0.4	17.2±1.4	77.5±2.9	ND
9l	16.5±3.6	34.5±4.5	24.8±4.4	34.7±1.8	ND
9m	26.5±3.6	34.5±4.5	24.8±4.4	34.7±1.8	ND
9n	8.3±1.1	15.8±3.0	13.4±2.1	39.7±3.2	64.5±3.2
9o	34.8±4.1	>100	>100	>100	ND
9p	22.9±3.3	48.8±2.7	35.1±2.2	69.3±0.8	ND
9q	26.2±3.2	57.9±1.8	13.4±1.5	>100	ND
Sorafenib	8.7±1.1	36.6±2.1	13.2±1.3	39.4±2.2	28.4±1.4

^a Values are averages of three independent experiments; ^b IC₅₀ is the concentration of compound required to inhibit the cell growth by 50% compared to an untreated control; ^c ND indicates not detection.

MDA-MB-231 细胞株的抑制活力分别是阳性对照药的 3.75 和 3 倍, 明显优于索拉菲尼。9b、9g、9j 对 PC-3 细胞株的抑制活力分别是索拉菲尼的 1.61、1.83 和 1.74

倍。这 3 个化合物对 B16BL6 细胞株的抑制活力均高于阳性对照 1.64 倍左右, 对 HCT116 细胞的抑制活力与阳性对照药索拉菲尼相当。9n 对 MDA-MB-231 细胞的抑

制活性是索拉菲尼的 2.3 倍, 对 HCT116、PC-3 和 B16BL6 细胞的抑制活性和索拉菲尼相当. 由此可见, 化合物 **9b**、**9g**、**9n** 和 **9j** 值得进行下一步研究.

为了初步评价 **9b**、**9g**、**9n** 和 **9j** 这 4 个优选化合物的成药性, 我们又用 MTT 法研究了他们对体外培养的大鼠永生肾小球足细胞(Rat Podocyte)的毒性作用, 发现 **9b**、**9g**、**9n** 和 **9j** 这四个优选化合物对 Rat Podocyte 细胞的抑制活性均低于索拉菲尼, 显示低于阳性对照药索拉菲尼的毒性.

1.3 分子对接

PDB:5HI2 数据参考文献[20]. 从 Protein Data Bank 库里下载 B-Raf 受体的三维晶体结构(5HI2)的 PDB 文件, 选取体外活性较好的化合物 **9j**, 利用 SYBYL-X 2.0 的 Docking Suite 模块对化合物 **9j** 进行结构优化处理与模块分子对接, 对接结果用 Pymol 进行处理. 如图 3 所示, 化合物 **9j** 可以很好地与 B-Raf 的 DFG-out 构象相结合, **9j** 中的硫脲结构中的两个氮原子和硫原子分别与氨基酸 GLU-501 和 ASP-594 铰链区形成氢键, 异丙基酰胺结构中的氮原子与氨基酸残基 CYS-532 形成氢键作用. 末端 3-三氟甲基-4-氟取代苯环可以插入氨基酸残基 VAL-504、ILE-572、LEU-567、ILE-513 形成的亲脂性口袋中, 二苯氨基苯环部分可以直接插入氨基酸 LYS-483、LEU-314、PHE-595 形成的疏水性口袋中, 使化合物 **9j** 与激酶构象结合更加牢固.

