

## 噻唑-噁唑串联杂环类 RNA 剪接抑制剂的发现及构效关系研究

张 蓉<sup>a,b</sup> 郜 祥<sup>a,c,d</sup> 陈玲玲<sup>a,c,d</sup> 南发俊<sup>\*,a,b</sup><sup>(a)</sup> 中国科学院大学 北京 100049<sup>(b)</sup> 上海药物研究所 上海 201203<sup>(c)</sup> 上海生物化学和细胞生物学研究所 上海 200031<sup>(d)</sup> 上海科技大学生命科学院 上海 201210

**摘要** 剪接是将内含子从前体 mRNA (pre-mRNA) 中移除, 并将侧翼外显子连接在一起形成成熟的 mRNA 的过程, pre-mRNA 剪接过程是高等生物中基因表达和蛋白质组学多样性的重要组成部分, 但其发生选择性剪接或剪接因子发生突变, 都会导致疾病的发生. 利用小分子化合物对剪接过程的调控, 或为相关疾病的治疗提供另一种选择. 利用 *circmCherry* 表达体系进行化合物筛选, 发现天然产物 Leucamide A 的简单衍生物对于剪接过程具有一定的抑制作用, 以其为先导化合物, 进行了结构改造后, 新设计合成了约 36 个噻唑-噁唑双杂环串联结构的化合物, 其中 2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-甲氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**91**)对于剪接过程有较强的抑制作用.

**关键词** 剪接抑制剂; *circmCherry* 表达体系; Leucamide A 衍生物; 构效关系

## Discovery and Structure-Activity Relationship Studies of Thiazole-Oxazole Tandem Heterocyclic RNA Splicing Inhibitors

Zhang, Rong<sup>a,b</sup> Gao, Xiang<sup>a,c,d</sup> Chen, Lingling<sup>a,c,d</sup> Nan, Fajun<sup>\*,a,b</sup><sup>(a)</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049<sup>(b)</sup> Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai 201203<sup>(c)</sup> Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai 200031<sup>(d)</sup> School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210

**Abstract** Precursor mRNAs (pre-mRNAs) undergo splicing to remove introns and ligation of their exons to yield mature mRNAs. Pre-mRNA splicing is an essential component of gene expression and proteomic diversity in higher organisms. However, the alternative splicing or mutation of splicing factors have been found in human diseases. By the use of the small molecules modulate the splicing process will provide potential treatment for related diseases. In this paper, *circmCherry* expression system was used to screen compounds that could affect splicing process. Several simple derivatives of natural product Leucamide A have been found to have inhibitory effects, and 36 compounds with thiazole-oxazole tandem structural core were designed and synthesized, of which methyl 2-((S)-1-(2-((S)-1-(4-methoxybenzamido)-2-methylpropyl)thiazol-4-yl)-5-methyloxazole-4-carboxamido)ethyl)oxazole-4-carboxylate (**91**) shows most potent inhibitory activity on splicing.

**Keywords** splicing inhibitors; *circmCherry*-expression system; Leucamide A derivatives; structure-activity relationships

剪接是真核生物前体 mRNAs (pre-mRNAs) 通过去除内含子并连接其外显子形成成熟 mRNA 的过程. 通常剪接(canonical splicing)过程是将上游 5'剪接位点(剪接供体)与下游 3'剪接位点(剪接受体)跨内含子进行连接形成线性 mRNA, 但是也存在有反向剪接(back-splicing)过程, 是指通过将下游 5'剪接位点与上游 3'剪接位点连

接以产生共价闭合的环状 RNA<sup>[1]</sup>. 尽管环形 RNA 在真核生物中的表达水平较低, 但越来越多的证据表明, 其在生理和病理条件下具有重要功能, 比如能够影响免疫反应<sup>[2]</sup>、促进癌症发展<sup>[3]</sup>、引发神经精神疾病<sup>[4]</sup>等. 若能够通过小分子化合物调控剪接, 特别是反向剪接过程, 或为因环形 RNA 表达紊乱所导致的疾病提供一种治疗

\* Corresponding author. E-mail: fjan@simm.ac.cn

Received February 25, 2022; revised May 19, 2022; published online May 31, 2022.

选择. 但是目前针对于剪接过程的调控, 大多是一些小分子抑制剂靶向线性剪接过程以缓解癌症的发展(图1)<sup>[5-6]</sup>, 对于反向剪接的调控暂无小分子报道.

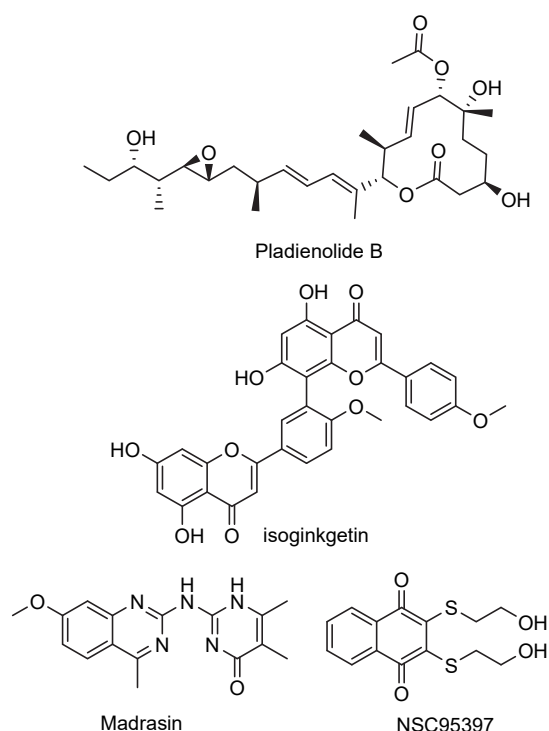


图1 线性剪接抑制剂

Figure 1 Liner splicing inhibitors

针对线性剪接和反向剪接调控过程, Dox 诱导的 *circmCherry* 表达体系可通过后续的荧光强度来表示两者发生的效率, 其中 *circmCherry* 是由插入 IRES 的反向 *mCherry* 序列经反向剪接而得<sup>[2]</sup>, *circmCherry* (环状 RNA) 与 *mCherry* (线性 RNA) 两者 RNA 水平的形态不同, 但都可以翻译出 mCherry 红色荧光蛋白. 研究人员已通

过该体系进行全基因组筛选, 发现了一系列与反向剪接密切相关的反式作用蛋白因子, 包括与抗病毒免疫相关的 NF90 和 NF110 等. 该方法是将人类 ON-TARGETplus (OTP) siRNA 文库反向转染到能够稳定表达 Dox 诱导的 *circmCherry* 的 HeLa 细胞中, 然后加入 Dox 诱导 mCherry 和 EGFP 的表达, 通过监测 mCherry 和 EGFP 的荧光信号来筛选能够影响反向剪接的蛋白因子<sup>[2]</sup>. 所以我们使用该体系来尝试筛选出能够影响剪接过程的小分子化合物, 发现天然产物 Leucamide A 简单的衍生物对于线性剪接和反向剪接皆具有一定的抑制作用, 后续, 在此结构基础上进行了修饰, 以求进一步提高其对于剪接的抑制作用, 另一方面也尝试发现其对于线性剪接及反向剪接的选择性抑制.

## 1 结果与讨论

### 1.1 化合物筛选流程

小分子化合物筛选流程如下: 将筛选化合物注入在 96 孔板稳定表达载体的 Hela 细胞中. 48 h 后, 加入 Dox 以诱导 EGFP 和 mCherry 的表达. 24 h 后, 对 EGFP 和 mCherry 的荧光信号进行监测, 以确保荧光变化是由 Dox 诱导的“新生”mCherry 和 EGFP 产生的(图 2B). 以二甲亚砜(DMSO)作为空白对照, 以 Isoginkgetin<sup>[7]</sup>作为阳性对照, 通过荧光强弱比较化合物对于剪接的作用情况来直观快速地筛选大量化合物. 若是该基因座上仅发生线性剪接过程, 那么转录出的 mRNA 是 *1/2egfp-RmCherry-1/2egfp*, 翻译出的蛋白并不体现出荧光. 若存在反向剪接, 可转录出 *circmCherry*, 翻译出的蛋白可体现红色荧光. 当存在外显子跳读<sup>[8]</sup>或经反向剪接<sup>[9]</sup>后, 两侧各 *1/2 egfp* 可经线性剪接生成线性 *egfp*, 翻译出

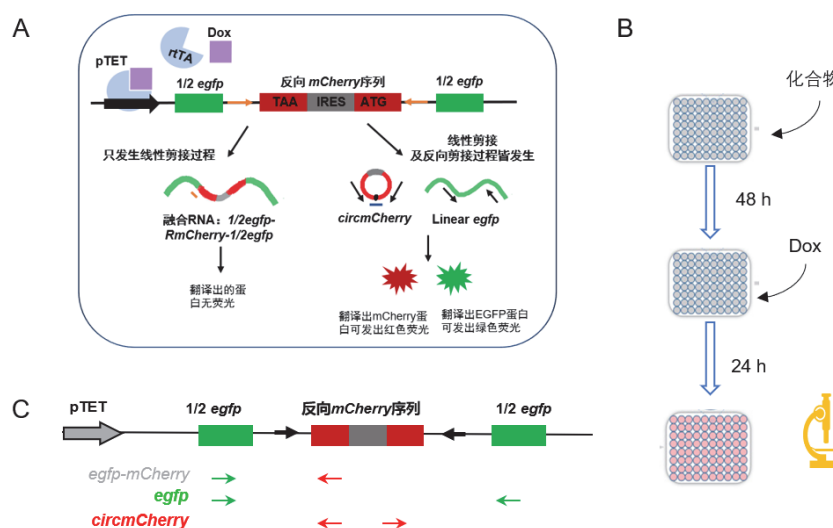


图2 活性化合物的筛选

Figure 2 Screening of active compounds

的蛋白可体现绿色荧光(图2A). 若是红色荧光相较于空白对照减弱, 则可以反映出反向剪接过程受到抑制; 反之, 则化合物能够促进反向剪接. 该初筛过程, 所使用的溶剂及化合物的浓度分别为 IGK (Isoginketin) (33  $\mu\text{mol/L}$ )、小分子化合物(40  $\mu\text{mol/L}$ )、DMSO [0.1% (体积分数)]及 Dox (5  $\mu\text{g/mL}$ ). 该方式操作简单, 可用于大批量筛选活性化合物.

