

新型三嗪类白念珠菌 SAP2 抑制剂的设计、合成和生物活性研究

杨 继¹, 董国强², 刘 娜^{2*}, 盛春泉^{1,2*}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 近年来, 侵袭性真菌感染的发病率和死亡率不断上升, 迫切需要研发具有新型作用模式的抗真菌药物。靶向毒力因子是一种新的抗真菌药物发现策略。分泌型天冬氨酸蛋白酶 2 (SAP2) 是一种毒力因子, 是一种新兴的抗真菌靶点。然而, 发现小分子 SAP2 抑制剂仍然是一个重大的挑战。本研究从前期筛选得到的三嗪类小分子 SAP2 抑制剂 **A12** 入手, 经合理设计和结构优化后, 化合物的 SAP2 抑制活性显著提高, 并对其构效关系进行总结。其中化合物 **8a** 和 **8c** 在白念珠菌感染的体内模型中表现出良好的抗真菌活性。并且, 该类化合物 (**8a** 和 **8b**) 对于真菌生物被膜具有较好的抑制作用。因此, 三嗪类小分子 SAP2 抑制剂是一类具有研究前景的新型抗真菌先导化合物。

关键词: 三嗪类衍生物; SAP2 抑制剂; 毒力因子

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1647-14

Design, synthesis and biological activity of novel triazine inhibitors of *Candida albicans* secreted aspartic protease 2

YANG Ji¹, DONG Guo-qiang², LIU Na^{2*}, SHENG Chun-quan^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: In recent years, the incidence and mortality of invasive fungal infections has increased. It is highly desirable to develop novel antifungal agents with new modes of action. Targeting virulence factors represents a new strategy for antifungal drug discovery. Secreted aspartic protease 2 (SAP2), a kind of virulence factor, is an emerging antifungal target. However, discovery of small-molecule SAP2 inhibitors remains a significant challenge. Based on the structure-activity relationship of our previously identified triazine small-molecule SAP2 inhibitor, we were able to identify two potent inhibitors, **8a** and **8c**, which showed excellent *in vivo* antifungal activity for the treatment of *C. albicans* infection. Moreover, compounds **8a** and **8b** effectively inhibited fungal biofilm. Taken together, triazine SAP2 inhibitors represent promising lead compounds for the discovery of novel antifungal agents.

Key words: triazine derivative; SAP2 inhibitor; virulence factor

近年来, 侵袭性真菌感染 (invasive fungal infections, IFIs) 的发病率和死亡率逐年增高^[1], 安全有效的抗真菌药物却十分有限。目前, 临床上用于治疗侵袭

性真菌感染的药物主要包括多烯类 (两性霉素 B)、三唑类 (氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑等)、棘白菌素类 (卡泊芬净、米卡芬净) 和核酸类 (5-氟胞嘧啶)^[2], 但这些抗真菌药存在肝肾毒性、耐药性严重和口服生物利用度差等问题^[3]。因此, 迫切需要研发全新结构类型和全新作用机制的抗真菌新药。

侵袭性真菌感染的主要致病菌包括念珠菌、曲霉菌和隐球菌^[4]。其中, 白念珠菌是发病率最高的致

收稿日期: 2020-06-01; 修回日期: 2020-06-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81725020, 81973175); 上海市教委科研创新计划重大项目 (2019-01-07-00-07-E00073).

*通讯作者 Tel: 86-21-81871201, E-mail: shengcq@smmu.edu.cn;

Tel: 86-21-81871230, E-mail: liuna66@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0880

病真菌^[5]。分泌型天冬氨酸蛋白酶 (secreted aspartyl proteinase, SAP) 是白念珠菌分泌的一种蛋白酶, 是白念珠菌致病的重要毒力因子。SAP 参与入侵宿主细胞、破坏宿主免疫系统、裂解各种免疫因子的过程, 进而损害宿主免疫应激反应、抵御抗菌药物^[6]。因此, 抑制真菌 SAP, 可有效降低真菌的致病能力。而靶向真菌毒力因子 SAP, 有可能成为抗真菌药物研发的新策略。目前, 研究人员已发现 SAP 家族的 10 个成员 (SAP1~10)^[7], 分子质量介于 35~50 kDa 之间, 在宿主不同部位、不同感染阶段具有差异性的表达^[8]。其中, SAP2 与抑制剂的晶体三维结构复合物已被测定, 是 SAP 家族中最有潜力的药物靶点^[9,10]。目前, 关于 SAP 抑制剂的研究仍处于起步阶段, 还没有进入临床研究的候选药物。

早期的 SAP2 抑制剂主要是天然的肽类和拟肽类, 因其活性、选择性或体内代谢性质不佳等缺点没有新药研发的价值。课题组前期通过虚拟筛选和结构优化发现了一类非肽类噻唑酮小分子 SAP2 抑制剂, 为小分子 SAP2 抑制剂的研究开辟了新的方向^[7]。本研究基于前期通过虚拟筛选和抑酶活性测试发现的三嗪类 SAP2 抑制剂 **A12** ($IC_{50} = 77.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行合理设计和结构优化, 设计并合成了 27 个新型三嗪类衍生物, 并对其进行抑酶活性测试和探讨构效关系。获得了 3 个高活性的化合物 **8a~8c**, 并对其进行毒力因子相关的活性研究和体内活性评价 (图 1)。

以 2,4,6-三氯-1,3,5-三嗪 (**1**) 为起始原料, 与取代的苯胺或苄胺在丙酮中反应得到单取代的产物 **2a~2j**。弱碱性条件下与咪喃-2-基甲胺进一步反应, 得到二取代的中间体 **3a~3j**。与过量的脲反应得到中间体 **4a~4j**, 中间体 **4a~4j** 与各种醛反应获得目标化合物 **5a~5x** (合成路线 1)。中间体 **4j** 与含有单酯或二酯侧

链的各种醛反应, 碱性条件下酯基水解, 得到具有羧酸侧链的目标化合物 **8a~8c** (合成路线 2)。所有目标化合物经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 ESI-MS 确证其结构, 数据见实验部分。

结果与讨论

1 三嗪类 SAP2 抑制剂的构效关系

三嗪类化合物 **A12** 是一个活性中等的 SAP2 抑制剂 ($IC_{50} = 77.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其构效关系初步探索结果如下: ① 在 C4 侧链的苯基上引入了卤素、烷基、NO₂ 和 SO₂NH₂ 等取代基。SAP2 抑制活性测试结果表明, 甲氧基取代时活性最优, 乙氧基取代活性略有下降; 吸电子基团取代后活性降低明显, 在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下抑制率低于 50%; 当苯基被苄基取代时, 同样活性下降明显, 在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下抑制率为 36%。② 将 C6 位侧链中的 1-萘基用 2-萘基、2-喹啉基、苯基或吡啶基取代后均导致活性显著降低。③ 在 C4 位苄基取代和 C6 位 2-喹啉基取代的化合物 **5t** 对 SAP2 的抑制活性有所保持 (IC_{50} 值为 41.67 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 2, 表 1)。

2 基于三嗪类 SAP2 抑制剂作用模式的合理结构优化

分析先导化合物 **A12** 与靶酶之间的结合模式, C6 侧链位于 S2 口袋中, 萘基与 Ala303 和 Ile305 形成疏水相互作用, 与 Tyr225 形成 $\pi-\pi$ 相互作用 (图 3A)。

为了与 S2/S3 口袋形成氢键相互作用, 设计并合成了带有单或双羧基侧链的苯基来取代萘基 (**8a~8c**)。上述化合物 (**8a~8c**) 的抑酶活性显著提高, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下抑制率均为 100%, IC_{50} 分别为 17.27、16.32 和 9.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 验证了设计策略的合理性。构效关系分析表明, 二羧基取代的化合物 (**8b**、**8c**) 活性优于单羧