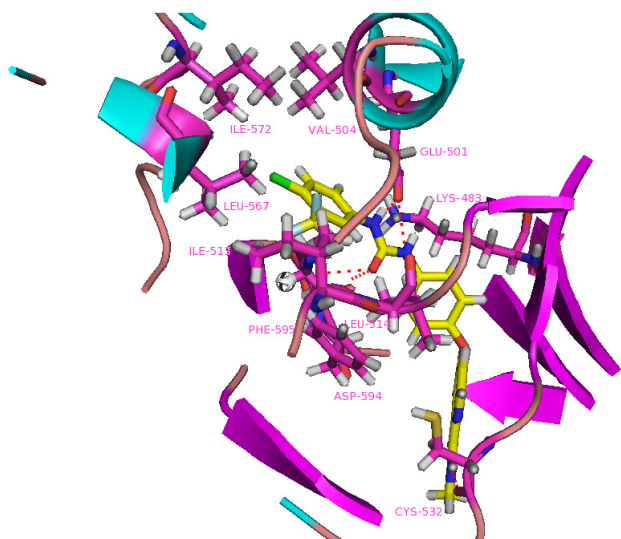


图 3 化合物 **9j** 与 B-Raf 受体分子对接图

Figure 3 Molecules docking of compound **9j** with B-Raf

2 结论

合成了 17 个新型二苯胺类索拉菲尼衍生物 **9a**~**9q**, 采用 MTT 法评价了 17 个化合物对 HTC116, MDA-MB-

231, PC-3 和 B16BL6 细胞的体外抗增殖活性. 结果表明: 二苯胺类化合物 **9b**、**9g**、**9j**、**9n** 具有优于阳性对照药索拉菲尼的细胞活性.

利用硫脲结构替换脲结构, 利用仲胺连接替换氧连接, 得到的化合物 **9b** 具有优于原型药索拉菲尼的细胞活性. 当 R^2 的 4-Cl 以电负性更强的 F (**9a/9j**)或电负性更弱的 Br (**9k/9k**)、H (**9c/9f**)取代时活性均降低. 当以电负性更低的 F (**9e/9h**)、Cl (**9d/9i**)替换 **9a** 中 3- CF_3 , 以 H (**9m**)替换 **9b** 中的 3- CF_3 , 以 OCF_3 (**9q/9p**)替换 **9c/9f** 中的 3- CF_3 , 化合物的活性均下降. 当 R^1 以 $CH(CH_3)_2$ 取代 **9b** 中的 CH_3 时得到活性更强的 **9g**, **9a**~**9e**、**9k**、**9o**、**9q**, 活性也依次强于 **9j**、**9g**、**9f**、**9i**、**9h**、**9l**、**9n**、**9p**.

从构效关系上看: 利用硫脲结构替换脲结构, 利用仲胺连接替换氧连接, 得到的化合物比原型药索拉菲尼活性更佳; R^2 的 3 位以强吸电子基 CF_3 取代时化合物的活性最佳, 吸电子性减小则活性下降; R^2 的 4 位以吸电子性适中的 Cl 取代时活性最佳, 以吸电子性更强或更弱的基团取代则活性降低; R^1 以 $CH(CH_3)_2$ 取代活性优于 CH_3 取代. 化合物 **9b**、**9g**、**9j** 和 **9n** 对 4 种细胞均展示出了较好的抑制活性, 可进一步进行研究. 本研究为索拉菲尼衍生物的研究提供了一定的依据, 但部分化合物活性仍弱于阳性对照化合物, 课题组将在本研究的基础上进行进一步结构优化研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

WRS-1B 数字熔点仪(上海精密仪器科技有限公司); Jeol Resonance ECZ 400S 核磁共振仪; Thermo Scientific Q Exactive 高分辨质谱仪; Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS; DMSO- d_6 (D, 99.9%) + 0.03% TMS (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). 中间体化合物 **8a**~**8j** 参考文献[19]合成. 实验用的试剂及原料均为分析纯或化学纯.

3.2 实验方法

3.2.1 4-氯-2-吡啶甲酸甲酯(**3a**)的合成

将 112.5 mL 氯化亚砷加入 250 mL 的反应瓶中, 保温在 45 °C 下不断搅拌下分批加入 2-吡啶甲酸(34 g, 275 mmol), 升温回流反应 14 h. 停止反应, 降至室温, 加入 200 mL 甲苯, 减压蒸馏回收氯化亚砷, 得到黄色固液混合物. 加入 50 mL 甲醇, 在室温保温搅拌反应 2 h, 抽滤, 中和, 干燥, 得 36.9 g 浅黄色固体 **3a**, 产率 78.5%. m.p. 52~54 °C(文献值: 51~54 °C^[21]); 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 8.69 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J=5.4, 2.1$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H).

3.2.2 *N*-甲基-4-氯-2-吡啶甲酰胺(**4a**)的合成

将 4-氯-2-吡啶甲酸甲酯(10 g, 58.3 mmol)加入 70 mL 甲醇中搅拌溶解, 搅拌下冷却至 0~5 °C, 然后不断搅拌下滴加甲胺(5.4 g, 175 mmol)的水溶液(40 mL), 滴加后在 0~5 °C 下反应 4 h. 减压回收溶剂, 残余物加入 200 mL 乙酸乙酯, 搅拌, 抽滤, 滤液用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩、结晶、抽滤、洗涤、干燥, 得到 9.4 g 浅黄色结晶 **4a**, 产率 94.5%. m.p. 41~42 °C (文献值: 41~42 °C^[22]); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.87~8.85 (m, 1H), 8.61 (d, *J*=5.1 Hz, 1H), 8.01 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.75~7.73 (dd, *J*=2.4, 5.7 Hz, 1H), 2.82 (d, *J*=5.1 Hz, 3H).

