

新型 5 位与 6 位取代的吲唑类化合物的合成及抗肿瘤活性研究

曹亚权^{a,b} 杨莹雪^{a,b} 翟洪进^{a,b} 王锦^{a,b} 张烁^{a,b}
王焕焕^{a,b} 杨璞^{a,b} 吴春丽^{*,a,b,c}^(a) 郑州大学药学院 郑州 450001^(b) 新药创制与药物安全性评价河南省协同创新中心 郑州 450001^(c) 教育部药物关键制备技术重点实验室 郑州 450001

摘要 为了寻找高效低毒的新型抗肿瘤药物, 设计并合成了新型的 5 位与 6 位取代的吲唑类化合物. 采用噻唑蓝(MTT)法对目标化合物在 PC-3(人前列腺癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)、HepG-2(人肝癌细胞)和 MGC-803(人胃癌细胞)四种人类癌细胞的抗增殖活性进行评价. 结果显示大部分化合物对 PC-3 具有特异性的抗增殖活性. 其中, *N*-(1-苄基-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基-1-异丙基-1*H*-吲唑-5-羧酰胺(**8a**)和 *N*-[(1-苄基-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基]-1-异丙基-1*H*-吲唑-6-甲酰胺(**14a**)对 PC-3 细胞的抗增殖活性较好, IC₅₀ 值分别为 6.21 和 6.43 μmol/L, 为前列腺癌抗肿瘤药物的研究提供了思路.

关键词 吲唑; 癌症; 抗肿瘤活性; 前列腺癌

Synthesis and Antitumor Activity of Novel 5- and 6-Substituted Indazole Derivatives

Cao, Yaquan^{a,b} Yang, Yingxue^{a,b} Zhai, Hongjin^{a,b} Wang, Jin^{a,b} Zhang, Shuo^{a,b}
Wang, Huanhuan^{a,b} Yang, Pu^{a,b} Wu, Chunli^{*,a,b,c}^(a) School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001^(b) Collaborative Innovation Center of New Drug Research and Safety Evaluation, Zhengzhou 450001^(c) Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies, Ministry of Education, Zhengzhou 450001

Abstract In order to search for new antitumor drugs with high efficiency and low toxicity, 5- and 6-substituted indazole compounds were designed and synthesized. The antiproliferative activity of target compounds in four human cancer cells, PC-3 (human prostate cancer cell), MCF-7 (human breast cancer cell), HepG-2 (human hepatoma cell) and MGC-803 (human gastric cancer cell), was evaluated by thiazole blue (MTT) method. The results showed that most of the compounds had specific antiproliferative activity against PC-3. Among them, *N*-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1-isopropyl-1*H*-indoleazole-5-carboxamide (**8a**) and *N*-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1-isopropyl-1*H*-indoleazole-6-formamide (**14a**) possess strong antitumor activity against PC-3 with IC₅₀ values of 6.21 and 6.43 μmol/L, respectively. It provides a new idea for the research of anti-tumor drugs for prostate cancer.

Keywords indazole; cancer; antiproliferative activity; prostatic cancer

根据世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)发布的全球最新癌症负担数据显示, 2020 年全球新发癌症病例 1929 万例, 死亡病例 996 万例, 其中中国新发癌症 457 万人, 占全球 23.7%, 中国癌症死亡人数 300 万, 占癌症死亡总人数 30%. 面对如此严峻的形势, 寻找癌症

的治疗迫在眉睫^[1]. 目前治疗癌症的手段主要包括化学治疗、手术切除和放射治疗三种, 而化学治疗在目前的临床治疗中发挥着不可或缺的作用^[2-3]. 因此, 寻找并设计合成高效安全的抗肿瘤药物对癌症的治疗有重要意义^[4-5].

* Corresponding author. E-mail: kedi2009@126.com

Received July 24, 2021; revised September 8, 2021; published online October 9, 2021.

Project supported by the National Key Research and Development Project of China (No. 2017YFD0501400).

国家重点研发计划(No. 2017YFD0501400)资助项目.

具有不同官能团的吡唑类衍生物具有抗炎、抗菌、抗 HIV、抗心律失常、抗真菌、抗肿瘤等多种生物活性^[6], 近年来受到了广泛的关注. 尤其需要指出的是, 目前至少有 43 种吡唑类治疗药物已在临床应用或临床试验中^[6-8]. 利尼伐尼(Linifanib, 图 1)是一种由艾伯维公司和基因泰克公司共同开发的三磷酸腺苷(ATP)竞争性血管内皮生长因子/血小板衍生生长因子受体(VEGFR/PDGFR)抑制剂, 对于肝癌、非小细胞肺癌和肾细胞癌都有良好的治疗作用^[9-10]. 阿西替尼(Asitinib, 图 1)是辉瑞公司开发的一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂(TKI), 2012 年被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗对其他药物无反应的晚期肾细胞癌(RCC)^[11-13]. 它是第二代 TKI 和有效的血管内皮生长因子(VEGF)受体抑制剂, 对 VEGF 家族受体的半最大抑制浓度比其他 TKI 低 10 倍^[14]. AC-480(图 1)是由美国生物制药公司 Ambit Biosciences^[15]开发的可逆的 HER-2、HER-4 和 HER-3 受体抑制剂, 具有广谱抗肿瘤活性. 目前该药已完成针对实体瘤(研究编号: NCT00093730)、胶质瘤(研

究编号: NCT00979173)和癌症转移(研究编号: NCT00095537)的 I 期试验^[6,16].

从上市的药物分子中可以发现, 吡唑的 5 位与 6 位侧链是其活性的关键性影响因素, 基于本课题组的研究基础和文献调研, 发现三氮唑基团的引入可以很好地提升小分子的生物相容性和水溶性^[21]. 我们以吡唑为母核, 在其 5 位与 6 位引入含三氮唑的活性侧链, 设计并合成了一系列新型的 5 位与 6 位取代的吡唑类衍生物, 并对其抗肿瘤活性进行测试和评价.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

新型 5 位与 6 位取代的吡唑类衍生物的合成路线见 Schemes 1 和 2. 以 Scheme 1 为例, 以商用的 1*H*-吡唑-5-羧酸甲酯和碘代异丙烷为原料, 碳酸铯作为无机碱, 通过取代反应获得化合物 **2**^[17]. 化合物 **2** 在甲醇中加入氢氧化钠, 通过水解反应获得化合物 **3**^[20]. 以化合物 **3** 和炔丙胺为原料, 以 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲