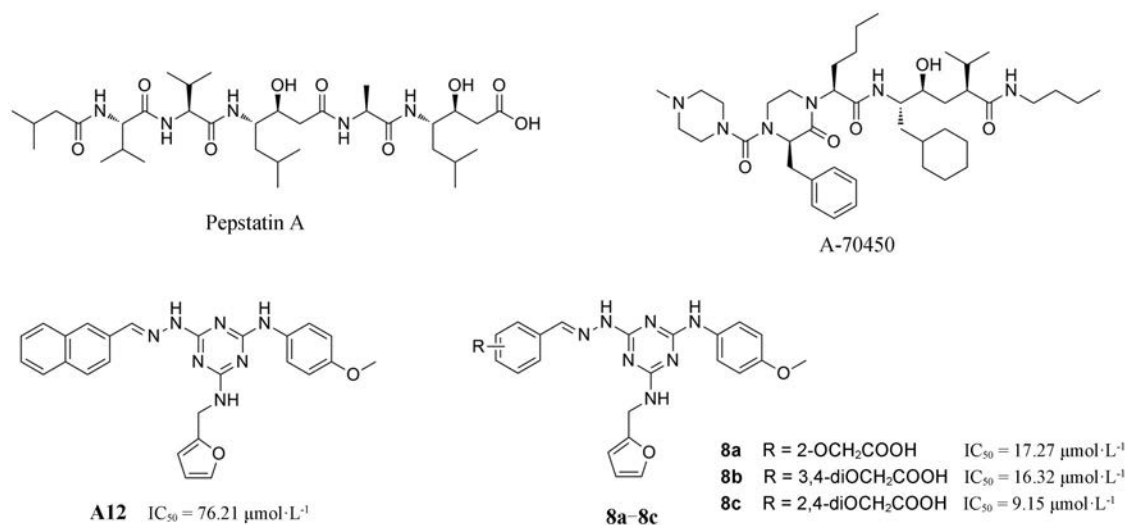
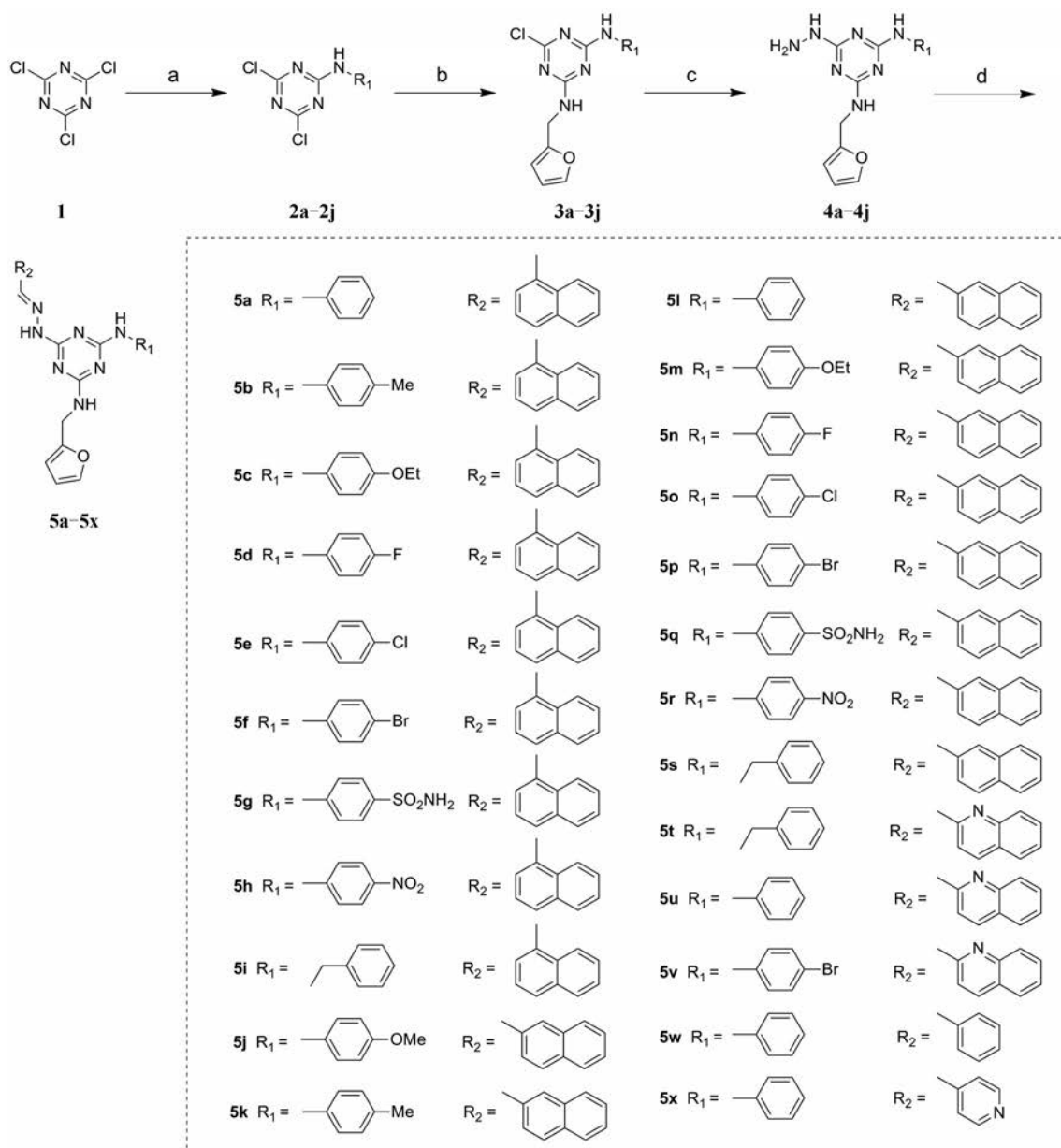


Figure 1 Chemical structures of peptidic secreted aspartyl proteinase 2 (SAP2) inhibitors and novel triazine SAP2 inhibitors



Scheme 1 Synthetic route of target compounds **5a-5x**. Reagents and conditions: (a) Substituted aniline or benzylamine, acetone, 0 °C, 4 h, 63%–92%; (b) Furan-2-ylmethanamine, THF, 5% aqueous Na₂CO₃, rt, 12 h, 81%–95%; (c) CH₂Cl₂, reflux, 12 h, 63%–90%; (d) Various aldehyde, toluene, reflux, 3 h, 40%–82%

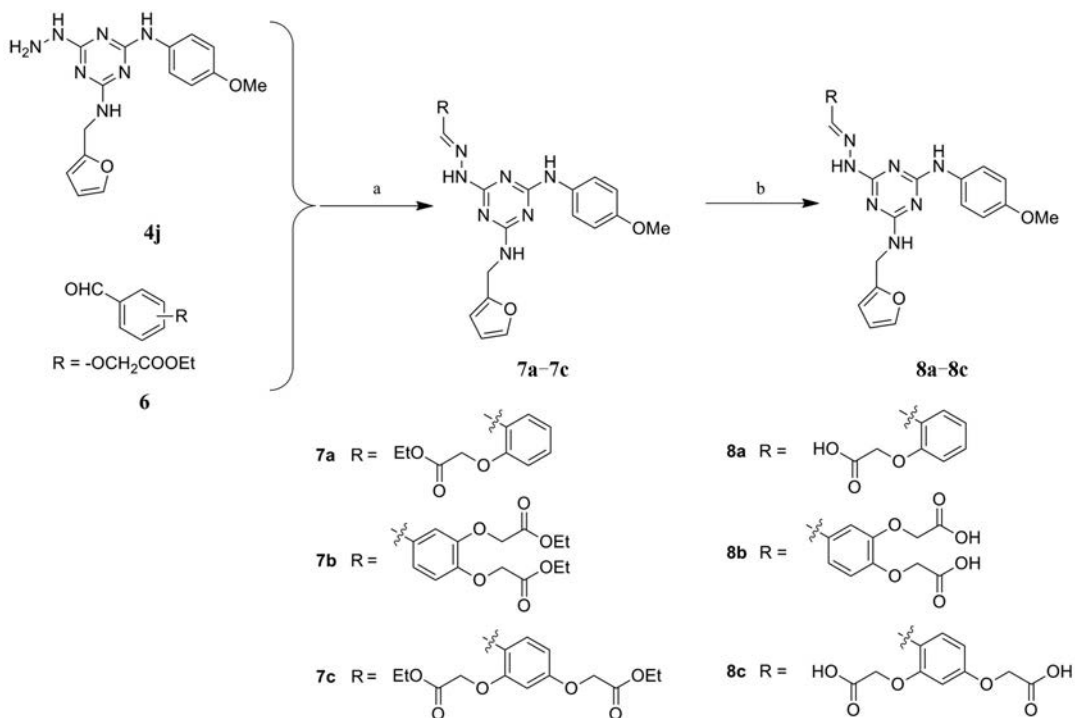
取代的化合物 (**8a**)。而2,4-位取代 (**8c**) 活性优于3,4-位取代 (**8b**)。酯基取代类似物 (**7a~7c**) 对SAP2无抑制活性, 进一步证实了羧基的重要性 (图2, 表1)。

化合物 **8c** 与SAP2的对接结果显示, **8c** 与SAP2活性位点的结合模式与先导化合物 **A12** 相似。化合物 **8c** 的1,3,5-三嗪基团位于S1、S2、S1'和S2'口袋的中央位置, C4侧链通过与Tyr84的芳香 π - π 相互作用而定位于S1口袋。此外, C4胺基与催化残基Asp32形成氢键。C2侧链位于S2'的口袋中, 该口袋与Ile82形成疏水相互作用, 与Gly34形成氢键相互作用。C6侧链的末端苯基与S2口袋中的Ile305形成疏水相互作用。值得注意

的是, 两个羧基分别与Gly220、Thr221和Tyr225形成了3个氢键, 对提高SAP2抑制活性具有重要作用 (图3B)。

3 线虫真菌感染模型活性研究

SAP2是真菌的毒力因子, 在真菌侵入宿主和致病过程中发挥重要作用。抑制SAP2不影响真菌细胞的生长繁殖。在体外抗真菌活性实验中, 化合物 **A12**、**8a~8c** 均无活性 (MIC > 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 这与SAP2的作用机制一致。因此, 本研究采用念珠菌感染的秀丽隐杆线虫体内模型来评估SAP2抑制剂的抗真菌活性。结果显示, 化合物 **8a**、**8c** 均显示出优秀的体内抗真菌