通过筛选, 发现了化合物 **W3** 代表的一系列化合物(图3A)对报告基因表达有一定的抑制作用. 这些化合物源自海洋天然产物 Leucamide A(图3B)的简单衍生物, 其独特的 4,2-双杂环串联结构在各种具有生物活性的天然产物中被发现<sup>[10]</sup>, 可体现出抗菌和抗病毒作用<sup>[11]</sup>. 此外在对于 Leucamide A 衍生物抗 HBV (hepatitis B virus) 的机制研究中, 发现其是通过阻断 pgRNA 的包封, 干扰核衣壳的组装来抑制 HBV 的复制<sup>[12]</sup>, 显示这类化合物存在与核酸(RNA)作用的可能. 由于 **W3** 等化合物在 *circmCherry* 表达体系中体现出一定的剪接抑制作用, 所以在 Leucamide A 骨架上考虑后续修饰位点(图3B)进行构效改造, 设计并合成了一系列具有噻唑-噻唑串联结构的化合物, 以求进一步提升剪接抑制活性.

## 1.2 合成路线的设计

关键中间体 **1** (Scheme 1)的合成过程参考了王文龙博士<sup>[13]</sup>的工作, 中间体 **1** 经脱 Boc 后得到中间体 **2**<sup>[14]</sup>, 再与不同的取代苯甲酸反应生成化合物 **A3~D3**. 化合物 **A3~D3** 的甲酯可以继续水解成酸, 并且与不同的胺

缩合生成 **A4~G4**. 另一方面, 中间体 **1** 也可以先进行酯基水解, 然后与化合物 **6**<sup>[13]</sup>缩合得到中间体 **7**<sup>[14]</sup>. **7** 经脱保护得到大致的结构骨架, 之后, 在此基础上通过酰胺缩合的方式得到 **9a~9s**、**10a~10d** 和 **11a~11b** 等一系列具有噻唑-噻唑串联结构的化合物(Scheme 1).

## 1.3 噻唑-噻唑双环类化合物抑制剪接的活性测定

通过筛选发现 Leucamide A 衍生物 **W3**、**W11** 和 **W12** 对剪接过程具有抑制活性, 为了后续构效改造的准确, 首先对 **W3/W11/W12** 进行细胞毒性检测, 以确定化合物的给药浓度(图4), 可以清晰地发现, 当给药浓度在 40  $\mu\text{mol/L}$  时有极低的细胞毒性, 且剪接抑制作用也较强, 所以在后续化合物的剪接活性检测中, 给药浓度先设置为 40  $\mu\text{mol/L}$ . 之前阳性对照 IGK 设置 33  $\mu\text{mol/L}$ , 剂量过大, 细胞生存周期较短, 故调整为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 其余数据与初筛一致.

经过对前期所筛选的化合物进行简单的构效分析, 发现当化合物 **R<sup>1</sup>** 位置连接一些脂环烃、脂肪烃时, 对报告基因的表达几乎没有影响. 而对报告基因具有一定抑制作用的化合物(**W3/W11/W12**)在 **R<sup>1</sup>** 位置分别为双键以及取代苯环的结构, 所以推测剪接抑制活性与 **R<sup>1</sup>** 有关, 由此先对 **R<sup>1</sup>** 进行考察(图5). 我们仍然使用 *circmCherry* 表达系统来检测化合物的活性, 同时, 由于 RNA 翻译为蛋白的过程中影响因素很多, 所以蛋白荧光强弱并不能完全对应于 RNA 水平, 为了更为精准地反映报告基因在 RNA 水平的表达量, 可以通过引物的

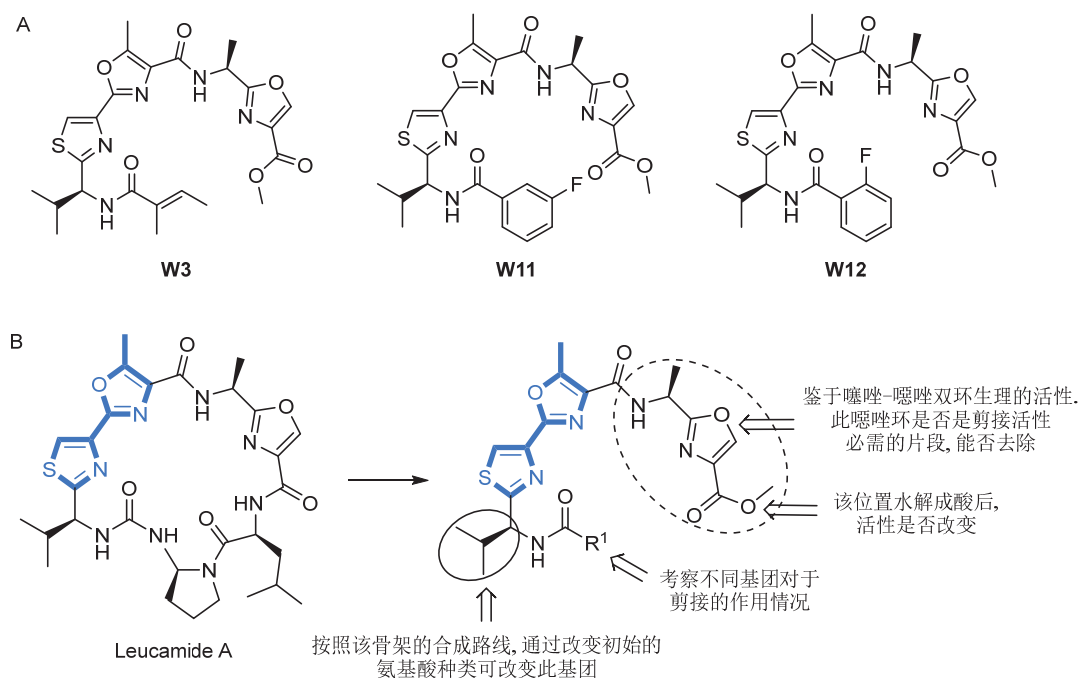
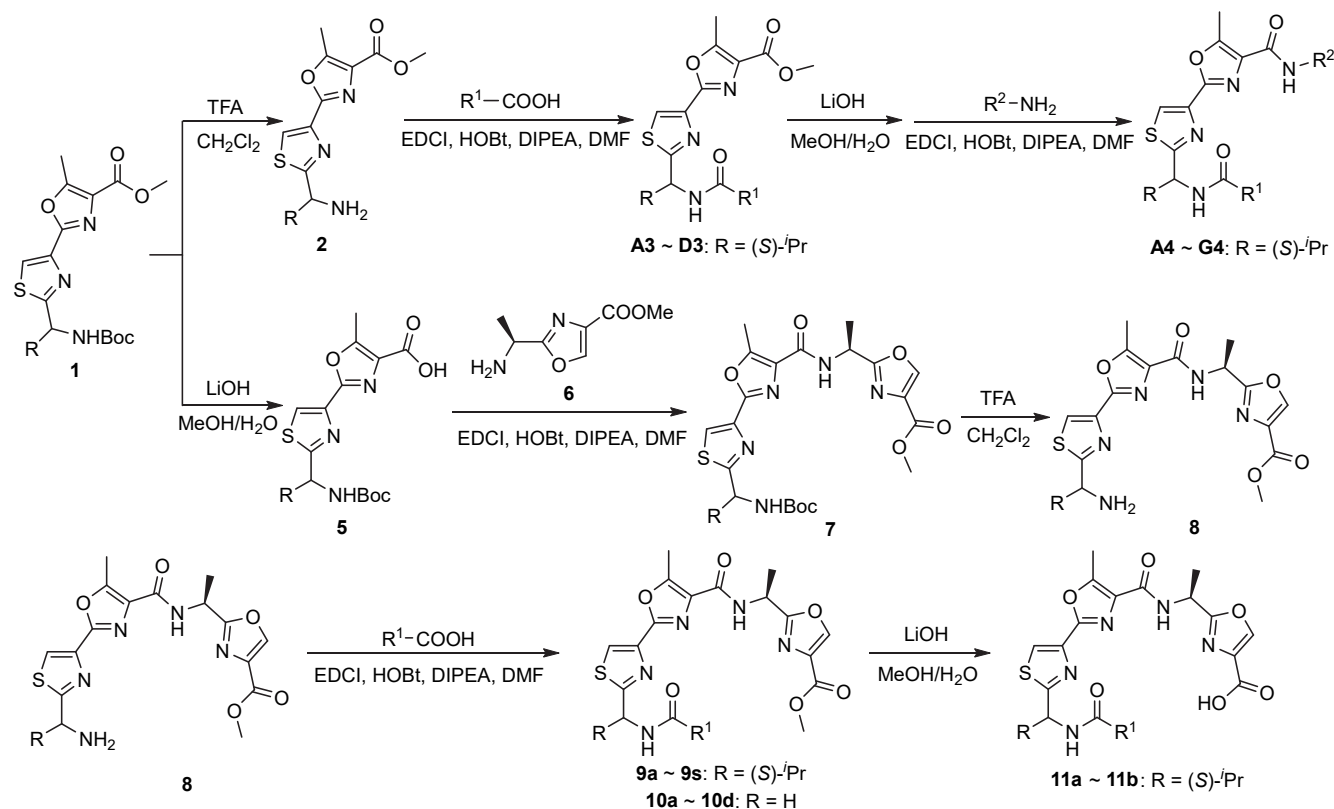