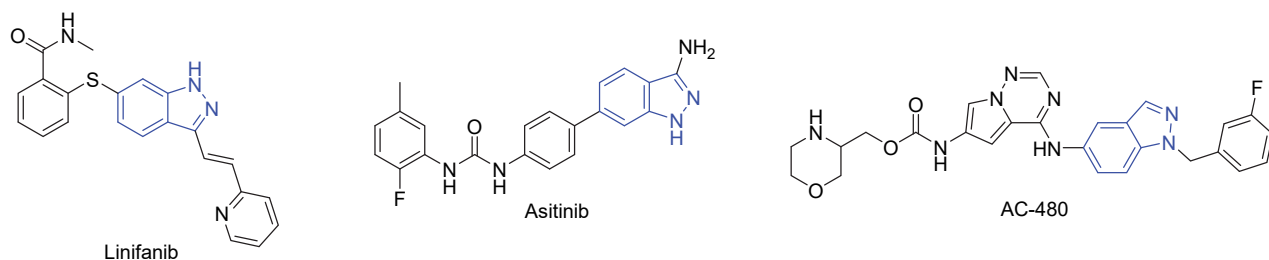
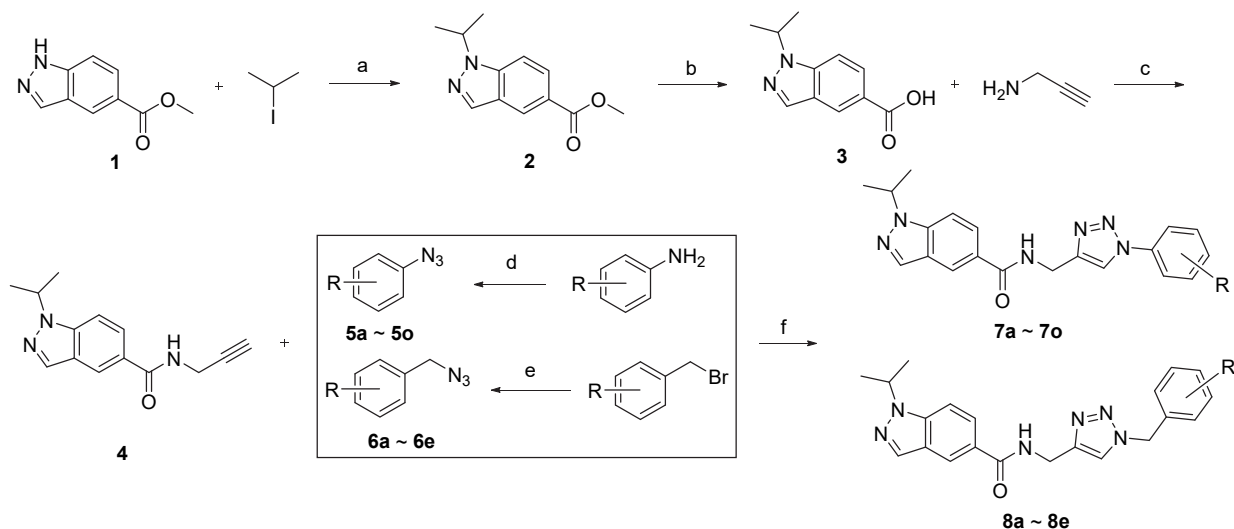


图 1 含吡唑基团药物的分子结构

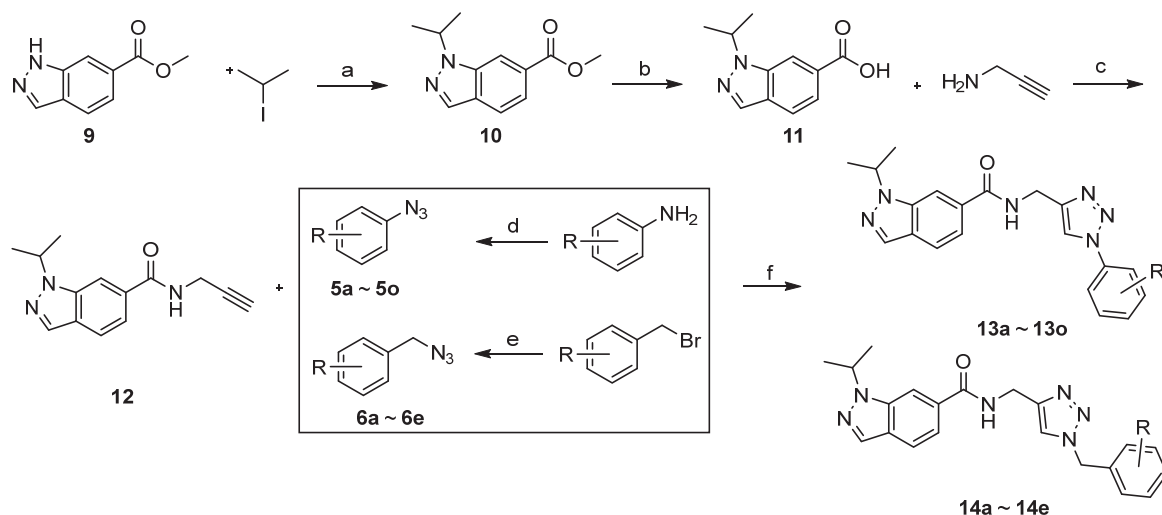
Figure 1 Structures of drug containing indazole group



Reagents and condition: (a) Cs_2CO_3 , CH_3CN , 4 h, 81 °C; (b) 1) NaOH , H_2O , MeOH , 2 h, reflux; 2) HCl , H_2O , r.t., pH = 3 ~ 4; (c) DCM , HATU , r.t., 8 h; (d) NaN_3 , NaNO_2 , 10% $\text{HCl-H}_2\text{O}$, r.t.; (e) NaN_3 , DMSO , 80 °C, 8 h; (f) CuSO_4 , VcNa , THF , H_2O , r.t., 4 ~ 6 h

图式 1 化合物 **7a~7o**, **8a~8e** 的合成路线

Scheme 1 Synthesis of compounds **7a~7o**, **8a~8e**



Reagents and condition: (a) Cs_2CO_3 , CH_3CN , 4 h, 81°C ; (b) 1) NaOH , H_2O , MeOH , 2 h, reflux; 2) HCl , H_2O , r.t., pH = 3~4; (c) DCM , HATU , r.t., 8 h; (d) NaN_3 , NaNO_2 , 10% $\text{HCl-H}_2\text{O}$, r.t.; (e) NaN_3 , DMSO , 80°C , 8 h; (f) CuSO_4 , VcNa , THF , H_2O , r.t., 4~6 h

图式 2 化合物 13a~13o, 14a~14e 的合成路线
Scheme 2 Synthesis of compounds 13a~13o, 14a~14e

基脒六氟磷酸酯(HATU)为缩合剂, 通过酰胺缩合反应获得化合物 4。使用不同取代基的苯胺与叠氮化钠和亚硝酸钠在 10% 的盐酸水溶液中反应获得中间体 5a~5o。使用不同取代基的溴化苄和叠氮化钠在二甲基亚砜(DMSO)中 80°C 反应 8 h 获得中间体 6a~6e^[18]。中间体 5a~5o 和 6a~6e 分别与化合物 4 通过 Click 点击反应^[19]获得化合物 7a~7o 和 8a~8e。所有化合物均通过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 技术进行了结构确证。