Scheme 2 Synthesis of **8a–8c**. Reagents and conditions: (a) Various aldehyde, toluene, reflux, 6 h, 66%–78%; (b) LiOH, THF–MeOH–H₂O = 3:2:1, rt, 1 h, 43%–59%

活性: 在 16 μg·mL⁻¹ 浓度下, 线虫的生存率与对照药氟康唑组 (32 μg·mL⁻¹) 相当 (图4)。

4 菌丝生长抑制作用

菌丝作为白念珠菌的重要毒力因子, 使真菌细胞更具有黏附和侵袭宿主的能力, 并有助于逃脱宿主免

疫系统的攻击^[11]。如果能有效抑制白念珠菌菌丝的形成, 则可控制其感染能力。将化合物 **8a**、**8b** 作用于白念珠菌敏感菌 *C. alb.* 5314 菌丝生成阶段, 考察化合物对菌丝生成的抑制作用。测试结果显示, 化合物 **8a**、**8b** 在高浓度下均不能抑制菌丝的生长, 而相同浓度的

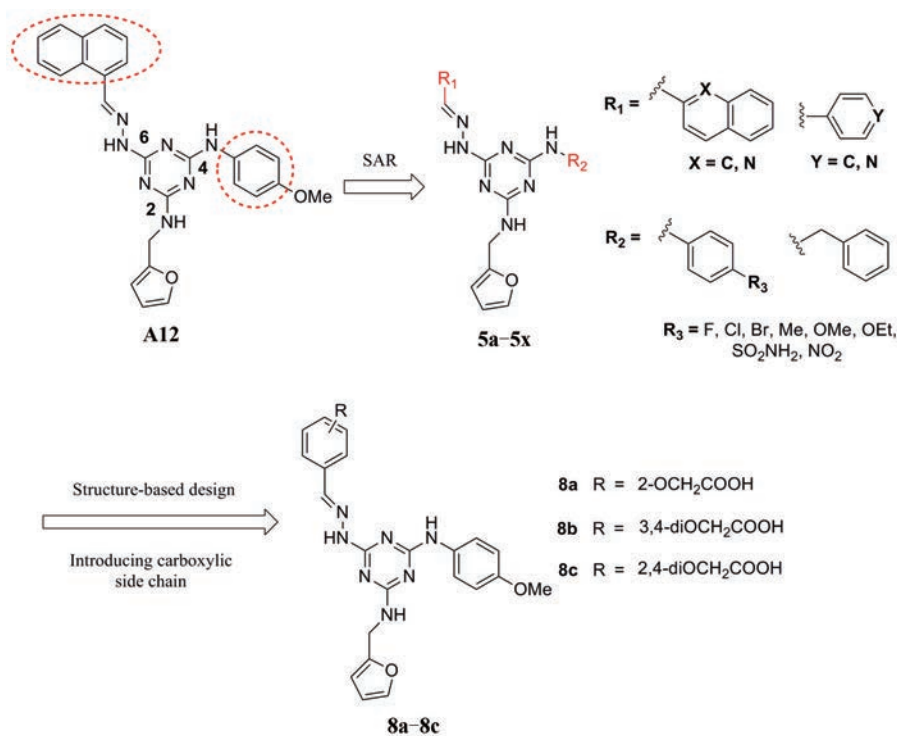


Figure 2 Design rationale of the triazine SAP2 inhibitors

Table 1 SAP2 inhibitory activity of the thiazolidinone inhibitors. nd = Not determined

Compd.	R ₁	R ₂	Inhibition (100 μmol·L ⁻¹)	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
5a			46%	nd
5b			48%	nd
5c			52%	87.84
5d			31%	nd
5e			29%	nd
5f			21%	nd
5g			42%	nd
5h			12%	nd
5i			36%	nd
5j			21%	nd
5k			30%	nd
5l			23%	nd
5m			39%	nd
5n			30%	nd
5o			22%	nd
5p			25%	nd
5q			35%	nd
5r			14%	nd
5s			45%	nd
5t			68%	41.67
5u			43%	nd
5v			40%	nd
5w			9%	nd
5x			14%	nd
7a			27%	nd
7b			33%	nd
7c			30%	nd
8a			100%	17.27
8b			100%	16.32
8c			100%	9.15
A12			54%	76.21
PepA	—	—	100%	0.019

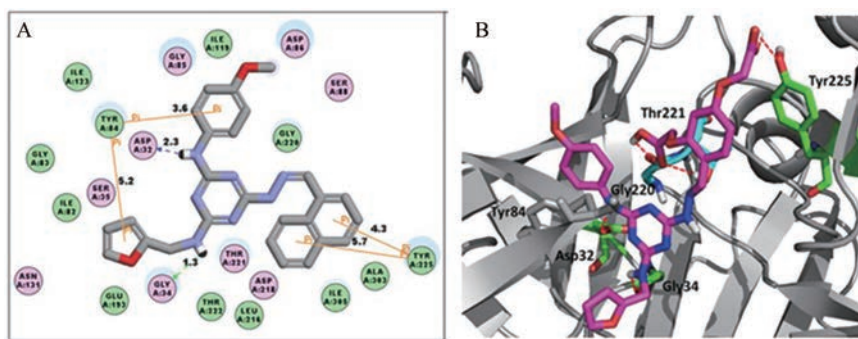


Figure 3 Binding modes of the triazine SAP2 inhibitors. (A) Schematic representation of the proposed interactions between lead compound **A12** and *C. albicans* SAP2; (B) Proposed binding pose of inhibitor **8c** in the active site of SAP2. The inhibitors are shown in the stick format and hydrogen bonds are shown in dotted red lines. The figures are generated using PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>)

氟康唑可以抑制部分真菌细胞的菌丝生成。该结果表明, SAP2 抑制剂对于菌丝生成没有明显抑制作用(图5)。

5 真菌生物被膜抑制作用

生物被膜是真菌感染的重要致病因素。真菌的耐药程度与生物膜的形成有关,生物膜越成熟,真菌的耐药性就越强^[12,13]。将化合物 **8a**、**8b** 作用于白念珠菌敏感菌 *C. alb.* 5314 和白念珠菌耐药菌 *C. alb.* 103 的被膜生成阶段,考察目标化合物对被膜形成的抑制作用。测试结果表明,对于白念珠菌敏感菌 5314,化合物 **8a**

在 $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下,被膜形成抑制率超过 70%;化合物 **8b** 在 $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时被膜形成抑制率为 70%,与阳性对照药氟康唑相当(图 6A)。对于白念珠菌耐药菌 103,化合物 **8a**、**8b** 在 $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下,被膜形成抑制率为 60%,优于同浓度氟康唑的活性(图 6B)。

将化合物 **8a**、**8b** 作用于白念珠菌耐药菌 *C. alb.* 103 已形成的成熟被膜,测定化合物对成熟被膜的破坏作用。结果显示,阳性对照药氟康唑在 $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下,成熟被膜破坏率仅为 10%;化合物 **8a** 在 $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能够破坏 40% 已形成的成熟被膜;化合物 **8b** 在 $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能够破坏 50% 已形成的成熟被膜,活性明显优于对照药氟康唑(图 6C)。

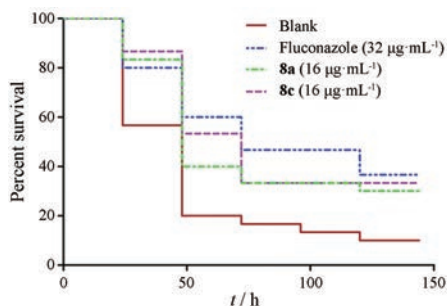


Figure 4 Kaplan-Meier survival curves of *C. elegans* with candidiasis treated with compounds **8a**, **8c** and fluconazole

6 小结

综上所述,本研究基于前期发现的新型三嗪类 SAP2 小分子抑制剂,对其进行结构优化和构效关系研究。通过基于结构的合理设计,显著提高了先导化合物对 SAP2 的抑制活性。通过分子对接验证了结合模式和药物设计策略。特别是化合物 **8a** 和 **8c**,显示出优秀的抗生物被膜和体内抗真菌治疗效果,是具有研究前景的新型抗真菌化合物。本研究为小分子 SAP2 抑制剂的进一步探索及其结构优化研究提供了新的思路。

实验部分

核磁共振仪为 Bruker 300 型、400 型、500 型和 600 型, TMS 为内标, CDCl_3 或 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂。在 API-3000LC-MS 型质谱仪上完成 ESI 质谱。Biotage 快速制备色谱(香港环球分析测试仪器有限公司)。显微熔点测定仪 XT4A(温控型,北京市科仪电光仪器厂)。TLC 分析在硅胶板上进行(GF254,中国青岛海洋化学)。硅胶柱色谱硅胶(60 G,中国青岛海洋化学)。商品化溶剂皆为市售分析纯或化学纯。