中间体化合物 **4b** 的合成方法参照中间体 **4a** 的合成方法制备得到.

N-异丙基-4-氯-2-吡啶甲酰胺(**4b**): 产率 89.2%, 白色固体. m.p. 44~46 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.63 (dd, *J*=5.3, 0.6 Hz, 1H), 8.56 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J*=2.2, 0.6 Hz, 1H), 7.78~7.75 (m, 1H), 4.18~4.09 (m, 1H), 1.21 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.14, 152.46, 150.44, 145.06, 126.81, 122.44, 41.49, 22.62; HRMS (positive-ESIMS) calcd for C₉H₁₁ClN₂NaO [M+Na]⁺ 221.0452, found 221.0468.

3.2.3 4-(2-(*N*-甲基甲酰基)-4-吡啶氨基)苯胺(**5a**)的合成

取 4-氨基乙酰苯胺(4.50 g, 30.0 mmol)和中间体 **4a** (5.12 g, 30.0 mmol)于 100 mL 单口瓶, 升温至 125~130 °C, 搅拌保温反应 2 h 后将反应液降至室温, 分别加入无水乙醇 35 mL 和浓盐酸 7.5 mL, 升温回流 1.5 h, 停止反应. 将反应液降至室温, 得到浅黄绿色固体, 向反应物中加入 30 mL 水溶解, 在 45~50 °C 下滴入氨水调节 pH 7~8, 磁力搅拌保温反应 1.5 h, 加入 400 mL 乙酸乙酯和 100 mL 饱和食盐水, 有机相用饱和食盐水洗三次, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩至干, 得到 7.5 g 灰色固体 **5a**, 产率 67.6%, m.p. 162~165 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.95 (d, *J*=5.0 Hz, 3H), 3.69 (br s, 2H), 6.65 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 6.71 (dd, *J*=5.4, 1.6 Hz, 1H), 6.91~6.70 (m, 3H), 7.66 (s, 1H), 8.06 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.10 (br s, 1H).

中间体化合物 **5b** 参照化合物 **5a** 的合成方法制备得到.

4-(3-氨基苯氧基)-*N*-异丙基-2-吡啶甲酰胺(**5b**): 产率 65.3%. 黄色固体, m.p. 92~94 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.25 (d, *J*=6.6 Hz, 6H), 3.67 (br s, 2H), 4.19~4.27 (m, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.42 (d, *J*=8.0 Hz, 1H),

6.54 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J*=5.6, 2.4 Hz, 1H), 7.14 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.93 (br d, 1H), 8.34 (d, *J*=5.6 Hz, 1H).

3.2.4 4-{4-[3-[3-三氟甲基-4-氟苯基]硫脲基]-苯氨基}-*N*-甲基吡啶-2-甲酰胺(**9a**)的合成

将 4-(2-(*N*-甲基甲酰基)-4-吡啶氨基)苯胺(**5a**, 0.55 g, 2.28 mmol)加入 100 mL 三口反应瓶中, 加 DMF 15 mL 搅拌溶解, 冰浴降温至 0 °C, 缓慢滴加 3-三氟甲基-4-氟苯基异硫氰酸酯(**8a**, 0.51 g, 2.28 mmol)的 DMF 溶液 6 mL, 0~2 °C 反应 1.5 h, 撤去冰浴后室温反应约 6 h, 加 200 mL 乙酸乙酯和 100 mL 饱和食盐水, 有机相用饱和食盐水洗两次, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩至干, 干燥得到 0.42 g 1-(3-三氟甲基-4-氟苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9a**), 产率 50.8%. 黄色粉末状固体, m.p. 174~176 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.03 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.62~8.65 (m, 1H), 8.22 (d, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J*=3.0, 6.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J*=4.1 Hz, 1H), 7.60 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.49 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.04 (m, 1H), 2.81 (d, *J*=4.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 180.60, 165.21, 152.17, 151.46, 149.47, 137.61, 137.03, 134.64, 131.12, 131.03, 127.76, 125.93, 124.38, 123.03, 121.55, 117.66, 117.44, 116.41, 110.79, 107.37, 26.42; HRMS (positive-ESIMS) calcd for C₂₁H₁₈F₄N₅OS [M+H]⁺ 464.1163, found 464.1166.

