



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110002987 B

(45)授权公告日 2020.09.15

(21)申请号 201910223740.4	C07C 201/12(2006.01)
(22)申请日 2019.03.22	C07C 49/747(2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号	C07C 49/753(2006.01)
申请公布号 CN 110002987 A	C07C 225/22(2006.01)
(43)申请公布日 2019.07.12	C07C 221/00(2006.01)
(73)专利权人 南通大学	C07C 69/157(2006.01)
地址 226019 江苏省南通市崇川区啬园路9号	C07C 67/293(2006.01)
(72)发明人 凌勇 杨圣菊 张延安 刘季	C07C 255/40(2006.01)
凌长春 李洋阳 刘思群 贾启新	C07C 253/30(2006.01)
明古旭 吴红梅	A61P 35/00(2006.01)
(74)专利代理机构 南京艾普利德知识产权代理	(56)对比文件
事务所(特殊普通合伙)	CN 106673988 A,2017.05.17
32297	Olaf Cussó等.Iron Catalyzed Highly
代理人 张铂	Enantioselective Epoxidation of Cyclic
(51)Int.Cl.	Aliphatic Enones with Aqueous H ₂ O ₂ .《J.
C07C 49/683(2006.01)	Am. Chem. Soc.》.2016,第138卷
C07C 49/697(2006.01)	姚建新等.萘苒明碱对人乳腺癌MDA-MB-231
C07C 45/74(2006.01)	细胞放射增敏作用.《介入放射学杂志》.2014,第
C07C 205/45(2006.01)	23卷(第2期),
	审查员 臧丽红
	权利要求书2页 说明书11页

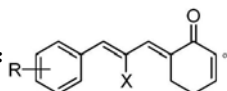
(54)发明名称 瘤效果。

苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物及制备方法和用途

(57)摘要

本发明公开了一类苯基亚烯丙基环己烯酮

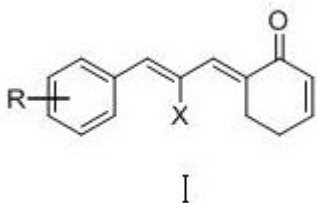
衍生物,具有通式I所示结构:



本发明结合萘苒明碱的结构特点和构效关系,将酰胺键替换为双键,同时保留活性基团,改变芳环取代基,设计了靶向肿瘤组织高表达的硫氧还蛋白还原酶(TrxR)的新型苯基亚烯丙基环己烯酮类衍生物,克服了萘苒明碱合成步骤多,需昂贵的金属催化剂的缺点,提高了该类化合物的抗肿瘤活性。研究表明,本发明所述化合物对多种肿瘤细胞增殖都具有强烈的抑制效果,并能够显著提升其肿瘤细胞内ROS水平,增强其抗肿

CN 110002987 B

1. 一类苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,具有通式I所示结构:



其中,R代表H、羟基、卤素基团、氨基、硝基、C1-C6的烷基、C1-C6的烷氧基、C1-C6的烷胺基、C1-C6的酰氧基、C1-C6的甲氧基醚类中的一种或几种;X代表H、卤素基团、CN或C1-C6的烷基。

2. 根据权利要求1所述的苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,其特征在于所述R代表H、F、Cl、Br、NO₂、OCH₃、CH₃、N(CH₃)₂、OH、O(CH₂)₂OCH₃、O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃、OAc。

3. 根据权利要求1所述的苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,其特征在于所述R在苯环的取代位置为2、3、4位中的一种或几种。

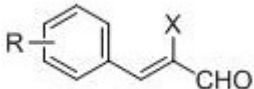
4. 根据权利要求1所述的苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,其特征在于所述R代表H、4-F、4-Cl、4-Br、2-NO₂、4-NO₂、3-OH、2-OCH₃、4-OCH₃、4-CH₃、3-CH₃、4-N(CH₃)₂、4-OH-3-OCH₃、4-OAc-3-OCH₃、3-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃,X代表H、Cl、Br、CN、CH₃。

5. 根据权利要求1所述的苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,其特征在于所述苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物选自如下:

R代表H、4-F、4-Cl、4-Br、2-NO₂、4-NO₂、3-OH、2-OCH₃、4-OCH₃、4-CH₃、3-CH₃、4-N(CH₃)₂、4-OH-3-OCH₃、4-OAc-3-OCH₃、3-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃,X代表H;

或者,R代表H,X代表Cl、Br、CN或CH₃。

6. 根据权利要求1所述苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物的制备方法,其特征在于将取代或非取代的肉桂醛与环己烯-2-酮在催化剂催化下发生Aldol缩合反应制备得到,所述取代

