

新型 2,4,6-三取代嘧啶衍生物的合成及抗增殖活性评价

高 潮^{a,b} 张玉桐^{a,b} 池玲玲^{a,b} 王 浩^{a,b} 马家婕^{a,b}
 毕梦鑫^{a,b} 戴洪林^{a,b} 司晓杰^{a,b} 刘丽敏^{a,b} 张 洋^{a,b}
 郑甲信^{a,b} 可 钰^{*,a,b,c,d} 刘宏民^{*,a,b,c,d} 张秋荣^{*,a,b,c,d}

(^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和药物质量与评价中心 郑州 450001)

(^c 郑州大学 省部共建食管癌防治国家重点实验室 郑州 450052)

(^d 教育部药物制备关键技术重点实验室 郑州 450001)

摘要 为了寻找新型高效的抗肿瘤药物,设计合成了一系列 2,4,6-三取代嘧啶衍生物,并采用噻唑蓝(MTT)法测定目标化合物对 PC-3(人前列腺癌细胞)、MGC-803(人胃癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)、HGC-27(人未分化胃癌细胞)四种人肿瘤细胞的抗增殖活性。结果显示大部分化合物表现出中度至强效的抗增殖活性,其中 *N*-(3-(2-((4-((1,3,4-噻二唑-2-基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19q**)对 PC-3 细胞具有最好的抑制活性, IC₅₀ 值为(0.87±0.15) μmol·L⁻¹,抗肿瘤活性明显优于阳性对照 5-氟尿嘧啶。进一步抗肿瘤机制研究表明,化合物 **19q** 可以诱导 PC-3 细胞凋亡。此外,化合物 **19q** 可能是通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,上调促凋亡蛋白 Bax 和 p53 的表达而发挥抗肿瘤作用。

关键词 嘧啶衍生物; 合成; 抗增殖活性

Synthesis and Antiproliferative Activity Evaluation of Novel 2,4,6-Trisubstituted Pyrimidine Derivatives

Gao, Chao^{a,b} Zhang, Yutong^{a,b} Chi, Lingling^{a,b} Wang, Hao^{a,b} Ma, Jiajie^{a,b}
 Bi, Mengxin^{a,b} Dai, Honglin^{a,b} Si, Xiaojie^{a,b} Liu, Limin^{a,b} Zhang, Yang^{a,b}
 Zheng, Jiaxin^{a,b} Ke, Yu^{*,a,b,c,d} Liu, Hongmin^{*,a,b,c,d} Zhang, Qiurong^{*,a,b,c,d}

(^a School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

(^b Collaborative Innovation Center of New Drug Research & Quality and Safety Evaluation, Zhengzhou 450001)

(^c State Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention & Treatment, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

(^d Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies, Ministry of Education of China, Zhengzhou 450001)

Abstract In order to find new and efficient anti-tumor drugs, a series of 2,4,6-trisubstituted pyrimidine derivatives were designed and synthesized, and the antiproliferative activities were evaluated against four cancer cell lines of PC-3 (human prostate cancer cells), MGC-803 (human gastric cancer cells), MCF-7 (human breast cancer cells) and HGC-27 (human gastric carcinoma cell line) using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The results showed that most of the compounds exhibited moderate to potent antiproliferative activities against the four human tumor cell lines, among which *N*-(3-(2-((4-((1,3,4-thiazol-2-yl)thio)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)thio)acetamido)phenyl)acrylamide (**19q**) had the best inhibitory activity against PC-3 cells with IC₅₀ value of (0.87±0.15) μmol·L⁻¹, the antitumor activity was significantly better than the positive control 5-fluorouracil. Further anti-tumor mechanism studies showed that compound **19q** could induce apoptosis in PC-3 cells. In addition, compound **19q** might play an anti-tumor effect by down-regulating the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and up-regulating the expression of pro-apoptotic proteins Bax and p53.

* Corresponding authors. E-mail: zqr409@yeah.net; ky@zzu.edu.cn; liuhm@zzu.edu.cn

Received May 28, 2022; revised June 27, 2022; published online July 13, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. U21A20416) and the Opening Fund from State Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention & Treatment (No. K2020000X).

国家自然科学基金(No. U21A20416)和省部共建食管癌防治国家重点实验室开放基金(No. K2020000X)资助项目。

Keywords pyrimidine derivatives; synthesis; antiproliferative activity

癌症是世界范围内的一个主要健康问题,它造成严重的健康问题,影响公共卫生、社会发展的成本,最重要的是降低了人民的幸福感^[1-2]. 美国癌症协会估计,到2021年,前列腺癌将成为美国男性癌症相关死亡的第二大原因,仅次于肺癌^[3]. 传统的癌症治疗包括手术、化学疗法(CT)和放射疗法(RT). 化学疗法仍然是目前最有效的癌症治疗方法之一^[4]. 然而,化疗相关的不良反应、低效和多药耐药性使治疗更加困难^[5-7]. 因此,迫切需要开发新的有效、低毒的抗癌药物. 嘧啶是一类在1位和3位有两个氮原子的六元杂环化合物. 目前市售的抗肿瘤药物有很多嘧啶衍生物,例如罗西替尼(Rociletinib) (1)^[8]和奥希替尼(Osimertinib)(2)^[9].

引入三氟甲基是调节生物活性分子特性的流行策略^[10]. 根据相关文献报道,将甲基替换为三氟甲基可以增加代谢稳定性和通透性,降低近端胺的碱度或改变分子的构象^[11]. Clegg等^[12]报道了ARN-509(3)的发现和开发,ARN-509是一种竞争性雄激素受体(AR)抑制剂. ARN-509能够抑制AR转录活性和前列腺癌细胞的增殖. Enasidenib (4)是一种突变型异柠檬酸脱氢酶2

(IDH2)蛋白的小分子口服抑制剂,已获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准,用于治疗患有突变型IDH2的成年复发或难治性急性髓细胞性白血病(R/R AML)患者^[13].

近年来,丙烯酰胺结构作为活性片段在抗肿瘤领域发挥了重要作用. 构效关系研究表明,丙烯酰胺片段可以作为迈克尔受体与Cys797巯基基团发生迈克尔加成形成共价键,使抑制剂与腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的结合位点结合更加稳定,因此化合物可以具有更好的抗肿瘤活性^[14-15]. 目前,在上市或临床药物中,罗西替尼(Rociletinib) (1)、奥西替尼(Osimertinib) (2)、艾维替尼(Avitinib) (5)、WZ4002 (6)等皆含有丙烯酰胺片段^[16]. 此外,酰胺键是蛋白质的基本结构,在许多抗癌小分子中发挥着重要作用. 已有文献报道,含有N-苯乙酰胺基团的化合物7~8具有良好的抗肿瘤作用^[17-18].

受上述研究成果启发,利用分子杂交原理,在嘧啶骨架上引入三氟甲基、丙烯酰胺和N-苯乙酰胺基团,合成了一系列新型的2,4,6-三取代嘧啶衍生物,并通过噻唑蓝(MTT)法在体外评估目标化合物的抗增殖活性.