目标化合物 **9b**~**9u** 参照化合物 **9a** 的合成方法制备得到.

1-(3-三氟甲基-4-氯苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9b**): 产率 51.6%. 类白色固体, m.p. 177~179 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.09 (s, 1H, NHCS), 10.04 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.62~8.65 (m, 1H), 8.22 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.11 (d, *J*=2.5 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J*=2.4, 8.7 Hz, 1H), 7.67 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 7.60 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.22 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.02 (dd, *J*=2.5, 5.7 Hz, 1H), 2.80 (d, *J*=4.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 180.23, 165.22, 152.12, 149.52, 139.86, 137.68, 134.56, 131.98, 129.01, 126.84, 126.53, 125.89, 125.53, 124.63, 122.96, 122.90, 121.91, 121.52, 110.80, 107.38, 26.43; HRMS (positive-ESIMS) calcd for C₂₁H₁₈ClF₃N₅OS [M+H]⁺ 480.0867, found 480.0869.

1-(3-三氟甲基苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9c**): 产率 62.6%. 类白色粉末状固体, m.p. 172~175 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ:

10.02 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.64 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.79 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.60~7.65 (m, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.46 (s, 2H), 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=2.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.31, 165.24, 152.17, 151.49, 149.51, 141.11, 137.53, 134.76, 129.95, 129.63, 129.32, 127.85, 125.99, 125.81, 123.28, 121.54, 121.04, 120.37, 110.76, 107.38, 26.43; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 446.1257, found 446.1258.

1-(3-氯-4-氟苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9d**): 产率 55.8%. 黄色粉末状固体, m.p. 166~168 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.92 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.63 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J=6.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J=2.8, 4.7$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J=4.6$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.24 (dd, $J=9.0, 3.0$ Hz, 2H), 7.01 (dd, $J=5.4, 1.8$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.47, 165.21, 152.20, 151.45, 149.48, 137.46, 137.34, 134.84, 126.41, 125.87, 125.24, 125.17, 121.53, 119.27, 119.08, 117.02, 116.81, 110.75, 107.35, 26.43; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClF}_2\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 430.0899, found 430.0900.

1-(3,4-二氟苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9e**): 产率 53.9%. 灰色粉末状固体, m.p. 180~182 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.87 (d, 2H), 9.06 (s, 1H), 8.63 (s, $J=4.7$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.71~7.74 (m, 1H), 7.59 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.41~7.44 (m, 1H), 7.25 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.01 (dd, $J=6.0, 2.5$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.37, 165.23, 165.21, 152.19, 152.18, 151.48, 149.50, 148.00, 137.45, 134.87, 125.86, 121.51, 120.95, 117.51, 117.33, 113.79, 113.59, 110.75, 107.34, 26.43; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414.1195, found 414.1195.

1-(3-三氟甲基苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9f**): 产率 55.8%. 淡黄色粉末状固体, m.p. 170~172 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.02 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.79 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.58~7.62 (m, 2H), 7.45~7.48 (m, $J=8.7$ Hz, 3H), 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=5.7, 2.5$ Hz, 1H), 4.08 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C

NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.31, 163.60, 151.45, 149.41, 141.11, 137.49, 134.80, 129.95, 129.63, 129.32, 129.00, 127.84, 125.99, 125.81, 123.28, 121.57, 121.04, 121.00, 120.36, 120.32, 110.91, 107.32, 22.80; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 474.1570, found 474.1567.

1-(4-氯-3-三氟甲基苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9g**): 产率 49.1%. 类白色粉末状固体, m.p. 186~189 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.10 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.82~7.85 (m, 1H), 7.69~7.59 (m, 2H), 7.46 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=5.7, 2.4$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.24, 163.59, 152.21, 151.44, 149.40, 139.86, 137.65, 134.60, 131.98, 128.99, 126.85, 126.55, 126.24, 125.88, 125.53, 124.63, 122.94, 121.91, 121.55, 110.95, 107.33, 41.14, 22.80; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 508.1180, found 508.1180.

