

(*E*)-3-(((1,3,4-噻二唑-2-基)氨基)亚甲基)-硫色满-4-酮类化合物的合成、抗真菌活性测定及分子对接研究

李生彬¹, 齐慧¹, 张超超¹, 刘振明³, 宋亚丽^{1*}, 乔晓强^{1,2*}

(河北大学 1. 药学院, 河北省药物质量分析控制重点实验室, 2. 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北保定 071002; 3. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室药物设计中心, 北京 100191)

摘要: 1,3,4-噻二唑和硫色满酮是具有广泛生物活性的杂环, 为寻找具有抗真菌生物活性的新颖化合物, 本文合成了 21 个含有 1,3,4-噻二唑片段的硫色满酮类衍生物。所合成的化合物经 HR-MS、¹H NMR、¹³C NMR 和 1D-noesy 等方法进行了结构表征。采用微量稀释法对所合成的化合物进行抗真菌活性的测定, 测试结果表明, 化合物 **5j** 对辣椒炭疽病菌、小麦纹枯病菌、花生冠腐病菌的抑制活性均优于阳性对照药物多菌灵。化合物 **5h** 对白色念珠菌和烟曲霉的最小抑菌浓度分别为 8 μg·mL⁻¹ 和 16 μg·mL⁻¹, 优于阳性对照药物氟康唑。利用分子对接方法研究了含 1,3,4-噻二唑片段的硫色满酮类化合物与白色念珠菌的甾醇 14α-去甲基化酶 (sterol 14α-demethylase, CYP51) 作用模式, 为进一步的结构改造提供了依据。

关键词: 抗菌活性; 硫色满酮; 噻二唑

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1518-08

Synthesis, antifungal activity and molecular docking of (*E*)-3-(((1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino)methylene)-thiochroman-4-ones

LI Sheng-bin¹, QI Hui¹, ZHANG Chao-chao¹, LIU Zhen-ming³, SONG Ya-li^{1*}, QIAO Xiao-qiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, College of Pharmaceutical Sciences, 2. Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education, Hebei University, Baoding 071002, China; 3. Drug Design Center, State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Thiochromanones and 1,3,4-thiadiazoles as heterocyclic compounds have broad biological activities. In order to find novel compounds with antifungal activity, we synthesized a novel series of (*E*)-3-(((1,3,4-thiadiazol-2-yl) amino)methylene)-thiochroman-4-ones. Structures of these compounds were established by HR-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR and 1D-noesy. All of the synthesized compounds were screened for antifungal activity by using an established agar double dilution method (plate method) against ten fungi species *in vitro*. Compound **5j** showed significant inhibitory activity to *Colletotrichum capsici*, *Rhizoctonia cerealis* and *Aspergillus niger* compared with that of the positive control carbendazim. Compounds **5h** exhibited better antifungal activity to *Canidia albicans* and *Aspergillus fumigatus* than the positive control fluconazole, in which the minimum inhibition concentration can reach 8 μg·mL⁻¹ and 16 μg·mL⁻¹. Moreover, the molecular docking method was used to study the interaction mode of compound **5h** and CYP51, and the results will be helpful for

收稿日期: 2018-04-09; 修回日期: 2018-06-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21675039); 中国博士后科学基金资助项目 (2016M591401); 河北省青年拔尖人才项目; 河北省自然科学基金资助项目 (B2018201269); 河北大学杰出青年科学基金资助项目 (2015JQ06).

*通讯作者 Tel / Fax: 13483283338, E-mail: yalisong@hbu.edu.cn;

Tel / Fax: 15903120430, E-mail: xiaoqiao@hbu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0310

designing of CYP51 inhibitors in the future.

Key words: antifungal activity; thiochromanone; 1,3,4-thiadiazol

真菌是一类分布十分广泛的真核细胞生物, 它们与人类关系密切, 其中许多真菌对人类是有益的, 然而还有些真菌可侵犯动植物及人类, 引起各种真菌病^[1, 2]。虽然人们对于一些结构新颖、活性突出的抗真菌药物需求量巨大, 但是抗真菌药物的发展依然十分缓慢^[3, 4]。甾醇 14 α -去甲基化酶 (sterol 14 α -demethylase, CYP51) 是生物甾醇合成过程中的一个关键酶, 为细胞色素 P450 超家族的主要成员之一^[5]。其主要功能是催化羊毛甾醇 14 α -位的甲基离去^[6]。一旦此酶缺乏或其功能受到抑制, 生物体就无法合成甾醇, 细胞膜无法合成, 最终细胞因失去细胞膜而死亡^[7]。自然界中, CYP51 广泛存在于植物、真菌、哺乳动物体内, 是氮唑类抗真菌药物的靶标酶, 在药物的设计和研发中占有重要地位^[8, 9]。

