

2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

张维舒^{a,b} 聂礼飞^a Khurshed Bozorov^{a,c}阿吉艾克拜尔·艾萨^{a,b} 赵江瑜^{*,a,b}^(a) 中国科学院新疆理化技术研究所 新疆特有药用资源利用重点实验室 乌鲁木齐 830011)^(b) 中国科学院大学 北京 100049)^(c) 撒马尔罕国立大学化学学院 撒马尔罕 乌兹别克斯坦 140104)

摘要 以含硫杂环噻吩为母核,设计并合成了30个2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯衍生物,经¹H NMR、¹³C NMR和HRMS进行了结构确证.用噻唑蓝(MTT)法测定该系列化合物对HeLa(人宫颈癌)、HT-29(人结肠癌)、A549(人非小细胞肺癌)、HepG2(人肝癌)四种肿瘤细胞的体外抗增殖活性.结果表明,部分化合物表现出良好的抗增殖活性,其中2-(4-(三氟甲氧基)苯甲酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C25)对HT-29、A549两种肿瘤细胞均表现出明显的抗增殖活性,IC₅₀值分别为(0.35±0.07)和(0.66±0.09) μmol/L; 2-(3-(三氟甲基)苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C29)对HT-29、HepG2两种肿瘤细胞也表现出明显的抗增殖活性,IC₅₀值分别为(0.47±0.03)和(0.41±0.04) μmol/L,其抑制活性均优于阳性对照药阿霉素(DOX)[对HT-29、A549、HepG2的IC₅₀值分别为(1.15±0.03)、(0.86±0.07)、(0.86±0.02) μmol/L].

关键词 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯; 抗肿瘤活性; 构效关系

Synthesis of Diethyl 2,5-Diaminothiophene-3,4-dicarboxylate Derivatives and Antitumor Activity Study

Zhang, Weishu^{a,b} Nie, Lifei^a Bozorov, Khurshed^{a,c}Aisa, Haji Akber^{a,b} Zhao, Jiangyu^{*,a,b}^(a) State Key Laboratory Basis of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011)^(b) University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)^(c) Faculty of Chemistry, Samarkand State University, Samarkand, Uzbekistan 140104)

Abstract Based on the sulfur heterocyclic compound thiophene, thirty diethyl 2,5-diaminothiophene-3,4-dicarboxylate derivatives were designed and synthesized. The structures of all compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS, and antiproliferative activities of the target compounds against four human cancer cell lines (HeLa, HT-29, A549 and HepG2) were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) *in vitro*. The results showed that some compounds exhibited good anticancer activity. Especially, diethyl 2-(4-(trifluoromethoxy)benzamido-5-(5-nitrothiophen-2-yl)methylene-aminothiophene-3,4-dicarboxylate (C25) possessed the best activity, whose IC₅₀ values were (0.35±0.07) and (0.66±0.09) μmol/L against HT-29 and A549, respectively; diethyl 2-(3-(trifluoromethyl)benzamido-5-(5-nitrothiophen-2-yl)methylene-aminothiophene-3,4-dicarboxylate (C29) also possessed the best activity, whose IC₅₀ values were (0.47±0.03) and (0.41±0.04) μmol/L against HT-29 and HepG2, respectively, better than positive control drug doxorubicin (DOX) (IC₅₀ values were (1.15±0.03), (0.86±0.07) and (0.86±0.02) μmol/L against HT-29, A549, and HepG2, respectively).

Keywords diethyl 2,5-diaminothiophene-3,4-dicarboxylate; anticancer activity; structure-activity relationships

随着全球人口增长和预期寿命延长,癌症发病率也随之增长.国际癌症研究机构(International Agency for

Research on Cancer)有关数据显示,2020年全球新增癌症病例约1 930万例,癌症死亡病例近1 000万例^[1].相

* Corresponding author. E-mail: zhaojy@ms.xjb.ac.cn

Received October 30, 2022; revised January 8, 2023; published online February 6, 2023.

Project supported by the National Key R&D Program of China (No. 2020YFE0205600).

国家重点研发计划(No. 2020YFE0205600)资助项目.

对于物理治疗和手术治疗, 药物治疗仍是目前最主要的治疗方式, 但一直受副作用和耐药性的限制. 因此通过化学合成手段发现疗效佳、毒性低的抗肿瘤先导化合物仍是目前的热点研究方向.

杂环化合物与生命过程密切相关, 在药物设计和开发领域得到了广泛的探索及应用^[2]. 其中含硫的五元杂环化合物噻吩也因其多样的生物活性和药理活性而受到特别关注^[3]. 大量文献报道证明, 噻吩类化合物具有抗肿瘤^[4]、抗炎^[5]、抗菌^[6]、抗病毒^[7]、抗结核^[8]、抑制激酶^[9]以及抗氧化^[10]等多种生物活性. 目前含有噻吩基团的上市药物种类繁多, 例如多靶点抗肿瘤抑制剂噻尔非尼(OSI-930)、抗精神分裂药物奥氮平(Olanzapine)、抗惊厥药物噻加宾(Tigabine)、抗炎药物舒洛芬(Suprofen)和替诺立定(Tinoridine), 以及抗血小板聚集药物噻氯匹定(Ticlopidine)等(如图 1).