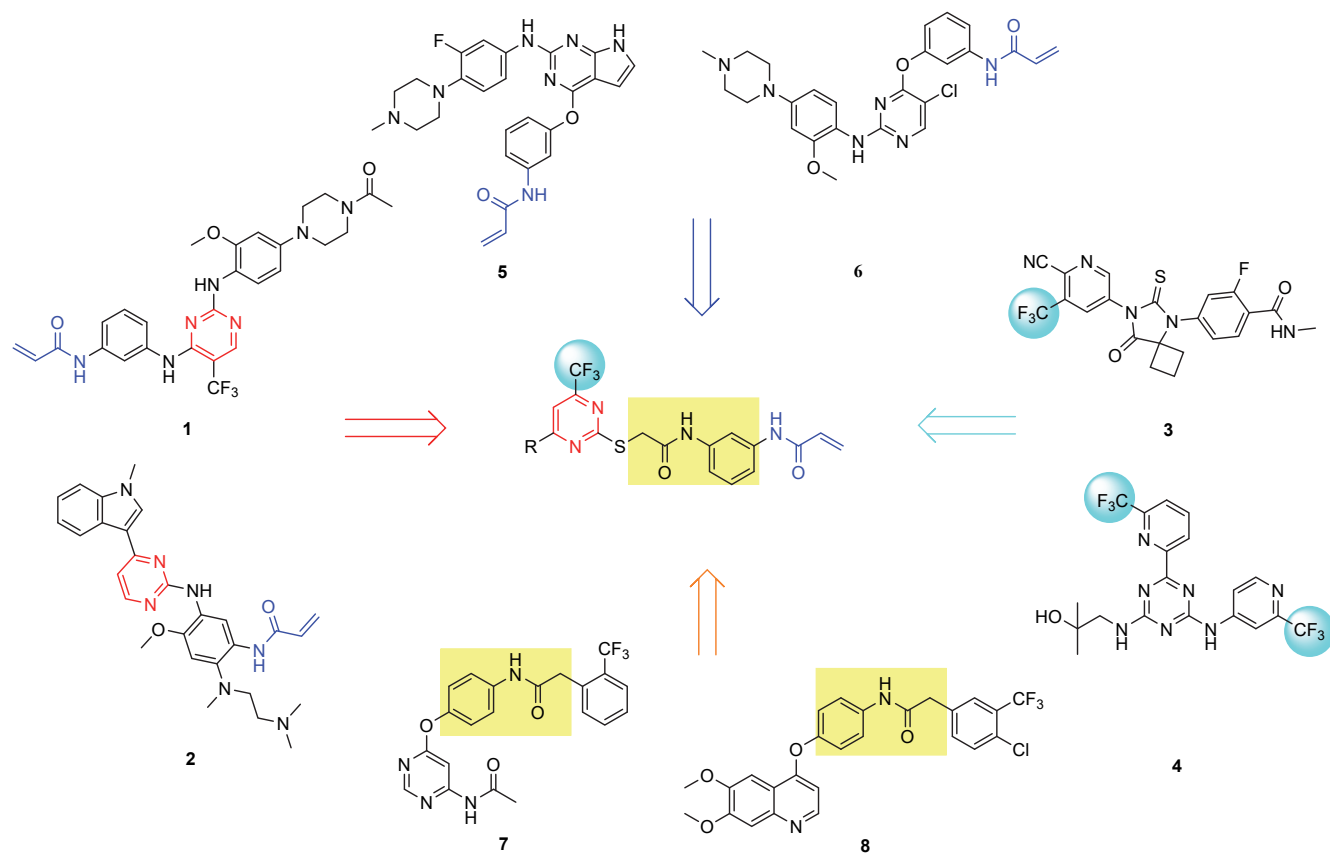


图1 新型2,4,6-三取代嘧啶衍生物的设计

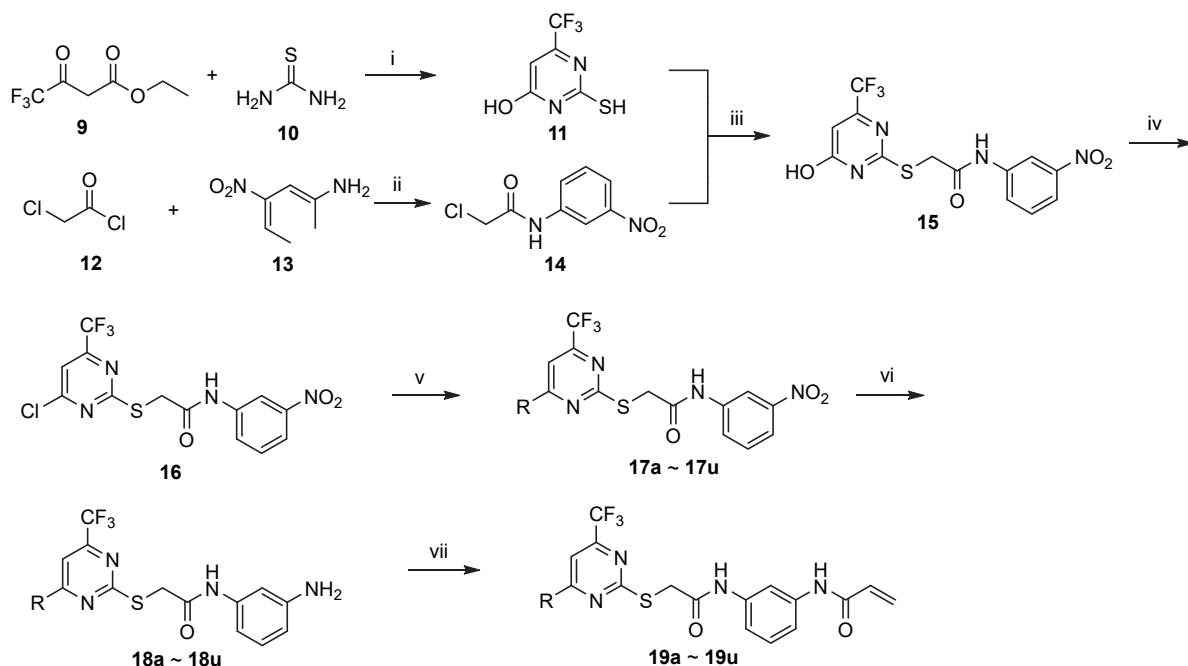
Figure 1 Design of novel 2,4,6-trisubstituted pyrimidine derivatives

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

目标化合物 **19a**~**19u** 的合成路线如 Scheme 1 所示。以市售的 4,4,4-三氟乙酰乙酸乙酯(**9**)为起始原料,与硫脲(**10**)通过环合反应合成化合物 **11**; 化合物 **12** 和 **13** 以

三乙胺为催化剂反应得到化合物 **14**; 化合物 **11** 与 **14** 在水中 70 °C 反应 5 h 得到化合物 **15**; 化合物 **15** 与过量的 POCl₃ 通过氯代反应得到化合物 **16**; 化合物 **16** 与不同取代的含巯基化合物和哌嗪类化合物发生亲核取代反应得到化合物 **17a**~**17u**; 化合物 **17a**~**17u** 与铁粉、氯化铵反应得到化合物 **18a**~**18u**; 化合物 **18a**~**18u** 在二



Compd.	R	Compd.	R	Compd.	R
19a	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ S	19h	2-ClC ₆ H ₄ S	19o	
19b	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ S	19i	3-ClC ₆ H ₄ S	19p	
19c	2,5-Cl ₂ C ₆ H ₃ S	19j	4-ClC ₆ H ₄ S	19q	
19d	2,6-Cl ₂ C ₆ H ₃ S	19k		19r	
19e	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ S	19l		19s	
19f	2,4-F ₂ C ₆ H ₃ S	19m		19t	
19g	3,4-F ₂ C ₆ H ₃ S	19n		19u	

Reagents and conditions: (i) absolute ethanol, KOH, 80 °C, 8 h; (ii) acetone, Et₃N, r.t., 4 h; (iii) H₂O, KOH, 70 °C, 5 h; (iv) POCl₃, 60 °C, 4 h; (v) CH₃CN, Et₃N, different thiol-containing compounds and substituted piperazines, 82 °C, 4 h; (vi) water-absolute ethanol, Fe, NH₄Cl, 80 °C, 5 h; (vii) DCM, Et₃N, acryloyl chloride, r.t., 2 h.