1.2 目标化合物的抗增殖活性

对表 1 进行分析发现, 该系列化合物(5 位取代)对四种癌细胞中的 PC-3 细胞的活性良好, 而对于其余三种癌细胞的活性几乎没有。虽然当取代基由苯环变为没有取代的苄基时, 化合物 8a 不仅对 PC-3 有较强的抗增殖活性, 对其他三种癌症细胞系的抗增殖活性也大大提高, 但是相对于 PC-3 来说提升并不明显, 且抗增殖活性远远不如 PC-3, 使其表现出了显著的特异性。对该系列化合物的构效关系进行研究, 当该系列化合物苯环上无取代基时, 表现出一定的抗增殖活性, 7a 的 IC_{50} 30.67 $\mu\text{mol/L}$, 但是明显比对照药物氟尿嘧啶的活性(IC_{50} 8.41 $\mu\text{mol/L}$)差; 当苯环上为双取代时, 如化合物 7b, 7c, 基本没有抗增殖活性; 当苯环上的 4 位被吸电子基或者给电子基取代时, 如化合物 7d, 7e, 7i, 7m, 7n, 7o, 表现出较差抗增殖活性, 并且活性相差不大, 说明 4 位的吸电子基或者给电子基对于活性没有帮助; 通过对化合物 7e, 7g, 7l, 7i, 7j, 7k 的活性对比可以发现, 苯环上位置取代对于活性没有任何帮助, 特别是邻位的吸电子基使活性直接丧失; 当把苯环变为苄基时, 惊喜地发现该系列化合物活性都有了显著的提升, 无论是对位吸电子基还

是给电子基, 活性相对于苯环都有明显的提升, 如化合物 7m (37.21 $\mu\text{mol/L}$)与 8b (15.81 $\mu\text{mol/L}$), 7o (>40 $\mu\text{mol/L}$)与 8d (28.20 $\mu\text{mol/L}$); 值得注意的是, 当苄基无任何取代时表现出了最好的抗增殖活性(8a 的 IC_{50} 6.21 $\mu\text{mol/L}$), 并且优于对照药物氟尿嘧啶。

对表 2 进行分析发现, 该系列化合物(6 位取代)表现出与表 1 化合物相似的活性与构效关系, 最后发现也是苄基无任何取代时表现出最好的抗增殖活性(14a 的 IC_{50} = 6.43 $\mu\text{mol/L}$, 优于对照药物氟尿嘧啶。

1.3 化合物 8a 的集落形成实验

细胞集落形成实验是检测培养细胞增殖能力的有效方法之一, 该方法通过检验活细胞的增殖能力, 可以避免在生长曲线绘制时将死细胞或不能再分裂细胞计数在内而导致的实验结果误差。由于化合物 8a 与 14a 表现出相似的抗增殖活性, 所以选取活性稍优的 8a 进行集落形成实验。从图 2 可以看出, 与对照组相比化合物 8a 可有效地抑制集落的形成, 特别是高剂量组, 且成剂量依赖。

1.4 化合物 8a 的细胞周期阻滞实验

根据上述结果, 选择化合物 8a 进一步评价其对 PC-3 细胞的周期阻滞实验。由图 3 可以看出, 经过 24 h 处理后, PC-3 细胞主要被阻滞在 G2/M 期, 从而抑制细胞的增殖。

1.5 化合物 8a 与 14a 的安全性评价

鉴于化合物 8a 与 14a 对前列腺癌细胞表现出较优的抗增殖活性, 为了进一步验证其安全性, 使用前列腺癌基质细胞 WPYM-1 对其抗增殖活性进行评价, 结果

表 1 化合物 7a~7o, 8a~8e 对四种人类癌细胞的体外抗增殖活性

Table 1 Antiproliferative activity of target compounds 7a~7o, 8a~8e against four cancer cell lines

Compound	R	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)			
		PC-3	MCF-7	HepG-2	MGC-803
7a	H	30.67 ± 1.63	>40	>40	>40
7b	2,4-(CH ₃) ₂	>40	>40	>40	>40
7c	3,4-(CH ₃) ₂	>40	>40	>40	>40
7d	4-I	39.63 ± 1.21	>40	>40	>40
7e	4-F	38.72 ± 0.96	>40	>40	>40
7f	3-Br	36.21 ± 0.87	>40	>40	>40
7g	3-F	38.14 ± 1.03	>40	>40	>40
7h	4-NO ₂	>40	>40	>40	>40
7i	4-CH ₃	36.98 ± 1.63	>40	>40	>40
7j	3-CH ₃	34.55 ± 1.14	26.12 ± 0.78	>40	34.75 ± 2.07
7k	2-CH ₃	35.40 ± 2.97	>40	>40	>40
7l	2-F	>40	>40	>40	>40
7m	4-CF ₃	37.21 ± 0.89	>40	>40	>40
7n	4-CH ₂ CH ₃	31.05 ± 0.95	>40	>40	>40
7o	4-OCH ₃	>40	>40	>40	>40
8a	H	6.21 ± 0.84	19.33 ± 0.68	18.17 ± 2.91	20.56 ± 1.01
8b	4-CF ₃	15.81 ± 0.78	>40	>40	>40
8c	4-CN	9.53 ± 0.62	19.26 ± 1.23	30.04 ± 1.89	20.06 ± 1.80
8d	4-OCH ₃	28.20 ± 2.20	>40	>40	>40
8e	4-C(CH ₃) ₃	8.76 ± 1.98	>40	>40	>40
5-Fu ^b	—	8.41 ± 0.92	15.14 ± 0.44	11.68 ± 0.48	10.14 ± 0.89

^a Anti-tumor activity was assayed by exposure for 72 h to substances and expressed as concentration required to inhibit tumor cells proliferation by 50% (IC₅₀). Data are presented as the mean ± SDs of three independent experiments. ^b Used as a positive control.

表 2 化合物 13a~13o, 14a~14e 对四种人类癌细胞的体外抗增殖活性

Table 2 Antiproliferative activity of target compounds 13a~13o, 14a~14e against four cancer cell lines

Compound	R	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)			
		PC-3	MCF-7	HepG-2	MGC-803
13a	H	30.25 ± 1.36	>40	>40	>40
13b	2,4-(CH ₃) ₂	>40	>40	>40	>40
13c	3,4-(CH ₃) ₂	>40	>40	>40	>40
13d	4-I	38.37 ± 0.89	>40	>40	>40
13e	4-F	38.67 ± 0.67	>40	>40	>40
13f	3-Br	31.51 ± 1.76	>40	>40	>40
13g	3-F	37.69 ± 0.96	>40	>40	>40
13h	4-NO ₂	>40	>40	>40	>40
13i	4-CH ₃	32.05 ± 1.35	>40	>40	>40
13j	3-CH ₃	31.65 ± 1.08	>40	>40	>40
13k	2-CH ₃	30.15 ± 1.25	>40	>40	>40
13l	2-F	>40	>40	>40	>40
13m	4-CF ₃	36.28 ± 0.87	>40	>40	>40
13n	4-CH ₂ CH ₃	30.26 ± 0.58	>40	>40	>40
13o	4-OCH ₃	>40	>40	>40	>40
14a	H	6.43 ± 0.80	11.19 ± 0.40	12.72 ± 0.60	14.41 ± 2.12
14b	4-CF ₃	21.90 ± 1.69	31.91 ± 1.18	30.99 ± 0.99	39.92 ± 1.63
14c	4-CN	11.16 ± 1.76	32.28 ± 0.79	24.71 ± 3.90	33.06 ± 2.68
14d	4-OCH ₃	34.74 ± 1.27	>40	>40	>40
14e	4-C(CH ₃) ₃	12.82 ± 0.71	>40	>40	>40
5-Fu ^b	—	8.41 ± 0.92	15.14 ± 0.44	11.68 ± 0.48	10.14 ± 0.89

^a Anti-tumor activity was assayed by exposure for 72 h to substances and expressed as concentration required to inhibit tumor cells proliferation by 50% (IC₅₀). Data are presented as the mean ± SDs of three independent experiments. ^b Used as a positive control.