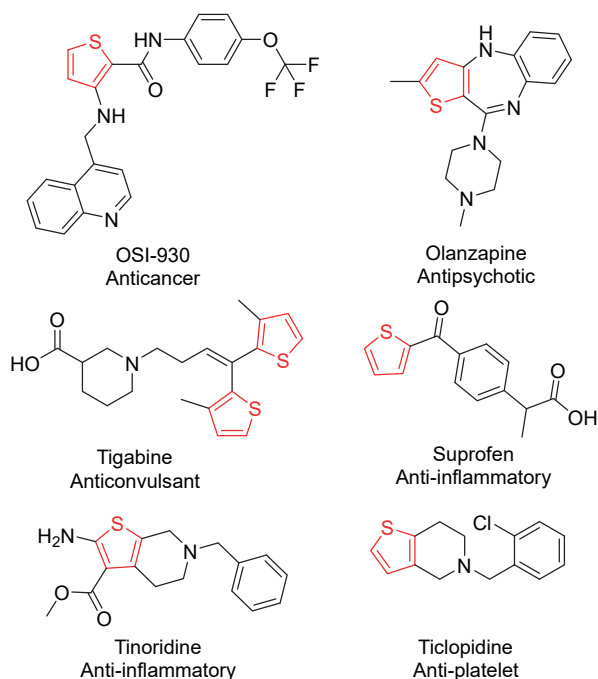


图 1 含噻吩基团的上市药物

Figure 1 Marketed drugs containing thiophene nucleus

噻吩类化合物抗肿瘤作用的多种机制已被广泛探索, 同时席夫碱类化合物自 20 世纪 70 年代初被发现具有良好的抗菌^[11]和抗肿瘤活性^[12]以来, 在医药领域应用甚广^[13]. 2017 年, 我们课题组 Bozorov^[14]的研究结果表明, 含单取代席夫碱的 2,5-二氨基-3,4-噻吩二羧酸二乙酯衍生物具有良好的抗癌和抗病毒活性, 其中含有 2-硝基噻吩环取代基的化合物 **B** 对肺癌细胞、结肠癌细胞和前列腺癌细胞等表现出较强的抗增殖活性, 而且对甲型和乙型流感病毒也有良好的抑制作用. 结构分析表明, 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯中的酯基不仅增

加了该系列化合物的稳定性, 还降低了氨基的亲核性, 使其在温和条件下仅发生单侧的偶联反应^[15], 这将有利于对另一侧氨基继续修饰. 不同官能团的引入对席夫碱的药理活性有很大的影响. 酰胺键作为药物化学中常见的药效团或连接基团, 普遍存在于生物体的蛋白质和多肽中, 极易与生物大分子形成氢键, 增强与受体的结合作用, 从而表现出较好的生物活性. 因此, 结合引入酰胺药效基团的优势, 对化合物 **B** 中的氨基进行酰胺化反应, 设计合成了一系列结构新颖的化合物(图 2), 期望发现高活性、低毒性的新型抗肿瘤先导化合物.

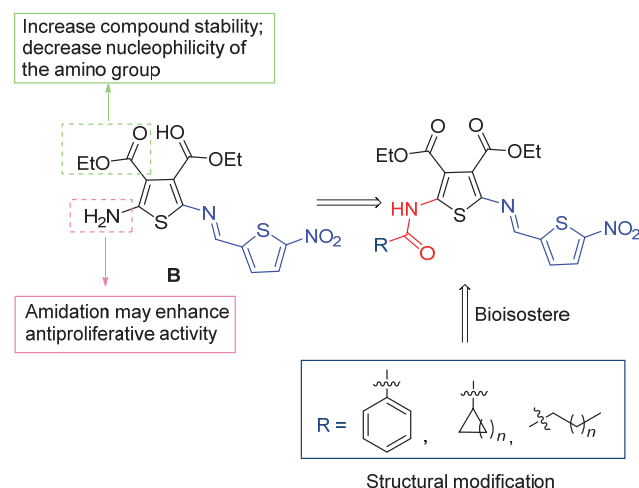


图 2 目标化合物的设计

Figure 2 Design of target compounds

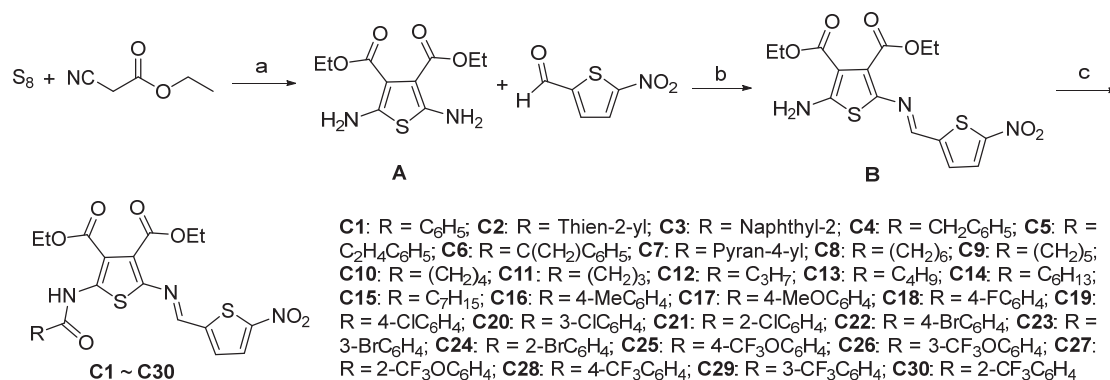
1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

以氨基乙酸乙酯为初始原料, 在三乙胺作用下与硫单质反应合成 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**A**), 接着, 在对甲苯磺酸的催化下与 5-硝基噻吩-2-甲醛反应得到单取代化合物 2-氨基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**B**), 最后, 在碱的作用下, 与不同取代的酰氯反应得到目标化合物 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯衍生物(**C1**~**C30**) (Scheme 1).