图3 Leucamide A 衍生物的设计思路  
Figure 3 Design idea of Leucamide A derivatives



图式 1 Leucamide A 衍生物的合成  
Scheme 1 Synthesis of Leucamide A derivatives

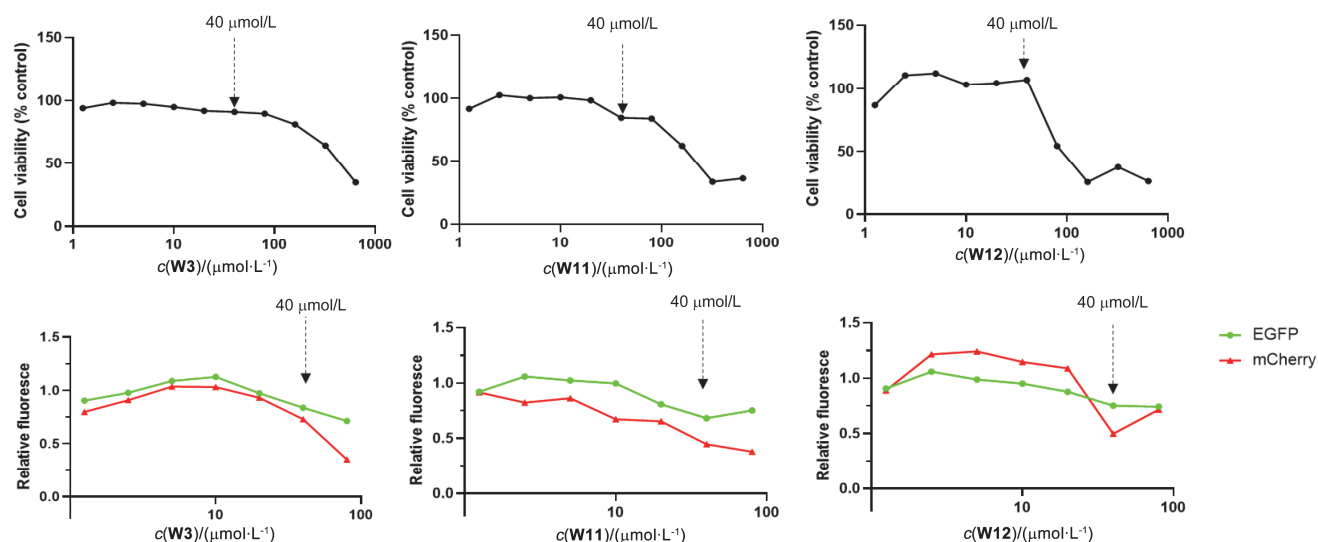


图 4 W3/W11/W12 细胞毒性及量-效关系  
Figure 4 Cytotoxicity and dose-effect relationship of W3/W11/W12

设计, 运用实时荧光定量 PCR (Real Time Quantitative PCR, RT-qPCR) 直接检测其在 RNA 水平的表达(图 2C). 在该体系中, *egfp-mCherry* 的表达量可体现出常规剪接的效率, *circmCherry* 的表达量可体现出反向剪接的效率, 所以若荧光蛋白数据结果与 qPCR 结果不一致时, 以后者结果为准.

通过上述合成路线进行化合物 9a~9c 的合成, 其对于剪接抑制的活性情况如图 5B 所示. 图中绿色和红色颜色深度表明 EGFP 及 mCherry 蛋白的表达量, 颜色越浅, 表明化合物对剪接的抑制作用越强. 另外图中右侧簇状柱形图是用 RT-qPCR 所检测的 *egfp-mCherry*、*egfp*、*circmCherry* 在 RNA 水平的表达量, 其值越低表

示剪接抑制越强, *egfp-mCherry* 是由线性剪接而得, *circmCherry* 是由反向剪接而来, 所以可以发现当  $R^1$  连接一些环内双键时(**9c**), 活性优于 **W3**, 另外化合物 **9b** 几乎不影响报告基因的表达, 表明双键与羰基共轭的条件不是抑制活性的充分条件. 由于在剪接过程中存在许多的 RNA-RNA、蛋白-RNA 的相互作用, 所以在  $R^1$  位置参考了一些能与 RNA 结合的化合物中常见基团, 如苯并噻唑和 2-嘧啶胺(图 5C)<sup>[15]</sup>, 试图提高其对于剪接过程的抑制. 所合成的一系列化合物中具有苯环的化合物 **9e** 显示明显的剪接抑制活性, 但是其 RT-qPCR 结果显示 *egfp-mCherry* 的表达量也有所降低, 说明该化合物对于线性剪接过程也有所抑制. 然后在 **9e** 基础上, 通过苯环上取代基的修饰设计合成化合物 **9i~9n**, 其中 **9i** 和 **9n** 对于剪接的抑制作用优于 **9e**. 由于配制的 **9n** 的 DMSO 溶液一旦加入到培养基后, 会有些不溶物生成, 可能会对实验结果有所影响, 而 **9i** 并无此现象, 为了后续结果的准确, 则选择 **9i** 继续进行修饰. 发现当苯环对位烷氧基链延长后, 抑制活性有所下降, **9i** 的活性仍最优.

其次, 考察骨架中异丙基侧链对于活性的影响, 在原骨架的基础上, 保留之前活性较好的化合物中的  $R^1$ , 改变异丙基侧链合成化合物 **10a~10d**(图 6), 观测活性的变化. 发现去除异丙基之后, 报告基因的表达量几乎不变, 不影响剪接过程, 说明异丙基侧链是活性所需基团.

另外也探讨骨架上其他的基团对活性的影响. 首先, 在之前活性较好的化合物(**9i**、**9h**)的基础上, 将酯基水解成酸后得到化合物 **11a**、**11b**(图 7), 观测到其对报告基因的表达几乎无影响, 说明剪接抑制活性基本丧失. 在后续的改造中, 尽量避免羧基的使用.

考虑到噻唑-噻唑双杂环串联结构的生理活性, 我们尝试减去另外的噻唑环以简化骨架(图 8A), 所得到的化合物 **A3~D3** 皆保留对于剪接的抑制活性(图 8B). 特别是具有强抑制活性的化合物 **D3**, 表明噻唑环是可替换的. 之后对经 **A3~D3** 衍生而得到的化合物 **A4~G4** 进行验证, 报告基因表达量的减少皆显示该类化合物对于剪接具有良好的抑制作用(图 8C、8D).