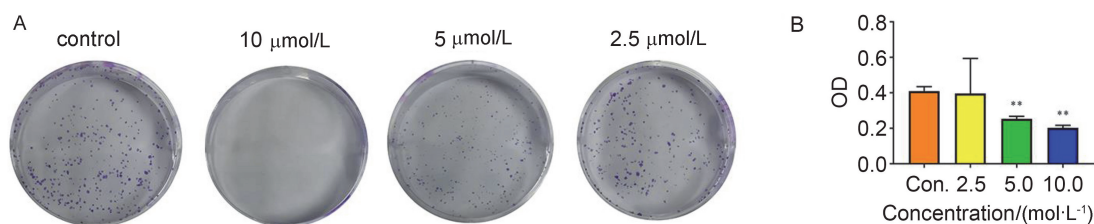


图2 (A)用指定浓度的化合物 **8a** 处理 PC3 细胞 7 d 后结晶紫染色的集落形成的代表性图片以及(B)在 570 nm 处测量 PC3 细胞中结晶紫的吸光度

Figure 2 (A) Representative pictures of colony formation stained by crystal violet in PC3 cells treated with indicated concentrations of compound **8a** for 7 d, and (B) the absorbance of crystal violet in PC3 cells measured at 570 nm

The data was presented as Mean $\pm$ SD. Three individual experiments were performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control (Con) group

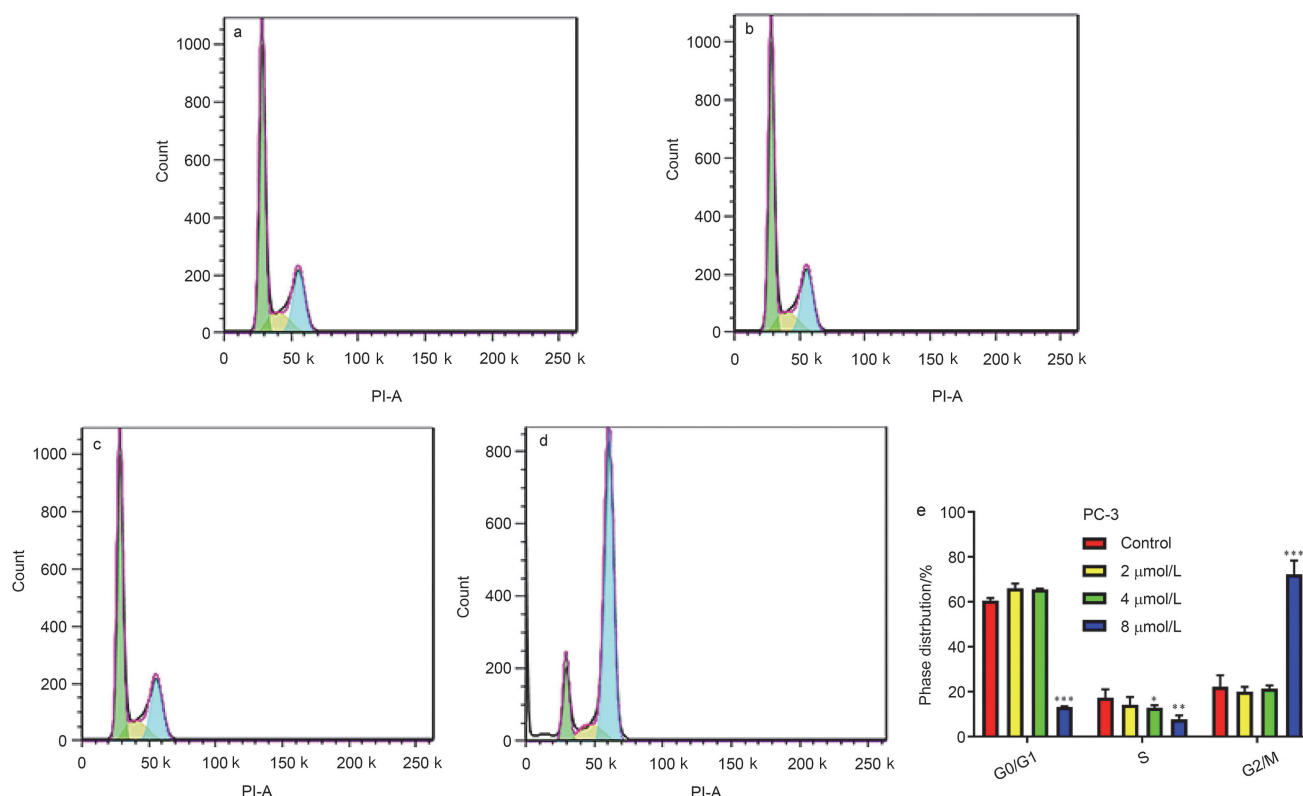


图3 不同浓度化合物 **8a** 处理 24 h 后的细胞周期阻滞实验结果

Figure 3 Cell cycle arrestment induction of compound **8a** after 24 h treatment with different concentrations

(a) Control, (b) 2 μmol/L, (c) 4 μmol/L, (d) 8 μmol/L. The data was presented as mean $\pm$ SD. Three individual experiments were performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control (Con) group

表3 化合物 **8a** 与 **14a** 对前列腺基质细胞的体外抗增殖活性
Table 3 Antiproliferative activity of compounds **8a** and **14a** on prostate stromal cells *in vitro*

Compd.	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)		Active ratio WPYM-1/PC-3
	PC-3	WPYM-1	
8a	6.21 $\pm$ 0.84	27.07 $\pm$ 1.36	4.35
14a	6.43 $\pm$ 0.80	23.57 $\pm$ 1.77	3.67

^a Anti-tumor activity was assayed by exposure for 72 h to substances and expressed as concentration required to inhibit tumor cells proliferation by 50% (IC₅₀). Data are presented as the mean $\pm$ SDs of three independent experiments.