1.2 化合物 **C11** 的单晶结构

为最终确认目标化合物的结构, 在二氯甲烷/石油醚混合溶剂中培养得化合物 **C11** 的晶体(图 3), 晶体数据存于剑桥晶体数据库, 其 CCDC 号为 2191954. 选取 0.15 mm × 0.08 mm × 0.05 mm 大小的单晶在 170 K 温度下, 在 Bruker D8 VENTURE 衍射仪上, 采用 Mo K α 射线 ($\lambda = 0.071073$ nm), 在 $4.934^\circ \leq \theta \leq 52.718^\circ$ 范围内进行扫描, 共收集了 6791 个衍射点, 其中独立衍射点为 3591 个 [$R(\text{int}) = 0.0720$, $[R(\text{sigma})] = 0.1092$]. 晶体结构用 shelx-2014 软件求解, 非氢原子坐标用直接法解出, 最



Reagents and conditions: (a) DMF, TEA, r.t., 6 d; (b) ethanol, TsOH, reflux, 3 h; (c) RCOCl, DCM, TEA, DMAP, r.t., 6 h

图式 1 目标化合物的合成

Scheme 1 Synthesis of the target compounds

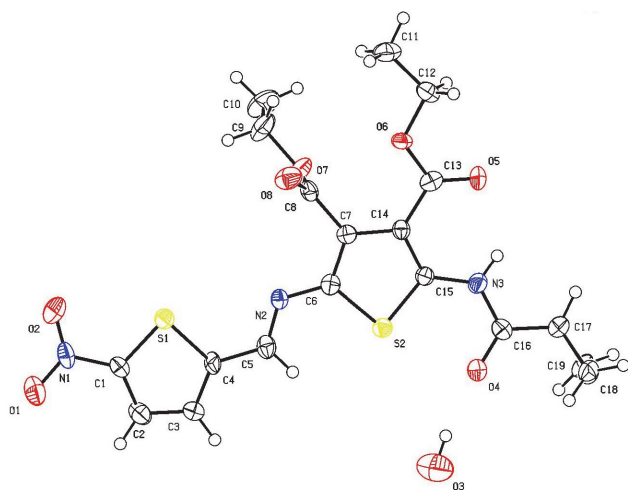


图 3 化合物 C11 的晶体结构(CCDC:2191954)

Figure 3 Crystal structure of compound C11 (CCDC:2191954)

小二乘法对非氢原子进行各种异性温度因子修正。

1.3 生物活性评价

采用噻唑蓝(MTT)法对化合物的体外抗肿瘤活性进行评价,以阿霉素(DOX)作为阳性对照药,用 HeLa、HT-29、A549、HepG2 四种肿瘤细胞来评价 30 个 2,5-二氨基-3,4-噻吩二羧酸二乙酯衍生物的体外抗肿瘤活性,结果见表 1。

结果显示,18 个化合物对 HeLa 细胞有一定的抑制活性;16 个化合物对 HT-29 细胞有一定的抑制活性。20 个化合物对 A549 细胞有一定的抑制活性;19 个化合物对 HepG2 细胞有一定的抑制活性。其中 C25 对 HT-29 和 A549 两种肿瘤细胞有较好的抑制活性,IC₅₀值分别为(0.35±0.07)、(0.66±0.09) μmol/L,其抑制活性优于阳性对照药 DOX [IC₅₀值分别为(1.15±0.03)、(0.86±0.07) μmol/L];C29 对 HT-29 和 HepG2 两种肿瘤细胞的抑制活性分别为(0.47±0.03)、(0.41±0.04) μmol/L,优于阳性对照药 DOX [IC₅₀值分别为(1.15±0.03)、(0.86±0.02)

μmol/L]。从整体的活性结果来看,该系列化合物有广谱的抗肿瘤活性,其中,对 HT-29 细胞的抑制作用最强,这将有利于进一步探索该系列化合物对人结肠癌细胞的抗增殖作用机制。

药物的理化作用主要依赖于分子整体性,但特定的官能团也会对分子结构和性质产生影响,从而可能影响药效。实验结果表明,当取代基为苯基时,化合物 C1 对四种肿瘤细胞均表现出一定的抑制活性;将苯基替换为杂环芳基时,抗肿瘤活性明显降低;与苯基相比,增加烷烃碳链长度得到的化合物 C4、C5 对 HeLa 和 HT-29 细胞的抑制活性有明显提高的趋势,但引入烯烃时,化合物 C6 的活性反而相对降低。

从取代基类型对活性影响结果可以看出,脂肪族取代基的引入对化合物活性整体优于芳香族,特别是化合物 C8 和 C14 对不同细胞的抗肿瘤活性较化合物 C1 均有不同程度的提高。遗憾的是,将环己酰基换成四氢吡喃基时,得到的化合物 C7 对 HeLa 和 HT-29 细胞并无抑制活性。同时还发现引入环烷烃的结构越稳定,化合物对肿瘤细胞抑制活性越强;当引入直链烷烃时,碳数与活性结果大致呈抛物线相关;无论是环烷烃还是直链烷烃,己基的引入对肿瘤细胞均显示出相对较好的抑制活性。结果表明,烃基的适当引入增加了化合物的脂水分配系数,有利于提高化合物与受体的疏水结合能力。同时,大体积的烃基可能因为位阻效应,增加了药物代谢稳定性,从而延长作用时间,对肿瘤细胞表现出较好的抑制作用,当脂溶性达到药物吸收最佳值后,再增加碳数反而效果不好。

从苯环取代基类型对活性影响结果可以看出,与供电子基相比,吸电子基团的引入对化合物的活性有明显的提高。众所周知,三氟甲基的脂溶性、代谢稳定性以及与生物蛋白酶结合能力强、生物利用度高,含该基团的化合物大多具有良好的生物活性^[16]。其中,化合物

