(*E*)-*N*-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺类 DNA 拓扑异构酶 II α 抑制剂的合成及抗肿瘤活性研究

尹丽君^a 李超群^a 吴晓霞^a 徐广森^a 李志颖^a 沈月毛^{*}

(山东大学药学院 天然产物化学教育部重点实验室 济南 250012)

摘要 人 DNA 拓扑异构酶 II α (topoisomerase II α , Topo II α) 是重要的抗肿瘤药物靶标之一。为发现新的高效、低毒 Topo II α 抑制剂, 本研究通过对先导化合物 CL-2 进行骨架跃迁, 设计合成了 18 个(*E*)-*N*-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺衍生物(A1~A9, B1~B9)。18 个化合物对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和人急性髓性白血病 KG1 细胞生长的抑制实验结果表明, (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯基)苯基)-3-(邻-甲基)丙烯酰胺(B1)和(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯基)苯基)-3-(4-硝基苯基)丙烯酰胺(B9)抑制 KG1 细胞生长的 IC₅₀ 分别为 0.43 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$; (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯基)苯基)-3-(2-羟基苯基)丙烯酰胺(B4)对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用(IC₅₀=0.82 $\mu\text{mol/L}$)超过阳性对照 VP16 (IC₅₀=6.62 $\mu\text{mol/L}$)。(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯基)苯基)-3-(邻-甲基)丙烯酰胺(A1)、B1、(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯基)苯基)-3-(2-甲氧基)丙烯酰胺(A4)、B4、(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯基)苯基)-3-(噻吩-3-基)丙烯酰胺(A9)和 B9 体外抑制 Topo II α 介导的 DNA 松弛作用。研究结果为发现新骨架 Topo II α 抑制剂提供了新方向。

关键词 拓扑异构酶 II α ; 设计合成; 结构优化; 抗肿瘤活性

Synthesis of (*E*)-*N*-(4-Styrene) Acrylamides for DNA Topoisomerase II α Inhibitors and Antitumor Agents

Yin, Lijun Li, Chaoqun Wu, Xiaoxia Xu, Guangsen Li, Zhiying Shen, Yuemao^{*}

(Key Laboratory of Chemical Biology, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012)

Abstract Human DNA topoisomerase II α (Topo II α) is one of the important targets of antitumor drugs. In this study, eighteen (*E*)-*N*-(4-styrene) acrylamide derivatives (A1~A9, B1~B9) were designed and synthesized through skeleton hopping of the lead compound CL-2 for the discovery of new high-efficient and low-toxic Topo II α inhibitors. In vitro growth inhibition experiments of human triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells and human acute myeloid leukemia KG1 cells were carried out for these eighteen compounds. Amongst, (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-dihydroxystyryl)phenyl)-3-(*o*-tolyl) acrylamide (B1) and (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-dihydroxystyryl)phenyl)-3-(4-nitrophenyl) acrylamide (B9) showed evident cytotoxicity against the KG1 cells with the IC₅₀ values of 0.43 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$, respectively. (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-dihydroxyphenyl)phenyl)-3-(2-hydroxyphenyl) acrylamide (B4) showed stronger growth inhibitory effect (IC₅₀=0.82 $\mu\text{mol/L}$) against the MDA-MB-231 cells than that of the positive control VP16 (IC₅₀=6.62 $\mu\text{mol/L}$). (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-Dimethoxystyryl)phenyl)-3-(*o*-tolyl)-acrylamide (A1)、B1、(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-dimethoxystyryl)phenyl)-3-(2-methoxyphenyl)acrylamide (A4)、B4、(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-dimethoxystyryl)phenyl)-3-(thiophen-3-yl)acrylamide (A9) and B9 inhibited Topo II α -mediated DNA relaxation *in vitro*. These results provide a new direction for the discovery of new skeleton Topo II α inhibitors.

Keywords topoisomerase II α ; design and synthesis; structure optimization; antitumor activity

恶性肿瘤严重危害人类健康。世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)发布的 2020 年全球最新癌症负担数

^{*} Corresponding author. E-mail: yshen@sdu.edu.cn

Received May 6, 2021; revised June 6, 2021; published online June 28, 2021.

Project supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2010CB833802), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81273384, 90913024, 91313303), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT_17R68), and the Distinguished Young Scholars Grant (No. 30325044).

国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2010CB833802)、国家自然科学基金(Nos. 81273384, 90913024, 91313303)、长江学者和创新团队发展计划(IRT_17R68)和国家杰出青年科学基金(No. 30325044)资助项目。

据显示, 2020 年全球新发癌症 1930 万例, 死亡近 1000 万例; 女性乳腺癌成为全球最常见癌症, 其中三阴性乳腺癌的治愈率最低, 死亡率最高; 人急性骨髓白血病也是导致癌症死亡的主要原因之一, 是成年人发病率最高的一种白血病^[1]. 肿瘤治疗是一个世界性的难题, 目前治疗手段主要以手术、化疗和放疗等为主. 化疗是目前肿瘤治疗最广泛使用的方法, 但具有不良反应大、易产生耐药性等缺点, 要求我们不断寻求新型治疗药物.