图式 1 化合物 **19a**~**19u** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of compounds **19a**~**19u**

氯甲烷溶液中与丙烯酰氯室温反应, 得到目标化合物 **19a~19u**. 目标化合物 **19a~19u** 的结构通过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 进行了表征.

1.2 目标化合物的生物活性评估

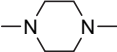
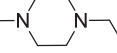
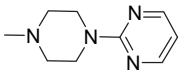
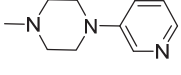
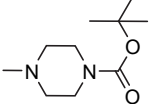
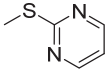
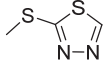
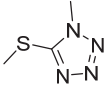
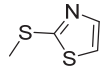
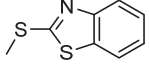
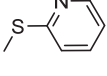
1.2.1 目标化合物 **19a~19u** 的抗增殖活性

为了探索目标化合物的抗增殖活性, 使用噻唑蓝

(MTT)比色法, 5-氟尿嘧啶(5-FU)用作阳性对照, 对化合物 **19a~19u** 进行体外抗人 PC-3(人前列腺癌细胞)、MGC-803(人胃癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)和 HGC-27(人未分化胃癌细胞)的抗增殖活性实验. 实验结果如表 1 所示.

比较化合物 **19a~19g**, 当嘧啶的 6 位被不同位置的

表 1 目标化合物 **19a~19u** 的体外抗增殖活性评价
Table 1 In vitro antiproliferative activity evaluation results of compounds **19a~19u**

Compd.	R	$\text{IC}_{50}^a/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
		PC-3	MGC-803	MCF-7	HGC-27
19a	2,3- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	11.20 ± 1.05	4.24 ± 0.63	15.28 ± 1.18	13.70 ± 1.14
19b	2,4- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	15.17 ± 1.18	4.60 ± 0.66	14.49 ± 1.16	13.49 ± 1.13
19c	2,5- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	11.94 ± 1.08	4.41 ± 0.67	12.85 ± 1.11	10.75 ± 1.03
19d	2,6- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	12.57 ± 0.96	10.05 ± 1.02	13.93 ± 1.14	12.45 ± 1.09
19e	3,4- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	11.65 ± 1.07	7.53 ± 0.88	16.18 ± 1.21	11.16 ± 1.05
19f	2,4- $\text{F}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	24.18 ± 1.38	4.29 ± 1.03	26.54 ± 1.42	22.83 ± 1.36
19g	3,4- $\text{F}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$	22.54 ± 1.35	4.47 ± 1.09	24.16 ± 1.38	22.24 ± 1.35
19h	2- $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{S}$	13.20 ± 1.12	4.57 ± 0.87	16.96 ± 1.23	21.60 ± 1.33
19i	3- $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{S}$	13.22 ± 1.04	3.95 ± 1.22	20.10 ± 1.30	18.20 ± 1.26
19j	4- $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{S}$	16.29 ± 1.15	6.09 ± 0.78	18.71 ± 1.27	16.70 ± 1.22
19k		19.23 ± 1.28	2.51 ± 0.57	22.42 ± 1.35	22.75 ± 1.35
19l		12.09 ± 1.08	7.64 ± 0.88	9.13 ± 0.96	10.18 ± 1.01
19m		5.97 ± 0.85	15.72 ± 1.16	19.27 ± 1.28	16.08 ± 1.21
19n		10.21 ± 1.01	15.42 ± 1.19	13.12 ± 1.12	13.77 ± 1.14
19o		11.26 ± 1.06	25.71 ± 1.41	20.96 ± 1.32	17.23 ± 1.24
19p		2.30 ± 0.21	3.55 ± 0.55	5.46 ± 0.74	3.64 ± 0.56
19q		0.87 ± 0.15	0.97 ± 0.18	1.38 ± 0.14	1.17 ± 0.07
19r		0.96 ± 0.11	1.36 ± 0.16	1.77 ± 0.25	1.93 ± 0.29
19s		1.86 ± 0.27	2.19 ± 0.34	3.57 ± 0.55	1.51 ± 0.18
19t		4.15 ± 0.62	8.61 ± 0.94	2.71 ± 0.43	2.81 ± 0.45
19u		8.30 ± 0.92	9.66 ± 0.98	17.22 ± 1.24	8.01 ± 0.90
5-Fu ^b	—	6.39 ± 0.71	10.64 ± 1.09	10.23 ± 0.68	7.25 ± 0.72

^a Antitumor activity was assayed by exposure for 72 h to substances and expressed as concentration required to inhibit tumor cells proliferation by 50% (IC_{50}).

^b Positive control.

氯原子二取代时,活性没有显著差异.如果将氯原子替换为吸电子能力更强的氟原子,虽然活性降低,但对 MGC-803 细胞的选择性增加;与双取代相比,大部分单取代的氯原子反应性较低;当被取代哌嗪取代时,对四种癌细胞株的抗增殖活性普遍低于取代苯基,其中 *N*-乙基取代哌嗪的活性优于其他取代哌嗪;当取代基为芳香杂环时,活性显著提高,基本上都小于 10 $\mu\text{mol/L}$,其中化合物 **19q** 表现出最好的生物活性.化合物 **19q** 对 PC-3、MGC-803、MCF-7 和 HGC-27 细胞的 IC_{50} 值分别为 0.87、0.97、1.38 和 1.17 $\mu\text{mol/L}$,明显优于 5-Fu.因此,选择了本系列中对 PC-3 细胞具有最佳抗增殖活性的化合物 **19q**,进一步探索其抗肿瘤机制.为了研究目标化合物对正常细胞的毒性,选择具有最佳抗增殖活性的化合物 **19q** 进一步探索其对 GES-1(正常人胃上皮细胞系)的细胞毒性.如表 2 所示,结果表明化合物 **19q** 对 GES-1 的细胞毒性较弱,明显低于阳性对照 5-Fu.

表 2 化合物 **19q** 对人正常细胞的体外抗增殖活性

Table 2 *In vitro* antiproliferative activity of compound **19q** against human normal cells

Compd.	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
	GES-1
19q	23.12 ± 1.36
5-Fu	13.30 ± 1.12

1.2.2 化合物 **19q** 诱导 PC-3 细胞凋亡

细胞凋亡是肿瘤生长的重要过程^[19].细胞凋亡主要在肿瘤的发生发展过程中起负调控作用,可以抑制肿瘤细胞的快速生长.因此,通过 DAPI 染色观察核染色质的形态变化.如图 2 所示,与空白对照组相比,随着化合物 **19q** 浓度的增加,细胞核的形状变得不规则,出现致密且浓染的颗粒,细胞核裂解成碎片,说明化合物 **19q** 可诱导 PC-3 细胞凋亡.为了进一步探索化合物 **19q** 对细胞凋亡的影响,通过流式细胞仪分析处理过的 PC-3 细胞.如图 3 所示,不同浓度化合物处理 48 h 后凋亡细胞的百分比分别为 5.47%、7.04%、13.59% 和 38.45%.用不同浓度的化合物处理 72 h 后,凋亡细胞的百分比分别为 7.7%、10.5%、39.5% 和 52.1%.结果表明,化合物 **19q** 以浓度依赖性和时间依赖性方式诱导 PC-3 细胞凋亡.为进一步研究化合物 **19q** 对 PC-3 细胞的抗增殖作用机制,采用蛋白质印迹实验分析其对凋亡相关蛋白表达的影响.如图 4 所示,随着化合物 **19q** 浓度的增加,处理过的样品显示出促凋亡蛋白 Bax 的蛋白水平显著增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的蛋白水平显著降低.此外,与空白对照相比,还观察到肿瘤抑制蛋白 p53 水平升高.这些结果表明化合物 **19q** 可以通过调节凋亡相

关蛋白的表达来诱导 PC-3 细胞凋亡.