或非取代的肉桂醛结构式为:,R代表H、羟基、卤素基团、氨基、硝基、C1-

C6的烷基、C1-C6的烷氧基、C1-C6的烷胺基、C1-C6的酰氧基、C1-C6的甲氧基醚类中的一种或几种;X代表H、卤素基团、CN或C1-C6的烷基。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于所述催化剂选自三苯基膦和TiCl₄。

8. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于所述制备方法具体为将环己烯-2-酮和三苯基膦溶于无水二氯甲烷中,在-40至-78℃条件下加入TiCl₄的二氯甲烷溶液,缓慢滴加二氯甲烷溶解的取代或非取代的肉桂醛溶液,滴加完毕后,反应恢复到0-30℃,继续反应10-12h,加入适量10%K₂CO₃溶液使反应液的pH=8-10,得到苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物。

9. 根据权利要求1-5任一项所述苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物在制备TrxR抑制活性的药物中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于所述具有TrxR抑制活性的药物为治疗和/或预防癌症的药物。

11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在於所述癌症选自肝癌,结肠癌,胃癌,乳腺癌或宫颈癌。

苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物及制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一类苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物及制备方法以及含有这些衍生物的药用组合物以及具有TrxR抑制活性的药物医药用途,特别是在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 世界卫生组织(WHO)的报告显示,恶性肿瘤早就成为全球性的重大疾病之一,并正快速成为世界头号“杀手疾病”,严重威胁着人类健康和生命。据WHO统计,近三十年来,世界癌症发病率递增速度为年均3-5%并预计到2020年前,世界癌症发病率将比2008年增加50%,即每年将新增1500万癌症患者。不仅如此,全球癌症致死亡人数也在迅猛上升,已变成全球第一致死疾病。而且预计到2030年,全球癌症死亡病例将达到1320万。癌症已成为全球性的挑战与难题,与癌症的抗争任重而道远。

[0003] 活性氧(ROS)是分子氧被单电子还原后生成的化学性质活泼的氧代谢产物及其衍生物的总称。ROS可分为自由基类和非自由基类,其中自由基类主要包含超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($HO\cdot$)等,非自由基类ROS主要有过氧化氢(H_2O_2)、臭氧(O_3)、过硝酸盐等。在正常生理条件下,多种ROS清除体系存在于细胞内,例如超氧化物歧化酶(SOD1、SOD2、SOD3)、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽(GSH)、谷氧还蛋白、抗氧化蛋白(peroxiredoxins)和硫氧还蛋白等,能够使体内ROS的产生和消除达到动态平衡,能让细胞的各项正常功能不受影响(Trachootham D,Alexandre J,Huang P.Nature Reviews Drug Discovery,2009,8,579-591)。据报道,在多种癌细胞中ROS水平升高,例如,从慢性淋巴细胞白血病或毛细胞白血病患者血样中分离出来的白血病细胞与正常淋巴细胞相比ROS产量增加(Zhou Y,Hileman E O,Plunkett W,et al.Blood,2003,101,4098-4104)。实体肿瘤中的氧化损伤产物例如氧化DNA碱基,脂质过氧化物等水平增加。

[0004] 研究表明,细胞内ROS水平达到阈值,就会引发一系列反应而导致细胞死亡。相比于正常细胞,肿瘤细胞具有更高的ROS水平(Fruehauf J P,Meyskens F L.Clinical Cancer Research,2007,13,789-794)。诱导ROS产生或抑制抗氧化系统来增加肿瘤细胞内的ROS水平被认为是一种有效的抗肿瘤策略。2011年,Raj等发现葎萆酰胺能通过上调肿瘤细胞中的ROS,不影响正常细胞的ROS,从而达到选择性杀死肿瘤细胞的目的(Raj L,Ide T,Gurkar AU,et al.Nature 2011,475,231-234)。研究表明,葎萆酰胺经靶向调节硫氧还蛋白酶(TrxR)来调节氧化还原作用和活性氧的动态平衡,造成肿瘤细胞内的GSH水平下降,GSSG水平上升,最终导致肿瘤细胞的ROS浓度升高,使其凋亡或坏死。

[0005] 诚然目前人们已经发现葎萆酰胺具有很好的抗肿瘤活性,但其本身也存在一些缺点,限制了其临床应用。首先,葎萆酰胺的活性还不够高,具体作用机制尚未完全阐明;其次,从植物提取的葎萆酰胺原料有限,而生产所需药材资源消耗相当大;另外通过人工合成的葎萆酰胺,其制备工艺复杂,需要昂贵的金属催化剂,反应收率低。因此,有必要对葎萆酰胺进行结构衍生化和结构优化,进而筛选出靶向性强、高效低毒、易于合成的抗肿瘤的化合