DNA 拓扑异构酶是生物体中的一种基本酶, 广泛分布于细胞核内, 在复制、转录、翻译、重组及染色体单体分离等过程中控制、维持和修饰 DNA 拓扑结构^[2-4]. 人 DNA 拓扑异构酶主要包括 I 型拓扑异构酶与 II 型拓扑异构酶. I 型拓扑异构酶(Topo I)在 ATP 非依赖下产生 DNA 单链断裂, 改变 DNA 超螺旋或螺旋化不足的情况; II 型拓扑异构酶(Topo II)包括 Topo II α 和 II β 两种亚型. Topo II α 倾向于对正超螺旋的 DNA 起作用, 对细胞增殖起重要作用, 在细胞快速增殖期含量较高, 在肿瘤细胞中表现出不受其他因素影响的高水平表达, 因此抑制肿瘤细胞 Topo II α 的活性能起到遏制肿瘤细胞快速增殖、进而杀死肿瘤细胞的作用; 而 Topo II β 没有对超螺旋 DNA 构象的特殊选择性, 在细胞中含量相对稳定, 与细胞增殖状态及细胞周期无相关性^[5-6]. 因而 Topo II α 是目前抗肿瘤药物的一个重要作用靶标. 目前以 Topo II α 为靶点的抗肿瘤药物主要有: 阿霉素(doxorubicin)、依托泊苷(etoposide, VP16)、米托蒽醌(mitoxantrone)和安吡啶(amsacrine)(图 1). 然而, 肿瘤对 Topo II α 抑制剂药物有多种抗药机制, 会导致化疗失败. 因此, 迫切需要新的 Topo II α 抑制剂.

图 1 代表性 Topo II α 抑制剂

Figure 1 Structures of the representative Topo II α inhibitors

CL-2 是课题组前期发现的新型 Topo II α 抑制剂, 具有较强的 Topo II α 抑制与抗肿瘤细胞增殖活性. 本研究对先导化合物 CL-2 进行了合理化修饰, 在 A 环上进行不同取代, 以探究甲氧基与羟基对目标化合物生物活性的影响; 在 C 环(苯环)引入不同的给电子或吸电子基团, 另外, 还采用生物电子等排体方法, 尝试将原有的苯环(C 环)替换为噻吩环, 设计合成了 18 个(E)-N-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺衍生物(Scheme 1), 并筛选了其抑制人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和人急性骨髓性白血病 KG1 细胞生长的活性, 并测定了活性较好的 6 个化合物体外抑制 Topo II α 酶的作用.

图式 1 (E)-N-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺类衍生物的设计策略
Scheme 1 Design of (E)-N-(4-styrylphenyl)acrylamides

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

以 1-(溴甲基)-3,5-二甲氧基苯(1)与亚磷酸三磷酸为起始原料, 得到中间体(3,5-二甲氧基苯基)膦酸二乙酯(2) (Scheme 2). 中间体 2 与 4-溴苯甲醛反应得到(E)-1-(4-溴苯乙烯基)-3,5-二甲氧基苯(3). 同时, 9 个肉桂酸衍生物(4a~4i)与氯化亚砷反应, 分别得到取代肉桂酰氯 5a~5i, 再分别与氨水反应得到取代肉桂酰胺中间体 6a~6i. 中间体 3 分别与中间体 6a~6i 发生 Goldberg 偶联反应得到化合物 A1~A9. 化合物 A1~A9 分别脱甲基得到化合物 B1~B9 (Scheme 2). 通过熔点测定、核磁共振波谱、质谱和高分辨质谱数据分析确定了化合物 A1~A9 和 B1~B9 的结构.

1.2 细胞毒性实验结果

以 VP16 为阳性对照, 采用 CCK8 法测定化合物 A1~A9 和 B1~B9 对 MDA-MB-231 细胞和 KG1 细胞的生长抑制作用. 结果表明, 大部分化合物对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用表现出中等至强活性(表 1), B4 的作用最强, IC₅₀=0.82 μ mol/L; B1 和 B9 对 KG1 细胞的生长抑制作用表现出强活性; B9 对 MDA-MB-231 细胞和 KG1 细胞的生长抑制都表现出强活性, IC₅₀ 分别为 1.88 和 0.5 μ mol/L(表 1).

1.3 体外抑制 Topo II α 活性

采用 pBR322 DNA 松弛实验, 以 VP16 (100 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照, 评价先导化合物 CL-2、化合物 **A1**、**B1**、**A4**、**B4**、**A9** 和 **B9** 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 Topo II α 酶的抑制作用. 0.25 g 的超螺旋 DNA 在 1U Topo II α 的作用下, 由超螺旋型(supercoiled DNA)全部变为松弛型(relaxed DNA). 体积分数为 1% 的 DMSO 的药物溶媒对 Topo II α 介导的 DNA 松弛作用没有任何影响. VP16 能显著抑制 Topo II α 酶介导的 DNA 松弛作用, 使 pBR322 DNA 能够完全保持超螺旋结构. 化合物 **A1**、**B1**、**A4**、**B4**、**A9** 和 **B9** 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 能够抑制 Topo II α 介导的 DNA 松弛作用, pBR322 DNA 保持超螺旋结构, 作用强度与阳性对照 VP16 相当(图 2).