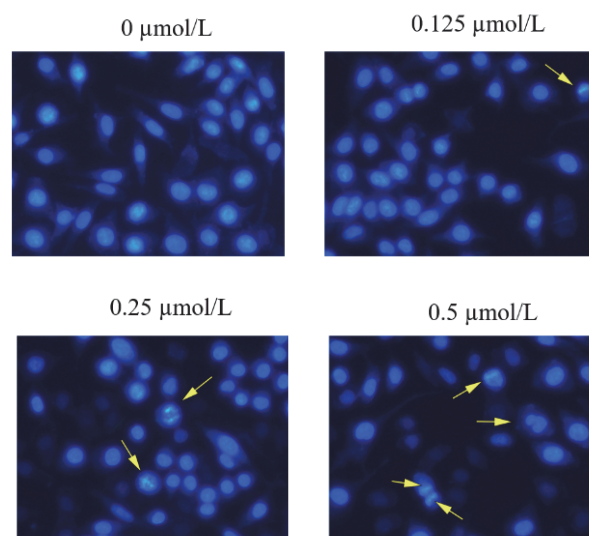


图 2 化合物 **19q** 对 PC-3 细胞核形态的影响

Figure 2 Effect of compound **19q** on nuclear morphology of PC-3 cells

The arrows in the figure indicate the cells whose nuclei have shrunk or broken

2 结论

总之,设计并合成了一系列新型 2,4,6-三取代嘧啶衍生物,并评估了它们对四种肿瘤细胞(PC-3、MGC-803、MCF-7、HGC-27)的体外抗增殖活性.实验结果表明,大部分化合物具有中等至良好的抗增殖活性,其中化合物 **19q** 对 PC-3 细胞的抗增殖活性最强.初步抗肿瘤机制的研究表明,化合物 **19q** 可诱导细胞核形态发生变化.细胞凋亡实验表明化合物 **19q** 以浓度依赖性和时间依赖性方式诱导细胞凋亡.蛋白质印迹实验结果也证明了化合物 **19q** 通过调节凋亡相关蛋白的表达来诱导 PC-3 细胞的凋亡.以上结果表明化合物 **19q** 可能是一种有价值的先导化合物,值得进一步研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点在 X-5 微熔点仪上测定. ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱分别在 Bruker 400 MHz 和 101 MHz 光谱仪上测定;高分辨质谱(HRMS)使用美国 Waters-Micromass 公司 Q-ToF Micro 高分辨四级杆-飞行时间串联质谱仪测定.试剂和溶剂均购自商业来源,无需进一步纯化即可使用.柱层析在 200~300 目硅胶(中国青岛海洋化工)上进行.在 0.25 mm 硅胶板(GF254)上的薄层色谱(TLC)上监测反应.

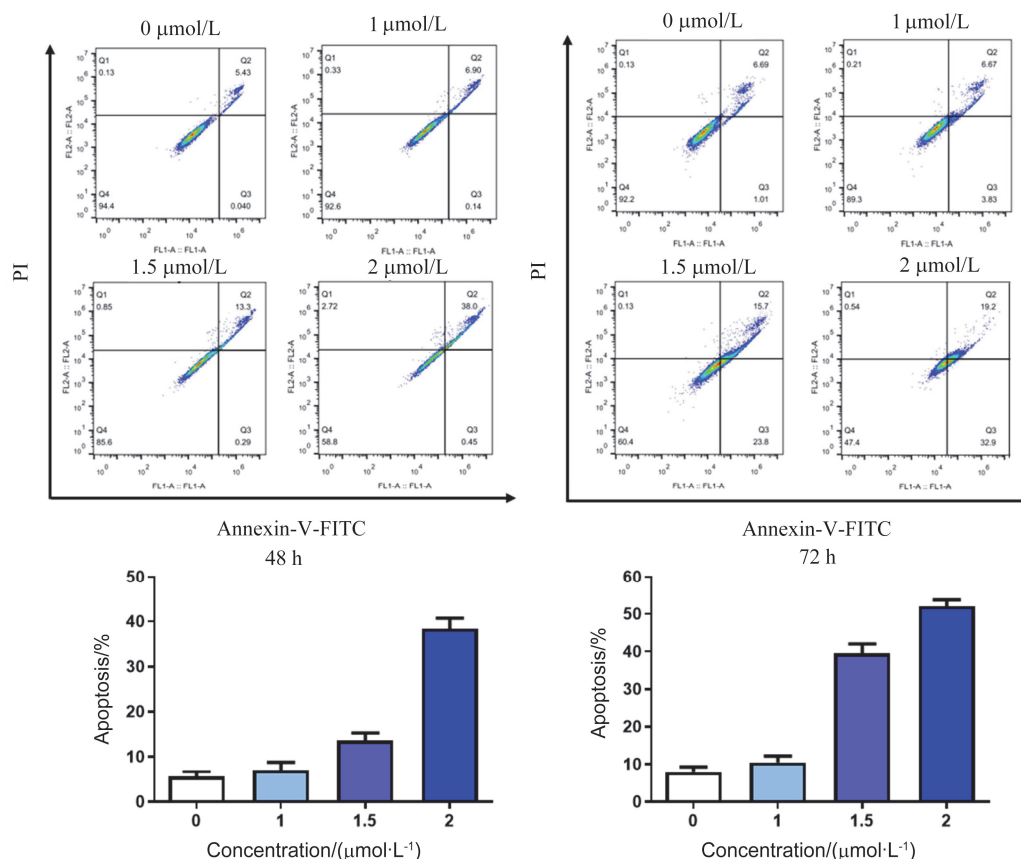


图3 化合物 19q 对 PC-3 细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of compound 19q on apoptosis of PC-3 cells

(A) Annexin V-FITC/PI detected apoptosis of PC-3 cells treated with different concentrations of compound 19q for 48 h; (B) Annexin V-FITC/PI detected apoptosis of PC-3 cells treated with different concentrations of compound 19q for 72 h; (C) Quantitative analysis of apoptosis cells of PC-3 cells for 48 h; (D) Quantitative analysis of apoptosis cells of PC-3 cells for 72 h. Compared with the control group, $*P<0.05$, $***P<0.001$.