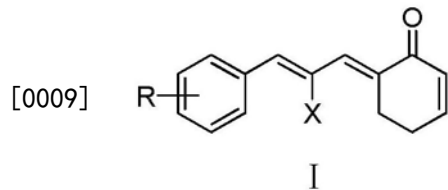
物。

发明内容

[0006] 本发明根据茛菎酰胺的结构特点兼顾生物活性,成药性,合成难易三个方面,设计合成了具有TrxR抑制活性的新型苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,保留PL活性位点C2-C3双键和C7-C8双键,不仅对多种人源肿瘤细胞及耐药肿瘤细胞均具有显著的抑制活性,而且对正常细胞损伤较小,可以选择性地杀伤肿瘤细胞。初步研究机制表明,本发明化合物可以抑制TrxR酶活性,提高肿瘤细胞ROS水平,引起肿瘤细胞膜损伤,诱导肿瘤细胞凋亡,促进发明化合物的抗肿瘤活性。

[0007] 本发明具体技术方案如下:

[0008] 一类苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物,具有通式I所示结构:



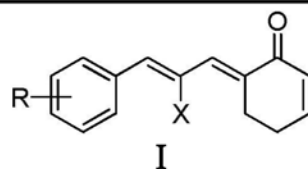
[0010] 其中,R代表苯环上一个或多个取代基,选自H、羟基、卤素基团、氨基、硝基、C1-C6的烷基、C1-C6的烷氧基、C1-C6的烷胺基、C1-C6的酰氧基、C1-C6的甲氧基醚类中的一种或几种;X代表H、卤素基团、CN或C1-C6的烷基。优选的,所述R代表H、Br、NO₂、OCH₃、F、CH₃、C1、N(CH₃)₂、OH、O(CH₂)₂OCH₃、O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃或OAc中的一种或几种。

[0011] 优选的,所述R在苯环的取代位置为2、3、4位中的一种或几种。

[0012] 优选的,所述R代表H、4-F、4-Cl、4-Br、2-NO₂、4-NO₂、3-OH、2-OCH₃、4-OCH₃、4-CH₃、3-CH₃、4-N(CH₃)₂、4-OH-3-OCH₃、4-OAc-3-OCH₃、3-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃,X代表H、Cl、Br、CN、CH₃。

[0013] 上述通式结构化合物优选结构如表1所示:

[0014] 表1通式I部分化合物代号及其对应的结构



Compd.	R	X
I ₁	H	H
I ₂	4-Br	H
I ₃	2-NO ₂	H
I ₄	4-NO ₂	H
I ₅	3-OH	H
[0015] I ₆	2-OCH ₃	H
I ₇	4-OCH ₃	H
I ₈	4-F	H
I ₉	4-CH ₃	H
I ₁₀	4-Cl	H
I ₁₁	4-N(CH ₃) ₂	H
I ₁₂	4-OH-3-OCH ₃	H
I ₁₃	3-O(CH ₂) ₂ OCH ₃	H
I ₁₄	3-OCH ₃ -4-O(CH ₂) ₂ OCH ₃	H
I ₁₅	3-OCH ₃ -4-O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	H
I ₁₆	4-OAc-3-OCH ₃	H
[0016] I ₁₇	H	Cl
I ₁₈	H	Br
I ₁₉	H	CN
I ₂₀	H	CH ₃

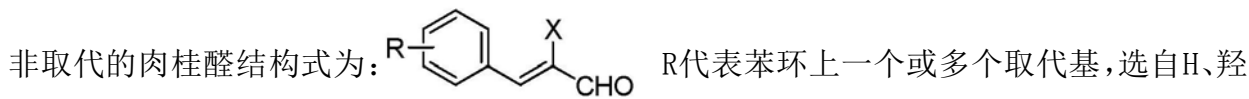
[0017] I₁: (E)-6-((E)-3-苯烯丙基)环己-2-烯酮;

[0018] I₂: (E)-6-((E)-3-(4-溴苯基)-亚烯丙基)环己-2-烯酮;

[0019] I₃: (E)-6-((E)-3-(2-硝基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;