噻二唑类化合物是由包括氢键结合域、硫原子和双电子供体氮系统组成的五元杂环类化合物, 表现出广泛的生物活性^[10]。噻二唑类在自然界中存在以下 4 种异构体形式: 分别是 1,2,3-噻二唑、1,2,5-噻二唑、1,2,4-噻二唑和 1,3,4-噻二唑^[11, 12]。其中, 1,3,4-噻二唑类的化合物对各种病原体显示出广谱的活性^[13]。这些化合物通过竞争性抑制真菌甾醇生物合成中的

关键酶 CYP51 发挥作用^[14]。CYP51 的选择性抑制会引起麦角甾醇的消耗以及羊毛甾醇和其他 14-甲基甾醇的积累, 导致真菌细胞的生长抑制^[15, 16]。

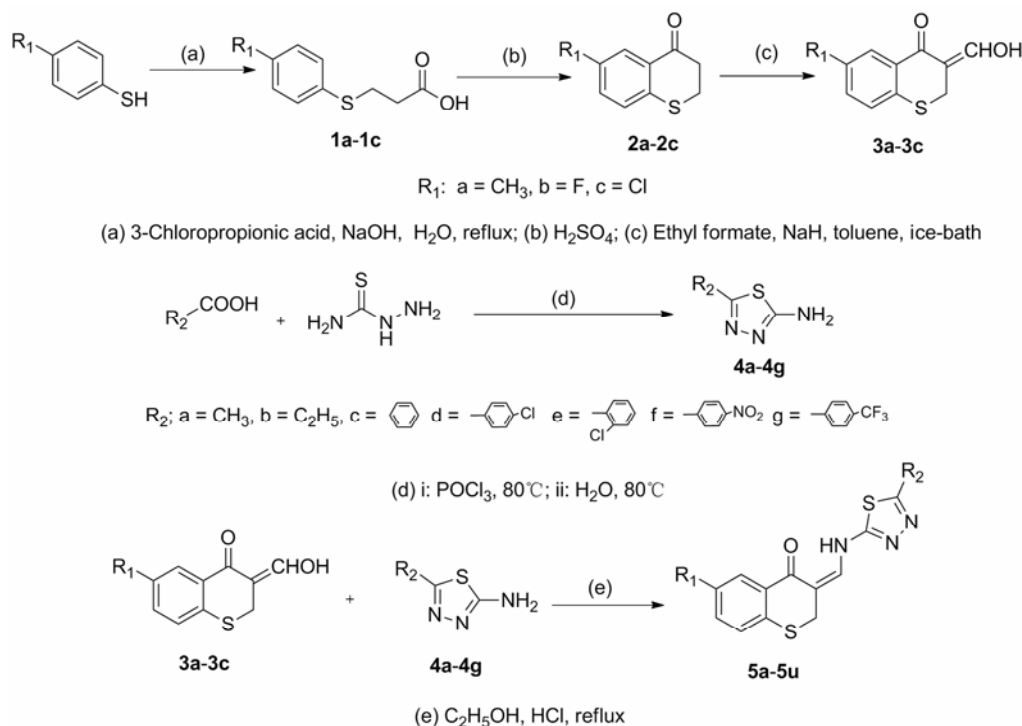
鉴于 1,3,4-噻二唑和硫色满酮杂环类化合物均具有良好生物活性^[17], 根据药物设计的生物活性基团拼接原理^[18-20], 设计了一系列的 (*E*)-3-[[1,3,4-噻二唑-2-基]氨基]亚甲基]-硫色满-4-酮类衍生物, 采用微量稀释法评价其抗真菌活性, 得出初步构效关系, 并通过分子对接探讨该类化合物与白色念珠菌的甾醇 14 α -去甲基化酶的结合方式, 为进一步结构改造提供依据^[21, 22]。

结果与讨论

1 化合物的合成及结构鉴定

本文以 **5a** 为例, 由化合物 **3**、**4** 合成化合物 **5a** 的过程中 (合成路线 1), 考察了不同催化剂、溶剂对反应速率的影响。

以乙醇作溶剂, 考察了三乙胺、氢氧化钠、醋酸、盐酸等不同催化剂对产率的影响, 结果表明, 盐酸作催化剂时产率最高为 83%。接着在盐酸作催化剂的条件下, 考察了乙醇、水、二氯甲烷等溶剂对反应产率



Scheme 1 Synthesis of (*E*)-3-(((1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino)methylene)-thiochroman-4-ones

的影响,结果当乙醇作溶剂时,产率最高。合成的最佳反应条件确定为:乙醇为溶剂,盐酸为催化剂。

目标化合物经过 HR-MS、¹HNMR、¹³CNMR 等方法进行了表征,理化数据见表 1、2。1D-noesy 谱图中-S-CH₂- (δ_{H} 3.81) 和-C=CH- (δ_{H} 7.83) (化合物 **5h**) 之间存在 NOE 效应,说明化合物的双键为 *E* 构型。