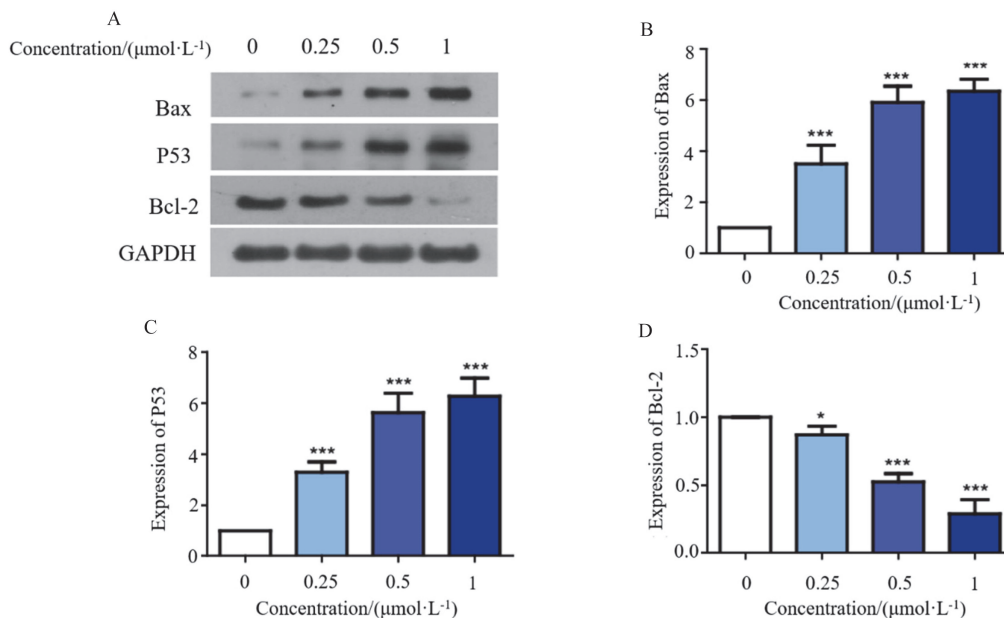


图4 化合物 19q 对凋亡相关蛋白的影响

Figure 4 Effect of compound 19q on apoptosis-related proteins

Changes in protein expression after treatment with different concentrations of compound 19q. GAPDH is the reference protein. (B, C, and D) Quantitative analysis diagrams of each protein. Compared with the control group, $*P<0.05$, $***P<0.001$.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 11、14~16、17a~17u、18a~18u 的合成

根据相关文献的方法合成了化合物 11、14~16、17a~17u、18a~18u, 表征数据与文献一致^[20-23].

3.2.2 目标化合物 19a~19u 的合成

称取化合物 18a~18u (0.93 mmol), 依次加入适量二氯甲烷, 三乙胺(0.68 mmol), 在冰浴条件下缓慢滴加丙烯酰胺(0.68 mmol), 室温反应 1 h. 薄层色谱(TLC)监测反应完成, 然后将体系倒入冰水混合物中, 转移至分液漏斗, 用二氯甲烷萃取 3 次, 收集有机相, 并用无水硫酸镁干燥, 柱层析分离得到目标化合物 19a~19u.

N-(3-(2-((4-((2,3-二氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(19a): 淡黄色固体, 产率 84.2%. m.p. 100.1~100.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.18 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.79 (t, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.41 (t, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.25 (d, *J*=4.8 Hz, 2H), 6.46 (dd, *J*=17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J*=17.0, 2.2 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J*=10.1, 2.1 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.8, 171.7, 164.9, 163.1, 153.1 (d, *J*=36.4 Hz), 139.2, 139.1, 136.5, 136.4, 133.1, 132.9, 131.8, 129.0, 128.9, 127.6, 126.8, 121.3, 118.6, 114.4, 110.3, 109.6, 35.3; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₁₆Cl₂F₃N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 559.0044, found 559.0042.

N-(3-(2-((4-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(19b): 白色固体, 产率 73.5%. m.p. 103.4~104.2 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.17 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.93~7.76 (m, 2H), 7.57~7.46 (m, 2H), 7.41 (td, *J*=4.6, 2.0 Hz, 1H), 7.24 (d, *J*=4.8 Hz, 2H), 6.45 (dd, *J*=16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J*=17.0, 2.1 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J*=10.0, 2.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.9, 171.7, 164.9, 163.0, 153.1 (d, *J*=35.4 Hz), 139.4, 139.2, 139.1, 138.9, 136.8, 131.8, 130.0, 128.8, 128.6, 126.7, 124.2, 121.3 (d, *J*=276.7 Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 109.4, 35.3; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₁₆Cl₂F₃N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 559.0044, found 559.0040.

N-(3-(2-((4-((2,5-二氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(19c): 白色固体, 产率 56.7%. m.p. 100.2~100.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.16 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 7.97 (d, *J*=2.1 Hz, 1H), 7.93 (d, *J*=2.5 Hz, 1H), 7.67 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J*=8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.39 (dt, *J*=6.8, 2.1 Hz, 1H), 7.29~7.20 (m, 2H), 6.46 (dd, *J*=17.0,

10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J*=17.0, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J*=10.1, 2.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.7, 171.6, 164.9, 163.1, 153.1 (d, *J*=36.4 Hz), 139.2, 139.1, 137.1, 136.9, 132.4, 132.3, 131.8, 131.6, 128.8, 127.0, 126.7, 121.3 (d, *J*=276.7 Hz), 114.4, 114.4, 110.3, 109.6, 35.3; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₁₆Cl₂F₃N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 559.0044, found 559.0044.

N-(3-(2-((4-((2,6-二氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(19d): 白色固体, 产率 58.9%. m.p. 105.6~106.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.16 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.70~7.59 (m, 3H), 7.55 (dd, *J*=9.2, 6.7 Hz, 1H), 7.41 (dt, *J*=7.1, 2.0 Hz, 1H), 7.31~7.20 (m, 2H), 6.46 (dd, *J*=16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J*=17.0, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J*=10.1, 2.1 Hz, 1H), 3.89 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.9, 170.9, 164.7, 163.1, 153.1 (d, *J*=35.4 Hz), 140.6, 139.2, 133.4, 131.8, 129.2, 128.8, 126.8, 124.7, 121.3, 118.6, 114.5, 114.4, 110.3, 109.4, 35.3; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₁₆Cl₂F₃N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 559.0044, found 559.0042.

N-(3-(2-((4-((3,4-二氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(19e): 白色固体, 产率 60.6%. m.p. 102.8~103.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.22 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.05~7.91 (m, 2H), 7.71 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J*=8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.41 (ddt, *J*=8.9, 6.0, 3.5 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J*=4.0, 1.8 Hz, 2H), 6.46 (dd, *J*=17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J*=16.9, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J*=10.1, 2.1 Hz, 1H), 4.00 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172.9, 171.6, 165.1, 163.1, 153.0 (d, *J*=35.4 Hz), 139.2, 139.1, 136.4, 135.2, 133.6, 132.1, 131.8, 131.6, 128.8, 126.7, 126.5, 121.3 (d, *J*=276.7 Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 109.6, 35.4; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₁₆Cl₂F₃N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 559.0044, found 559.0040.

N-(3-(2-((4-((2,4-二氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(19f): 淡黄色固体, 产率 67.2%. m.p. 91.3~92.2 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.20 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.99 (d, *J*=2.1 Hz, 1H), 7.76 (td, *J*=8.4, 6.3 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.49~7.39 (m, 2H), 7.30~7.22 (m, 2H), 7.19 (td, *J*=8.5, 2.8 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J*=16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J*=16.9, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J*=10.0, 2.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172.1, 171.7, 164.9, 163.9 (d, *J*=264.6 Hz), 163.0, 161.4 (d, *J*=238.4 Hz), 153.0 (d, *J*=35.4 Hz), 139.2 (d, *J*=8.1 Hz), 138.8 (d, *J*=

10.1 Hz), 131.8, 128.8, 126.7, 121.3 (d, $J=276.7$ Hz), 114.4 (d, $J=9.1$ Hz), 113.2 (d, $J=3.0$ Hz), 113.0 (d, $J=3.0$ Hz), 110.2, 109.3, 109.1 (d, $J=4.0$ Hz), 108.9 (d, $J=4.0$ Hz), 105.3, 35.3; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{16}F_5N_4O_2S_2$ $[M+H]^+$ 527.0635 found 527.0634.