- [0020] I₄: (E)-6-(E)-3-(4-硝基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0021] I₅: (E)-6-(E)-3-(3-羟基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0022] I₆: (E)-6-(E)-3-(2-甲氧基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0023] I₇: (E)-6-(E)-3-(4-甲氧基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0024] I₈: (E)-6-(E)-3-(4-氟苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0025] I₉: (E)-6-(E)-3-(4-甲基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0026] I₁₀: (E)-6-(E)-3-(4-氯苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0027] I₁₁: (E)-6-(E)-3-(4-二甲氨基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0028] I₁₂: (E)-6-(E)-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0029] I₁₃: (E)-6-(E)-3-(3-(2-甲氧基乙氧基)苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0030] I₁₄: (E)-6-(E)-3-(3-甲氧基-4-(2-甲氧基乙氧基)苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0031] I₁₅: (E)-6-(E)-3-(3-甲氧基-4-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0032] I₁₆: (E)-6-(E)-3-(3-甲氧基-4-乙酰基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0033] I₁₇: (E)-6-(Z)-2-氯-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0034] I₁₈: (E)-6-(Z)-2-溴-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮;
- [0035] I₁₉: (E)-6-(Z)-2-氰基-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮。
- [0036] I₂₀: (E)-6-(Z)-2-甲基-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮。

[0037] 本发明的另一目的在于提供本发明通式I所述化合物的制备方法,如下:将取代或非取代的肉桂醛与环己烯-2-酮在催化剂催化下发生Aldol缩合反应制备得到,所述取代或非取代的肉桂醛结构式为:



基、卤素基团、氨基、硝基、C₁-C₆的烷基、C₁-C₆的烷氧基、C₁-C₆的烷胺基、C₁-C₆的酰氧基、C₁-C₆的甲氧基醚类中的一种或几种;X代表H、卤素基团、CN或C₁-C₆的烷基。优选的,所述R代表H、Br、NO₂、OCH₃、F、CH₃、Cl、N(CH₃)₂、OH、O(CH₂)₂OCH₃、O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃或OAc中的一种或几种。

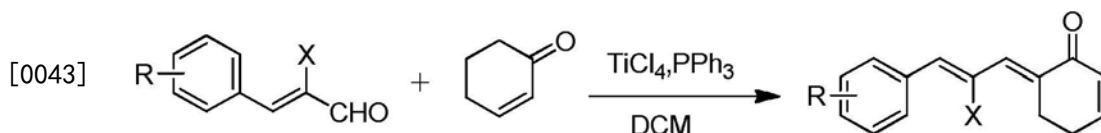
[0038] 优选的,所述R在苯环的取代位置为2、3、4位中的一种或几种。

[0039] 优选的,所述R代表H、4-F、4-Cl、4-Br、2-NO₂、4-NO₂、3-OH、2-OCH₃、4-OCH₃、4-CH₃、3-CH₃、4-N(CH₃)₂、4-OH-3-OCH₃、4-OAc-3-OCH₃、3-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂OCH₃、3-OCH₃-4-O(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₃,X代表H、Cl、Br、CN、CH₃。

[0040] 优选的,所述催化剂选自三苯基膦、TiCl₄、三甲基硅烷咪唑(TMSI)、硫酸氢镁中的一种或几种。

[0041] 一个具体的制备方法,具体为将环己烯-2-酮和三苯基膦溶于无水二氯甲烷中,在-40至-78℃条件下加入TiCl₄的二氯甲烷溶液,缓慢滴加二氯甲烷溶解的肉桂醛溶液,滴加完毕后,反应恢复到0-30℃,继续反应10-12h,加入适量10%K₂CO₃溶液使反应液的pH=8-10,反应得到苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物。

[0042] 合成路线如下所示:



[0044] 本发明的另一目的在于提供本发明所述的环己烯酮类衍生物在制备具有TrxR抑制活性的药物中的应用。所述具有TrxR抑制活性的药物成为治疗和/或预防癌症的药物,优选的,所述癌症选自肝癌,结肠癌,胃癌,乳腺癌或宫颈癌。

[0045] 本发明化合物可单独或与一种或一种以上的药学上可接受的载体组合制成制剂以供给药。比如,溶剂、稀释剂等,也可以用于口服给药剂型,如胶囊、可分散粉末、片剂、颗粒剂等。本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域中熟知的方法进行制备。这些药用制剂中可以含有与载体组合的例如0.05%~90%重量的活性成分,更常见约15%~60%之间重量的活性成分。本发明化合物剂量可以是0.005~5000mg/kg/天,也可根据疾病严重程度或剂型的不同使用剂量超出此剂量范围。

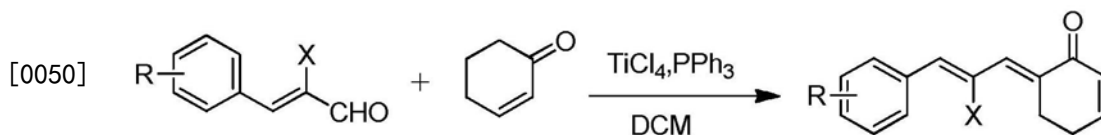
[0046] 本发明化合物可以单独自组装成纳米粒改善活性,或与其他抗肿瘤药物例如烷化剂(如环磷酰胺或苯丁酸氮芥)、抗代谢药(如5-氟尿嘧啶或羟基脲)、拓扑异构酶抑制剂(如喜树碱)、有丝分裂抑制剂(如紫杉醇或长春碱)、DNA插入剂(如阿霉素)联合自组装纳米粒提高活性,另外还可以与放射治疗联合应用。这些其他抗肿瘤药物或放射治疗可以与本发明化合物同时或在不同时间给予。这些联合治疗可以产生协同作用从而有助于改善治疗效果。