1-(3,4-二氟苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9h**): 产率 66.9%. 黄色粉末状固体, m.p. 184~186 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.89 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.71~7.75 (m, 1H), 7.59 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.40 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.28~7.23 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.01 (dd, $J=5.7, 2.4$ Hz, 1H), 4.08 (m, $J=6.6$ Hz, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.37, 152.27, 151.45, 150.43, 149.40, 148.00, 145.70, 145.57, 137.42, 137.05, 134.91, 125.86, 121.55, 120.94, 117.50, 117.33, 113.78, 113.58, 110.90, 107.28, 41.14, 22.80; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.1508, found 442.1507.

1-(3-氯-4-氟苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9i**): 产率 46.7%. 黄色粉末状固体, m.p. 168~171 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.29 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.28 (s, 2H), 8.22 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.61 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.03 (dd, $J=5.7, 1.8$ Hz, 1H), 4.03~4.12 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.28, 163.56, 152.15, 151.44, 149.40, 142.50, 137.91, 134.25, 130.98, 130.65, 130.33, 130.00, 126.04, 125.15, 124.03, 122.44, 121.54, 117.27, 111.01,

107.37, 41.14, 22.79; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{22}H_{22}ClFN_5OS$ $[M+H]^+$ 458.1208, found 458.1211.

1-(3-三氟甲基-4-氟苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9j**): 产率 61.4%. 棕色固体, m.p. 173~177 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.02 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J=6.5, 3.0$ Hz, 1H), 7.80~7.84 (m, 1H), 7.60 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 7.01~7.46 (m, 2H), 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=5.7, 2.4$ Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.23, 165.93, 152.15, 151.30, 149.43, 139.86, 137.64, 134.59, 131.97, 128.97, 126.86, 126.55, 125.88, 125.54, 125.53, 124.63, 122.93, 121.91, 121.53, 110.94, 107.26, 23.28, 6.31; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{23}H_{21}F_4N_5NaOS$ $[M+Na]^+$ 514.1295, found 514.1285.

1-(3-三氟甲基-4-溴苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9k**): 产率 50.7%. 类白色粉末状固体, m.p. 179~181 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.10 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.61~8.63 (m, 1H), 8.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J=2.4, 8.7$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=5.7, 2.5$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.15, 165.22, 152.12, 151.50, 149.52, 140.33, 137.67, 135.38, 134.56, 128.97, 128.65, 128.35, 125.87, 124.73, 123.17, 123.11, 121.51, 113.21, 110.80, 107.38, 26.43; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{21}H_{18}BrF_3N_5OS$ $[M+H]^+$ 524.0362, found 524.0362.

1-(3-三氟甲基-4-溴苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9l**): 产率 77.0%. 类白色粉末状固体, m.p. 176~178 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.12 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=2.4, 8.7$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.02 (dd, $J=2.4, 5.7$ Hz, 1H), 4.01~4.13 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.14, 163.59, 152.20, 151.46, 149.42, 140.33, 137.64, 135.37, 134.60, 128.93, 128.66, 128.36, 125.86, 123.14, 122.45, 122.02, 121.54, 120.63, 113.20, 110.95, 107.33, 41.14, 22.80; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{23}H_{22}BrF_3N_5OS$ $[M+H]^+$ 552.0675, found 552.0670.

1-(4-氯苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9m**): 产率 60.3%. 灰色粉末状固体, m.p. 183~186 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.87 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.64 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.38 (dd, $J=8.9, 2.5$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.04 (dd, $J=5.4, 2.4$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.20, 165.22, 152.25, 151.43, 149.46, 139.11, 137.28, 135.07, 128.87, 128.78, 128.73, 125.81, 125.71, 121.54, 110.72, 107.34, 60.29, 26.44, 21.29, 14.62; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{20}H_{19}ClN_5OS$ $[M+H]^+$ 412.0994, found 412.0991.

1-(3,5-双三氟甲基苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9n**): 产率 59.5%. 类白色固体, m.p. 172~175 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.93 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.33 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J=6.8, 2.4$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.41~7.46 (m, 1H), 7.37 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.19~7.22 (m, 2H), 7.00 (dd, $J=5.7, 2.5$ Hz, 1H), 4.02~4.11 (m, 1H), 1.17 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.46, 163.48, 155.88, 153.45, 152.36, 137.38, 137.34, 134.94, 134.94, 126.37, 125.84, 125.84, 125.22, 125.15, 121.61, 121.61, 119.25, 119.06, 117.04, 116.82, 110.88, 107.29, 41.16, 22.80; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{24}H_{22}F_6N_5OS$ $[M+H]^+$ 542.1444, found 542.1444.