N-(3-(2-((4-((3,4-二氟苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19g**): 白色固体, 产率 70.5%. m.p. 97.3~98.2 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.21 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.89~7.79 (m, 1H), 7.58~7.47 (m, 2H), 7.40 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=4.8$ Hz, 2H), 6.45 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.74 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.6, 171.6, 165.1 (d, $J=205.0$ Hz), 153.0 (d, $J=35.4$ Hz), 152.2, 150.9, 148.3, 139.2 (d, $J=9.1$ Hz), 133.0 (d, $J=3.0$ Hz), 132.9 (d, $J=3.0$ Hz), 131.8, 128.8, 126.7, 124.6 (d, $J=18.2$ Hz), 122.5 (d, $J=4.0$ Hz), 122.4 (d, $J=4.0$ Hz), 121.4 (d, $J=276.7$ Hz), 119.0 (d, $J=18.2$ Hz), 114.4 (d, $J=8.1$ Hz), 110.3, 109.2, 35.4; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{16}F_5N_4O_2S_2$ $[M+H]^+$ 527.0635, found 527.0635.

N-(3-(2-((4-((2-氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19h**): 白色固体, 产率 73.4%. m.p. 73.2~74.0 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.18 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.80 (dd, $J=7.7$, 1.6 Hz, 1H), 7.69 (dd, $J=8.0$, 1.3 Hz, 1H), 7.58 (td, $J=7.8$, 1.7 Hz, 1H), 7.48~7.38 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.30~7.22 (m, 2H), 6.46 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.0$, 2.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.6, 171.7, 165.0, 163.1, 153.0 (d, $J=36.4$ Hz), 139.2, 139.1, 138.3, 137.9, 132.8, 131.8, 130.5, 128.8, 128.5, 126.8, 124.9, 121.3 (d, $J=275.7$ Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 109.0, 35.4; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{17}ClF_3N_4O_2S_2$ $[M+H]^+$ 525.0434, found 525.0435.

N-(3-(2-((4-((3-氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19i**): 白色固体, 产率 67.9%. m.p. 148.5~149.4 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.22 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.99 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.79 (t, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.62 (ddt, $J=8.1$, 5.1, 1.2 Hz, 2H), 7.51 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.41 (dt, $J=6.8$, 2.1 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.30~7.22 (m, 2H), 6.46 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 4.00 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.5, 171.6, 165.1, 163.0, 153.0 (d, $J=35.4$

Hz), 139.2, 139.1, 134.5, 134.0, 133.9, 131.8, 131.4, 130.5, 128.9, 127.9, 126.7, 121.3 (d, $J=276.7$ Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 109.2, 35.4; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{17}ClF_3N_4O_2S_2$ $[M+H]^+$ 525.0434, found 525.0432.

N-(3-(2-((4-((4-氯苯基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19j**): 白色固体, 产率 57.8%. m.p. 148.5~149.4 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.24 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.04~7.97 (m, 1H), 7.70~7.62 (m, 2H), 7.59~7.52 (m, 2H), 7.46~7.37 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.29~7.21 (m, 2H), 6.45 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.8, 171.6, 165.1, 163.0, 153.0 (d, $J=35.4$ Hz), 139.2, 139.1, 136.9, 136.0, 131.8, 129.9, 128.9, 126.8, 124.7, 121.3 (d, $J=276.7$ Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 109.1, 35.4; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{17}ClF_3N_4O_2S_2$ $[M+H]^+$ 525.0434, found 525.0432.

N-(3-(2-((4-((4-甲基哌嗪-1-基)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19k**): 淡黄色固体, 产率 58.9%. m.p. 116.2~117.1 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.29 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.36 (dd, $J=7.9$, 1.8 Hz, 1H), 7.34~7.28 (m, 1H), 7.24 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.46 (dd, $J=16.9$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.0$, 2.1 Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.62 (s, 4H), 2.45~2.15 (m, 4H), 2.10 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.6, 166.0, 163.0, 161.0, 153.1 (d, $J=33.3$ Hz), 139.3, 139.2, 131.8, 128.9, 126.7, 122.1 (d, $J=275.7$ Hz), 114.3, 114.2, 110.1, 95.7, 53.9, 45.3, 43.4, 35.5; HRMS (ESI) calcd for $C_{21}H_{24}F_3N_6O_2S$ $[M+H]^+$ 481.1634, found 481.1631.

N-(3-(2-((4-((4-乙基哌嗪-1-基)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19l**): 淡黄色固体, 产率 75.9%. m.p. 116.6~117.5 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.05 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.50~7.31 (m, 2H), 7.29~7.17 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.45 (dd, $J=16.9$, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.74 (dd, $J=10.0$, 2.1 Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.65 (s, 4H), 2.24 (q, $J=7.2$ Hz, 6H), 0.91 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.6, 166.0, 163.0, 160.9, 153.1 (d, $J=34.3$ Hz), 139.4, 139.3, 131.8, 128.8, 126.7, 122.1 (d, $J=275.7$ Hz), 114.2, 114.1, 109.9, 95.6, 51.7, 51.2, 44.1, 35.5, 11.6; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{26}F_3N_6O_2S$ $[M+H]^+$ 495.1790, found 495.1786.

N-(3-(2-((4-((4-嘧啶-2-基)哌嗪-1-基)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19m**): 白色固

体, 产率 78.3%. m.p. 246.6~247.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.37 (d, $J=4.7$ Hz, 2H), 8.05 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.40 (dt, $J=8.0$, 1.5 Hz, 1H), 7.35~7.20 (m, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.66 (t, $J=4.7$ Hz, 1H), 6.45 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.74 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.75 (s, 8H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.6, 166.1, 163.0, 161.1, 160.9, 157.9, 153.1 (d, $J=34.3$ Hz), 139.4, 139.3, 131.8, 128.9, 126.7, 122.2 (d, $J=276.7$ Hz), 114.3, 114.1, 110.4, 110.1, 95.8, 42.6, 42.4, 35.6; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 545.1695, found 545.1693.

N-(3-(2-((4-(4-(吡啶-3-基)哌嗪-1-基)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19n**): 黄色固体, 产率 76.0%. m.p. 241.3~242.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.35 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 8.20~8.00 (m, 2H), 7.49 (ddd, $J=8.9$, 7.2, 2.0 Hz, 1H), 7.42 (dt, $J=8.2$, 1.4 Hz, 1H), 7.38~7.33 (m, 1H), 7.26 (t, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.70~6.59 (m, 2H), 6.47 (dd, $J=16.9$, 10.1 Hz, 1H), 6.28 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.84~5.69 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.79 (s, 4H), 3.59~3.36 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.6, 166.1, 163.1, 161.1, 158.4, 153.1 (d, $J=34.3$ Hz), 147.5, 139.4, 139.3, 137.5, 131.8, 129.0, 126.8, 122.2 (d, $J=275.7$ Hz), 114.2, 114.1, 113.2, 109.8, 106.8, 95.8, 43.8, 35.5, 14.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 544.1743, found 544.1740.

4-(2-((2-(3-丙烯酰胺苯基)氨基)-2-氧代乙基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-4-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯(**19o**): 淡黄色固体, 产率 66.7%. m.p. 114.1~115.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.30 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.07 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.46~7.36 (m, 1H), 7.31 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.45 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.74 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.67 (s, 4H), 3.28 (s, 4H), 1.38 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.6, 166.0, 163.0, 161.1, 153.6, 153.1 (d, $J=34.3$ Hz), 139.4, 139.3, 131.8, 128.9, 126.7, 122.1 (d, $J=275.7$ Hz), 114.3, 114.0, 109.9, 95.8, 79.1, 59.7, 35.6, 27.9, 20.7; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 567.2001, found 567.2000.