表 1 化合物 C1~C30 体外抗肿瘤活性数据
Table 1 Antitumor data of compounds C1~C30 *in vitro*

Compd.	R	IC ₅₀ ^a /(μmol/L)				
		HeLa	HT-29	A549	HepG2	L02
C1	C ₆ H ₅	19.04±1.00	1.11±0.24	1.44±0.20	5.85±0.21	—
C2	Thien-2-yl	—	—	10.94±0.39	8.83±0.44	—
C3	Naphthyl-2	7.30±1.27	—	3.96±1.05	8.97±0.41	—
C4	CH ₂ C ₆ H ₅	6.36±1.63	0.63±0.03	5.08±0.60	1.27±0.07	—
C5	C ₂ H ₄ C ₆ H ₅	1.46±0.44	0.86±0.01	2.04±0.37	—	—
C6	C(CH ₂)C ₆ H ₅	26.67±2.92	2.72±1.65	9.58±3.12	36.51±2.18	—
C7	Pyran-4-yl	—	—	14.11±0.42	6.5±0.32	—
C8	(CH ₂) ₆	0.40±0.06	—	1.14±0.07	6.80±0.36	9.17±0.89
C9	(CH ₂) ₅	1.77±0.01	1.15±0.21	1.94±0.60	2.70±0.19	—
C10	(CH ₂) ₄	—	—	—	—	—
C11	(CH ₂) ₃	—	—	—	—	—
C12	C ₃ H ₇	—	15.84±0.57	—	27.03±0.97	—
C13	C ₄ H ₉	1.89±0.51	1.11±0.16	2.67±1.32	0.38±0.03	—
C14	C ₆ H ₁₃	8.29±0.42	0.83±0.03	6.69±0.21	—	35.48±3.11
C15	C ₇ H ₁₅	—	—	—	—	—
C16	4-CH ₃ C ₆ H ₄	—	9.53±0.48	23.28±1.03	11.42±0.51	—
C17	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	—	—	—	1.47±0.08	—
C18	4-FC ₆ H ₄	26.21±0.95	—	3.34±0.09	—	—
C19	4-ClC ₆ H ₄	28.73±1.38	2.92±0.22	8.52±0.24	3.48±0.19	—
C20	3-ClC ₆ H ₄	—	—	—	—	—
C21	2-ClC ₆ H ₄	—	—	—	—	—
C22	4-BrC ₆ H ₄	0.83±0.04	2.78±0.06	—	7.52±0.66	—
C23	3-BrC ₆ H ₄	—	32.26±1.64	30.01±1.51	—	—
C24	2-BrC ₆ H ₄	2.49±0.13	27.67±1.11	15.68±0.51	—	—
C25	4-CF ₃ OC ₆ H ₄	—	0.35±0.07	0.66±0.09	0.96±0.06	2.68±0.21
C26	3-CF ₃ OC ₆ H ₄	8.11±0.49	—	—	10.9±0.51	—
C27	2-CF ₃ OC ₆ H ₄	—	—	—	—	—
C28	4-CF ₃ C ₆ H ₄	9.62±2.93	1.59±0.07	7.54±1.74	10.09±0.78	—
C29	3-CF ₃ C ₆ H ₄	6.80±0.25	0.47±0.03	2.03±0.09	0.41±0.04	—
C30	2-CF ₃ C ₆ H ₄	0.92±0.02	—	2.51±0.07	9.03±0.38	—
DOX		0.55±0.05	1.15±0.03	0.86±0.07	0.86±0.02	—

^a “—” indicates the compound IC₅₀>50 μmol/L.

C29 对肿瘤细胞抗增殖活性的提高也显示了类似的结果. 与此同时, 研究发现三氟甲氧基的引入也可以明显提高化合物对肿瘤细胞的抑制效果. 但氟、氯等基团的引入并未增强抑制活性, 相比之下, 显示较强电负性的溴原子的引入可能会增强化合物与受体的电性结合作用, 且一定程度上提高化合物的亲脂性, 增加化合物对细胞膜的通透性^[17], 使其对肿瘤细胞抑制活性相对较强. 同时, 取代基的位置也影响细胞活性, 大部分对位取代的化合物对细胞抑制活性优于邻位和间位取代.

此外, 考察了化合物对正常细胞人肝癌细胞(L02)的细胞毒活性. 结果表明, 除化合物 **C8**、**C14** 和 **C25** 外, 大部分化合物对人肝癌细胞(L02)没有显著的细胞毒活性.

综上所述, 大部分目标化合物均在不同程度上抑制四种肿瘤细胞增长, 且对正常细胞没有显著的细胞毒活性, 故研究结果对噻吩类抗肿瘤药物分子的设计具有一

定的参考价值.

2 结论

本文以成本低廉的试剂为起始原料, 经三步反应合成了 30 个不同取代的 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯衍生物 **C1**~**C30**, 通过核磁和高分辨质谱对所合成的化合物结构进行了结构表征. 用 MTT 法测试了这些化合物的体外抗肿瘤活性. 活性测试结果显示, 大部分目标化合物均能有效抑制 HeLa、HT-29、A549、HepG2 肿瘤细胞增长. 可以看出, 有 18 个化合物对 HeLa 细胞有抑制活性, 其中 **C8** 活性最佳, IC₅₀ 为 (0.40±0.06) μmol/L; 16 个化合物对 HT-29 有抑制活性, 其中 **C4**、**C5**、**C14**、**C25**、**C29** 的活性均优于阳性对照药 DOX [IC₅₀=(1.15±0.03) μmol/L]; 20 个化合物对 A549 细胞有抑制活性, 其中 **C25** 的活性最好, IC₅₀ 为 (0.66±0.09) μmol/L; 19 个化合物对 HepG2 细胞有抑制活性, 其中 **C13** 的 IC₅₀

为 (0.38 ± 0.03) $\mu\text{mol/L}$; **C29** 的 IC_{50} 为 (0.41 ± 0.04) $\mu\text{mol/L}$, 均优于阳性对照药 DOX [$\text{IC}_{50} = (0.86 \pm 0.02)$ $\mu\text{mol/L}$].

从上述活性测试结果可以看出, 基于噻吩骨架设计合成的部分化合物表现出明显的体外抗肿瘤活性, 在此结构基础上, 对其继续优化改造, 可为进一步开发新型 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯衍生物类抗肿瘤药物提供科学依据.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振仪为 Varian 公司 INOVA 400M 型或 Bruker AM-500 M 型; 熔点由 Buchi B-540 型熔点仪测得; 高分辨质谱仪为 ABSCIEX QSTAR Elite 四级杆飞行质谱仪; 薄层色谱(TLC)选用 Merk Salica Gel 60 F254 plates 或青岛海洋 GF254 硅胶板, 于紫外灯下观察; 柱层析硅胶 200~300 目.