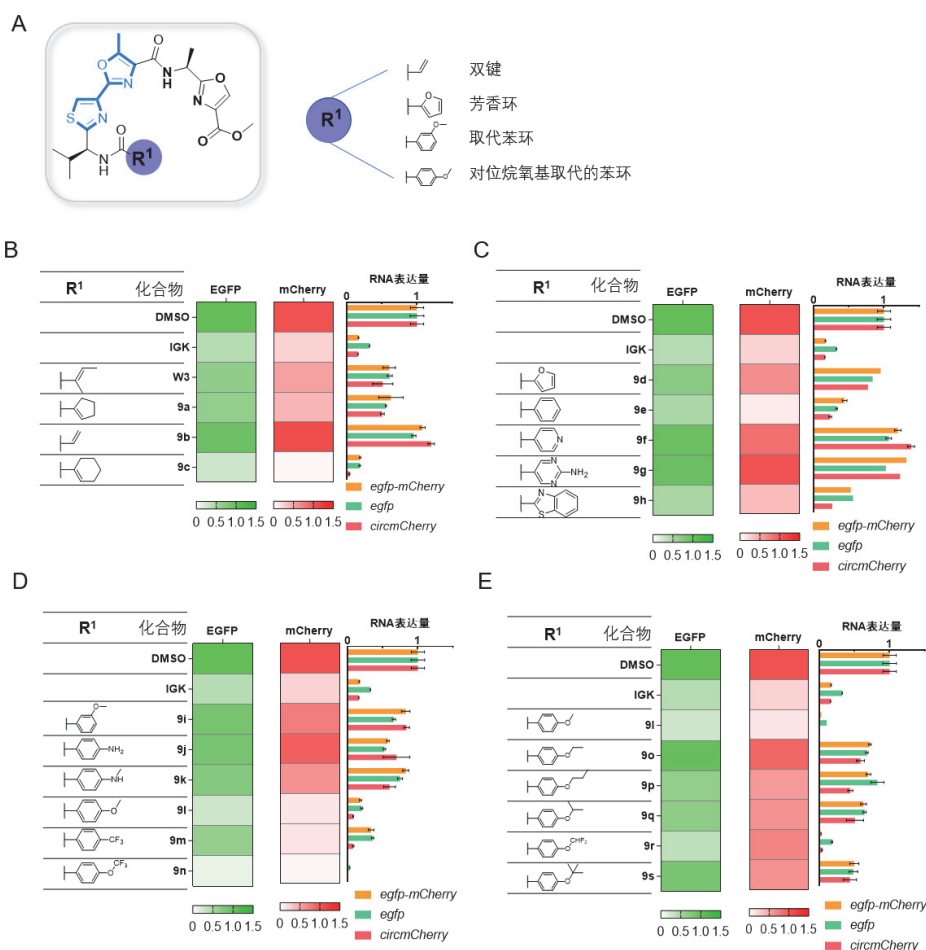


图 5  $R^1$  基团的考察  
Figure 5 Investigation of  $R^1$  group

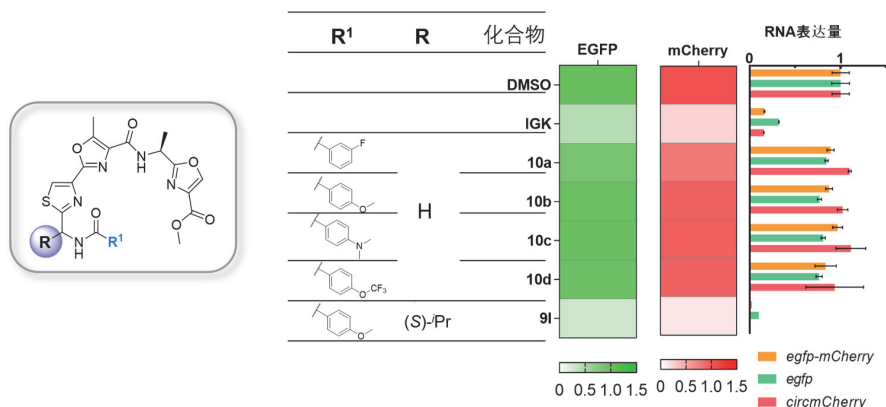


图6 去除异丙基侧链后的活性  
Figure 6 Activity after isopropyl removal

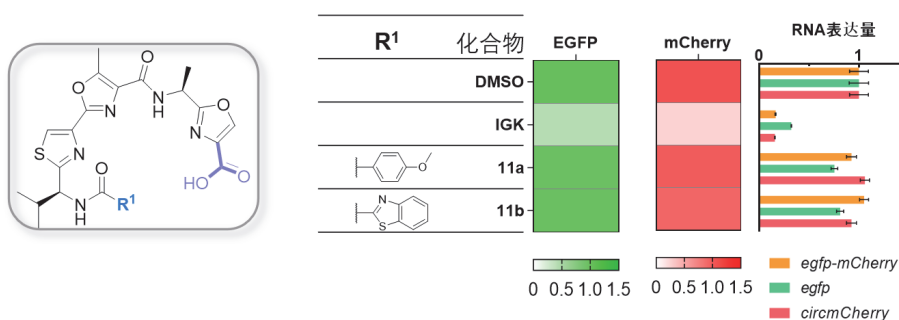


图7 酯基水解后的活性  
Figure 7 Activity after ester hydrolysis

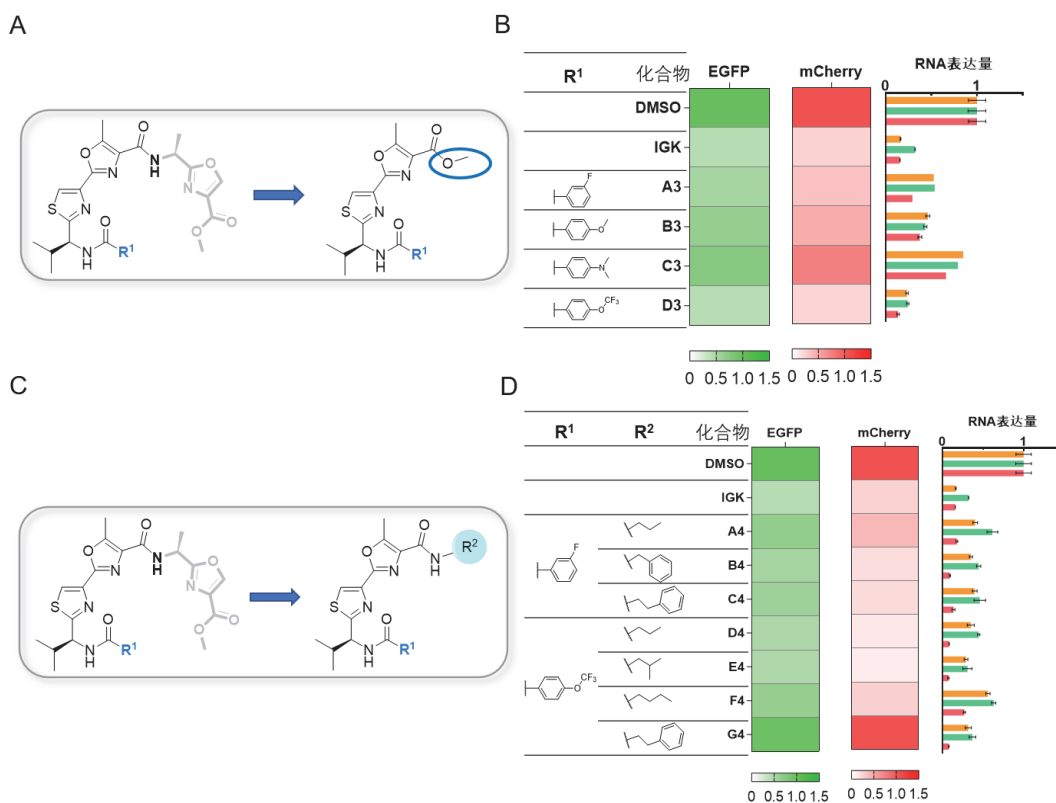


图8 噁唑环的去除及替换后的活性  
Figure 8 Activity after removal and replacement of oxazole

## 2 结论

在本文研究中, 通过 *circmCherry* 表达系统筛选出可以抑制剪接的小分子化合物, 对苗头化合物进行结构优化后新设计合成了一系列具有噻唑-噁唑双环串联结构的化合物, 其中 **91** 对剪接的抑制作用很强. 对其进行细胞毒性检测, 发现在给药浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$  时有较大的细胞毒性, 于是降低给药浓度, 化合物 **91** 的给药浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时几乎没有细胞毒性. 通过 qPCR 检测报告基因在 RNA 水平的表达量, 可以发现其仍具有较强的剪接抑制作用, 说明 **91** 并非是通过杀伤细胞而影响剪接, 其对剪接过程确有抑制活性.

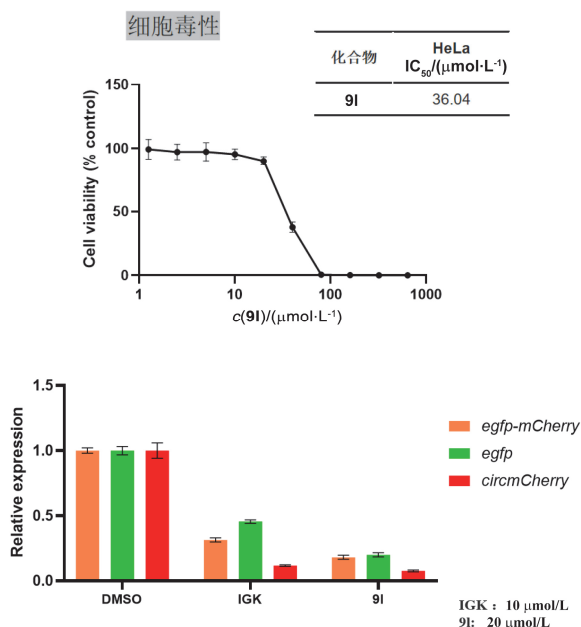


图9 化合物 **91** 的细胞毒性及其在给药浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时的活性结果

Figure 9 Cytotoxicity of compound **91** and its activity results at dose concentration of 20  $\mu\text{mol/L}$

另外, 初步总结了该噻唑-噁唑双环类剪接抑制剂的构效关系(图 10), 但该类化合物似乎难以实现对于性

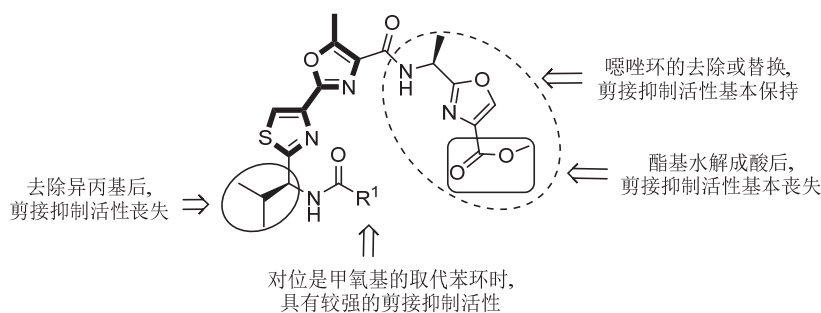


图 10 噻唑-噁唑双环类剪接抑制剂的构效关系

Figure 10 Structure-activity relationship of thiazole-oxazole tandem heterocyclic RNA splicing inhibitors

剪接及反向剪接的选择性抑制, 其抑制剪接过程的机制也尚未清晰, 值得进一步深入探讨. 该噻唑-噁唑双环类剪接抑制剂的发现及构效关系研究, 为后续开发新型剪接抑制剂提供参考.

## 3 实验部分

### 3.1 仪器与试剂

$^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 谱图数据由 Bruker Avance 400 MHz 核磁共振波谱仪(氘代氯仿为溶剂, TMS 为内标), 高分辨质谱数据由 Bruker Daltonics microTOF-QII 质谱仪测定; 合成过程中用到的仪器有: 德国 Heidolph MR3001 型恒温加热磁力搅拌器, 瑞士 Büchi R-200 型旋转蒸发仪、德国 Sartorius 电子天平、DLSB 低温冷却循环泵、SHZ-D(III)循环水式真空泵、70-1 型远红外线干燥箱、ZK-82BB 型电热真空干燥箱和 KQ-100DZ 型数控超声波清洗仪等; 柱层析所用硅胶及薄层层析色谱(TLC)所用硅胶板为青岛海洋化工有限公司生产, 型号 200~300 目. 所使用石油醚沸程为 60~90  $^{\circ}\text{C}$ ; 其它试剂和溶剂如无特殊说明, 均为分析纯或化学纯.

### 3.2 实验方法

#### 3.2.1 中间体 **2** 的通用合成方法

在 0  $^{\circ}\text{C}$  下, 向溶于二氯甲烷(2 mL)的 **1** (0.47 mmol) 中, 加入三氟乙酸(0.7 mL, 9.42 mmol), 并在此温度下搅拌 20 min, 逐渐升至室温. 5 h 后, 将反应液浓缩, 用乙酸乙酯进行稀释, 饱和碳酸氢钠水溶液调至 pH=7, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 得中间体 **2**.

(*S*)-2-[2-(1-氨基-2-甲基丙基)噻唑-4-基]-5-甲基噁唑-4-甲酸甲酯(**2a**): 微黄色油状物, 产率为 75%.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.05 (s, 1H), 4.22 (d,  $J=5.0$  Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.36~2.25 (m, 1H), 1.02 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 0.93 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H).

## 3.2.2 终产品 A3~C3 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向溶于乙酸乙酯/水(0.8 mL : 0.2 mL)的 **2** (0.11 mmol) 和碳酸氢钠(88.3 mg, 1.05 mmol) 的溶液中, 加入 R<sup>2</sup>COCl (0.17 mmol), 逐渐升至室温. 1 h 后, 将反应液用乙酸乙酯和水稀释, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=2: 1]得化合物 **3**.

(S)-2-{2-[1-(3-氟苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酸甲酯(**A3**): 白色固体, 收率 45%. m.p. 77.6~84.1 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 1.0$  (c 0.05, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.02 (s, 1H), 7.65~7.55 (m, 2H), 7.44 (td, *J*=8.0, 5.6 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.0, 2.8, 1.2 Hz, 1H), 7.04 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 5.43 (dd, *J*=8.8, 6.8 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.56~2.47 (m, 1H), 1.06 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 1.01 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 171.4, 165.9, 163.6, 162.6, 162.0, 156.5, 155.1, 142.9, 136.2, 130.3, 128.5, 122.6, 120.4, 118.9, 118.8, 114.7, 114.6, 56.8, 52.1, 33.9, 19.5, 18.3, 12.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 418.1231, found 418.1239.

(S)-2-{2-[1-(4-甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酸甲酯(**B3**): 白色固体, 产率 47%. m.p. 75.3~86.4 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 0.8$  (c 0.05, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.01 (s, 1H), 7.81 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.95 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.88 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 5.48~5.38 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.61~2.47 (m, 1H), 1.05 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 1.01 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.3, 166.6, 162.5, 156.5, 155.2, 142.9, 129.0, 128.5, 126.2, 120.3, 113.9, 56.6, 55.4, 52.0, 33.7, 19.6, 18.2, 12.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 430.1431, found 430.1440.