1-(3,5-双三氟甲基苯基)-3-{4-[2-(甲基氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9o**): 产率 56.1%. 浅灰色粉末状固体, m.p. 196~198 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.28 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.64 (q, $J=4.8$ Hz, 1H), 8.29 (s, 2H), 8.23 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.61 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.43~7.48 (m, 2H), 7.22~7.27 (m, 2H), 7.03 (dd, $J=5.7, 2.5$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.29, 165.21, 152.05, 151.51, 149.53, 142.50, 137.96, 134.21, 130.65, 130.32, 130.00, 127.87, 126.05, 125.15, 124.07, 124.02, 122.44, 121.50, 117.24, 110.87, 107.43, 26.42; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $C_{22}H_{18}F_6N_5OS$ $[M+H]^+$ 514.1131, found 514.1129.

1-(4-三氟甲氧基苯基)-3-{4-[2-(异丙氨甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9p**): 产率 64.4%. 淡黄色粉末状固体, m.p. 174~176 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.91 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.32 (d, $J=8.4$

Hz, 1H), 8.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.59~7.65 (m, 2H), 7.60 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.01 (dd, $J=5.7$, 2.5 Hz, 1H), 4.04~4.13 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.34, 163.59, 152.32, 151.41, 149.36, 145.07, 145.06, 145.04, 145.02, 139.38, 137.29, 135.07, 125.71, 124.49, 121.94, 121.65, 121.58, 119.40, 116.85, 110.87, 107.28, 41.14, 22.79; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$ 490.1519, found 490.1517.

1-(4-三氟甲氧基苯基)-3-{4-[2-(甲氨基甲酰基)吡啶-4-氨基]苯基}硫脲(**9q**): 产率 69.0%. 土黄色粉末状固体, m.p. 178~180 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.16 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.62~8.66 (m, 1H), 8.21 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.02 (dd, $J=5.7$, 2.5 Hz, 1H), 2.80 (d, $J=4.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.22, 165.22, 152.27, 151.42, 149.44, 144.95, 139.38, 137.22, 135.11, 125.52, 125.45, 125.40, 124.24, 122.42, 121.63, 121.52, 120.62, 119.40, 110.68, 107.35, 26.42; HRMS (positive-ESIMS) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_5\text{NaO}_2\text{S}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^{+}$ 484.1026, found 484.1020.

3.2.5 生物活性测试

17 个新化合物的体外抗肿瘤活性评价使用噻唑蓝 (MTT)法进行. 将细胞接种到 96 孔培养板中(每孔接种 4×10^3 个细胞), 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h 使细胞贴壁, 24 h 后将培养液吸出, 加入含有不同浓度新化合物或阳性药的培养液, 每株细胞的每个药物浓度设置 3 个平行孔, 对照孔加入等体积的 DMSO, 将细胞重新放回培养箱中培养 72 h, 72 h 后用 MTT 检测肿瘤细胞活力, 计算每个化合物对各细胞系的抑制率, 使用 Microsoft Excel 2010 中的 EXP 法预测 IC_{50} 值. 随后, 用 Rat Podocyte 细胞系检测优选化合物的毒性, 对化合物的成药性进行初步的评价.