2 抗植物病原真菌活性测定

以辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsici*, *C.c.*)、小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*, *R.c.*)、苹果树腐烂病 (*Valsa mali*, *V.m.*)、花生冠腐病菌 (*Aspergillus niger*, *A.n.*) 为供试菌。对合成的目标化合物 **5a**~**5u** 的抑菌活性进行初步筛选,结果见表 3。结果表明化合物 **5n**、**5o** 对 *R.c.* 抗菌活性优于阳性对照多菌灵 (carbendazim, CBD), 最小抑菌浓度均为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。化合物 **5j** 对 *C.c.*、*R.c.*、*A.n.* 的抗菌活性也优于阳性对照多菌灵;**5p** 对 *R.c.*、*V.m.*、*A.n.* 抗菌活性与阳性对照多菌灵相当。化合物 **5a**、**5d**、**5r** 和 **5t** 表现出一定的抗菌活性,但是,所有化合物的活性均显著低于两性霉素 B (amphotericin B, AmB)。

3 抗动物病原真菌活性测定

以新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*, *C.n.*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*, *C.a.*)、烟曲霉 (*Asper-*

gillus funigatus, *A.f.*)、絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*, *E.f.*)、总状毛霉菌 (*Mucor racemosus*, *M.r.*) 和须癣毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*, *T.m.*) 为供试对象,对合成的目标化合物 **5a**~**5u** 进行抑菌活性测试,结果见表 4,总体来看,化合物对 *C.n.*、*C.a.* 和 *A.f.* 的抗菌活性要优于 *M.r.*、*T.m.* 和 *E.f.*。化合物 **5h** 抗菌活性最强,对 *C.a.* 最小抑菌浓度为 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,对 *C.n.*、*A.f.*、*E.f.* 最小抑菌浓度为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;其次是 **5i**,对 *C.a.*、*A.f.* 和 *M.r.* 的最小抑菌浓度均为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;化合物 **5o** 对 *C.a.*、*A.f.* 最小抑菌浓度均为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;化合物 **5a** 对 *A.f.* 的最小抑菌浓度为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,对 *C.a.* 最小抑菌浓度为 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,均优于阳性对照氟康唑。其余化合物对被试菌株也表现出一定的抗菌活性,但所有化合物的抗真菌活性均显著低于两性霉素 B。

R₂ 为烷烃时的抗菌活性优于芳香烃,可能的原因芳香烃空间位阻大,无法进入活性口袋,从而使化合物无法与作用靶点进行结合,分子对接结果也证明了这点。另外,当硫色满酮的苯环上带有吸电子取代基时(如氟、氯)、1,3,4-噻二唑的 2 位为供电子取代基时(如甲基或乙基),化合物表现出较好的抗菌活性,这对进一步设计工作具有指导意义。

Table 1 Structure and yield of synthesized compounds **5a**–**5u**

| Compd. | R ₁ | R ₂ | Yield/% | mp/°C | Compd. | R ₁ | R ₂ | Yield/% | mp/°C |
|-----------|-----------------|-------------------------------|---------|---------|-----------|----------------|-------------------------------|---------|---------|
| 5a | CH ₃ | CH ₃ | 47 | 171–174 | 5l | F | | 85 | 221–223 |
| 5b | CH ₃ | C ₂ H ₅ | 54 | 154–156 | 5m | F | | 91 | 228–230 |
| 5c | CH ₃ | | 62 | 201–203 | 5n | F | | 87 | 197–199 |
| 5d | CH ₃ | | 83 | 211–213 | 5o | Cl | CH ₃ | 49 | 186–189 |
| 5e | CH ₃ | | 86 | 221–222 | 5p | Cl | C ₂ H ₅ | 77 | 152–155 |
| 5f | CH ₃ | | 90 | 225–228 | 5q | Cl | | 72 | 202–204 |
| 5g | CH ₃ | | 87 | 214–217 | 5r | Cl | | 83 | 218–220 |
| 5h | F | CH ₃ | 49 | 186–188 | 5s | Cl | | 86 | 226–227 |
| 5i | F | C ₂ H ₅ | 66 | 167–169 | 5t | Cl | | 92 | 238–240 |
| 5j | F | | 82 | 205–206 | 5u | Cl | | 84 | 199–200 |
| 5k | F | | 88 | 204–206 | | | | | |