见表 3. 从活性结果可以看出, 化合物 **8a** 与 **14a** 对于 WPYM-1 存在一定的抗增殖活性, IC₅₀ 值分别为(27.07 $\pm$ 1.36)和(23.57 $\pm$ 1.77) μmol/L, 但是远远弱于其对 PC-3 的抗增殖活性, 其活性只有 PC-3 的四分之一左右, 可以看出 **8a** 与 **14a** 对于正常的前列腺基质细胞具有较好的安全性.

2 结论

为了寻找高效低毒抗肿瘤化合物, 设计并合成出了一系列新型 5 位与 6 位取代的吡啶类衍生物, 利用核磁

共振氢谱、核磁共振碳谱和高分辨质谱等技术证实了目标化合物的结构. 运用噻唑蓝(MTT)比色法测定了目标化合物对人类四种癌细胞: PC-3(人前列腺癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)、HepG-2(人肝癌细胞)和MGC-803(人胃癌细胞)四种人类癌细胞的抗增殖活性进行评价. 结果显示大部分化合物对 PC-3 细胞表现出特异性的抗增殖活性, 其中, 化合物 **8a** 和 **14a** 对 PC-3 细胞的抗增殖活性较好, IC₅₀ 值分别为 6.21 和 6.43 $\mu\text{mol/L}$. 集落形成实验表明, 化合物 **8a** 可呈剂量依赖性抑制前列腺癌细胞 PC-3 的集落形成. 进一步机制实验表明, 化合物 **8a** 可将 PC-3 细胞阻滞在 G2/M 期, 从而抑制细胞的增殖. 最后, 通过评价化合物 **8a** 与 **14a** 对前列腺癌基质细胞 WPYM-1 的抗增殖活性, 发现其活性只有 PC-3 的四分之一左右, 表现出较好的安全性. 综上所述, 化合物 **8a** 与 **14a** 可能是一种有价值的抗前列腺癌先导化合物.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

¹H NMR 和 ¹³C NMR 使用 DPX-DPX-400 超导核磁共振仪测定, TMS 作为内标; 高分辨质谱使用 Waters-Micromass 公 Q-ToF 质谱仪测定; 本实验分离纯化所用有机溶剂均为工业级, 经重新蒸馏后使用, 其它试剂均为市售分析纯与生物级, 必要时做常规处理.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 **2** 与 **10** 的合成

化合物 **2** 和 **10** 按照文献[17]的方法制备. 以化合物 **10** 为例, 将碘代异丙烷(725 mg, 4.26 mmol)滴加到搅拌均匀的化合物 **9** (500 mg, 2.84 mmol)与碳酸铯(1.015 g, 3.12 mmol)的乙腈溶液中, 回流搅拌 4~6 h, TLC 监测反应, 待反应完全后冷却至室温, 抽滤, 滤液蒸干柱层析得无色透明液体 **10** 371 mg, 收率 60%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.23 (d, $J=0.9$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.78 (dd, $J=8.5, 1.0$ Hz, 2H), 5.06~4.80 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 1.62 (d, $J=6.7$ Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 167.5, 138.1, 132.6, 127.6, 126.6, 120.9, 111.6, 52.4, 50.6, 22.3.

3.2.2 化合物 **3** 与 **11** 的合成

化合物 **3** 和 **11** 按照文献[17]的方法制备. 以化合物 **11** 为例, 将化合物 **10** (300 mg, 1.37 mmol)溶于无水甲醇中, 缓慢加入氢氧化钠(115 mg, 2.05 mmol), 回流搅拌 1~2 h, 冷却至室温, 减压蒸馏除去溶剂, 在体系加入适量的水, 用盐酸调 pH 3~4, 有大量白色固体析出, 抽滤得产物 **11** 238 mg, 收率 85%. m.p. 137.8~

139.6 $^{\circ}\text{C}$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.34 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.89 (dd, $J=8.5, 1.0$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.99 (m, $J=13.3, 6.7$ Hz, 1H), 1.65 (d, $J=6.7$ Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 172.2, 138.0, 132.8, 127.1, 126.7, 121.2, 112.4, 50.7, 22.3. HRMS (ESI) calcd for C₁₁H₁₃N₂O₂ [M + H]⁺ 205.0977, found 205.0973.

3.2.3 化合物 **4** 与 **12** 的合成

以化合物 **12** 为例: 室温下将化合物 **11** (500 mg, 2.45 mmol)和 HATU (933 mg, 2.45 mmol)加入到无水二氯甲烷中搅拌均匀, 然后加入溴代丙炔(202 mg, 3.68 mmol)室温搅拌过夜. 体系用二氯甲烷萃取(20 mL $\times$ 3), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干得粗产物. 粗产物用乙酸乙酯/石油醚($V:V=1:2$)柱层析, 浓缩后得白色固体 513 mg, 收率 87%. m.p. 117.3~117.8 $^{\circ}\text{C}$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.06 (s, 2H), 7.77 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.46~7.40 (m, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.92 (m, $J=13.3, 6.7$ Hz, 1H), 4.32 (dd, $J=5.2, 2.6$ Hz, 2H), 2.32 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 1.60 (d, $J=6.7$ Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 167.4, 138.3, 132.7, 131.2, 125.8, 121.4, 118.0, 109.5, 79.4, 72.1, 50.5, 30.0, 22.3. HRMS (ESI) calcd for C₁₄H₁₆N₃O [M+H]⁺ 242.1293, found 242.1291.

3.2.4 化合物 **5a~5o** 的合成

室温下将含有不同取代基的苯胺(100 mg)溶于质量分数为 10%的盐酸水溶液中搅拌均匀, 滴加亚硝酸钠(1.3 equiv.)的水溶液, 反应 1 h, 再滴加叠氮化钠(1.1 equiv.)的水溶液, 室温搅拌 1~2 h. 向体系中缓慢加入碳酸氢钠使体系为弱碱性, 用乙酸乙酯萃取(15 mL $\times$ 3), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干直接用于下一步反应, 收率 65%~81%.

3.2.5 化合物 **6a~6e** 的合成

将含有不同取代基的溴化苄(100 mg)和叠氮化钠(1.1 equiv.)加入到二甲基亚砜(DMSO)中 80 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 8 h, 体系放置冷却至室温, 用二氯甲烷和饱和食盐水萃取($V:V=1:1$, 15 mL $\times$ 3), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干直接用于下一步反应, 收率 72%~84%.

3.2.6 目标化合物 **7a~7o**, **8a~8e**, **13a~13o**, **14a~14e** 的合成

室温下将化合物 **4** (12)(50 mg, 0.21 mmol)加入到四氢呋喃和水的混合溶液($V:V=1:1$)中, 然后缓慢加入无水硫酸铜(10 mg, 0.042 mmol)和抗坏血酸钠(20 mg, 0.105 mmol)搅拌均匀, 0.5 h 后加入化合物 **5a~5o**, **6a~6e** (0.21 mmol)室温反应 6~8 h. 体系用二氯甲烷萃取(15 mL $\times$ 3), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干, 粗产物用二氯甲烷和石油醚重结晶得目标化合物 **7a~7o**, **8a~**

8e (13a~13o, 14a~14e), 收率 40%~85%.