[0047] 本发明结合抗肿瘤药物萜萜酰胺的结构特点、构效关系和药效团模型,在萜萜酰胺基础上,利用生物电子等排体理论,以不同取代基的肉桂醛为原料,从而设计合成出具有TrxR抑制活性的新型苯基亚烯丙基环己烯酮类衍生物,简化其合成路线,便于大量生产,研究其对TrxR靶点和恶性肿瘤细胞的抑制作用,发现该类化合物不仅对多种肿瘤细胞(包括肝癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌等)增殖都具有强烈的和选择性的抑制效果,而且能够显著抑制TrxR酶活性,此外,本发明化合物在一定浓度下对正常细胞损伤较小,并能够诱导肿瘤细胞ROS表达,协同促使肿瘤细胞凋亡或坏死。

具体实施方式

[0048] 为了进一步阐明本发明,下面给出一系列实施例,这些实施例完全是例证性的,它们仅用来对本发明具体描述,不应当理解为对本发明的限制。

[0049] 实施例1 (E)-6-((E)-3-苯烯丙基)环己-2-烯酮(I₁)的制备



[0051] 将环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol)和三苯基膦(1.31g, 5.0mmol)溶于50ml无水二氯甲烷中,再在-50℃条件下加入5ml 1mol/L TiCl₄的二氯甲烷溶液,15min后用恒压漏斗缓慢滴加二氯甲烷溶解的肉桂醛(1.32g, 10.0mmol)溶液30ml,半小时滴加完毕后,反应恢复到室温,继续反应约12h,TLC监测,反应完全后加入适量10%K₂CO₃溶液继续搅拌约5min后,使反应液的pH=9,再用二氯甲烷(50ml×2)萃取,用饱和食盐水(50mL)清洗萃取得到的二氯甲烷层,收集二氯甲烷层,无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析纯化(EA:PE=1:3作为洗脱剂),

得到黄色固体产物0.90g, 收率为86%。I₁谱图数据为:ESI-MS (m/z): 211 [M+H]⁺; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.32 (m, 3H, Ar-H), 7.12 (m, 1H, CH), 6.96 (m, 3H, CH), 6.19 (d, 1H, J=16.8Hz, CH), 2.88 (m, 2H, CH₂), 2.44 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ 188.18, 141.07, 140.25, 135.63, 134.28, 133.77, 131.06, 131.02, 128.73, 128.57, 128.31, 127.16, 125.02, 25.45, 21.00。

[0052] (E)-6-((E)-3-(4-溴苯基)-亚烯丙基)环己-2-烯酮 (I₂) 的制备

[0053] 参照I₁的合成方法, 将4-溴-肉桂醛(2.22g, 10.0mmol) 替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol), 与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol) 反应, 得到黄色固体产物1.20g, 收率:83%。I₂谱图数据为:ESI-MS (m/z): 289 [M+H]⁺; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (CDCl₃, 400MHz) 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.34 (m, 2H, Ar-H), 7.28 (d, 1H, J=18.4Hz, CH), 7.07 (m, 1H, CH), 7.01 (m, 1H, CH), 6.87 (m, 1H, CH), 6.22 (m, 1H, CH), 2.91 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ 188.15, 149.06, 138.62, 135.62, 133.81, 131.22, 131.02, 128.51, 128.39, 123.69, 123.56, 122.65, 25.59, 25.20。

[0054] (E)-6-((E)-3-(2-硝基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮 (I₃) 的制备

[0055] 参照I₁的合成方法, 将2-硝基-肉桂醛(1.81g, 10.0mmol) 替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol), 与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol) 反应, 得到黄色固体产物1.10g, 收率:86%。I₃谱图数据为:ESI-MS (m/z): 256 [M+H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ 7.98 (m, 1H, CH), 7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.61 (m, 1H, Ar-H), 7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.42 (m, 1H, CH), 7.31 (d, 1H, J=16.8Hz, CH), 7.06 (m, 1H, CH), 7.05 (m, 1H, CH), 6.25 (m, 1H, CH), 2.93 (m, 2H, CH₂), 2.50 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ 181.98, 149.46, 161.76, 147.99, 136.11, 134.35, 133.22, 133.05, 132.35, 131.02, 128.84, 128.37, 127.69, 124.85, 25.54, 25.43。