Table 2 The spectral data of compounds **5a–5u**

| Compd. | ¹ H NMR, ¹³ C NMR and HR-MS |
|-----------|--|
| 5a | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.02 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, -NH-), 7.87 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, =CH-), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.21 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 3.77 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.69 (s, 3H, -CH ₃), 2.37 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 187.99, 163.39, 158.68, 138.77, 136.81, 135.79, 133.80, 133.31, 129.59, 127.97, 107.31, 31.65, 20.97, 15.96. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O ₅ S ₂ : 304.057 28; Found: 304.057 06. |
| 5b | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.03 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, -NH-), 7.87 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, =CH-), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.21 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 3.77 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 3.04 (q, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H, -CH ₂ CH ₃), 2.37 (s, 3H, -CH ₃), 1.40 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 187.94, 165.56, 163.04, 138.86, 136.79, 135.77, 133.77, 133.32, 129.59, 127.96, 107.20, 31.65, 24.11, 20.97, 14.03. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₅ H ₁₆ N ₃ O ₅ S ₂ : 318.072 93; Found: 318.072 79. |
| 5c | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.16 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 7.89 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.87 (m, 2H, Ar-H), 7.81 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, =CH-), 7.49–7.44 (m, 3H, Ar-H), 7.24 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 3.80 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.38 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 188.02, 162.83, 161.84, 138.48, 136.90, 135.82, 133.83, 133.32, 130.22, 129.65, 129.12, 127.97, 127.36, 107.80, 31.69, 20.90. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₃ H ₁₁ FN ₃ O ₅ S ₂ : 366.072 93; Found: 366.072 88. |
| 5d | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.18 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 7.89 (d, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.83–7.80 (m, 1H, =CH-, 2H, Ar-H), 7.45 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.80 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.38 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 188.11, 162.99, 160.84, 138.27, 136.90, 136.86, 135.87, 133.92, 133.25, 129.66, 129.42, 128.68, 128.47, 128.00, 108.03, 31.69, 20.93. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₉ H ₁₅ ClN ₃ O ₅ S ₂ : 400.033 96; Found: 400.034 07. |
| 5e | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.19 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 8.30–8.26 (m, 1H, Ar-H), 7.89 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.83 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, =CH-), 7.53–7.50 (m, 1H, Ar-H), 7.44–7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.24 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 3.81 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.38 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 188.02, 164.68, 157.36, 138.48, 136.83, 135.85, 133.87, 133.29, 131.95, 131.37, 130.74, 130.53, 129.68, 128.95, 127.99, 127.37, 107.90, 31.73, 20.97. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₉ H ₁₅ ClN ₃ O ₅ S ₂ : 400.033 96; Found: 400.034 07. |
| 5f | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.26 (d, <i>J</i> = 10.6 Hz, 1H, -NH-), 8.34 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, Ar-H), 8.06 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.89 (s, 1H, Ar-H), 7.82 (d, <i>J</i> = 10.6 Hz, 1H, =CH-), 7.25–7.22 (m, 2H, Ar-H), 3.81 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.39 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 188.25, 164.08, 159.24, 148.87, 137.73, 136.99, 135.95, 135.85, 134.09, 133.12, 129.72, 128.04, 127.93, 124.44, 108.76, 31.69, 20.92. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₉ H ₁₅ N ₄ O ₅ S ₂ : 411.058 55; Found: 411.058 43. |
| 5g | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.22 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H, -NH-), 8.00 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.89 (s, 1H, Ar-H), 7.82 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H, =CH-), 7.74 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.25–7.21 (m, 2H, Ar-H), 3.81 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.38 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 188.18, 163.52, 160.35, 138.04, 136.95, 135.90, 133.99, 133.20, 132.76, 132.54, 132.33, 132.10, 129.69, 128.05, 128.02, 127.55, 126.39, 126.19, 126.17, 126.14, 126.12, 124.58, 122.77, 120.97, 108.35, 31.70, 20.99. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₂₀ H ₁₅ F ₃ N ₃ O ₅ S ₂ : 434.060 31; Found: 434.060 22. |
| 5h | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 11.95 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H, -NH-), 7.82 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H, =CH-), 7.75 (dd, <i>J</i> = 9.3, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (dd, <i>J</i> = 8.6, 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.12 (td, <i>J</i> = 8.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.79 (s, 2H, -S-CH ₂ -), 2.70 (s, 3H, -CH ₃). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 186.67, 163.15, 161.90, 160.27, 159.03, 139.50, 135.32, 135.31, 135.04, 134.99, 129.70, 129.66, 120.41, 120.26, 115.69, 115.54, 106.44, 31.58, 15.98. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₃ H ₁₁ FN ₃ O ₅ S ₂ : 308.032 21; Found: 308.032 10. |