本文中所有的试剂全部购自于商业试剂公司, 均为分析纯, 除特别说明外, 未经处理直接使用.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 A 的合成

化合物 A 的合成参考文献[18], 在室温条件下, 向单质硫(5 g, 156 mmol)和氰基乙酸乙酯(31.5 mL, 311.9 mmol)的混合物中加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(25 mL)和三乙胺(4.9 mL, 39 mmol), 室温反应 6 d, 将所得混合物加入 2 L 冷水中, 搅拌 3 h 后过滤, 干燥, 再采用正向硅胶柱层析梯度洗脱, 洗脱剂为 *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯) = 5 : 1, 得到 2,5-二氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**A**), 产率 57%. 黄色固体, m.p. 154~155 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.25 (s, 4H), 4.26~4.21 (m, 4H), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.0, 148.3, 104.0, 59.9, 14.2, HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 259.0747, found 259.0742.

3.2.2 化合物 B 的合成

化合物 B 的合成参考文献[19], 在室温条件下, 将黄色固体 A (2.56 g, 9.9 mmol)和 5-硝基噻吩甲醛(1.71 g, 10.9 mmol)溶于无水乙醇中(10 mL), 加催化量的对甲苯磺酸(0.69 g, 4 mmol), 加热回流 3 h. 薄层色谱(TLC)监测反应完毕, 用二氯甲烷(5 mL $\times$ 3)萃取, 合并有机相, 干燥、浓缩. 采用正向硅胶柱层析梯度洗脱, 洗脱剂为 *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯) = 2 : 1, 得到 2-氨基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**B**), 产率 87%. 黑红色固体, m.p. 186~188 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.93 (s, 1H), 7.85 (d, $J=4.3$ Hz, 1H),

7.20 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 6.51 (s, 2H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.26 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.46 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 164.3, 161.0, 148.9, 142.8, 133.6, 132.1, 129.0, 128.2, 103.9, 62.0, 60.8, 18.6, 14.6, 14.3; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 398.0475, found 398.0466.

3.2.3 化合物 C1~C30 的合成

将得到的化合物 B (0.25 mmol)溶解在无水二氯甲烷中, 滴加缚酸剂三乙胺(0.37 mmol)和催化剂 4-二甲氨基吡啶(DMAP) (0.06 mmol), 0 $^{\circ}\text{C}$ 下缓慢滴加不同取代的酰氯(0.3 mmol), 室温搅拌 6 h. TLC 监测反应完毕, 加水除去过量的酰氯, 二氯甲烷(5 mL $\times$ 3)萃取, 合并有机相, 干燥, 浓缩, 采用正向硅胶柱层析梯度洗脱, 洗脱剂 *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯) = 5 : 1, 分别得到化合物 C1~C30.

2-苯甲酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C1**): 产率 80%. 红色固体, m.p. 255~256 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.30 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.02 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.47 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.48 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 164.8, 163.6, 153.9, 148.2, 147.1, 146.8, 140.2, 133.3, 131.3, 130.2, 129.4, 129.2, 128.7, 127.6, 109.7, 62.0, 61.8, 14.9, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 502.0737, found 502.0730.

2-(噻吩-2-甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C2**): 产率 67%. 橙红色固体, m.p. 265~267 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.10 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.86 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.20~7.17 (m, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.36 (dd, $J=7.1, 3.5$ Hz, 2H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.35 (d, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.9, 164.7, 158.8, 153.5, 148.2, 146.7, 146.7, 140.2, 136.3, 133.2, 132.2, 130.3, 129.5, 128.7, 128.4, 109.9, 62.0, 61.8, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 508.0301, found 508.0294.

2-萘甲酰亚胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C3**): 产率 71%. 红色固体, m.p. 233~234 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.42 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.01 (dd, $J=14.2, 5.8$ Hz, 3H), 7.89 (dd, $J=13.8, 6.1$ Hz, 2H), 7.61 (dt, $J=15.0, 6.7$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.55~4.43 (m, 2H),

4.42~4.34 (m, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.84, 164.82, 164.16, 153.79, 148.24, 147.12, 146.75, 140.24, 135.49, 132.56, 130.26, 129.47, 129.41, 129.18, 129.15, 128.73, 128.71, 128.44, 127.86, 127.22, 123.05, 110.14, 62.00, 61.77, 14.47, 13.99; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 552.0894, found 552.0884.

2-苯乙酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C4): 产率 73%. 红色固体, m.p. 218~220 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.16 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.44~7.40 (m, 2H), 7.36 (td, $J=7.2, 6.7, 1.8$ Hz, 3H), 7.29 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.42 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 1.43 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.28 (d, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 169.9, 164.8, 164.3, 153.8, 148.2, 146.7, 146.2, 139.9, 139.6, 129.9, 129.4, 128.7, 128.2, 126.6, 109.6, 61.9, 61.6, 38.4, 30.9, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 516.0892, found 516.0888.

2-苯丙酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C5): 产率 70%. 亮红色固体, m.p. 158~160 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.23 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.88 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.29 (dd, $J=5.9, 1.4$ Hz, 3H), 7.24~7.21 (m, 3H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.30 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 2.85 (dd, $J=8.3, 7.0$ Hz, 2H), 1.45 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.34 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.04, 164.94, 164.43, 153.96, 148.32, 146.90, 146.37, 140.14, 139.77, 129.56, 128.85, 128.83, 128.67, 128.39, 126.72, 109.74, 62.13, 61.75, 38.58, 31.06, 14.61, 14.07; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 530.1050, found 530.1042.

2-肉桂酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C6): 产率 68%. 橙红色固体, m.p. 215~216 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.48 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.88 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=6.6, 2.9$ Hz, 2H), 7.45~7.41 (m, 3H), 7.31 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 4.46 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.36 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.38 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 164.5, 163.1, 153.7, 148.2, 146.8, 146.7, 145.3, 140.4, 134.6, 130.9, 130.2, 129.4, 129.0, 128.7, 128.3, 118.8, 109.8, 61.9, 61.6, 14.5, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 528.0894, found 528.0887.