[0056] (E)-6-((E)-3-(4-硝基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮 (I₄) 的制备

[0057] 参照I₁的合成方法, 将4-硝基-肉桂醛(1.81g, 10.0mmol) 替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol), 与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol) 反应, 得到黄色固体产物0.84g, 收率:66%。I₄谱图数据为:ESI-MS (m/z): 256 [M+H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ 8.18 (m, 2H, Ar-H), 7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.20 (m, 2H, CH), 7.03 (m, 1H, CH), 6.94 (d, 1H, J=15.7Hz, CH), 6.21 (m, 1H, CH), 2.91 (m, 2H, CH₂), 2.49 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ 187.86, 149.49, 142.91, 136.99, 136.57, 132.80, 130.98, 127.37, 127.13, 124.11, 25.56, 25.40。

[0058] (E)-6-((E)-3-(3-羟基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮 (I₅) 的制备

[0059] 参照I₁的合成方法, 将3-羟基-肉桂醛(1.48g, 10.0mmol) 替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol), 与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol) 反应, 得到黄色固体产物0.91g, 收率:80%。I₅谱图数据为:ESI-MS (m/z): 227 [M+H]⁺。

[0060] (E)-6-((E)-3-(2-甲氧基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮 (I₆) 的制备

[0061] 参照I₁的合成方法, 将2-甲氧基-肉桂醛(1.69g, 10.0mmol) 替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol), 与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol) 反应, 得到黄色固体产物0.97g, 收率:81%。I₆谱图数据为:ESI-MS (m/z): 241 [M+H]⁺; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ 7.53 (m, 1H, CH), 7.35 (m, 1H, Ar-H), 7.32 (m, 1H, CH), 7.27 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (m, 1H, CH), 7.00 (m, 1H, CH), 6.98 (m, 1H, Ar-H), 6.91 (m, 1H, Ar-H), 6.21 (d, 1H, J=18.4Hz, CH), 3.86 (s, 3H, CH₃), 2.91 (m, 2H, CH₂), 2.47 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ 188.42, 157.37, 149.14, 148.97, 135.65,

133.07, 131.16, 129.90, 127.32, 125.69, 123.80, 120.82, 111.01, 55.43, 25.43, 25.22。

[0062] (E)-6-((E)-3-(4-甲氧基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₇)的制备

[0063] 参照I₁的合成方法,将4-甲氧基-肉桂醛(1.67g, 10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol)反应,得到黄色固体产物0.98g,收率:82%。I₇谱图数据为:ESI-MS (m/z): 241 [M+H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.30 (m, 1H, CH), 7.0 (m, 1H, CH), 6.94 (m, 4H, Ar-H, CH), 6.21 (m, 1H, CH), 7.80 (m, 3H, CH₃), 2.90 (m, 2H, CH₂), 2.47 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ188.41, 160.20, 149.19, 140.22, 135.03, 132.59, 131.21, 129.50, 128.58, 121.07, 114.33, 55.51, 25.39, 18.55。

[0064] (E)-6-((E)-3-(4-氟苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₈)的制备

[0065] 参照I₁的合成方法,将4-氟-肉桂醛(1.58g, 10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol)反应,得到黄色固体产物0.95g,收率:83%。I₈谱图数据为:ESI-MS (m/z): 229 [M+H]⁺; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.28 (m, 1H, CH), 7.04 (m, 2H, Ar-H), 6.96 (m, 1H, CH), 6.94 (m, 1H, CH), 6.91 (m, 1H, CH), 6.21 (m, 1H, CH), 2.91 (m, 2H, CH₂), 2.48 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ188.18, 164.22, 161.76, 148.95, 138.85, 134.20, 132.96, 131.02, 131.25, 128.68, 122.69, 116.08, 115.60, 25.50, 25.32。

[0066] (E)-6-((E)-3-(4-甲基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₉)的制备

[0067] 参照I₁的合成方法,将4-甲基-肉桂醛(1.46g, 10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol)反应,得到黄色固体产物0.90g,收率:80%。I₉谱图数据为:ESI-MS (m/z): 225 [M+H]⁺; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.22 (m, 3H, Ar-H, CH), 7.14 (m, 2H, CH), 7.03 (d, 1H, J=15.3Hz, CH), 6.10 (m, 1H, CH), 2.92 (m, 2H, CH₂), 2.44 (m, 2H, CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃)。 ¹³C NMR (DMSO-d₆, 101MHz): δ187.63, 151.05, 140.41, 138.89, 134.34, 134.27, 134.12, 130.63, 129.77, 127.67, 123.10, 25.47, 25.24, 21.40。