| 5i | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.10 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 7.93–7.86 (m, 3H, Ar-H), 7.77 (dd, <i>J</i> = 9.2, 2.9 Hz, 1H, =CH-), 7.50–7.46 (m, 4H, Ar-H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.6, 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (td, <i>J</i> = 8.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.82 (d, <i>J</i> = 0.7 Hz, 2H, -S-CH ₂ -). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 186.77, 162.55, 160.91, 160.30, 158.45, 139.22, 136.55, 136.53, 135.37, 134.91, 134.38, 134.36, 133.17, 133.08, 131.93, 130.92, 130.06, 129.69, 129.19, 128.15, 127.39, 126.27, 126.24, 120.50, 120.35, 115.60, 115.05, 107.53, 31.64. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₈ H ₁₃ FN ₃ O ₅ S ₂ : 370.047 86; Found: 370.047 96. |
| 5j | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.10 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 7.93–7.86 (m, 3H, Ar-H), 7.77 (dd, <i>J</i> = 9.2, 2.9 Hz, 1H, =CH-), 7.50–7.46 (m, 4H, Ar-H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.6, 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (td, <i>J</i> = 8.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.82 (d, <i>J</i> = 0.7 Hz, 2H, -S-CH ₂ -). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 186.77, 162.55, 160.91, 160.30, 158.45, 139.22, 136.55, 136.53, 135.37, 134.91, 134.38, 134.36, 133.17, 133.08, 131.93, 130.92, 130.06, 129.69, 129.19, 128.15, 127.39, 126.24, 120.50, 120.35, 115.60, 115.05, 107.53, 31.64. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₈ H ₁₃ FN ₃ O ₅ S ₂ : 370.047 86; Found: 370.047 96. |
| 5k | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.10 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, -NH-), 7.87 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, =CH-), 7.81 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.77 (dd, <i>J</i> = 9.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.46 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.6, 4.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (td, <i>J</i> = 8.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.82 (s, 2H, -S-CH ₂ -). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 186.80, 162.74, 161.95, 161.18, 160.32, 139.00, 136.98, 135.41, 135.39, 134.96, 134.92, 129.73, 129.68, 129.46, 128.58, 128.50, 120.53, 120.38, 115.76, 115.61, 107.16, 31.63. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₈ H ₁₂ ClFN ₃ O ₅ S ₂ : 404.008 89; Found: 404.008 80. |
| 5l | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.13 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H, -NH-), 8.29–8.26 (m, 1H, Ar-H), 7.90 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H, =CH-), 7.78 (dd, <i>J</i> = 9.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.54–7.51 (m, 1H, Ar-H), 7.44–7.41 (m, 2H, Ar-H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.6, 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.15–7.12 (m, 1H, Ar-H), 3.83 (s, 2H, -S-CH ₂ -). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 186.72, 164.42, 161.93, 160.30, 157.67, 139.21, 135.34, 135.32, 135.02, 134.98, 131.98, 131.46, 130.74, 130.55, 129.72, 129.68, 128.86, 127.40, 120.48, 120.33, 115.79, 115.63, 107.01, 31.66. HR-MS (ESI ⁺) [M+Na] ⁺ : Calcd. for C ₁₈ H ₁₁ ClFN ₃ NaO ₅ S ₂ : 425.990 83; Found: 425.991 40. |
| 5m | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.19 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 8.35 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 8.07 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.90 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, =CH-), 7.78 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.38–7.31 (m, 1H, Ar-H), 7.16 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 3.84 (s, 2H, -S-CH ₂ -). ¹³ C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 184.36, 164.68, 161.89, 159.97, 159.40, 137.25, 135.50, 134.33, 133.89, 133.82, 133.06, 130.71, 130.49, 129.94, 128.23, 127.97, 126.70, 126.68, 126.65, 125.27, 123.47, 111.40, 26.63. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₈ H ₁₂ FN ₄ O ₅ S ₂ : 415.0334 67; Found: 415.0334 79. |
| 5n | ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 12.14 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, -NH-), 8.00 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.89 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H, =CH-), 7.77 (dd, <i>J</i> = 9.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.74 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.6, 4.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (td, <i>J</i> = 8.2, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.83 (s, 2H, -S-CH ₂ -). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 186.90, 163.28, 161.94, 160.67, 160.30, 138.78, 135.44, 135.42, 134.89, 134.85, 133.30, 132.82, 132.60, 132.39, 132.17, 129.78, 129.74, 127.58, 126.36, 126.23, 126.21, 126.19, 126.16, 124.55, 122.75, 120.95, 120.69, 120.49, 115.79, 115.64, 107.43, 31.64. HR-MS (ESI ⁺) [M+H] ⁺ : Calcd. for C ₁₉ H ₁₁ F ₄ N ₃ NaO ₅ S ₂ : 460.017 19; Found: 460.017 31. |