N-(3-(2-((4-(嘧啶-2-基)硫基)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫基)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19p**): 白色固体, 产率 59.4%. m.p. 212.4~213.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.32 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.82 (d, $J=4.9$

Hz, 2H), 8.31 (s, 1H), 7.99 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J=4.9$ Hz, 1H), 7.41 (dt, $J=6.9$, 1.8 Hz, 1H), 7.30~7.21 (m, 2H), 6.44 (dd, $J=16.9$, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.74 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 4.13 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.3, 170.3, 165.6, 165.2, 163.0, 158.8, 153.2, 139.2, 139.1, 131.8, 128.9, 126.7, 120.3, 114.4, 114.3, 113.1, 113.0, 110.2, 35.8; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 493.0728, found 493.0726.

N-(3-(2-((4-(1,3,4-噻二唑-2-基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19q**): 白色固体, 产率 64.3%. m.p. 233.5~234.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.31 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.01 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 7.40 (dt, $J=7.5$, 2.0 Hz, 1H), 7.32~7.21 (m, 2H), 6.46 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.80~5.70 (m, 1H), 4.12 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.0, 168.2, 165.0, 163.1, 158.3, 155.9, 152.9 (d, $J=36.4$ Hz), 139.2, 139.1, 131.8, 128.9, 126.7, 121.3 (d, $J=276.7$ Hz), 114.5, 114.4, 111.0, 110.3, 35.8; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 499.0292, found 499.0289.

N-(3-(2-((4-(1-甲基-1H-四唑-5-基)硫代)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫代)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19r**): 淡黄色固体, 产率 68.7%. m.p. 105.2~106.1 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.26 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.01 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.40 (dt, $J=7.5$, 1.8 Hz, 1H), 7.35~7.19 (m, 2H), 6.45 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.0$, 2.1 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.87 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.0, 168.6, 164.9, 163.0, 153.5 (d, $J=36.4$ Hz), 146.1, 139.2, 139.1, 131.8, 128.8, 126.7, 121.2 (d, $J=276.7$ Hz), 114.5, 114.4, 110.7, 110.2, 35.2, 34.5; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 497.0790, found 497.0786.

N-(3-(2-((4-(噻唑-2-基)硫基)-6-(三氟甲基)嘧啶-2-基)硫基)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19s**): 淡黄色固体, 产率 65.5%. m.p. 160.1~161.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.28 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.19~8.05 (m, 2H), 8.01 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.41 (dt, $J=7.4$, 1.8 Hz, 1H), 7.32~7.21 (m, 2H), 6.46 (dd, $J=17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=17.0$, 2.1 Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.1$, 2.1 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.9, 171.0, 165.0, 163.1, 153.2 (d, $J=36.4$ Hz), 151.5, 144.2, 139.2, 139.1, 131.8, 128.9, 127.0, 126.7, 121.3 (d, $J=276.7$ Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 109.8, 35.7; HRMS

(ESI) calcd for $C_{19}H_{15}F_3N_5O_2S_3$ $[M+H]^+$ 498.0340, found 498.0337.

N-(3-(2-((4-(苯并[d]噻唑-2-基硫基)-6-(三氟甲基)噻啉-2-基)硫基)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19t**): 淡黄色固体, 产率 70.5%. m.p. 180.7~181.6 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.32 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.16~8.10 (m, 1H), 8.09~8.04 (m, 1H), 8.00 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 7.61~7.55 (m, 1H), 7.51 (td, $J=7.7, 1.3$ Hz, 1H), 7.41 (dt, $J=6.6, 2.1$ Hz, 1H), 7.30~7.21 (m, 2H), 6.46 (dd, $J=17.0, 10.1$ Hz, 1H), 6.27 (dd, $J=17.0, 2.1$ Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.1, 2.1$ Hz, 1H), 4.17 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.0, 169.0, 165.0, 163.0, 156.3, 153.3 (d, $J=35.4$ Hz), 151.4, 139.3, 139.1, 136.1, 131.8, 128.9, 126.7, 126.0, 122.6, 122.1, 121.3, 118.5, 114.5, 114.3, 110.9, 110.2, 35.8; HRMS (ESI) calcd for $C_{23}H_{17}F_3N_5O_2S_3$ $[M+H]^+$ 548.0496, found 548.0496.

N-(3-(2-((4-(吡啶-2-基硫基)-6-(三氟甲基)噻啉-2-基)硫基)乙酰氨基)苯基)丙烯酰胺(**19u**): 黄色固体, 产率 74.6%. m.p. 201.3~202.0 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.24 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.65 (ddd, $J=4.9, 1.9, 0.9$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.89 (td, $J=7.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.80 (dt, $J=8.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.48 (ddd, $J=7.4, 4.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.41 (dt, $J=6.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.32~7.19 (m, 2H), 6.46 (dd, $J=16.9, 10.1$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J=16.9, 2.1$ Hz, 1H), 5.75 (dd, $J=10.1, 2.1$ Hz, 1H), 4.02 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.8, 171.6, 165.1, 163.1, 153.1 (d, $J=35.4$ Hz), 150.8, 149.9, 139.2, 139.1, 138.3, 131.8, 129.7, 128.9, 126.7, 124.5, 121.3 (d, $J=275.7$ Hz), 114.5, 114.4, 110.3, 110.2, 35.5; HRMS (ESI) calcd for $C_{21}H_{17}F_3N_5O_2S_2$ $[M+H]^+$ 492.0776, found 492.0772.

3.3 抗增殖活性评价

3.3.1 MTT 实验

将处于对数生长期的细胞以每孔 2000~3000 个接种于 96 孔板中. 细胞培养 24 h 后, 每孔加入 200 μ L 不同浓度的含药培养基, 每种化合物设置 9 个浓度, 每个浓度为 3 个复孔, 另设阳性对照组和空白对照组, 在 37 °C 恒温培养箱中培养 72 h. 每孔避光加入 20 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 37 °C 避光孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO), 摇床上水平振摇 10 min, 待甲臜完全溶解后, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度值. 使用 SPSS Statistics 计算每个化合物的 IC_{50} 值.

3.3.2 DAPI 染色实验

取对数生长期的 PC-3 细胞, 计数后以 1×10^5 个/孔

的密度接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育培养 24 h. 用不同浓度的化合物 **19q** (0, 0.125, 0.250, 0.500 μ mol/L)处理细胞 48 h, DAPI 染液孵育细胞. 选择每个样品的三个视野并用荧光显微镜(Nikon Eclipse Ti-S, Nikon Ltd, Japan)拍照, 并用 Photoshop 和 Illustartor 软件处理图像.

3.3.3 细胞凋亡实验

取对数生长期的 PC-3 细胞以每孔 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 置于 37 °C, 体积分数为 5%的 CO_2 细胞培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 加入不同浓度(0、1.0、1.5、2.0 μ mol/L)的含药培养基, 将 6 孔板置于培养箱中培养 48、72 h. 然后收集细胞并重悬于含有 0.5 mg/mL AnnexinV-FITC 和 0.5 mg/mL PI 的结合缓冲液中. 接着将细胞在暗处孵育 40 min 之后, 用流式细胞仪(Becton, Dickinson and Company, NJ)分析样品, 实验数据使用 Flow Jo 软件处理分析.