[0068] (E)-6-((E)-3-(4-氯苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₀)的制备

[0069] 参照I₁的合成方法,将4-氯-肉桂醛(1.66g, 10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.06g,收率:87%。I₁₀谱图数据为:ESI-MS (m/z): 256 [M+H]⁺; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ7.68 (m, 2H, Ar-H), 7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.35 (m, 1H, CH), 7.15 (m, 3H, CH), 6.11 (m, 1H, CH), 2.94 (m, 2H, CH₂), 2.45 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ187.67, 151.32, 138.78, 135.96, 135.49, 133.55, 133.48, 130.57, 129.33, 129.23, 124.91, 25.50, 25.32。

[0070] (E)-6-((E)-3-(4-二甲氨基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₁)的制备

[0071] 参照I₁的合成方法,将4-二甲氨基-肉桂醛(1.75g, 10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g, 10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g, 5.0mmol)反应,得到红色固体产物0.97g,收率:77%。I₁₁谱图数据为:ESI-MS (m/z): 254 [M+H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ7.38 (m, 1H, CH), 7.33 (m, 2H, Ar-H), 6.97 (m, 1H, CH), 6.88 (m, 1H, CH), 6.68 (m, 2H, Ar-H), 6.19 (m, 1H, CH), 3.00 (s, 6H, CH₃), 2.89 (m, 2H, CH₂), 2.45 (m, 2H, CH₂)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 101MHz): δ188.24, 150.85, 148.49, 141.34, 135.87, 131.30, 128.55, 124.90, 118.79, 112.11, 40.26, 25.33, 25.10。

[0072] (E)-6-((E)-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₂)的制备

[0073] 参照I₁的合成方法,将4-羟基-3-甲氧基-肉桂醛(1.78g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.13g,收率:88%。I₁₂谱图数据为:ESI-MS(m/z):257[M+H]⁺; ¹H NMR(DMSO-d₆,400MHz): δ 7.30(m,1H,CH),7.01(m,3H,Ar-H),6.90(m,3H,CH),6.21(m,1H,CH),5.93(s,1H,OH),3.94(s,3H,CH₃),2.90(m,2H,CH₂),2.48(m,2H,CH₂)。 ¹³C NMR(CDCl₃,101MHz): δ 188.24,150.85,148.49,141.34,135.87,131.30,128.55,124.90,118.79,112.11,40.26,25.33,25.10。

[0074] (E)-6-((E)-3-(3-(2-甲氧基乙氧基)苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₃)的制备

[0075] 参照I₁的合成方法,将3-(2-甲氧基乙氧基)-肉桂醛(2.06g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.08g,收率:76%。I₁₃谱图数据为:ESI-MS(m/z):285[M+H]⁺。

[0076] (E)-6-((E)-3-(3-甲氧基-4-(2-甲氧基乙氧基)苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₄)的制备

[0077] 参照I₁的合成方法,将3-甲氧基-4-(2-甲氧基乙氧基)-肉桂醛(2.36g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.10g,收率:70%。I₁₄谱图数据为:ESI-MS(m/z):315[M+H]⁺。

[0078] (E)-6-((E)-3-(3-甲氧基-4-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₅)的制备

[0079] 参照I₁的合成方法,将3-甲氧基-4-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)-肉桂醛(2.80g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.27g,收率:71%。I₁₅谱图数据为:ESI-MS(m/z):359[M+H]⁺。

[0080] (E)-6-((E)-3-(3-甲氧基-4-乙酰基苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₆)的制备

[0081] 参照I₁的合成方法,将3-甲氧基-4-乙酰基-肉桂醛(2.20g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.16g,收率:78%。I₁₆谱图数据为:ESI-MS(m/z):299[M+H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃,400MHz): δ 7.23(m,1H,CH),7.03(m,1H,CH),6.96(m,4H,Ar-H,CH),6.84(d,J=15.3Hz,1H,CH),6.16(m,1H,CH),3.82(s,3H,CH₃),2.86(m,1H,CH₂),2.42(m,1H,CH₂),2.26(s,3H,CH₃)。 ¹³C NMR(CDCl₃,101MHz): δ 188.06,168.83,151.23,149.14,140.14,139.48,135.67,134.01,133.97,131.01,123.25,123.03,119.69,110.66,55.88,25.34,25.30。

[0082] (E)-6-((Z)-2-氯-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₇)的制备

[0083] 参照I₁的合成方法,将 α -氯代肉桂醛(1.66g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物0.98g,收率:80%。I₁₇谱图数据为:ESI-MS(m/z):245[M+H]⁺。