4 分子对接研究

目标化合物 **5a**~**5u**、阳性对照氟康唑分别与白色念珠菌的甾醇 14 α -去甲基化酶 (ID: 5TZ1) 的对接结果见表 4。对接结果表明: 化合物的对接打分值 (C-score) 与其抗真菌活性大体相一致。

图 1、图 2 和图 3 为半柔性分子对接研究得到的 **5h**、**5c** 和氟康唑分别与 CYP51 活性位点的相互作用模式。从图中可以看出, 当 R₂ 位为烷烃时 (图 1), 化合物可以与 CYP51 的血红素铁原子形成配位结合, 而当 R₂ 位为芳香烃时 (图 2), 可能是因为苯环的空间位阻过大, 导致化合物无法与靶点的血红素铁原子形成配位结合。

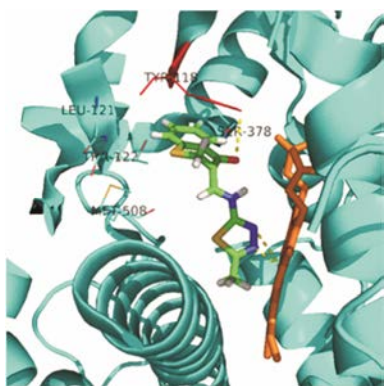


Figure 1 Predicted binding mode of **5h** docked into the binding site of CYP51 14 α -sterol demethylase of *Candida albicans*

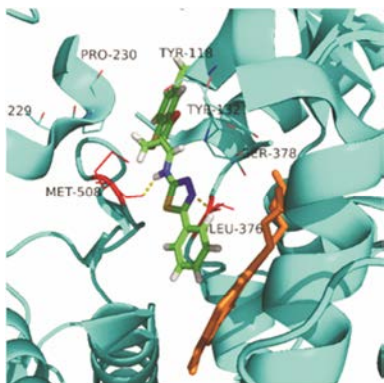


Figure 2 Predicted binding mode of **5c** docked into the binding site of CYP51 14 α -sterol demethylase of *Candida albicans*

同时, 分子对接研究表明, 化合物与 CYP51 主要通过氢键、疏水和范德华力相互作用。另外, 噻二唑环上的氮原子能与 CYP51 上的血红素铁原子形成配位结合, 说明化合物中噻二唑环为抗真菌活性的主要基团。噻色满酮基位于由 LEU-121、TYR-122、MET-508 和 SER-378 等氨基酸残基组成的疏水空穴中, 并形成较强的疏水相互作用, 噻色满酮环中的 -C=O 基团还能与 TYR-118 残基形成氢键, 说明

-C=O 基团在化合物的抗菌活性中也起关键作用。这与阳性对照氟康唑作用模式 (图 3) 基本相似。活性数据和对接结果表明此类化合物的抑菌作用可能与抑制 CYP51 有关。

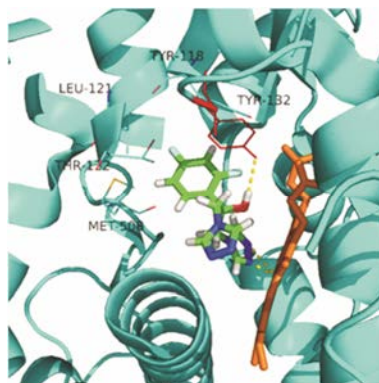


Figure 3 Predicted binding mode of fluconazole docked into the binding site of CYP51 14 α -sterol demethylase of *Candida albicans*

结论

本文设计合成了 21 个未见文献报道的含 1,3,4-噻二唑片段的噻色满酮衍生物。采用微量稀释法对目标化合物进行抗真菌活性的测试。结果表明化合物 **5n**、**5o** 对 *R.c.* 抗菌活性优于阳性对照多菌灵, 最小抑菌浓度均为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。化合物 **5j** 对 *C.c.*、*R.c.*、*A.n.* 的抗菌活性也优于阳性对照多菌灵; 化合物 **5a**、**5h**、**5i** 和 **5o** 对 *A.f.*、*C.a.* 的抗菌活性 (MIC: 8~32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 要优于阳性对照氟康唑 (MIC: 32~64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 其余化合物的抗菌活性较弱。分子对接研究结果表明, 含 1,3,4-噻二唑片段的噻色满酮衍生物与阳性对照氟康唑的作用模式相似, 说明噻二唑类化合物的抑菌作用可能与抑制 CYP51 有关。

实验部分

¹H NMR, ¹³C NMR 和 1D-noesy 由 Bruker AVIII-600 MHz 核磁共振波谱仪完成; HR-MS 由 Bruker apex ultra 7.0 T 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪得到; 中间体的 MS 由 Agilent LC/MSD Trap XCT 液质联用仪获得; 熔点由 SGW X-4 显微熔点仪测定。其他试剂和溶剂未经特别说明均为国产或进口分析纯。

1 化合物合成

1.1 化合物 2 的合成 将取代苯硫酚 0.1 mol 和 β -氯丙酸 0.12 mol 置于 500 mL 圆底烧瓶中, 加入含 0.24 mol 氢氧化钠的溶液 300 mL, 充分搅拌均匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应。TLC 跟踪监测, 待反应完全后冷至室温,

用稀盐酸调节 pH 1, 析出大量白色沉淀, 抽滤, 大量水洗滤饼, 用乙醇/水重结晶 (1:1), 得化合物 **1a**~**1c**, 收率为 72%~85%。化合物的数据与文献^[23]一致。

按 1 g 化合物 **1** 用 4 mL 浓硫酸的比例将化合物 **1** 溶于浓硫酸中, 室温放置 12 h, 冰解, 析出大量浅黄色固体, 抽滤, 水洗至中性。用 50% 乙醇重结晶, 得到化合物 **2a**~**2c**。收率为 80%~85%, 化合物的数据与文献^[23]一致。