1.4 分子对接

为了进一步阐明化合物 **B9** 与人 DNA Topo II α 酶的作用模式, 将 **B9** 对接至 Topo II α (5GWK) 的活性口袋. 发现 **B9** 结合至 Topo II α 酶和 DNA 之间的空腔, 且空间位置偏向于 DNA, 以紧凑的构象与活性口袋与周围的氨基酸和核苷酸形成相互作用. 其 A 环上的两个羟基分别与核苷酸 DT-9、氨基酸残基 Ser-464、Asp-463 和 Gly-462 形成氢键, B 环酰胺键与核苷酸 DC-8 形成氢键(图 3). 所有这些相互作用使 **B9** 与 Topo II α 形成稳定的复合物.

1.5 讨论

本研究设计合成了 18 个 (*E*)-*N*-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺衍生物. 细胞毒性实验结果表明, 18 个化合物中 12 个

图式 2 化合物 **A1**~**A9** 和 **B1**~**B9** 的合成路线
Scheme 2 Synthesis of compounds **A1**~**A9** and **B1**~**B9**

图 2 (*E*)-*N*-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺类体外抑制 Topo II α 的活性
Figure 2 Inhibitory activity of (*E*)-*N*-(4-styrylphenyl)acrylamides against DNA Topoisomerase II α *in vitro*

图3 化合物 B9 对接至 Topo II α 的活性口袋Figure 3 Compound B9 docked into the binding site of Topo II α

表1 化合物 A1~A9 和 B1~B9 对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和人急性骨髓性白血病 KG1 细胞的生长抑制作用

Table 1 Inhibitory activity of A1~A9 and B1~B9 against the growth of human breast cancer MDA-MB-231 cells and human acute myeloleukemia KG1 cells

Compd.	Ar	KG1/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	MDA-MB-231/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Compd.	Ar	KG1/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	MDA-MB-231/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
A1	<i>o</i> -Tolyl	8.3	1.87	B2	<i>m</i> -Tolyl	3.18	7.61
A2	<i>m</i> -Tolyl	>10	>10	B3	<i>p</i> -Tolyl	7.92	6.52
A3	<i>p</i> -Tolyl	>10	>10	B4	2-Hydroxyphenyl	1.6	0.82
A4	2-Methoxyphenyl	>10	3.91	B5	3-Hydroxyphenyl	3.03	1.53
A5	3-Methoxyphenyl	>10	3.72	B6	4-Hydroxyphenyl	6.36	2.17
A6	4-Methoxyphenyl	>10	>10	B7	3-Nitrophenyl	2.58	3.49
A7	3-Nitrophenyl	>10	>10	B8	Thiophen-2-yl	1.59	4.02
A8	Thiophen-2-yl	>10	>10	B9	Thiophen-3-yl	0.5	1.88
A9	Thiophen-3-yl	>10	2.7	CL-2		1.35	2.90
B1	<i>o</i> -Tolyl	0.43	3.56	VP16		0.91	6.62

对 MDA-MB-231 细胞有较强生长抑制作用, 2 个对人急性骨髓性白血病 KG1 细胞有强生长抑制作用. 构效关系发现, 未脱甲基的 A 系列化合物中有 4 个(A1、A4、A5 和 A9)抑制 MDA-MB-231 细胞生长; 脱甲基的 B 系列化合物有 8 个(B1、B3、B4、B5、B6、B7、B8 和 B9)抑制 MDA-MB-231 细胞的作用强于 VP16, 且 2 个化合物(B1 和 B9)对 KG1 细胞有强生长抑制作用.

与 A 系列相比, 脱甲基之后的 B 系列化合物抗肿瘤活性明显增强. 此外, C 环上取代基的位置也对化合物(A1~A6 和 B1~B6)的抗增殖活性有一定的影响: 在 C 环邻位引入取代基时, 相较于在间位或对位取代, 化合物抗增殖活性更强(表 1). 同样是将苯环替换为噻吩环, 3-噻吩(A9、B9)明显优于 2-噻吩取代的目标化合物(A8、B8).

体外抑制 Topo II α 活性测定结果表明, B1、B4、B9 和 CL-2 组, 超螺旋型 DNA (Supercoiled DNA)向松弛型 (relaxed DNA)转化量很低, 尤其是 B4 和 CL-2 组, 松弛

型 DNA 几乎不可见, 说明 100 $\mu\text{mol/L}$ 下, B4 和 CL-2 可完全抑制 Topo II α 活性. 然而 A1、A4、A9 和 VP16 组松弛型 DNA 比例较高, 仅部分抑制了 Topo II α 的活性. 研究发现, 脱甲基的 B 系列化合物的 Topo II α 酶抑制活性强于未脱甲基的 A 系列化合物(图 2).

2 结论

以 CL-2 为先导化合物进行合理化修饰, 设计合成了 18 个(*E*)-*N*-(4-苯乙烯基)丙烯酰胺衍生物(Scheme 1). 细胞毒性实验研究发现, A 系列和 B 系列分别有 4 个和 8 个化合物对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用强于 VP16, B4 的抑制作用最强($\text{IC}_{50}=0.82 \mu\text{mol/L}$); B1 和 B9 对 KG1 细胞的生长抑制作用强于 VP16, IC_{50} 值分别为 0.43 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$. 体外 Topo II α 抑制实验结果表明, 化合物 A1、B1、A4、B4、A9 和 B9 抑制 Topo II α 介导的 DNA 松弛作用, 且 A 环上为羟基的 B 系列化合物的抑制作用比 A 环上为甲氧基的 A 系列化合物要好, 与细胞

毒性一致. 本研究为发现新骨架 Topo II α 抑制剂提供了新方向.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

柱色谱使用 60~100 和 200~300 目硅胶(购自青岛海洋化工厂); 核磁共振仪为 Bruker Avance-400 型, 以 TMS 为内标; 质谱仪为 LTQ-Orbitrap XL 型(Thermo Fisher), 离子源采用电喷雾离子化(ESI); 熔点用 X-5 型显微熔点仪测定(温度未校正); ChemDoc XRS⁺凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); 薄层色谱使用 Silica Gel GF254(购自青岛海洋化工厂). 所有试剂均为国产或进口分析纯, 无水溶剂用常规方法干燥处理.