(S)-2-{2-[1-(4-二甲氨基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酸甲酯(**C3**): 白色固体, 产率 32%. m.p. 190.0~190.4 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 1.0$  (c 0.03, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.99 (s, 1H), 7.75 (d, *J*=9.2 Hz, 2H), 6.76 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.69 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 5.44 (dd, *J*=8.8, 6.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.03 (s, 6H), 2.73 (s, 3H), 2.62~2.48 (m, 1H), 1.05~0.97 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173.0, 167.0, 162.7, 156.5, 155.3, 152.7, 142.9, 128.7, 128.4, 120.5, 120.3, 111.1, 56.5, 52.0, 40.1, 33.5, 19.7, 18.1, 12.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 443.1748, found 443.1753.

## 3.2.3 终产品 D3 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向含有 **2** (0.11 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) (2 mL) 溶液中, 加入 HOBT (43 mg, 0.32 mmol) 和 R<sup>2</sup>-COOH (0.12 mmol), 并在此温度上继续搅拌 20 min. 再加入 EDCI (11.2 mg, 0.06 mmol), 逐渐升至室温. 2 h 后, 将反应液用乙酸乙酯和水稀释, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=2: 1]得化合物 **3**.

(S)-2-{2-[1-(4-三氟甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酸甲酯(**D3**): 白色固体, 产率 35%. m.p. 77.2~84.2 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 1.0$  (c 0.03, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.01 (s, 1H), 7.90 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.30 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.02 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 5.43 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.73 (d, *J*=3.3 Hz, 3H), 2.57~2.46 (m, 1H), 1.06 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 1.01 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 171.4, 165.9, 162.6, 156.5, 155.1, 151.7, 142.9, 132.5, 129.1, 128.5, 121.3, 120.7, 120.4, 119.2, 56.8, 52.1, 33.9, 19.5, 18.3, 12.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 484.1149, found 484.1157.

## 3.2.4 终产品 A4~G4 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向含有 **3** (0.37 mmol) 的 MeOH/H<sub>2</sub>O (10 mL : 2.5 mL) 溶液中, 加入氢氧化锂(22 mg, 0.90 mmol), 逐渐升至室温. 搅拌 1 h 后, TLC 监测, 显示反应基本完全. 将反应液浓缩, 用乙酸乙酯进行稀释, 2 mol/L HCl 溶液调至 PH=2, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 得到噻唑酸.

于 0 °C 向含有 HOBT (36 mg, 0.27 mmol) 和噻唑酸 (36 mg, 0.09 mmol) 的 DMF (2 mL) 溶液中加入胺(0.08 mmol), 并将反应液在 0 °C 下继续搅拌 20 min. 然后加入 EDCI (21 mg, 0.11 mmol), 并将混合物搅拌 2 h, 逐渐升至室温. 2 h 后, 将反应液用乙酸乙酯和水稀释, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=2: 1]得化合物 **4**.

(S)-*N*-正丙基-2-{2-[1-(3-氟苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺(**A4**): 白色固体, 产率 51%. m.p. 200.0~200.8 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.6$  (c 0.05, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.88 (s, 1H), 7.63~7.54 (m, 2H), 7.45 (td, *J*=8.0, 5.6 Hz, 1H), 7.26~7.21 (m, 1H), 7.12 (t, *J*=6.0 Hz, 1H), 6.97 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 5.44 (dd, *J*=8.8, 6.8 Hz, 1H), 3.41~3.34 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.62~2.52 (m, 1H), 1.68~1.58 (m,

2H), 1.07 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.03 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 0.98 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 165.9, 163.8, 161.7, 154.0, 153.1, 143.3, 136.3, 130.4, 122.6, 119.8, 119.0, 118.8, 114.7, 114.5, 56.9, 40.7, 33.7, 23.0, 19.6, 18.2, 11.9, 11.5; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{FN}_4\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  445.1704, found 445.1713.

(*S*)-*N*-苄基-2-{2-[1-(3-氟苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺(**B4**): 白色固体, 产率 44%. m.p. 193.7 ~ 199.1  $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -2.3 ( $c$  0.04,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 9.18 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 8.77 (t,  $J=6.4$  Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.75 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 7.59~7.51 (m, 1H), 7.42 (td,  $J=8.6, 2.6$  Hz, 1H), 7.35~7.29 (m, 4H), 7.26~7.20 (m, 1H), 5.14 (t,  $J=8.4$  Hz, 1H), 4.42 (d,  $J=6.4$  Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.47~2.42 (m, 1H), 1.05 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 0.91 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 174.4, 165.4, 163.3, 161.4, 154.4, 153.0, 141.9, 140.1, 136.7, 131.1, 130.4, 128.7, 127.9, 127.2, 124.3, 122.2, 119.0, 114.9, 58.2, 42.4, 32.5, 20.1, 19.6, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{FN}_4\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  493.1704, found 493.1709.

(*S*)-*N*-苄基-2-{2-[1-(3-氟苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺(**C4**): 微黄色油状物, 产率 102%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -0.3 ( $c$  0.07,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Methanol}-d_4$ )  $\delta$ : 8.16 (s, 1H), 7.69 (d,  $J=9.2$  Hz, 1H), 7.64~7.57 (m, 1H), 7.51 (td,  $J=8.0, 5.6$  Hz, 1H), 7.34~7.23 (m, 5H), 7.18 (ddd,  $J=8.7, 5.6, 2.4$  Hz, 1H), 5.27 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 3.62~3.54 (m, 2H), 2.92~2.85 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.55~2.44 (m, 1H), 1.11 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.00 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{MeOD}$ )  $\delta$ : 173.7, 167.4, 163.6, 162.5, 161.7, 154.4, 153.2, 142.1, 139.0, 136.2, 130.2, 129.8, 128.4, 128.1, 126.0, 123.1, 120.6, 118.4, 114.0, 57.9, 40.3, 35.3, 32.8, 18.7, 18.0, 10.3; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{FN}_4\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  507.1861, found 507.1863.

(*S*)-*N*-正丙基-2-{2-[1-(4-三氟甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺(**D4**): 白色固体, 产率 63%. m.p. 166.7~167.1  $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -0.5 ( $c$  0.06,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform}-d$ )  $\delta$ : 7.92~7.89 (m, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.32~7.28 (m, 2H), 7.11 (t,  $J=6.2$  Hz, 1H), 7.02 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 5.44 (dd,  $J=8.8, 6.8$  Hz, 1H), 3.40~3.34 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.61~2.53 (m, 1H), 1.68~1.58 (m, 2H), 1.07 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.03 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 0.98 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 165.9, 161.7, 154.0,

153.1, 151.7, 143.3, 132.4, 130.4, 129.1, 121.6, 120.7, 119.8, 119.0, 56.9, 40.7, 33.7, 23.0, 19.6, 18.3, 11.9, 11.5; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  511.1621, found 511.1631.

(*S*)-*N*-异丁基-2-{2-[1-(4-三氟甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺(**E4**): 白色固体, 产率 80%. m.p. 157.8~160.3  $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -0.6 ( $c$  0.03,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{Chloroform}-d$ )  $\delta$ : 7.93 (s, 1H), 7.91 (d,  $J=2.9$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J=9.2$  Hz, 2H), 7.16 (t,  $J=6.3$  Hz, 1H), 7.03 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H), 5.46 (dd,  $J=8.8, 6.9$  Hz, 1H), 3.25 (td,  $J=6.7, 2.3$  Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.63~2.55 (m, 1H), 1.94~1.87 (m, 1H), 1.09 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.05 (d,  $J=6.7$  Hz, 3H), 1.00 (d,  $J=6.7$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 165.9, 161.8, 154.0, 153.1, 151.8, 143.3, 132.4, 130.4, 129.1, 120.7, 119.8, 56.9, 46.3, 33.7, 28.8, 20.2, 19.6, 18.2, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  525.1778, found 525.1784.

(*S*)-*N*-正丁基-2-{2-[1-(4-三氟甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺(**F4**): 白色固体, 产率 77%. m.p. 161.4~161.7  $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -3.0 ( $c$  0.05,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{Chloroform}-d$ )  $\delta$ : 7.92 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.31 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H), 7.15~7.06 (m, 2H), 5.46 (dd,  $J=8.9, 6.9$  Hz, 1H), 3.42 (q,  $J=7.1$  Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.62~2.54 (m, 1H), 1.67~1.56 (m, 2H), 1.49~1.39 (m, 2H), 1.09 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.04 (d,  $J=6.7$  Hz, 3H), 0.97 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 165.9, 161.7, 154.0, 153.1, 151.8, 143.2, 132.4, 130.4, 129.1, 120.7, 119.8, 56.9, 38.7, 33.7, 31.8, 20.2, 19.6, 18.3, 13.7, 11.8; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  525.1778, found 525.1784.

(*S*)-*N*-苄基-2-{2-[1-(4-三氟甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺(**G4**): 白色固体, 产率 39%. m.p. 125.4~126.8  $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -0.6 ( $c$  0.05,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{Methanol}-d_4$ )  $\delta$ : 8.16 (s, 1H), 8.01~7.93 (m, 2H), 7.40 (d,  $J=7.9$  Hz, 2H), 7.31~7.25 (m, 4H), 7.22~7.13 (m, 1H), 5.30 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 3.62~3.55 (m, 2H), 2.91 (dd,  $J=8.2, 6.7$  Hz, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.57~2.48 (m, 1H), 1.13 (d,  $J=6.7$  Hz, 3H), 1.02 (d,  $J=6.7$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{MeOD}$ )  $\delta$ : 173.8, 167.5, 162.4, 154.4, 153.2, 151.5, 142.2, 139.0, 132.8, 129.8, 129.4, 128.4, 128.2, 126.0, 120.7, 120.4, 57.9, 40.3, 35.3, 32.8, 18.7, 18.0, 10.4; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  573.1778, found

573.1784.