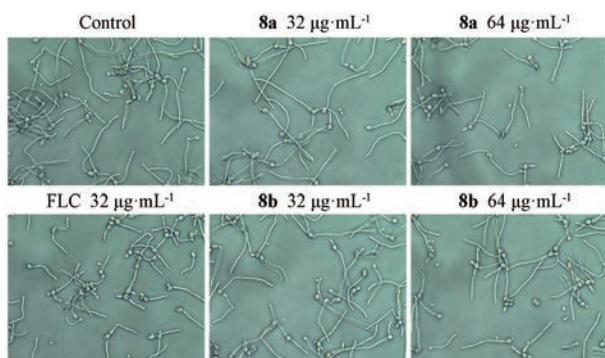


Figure 5 Inhibitory effect of compounds **8a**, **8b** and fluconazole (FLC) on hyphae of *C. albicans*

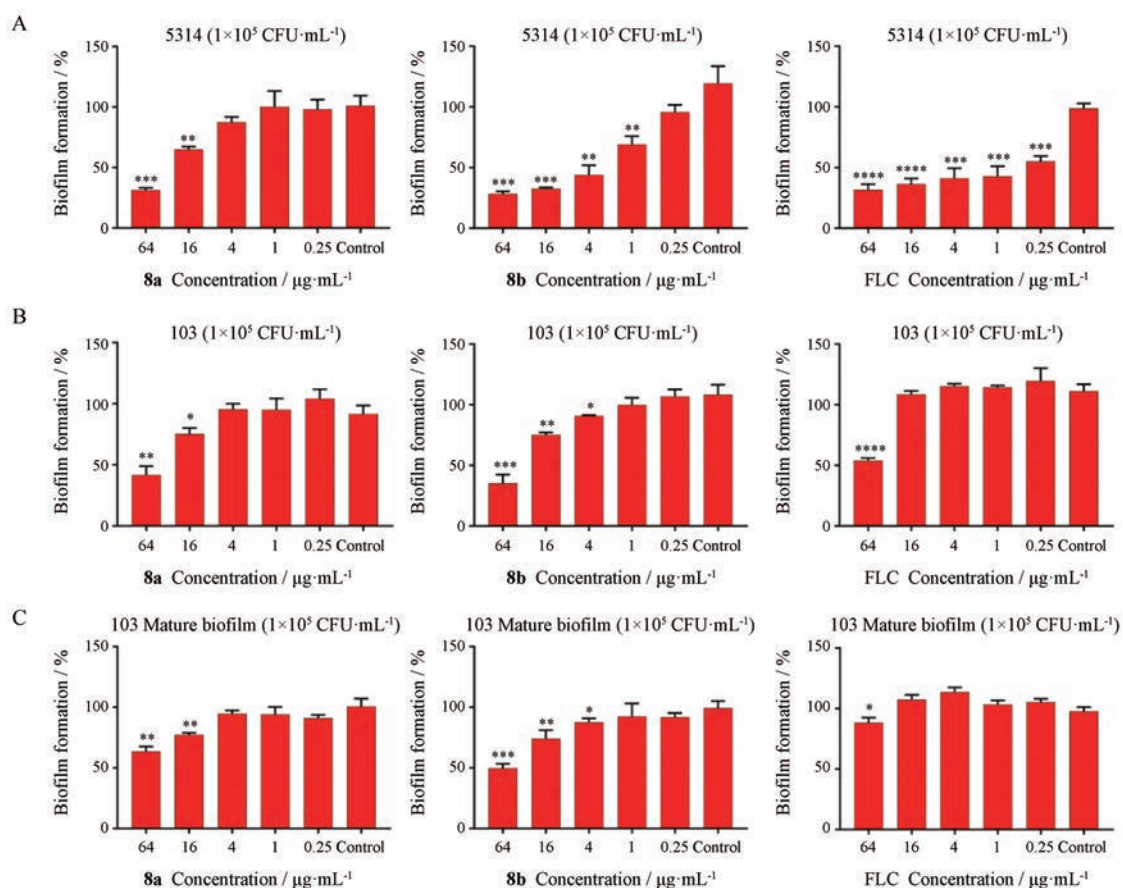


Figure 6 (A) Inhibitory effect of compounds **8a**, **8b** and FLC on *C. alb.* 5314 biofilm formation. (B) Inhibitory effect of compounds **8a**, **8b** and FLC on *C. alb.* 103 biofilm formation. (C) Destructive effect of compounds **8a**, **8b** and FLC on *C. alb.* 103 mature biofilm

1 化合物合成

1.1 4,6-二氯-N-苄基-1,3,5-三嗪-2-胺 (2a) 的合成 将2,4,6-三氯-1,3,5-三嗪 (**1**) (9.22 g, 50 mmol, 1 equiv) 溶解于30 mL丙酮中, 冰浴搅拌至0 °C。缓缓滴加溶有苄胺 (4.66 g, 50 mmol, 1 equiv) 丙酮溶液20 mL。在冰浴下继续搅拌反应2 h, 之后室温反应2 h。反应结束后, 加入冰水20 mL。待固体析出完全后, 抽滤, 得到白色固体10.85 g, 收率: 90%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.12 (s, 1H, NH), 7.69 (d, 2H, *J* = 2.36, 7.95 Hz), 7.36 (d, 2H, *J* = 8.35 Hz), 7.16 (t, 1H, *J* = 7.40 Hz); ESI-MS (*m/z*): 239.24 [M-1]。

化合物**2b**~**2j**的制备方法与化合物**2a**相同。部分中间体化合物质谱确证后直接进行下一步反应。

4,6-二氯-N-(4-甲苯基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2b**), 白色固体, 收率: 92%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.06 (s, 1H, NH), 7.45 (dd, 2H, *J* = 2.36, 8.71 Hz), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.32 Hz), 2.26 (s, 3H); ESI-MS (*m/z*): 255.39 [M+1]。

4,6-二氯-N-(4-乙氧苯基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2c**), 白色固体, 收率: 65%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ :

10.97 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 2H, *J* = 9.02 Hz), 7.17 (dd, 2H, *J* = 2.18, 6.90 Hz), 4.01 (dd, 2H, *J* = 6.97, 13.94 Hz), 1.32 (t, 3H, *J* = 6.97 Hz); ESI-MS (*m/z*): 285.46 [M+1]。

4,6-二氯-N-(4-磺酰胺苯基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2g**), 白色固体, 收率: 82%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.90 (s, 1H, NH), 7.71~7.85 (m, 4H), 7.69 (s, 2H, NH₂); ESI-MS (*m/z*): 318.20 [M-1]。

4,6-二氯-N-苄基-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2i**), 白色固体, 收率: 78%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.07 (s, 1H, NH), 7.34 (d, 2H, *J* = 6.80 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 6.80 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 4.54 (s, 2H); ESI-MS (*m/z*): 253.05 [M-1]。

4,6-二氯-N-(4-甲氧苯基)-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2j**), 白色固体, 收率: 88%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.96 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 2H, *J* = 9.07 Hz), 7.17 (dd, 2H, *J* = 2.25, 6.85 Hz), 3.74 (s, 3H); ESI-MS (*m/z*): 269.19 [M-1]。

1.2 6-氯-N²-(呋喃-2-基甲基)-N⁴-苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (3a) 的合成 将4,6-二氯-N-苄基-1,3,5-三嗪-2-胺 (**2a**) (2.41 g, 10 mmol, 1 equiv) 溶解于30 mL四氢呋喃

中,加入2-呋喃甲胺(0.92 mL, 10 mmol, 1 equiv)及5%的Na₂CO₃溶液30 mL,室温搅拌反应12 h,过滤反应析出固体,水洗2~5次,得到白色固体2.81 g,收率:93%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.07 (br s, 1H, NH), 8.59 (br s, 1H, NH), 7.49~7.81 (m, 3H), 7.19~7.38 (m, 2H), 7.02 (t, 1H, *J* = 7.18 Hz), 6.31~6.48 (m, 1H), 6.15~6.30 (m, 1H), 4.48 (d, 2H, *J* = 5.05 Hz); ESI-MS (*m/z*): 302.49 [M+1]。