3.2 合成

3.2.1 中间体 2 制备

中间体 2 按照文献[7]制备. 称取 1-溴甲基-3,5-二甲氧基苯(27 g, 120 mmol)和亚磷酸三乙酯(63 mL, 360 mmol)于烧瓶中, 140 °C 下回流 4 h. 反应完成后, 降温, 减压蒸除溶剂, 得到中间体 2, 表征数据与文献[7]一致.

3.2.2 中间体 3 的制备

称取中间体 2,4-溴苯甲醛(14 g, 120 mmol)和 NaOMe (13 g, 240 mmol)溶解于 100 mL 圆底烧瓶中的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) (80 mL), 室温过夜. 反应完成后, 冰水淬灭, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 减压蒸除溶剂, 得到中间体 (*E*)-1-(4-溴苯基)-3,5-二甲氧基苯(3)^[8], 白色粉末, 产率 78%. m.p. 100~101 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.58 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.56 (d, *J*=9 Hz, 2H), 7.29 (d, *J*=16.4 Hz, 1H), 7.24 (d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.79 (d, *J*=2.3 Hz, 2H), 6.44 (t, *J*=2.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 6H); ESI-MS *m/z*: 319.4 [M+H]⁺.

3.2.3 中间体 5a~5i 的制备

中间体 5a~5i 按照文献[9]制备, 以化合物 5a 的合成例. 称取化合物 4a (0.54 g, 3.03 mmol)溶解至 100 mL 圆底烧瓶中的二氯甲烷(30~50 mL), 再加 3 mL 氯化亚砷和 200 μ L DMF, 加干燥装置, 冰浴中搅拌反应 5 h. 反应完成后, 减压蒸除溶剂, 得到中间体 5a.

3.2.4 中间体 6a~6i 的制备

中间体 6a~6i 的制备, 以化合物 6a 的合成例. 将中间体 5a 溶解至 100 mL 圆底烧瓶中的四氢呋喃(20~30 mL)中, 混合物在冰浴下搅拌 10 min, 再加入氨水 2~3 mL, 冰浴中搅拌反应 2 h. 反应完成后减压蒸除溶剂, 加水 50~70 mL, 超声、过滤、干燥, 得到中间体 6a.

(*E*)-3-(邻-甲基)丙烯酰胺(6a): 白色粉末, 产率 81.9%. m.p. 150~152 °C (lit.^[10] 151~153 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.67 (d, *J*=15.8 Hz, 1H), 7.59~7.50 (m, 2H), 7.29~7.19 (m, 3H), 7.13 (s, 1H), 6.53 (d, *J*=15.8 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H); ESI-MS *m/z*: 162.0 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(间-甲基)丙烯酰胺(6b)^[11]: 油状物, 产率 51.8%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.52 (s, 1H), 7.48~7.21 (m, 4H), 7.20 (d, *J*=7.4 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.62 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 2.33 (s, 3H); ESI-MS *m/z*: 162.0 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(对-甲基)丙烯酰胺(6c): 白色粉末; 收率 72.5%; m.p. 189~191 °C (lit.^[12] 188~191 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.52~7.41 (m, 3H), 7.39 (d, *J*=15.8 Hz, 1H), 7.23 (d, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.07 (s, 1H), 6.57 (d, *J*=15.8 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H); ESI-MS *m/z*: 161.9 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(2-甲氧苯基)丙烯酰胺(6d): 白色粉末, 产率 71.6%. m.p. 193~196 °C (lit.^[13] 192 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.67 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 7.55~7.48 (m, 2H), 7.41~7.32 (m, 1H), 7.03~6.95 (m, 2H), 7.00 (dt, *J*=7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.64 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H); ESI-MS *m/z*: 179.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(3-甲氧苯基)丙烯酰胺(6e): 白色粉末, 产率 74.6%. m.p. 175~176 °C (lit.^[13] 179 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.52 (s, 1H), 7.47~7.28 (m, 2H), 7.17~7.09 (m, 3H), 6.99~6.92 (m, 1H), 6.64 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H); ESI-MS *m/z*: 179.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(4-甲氧苯基)丙烯酰胺(6f): 白色粉末, 产率 88%. m.p. 198~200 °C (lit.^[12] 194~195 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.54~7.43 (m, 3H), 7.39 (d, *J*=15.8 Hz, 1H), 7.06~6.93 (m, 3H), 6.49 (d, *J*=15.8 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H); ESI-MS *m/z*: 178.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(3-硝基)丙烯酰胺(6g): 白色粉末, 产率 66.0%. m.p. 197~198 °C (lit.^[14] 194~195 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.40 (t, *J*=2.0 Hz, 1H), 8.25~8.18 (m, 1H), 8.04 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.73 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.64~7.50 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 6.84 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); ESI-MS *m/z*: 193.2 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(噻吩-2-基)丙烯酰胺(6h): 白色粉末, 产率 76.3%. m.p. 156~158 °C (lit.^[15] 162~163 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.67~7.47 (m, 3H), 7.36 (dd, *J*=1.1, 1Hz, 1H), 7.17~7.03 (m, 2H), 6.38 (d, *J*=15.5 Hz, 1H); ESI-MS *m/z*: 153.8 [M+H]⁺.