辅助材料(Supporting Information) 部分中间体及最终产物的氢谱、碳谱和高分辨图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Robert, R. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 399, 313.
- [2] Rawan, A.; Rachel, H.; Sophia, E.; Elia, S.; Jacob, B. *Oncotarget* **2016**, 7, 18694.
- [3] Huang, T. G.; Michael, K.; Zhuge, J.; Zhong, M. H.; Liu, D. L. *J. Hematol. Oncol.* **2013**, 6, 30.
- [4] Yang, Y. S.; Zhang, F.; Tang, D. J.; Yang, Y. H.; Zhu, H. L. *Plos One* **2014**, 9, 1.
- [5] Wagle, N.; Van Allen, E. M.; Treacy, D. J.; Frederick, D. T.; Cooper, Z. A.; Taylor-Weiner, A.; Rosenberg, M.; Goetz, E. M.; Sullivan, R. J.; Farlow, D. N.; Friedrich, D. C.; Anderka, K.; Perrin, D.; Johannessen, C. M.; McKenna, A.; Cibulskis, K.; Kryukov, G.; Hodis, E.; Lawrence, D. P.; Fisher, S.; Getz, G.; Gabriel, S. B.; Carter, S. L.; Flaherty, K. T.; Wargo, J. A.; Garraway, L. A. *Cancer Discovery* **2014**, 4, 61.
- [6] Rauch, J.; O'Neill, E.; Mack, B.; Matthias, C.; Munz, M.; Kolch, W.; Gires, O. *Cancer Res.* **2010**, 70, 1679.
- [7] Shi, H.; Moriceau, G.; Kong, X.; Lee, M. K.; Lee, H.; Koya, R. C.; Ng, C.; Chodon, T.; Scolyer, R. A.; Dahlman, K. B.; Sosman, J. A.; Kefford, R. F.; Long, G. V.; Nelson, S. F.; Ribas, A.; Lo, R. S. *Nat Commun.* **2012**, 3, 724.
- [8] Vasbinder, M. M.; Aquila, B.; Augustin, M.; Chen, H.; Cheung, T.; Cook, D.; Drew, L.; Fauber, B. P.; Glossop, S.; Grondine, M.; Hennessey, E.; Johannes, J.; Lee, S.; Lyne, P.; Mortl, M.; Omer, C.; Palakurthi, S.; Pontz, T.; Read, J.; Sha, L.; Shen, M.; Steinbacher, S.; Wang, H.; Wu, A.; Ye, M. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1996.
- [9] Tang, J.; Hamajima, T.; Nakano, M.; Sato, H.; Dickerson, S. H.; Lackey, K. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 4610.
- [10] Wilhelm, S. M.; Adnane, L.; Newell, P.; Villanueva, A.; Llovet, J. M.; Lynch, M. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 3129.
- [11] Ambrosini, G.; Cheema, H. S.; Seelman, S.; Teed, A.; Sambol, E. B.; Singer, S.; Schwartz, G. K. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 890.
- [12] Hong, D. S.; Cabanillas, M. E.; Wheler, J.; Naing, A.; Tsimberidou, A. M.; Ye, L.; Waguespack, S. G.; Hernandez, M.; El Naggar, A. K.; Bidyasar, S.; Wright, J.; Sherman, S. I.; Kurzrock, R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, 96, 997.
- [13] Adnane, L.; Trail, P. A.; Taylor, I.; Wilhelm, S. M. *Method Enzymol.* **2006**, 407, 597.
- [14] Jean, G. W.; Mani, R. M.; Jaffry, A.; Khan, S. A. *Clin. Rev. Educ.* **2016**, 2, 529.
- [15] Gedaly, R.; Angulo, P.; Hundley, J.; Daily, M. F.; Chen, C.; Koch, A.; Evers, B. M. *Anticancer Res.* **2010**, 30, 4951.
- [16] Richetta, A. G.; Maiani, E.; Carboni, V.; Carlomagno, V.; Cimillo, M.; Mattozzi, C.; Calvieri, S. *Eur. J. Dermatol.* **2012**, 55, 1082.
- [17] Justin D.; Vijay G.; Wang X. D.; Laurence H. H.; Gary A. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 292.
- [18] Yao, J.; Chen, J.; He, Z.; Sun, W.; Xu, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2923.
- [19] Kong, X.; Yao, Z.; He, Z.; Xu, W.; Yao, J. *MedChemComm* **2015**, 6, 867.
- [20] Scott, A. F.; Daniel, M. W.; Aysxegül, Ö.; Matthew, J. W. C. K.; Yin, J. P.; Ivana, Y.; Gabriele, S.; John, D. M.; Juliann, C.; Philip, J. S.; Lee, A. A.; Yan, J. B.; Kyung, S.; Georgia, H.; Charles, E.; Christine, Y.; Andrey, S. S.; Gerard, M.; Nicholas, J. S.; Sarah, G. H.; Shiva, M. *Cancer Cell* **2016**, 29, 477.
- [21] Harry, S. M.; Melvin, L. *Heterocycl. Basic Comd.* **1954**, 20, 285.
- [22] Wei, L.; Xin, Z.; Lu, D.; Limin, S.; Chen, X. M.; Ping, G.; Sun, T. M. *Molecules* **2011**, 16, 5134.

(Li, L.; Fan, Y.)