### 3.2.5 中间体 7 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向含有 **1** (3.5 mmol) 的 MeOH/H<sub>2</sub>O (12 mL : 3 mL) 溶液中, 加入氢氧化锂 (126 mg, 3.1 mmol), 逐渐升至室温. 搅拌 1 h 后, 通过 TLC 监测, 显示原料基本反应完全. 将反应液浓缩, 用乙酸乙酯进行稀释, 2 mol/L HCl 溶液调至 pH=2, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 得粗产物 **5**. 之后于 0 °C 向含有 HOBT (184 mg, 1.32 mmol) 和 **5** (0.48 mmol) 的 DMF (2 mL) 溶液中加入噁唑胺 **6** (0.44 mmol), 并将反应液在 0 °C 下继续搅拌 20 min. 然后加入 EDCI (98 mg, 0.53 mmol), 逐渐升至室温. 2 h 后, 将反应液用乙酸乙酯和水稀释, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化 [*V*(石油醚) : *V*(乙酸乙酯)=2 : 1] 得化合物 **7**.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(叔丁氧基羰基)氨基]-2-甲基丙基}噁唑-4-基)-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基]乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**7a**): 黄色油状, 产率 17%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.55 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 5.57~5.45 (m, 1H), 5.27 (s, 1H), 4.96 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.51 (s, 1H), 1.74~1.70 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.02 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 0.93 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); MS (ESI positive) [*M*+Na]<sup>+</sup> 556.2.

### 3.2.6 中间体 8 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向溶于二氯甲烷(2 mL)的 **7** (0.1 mmol) 中, 加入三氟乙酸(0.7 mL, 9.42 mmol), 并在此温度下搅拌 20 min, 逐渐升至室温. 5 h 后, 将反应液浓缩, 用乙酸乙酯进行稀释, 饱和碳酸氢钠水溶液调至 pH=7, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化 [*V*(二氯甲烷) : *V*(甲醇)=50 : 1] 得中间体 **8**.

2-[(*S*)-1-{2-[2-[(*S*)-1-氨基-2-甲基丙基]噁唑-4-基]-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基}乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**8a**): 黄色油状, 产率 73%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.54 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 5.56~5.47 (m, 1H), 4.24 (d, *J*=5.0 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.37~2.27 (m, 1H), 1.70 (d, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.02 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 0.93 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 179.4, 164.8, 161.1, 160.7, 154.1, 153.3, 143.6, 142.2, 132.8, 129.1, 119.7, 59.0, 51.7, 42.1, 34.1, 19.1, 16.2, 11.4; MS (ESI positive) [*M*+H]<sup>+</sup> 434.1.

### 3.2.7 终产物 9a、9c、9e、9g~9h、9j~9s、10a~10d 的通用合成方法

于 0 °C 向含有 HOBT (19.2 mg, 0.14 mmol) 和 **8** (0.05

mmol) 的 DMF (2 mL) 溶液中, 加入 R<sup>2</sup>-COOH (0.05 mmol), 并将反应液在 0 °C 下继续搅拌 20 min. 然后加入 EDCI (11.2 mg, 0.06 mmol), 逐渐升至室温. 2 h 后, 将反应液用乙酸乙酯和水稀释, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化 [*V*(石油醚) : *V*(乙酸乙酯)=2 : 1] 得化合物 **9**.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(环戊-1-烯-1-甲酰胺基)-2-甲基丙基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9a**): 透明油状, 产率 61%. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -0.5 (*c* 0.04, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.54 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 5.51 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.30 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.62 (s, 2H), 2.58~2.47 (m, 3H), 2.06~1.96 (m, 2H), 1.71 (d, *J*=7.0 Hz, 3H), 1.00 (t, *J*=7.2 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173.1, 165.3, 165.1, 161.5, 161.1, 154.3, 153.9, 144.1, 143.1, 139.2, 138.8, 133.4, 129.7, 120.0, 77.3, 77.2, 77.0, 76.7, 56.2, 52.2, 42.6, 33.2, 31.6, 23.3, 19.7, 19.6, 18.1, 11.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S [*M*+H]<sup>+</sup> 528.1911, found 528.1916.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(环己-1-烯-1-甲酰胺基)-2-甲基丙基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9c**): 透明油状, 产率 30%. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +2.0 (*c* 0.02, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.12 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 6.68~6.60 (m, 1H), 6.41 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 5.47~5.39 (m, 1H), 5.24 (dd, *J*=8.9, 6.7 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 2.50~2.42 (m, 1H), 2.29~2.17 (m, 2H), 2.14~2.09 (m, 2H), 1.64 (d, *J*=7.2 Hz, 6H), 1.58~1.51 (m, 2H), 0.92 (dd, *J*=10.2, 6.8 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.9, 167.8, 164.8, 161.0, 160.7, 153.8, 153.4, 143.6, 142.6, 134.1, 132.9, 132.5, 129.2, 119.5, 55.8, 51.8, 42.1, 32.8, 25.0, 23.8, 21.6, 21.0, 19.2, 19.1, 17.5, 11.4; HRMS (ESI) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S [*M*+H]<sup>+</sup> 542.2068, found 542.2073.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-苯甲酰胺基]-2-甲基丙基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9e**): 白色固体, 产率 53%. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -0.8 (*c* 0.04, CH<sub>3</sub>OH); m.p. 96.4~99.9 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.91~7.83 (m, 3H), 7.54 (t, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.51~7.43 (m, 2H), 6.97 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.55~5.43 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.63~2.55 (m, 1H), 1.76~1.70 (m, 3H), 1.06 (dd, *J*=15.2, 6.6 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.6, 167.2, 165.3, 161.5,

161.1, 154.3, 153.9, 144.1, 143.1, 134.0, 133.3, 131.9, 129.7, 128.7, 127.2, 120.1, 56.8, 52.2, 42.7, 33.6, 19.7, 18.2, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{28}N_5O_6S$   $[M+H]^+$  538.1755, found 538.1762.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(2-氨基嘧啶-5-甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9g**): 黄色油状, 产率 24%.  $[\alpha]_D^{20} + 3.5$  (c 0.02,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ )  $\delta$ : 8.81 (s, 2H), 8.21 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.60 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 6.99~6.89 (m, 1H), 5.55~5.47 (m, 3H), 5.46~5.38 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.57~2.45 (m, 1H), 1.72 (dd,  $J=7.2, 5.2$  Hz, 3H), 1.06 (dd,  $J=6.8, 2.0$  Hz, 3H), 1.03 (dd,  $J=6.8, 3.2$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 171.9, 165.3, 164.2, 161.5, 161.1, 158.2, 154.2, 153.9, 144.2, 142.8, 133.3, 129.7, 120.1, 118.1, 56.7, 52.2, 42.6, 33.9, 19.6, 18.2, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{24}H_{27}N_8O_6S$   $[M+H]^+$  555.1774, found 555.1769.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(苯并[d]噻唑-2-甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9h**): 透明油状, 产率 63%.  $[\alpha]_D^{20} - 1.3$  (c 0.03,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ )  $\delta$ : 8.21~8.10 (m, 3H), 8.01~7.95 (m, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.62~7.50 (m, 3H), 5.57~5.41 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.76~2.65 (m, 4H), 1.72 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.12 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.08 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 172.3, 165.3, 162.8, 161.5, 161.1, 159.9, 154.2, 154.0, 152.8, 144.1, 143.3, 137.3, 133.4, 129.7, 127.0, 124.5, 122.4, 120.1, 57.1, 52.2, 42.6, 33.4, 19.5, 17.9, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{27}H_{27}N_6O_6S_2$   $[M+H]^+$  595.1428, found 595.1433.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-氨基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9j**): 白色固体, 产率 54%. m.p. 168.4~178.4 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 0.2$  (c 0.05,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ )  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.68 (d,  $J=6.5$  Hz, 2H), 7.55 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 6.81~6.73 (m, 1H), 6.68 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 5.54~5.42 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.66~2.54 (m, 1H), 1.74~1.67 (m, 3H), 1.06~1.00 (m, 6H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 173.3, 166.9, 165.3, 161.6, 161.2, 154.3, 153.9, 150.0, 144.1, 143.0, 133.3, 129.7, 129.0, 123.3, 120.0, 114.2, 56.6, 52.2, 42.6, 33.5, 19.7, 19.6, 18.1, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{29}N_6O_6S$   $[M+H]^+$  553.1864, found 553.1872.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-氨基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲

酸甲酯(**9k**): 白色固体, 产率 35%. m.p. 137.2~141.1 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 0.3$  (c 0.03,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ )  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.71 (dd,  $J=8.4, 2.8$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 6.70 (t,  $J=7.4$  Hz, 1H), 6.60 (d,  $J=10.0$  Hz, 2H), 5.55~5.48 (m, 1H), 5.45 (dd,  $J=8.8, 6.6$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.68~2.57 (m, 1H), 1.71 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.06~1.01 (m, 6H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 173.6, 167.0, 165.3, 161.5, 161.2, 154.4, 153.9, 152.2, 144.1, 143.0, 133.4, 129.6, 128.9, 121.7, 120.0, 111.4, 56.6, 52.2, 42.6, 33.4, 30.3, 19.7, 18.0, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{27}H_{31}N_6O_6S$   $[M+H]^+$  567.2020, found 567.2028.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-甲氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9l**): 白色固体, 产率 60%. m.p. 100.0~105.0 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 0.2$  (c 0.05,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ )  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.83 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J=6.8$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 5.55~5.42 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.66~2.55 (m, 1H), 1.71 (d,  $J=7.2$  Hz, 3H), 1.07 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.03 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 173.0, 166.7, 165.3, 162.5, 161.5, 161.1, 154.3, 153.9, 144.1, 143.1, 133.3, 129.7, 129.0, 126.1, 120.0, 113.9, 56.7, 55.5, 52.2, 42.7, 33.5, 19.6, 18.2, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{27}H_{30}N_5O_7S$   $[M+H]^+$  568.1860, found 568.1867.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-三氟甲基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9m**): 白色固体, 产率 38%. m.p. 101.1~114.1 °C;  $[\alpha]_D^{20} + 0.4$  (c 0.05,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ )  $\delta$ : 8.12 (s, 1H), 7.93 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.67 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.55 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.48~5.34 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 2.54~2.43 (m, 1H), 1.63 (d,  $J=7.0$  Hz, 3H), 1.02 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 0.96 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 170.7, 164.8, 164.4, 160.5, 160.0, 153.2, 152.9, 143.1, 142.0, 136.2, 132.9, 132.6, 132.4, 132.3, 132.1, 128.7, 126.8, 125.9, 124.8, 124.7, 124.7, 124.7, 123.7, 121.6, 119.4, 119.0, 55.8, 51.2, 41.8, 32.9, 18.8, 18.5, 17.4, 10.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{27}H_{27}F_3N_5O_6S$   $[M+H]^+$  606.1629, found 606.1635.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-三氟甲氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯(**9n**): 白色固体, 产率 42%. m.p. 106.1~