(*E*)-3-(噻吩-3-基)丙烯酰胺(6i)^[16]: 白色粉末, 产率

69.7%. m.p. 174~176 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.78 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 7.64~7.57 (m, 1H), 7.52~7.37 (m, 2H), 7.35 (dd, $J=5.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.44 (d, $J=15.8$ Hz, 1H); ESI-MS m/z : 153.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2.5 化合物 A1~A9 的制备

以 A1 的合成例. 称取中间体 6a (0.32 g, 2 mmol)、中间体 3 (0.64 g, 2 mmol)、碘化亚铜(0.19 g, 1 mmol)、 N,N' -二甲基-1,2-环己二胺(0.30 g, 2 mmol)及碳酸钙(0.56 g, 4 mmol), 溶解至 50 mL 圆底烧瓶中的二氧六环(20~30 mL), 氩气保护, 110 °C 搅拌反应 24 h, 薄层色谱(TLC)检测反应进程. 反应完成后, 冷却至室温, 减压蒸除部分溶剂. 粗产物经硅胶柱层析分离, 二氯甲烷/乙酸乙酯($V:V=100:1$)洗脱得到(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(邻-甲苯基)丙烯酰胺(A1), 白色粉末, 产率 65.2%. m.p. 205~207 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 7.84 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.64~7.54 (m, 3H), 7.35~7.26 (m, 3H), 7.26 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.85~6.75 (m, 2H), 6.76 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 6.41 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.78 (s, 6H), 2.42 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.0, 161.2, 139.8, 139.3, 138.2, 137.5, 134.0, 132.6, 131.3, 130.0, 129.0, 127.7, 127.6, 127.0, 126.6, 123.9, 119.8, 104.8, 100.2, 55.7, 19.9. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 434.1528, found 434.1533.

采用相同方法制备得到化合物 A2~A9.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(间-甲苯基)丙烯酰胺(A2): 白色粉末, 产率 66.7%. m.p. 155~157 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.27 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.62~7.53 (m, 3H), 7.44 (d, $J=10.8$ Hz, 2H), 7.36 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J=11.9, 4.5$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 6.81~6.71 (m, 2H), 6.41 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.78 (s, 6H), 2.35 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.0, 161.2, 140.8, 139.8, 139.4, 138.7, 135.2, 132.6, 131.0, 129.4, 129.1, 128.7, 127.6, 125.4, 122.6, 119.8, 104.8, 100.2, 55.7, 21.4. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 434.1528, found 434.1533.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(对-甲苯基)丙烯酰胺(A3): 白色粉末, 产率 61.3%. m.p. 236~238 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.24 (s, 1H), 7.73 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.64~7.49 (m, 5H), 7.38~7.17 (m, 3H), 7.12 (d, $J=16.3$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.41 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.78 (s, 6H), 2.34 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)

δ : 164.1, 161.2, 140.7, 140.1, 139.8, 139.4, 132.5, 130.1, 129.1, 128.2, 127.6, 121.6, 119.8, 104.8, 100.2, 55.7, 21.5. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 434.1528, found 434.1528.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(2-甲氧苯基)丙烯酰胺(A4): 白色粉末, 产率 73.2%. m.p. 217~219 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.26 (s, 1H), 7.85 (d, $J=15.8$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.62~7.54 (m, 3H), 7.45~7.37 (m, 1H), 7.26 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.15~7.07 (m, 2H), 7.03 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J=15.8$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.3$ Hz, 2H), 6.42 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.79 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz,) δ : 164.4, 161.2, 158.3, 139.8, 139.5, 135.9, 132.5, 131.7, 129.1, 128.8, 127.6, 123.6, 123.1, 121.3, 119.8, 112.3, 104.8, 100.2, 56.1, 55.7. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 450.1478, found 450.1478.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(3-甲氧苯基)丙烯酰胺(A5): 黄色粉末, 产率 70.0%. m.p. 208~210 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 7.75 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.62~7.54 (m, 3H), 7.39 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.28~7.17 (m, 3H), 7.13 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J=8.2, 2.5$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.42 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.0, 161.2, 160.1, 140.7, 139.8, 139.4, 136.7, 132.6, 130.5, 129.1, 127.7, 127.6, 123.0, 120.6, 119.9, 116.2, 113.2, 104.8, 100.2, 55.7, 55.6. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 450.1478, found 450.1483.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(4-甲氧苯基)丙烯酰胺(A6): 白色粉末, 产率 62.1%. m.p. 198~200 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.21 (s, 1H), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.65~7.51 (m, 5H), 7.25 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 6.41 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.3, 161.2, 140.5, 139.8, 139.5, 132.4, 129.9, 129.1, 127.8, 127.6, 120.1, 119.7, 115.0, 104.8, 100.2, 55.8, 55.7. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 450.1478, found 450.1479.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(3-硝基苯基)丙烯酰胺(A7): 白色粉末, 产率 68.0%. m.p. 205~207 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.39 (s, 1H), 8.49 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.80~7.69 (m, 4H), 7.60 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J=16.4$ Hz,