1-异丙基-*N*-((1-苯基-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7a**): 产率 43%. 棕色固体, m.p. 104.2~105.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.09 (t, *J*=5.5 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.93 (t, *J*=7.4 Hz, 3H), 7.76 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.59 (t, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.48 (t, *J*=7.3 Hz, 1H), 5.03 (m, *J*=13.2, 6.6 Hz, 1H), 4.64 (d, *J*=5.5 Hz, 2H), 1.49 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.9, 146.9, 139.8, 137.2, 134.2, 130.4, 129.0, 127.2, 125.5, 123.5, 121.6, 120.4, 109.7, 50.0, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd C₂₀H₂₁N₆O [M+H]⁺ 361.1777, found 361.1780.

N-((1-(3,4-二甲基苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7b**): 产率 85%. 白色固体, m.p. 159.9~161.2 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.08 (t, *J*=5.5 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.94 (m, *J*=8.9, 1.1 Hz, 1H), 7.82~7.69 (m, 2H), 7.61 (m, *J*=8.1, 1.9 Hz, 1H), 7.32 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 5.03 (m, *J*=13.2, 6.5 Hz, 1H), 4.63 (d, *J*=5.5 Hz, 2H), 2.29 (d, *J*=13.0 Hz, 6H), 1.49 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.8, 146.7, 139.8, 138.6, 137.3, 135.1, 134.2, 131.0, 127.1, 125.5, 123.5, 121.6, 121.4, 121.2, 117.6, 109.7, 50.0, 35.4, 22.5, 19.9, 19.4. HRMS (ESI) calcd C₂₂H₂₅N₆O [M+H]⁺ 389.2090, found 389.2088.

N-((1-(2,4-二甲基苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7c**): 产率 61%. 黄色油状液体. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.96~7.82 (m, 2H), 7.74~7.64 (m, 1H), 7.44 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 7.22~7.08 (m, 3H), 4.94~4.79 (m, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.59 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 167.7, 140.0, 139.7, 134.0, 133.2, 132.1, 131.2, 128.9, 127.4, 126.6, 125.7, 125.0, 123.7, 121.3, 109.0, 52.7, 50.6, 35.3, 22.1, 21.2, 17.8. HRMS (ESI) calcd C₂₂H₂₅N₆O [M+H]⁺ 389.2090, found 389.2088.

N-((1-(4-碘苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7d**): 产率 41%. 白色固体, m.p. 246.5~248.1 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.09 (t, *J*=5.5 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.94 (d, *J*=8.8 Hz, 3H), 7.82~7.65 (m, 3H), 5.03 (m, *J*=13.2, 6.6 Hz, 1H), 4.64 (d, *J*=5.5 Hz, 2H), 1.48 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.9, 147.1, 139.8, 139.0, 136.8, 134.2, 127.1, 125.5, 123.5, 122.3, 121.6, 109.7, 94.6, 50.1, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd

C₂₀H₂₀IN₆O [M+H]⁺ 487.0743, found 487.0741.

N-((1-(4-氟苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7e**): 产率 68%. 白色固体, m.p. 186.0~187.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.09 (t, *J*=5.3 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.03~7.88 (m, 3H), 7.76 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.44 (t, *J*=8.7 Hz, 2H), 5.03 (m, *J*=13.1, 6.5 Hz, 1H), 4.64 (d, *J*=5.4 Hz, 2H), 1.49 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.9, 162.01 (d, *J*=245.5 Hz), 147.0, 139.8, 134.2, 133.7, 127.1, 125.5, 123.5, 122.7 (d, *J*=8.8 Hz), 121.9, 121.6, 117.2 (d, *J*=23.2 Hz), 109.7, 50.1, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd C₂₀H₂₀FN₆O [M+H]⁺ 379.1682, found 379.1683.

N-((1-(3-溴苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7f**): 产率 64%. 白色固体, m.p. 156.4~157.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.10 (t, *J*=5.5 Hz, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.20 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.96 (m, *J*=18.7, 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.68 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.54 (t, *J*=8.1 Hz, 1H), 5.03 (m, *J*=13.1, 6.6 Hz, 1H), 4.65 (d, *J*=5.5 Hz, 2H), 1.49 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.9, 147.2, 139.8, 138.3, 134.3, 132.3, 131.7, 127.1, 125.5, 123.5, 122.9, 121.7, 119.3, 109.7, 50.1, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd C₂₀H₂₀BrN₆O [M+H]⁺ 439.0882, found 439.0885.

N-((1-(3-氟苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7g**): 产率 62%. 白色固体, m.p. 144.5~146.1 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.11 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.39 (d, *J*=0.6 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.87 (m, *J*=34.3, 27.5, 17.5, 5.2 Hz, 4H), 7.64 (m, *J*=8.2, 6.4 Hz, 1H), 7.34 (m, *J*=8.4, 2.1 Hz, 1H), 5.03 (m, *J*=13.2, 6.6 Hz, 1H), 4.65 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 1.49 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.9, 162.9 (d, *J*=245.0 Hz), 147.1, 139.8, 134.2, 132.3 (d, *J*=9.1 Hz), 127.1, 125.5, 123.5, 121.7, 115.7 (d, *J*=21.0 Hz), 109.7, 108.0, 107.7, 55.4, 50.1, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd C₂₀H₂₀FN₆O [M+H]⁺ 379.1682, found 379.1685.

1-异丙基-*N*-((1-(4-硝基苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7h**): 产率 50%. 淡黄色固体, m.p. 200.4~201.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.13 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.48~8.38 (m, 3H), 8.25 (m, *J*=15.0, 7.8 Hz, 3H), 7.94 (m, *J*=8.9, 1.4 Hz, 1H), 7.77 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 5.03 (m, *J*=13.2, 6.6 Hz, 1H), 4.67 (d, *J*=5.5 Hz, 2H), 1.49 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C

NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.9, 147.7, 147.1, 141.4, 139.8, 134.3, 127.08, 126.0, 125.5, 123.5, 122.1, 121.6, 120.9, 109.7, 50.1, 35.3, 22.5. HRMS (ESI) calcd $C_{20}H_{20}N_7O_3$ $[M+H]^+$ 406.1627, found 406.1618.

1-异丙基-*N*-((1-(对甲苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7i**): 产率 55%. 淡黄色固体, m.p. 183.3~185.1 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.08 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.94 (m, $J=8.9$, 1.4 Hz, 1H), 7.78 (m, $J=12.9$, 8.7 Hz, 3H), 7.38 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 5.03 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.64 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.49 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 146.8, 139.8, 138.6, 134.9, 134.2, 130.7, 127.2, 125.5, 123.5, 121.6, 120.3, 109.7, 50.0, 35.4, 22.5, 21.0. HRMS (ESI) calcd $C_{21}H_{23}N_6O$ $[M+H]^+$ 375.1933, found 375.1928.