2-(四氢-2H-吡喃-4-甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C7): 产率 67%. 红色固体, m.p. 223~224 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 11.46 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.45 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.34 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.10~4.05 (m, 2H), 3.51~3.46 (m, 2H), 2.72~2.66 (m, 1H), 1.93 (s, 2H), 1.91 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 1.89~1.85 (m, 1H), 1.46 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.37 (d, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 172.2, 164.9, 164.8, 154.0, 148.3, 146.9, 146.6, 140.2, 130.1, 129.6, 128.9, 109.9, 67.1, 62.2, 61.9, 42.2, 28.8, 14.6, 14.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 510.0999, found 510.0989.

2-环己烷甲酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C8): 产率 73%. 橙红色固体, m.p. 232~234 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.37 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.33 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.48~2.40 (m, 1H), 2.04 (d, $J=11.6$ Hz, 2H), 1.86 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 1.74 (s, 1H), 1.53 (d, $J=11.8$ Hz, 3H), 1.46 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.37 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.33 (d, $J=11.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.83, 164.90, 164.52, 153.71, 148.27, 146.79, 146.52, 139.83, 130.03, 129.35, 128.74, 109.46, 61.97, 61.59, 53.43, 45.16, 29.16, 25.43, 14.46, 13.95; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 508.1207, found 508.1196.

2-环戊烷甲酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(C9): 产率 70%. 红色固体, m.p. 215~216 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.31 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.32 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.89 (p, $J=8.2$ Hz, 1H), 2.06~1.99 (m, 2H), 1.94~1.87 (m, 2H), 1.81 (dd, $J=9.6, 5.6$ Hz, 2H), 1.68 (dd, $J=7.2, 4.6$ Hz, 2H), 1.45 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.35 (d, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.2, 164.9, 164.4, 153.8, 148.3, 146.8, 146.5, 139.8, 130.1, 129.3, 128.7, 109.4, 61.9, 61.5, 46.1, 30.2, 25.8, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 494.1050, found 494.1032.

2-环丁烷甲酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二甲酸二乙酯(C10): 产率 71%. 橙黄色固体, m.p. 233~234 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.17 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.85 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.31 (q, $J=7.1$ Hz,

2H), 3.31 (p, $J=8.5$ Hz, 1H), 2.43~2.37 (m, 2H), 2.36~2.30 (m, 2H), 2.11~1.95 (m, 2H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.35 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.3, 164.8, 163.8, 153.7, 148.2, 146.7, 146.6, 139.9, 130.0, 129.4, 128.7, 109.5, 61.9, 61.5, 40.0, 25.3, 18.2, 14.4, 13.2; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 480.0894, found 480.0873.

2-环丙烷甲酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C11**): 产率 76%. 红色固体, m.p. 237~238 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.43 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.86 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.33 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.74~1.70 (m, 1H), 1.46 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.36 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.21~1.18 (m, 2H), 1.03 (dd, $J=7.7$, 3.3 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 171.3, 164.9, 164.4, 153.8, 148.2, 146.8, 145.9, 139.1, 130.0, 129.3, 128.7, 109.1, 61.9, 61.6, 15.6, 14.4, 13.9, 9.6; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 466.0737, found 466.0730.

2-丁酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C12**): 产率 73%, 橙红色固体, m.p. 209~210 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.24 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.84 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.45~4.39 (m, 2H), 4.30 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.49 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.78 (q, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.43 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.01 (t, $J=7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 170.8, 164.8, 164.4, 153.8, 148.2, 146.6, 146.5, 139.9, 129.9, 129.4, 128.7, 109.5, 61.9, 61.6, 38.6, 18.6, 14.4, 13.9, 13.5; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 468.0894, found 468.0886.

2-戊酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C13**): 产率 68%. 橙黄色固体, m.p. 195~196 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.26 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.33 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.53 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.75 (p, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.47 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.42 (dd, $J=8.3$, 6.5 Hz, 2H), 1.36 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.96 (t, $J=7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 171.0, 164.9, 164.4, 153.8, 148.2, 146.6, 146.5, 139.9, 129.9, 129.4, 128.8, 109.4, 61.9, 61.6, 36.5, 27.1, 22.2, 14.5, 13.9, 13.7; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 482.1050, found 482.1034.

2-庚酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C14**): 产率 73%. 黄色固体, m.p. 160~162 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 11.25 (s,

1H), 8.36 (s, 1H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.33 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.52 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.74 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.38 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 1.35 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.34~1.30 (m, 4H), 0.89 (t, $J=6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 171.2, 165.0, 164.5, 153.9, 148.4, 146.8, 146.7, 140.0, 130.1, 129.5, 128.9, 109.6, 62.1, 61.7, 36.9, 31.5, 28.9, 25.2, 22.6, 14.6, 14.2, 14.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 510.1363, found 510.1354.

2-辛酰胺基-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C15**): 产率 72%. 黄色固体, m.p. 224~225 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 11.25 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.86 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.32 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.52 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.75 (p, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.35 (t, $J=7.2$ Hz, 6H), 1.29 (p, $J=4.1$, 3.6 Hz, 5H), 0.88 (t, $J=6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 171.2, 165.0, 164.5, 153.9, 148.4, 146.8, 146.7, 140.0, 130.1, 129.5, 128.9, 109.6, 62.1, 61.7, 36.9, 31.7, 29.2, 29.0, 25.2, 22.7, 14.6, 14.2, 14.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 524.1520, found 524.1512.

2-(4-甲基苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C16**): 产率 71%. 橙黄色固体, m.p. 266~267 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.23 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.89~7.87 (m, 2H), 7.34 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.38 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.46 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.38 (d, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.0, 164.9, 164.2, 153.9, 148.4, 147.4, 146.8, 144.4, 140.2, 130.4, 130.0, 129.6, 128.9, 128.6, 127.8, 110.1, 62.2, 61.9, 21.8, 14.6, 14.2; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 516.0894, found 516.0887.