1H), 7.09 (d, $J=15.8$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.42 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.79 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.4, 161.2, 148.8, 139.8, 139.2, 138.2, 137.1, 134.6, 132.8, 131.1, 129.0, 127.8, 127.6, 125.7, 124.5, 122.1, 119.9, 104.8, 100.2, 55.7. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 465.1223, found 465.1225.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(噻吩-2-基)丙烯酰胺(**A8**): 黄色粉末, 产率 74.9%. m.p. 206~208 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.28 (s, 1H), 7.78 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.16~7.12 (m, 1H), 7.12 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.3$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 6.41 (t, $J=2.3$ Hz, 1H), 3.78 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.7, 161.2, 140.2, 139.8, 139.4, 133.7, 132.6, 131.9, 129.1, 129.0, 127.57/127.63, 121.3, 119.7, 104.8, 100.2, 55.7. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 426.0936, found 426.0939.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯基)-3-(噻吩-3-基)丙烯酰胺(**A9**): 黄色粉末, 产率 58.6%. m.p. 227~229 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.25 (s, 1H), 7.90 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.68~7.62 (m, 2H), 7.60~7.53 (m, 2H), 7.41 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J=16.3$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.3$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.41 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 3.78 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.3, 161.2, 139.8, 139.4, 138.2, 134.8, 132.5, 129.1, 128.7, 128.4, 127.6, 127.5, 125.6, 122.1, 119.8, 104.8, 100.2, 55.7. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{-NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 392.1315, found 392.1314.

3.2.6 化合物 **B1**~**B9** 的制备

以 **B1** 的合成例. 称量化合物 **A1** (0.24 g, 0.75 mmol)溶解至 100 mL 圆底烧瓶中的二氯甲烷(30 mL), 混合物于冰盐浴中搅拌 10 min, 通过恒压滴液漏斗缓慢滴加 1 mmol/L 三溴化硼(4~5 mL), 氩气保护, 冰盐浴搅拌反应 5 h. 反应完成后, 淬灭(碳酸氢钠/水, $V:V=1:3$), 搅拌 30 min, 离心得粗产物. 粗产物经硅胶柱层析分离, 石油醚-乙酸乙酯($V:V=1:1$)洗脱得到 (*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(邻-甲基)丙烯酰胺(**B1**), 黄色粉末, 产率 55.6%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 9.24 (s, 2H), 7.84 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.65~7.53 (m, 3H), 7.35~7.24 (m, 3H), 7.03 (d, $J=16.6$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=16.8$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.1$ Hz, 1H), 2.42

(s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.0, 159.0, 141.9, 139.4, 139.2, 138.2, 137.5, 134.0, 132.7, 131.3, 130.0, 128.2, 127.9, 127.5, 127.0, 126.6, 123.9, 119.8, 105.0, 102.6, 19.9. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 406.1215, found 406.1211.

采用相同方法制备得到化合物 **B2**~**B9**.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(间-甲基)丙烯酰胺(**B2**): 黄色粉末, 产率 47.3%. m.p. 232~234 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.27 (s, 1H), 9.24 (s, 2H), 7.72 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.58 (dd, $J=12.2$, 3.4 Hz, 3H), 7.45 (d, $J=10.7$ Hz, 2H), 7.36 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.1$ Hz, 1H), 2.35 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.0, 159.0, 140.7, 139.4, 139.2, 138.7, 135.2, 132.7, 131.0, 129.4, 128.7, 128.1, 128.0, 127.5, 125.4, 122.6, 119.8, 105.0, 102.6, 21.4. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 406.1215, found 406.1215.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(对-甲基)丙烯酰胺(**B3**): 黄色粉末, 产率 41.1%. m.p. 206~208 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.24 (s, 1H), 9.24 (s, 2H), 7.72 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.63~7.47 (m, 5H), 7.28 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J=16.3$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.1$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.8, 164.1, 159.0, 140.7, 140.1, 139.4, 139.2, 132.7, 132.5, 130.1, 128.2, 128.1, 128.0, 127.5, 121.7, 119.8, 105.0, 102.6, 21.2. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 406.1215, found 406.1211.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(2-羟基苯基)丙烯酰胺(**B4**): 黄色粉末, 产率 30.1%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.22 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 9.23 (s, 2H), 7.80 (d, $J=15.8$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J=6.1$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.98(d, $J=15.8$ Hz, 1H), 6.94~6.83 (m, 2H), 6.43 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.7, 159.0, 157.1, 139.4, 136.9, 132.5, 131.3, 129.3, 128.0, 127.5, 122.2, 122.0, 119.9, 119.7, 116.7, 105.0, 102.6. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{-NO}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 408.1008, found 408.1006.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(3-羟基苯基)丙烯酰胺(**B5**): 黄色粉末, 产率 50.5%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.27 (s,