1-异丙基-*N*-((1-(间甲苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7j**): 产率 48%. 白色固体, m.p. 138.4~139.6 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.09 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.94 (m, $J=8.9$, 1.4 Hz, 1H), 7.77 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.03 (m, $J=13.1$, 6.5 Hz, 1H), 4.64 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.49 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.9, 146.8, 140.1, 139.8, 137.1, 134.2, 130.1, 129.6, 127.1, 125.5, 123.5, 121.6, 120.8, 117.4, 109.7, 50.0, 35.4, 22.5, 21.4. HRMS (ESI) calcd $C_{21}H_{23}N_6O$ $[M+H]^+$ 375.1933, found 375.1931.

1-异丙基-*N*-((1-(邻甲苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7k**): 产率 54%. 黄色油状液体. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.07 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 8.21 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=8.9$, 1.4 Hz, 1H), 7.76 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.51~7.36 (m, 4H), 5.03 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.66 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.49 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.9, 145.7, 139.8, 136.8, 134.2, 133.4, 131.8, 130.1, 127.4, 127.2, 126.4, 125.5, 125.0, 123.5, 121.6, 109.7, 50.0, 35.4, 22.5, 18.0. HRMS (ESI) calcd $C_{21}H_{23}N_6O$ $[M+H]^+$ 375.1933, found 375.1928.

N-((1-(2-氟苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7l**): 产率 55%. 黄色油状液体. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.11 (m, $J=9.6$, 3.9 Hz, 1H), 8.42 (m, $J=43.4$, 4.9 Hz, 2H), 8.21 (s, 1H), 7.93 (m, $J=8.9$, 1.3 Hz, 1H), 7.81 (m, $J=25.8$, 16.0, 5.2 Hz, 2H), 7.62~7.56 (m, 1H), 7.48~7.29 (m, 1H), 7.19~6.92 (m, 1H), 5.10~4.96 (m, 1H), 4.66 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 1.49 (d,

$J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.9, 154.2 (d, $J=249.0$ Hz), 149.9, 146.4, 139.8, 134.2, 131.6 (d, $J=8.1$ Hz), 130.4, 127.1, 126.3, 126.0, 125.4, 124.9, 123.5, 121.6, 120.0, 117.6 (d, $J=19.2$ Hz), 109.7, 50.0, 35.2, 22.5. HRMS (ESI) calcd $C_{20}H_{20}FN_6O$ $[M+H]^+$ 379.1682, found 379.1682.

1-异丙基-*N*-((1-(4-(三氟甲基)苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-羧酰胺(**7m**): 产率 51%. 白色固体, m.p. 220.2~223.1 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.12 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.20 (d, $J=10.8$ Hz, 3H), 8.04~7.89 (m, 3H), 7.77 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 5.03 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.66 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 1.49 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.9, 147.4, 139.8, 134.2, 129.14 (q, $J=32.2$ Hz), 127.64 (q, $J=3.7$ Hz), 127.1, 124.4 (q, 270.0 Hz), 121.9, 121.6, 120.8, 109.7, 50.1, 35.4, 22.5, 21.2. HRMS (ESI) calcd $C_{21}H_{20}F_3N_6O$, $[M+H]^+$ 429.1650, found 429.1646.

N-((1-(4-乙基苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7n**): 产率 49%. 淡黄色固体, m.p. 198.3~199.6 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.08 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.94 (m, $J=8.9$, 1.2 Hz, 1H), 7.79 (m, $J=20.7$, 8.7 Hz, 3H), 7.41 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.03 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.64 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 2.72~2.64 (m, 2H), 1.49 (d, $J=6.6$ Hz, 6H), 1.21 (t, $J=7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 146.8, 144.8, 139.8, 135.1, 134.2, 129.5, 127.2, 125.5, 123.5, 121.6, 120.4, 109.7, 50.0, 35.4, 28.1, 22.5, 15.9. HRMS (ESI) calcd $C_{22}H_{25}N_6O$ $[M+H]^+$ 389.2090, found 389.2086.

1-异丙基-*N*-((1-(4-甲氧基苯基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**7o**): 产率 53%. 棕色固体, m.p. 52.5~53.6 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.07 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.39 (d, $J=0.6$ Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.93 (m, $J=8.9$, 1.5 Hz, 1H), 7.86~7.72 (m, 3H), 7.12 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 5.03 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.63 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.49 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 159.6, 146.6, 139.8, 134.2, 130.6, 127.2, 125.5, 123.5, 122.0, 121.6, 115.3, 109.7, 56.0, 50.0, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd $C_{21}H_{23}N_6O_2$ $[M+H]^+$ 391.1882, found 391.1887.

N-((1-(苄基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-羧酰胺(**8a**): 产率 50%. 白色固体, m.p. 141.1~142.6 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.02

(t, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.90 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.34 (m, $J=13.8$, 5.8 Hz, 5H), 5.57 (s, 2H), 5.02 (m, $J=13.1$, 6.5 Hz, 1H), 4.53 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 1.48 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 139.8, 136.6, 134.2, 129.2, 128.5, 127.1, 125.4, 123.5, 121.5, 109.7, 53.2, 50.0, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 375.1933, found 375.1935.

1-异丙基-*N*-((1-(4-(三氟甲基)苄基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-羧酰胺(**8b**): 产率 52%. 白色固体, m.p. 185.5~186.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.03 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.90 (m, $J=8.9$, 1.5 Hz, 1H), 7.75 (d, $J=8.6$ Hz, 3H), 7.51 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.70 (s, 2H), 5.02 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.55 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 1.48 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 146.2, 141.3, 139.8, 134.2, 129.18 (q, $J=32.0$ Hz), 127.1, 126.13 (q, $J=3.7$ Hz), 124.4 (q, $J=270.0$ Hz), 121.5, 109.7, 52.5, 50.0, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 443.1807, found 443.1811.

N-((1-(4-氰基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-羧酰胺(**8c**): 产率 49%. 淡棕色固体, m.p. 48.2~50.1 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.04 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.90 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 5.70 (s, 2H), 5.02 (m, $J=13.1$, 6.4 Hz, 1H), 4.55 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 1.48 (d, $J=6.5$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 146.2, 142.1, 139.8, 134.2, 133.2, 129.2, 127.1, 125.4, 124.0, 123.5, 121.5, 119.0, 111.4, 109.7, 52.5, 50.1, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 400.1886, found 400.1891.

1-异丙基-*N*-((1-(4-甲氧基苄基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基)-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**8d**): 产率 51%. 白色固体, m.p. 124.7~125.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.00 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.89 (m, $J=8.9$, 1.4 Hz, 1H), 7.74 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.02 (m, $J=13.2$, 6.6 Hz, 1H), 4.51 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.48 (d, $J=6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.7, 159.6, 146.0, 139.8, 134.2, 130.1, 128.5, 127.1, 125.4, 123.5, 123.2, 121.5, 114.5, 109.7, 55.6, 52.7, 50.0, 35.4, 22.5. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 405.2039, found 405.2026.