2-(4-甲氧基苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C17**): 产率 71%. 橙黄色固体, m.p. 243~245 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.19 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.96 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 4.45 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.36 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.37 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 163.7, 163.6, 153.8, 148.3, 147.5, 146.5, 140.0, 132.4, 130.2, 129.7, 129.3, 128.7, 123.5, 114.4, 109.7, 61.9, 61.7, 55.6, 14.5, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

532.0843, found 532.0839.

2-(4-氟苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C18**): 产率 72%. 橙红色固体, m.p. 276~278 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.29 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.04 (dd, $J=8.8, 5.1$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.24 (s, 2H), 4.46 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.38 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 167.06, 164.90, 164.72, 164.52, 162.94, 148.10, 146.94, 146.85, 140.27, 130.20, 130.11, 129.46, 128.69, 127.59, 127.56, 116.50, 116.28, 110.14, 62.01, 61.81, 14.45, 13.94; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 520.0643, found 520.0635.

2-(4-氯苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C19**): 产率 70%. 橙黄色固体, m.p. 249~251 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.29 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.95~7.93 (m, 2H), 7.88 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J=8.9, 2.1$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.46 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.38 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.38 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 164.8, 163.0, 153.9, 148.1, 147.0, 146.8, 140.4, 139.9, 130.2, 129.7, 129.6, 129.5, 129.0, 128.8, 110.3, 62.1, 61.9, 14.5, 14.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 536.0347, found 536.0338.

2-(3-氯苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C20**): 产率 67%. 黄色固体, m.p. 231~232 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.29 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.01 (t, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.87~7.84 (m, 1H), 7.61 (ddd, $J=8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.47 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.48 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.0, 164.9, 162.9, 154.1, 148.2, 147.2, 146.7, 140.6, 135.7, 133.5, 133.3, 130.6, 130.3, 129.8, 128.9, 128.4, 125.4, 110.6, 62.2, 62.1, 14.6, 14.2; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 536.0347, found 536.0335.

2-(2-氯苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C21**): 产率 71%. 红色固体, m.p. 257~259 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.04 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.89 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=4.2$ Hz, 1H), 4.46 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.34 (q, $J=7.0$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.35 (t, $J=7.1$

Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 164.1, 163.6, 153.9, 148.1, 147.0, 145.7, 140.4, 132.9, 131.9, 131.6, 131.1, 131.0, 130.2, 129.5, 128.7, 127.4, 110.8, 62.0, 61.7, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 536.0347, found 536.0341.

2-(4-溴苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C22**): 产率 71%. 砖红色固体, m.p. 254~255 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.31 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.89 (d, $J=4.1$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.72~7.68 (m, 2H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.47 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.39 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 164.7, 163.2, 148.1, 146.9, 146.7, 140.4, 132.5, 130.2, 130.1, 129.5, 129.1, 128.7, 128.4, 110.3, 62.0, 61.8, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 579.9842, found 579.9833.

2-(3-溴苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C23**): 产率 72%. 红色固体, m.p. 236~237 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.25 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.14 (t, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.91~7.86 (m, 2H), 7.74 (dt, $J=7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.45 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.37 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.37 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 164.7, 162.6, 153.9, 148.1, 147.0, 146.5, 140.5, 136.2, 133.3, 131.1, 130.6, 130.1, 129.6, 128.7, 125.7, 123.4, 110.5, 62.5, 59.1, 14.5, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 579.9842, found 579.9838.

2-(2-溴苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C24**): 产率 73%. 红色固体, m.p. 247~248 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.78 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.86 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.68 (ddd, $J=7.4, 4.5, 1.3$ Hz, 2H), 7.44 (td, $J=7.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.38 (td, $J=7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.34~4.29 (m, 2H), 1.45 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.7, 164.6, 164.2, 153.9, 148.1, 147.1, 145.7, 140.5, 134.7, 134.3, 132.8, 130.2, 130.2, 129.6, 128.7, 127.9, 120.0, 110.8, 62.0, 61.7, 14.4, 13.5; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 579.9842, found 579.9833.

2-(4-(三氟甲氧基)苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C25**): 产率 76%. 橙红色固体, m.p. 203~205 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.33 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.08~8.05 (m, 2H),

7.89 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.40~7.38 (m, 2H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.38 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.46 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 164.7, 162.7, 153.9, 152.8, 148.0, 147.0, 146.7, 140.4, 132.2, 130.1, 129.7, 129.6, 128.7, 120.9, 120.3, 110.3, 62.0, 61.9, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 586.0560, found 586.0547.

2-(3-(三氟甲氧基)苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C26**): 产率 64%. 橘红色固体, m.p. 187~188 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.33 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.91~7.86 (m, 3H), 7.60 (t, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.47 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.78, 164.63, 162.51, 153.94, 149.82, 149.81, 148.02, 147.08, 146.43, 140.51, 133.47, 130.69, 130.10, 129.61, 128.68, 125.43, 125.15, 120.66, 110.52, 62.03, 61.89, 14.45, 13.93; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 586.0560, found 586.0551.

2-(2-(三氟甲氧基)苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C27**): 产率 64%. 黄色固体, m.p. 236~237 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.29 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.10 (dd, $J=7.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.66~7.62 (m, 1H), 7.51~7.47 (m, 1H), 7.41 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.47 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.35 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.36 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.0, 164.0, 161.9, 154.1, 148.3, 147.2, 146.6, 145.8, 140.6, 134.2, 132.4, 130.4, 129.7, 128.9, 127.8, 125.6, 121.8, 119.3, 111.1, 62.2, 61.9, 14.63, 14.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 586.0560, found 586.0552.

2-(4-(三氟甲基苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C28**): 产率 73%. 橙黄色固体, m.p. 248~249 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.41 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.13 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.46 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.48 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 164.6, 162.8, 153.9, 147.9, 147.2, 146.4, 140.6, 134.6, 132.4, 130.1, 129.6, 128.7, 128.1, 126.2, 126.2, 110.6, 62.1, 61.9, 14.4, 13.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

570.0611, found 570.0603.