化合物**3b**~**3j**的制备方法与化合物**3a**相同。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-甲基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3b**),白色固体,收率:95%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.05 (br s, 1H, NH), 8.60 (br s, 1H, NH), 7.37~7.67 (m, 3H), 7.08 (d, 2H, *J* = 8.32 Hz), 6.33~6.43 (m, 1H), 6.17~6.31 (m, 1H), 4.45 (d, 2H, *J* = 5.68 Hz), 2.23 (s, 3H); ESI-MS (*m/z*): 316.36 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-乙氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3c**),白色固体,收率:81%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.96 (br s, 1H, NH), 8.54 (br s, 1H, NH), 7.31~7.71 (m, 3H), 6.87 (d, 2H, *J* = 9.06 Hz), 6.35~6.45 (m, 1H), 6.20~6.33 (m, 1H), 4.46 (d, 2H, *J* = 5.86 Hz), 3.99 (dd, 2H, *J* = 6.96, 13.92 Hz), 1.31 (t, 3H, *J* = 6.87 Hz); ESI-MS (*m/z*): 346.47 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-氟苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3d**),白色固体,收率:89%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.08 (br s, 1H, NH), 8.61 (br s, 1H, NH), 7.54~7.90 (m, 3H), 7.06~7.20 (m, 2H), 6.35~6.46 (m, 1H), 6.17~6.32 (m, 1H), 4.49 (s, 2H); ESI-MS (*m/z*): 320.37 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-氯苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3e**),白色固体,收率:83%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.23 (br s, 1H, NH), 8.89 (br s, 1H, NH), 7.52~7.87 (m, 3H), 7.24~7.43 (m, 2H), 6.34~6.43 (m, 1H), 6.20~6.31 (m, 1H), 4.47 (d, 2H, *J* = 5.46 Hz); ESI-MS (*m/z*): 336.48 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-溴苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3f**),白色固体,收率:92%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.16 (br s, 1H, NH), 8.89 (br s, 1H, NH), 7.53~7.83 (m, 3H), 7.35~7.51 (m, 2H), 6.33~6.42 (m, 1H), 6.19~6.31 (m, 1H), 4.47 (s, 2H); ESI-MS (*m/z*): 382.29 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-磺酰胺苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3g**),白色固体,收率:81%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.45 (br s, 1H, NH), 8.76 (br s, 1H, NH), 7.65~8.07 (m, 4H), 7.59 (s, 1H), 7.24 (s, 2H, NH₂), 6.35~6.66 (m, 1H), 6.22~6.33 (m, 1H), 4.50 (d,

2H, *J* = 5.37 Hz); ESI-MS (*m/z*): 381.33 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-硝基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3h**),白色固体,收率:86%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.73 (br s, 1H, NH), 8.84 (br s, 1H, NH), 8.13~8.26 (m, 2H), 7.91~8.08 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 6.38~6.44 (m, 1H), 6.30~6.36 (m, 1H), 4.55 (d, 2H, *J* = 5.74 Hz); ESI-MS (*m/z*): 347.31 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3i**),白色固体,收率:89%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.44 (br s, 1H, NH), 8.07~8.47 (m, 1H, NH), 7.55 (d, 2H, *J* = 13.76 Hz), 8.36~8.19 (m, 4H), 6.22~6.42 (m, 1H), 6.09~6.12 (m, 1H), 4.36~4.50 (m, 4H); ESI-MS (*m/z*): 316.36 [M+1]。

6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-(4-甲氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3j**),白色固体,收率:86%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.94 (br s, 1H, NH), 8.52 (br s, 1H, NH), 7.38~7.74 (m, 3H), 6.87 (d, 2H, *J* = 9.04 Hz), 6.32~6.43 (m, 1H), 6.18~6.31 (m, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.71 (s, 3H); ESI-MS (*m/z*): 332.46 [M+1]。

1.3 *N*²-(呋喃-2-基甲基)-6-胍基-*N*⁴-苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(4a**)的合成** 将6-氯-*N*²-(呋喃-2-基甲基)-*N*⁴-苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**3a**) (1.51 g, 5 mmol, 1 equiv)溶解于50 mL二氯甲烷中,加胍(0.64 mL, 20 mmol, 4 equiv)回流搅拌反应12 h。反应结束后,分别用水50 mL、饱和NaCl溶液50 mL×2洗涤,无水硫酸钠干燥,溶液加入石油醚100 mL,过滤析出固体,得到白色固体0.99 g,收率:67%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (br s, 1H, NH), 7.92 (br s, 1H, NH), 7.46~7.83 (m, 3H), 7.24~7.44 (br s, 2H, NHNH₂), 7.19 (t, 2H, *J* = 7.92 Hz), 6.88 (t, 1H, *J* = 7.07 Hz), 6.30~6.44 (m, 1H), 6.12~6.29 (m, 1H), 4.46 (d, 2H, *J* = 5.21 Hz), 4.21 (br s, 1H, NHNH₂); ESI-MS (*m/z*): 298.33 [M+1]。

化合物**4b**~**4j**的制备方法与化合物**4a**相同。

*N*²-(呋喃-2-基甲基)-6-胍基-*N*⁴-(4-甲基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**4b**),白色固体,收率:65%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.95 (br s, 1H, NH), 7.91 (br s, 1H, NH), 7.48~7.72 (m, 3H), 7.27 (br s, 1H, NHNH₂), 7.00 (d, 2H, *J* = 8.34 Hz), 6.32~6.40 (m, 1H), 6.15~6.30 (m, 1H), 4.45 (d, 2H, *J* = 5.07 Hz), 4.14 (s, 2H, NHNH₂), 2.20 (s, 3H); ESI-MS (*m/z*): 312.51 [M+1]。

*N*²-(呋喃-2-基甲基)-6-胍基-*N*⁴-(4-乙氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺(**4c**),白色固体,收率:85%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.86 (br s, 1H, NH), 7.88 (br s, 1H, NH), 7.47~7.71 (m, 3H), 7.22 (br s, 2H, NHNH₂), 6.78 (d, 2H, *J* = 8.32 Hz), 6.34~6.39 (m, 1H), 6.16~

6.29 (m, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.22 (br s, 1H, NHNH_2), 3.96 (dd, 2H, $J = 6.91, 13.82$ Hz), 1.29 (t, 3H, $J = 6.91$ Hz); ESI-MS (m/z): 342.52 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -(4-氟苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4d**), 白色固体, 收率: 66%。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.09 (br s, 1H, NH), 8.01 (br s, 1H, NH), 7.50~7.86 (m, 3H), 7.30 (br s, 2H, NHNH_2), 6.78 (d, 2H, $J = 8.56$ Hz), 6.35~6.40 (m, 1H), 6.17~6.32 (m, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.23 (br s, 1H, NHNH_2); ESI-MS (m/z): 316.29 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -(4-氯苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4e**), 白色固体, 收率: 63%。 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.21 (br s, 1H, NH), 8.05 (br s, 1H, NH), 7.50~7.89 (m, 3H), 7.32 (br s, 2H, NHNH_2), 7.22 (d, 2H, $J = 8.76$ Hz), 6.31~6.41 (m, 1H), 6.13~6.30 (m, 1H), 4.44 (d, 2H, $J = 4.88$ Hz), 4.19 (br s, 1H, NHNH_2); ESI-MS (m/z): 332.37 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -(4-溴苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4f**), 白色固体, 收率: 84%。 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.22 (br s, 1H, NH), 8.02 (br s, 1H, NH), 7.51~7.86 (m, 3H), 7.35 (d, 2H, $J = 8.61$ Hz), 7.19 (br s, 2H, NHNH_2), 6.31~6.40 (m, 1H), 6.15~6.30 (m, 1H), 4.44 (d, 2H, $J = 5.17$ Hz), 4.20 (br s, 1H, NHNH_2); ESI-MS (m/z): 376.47 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -(4-磺胺基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4g**), 白色固体, 收率: 89%。 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.46 (br s, 1H, NH), 8.16 (br s, 1H, NH), 7.83~8.02 (m, 2H), 7.63 (d, 2H, $J = 8.87$ Hz), 7.54 (s, 1H), 7.44 (br s, 1H, NHNH_2), 6.45~7.29 (br s, 4H, NHNH_2 , NH_2), 6.34~6.40 (m, 1H), 6.17~6.32 (m, 1H), 4.46 (d, 2H, $J = 4.10$ Hz); ESI-MS (m/z): 377.27 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -(4-硝基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4h**), 白色固体, 收率: 75%。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.83 (br s, 1H, NH), 8.25 (br s, 1H, NH), 7.96~8.21 (m, 4H), 7.57 (s, 1H), 7.20 (br s, 2H, NHNH_2), 6.39 (s, 1H), 6.22~6.35 (m, 1H), 4.50 (d, 2H, $J = 5.17$ Hz), 4.34 (br s, 1H, NHNH_2); ESI-MS (m/z): 343.34 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4i**), 白色固体, 收率: 90%。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.14~8.49 (m, 1H, NH), 7.45~7.46 (m, 1H, NH), 7.16~7.36 (m, 5H), 7.11 (br s, 1H, NHNH_2), 7.20 (br s, 2H, NHNH_2), 6.36~6.42 (m, 1H), 5.99~6.26 (m, 1H), 4.34~4.51 (m, 4H), 4.27 (br s, 1H, NHNH_2);

ESI-MS (m/z): 312.23 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -(4-甲氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4j**), 白色固体, 收率: 71%。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.87 (br s, 1H, NH), 7.84 (br s, 1H, NH), 7.49~7.71 (m, 3H), 7.20 (br s, 2H, NHNH_2), 6.78 (d, 2H, $J = 8.93$ Hz), 6.33~6.38 (m, 1H), 6.15~6.29 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.16 (br s, 1H, NHNH_2), 3.69 (s, 3H); ESI-MS (m/z): 328.30 [M+1]。