3.3.4 Western blot 实验

用不同浓度(0、0.25、0.50、1.00 μ mol/L)的化合物 **19q** 处理 PC-3 细胞. 用放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(Beyotime Biotechnology)提取细胞内蛋白质, 并通过聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白质定量试剂盒(Beyotime Biotechnology)测定蛋白质含量. 根据分子量通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质. 用质量分数为 5%的脱脂牛奶溶液封闭条带, 在摇床上室温封闭 2 h. 一抗(1:1000)在 4 °C 孵育过夜, 然后用磷酸缓冲盐溶液(PBS)-聚山梨醇酯-20(Tween 20) ($w=0.05\%$)洗涤 3 次, 每次 10 min. 二抗(1:10000)在室温下孵育 2 h, 然后用 PBS-Tween 20 (0.05%)洗涤 3 次, 每次 10 min. 用增强型化学发光(ECL)液进行印迹曝光. 所有条带均通过 Image J 软件进行分析, 上述实验结果均重复 3 次.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **19a~19u** 的 1H NMR, ^{13}C NMR, 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] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A. *Ca-Cancer J. Clin.* **2022**, 72, 7.
- [2] Hernandez-Lopez, A.; Tellez-Gonzalez, M. A.; Mondragon-Teran, P.; Meneses-Acosta, A. *Front Pharmacol.* **2021**, 12, 720692.
- [3] Giri, V. N.; Morgan, T. M.; Morris, D. S.; Berchuck, J. E.; Hyatt, C.; Taplin, M. E. *Ca-Cancer J. Clin.* **2022**, 73, 1.
- [4] Guo, X.; Yang, N.; Ji, W.; Zhang, H.; Dong, X.; Zhou, Z.; Li, L.; Shen, H. M.; Yao, S. Q.; Huang, W. *Adv. Mater.* **2021**, 33, 2007778.
- [5] Gu, X.; Huang, Z.; Ren, Z.; Tang, X.; Xue, R.; Luo, X.; Peng, S.; Peng, H.; Lu, B.; Tian, J.; Zhang, Y. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 928.
- [6] Tian, B.; Liu, Y.; Liu, J. *Eur. Polym. J.* **2021**, 154, 110533.
- [7] Patra, S.; Pradhan, B.; Nayak, R.; Behera, C.; Rout, L.; Jena, M.;

- Efferth, T.; Bhutia, S. K. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *73*, 310.
- [8] Passaro, A.; Guerini-Rocco, E.; Pochesci, A.; Vacirca, D.; Spitaleri, G.; Catania, C. M.; Rappa, A.; Barberis, M.; de Marinis, F. *Pharmacol. Res.* **2017**, *117*, 406.
- [9] Finlay, M. R.; Anderton, M.; Ashton, S.; Ballard, P.; Bethel, P. A.; Box, M. R.; Bradbury, R. H.; Brown, S. J.; Butterworth, S.; Campbell, A.; Chorley, C.; Colclough, N.; Cross, D. A.; Currie, G. S.; Grist, M.; Hassall, L.; Hill, G. B.; James, D.; James, M.; Kemmitt, P.; Klinowska, T.; Lamont, G.; Lamont, S. G.; Martin, N.; McFarland, H. L.; Mellor, M. J.; Orme, J. P.; Perkins, D.; Perkins, P.; Richmond, G.; Smith, P.; Ward, R. A.; Waring, M. J.; Whittaker, D.; Wells, S.; Wrigley, G. L. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8249.
- [10] Meng, Y.; Li, E.; Zhang, Y.; Liu, S.; Bao, C.; Yang, P.; Zhang, L.; Zhang, D.; Wang, J.; Chen, Y.; Li, N.; Xin, J.; Zhao, P.; Ke, Y.; Zhang, Q.; Liu, H. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 2541 (in Chinese).
- (孟娅琪, 李二冬, 张洋, 刘栓, 包崇男, 杨鹏, 张路野, 张丹青, 王继宽, 陈雅欣, 栗娜, 辛景超, 赵培荣, 可钰, 张秋荣, 刘宏民, 有机化学, **2019**, *39*, 2541.)
- [11] Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822.
- [12] Clegg, N. J.; Wongvipat, J.; Joseph, J. D.; Tran, C.; Ouk, S.; Dilhas, A.; Chen, Y.; Grillot, K.; Bischoff, E. D.; Cai, L.; Aparicio, A.; Dorow, S.; Arora, V.; Shao, G.; Qian, J.; Zhao, H.; Yang, G.; Cao, C.; Sensintaffar, J.; Wasielewska, T.; Herbert, M. R.; Bonnefous, C.; Darimont, B.; Scher, H. I.; Smith-Jones, P.; Klang, M.; Smith, N. D.; De Stanchina, E.; Wu, N.; Ouerfelli, O.; Rix, P. J.; Heyman, R. A.; Jung, M. E.; Sawyers, C. L.; Hager, J. H. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1494.
- [13] Stein, E. M.; DiNardo, C. D.; Fathi, A. T.; Pollyea, D. A.; Stone, R. M.; Altman, J. K.; Roboz, G. J.; Patel, M. R.; Collins, R.; Flinn, I. W.; Sekeres, M. A.; Stein, A. S.; Kantarjian, H. M.; Levine, R. L.; Vyas, P.; MacBeth, K. J.; Tosolini, A.; VanOostendorp, J.; Xu, Q.; Gupta, I.; Lila, T.; Risueno, A.; Yen, K. E.; Wu, B.; Attar, E. C.; Tallman, M. S.; de Botton, S. *Blood* **2019**, *133*, 676.
- [14] Chen, L.; Zhang, Y.; Liu, J.; Wang, W.; Li, X.; Zhao, L.; Wang, W.; Li, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 689.
- [15] Hou, W.; Ren, Y.; Zhang, Z.; Sun, H.; Ma, Y.; Yan, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1740.
- [16] Patel, H.; Pawara, R.; Ansari, A.; Surana, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 32.
- [17] Liang, X.; Wang, B.; Chen, C.; Wang, A.; Hu, C.; Zou, F.; Yu, K.; Liu, Q.; Li, F.; Hu, Z.; Lu, T.; Wang, J.; Wang, L.; Weisberg, E. L.; Li, L.; Xia, R.; Wang, W.; Ren, T.; Ge, J.; Liu, J.; Liu, Q. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 875.
- [18] Wu, Y.; Wang, B.; Wang, J.; Qi, S.; Zou, F.; Qi, Z.; Liu, F.; Liu, Q.; Chen, C.; Hu, C.; Hu, Z.; Wang, A.; Wang, L.; Wang, W.; Ren, T.; Cai, Y.; Bai, M.; Liu, Q.; Liu, J. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6083.
- [19] Fu, S.; Chen, X.; Lo, H. W.; Lin, J. *Cancer Lett.* **2019**, *448*, 11.
- [20] Abdel-Mohsen, H. T.; Conrad, J.; Harms, K.; Nohr, D.; Beifuss, U. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 17427.
- [21] Tala, S. D.; Ou, T.-H.; Lin, Y.-W.; Tala, K. S.; Chao, S.-H.; Wu, M.-H.; Tsai, T.-H.; Kakadiya, R.; Suman, S.; Chen, C.-H.; Lee, T.-C.; Su, T.-L. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 155.
- [22] Ma, L. Y.; Zheng, Y. C.; Wang, S. Q.; Wang, B.; Wang, Z. R.; Pang, L. P.; Zhang, M.; Wang, J. W.; Ding, L.; Li, J.; Wang, C.; Hu, B.; Liu, Y.; Zhang, X. D.; Wang, J. J.; Wang, Z. J.; Zhao, W.; Liu, H. *M. J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1705.
- [23] Ge, Y.; Yang, H.; Wang, C.; Meng, Q.; Li, L.; Sun, H.; Zhen, Y.; Liu, K.; Li, Y.; Ma, X. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 765.

(Cheng, F.)