2-(3-(三氟甲基)苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C29**): 产率 70%. 红色固体, m.p. 218~219 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.33 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.11 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.86 (dd, $J=9.5, 6.2$ Hz, 2H), 7.68 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.45 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.37 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.46 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.38 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 162.6, 154.0, 148.2, 147.3, 146.5, 140.7, 132.3, 132.1, 131.8, 130.3, 130.2, 129.9, 129.9, 128.8, 125.2, 125.2, 122.5, 110.7, 62.2, 62.0, 14.6, 14.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 570.0611, found 570.0600.

2-(2-(三氟甲基)苯甲酰胺基)-5-(5-硝基噻吩-2-基)亚甲基氨基噻吩-3,4-二羧酸二乙酯(**C30**): 产率 65%. 黄色固体, m.p. 248~249 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 11.64 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.88 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.70 (q, $J=3.9, 3.5$ Hz, 3H), 7.32 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.31 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.46 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.34 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.8, 164.5, 154.2, 148.1, 147.4, 145.9, 140.8, 133.0, 132.5, 131.6, 130.2, 129.9, 128.9, 128.7, 127.3, 127.2, 124.4, 122.3, 110.9, 62.2, 61.9, 14.6, 14.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 570.0611, found 570.0604.

3.3 生物活性实验

MTT 法检测细胞存活率具体方法: 将对数生长期细胞吸去培养基, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗一次, 胰酶消化, 加培养基终止, 轻轻吹打, 计数, 以相应的细胞密度接种在 96 孔板中(100 μL /孔), 过夜培养, 加化合物(20 μL /孔). 每一化合物设浓度梯度, 每一浓度设 3 复孔. 在 CO_2 氛围 37 °C 培养箱内培养 48 h, 吸弃旧培养基, 加入 MTT 100 μL , 再继续培养 2 h. 37 °C 孵育 2 h 后, 使用 MB 酶标仪测定 570 nm 处的光吸收值(OD). 细胞抑制率(%) = $1 - \text{细胞活力}\%$ = $[1 - (\text{化合物 OD} - \text{空白 OD}) / (\text{对照组 OD} - \text{空白 OD})] \times 100\%$, 用 Graphpad Prism 8.0 经公式拟合得 IC_{50} .

细胞株: HeLa、HT-29、A549、HepG2 和 L02 细胞均购买自中国科学院上海细胞库. 试剂: 二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、DMEM 培养基选自美国 Sigma 公司; 阿霉素(DOX)选自美国 Thermo 公司. 仪器: SpectraMax M5 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); La120S 型电子天平(德国 Sartorius 公司); 37 °C 培养箱(香港 Heraeus 公司).

辅助材料(Supporting Information) 化合物 C1~C30 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图, 以及 C11 的单晶数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *Ca-Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209.
- [2] Pathania, S.; Narang, R. K.; Rawal, R. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 486.
- [3] Archana; Pathania, S.; Chawla, P. A. *Bioorg. Chem.* **2020**, *101*, 104026.
- [4] AbdElhameid, M. K.; Labib, M. B.; Negmeldin, A. T.; Al-Shorbagy, M.; Mohammed, M. R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33*, 1472.
- [5] Pillai, A. D.; Rathod, P. D.; Xavier, F. P.; Padh, H.; Sudarsanam, V.; K, K. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6685.
- [6] Wang, P.; Batt, S. M.; Wang, B.; Fu, L.; Qin, R.; Lu, Y.; Li, G.; Besra, G. S.; Huang, H. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6241.
- [7] Desantis, J.; Nannetti, G.; Massari, S.; Barreca, M. L.; Manfroni, G.; Cecchetti, V.; Palu, G.; Goracci, L.; Loregian, A.; Tabarrini, O. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 128.
- [8] Pandya, D. H.; Sharma, J. A.; Jalani, H. B.; Pandya, A. N.; Sudarsanam, V.; Kachler, S.; Klotz, K. N.; Vasu, K. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1306.
- [9] Kang, D.; Fang, Z.; Li, Z.; Huang, B.; Zhang, H.; Lu, X.; Xu, H.; Zhou, Z.; Ding, X.; Daelemans, D.; De Clercq, E.; Pannecouque, C.; Zhan, P.; Liu, X. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7991.
- [10] Shah, R.; Verma, P. K. *BMC Chem. Biol* **2019**, *13*, 54.
- [11] da Silva, C. M.; da Silva, D. L.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; de Resende, M. A.; Martins, C. V. B.; de Fátima, Â. *J. Adv. Res.* **2011**, *2*, 1.
- [12] Gabr, M. T.; El-Gohary, N. S.; El-Bendary, E. R.; El-Kerdawy, M. M.; Ni, N. *Chin. Chem. Lett.* **2016**, *27*, 380.
- [13] Ghanghas, P.; Choudhary, A.; Kumar, D.; Poonia, K. *Inorg. Chem. Commun.* **2021**, *130*, 108710.
- [14] Bozorov, K.; Zhao, J. y.; Nie, L. F.; Ma, H.-R.; Bobakulov, K.; Hu, R.; Rustamova, N.; Huang, G.; Effert, T.; Aisa, H. A. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 31417.
- [15] Liu, S.; Wu, T.; Zhu, Q.; Pu, J.; Chen, G.; Zhang, W.; Li, Z. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 12779.
- [16] Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822.
- [17] Roughley, S. D.; Jordan, A. M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451.
- [18] Bourgeaux, M.; Vomscheid, S.; Skene, W. G. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 3551.
- [19] Bozorov, K.; Ma, H. R.; Zhao, J. Y.; Zhao, H. Q.; Chen, H.; Bobakulov, K.; Xin, X. L.; Elmurodov, B.; Shakhidoyatov, K.; Aisa, H. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 739.

(Cheng, F.)