1H), 9.64 (s, 1H), 9.24 (s, 2H), 7.72 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.27 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.03~6.99 (m, 2H), 6.99 (d, $J=16.3$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J=2.4, 2.4$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 6.16 (t, $J=2.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.5, 164.0, 159.0, 158.2, 140.9, 139.4, 139.2, 136.5, 132.7, 130.5, 128.1, 127.9, 127.5, 122.4, 119.8, 119.4, 117.5, 114.3, 105.0, 102.6, 21.5. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Cl} [\text{M}+\text{Cl}]^-$ 408.1008, found 408.1003.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(4-羟基苯基)丙烯酰胺(**B6**): 黄色粉末, 产率 75.7%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, chloroform- d) δ : 10.15 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 7.71 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.61~7.50 (m, 2H), 7.48 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.91~6.79 (m, 2H), 6.62 (d, $J=15.6$ Hz, 2H), 6.42 (d, $J=2.1$ Hz, 3H), 6.14 (t, $J=2.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.5, 159.7, 159.0, 140.9, 139.5, 139.4, 132.5, 130.0, 128.0, 127.5, 126.2, 119.7, 119.0, 116.4, 105.0, 102.6. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NO}_4 [\text{M}-\text{H}]^-$ 372.1241, found 372.1244.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(3-硝基苯基)丙烯酰胺(**B7**): 黄色粉末, 产率 39.8%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.39 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.49 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.31~8.23 (m, 1H), 8.10 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.85~7.67 (m, 5H), 7.58 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J=15.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J=16.9$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.3, 159.0, 148.8, 139.4, 139.0, 138.2, 137.1, 134.6, 132.9, 131.1, 128.3, 127.9, 127.5, 125.7, 124.5, 122.1, 119.8, 105.0, 102.7, 21.5. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl} [\text{M}+\text{Cl}]^-$ 437.0910, found 437.0907.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(噻吩-2-基)丙烯酰胺(**B8**): 黄色粉末, 产率 53.2%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.25 (s, 1H), 9.23 (s, 2H), 7.77 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 7.72~7.65 (m, 3H), 7.56 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.10~7.12 (m, 1H), 7.02 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=16.3$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.7, 159.0, 140.2, 139.4, 139.2, 133.69, 132.7, 131.8, 129.0, 128.1, 127.9, 127.5, 121.3, 119.7, 105.0, 102.6. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SCl} [\text{M}+$

$\text{Cl}]^-$ 398.0623, found 398.0623.

(*E*)-*N*-(4-((*E*)-3,5-二羟基苯乙烯基)苯基)-3-(噻吩-3-基)丙烯酰胺(**B9**): 黄色粉末, 产率 40.7%. m.p. >250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.23 (s, 1H), 9.23 (s, 2H), 7.90 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.68~7.64 (m, 1H), 7.62 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.41 (dd, $J=5.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J=2.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.3, 159.0, 139.4, 139.3, 138.3, 134.7, 132.6, 128.7, 128.4, 128.1, 128.0, 127.5, 125.6, 122.1, 119.7, 105.0, 102.6. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SCl} [\text{M}+\text{Cl}]^-$ 398.0623, found 398.0625.

3.3 体外抗肿瘤活性试验

体外抗肿瘤活性测定采用 CCK8 法, 以 VP16 为阳性对照, 具体实验方法和实验数据处理方法见相应参考文献[17~19]. MDA-MB-231 细胞接种于含完全培养基的 96 孔细胞培养板中, 每孔细胞密度为 3×10^3 个/孔. 37 °C 恒温培养 12 h 后, 各孔分别加入 VP16、CL-2 和不同浓度的目标化合物. 37 °C, 5% CO_2 培养箱继续恒温培养 72 h 后, 每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CCK8 试剂, 继续培养 4 h, 移除培养基和 CCK8. 加入 200 μL DMSO 溶解结晶. 用酶标仪(Bio-Rad680, USA) OD570 nm 处测量各孔的吸光值并计算抑制率. KG1 细胞的活性测定方法相同. MDA-MB-231 细胞和 KG1 细胞的抑制率均用 IC_{50} 表示.

3.4 体外抑制 Topo II α 试验

采用超螺旋 DNA (pBR322) 松弛实验检测化合物对 DNA 拓扑异构酶 Topo II α 活性的影响. 实验方法详细过程见参考文献[20~25]. 在 20 μL 的反应体系中加入 2 μL $10 \times$ 反应缓冲液($500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白(BSA), $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(EDTA), $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl pH7.9)、0.25 μg 超螺旋 DNA (pBR322 DNA)、1 μL 不同浓度的待测化合物、VP16 和 CL-2, 加蒸馏水至 19 μL , 最后加入 1 μL 的 Topo II α (稀释至 $1 \text{ unit} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 37 °C 反应 30 min. 然后加 1 μL 质量分数为 10% 的十二烷基硫酸钠(SDS)终止反应, 质量分数为 0.8% 的琼脂糖凝胶、 $1 \times$ 核酸电泳(TAE)缓冲液、5 V/cm 室温条件下电泳 1 h. 电泳完毕, 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭(EB)条件下避光染色 20 min, 再去离子水漂洗 20 min, 然后用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照观察.