114.1 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.6$  ( $c$  0.03, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.96~7.88 (m, 3H), 7.58 (dd,  $J=8.4, 5.6$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.11~7.02 (m, 1H), 5.56~5.41 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.62~2.51 (m, 1H), 1.70 (d,  $J=7.0$  Hz, 3H), 1.08 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.03 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.0, 165.9, 165.3, 161.5, 161.1, 154.2, 153.9, 151.8, 144.1, 143.1, 133.3, 132.4, 129.7, 129.2, 123.4, 121.4, 120.8, 120.1, 120.0, 119.3, 117.3, 56.8, 52.2, 42.6, 33.8, 19.7, 19.6, 18.3, 11.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 622.1578, found 622.1583.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(4-乙氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**9o**): 白色固体, 产率 63%. m.p. 121.8~133.4 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.5$  ( $c$  0.02, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.81 (dd,  $J=8.8, 3.2$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.86~6.77 (m, 1H), 5.60~5.48 (m, 1H), 5.45 (dd,  $J=8.8, 6.8$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.67~2.54 (m, 1H), 1.74~1.67 (m, 5H), 1.44 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.09~1.02 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.6, 166.2, 164.8, 161.5, 161.0, 160.7, 153.8, 153.4, 143.6, 142.6, 132.9, 129.2, 128.5, 125.4, 119.5, 113.9, 63.2, 56.2, 51.8, 42.1, 33.0, 19.2, 19.1, 17.7, 14.2, 11.4; HRMS (ESI) calcd for C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 582.2017, found 582.2020.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(4-正丙氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**9p**): 白色固体, 产率 48%. m.p. 175.6~178.6 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 1.0$  ( $c$  0.02, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 (dd,  $J=8.8, 3.2$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 6.98~6.90 (m, 2H), 6.86~6.78 (m, 1H), 5.57~5.49 (m, 1H), 5.45 (dd,  $J=8.8, 6.7$  Hz, 1H), 3.97 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.64~2.55 (m, 1H), 1.87~1.76 (m, 3H), 1.71 (d,  $J=7.2$  Hz, 3H), 1.07~1.02 (m, 8H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173.0, 166.7, 165.3, 162.2, 161.5, 154.3, 153.9, 144.1, 143.1, 133.4, 129.7, 129.0, 125.9, 120.0, 114.4, 69.7, 56.7, 52.2, 42.6, 33.5, 22.5, 19.7, 18.2, 11.9, 10.5; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 596.2173, found 596.2175.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(4-异丙氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**9q**): 白色固体, 产率 74%. m.p. 88.1~

98.6 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 2.0$  ( $c$  0.02, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.80 (dd,  $J=8.8, 3.2$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J=9.2$  Hz, 2H), 6.81 (t,  $J=8.2$  Hz, 1H), 5.56~5.49 (m, 1H), 5.46 (dd,  $J=8.8, 6.8$  Hz, 1H), 4.64 (hept,  $J=6.0$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.67~2.53 (m, 1H), 1.75~1.67 (m, 5H), 1.36 (d,  $J=6.0$  Hz, 6H), 1.09~1.02 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173.0, 166.7, 165.3, 161.5, 161.1, 161.1, 154.3, 153.9, 144.1, 143.0, 133.3, 129.7, 129.0, 125.7, 120.0, 115.4, 70.1, 56.7, 52.2, 42.6, 33.5, 21.9, 19.6, 18.1, 11.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 596.2173, found 596.2183.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(4-二氟甲氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**9r**): 白色固体, 产率 42%. m.p. 91.5~99.7 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.6$  ( $c$  0.03, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.95~7.85 (m, 3H), 7.58 (t,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.05 (t,  $J=10.2$  Hz, 1H), 6.58 (t,  $J=73.2$  Hz, 1H), 5.56~5.41 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.61~2.51 (m, 1H), 1.70 (d,  $J=7.0$  Hz, 3H), 1.05 (dd,  $J=20.0, 6.7$  Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.1, 166.0, 165.3, 161.5, 161.1, 153.9, 153.8, 144.1, 143.1, 133.3, 130.9, 129.7, 129.2, 120.0, 119.2, 117.5, 115.4, 113.4, 56.8, 52.2, 42.7, 33.7, 19.7, 18.3, 11.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 604.1672, found 604.1681.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(4-叔丁氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**9s**): 白色固体, 产率 30%. m.p. 101.3~104.3 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.3$  ( $c$  0.04, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.78 (dd,  $J=8.7, 3.3$  Hz, 2H), 7.55 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 6.87 (t,  $J=8.1$  Hz, 1H), 5.56~5.40 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.65~2.54 (m, 1H), 1.71 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.09~0.99 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.8, 166.8, 165.3, 161.5, 161.1, 159.1, 154.3, 153.9, 144.1, 143.1, 133.3, 129.7, 128.2, 123.2, 120.0, 79.5, 56.7, 52.2, 42.6, 33.5, 28.9, 19.7, 18.2, 11.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 610.2330, found 610.2340.

(*S*)-2-[1-(2-{2-[(3-氟苯甲酰胺基)甲基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**10a**): 透明油状, 产率 20%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 4.0$  ( $c$  0.02, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.18 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.60~7.51 (m, 3H), 7.47~7.40 (m, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.57~5.45 (m, 1H), 5.02 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.91 (s,

3H), 2.73 (s, 3H), 1.70 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.8, 166.2, 165.2, 163.8, 161.8, 161.5, 161.0, 154.1, 144.1, 142.7, 135.7, 133.3, 130.5, 129.7, 122.5, 121.2, 119.1, 114.7, 52.2, 42.7, 41.4, 19.5, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  514.1191, found 514.1193.

(*S*)-2-[1-(2-{2-[(4-甲氧基苯甲酰胺基)甲基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯 (**10b**): 白色固体, 产率 70%. m.p. 97.7~105.1 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 0.2$  ( $c$  0.05,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform-d}$ )  $\delta$ : 8.18 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.81 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.93 (d,  $J=9.2$  Hz, 2H), 5.55~5.45 (m, 1H), 5.00 (d,  $J=5.2$  Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.72 (d,  $J=2.2$  Hz, 3H), 1.69 (d,  $J=7.2$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 169.3, 166.5, 164.7, 162.2, 161.0, 160.6, 153.7, 153.5, 143.7, 142.0, 132.8, 129.2, 128.5, 125.1, 120.7, 113.5, 55.0, 51.7, 42.2, 40.8, 19.0, 11.4; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  526.1391, found 526.1395.

(*S*)-2-[1-(2-{2-[(4-二甲氨基苯甲酰胺基)甲基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯 (**10c**): 透明油状, 产率 14%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 2.5$  ( $c$  0.02,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform-d}$ )  $\delta$ : 8.18 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.72 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 7.52 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.76~6.65 (m, 3H), 5.55~5.45 (m, 1H), 5.00 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.03 (s, 6H), 2.73 (s, 3H), 1.70 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.4, 167.5, 165.2, 161.7, 161.0, 154.0, 152.8, 144.1, 129.9, 128.7, 121.2, 119.8, 111.1, 77.3, 77.2, 77.0, 76.7, 52.4, 42.6, 41.3, 40.1, 19.4, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  539.1707, found 539.1718.

(*S*)-2-[1-(2-{2-[(4-三氟甲氧基苯甲酰胺基)甲基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯 (**10d**): 白色固体, 产率 43%. m.p. 139.0~150.7 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 0.2$  ( $c$  0.04,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform-d}$ )  $\delta$ : 8.18 (s, 1H), 7.94~7.88 (m, 3H), 7.54 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 7.29 (s, 2H), 5.53~5.45 (m, 1H), 5.02 (d,  $J=5.8$  Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 1.68 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 169.1, 166.2, 165.2, 161.5, 161.1, 154.0, 151.9, 144.1, 142.6, 133.3, 131.8, 129.7, 129.2, 122.9, 121.2, 120.7, 119.4, 117.7, 52.2, 42.7, 41.4, 19.5, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  580.1108, found 580.1116.

### 3.2.8 终产物 **9b**、**9d**、**9f**、**9i** 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向溶于乙酸乙酯/水(0.8 mL : 0.2 mL)的

**8** (0.13 mmol)和碳酸氢钠(126.5 mg, 1.27 mmol)的溶液中, 加入  $\text{R}^2\text{COCl}$  (0.20 mmol), 逐渐升至室温. 1 h 后, 将反应液用乙酸乙酯和水稀释, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析纯化 [ $V$ (石油醚) :  $V$ (乙酸乙酯) = 2 : 1]得化合物 **9**.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-丙烯酰胺-2-甲基丙基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯 (**9b**): 白色固体, 产率 77%. m.p. 101.5~110.4 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.2$  ( $c$  0.05,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform-d}$ )  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.55 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 6.44 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H), 6.40~6.33 (m, 1H), 6.22 (ddd,  $J=16.8$ , 10.2, 1.6 Hz, 1H), 5.73 (dt,  $J=10.2$ , 1.6 Hz, 1H), 5.58~5.47 (m, 1H), 5.33 (dd,  $J=9.0$ , 6.8 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.53~2.43 (m, 1H), 1.71 (d,  $J=7.2$  Hz, 3H), 1.04~0.97 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 165.3, 165.1, 161.5, 161.1, 154.2, 153.9, 144.1, 142.9, 133.3, 130.3, 129.7, 127.6, 120.0, 56.3, 52.2, 42.7, 33.7, 19.7, 19.5, 18.1, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  488.1598, found 488.1598.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-(呋喃-2-甲酰胺基)-2-甲基丙基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯 (**9d**): 白色固体, 产率 70%. m.p. 100.5~106.6 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 0.3$  ( $c$  0.04,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform-d}$ )  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.57~7.49 (m, 2H), 7.17 (d,  $J=3.6$  Hz, 1H), 7.06 (t,  $J=7.8$  Hz, 1H), 6.55~6.52 (m, 1H), 5.57~5.48 (m, 1H), 5.44~5.36 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.65~2.56 (m, 1H), 1.71 (d,  $J=7.2$  Hz, 3H), 1.04 (dd,  $J=10.2$ , 7.6 Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 164.8, 161.0, 160.7, 157.5, 153.8, 153.4, 146.9, 143.8, 143.6, 142.7, 132.8, 129.2, 119.6, 114.7, 111.9, 55.6, 51.7, 42.1, 32.9, 19.2, 19.1, 17.5, 11.4; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  528.1547, found 528.1554.