1.4 N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基亚甲基)胍基]- N^4 -苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (5a**) 的合成** 将 N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-胍基- N^4 -苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**4a**) (0.30 g, 0.1 mmol, 1 equiv) 溶解于 25 mL 甲苯中, 加入 1-萘甲醛 (0.64 mL, 20 mmol, 4 equiv), 利用酯水分离器回流搅拌反应 3 h。反应结束后, 减压蒸干溶剂, 加入最少量 CH_2Cl_2 溶解固体, 向溶液中滴加石油醚, 有大量固体析出, 过滤, 得到白色固体 0.28 g, 收率: 65%, mp: 144~145 $^\circ\text{C}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.94 (br s, 1H, NH), 9.31 (br s, 1H, NH), 8.46~9.06 (m, 2H), 7.95~8.12 (m, 2H), 7.43~7.94 (m, 8H), 7.26 (t, 2H, $J = 7.31$ Hz), 6.96 (t, 2H, $J = 7.01$ Hz), 6.39 (s, 1H), 6.19~6.37 (m, 1H), 4.54 (d, 2H, $J = 4.63$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 166.28, 164.68, 153.70, 142.25 (2C), 140.98, 134.06, 130.81, 130.60, 130.00, 129.17, 128.77 (2C), 127.53, 126.60, 126.00, 124.51, 122.06 (2C), 120.17 (2C), 110.95, 107.18, 106.92, 37.65; ESI-MS (m/z): 436.38 [M+1]。

化合物 **5b**~**5x** 的制备方法与化合物 **5a** 相同。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基亚甲基)胍基]- N^4 -(4-甲氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5b**), 白色固体, 收率: 73%, mp: 136~137 $^\circ\text{C}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.90 (br s, 1H, NH), 9.21 (br s, 1H, NH), 8.44~8.95 (m, 2H), 7.94~8.06 (m, 2H), 7.34~7.93 (m, 8H), 7.06 (d, 2H, $J = 7.99$ Hz), 6.39 (s, 1H), 6.20~6.36 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 2.26 (s, 3H); ESI-MS (m/z): 450.40 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基亚甲基)胍基]- N^4 -(4-乙氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5c**), 白色固体, 收率: 65%, mp: 138~140 $^\circ\text{C}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.86 (br s, 1H, NH), 9.13 (br s, 1H, NH), 8.42~8.95 (m, 2H), 7.93~8.04 (m, 2H), 7.44~7.92 (m, 8H), 6.83 (d, 2H, $J = 8.78$ Hz), 6.39 (s, 1H), 6.17~6.37 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.99 (dd, 2H, $J = 7.07, 13.99$ Hz), 1.32 (t, 1H, $J = 6.98$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 166.30, 164.66, 154.01, 153.77, 142.21 (2C), 134.06 (2C), 130.87, 130.61, 129.95, 129.16, 127.50,

126.55, 126.00, 124.52, 121.82 (3C), 114.58 (2C), 110.94, 107.14, 106.89, 63.54, 37.63, 15.23; ESI-MS (m/z): 480.39 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-氟苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5d**), 白色固体, 收率: 45%, mp: 129~130 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.94 (br s, 1H, NH), 9.36 (br s, 1H, NH), 8.47~9.05 (m, 2H), 7.72~8.12 (m, 5H), 7.42~7.71 (m, 5H), 7.09 (s, 2H), 6.40 (s, 1H), 6.19~6.37 (m, 1H), 4.52 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 454.38 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-氯苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5e**), 白色固体, 收率: 56%, mp: 125~127 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.97 (br s, 1H, NH), 9.47 (br s, 1H, NH), 8.48~9.03 (m, 2H), 7.76~8.08 (m, 5H), 7.49~7.75 (m, 5H), 7.28 (s, 2H), 6.40 (s, 1H), 6.19~6.38 (m, 1H), 4.52 (d, 2H, $J = 5.05$ Hz); ESI-MS (m/z): 470.45 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-溴苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5f**), 白色固体, 收率: 63%, mp: 123~124 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.03 (br s, 1H, NH), 9.50 (br s, 1H, NH), 8.56~9.03 (m, 2H), 7.79~8.11 (m, 5H), 7.55~7.78 (m, 5H), 7.45 (s, 2H), 6.44 (s, 1H), 6.27~6.42 (m, 1H), 4.57 (d, 2H, $J = 5.04$ Hz); ESI-MS (m/z): 514.69 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-磺胺基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5g**), 淡黄色固体, 收率: 40%, mp: 174~176 °C。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.91 (br s, 1H, NH), 9.20 (br s, 1H, NH), 8.43 (s, 1H), 7.82~8.21 (m, 5H), 7.44~7.81 (m, 6H), 7.06~7.40 (m, 3H), 6.42 (s, 1H), 6.25~6.40 (m, 1H), 4.61 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 515.35 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-硝基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5h**), 淡黄色固体, 收率: 49%, mp: 265~266 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.13 (br s, 1H, NH), 10.10 (br s, 1H, NH), 8.61~9.02 (m, 2H), 7.74~8.41 (m, 8H), 7.48~7.71 (m, 4H), 6.41 (s, 1H), 6.22~6.40 (m, 1H), 4.57 (d, 2H, $J = 5.49$ Hz); ESI-MS (m/z): 481.36 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-1-基甲烯基)胍基]- N^4 -苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5i**), 白色固体, 收率: 76%, mp: 102~103 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.78 (br s, 1H, NH), 9.32 (br s, 1H, NH), 8.51~8.92 (m, 1H), 7.10~8.09 (m, 14H), 6.38 (s, 1H), 6.05~6.35 (m, 1H), 4.33~4.76 (m, 4H); ESI-MS (m/z): 450.60 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-甲氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5j**), 白色固体, 收率: 68%, mp: 131~132 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.97 (br s, 1H, NH), 9.13 (br s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H), 7.62~8.11 (m, 8H), 7.58 (s, 1H), 7.51~7.57 (m, 2H), 6.86 (d, 2H, $J = 7.83$ Hz), 6.40 (s, 1H), 6.16~6.36 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.74 (s, 3H); ESI-MS (m/z): 466.39 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-甲基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5k**), 白色固体, 收率: 66%, mp: 136~138 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.94 (br s, 1H, NH), 9.18 (br s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H), 7.62~8.13 (m, 8H), 7.58 (s, 1H), 7.50~7.57 (m, 2H), 7.08 (d, 2H, $J = 8.14$ Hz), 6.40 (s, 1H), 6.20~6.38 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 2.27 (s, 3H); ESI-MS (m/z): 450.41 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -苯基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5l**), 白色固体, 收率: 57%, mp: 127~129 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.98 (br s, 1H, NH), 9.29 (br s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H), 7.68~8.14 (m, 8H), 7.58 (s, 1H), 7.52~7.57 (m, 2H), 7.08 (t, 2H, $J = 7.50$ Hz), 6.96 (t, 2H, $J = 7.23$ Hz), 6.40 (s, 1H), 6.21~6.37 (m, 1H), 4.53 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 436.37 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-乙氧苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5m**), 白色固体, 收率: 77%, mp: 130~132 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.89 (br s, 1H, NH), 9.10 (br s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H), 7.60~8.09 (m, 8H), 7.57 (s, 1H), 7.51~7.56 (m, 2H), 6.84 (d, 2H, $J = 8.16$ Hz), 6.39 (s, 1H), 6.18~6.37 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.00 (dd, 2H, $J = 6.63, 13.50$ Hz), 1.32 (t, 1H, $J = 6.91$ Hz); ESI-MS (m/z): 480.39 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-氟苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5n**), 白色固体, 收率: 48%, mp: 130~131 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.03 (br s, 1H, NH), 9.35 (br s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H), 7.66~8.09 (m, 8H), 7.58 (s, 1H), 7.51~7.57 (m, 2H), 7.10 (t, 2H, $J = 7.92$ Hz), 6.40 (s, 1H), 6.18~6.37 (m, 1H), 4.51 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 454.40 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-氯苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5o**), 白色固体, 收率: 63%, mp: 129~130 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.02 (br s, 1H, NH), 9.46 (br s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H), 7.61~8.12 (m, 8H), 7.59 (s, 1H), 7.51~7.58 (m,