3.5 分子对接方法

本课题采用 Sybyl-X2.1 中的 Surflex-Dock 程序进行分子对接研究^[26]。实现 **B9** 的分子对接。首先用 ChemBioDraw Ultra 14.0 软件画出小分子 **B9** 的结构, 然后用 ChemBio3D Ultra 14.0 软件转化为三维结构, 并使用 MMFF94 力场进行能量优化, 接着用 AutodockTools 1.5.6^[27-28] 转化为 pdbqt 格式。人 Topo II α 、DNA 和 VP16 复合物的 X-ray 晶体结构[Protein DataBank (PDB)编号: 5GWK, 分辨率: 0.3152 nm]从 RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) PDB 下载得到。Topo II α 用 AutodockTools 1.5.6 删除 VP16、添加极性氢和电荷, 转化为 pdbq 格式。最后, 根据晶体结构中的 VP16 的位置, 确定活性口袋的坐标为: center_x = 23.7, center_y = -38.695, center_z = -60.34; size_x = 15, size_y = 15, size_z = 15。为了增加计算的准确度, 将参数 exhaustiveness 设置为 20。除了特别说明, 其他参数均采用默认值。最后选取打分值最高的构象用 PyMol 1.7.6 进行作图并结果分析。

辅助材料(Supporting Information) 中间体 **3**、**6a~6i** 的 ¹H NMR 谱图和化合物 **A1~A9**、**B1~B9** 的 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] The International Agency for Research on Cancer (IARC), 2020. Available from <https://www.iarc.fr/fr/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>.
- [2] Infante Lara, L.; Sledge, A.; Laradji, A.; Okoro, C. O.; Osherooff, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 586.
- [3] Ortega, J. A.; Riccardi, L.; Minniti, E.; Borgogno, M.; Arencibia, J. M.; Greco, M. L.; Minarini, A.; Sissi, C.; De Vivo, M. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 1375.
- [4] Wang, Y.; Sun, H.; Xiao, Z.; Zhang, G.; Zhang, D.; Bao, X.; Li, F.; Wu, S.; Gao, Y.; Wei, N. *Cell Commun. Signal* **2018**, 16, 52.
- [5] Heck, M. M.; Earnshaw, W. C. *J. Cell Biol.* **1986**, 103, 2569.
- [6] Lyu, Y. L.; Lin, C. P.; Azarova, A. M.; Cai, L.; Wang, J. C.; Liu, L. F. *Mol. Cell Biol.* **2006**, 26, 7929.
- [7] Murty, M. S. R.; Penthalha, R.; Polepalli, S.; Jain, N. *Med. Chem. Res.* **2016**, 25, 627.
- [8] Smith, T. P.; Windsor, I. W.; Forest, K. T.; Raines, R. T. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 7820.
- [9] Xu, X. T.; Deng, X. Y.; Chen, J.; Liang, Q. M.; Zhang, K.; Li, D. L.; Wu, P. P.; Zheng, X.; Zhou, R. P.; Jiang, Z. Y.; Ma, A. J.; Chen, W. H.; Wang, S. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 189, 112013.
- [10] Harper, D. E.; Welch, D. R. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1992**, 45, 1827.
- [11] Sun, C. L.; Qu, P. P.; Li, F. *Catal. Sci. Technol.* **2014**, 4, 988.
- [12] Yang, Y. H.; Li, G. H.; Song, Z. W.; Yang, X. L.; Liu, P. *Lett. Org. Chem.* **2010**, 7, 533.
- [13] Hollywood, F.; Suschitzky, H.; Hull, R. *Synthesis-Stuttgart* **1982**, 662.
- [14] Cai, M. Z.; Zhao, H.; Hu, W. Y. *Chin. J. Chem.* **2005**, 23, 443.
- [15] Maity, R.; Naskar, S.; Das, I. J. *Org. Chem.* **2018**, 83, 2114.
- [16] Naskar, D.; Roy, S. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2435.
- [17] Feng, Z. X.; Zheng, Y. D.; Zhao, L.; Zhang, Z. Y.; Sun, Y.; Qiao, K.; Xie, Y. J.; Wang, Y. S.; He, W. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, 104, 109944.
- [18] Mo, X. Y.; Wu, F. L.; Yu, B. L.; Wang, W. L.; Cai, X. L. *Appl. Clay Sci.* **2020**, 193, 105664.
- [19] Shou, J. Q.; Wang, M.; Cheng, X. L.; Wang, X. Y.; Zhang, L. F.; Liu, Y. C.; Fei, C. Z.; Wang, C. M.; Gu, F.; Xue, F. Q.; Li, J.; Zhang, K. Y. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, 43, 271.
- [20] Chen, W. B.; Balakrishnan, K.; Kuang, Y. Y.; Han, Y. Y.; Fu, M.; Gandhi, V.; Peng, X. H. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 4498.
- [21] Gootz, T. D.; Barrett, J. F.; Sutcliffe, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, 34, 8.
- [22] Marini, J. C.; Levene, S. D.; Crothers, D. M.; Englund, P. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. Biol.* **1982**, 79, 7664.
- [23] Shen, Y.; Chen, W.; Li, Z. Y.; Shen, Y. M. *Med. Chem.* **2014**, 10, 533.
- [24] Shen, Y.; Chen, W.; Zhao, B. B.; Hao, H. L.; Li, Z. Y.; Lu, C. H.; Shen, Y. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, 453, 302.
- [25] Xiao, X.; Cushman, M. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9960.
- [26] Spitzer, R.; Jain, A. N. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, 26, 687.
- [27] Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785.
- [28] Sanner, M. F. *J. Mol. Graphics Modell.* **1999**, 17, 57.

(Lu, Y.)