N-((1-(4-(叔丁基)苄基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲

基)-1-异丙基-1*H*-吡啶-5-甲酰胺(**8e**): 产率 42%. 淡黄色固体, m.p. 35.8~36.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.01 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.89 (m, $J=8.9$, 1.5 Hz, 1H), 7.74 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 5.51 (s, 2H), 5.02 (m, $J=13.1$, 6.5 Hz, 1H), 4.52 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 1.48 (d, $J=6.6$ Hz, 6H), 1.24 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.8, 151.0, 146.0, 139.8, 134.2, 133.7, 128.3, 127.1, 126.0, 125.4, 123.4, 121.5, 109.7, 52.9, 50.0, 35.4, 34.8, 31.5, 22.5. HRMS (ESI) calcd $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 431.2559, found 431.2551.

3.2.6 抗增殖细胞活性实验

称取 1~2 mg 样品置于 1.5 mL EP 管中, 用 DMSO 配制成 10 mmol/L 的溶液, 于 4 °C 保存, 根据实验所需浓度用培养基稀释. 取对数生长期的细胞, 消化计数后, 用培养基调整细胞密度, 以 3×10^3 个/孔接种至 96 孔板, 每孔 100 μL 培养基, 培养 8~12 h. 待细胞贴壁后, 弃去培养基, 加入用培养基稀释好的药物, 即将待测样品以 80.0, 40.0, 20.0, 10.0, 5.00, 2.50, 1.25, 0.625 $\mu\text{mol/L}$ 浓度加入 96 孔板中, 每个浓度设 3 个复孔, 另设空白对照组和阳性药对照组. 药物作用 72 h, 每孔加入 20 μL 噻唑蓝(MTT)溶液(5 mg/mL), 于 37 °C 孵育 4 h, 吸去液体, 加入 150 μL 的 DMSO, 摇均匀. 酶标仪 490 nm 处检测吸光度值, 试验结果采用 SPSS 21.0 统计软件计算 IC_{50} 值.

3.2.7 集落形成实验

以每孔 1000 个细胞的浓度接种到 6 孔板中的细胞培养过夜. 然后分别用指定浓度的化合物 **8a** 处理细胞 7 d. 随后, 在质量分数为 4% 的多聚甲醛中于 4 °C 固定 1 h 后, 细胞在室温下用质量分数为 1% 的溶于甲醇的结晶紫染色 30 min, 然后拍照. 之后, 将结晶紫溶解在体积分数为 75% 的乙醇中, 测量 OD 值.

3.2.8 细胞周期阻滞实验

将 PC-3 细胞接种于 6 孔培养板中, 并用化合物处理 24 h. 然后收集细胞, 在 4 °C 下用体积分数为 70% 乙醇固定 8 h. 用含有 50 mg/mL 碘化丙啶(PI)和 10 mg/mL RNaseA 的磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗固定细胞, 并重新悬浮. 然后将细胞悬浮液在室温下黑暗处培养 40 min. 之后, 用流式细胞仪(Becton, Dickinson and Company, NJ)分析样本的 DNA 含量.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **10**, **11**, **12**, **7a**~**7o**, **8a**~**8e** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS 谱图; 化合物 **3**, **4**, **13a**~**7o**, **14a**~**14e** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 的核磁数据与谱图, HRMS 的谱图. 这些材料可以免费从本

刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>
- [2] Xu, K. M.; Chen, R. C.; Schuster, D. M.; Jani, A. B. *Urol. Oncol.* **2019**, *37*, 611.
- [3] Zhang, X.; Zhu, Y.; Dong, S.; Zhang, Lu, A.; Li, Y. Y.; Lv, S.; Zhang, J. *Life Sci.* **2019**, *232*, 116526.
- [4] Li, J. Y.; Qiao, S.; Li, Y. J.; Wang, J.; Liu, W.; Pan, W. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *134*, 63.
- [5] Zhang, Y.; Rong, D.; Li, B.; Wang, Y. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 7900.
- [6] Cao, Y.; Luo, C.; Yang, P.; Li, P.; Wu, C. *Med. Chem. Res.* **2020**, *30*, 501.
- [7] Fabian, L. V.; Lilian, Y. M.; Josel, M. F. *J. Biomol. Screen.* **2011**, *16*, 862.
- [8] Tzvetkov, N. T.; Hinz, S.; Küppers, P.; Gastreich, M.; Müller, C. E. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6679.
- [9] Zhou, J.; Goh, B. C.; Albert, D. H.; Chen, C. S. *J. Hematol. Oncol.* **2009**, *2*, 33.
- [10] Cainap, C.; Qin, S.; Huang, W.-T.; Chung, I. J.; Pan, H.; Cheng, Y.; Kudo, M.; Kang, Y.-K.; Chen, P.-J.; Toh, H.-C.; Gorbunova, V.; Eskens, F. A. L. M.; Qian, J.; McKee, M. D.; Ricker, J. L.; Carlson, D. M.; El-Nowiem, S. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 172.
- [11] Bellesoeur, A.; Carton, E.; Alexandre, J.; Goldwasser, F.; Huillard, O. *Drug Des., Dev. Ther.* **2017**, *11*, 2801.
- [12] Keating, G. M. *Drugs* **2015**, *75*, 1903.
- [13] Yoshida, K.; Takagi, T.; Kondo, T.; Kobayashi, H.; Iizuka, J.; Fukuda, H.; Ishihara, H.; Okumi, M.; Ishida, H.; Tanabe, K. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2019**, *49*, 576.
- [14] Chakrapani, C.; Muniappan, M. *J. Clin. Diagn. Res.* **2016**, *10*, 01.
- [15] Wong, T. W.; Lee, F. Y.; Yu, C.; Luo, F. R.; Oppenheimer, S.; Zhang, H.; Smykla, R. A.; Mastalerz, H.; Fink, B. E.; Hunt, J. T.; Gavai, A. V.; Vite, G. D. *Clin. Can. Res.* **2006**, *12*, 6186.
- [16] Soria, J. C.; Massard, C.; Armand, J.-P.; Andreis, D. D.; Ropert, S.; Lopez, E.; Catteau, A.; James, J.; Marier, J.-F.; Beliveau, R. E. M. J. B. M. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, 463.
- [17] Kuntz, K. W.; Campbell, J. E.; Keilhack, H.; Pollock, R. M.; Knutson, S. K.; Porter-Scott, M.; Richon, V. M.; Sneeringer, C. J.; Wigle, T. J.; Allain, C. J.; Majer, C. R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Chesworth, R. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1556.
- [18] Li, M.; Zheng, N.; Li, J.; Zheng, Y.; Song, W. *Green Chem.* **2020**, *22*, 2394.
- [19] Worrell, J. A. M. B. T.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*, 457.
- [20] Yup, S.; Bae, S.; Seong, D.; Hyung, W. *WO 2014/129796*, **2014**.
- [21] Claudia, F.; Antonella, P.; Yeong, S. K.; Sunmin, L.; Andrea, G.; Marco D. P.; Anna, T.; Alice, Z.; Michela, C.; Nadia, Z.; Michelandrea, D. C. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3082.

(Li, L.; Fan, Y.)