1.2 化合物 3 的合成 取氢氧化钠 0.15 mol 溶于甲酸乙酯 150 mL 中, 用恒压滴液漏斗向其中缓慢滴加 0.05 mol 化合物 **2** 的甲酸乙酯溶液, 30 min 滴完, 在冰浴条件下搅拌, 反应 12 h。反应液用水萃取 3 次, 合并水相然后用浓盐酸调节 pH 2~3, 静止 12 h 析出大量沉淀。抽滤水洗得到化合物 **3a**~**3c**, 产率 72%~82%。化合物的数据与文献^[24]一致。

1.3 化合物 4 的合成 当 R₂ 为甲基、乙基等脂肪族取代基时: 取氨基硫脲 0.11 mol、有机酸 0.11 mol 和浓盐酸 30 mL 加入到 50 mL 圆底烧瓶中, 搅拌回流 3 h, 冷却至室温, 用氢氧化钠调 pH 8~9, 冷却析出大量白色沉淀, 抽滤, 水洗得到化合物 **4a**、**4b**, 产率 75%~85%。化合物的数据与文献^[25]报道一致。

当 R₂ 为苯基、对氯苯基等芳香族取代基时: 将氨基硫脲 0.11 mol 和取代苯甲酸 0.11 mol 先加入到 100 mL 烧瓶中, 然后在搅拌条件下加入三氯氧磷 12 mL, 在 80 °C 回流反应 2 h, 冷却至室温, 在冰水浴下, 缓缓滴加水 15 mL, 0.5 h 加毕。然后再在 110 °C 回流反应 5 h, 冷却, 倒入 80 mL 冰水中, 搅拌出现沉淀。在冰水浴下用氢氧化钠调 pH 8~9, 抽滤, 水洗, 干燥, 得粗品。用 DMF 和 H₂O (1:2) 混合溶液重结晶得到化合物 **4c**~**4g**, 产率 70%~88%。化合物的数据与文献^[26]报道一致。

1.4 目标化合物 5a~5u 的合成 取化合物 **3** (0.01 mol)、化合物 **4** (0.01 mol) 和浓盐酸 0.5 mL 加入到 20 mL 乙醇溶液中, 加热回流 7~8 h, TLC 监测 (乙酸乙酯:石油醚=3:5), 反应结束后冷却至室温, 反应液用 200 目硅胶色谱 (乙酸乙酯:石油醚=1:3) 纯化, 即得目标产物 **5a**~**5u**, 产率在 47%~92%。

2 抗真菌活性测试

本实验受试动物病原真菌目前保存于河北省药物质量分析控制重点实验室, 植物病原真菌目前保存于河北大学药物化学与分子诊断教育部重点实验室。阳性对照品氟康唑购于山东绿因药业有限公司, 两性霉素 B 来自大连美仑生物技术有限公司, 阳性对照品多菌灵由江苏泰仓农化有限公司提供。本实

验采用微量稀释法分别对 4 种植物病原真菌和 6 种动物病原真菌进行活性测试^[27]。将目标化合物分别用二甲基亚砷溶解, 配制成样品储备液。采用倍比稀释法稀释样品, 得到一系列质量浓度分别是 128、64、32、16、8、4 和 2 μg·mL⁻¹ 样品溶液。对照品的稀释方法同上。用血球计数法将受试菌的菌悬液浓度配成 1×10⁵ CFU·mL⁻¹。将样品溶液 100 μL 及菌悬液 100 μL 加到 96 孔板中 (每种菌同时作一空白对照), 混匀后植物病原真菌恒温 28 °C 培养 3~6 天, 动物病原真菌恒温 35 °C 培养 2~7 天, 以无菌生长的最低浓度为最小抑菌浓度 (MIC 值)。

3 分子对接研究

分子对接研究运用 Sybyl-X2.0 中的 Surflex-Dock 模块进行分析, 靶标蛋白白色念珠菌的甾醇 14 α -去甲基化酶 (sterol 14 α -demethylase, CYP51) 的晶体结构 (ID: 5TZ1) 从蛋白数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中获得。对接时设定对接模式为 Surflex-Dock (SFXC), 对受体蛋白进行整体分析、残基修正、加氢加电荷、删除配体等处理。设定距离配体分子 5 Å 范围以内的所有氨基酸残基为活性口袋进行对接叠合。然后基于 Sybyl-X2.0 软件的 Surflex-Dock program 模块将化合物和氟康唑分别与 CYP51 的晶体结构进行对接, 并对配体与受体对接模式进行分析。