2-[(*S*)-1-(2-{2-[(*S*)-1-异烟酰胺基-2-甲基丙基]噁唑-4-基}-5-甲基噁唑-4-甲酰胺基)乙基]噁唑-4-甲酸甲酯 (**9f**): 黄色油状物, 产率 81%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 0.8$  ( $c$  0.04,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Chloroform-d}$ )  $\delta$ : 8.79 (d,  $J=7.2$  Hz, 2H), 8.19 (s, 1H), 7.91 (d,  $J=1.6$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J=7.2$  Hz, 2H), 7.60 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.54~5.39 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.61~2.49 (m, 1H), 1.70 (d,  $J=8.2$  Hz, 3H), 1.09 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.03 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.3, 165.4, 165.3, 161.5, 161.0, 154.1, 153.9, 150.7, 144.1, 143.1, 143.0, 141.0, 133.3, 129.7, 121.1, 120.1,

120.1, 56.8, 52.3, 42.7, 34.0, 19.8, 19.5, 18.4, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{25}H_{27}N_6O_6S$   $[M+H]^+$  539.1707, found 539.1719.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(3-甲氧基苯甲酰胺)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸甲酯(**9i**): 白色固体, 产率 38%. m.p. 92.2~97.3 °C;  $[\alpha]_D^{20} +0.2$  (c 0.05, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.19 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.56 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.40~7.35 (m, 2H), 7.11~7.04 (m, 1H), 6.97 (s, 1H), 5.57~5.42 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.66~2.53 (m, 1H), 1.71 (d, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.07 (d, *J*=6.4 Hz, 3H), 1.04 (d, *J*=6.4 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.6, 172.5, 167.0, 165.3, 161.5, 161.1, 159.9, 154.2, 153.9, 144.1, 143.1, 135.4, 133.3, 129.7, 120.0, 118.8, 118.1, 112.6, 56.8, 55.5, 52.2, 42.6, 33.5, 19.6, 18.1, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{27}H_{30}N_5O_7S$   $[M+H]^+$  568.1860, found 568.1863.

### 3.2.9 终产物 **11a**~**11b** 的通用合成方法

在 0 °C 下, 向含有 **9** (0.04 mmol) 的 MeOH/H<sub>2</sub>O (3 mL : 1 mL) 溶液中, 加入氢氧化锂 (4 mg, 0.17 mmol), 逐渐升至室温. 搅拌 1 h 后, 通过 TLC 监测, 显示反应基本完全. 将反应液浓缩, 用乙酸乙酯进行稀释, 2 mol/L HCl 溶液调至 pH=2, 乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 得化合物 **11**.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(4-甲氧基苯甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸(**11a**): 微黄色油状物, 产率 58%;  $[\alpha]_D^{20} -0.6$  (c 0.03, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.16 (d, *J*=13.5 Hz, 1H), 7.91~7.79 (m, 3H), 7.68 (dd, *J*=14.8, 8.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J*=13.2, 8.8 Hz, 1H), 6.96~6.88 (m, 2H), 5.56~5.49 (m, 1H), 5.47~5.38 (m, 1H), 3.84 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.62~2.48 (m, 1H), 1.77~1.68 (m, 3H), 1.07 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 1.00 (d, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173.2, 166.8, 165.2, 163.2, 162.5, 161.1, 154.3, 154.1, 144.8, 142.7, 133.0, 129.6, 129.1, 125.9, 120.1, 113.8, 56.6, 55.4, 42.6, 33.5, 19.7, 19.4, 18.6, 11.9; HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{28}N_5O_7S$   $[M+H]^+$  554.1704, found 554.1713.

2-[(S)-1-(2-{2-[(S)-1-(苯并[d]噻唑-2-甲酰胺基)-2-甲基丙基]噻唑-4-基}-5-甲基噻唑-4-甲酰胺基)乙基]噻唑-4-甲酸(**11b**): 白色固体, 产率 62%. m.p. 93.3~97.6 °C;  $[\alpha]_D^{20} +2.0$  (c 0.04, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.27~8.18 (m, 2H), 8.15~8.05 (m, 1H), 7.97 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.72~7.66 (m, 1H),

7.61~7.47 (m, 2H), 5.53 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.44 (dd, *J*=9.2, 6.7 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.70~2.62 (m, 1H), 1.73 (dd, *J*=7.1, 2.2 Hz, 3H), 1.12 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 1.07 (d, *J*=6.6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 171.9, 164.8, 162.7, 162.4, 160.7, 159.4, 153.8, 153.7, 152.3, 144.4, 142.6, 136.7, 132.3, 129.2, 126.5, 124.1, 121.9, 119.7, 56.6, 42.2, 33.0, 19.2, 18.8, 17.6, 11.4; HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{25}N_6O_6S_2$   $[M+H]^+$  581.1272, found 581.1278.

### 3.3 生物实验方法

细胞培养: *circmCherry* 稳定过表达的 HeLa 细胞在补充有体积分数为 10% 的 FBS 和青霉素/链霉素的 DMEM 中培养.

与剪接相关的化合物的筛选: 为了评估化学物质的活性, 将 HeLa 细胞以 2000 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板上, 并用化合物处理 48 h. 然后加入 5  $\mu$ g/mL Dox 以诱导 mCherry 和 EGFP 的表达. 24 h 后, 在用 PBS 洗涤一次, 并用添加了体积分数为 10% 的 FBS 的 Fluoro-Brite DMEM (GIBCO) 替换培养基后, 用 Operetta (Perkinelmer) 测量并分析 mCherry 和 EGFP 的荧光. IGK(异银杏酮)所使用的浓度为 10  $\mu$ mol/L. 合成的化合物浓度为 20 或 40  $\mu$ mol/L. 二甲基亚砜用作空白对照.

RNA 分离和 RT-qPCR: 根据制造商的方案, 使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从培养细胞中提取总 RNA. 用 TURBO DNA Free Kit (Ambion) 去除 DNA, 并用 PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa) 进行 cDNA 合成. 使用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo) 和 StepOnePlus 实时 PCR 系统(Applied Biosystems)进行实时定量 PCR. U6 RNA 作为内参. 表 1 列出了 qPCRs 的引物.

表 1 筛选报告基因的引物

Table 1 Primers for screening reporter gene

| Primer          | Sequence             |
|-----------------|----------------------|
| qEGFP-F         | GACCACATGAAGCAGCACGA |
| qEGFP-R         | TGAAGTCGATGCCCTTCAG  |
| qCircmCherry-F  | TGCGCTTCAAGGTGCACATG |
| qCircmCherry-R  | ACAGGATGTCCCAGGCGAAG |
| qEGFP-mCherry-F | GACCACATGAAGCAGCACGA |
| qEGFP-mCherry-R | ACAGGATGTCCCAGGCGAAG |

辅助材料(Supporting Information) 提供的是化合物 **A3**~**D3**、**A4**~**G4**、**9a**~**9s**、**10a**~**10d** 及 **11a**~**11b** 的 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

## References

- [1] Chen, L.-L. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 475.
- [2] Li, X.; Liu, C.-X.; Xue, W.; Zhang, Y.; Jiang, S.; Yin, Q.-F.; Wei, J.; Yao, R.-W.; Yang, L.; Chen, L.-L. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 214.
- [3] Bachmayr-Heyda, A.; Reiner, A. T.; Auer, K.; Sukhbaatar, N.; Aust, S.; Bachleitner-Hofmann, T.; Mesteri, I.; Grunt, T. W.; Zeillinger, R.; Pils, D. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8057.
- [4] Dube, U.; Del-Aguila, J. L.; Li, Z.; Budde, J. P.; Jiang, S.; Hsu, S.; Ibanez, L.; Fernandez, M. V.; Farias, F.; Norton, J.; Gentsch, J.; Wang, F.; Dominantly Inherited Alzheimer, N.; Salloway, S.; Masters, C. L.; Lee, J.-H.; Graff-Radford, N. R.; Chhatwal, J. P.; Bateman, R. J.; Morris, J. C.; Karch, C. M.; Harari, O.; Cruchaga, C. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 1903.
- [5] Effenberger, K. A.; Urabe, V. K.; Jurica, M. S. *WIREs RNA* **2017**, *8*, 1381.
- [6] Boer, R. E.; Torrey, Z. R.; Schneekloth, J. S. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 808.
- [7] Holdt, L. M.; Stahringer, A.; Sass, K.; Pichler, G.; Kulak, N. A.; Wilfert, W.; Kohlmaier, A.; Herbst, A.; Northoff, B. H.; Nicolaou, A.; Gäbel, G.; Beutner, F.; Scholz, M.; Thiery, J.; Musunuru, K.; Krohn, K.; Mann, M.; Teupser, D. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12429.
- [8] O'Brien, K.; Matlin, A. J.; Lowell, A. M.; Moore, M. J. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33147.
- [9] Kelly, S.; Greenman, C.; Cook, P. R.; Papantonis, A. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2414.
- [10] Chen, L.-L.; Yang, L. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 381.
- [11] Wang, W.-L.; Yao, D.-Y.; Xing, H.-Y.; Nan, F.-J. *Chin. J. Nat. Med.* **2005**, *3*, 14 (in Chinese).  
(王文龙, 姚德勇, 邢雅成, 南发俊, 中国天然药物, **2005**, *3*, 14.)
- [12] Wang, W.-L.; Chen, H.-J.; Ma, W.-P.; Gu, M.; Fan, M.-Z.; Li, J.-Y.; Feng, B.; Nan, F.-J. *Molecules* **2012**, *17*, 14522.
- [13] Yang, L.; Shi, L.-P.; Chen, H.-J.; Tong, X.-K.; Wang, G.-F.; Zhang, Y.-M.; Wang, W.-L.; Feng, C.-L.; He, P.-L.; Zhu, F.-H.; Hao, Y.-H.; Wang, B.-J.; Yang, D.-L.; Tang, W.; Nan, F.-J.; Zuo, J.-P. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 410.
- [14] Wang, W.-L.; Nan, F.-J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1636.
- [15] Manigrasso, J.; Marcia, M.; De Vivo, M. *Chem* **2021**, *7*, 2965.

(Cheng, F.)