2H), 7.43 (d, 2H, $J = 6.84$ Hz), 6.40 (s, 1H), 6.21~6.38 (m, 1H), 4.52 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 470.39 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-溴苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5p**), 白色固体, 收率: 68%, mp: 135~136 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.03 (br s, 1H, NH), 9.47 (br s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H), 7.61~8.10 (m, 8H), 7.58 (s, 1H), 7.51~7.57 (m, 2H), 7.43 (d, 2H, $J = 6.84$ Hz), 6.40 (s, 1H), 6.21~6.37 (m, 1H), 4.52 (d, 2H, $J = 5.24$ Hz); ESI-MS (m/z): 514.40 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-磺胺基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5q**), 淡黄色固体, 收率: 51%, mp: 161~163 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.08 (br s, 1H, NH), 9.71 (br s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H), 7.76~8.23 (m, 8H), 7.71 (d, 2H, $J = 8.16$ Hz), 7.59 (s, 1H), 7.51~7.58 (m, 2H), 6.41 (s, 1H), 6.19~6.39 (m, 1H), 4.55 (d, 2H, $J = 5.72$ Hz); ESI-MS (m/z): 513.28 [M-1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-硝基苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5r**), 淡黄色固体, 收率: 75%, mp: 272~274 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.15 (br s, 1H, NH), 10.10 (br s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H), 7.79~8.31 (m, 10H), 7.60 (s, 1H), 7.53~7.58 (m, 2H), 6.41 (s, 1H), 6.27~6.38 (m, 1H), 4.55 (d, 2H, $J = 5.93$ Hz); ESI-MS (m/z): 481.35 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(萘-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5s**), 白色固体, 收率: 82%, mp: 107~108 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.10 (br s, 1H, NH), 10.78 (br s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H), 7.85~8.08 (m, 5H), 7.47~7.61 (m, 3H), 7.16~7.46 (m, 6H), 6.30~6.42 (m, 1H), 6.04~6.29 (m, 1H), 4.37~4.60 (m, 4H); ESI-MS (m/z): 450.96 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(喹啉-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -苄基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5t**), 橙色固体, 收率: 43%, mp: 186~187 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.19 (br s, 1H, NH), 11.18 (br s, 1H, NH), 8.68~8.94 (m, 1H), 8.23~8.59 (m, 2H), 7.14~8.16 (m, 11H), 6.32~6.54 (m, 1H), 6.02~6.31 (m, 1H), 4.36~4.75 (m, 4H); ESI-MS (m/z): 451.63 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(喹啉-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -苯基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5u**), 橙色固体, 收率: 62%, mp: 181~182 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.37 (br s, 1H, NH), 9.38 (br s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.53~8.21 (m, 9H), 7.23 (s, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 6.22~6.37 (m, 1H), 4.55 (s, 2H);

ESI-MS (m/z): 437.78 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(喹啉-2-基甲烯基)胍基]- N^4 -(4-溴苯基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5v**), 橙色固体, 收率: 62%, mp: 169~171 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.34 (br s, 1H, NH), 9.52 (br s, 1H, NH), 8.43 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.96~8.22 (m, 3H), 7.92 (br s, 1H, NH), 7.67~7.89 (m, 3H), 7.62 (d, 1H, $J = 7.51$ Hz), 7.59 (s, 1H), 7.45 (s, 2H), 6.41 (s, 1H), 6.24~6.37 (m, 1H), 4.54 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 517.56 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(苯基甲烯基)胍基]- N^4 -苯基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5w**), 白色固体, 收率: 78%, mp: 116~117 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.85 (br s, 1H, NH), 9.27 (br s, 1H, NH), 8.16 (s, 1H), 7.62~8.04 (m, 4H), 7.57 (s, 1H), 7.54 (br s, 1H, NH), 7.44 (t, 2H, $J = 7.83$ Hz), 7.37 (t, 1H, $J = 7.16$ Hz), 7.26 (t, 2H, $J = 7.61$ Hz), 6.39 (s, 1H), 6.22~6.36 (m, 1H), 4.51 (d, 2H, $J = 5.15$ Hz); ESI-MS (m/z): 386.46 [M+1]。

N^2 -(呋喃-2-基甲基)-6-[2-(吡啶-4-基甲烯基)胍基]- N^4 -苯基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺 (**5x**), 黄色固体, 收率: 65%, mp: 231~232 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.17 (br s, 1H, NH), 9.34 (br s, 1H, NH), 8.62 (d, 2H, $J = 5.47$ Hz), 8.12 (s, 1H), 7.59~8.02 (m, 4H), 7.58 (s, 1H), 7.53 (br s, 1H, NH), 7.27 (t, 2H, $J = 7.64$ Hz), 6.96 (t, 1H, $J = 7.14$ Hz), 6.39 (s, 1H), 6.20~6.36 (m, 1H), 4.52 (s, 2H); ESI-MS (m/z): 387.30 [M+1]。

1.5 2-{2-[(2-{4-[(呋喃-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]苯氧基}乙酸乙酯 (7a) 的合成 化合物 **7a**~**7c** 的制备方法与化合物 **5a** 相同。

2-{2-[(2-{4-[(呋喃-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]苯氧基}乙酸乙酯 (**7a**), 白色固体, 收率: 72%, mp: 180~181 °C。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.94 (br s, 1H, NH), 9.10 (br s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H), 7.59~8.05 (m, 3H), 7.57 (s, 1H), 7.46 (br s, 1H, NH), 7.32 (t, 1H, $J = 7.92$ Hz), 7.05 (t, 1H, $J = 6.99$ Hz), 6.97 (d, 1H, $J = 8.86$ Hz), 6.83 (d, 2H, $J = 8.86$ Hz), 6.36~6.43 (m, 1H), 6.17~6.35 (m, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.18 (dd, 2H, $J = 7.17, 14.32$ Hz), 3.72 (s, 3H), 1.22 (t, 1H, $J = 7.17$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.08, 166.22, 164.52, 156.07, 154.73, 142.19, 138.16, 133.96, 130.66, 125.90, 124.23, 121.73 (2C), 113.94 (3C), 113.23, 110.92, 107.27, 106.82, 65.61, 61.19, 55.63, 37.63, 14.51; ESI-MS (m/z): 518.29 [M+1]。

2,2'-[4-[(2-{4-[(呋喃-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧

基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]-1,2-苯基}二(氧)]双乙酸乙酯 (**7b**), 白色固体, 收率: 78%, mp: 86~87 °C。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.74 (br s, 1H, NH), 9.09 (br s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H), 7.59~7.87 (m, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.44 (br s, 1H, NH), 7.13~7.32 (m, 2H), 6.99 (d, 1H, *J* = 8.51 Hz), 6.85 (d, 2H, *J* = 8.21 Hz), 6.36~6.41 (m, 1H), 6.17~6.35 (m, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.18 (dd, 4H, *J* = 7.16, 14.31 Hz), 3.72 (s, 3H), 6.85 (t, 6H, *J* = 7.14 Hz); HR-ESI-MS (*m/z*) [M+1]: 620.2466。

2,2'-[4-[(2-{4-[(咪唑-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]-1,3-苯基}二(氧)]双乙酸乙酯 (**7c**), 白色固体, 收率: 66%, mp: 95~97 °C。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.75 (br s, 1H, NH), 9.07 (br s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H), 7.60~8.04 (m, 3H), 7.56 (s, 1H), 7.41 (br s, 1H, NH), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.69 Hz), 6.54~6.73 (m, 2H), 6.35~6.43 (m, 1H), 6.18~6.35 (m, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.13~4.24 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 1.18~1.27 (m, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 168.97, 168.92, 166.22, 164.53, 160.03, 157.18, 154.67, 153.79, 142.16, 138.18, 134.06, 126.91, 121.65 (2C), 117.77, 113.94 (2C), 110.91, 108.07, 107.26, 106.76, 100.42, 65.70, 65.34, 61.20, 61.14, 55.62, 37.62, 14.50 (2C); ESI-MS (*m/z*): 620.32 [M+1]、HR-ESI-MS *m/z* [M+1]: 620.2469。

1.6 2-[2-[(2-{4-[(咪唑-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]苯氧基]乙酸 (8a**) 的合成** 将 2-[2-[(2-{4-[(咪唑-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]苯氧基]乙酸乙酯 (**7a**) (0.11 g, 0.22 mmol, 1 equiv) 和 LiOH·H₂O (0.014 g, 0.33 mmol, 1.5 equiv) 于 5 mL 混合溶剂 (THF-MeOH-H₂O = 3:2:1) 中, 室温搅拌反应 1 h。减压蒸干溶剂, 加入水 (20 mL), 1 mol·L⁻¹ 盐酸调节 pH 至 2.0~3.0, 有沉淀生成。过滤沉淀, 用冷水洗涤, 得到白色固体 64 mg, 收率: 59%, mp: 188~189 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) δ: 8.59 (s, 1H), 7.97 (d, 2H, *J* = 7.60 Hz), 7.43~7.71 (m, 3H), 7.28~7.42 (m, 1H), 7.15~6.93 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, *J* = 8.80 Hz), 6.41 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.77 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 170.44, 164.54, 158.85, 156.75, 155.77, 142.86, 142.42, 132.04 (2C), 126.56, 124.14 (2C), 121.59, 114.20 (3C), 113.25, 111.05, 107.67 (2C), 65.43, 55.70, 37.63; ESI-MS (*m/z*): 490.25 [M+1]。