References

- [1] Berne S, Kovačić L, Sova M, et al. Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: design, synthesis, structure-activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 4264–4276.
- [2] Imran A, Waseem AW, Amber K, et al. Synthesis and synergistic antifungal activities of a pyrazoline based ligand and its copper (II) and nickel (II) complexes with conventional antifungals [J]. *Microb Pathog*, 2012, 53: 66–73.
- [3] Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health [J]. *Nature*, 2012, 484: 186–194.
- [4] Imran A, Hassan Y, Vinay DG, et al. Chiral. Separations of imidazole antifungal drugs on amycoat RP column in HPLC [J]. *Chromatographia*, 2009, 70: 223–227.
- [5] Crešnar B, Petrič S. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814: 29–35.
- [6] Yu X, Nandekar P, Mustafa G, et al. Ligand tunnels in T. brucei and human CYP51: insights for parasite-specific drug design [J]. *Biomed Biochim Acta*, 2015, 1860: 67–78.
- [7] Singh A, Paliwal SK, Sharma M, et al. In silico and in vitro

- screening to identify structurally diverse non-azole CYP51 inhibitors as potent antifungal agent [J]. *J Mol Graphics Modell*, 2016, 63: 1–7.
- [8] Kelly SL, Kelly DE. Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us? [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2013, 368: 20120476.
- [9] Aboul-Enein HY, Ali I. Enantiomeric resolution of some imidazole antifungal agents on chirapak WH chiral stationary phase using HPLC [J]. *Chromatographia*, 2001, 54: 200–202.
- [10] Maarroof Z. One-pot synthesis of 1,3,4-thiadiazoles using Vilsmeier reagent as a versatile cyclodehydration agent [J]. *Tetrahedron*, 2017, 73: 1867–1872.
- [11] Wesam SA, Rajshekhkar K, Mahesh BP, et al. Novel imidazo [2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans* [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 95: 514–525.
- [12] Mahmut G, Halit M, Serdar Ç, et al. Synthesis, characterization, quantum chemical calculations and evaluation of antioxidant properties of 1,3,4-thiadiazole derivatives including 2- and 3-methoxy cinnamic acids [J]. *J Mol Struct*, 2017, 1134: 40–50.
- [13] Jain AK, Sharma S, Vaidya A, et al. 1,3,4-Thiadiazole and its derivatives: a review on recent progress in biological activities [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81: 557–576.
- [14] Lamb DC, Kelly DE, Venkateswarlu K, et al. Generation of a complete, soluble, and catalytically active sterol 14 α -demethylase-reductase complex [J]. *Biochemistry*, 1999, 388: 733–738.
- [15] Banfi E, Scialino G, Zampieri D, et al. Antifungal and antimycobacterial activity of new imidazole and triazole derivatives. A combined experimental and computational approach [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58: 76–84.
- [16] Ji HT, Zhang WN, Zhou YJ, et al. A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction withazole antifungals [J]. *J Med Chem*, 2000, 43: 2493–2505.
- [17] Zoumpoulakis P, Camoutsis C, Pairas G, et al. Synthesis of novel sulfonamide-1,2,4-triazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,3,4-oxadiazoles, as potential antibacterial and antifungal agents. Biological evaluation and conformational analysis studies [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 1569–1583.
- [18] Cui XH, Tan J, Zhou M, et al. Design, virtual screening, synthesis and anti-hepatitis B virus of oxime derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1578–1583.
- [19] Song YL, Yang T, Dong YF, et al. Facile one-pot synthesis of some novel thiazolopyrazole derivatives with antifungal activity [J]. *Chem Lett*, 2014, 43: 134–136.
- [20] Song YL, Dong YF, Yang T, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel bisindolylalkanes analogues [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 7624–7627.
- [21] Qi P, Jin YH, Guo C, et al. Synthesis and antifungal activity of 3-bromo-4-sulfur (mannose) derivatives [J]. *Chin J Med Chem*, 2003, 13: 205–207.
- [22] Ramprasad J, Nayak N, Dalimba U. Design of new phenothiazine-thiadiazole hybrids *via* molecular hybridization approach for the development of potent antitubercular agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 106: 75–84.
- [23] Xiao LW, Li HZ. Synthesis of β -arylthioethers of propionic acid and thiochromanones under microwave irradiation [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2006, 26: 979–982.
- [24] Liu XM, Yang GL, Song YL, et al. Synthesis and antifungal activity of some novel (*E*)-2,3-dihydro-3-[(phenylamino)methylene]-4*H*-1-benzothiopyran-4-ones [J]. *Lett Org Chem*, 2013, 10: 228–234.
- [25] Le CG, Ding JH, Yang SJ. Synthesis and application of 5-alkyl-2-amino-1,3,4-thiadiazole [J]. *Chem World (化学世界)*, 2002, 7: 366–368.
- [26] Niu P, Kang J, Tian X, et al. Synthesis of 2-amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-amino-1,3,4-thiadiazoles *via* sequential condensation and I₂-mediated oxidative C-O/C-S bond formation [J]. *J Org Chem*, 2015, 80: 1018–1024.
- [27] Han XY, Li SB, Liang GC, et al. Synthesis and antifungal activities of *N*-1,3,4-thiadiazol-2-yl-4-oxo-thiochroman-2-yl-formamide derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 113–119.