化合物 **8b**、**8c** 的制备方法与化合物 **8a** 相同。

2,2'-[4-[(2-{4-[(咪唑-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}胍基)甲烯基]-1,2-苯基}二(氧)]双乙酸 (**8b**), 白色固体, 收率: 43%, mp: 228~229 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) δ: 8.06 (s, 1H), 7.45~7.80 (m, 3H), 7.16~7.44 (m, 2H), 6.94 (d, 1H, *J* = 8.80 Hz), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.80 Hz), 6.40 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 4.76 (s, 4H), 4.50 (s, 2H), 3.72 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 170.47, 170.39, 165.43, 163.42, 162.44, 156.39, 150.16, 142.97, 142.52, 131.60, 127.35, 122.19 (2C), 118.89, 114.28 (2C), 113.80, 111.08, 107.68 (3C), 101.03, 65.95, 65.56, 55.72, 37.66; HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd. for C₂₆H₂₆N₇O₈ [M+H]⁺ 564.183 7, Found 564.184 3。

2,2'-[4-[(2-{4-[(咪唑-2-基甲基)胺基]-6-[(4-甲氧基苯基)胺基]-1,3,5-三嗪-2-基}2胍基)甲烯基]-1,3-苯基}二(氧)]双乙酸 (**8c**), 白色固体, 收率: 48%, mp: 233~234 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) δ: 8.52 (s, 1H), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.40 Hz), 7.44~7.75 (m, 3H), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.80 Hz), 6.63 (d, 1H, *J* = 8.80 Hz), 6.58 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.20~6.41 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 3.72 (s, 3H); HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd. for C₂₆H₂₆N₇O₈ [M+H]⁺ 564.183 7, Found 564.185 5。

2 SAP2 抑酶活性实验

本研究参考文献^[14]建立 SAP2 抑酶活性测试方法, 以 PepA 作阳性对照进行多次测试, 均获得接近文献结果。

在黑色 96 孔板上每孔依次加入柠檬酸钠缓冲液 185 μL、SAP2 酶 5 μL、抑制剂 5 μL, 作三复孔, PepA 做阳性对照组, DMSO 做空白组。混匀后于 30 °C 培养 30 min。加入 18.75 μmol·L⁻¹ 底物 5 μL, 振板混匀, 使用 Biotech Synergy2 多功能酶标仪每 10 min 测定化合物荧光发光 (λ_{ex} = 340/30 nm, λ_{em} = 485/20 nm)。根据单位时间荧光发光的增加程度, 计算出每个浓度下抑制剂的抑制率%。把每个浓度的抑制率与样品浓度的 log 值进行非线性拟合, 得到活性与剂量的依赖关系, 通过 GraphPad Prism 5.0 软件直接得到 IC₅₀ 值。

3 真菌感染的线虫体内模型测试实验

真菌感染的线虫体模型实验参照 Pukkila-Worley 等^[15]的研究方法建立。

将秀丽隐杆线虫 *glp-4*、*sek-1* 于 NGM 培养基中, 以大肠杆菌饲养线虫, 15 °C 培养 5~6 天至育卵期, 离心, 弃上清液, 用 M9 缓冲液冲洗干净, 加入裂解液, 振荡后收集虫卵, 于 M9 缓冲液中孵化过夜, 得到 L1 期幼虫,

再转移到NGM培养基上25℃培养3天,得L4期成虫。

从4℃条件下的SDA板上挑取单菌落*C. alb.* SC5314于2 mL YEPD液体培养基中,30℃培养过夜,得到指数生长后期的真菌。次日,取100 μL菌液于BHI琼脂培养基上(含卡那霉素45 μg·mL⁻¹),30℃培养过夜。L4期线虫成虫用M9缓冲液冲洗干净,400~500只干净线虫置于白念珠菌落上,25℃培养4 h。用6 mL无菌的M9缓冲液仔细冲洗线虫置于15 mL锥形管中,反复冲洗4次。在12孔板中各孔加入2 mL培养基(含80% M9、20% BHI、45 μg·mL⁻¹卡那霉素),每孔放入30只线虫进行培养。待测化合物**8a**、**8c**终浓度16 μg·mL⁻¹,氟康唑为32 μg·mL⁻¹,并设立空白对照。作三复孔,加入到上述培养基中,于25℃培养,每24 h计数观察各孔线虫存活情况。

4 菌丝生长抑制实验

从-80℃冰箱中吸取10 μL *C. alb.* SC5314菌种于1 mL YEPD培养基中,混匀后于30℃摇床中培养24 h后,从中吸取10 μL至1 mL新鲜YEPD培养基中,继续培养16 h,使真菌的生长状态处于指数后期。将1 mL YEPD菌液离心,弃去上清液,加入PBS缓冲液清洗3次后,最后一次加入1 mL PBS缓冲液吹打混匀,稀释10³倍到Spider培养基中配成菌悬液。

在12孔板的第一列每孔加入上述菌悬液3 mL,剩下每孔加入菌悬液1.5 mL。在12孔板的第一列每孔分别加入2 mg·mL⁻¹ FLC的DMSO溶液、2 mg·mL⁻¹化合物**8a**的DMSO溶液、2 mg·mL⁻¹化合物**8b**的DMSO溶液和2 mg·mL⁻¹化合物**8c**的DMSO溶液各96 μL。混匀后含有FLC药物的此行倍半稀释到第二孔,剩下两孔补加DMSO溶液96 μL作空白对照;含有化合物**8a**~**8c**的3行倍半稀释到第四孔,设置4个浓度梯度,即终浓度为64~8 μg·mL⁻¹。

稀释完成后,做好标记,放置于37℃恒温恒湿箱中培养5 h后,于荧光倒置显微镜下观察菌丝形成状况并拍照。

5 被膜形成抑制实验

分别取指数生长后期的白念珠菌敏感菌株*C. alb.* 5314和白念珠菌耐药菌株*C. alb.* 103,离心,弃去上清液,加入PBS缓冲液清洗3次后,最后一次加入PBS缓冲液1 mL吹打混匀,用RPMI 1640培养液稀释成1×10⁵ CFU·mL⁻¹菌悬液。

于96孔板上B1:G11每孔加入待测菌株菌悬液100 μL,放置于37℃恒温恒湿箱中培养1.5 h(成熟被膜实验需培养24 h)后,期间在另一空白96孔板上B1:G1每孔加入RPMI 1640培养液200 μL,B2:G12每孔加入待测菌株菌悬液100 μL,B1:D1每孔加入

2 mg·mL⁻¹待测药物的DMSO溶液6.4 μL,E1:G1每孔加入2 mg·mL⁻¹ FLC的DMSO溶液6.4 μL,混匀后倍半稀释至第10列。

从37℃恒温恒湿箱中取出培养1.5 h后的96孔板,轻轻吸弃RPMI 1640培养液,用PBS缓冲液重复清洗3次,将稀释好的化合物每孔对应加入,于37℃恒温恒湿箱中培养24 h后,吸走上层药液,PBS缓冲液清洗3次,避光条件下,B1:G12每孔加入XTT/menadione溶液100 μL,37℃恒温恒湿箱中培养3 h后,每孔吸取上清液80 μL至空白96孔板,使用酶标仪于490 nm波长下测各孔OD值。与空白组比较,以OD值下降80%以上的最低药物浓度为SMIC₈₀。

作者贡献: 杨继是本文的第一作者,负责化学合成和生物活性测试;董国强是本文的第二作者,负责计算机辅助药物设计相关研究;刘娜、盛春泉是本文的通讯作者,负责实验设计和把关,并指导整个研究、稿件修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Lai CC, Tan CK, Huang YT, et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections [J]. *J Infect Chemother*, 2008, 14: 77-85.
- [2] Odds FC. Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2005, 22: 229-237.
- [3] Liu N, Tu J, Dong G, et al. Emerging new targets for the treatment of resistant fungal infections [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 5484-5511.
- [4] Brown GD, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 165rv113.
- [5] Rueping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA. Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, 18: 735-748.
- [6] Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 400-428.
- [7] Dong G, Liu Y, Wu Y, et al. Novel non-peptidic small molecule inhibitors of secreted aspartic protease 2 (SAP2) for the treatment of resistant fungal infections [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54: 13535-13538.
- [8] Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family [J]. *Microbiology*, 2001, 147: 1997-2005.
- [9] De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity [J]. *Med Mycol*, 2001, 39: 303-313.
- [10] Cutfield SM, Dodson EJ, Anderson BF, et al. The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida*

- albicans* in complexes with two inhibitors [J]. *Structure*, 1995, 3: 1261-1271.
- [11] Liu N, Zhong H, Tu J, et al. Discovery of simplified sampangine derivatives as novel fungal biofilm inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 1510-1523.
- [12] Li DD, Zhao LX, Mylonakis E, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of pterostilbene against *Candida albicans* biofilms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 2344-2355.
- [13] Jiang Z, Liu N, Hu D, et al. The discovery of novel antifungal scaffolds by structural simplification of the natural product sampangine [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51: 14648-14651.
- [14] Büchold C, Hemberger Y, Heindl C, et al. New *cis*-configured aziridine-2-carboxylates as aspartic acid protease inhibitors [J]. *ChemMedChem*, 2011, 6: 141-152.
- [15] Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, et al. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model [J]. *Eukaryot Cell*, 2009, 8: 1750-1758.