[0084] (E)-6-((Z)-2-溴-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₈)的制备

[0085] 参照I₁的合成方法,将 α -溴代肉桂醛(2.11g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物1.18g,收率:82%。I₁₈谱图数据为:ESI-MS(m/z):289[M+H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃,400MHz): δ 7.66(m,2H,Ar-H),7.36(m,3H,Ar-H),7.20(m,1H,CH),7.03(m,1H,CH),6.91(s,1H,CH),6.20(m,1H,CH),3.03(m,2H,CH₂),2.45(m,2H,CH₂)。

[0086] (E)-6-((Z)-2-氰基-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I₁₉)的制备参照I₁的合成方

法,将 α -氰基肉桂醛(1.57g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物0.75g,收率:64%。 I_{19} 谱图数据为:ESI-MS(m/z):236[M+H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃,400MHz): δ 7.38(m,7H,Ar-H),7.03(m,1H,CH),6.64(s,1H,CH),3.02(m,2H,CH₂),2.42(m,2H,CH₂)。

[0087] (E)-6-(Z)-2-甲基-3-苯基)亚烯丙基)环己-2-烯酮(I_{20})的制备

[0088] 参照 I_1 的合成方法,将 α -甲基肉桂醛(1.46g,10.0mmol)替代肉桂醛(1.32g,10.0mmol),与环己烯-2-酮(0.48g,5.0mmol)反应,得到黄色固体产物0.87g,收率:78%。 I_{20} 谱图数据为:ESI-MS(m/z):224[M+H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃,400MHz): δ 7.32(m,4H,Ar-H),7.23(m,1H,Ar-H),7.16(s,1H,CH),6.99(m,1H,CH),6.61(s,1H,CH),6.18(m,1H,CH),2.99(m,2H,CH₂),2.40(m,2H,CH₂),2.09(s,3H,CH₃)。 ¹³C NMR(CDCl₃,101MHz): δ 189.00,149.09,139.72,136.96,134.59,133.93,133.51,130.84,129.23,128.21,127.17,26.71,25.71,18.57。

[0089] 实施例2采用MTT法对本发明化合物的肿瘤细胞和正常细胞增殖抑制率测定研究

[0090] 采用四甲基氮唑蓝比色法(MTT)体外抗肿瘤试验评价了本发明化合物对4种人癌细胞株的抗增殖活性。采用萘苡明碱(PL)作为阳性对照药。人癌细胞株:肝癌细胞SMMC7721、结肠癌细胞HCT116、胃癌细胞HGC-27、人宫颈癌细胞HeLa,人正常细胞:人胃黏膜上皮细胞GES-1。

[0091] 实验方法如下:取处于指数生长期状态良好的细胞一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化,使贴壁细胞脱落,制成每毫升含 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞的悬液。取细胞悬液接种于96孔板上,每孔180 μ L,置恒温CO₂培养箱中培养24小时。换液,加入受试化合物 $I_1 \sim I_{20}$ (化合物用DMSO溶解后用PBS稀释,受试化合物浓度为12.5 μ M),每孔20 μ L,培养72小时。将MTT加入96孔板中,每孔20 μ L,培养箱中反应4小时。吸去上清液,加入DMSO,每孔150 μ L,平板摇床上振摇5分钟。用酶联免疫检测仪在波长为570nm处测定每孔的吸收度,计算细胞抑制率。实验结果如表2所示。

[0092] 细胞抑制率=(阴性对照组OD值-受试物组OD值)/阴性对照组OD值 \times 100%。

[0093] 本发明所述化合物经过一系列肿瘤细胞抗增殖活性测试,药理实验结果表明(见表2),发现本发明化合物 $I_1 \sim I_{20}$ 在12.5 μ M浓度下,对大部分肿瘤细胞增殖抑制作用较强,尤其部分化合物的抑制活性显著优于阳性对照药萘苡明碱(PL)。然而,本发明化合物 $I_1 \sim I_{20}$ 在相同浓度下对人正常胃黏膜细胞GES-1的细胞毒明显低于肿瘤细胞,说明本发明化合物不仅对肿瘤细胞具有显著的抗肿瘤活性,而且对正常细胞毒性较低,具有一定的肿瘤细胞选择性。

[0094] 表2本发明部分化合物对人肿瘤细胞和正常细胞的抑制率%(12.5 μ M)

	Compounds	SMMC7721	HCT116	HGC27	Hela	GES-1
	PL	70.2	69.6	72.3	66.4	47.5
	I ₁	76.3	69.8	78.9	78.1	30.3
	I ₂	72.1	76.4	80.2	79.8	32.6
	I ₃	75.9	73.3	78.9	76.4	27.5
	I ₄	78.8	74.6	80.7	74.9	28.2
	I ₅	79.6	89.7	86.1	87.6	ND
	I ₆	73.8	75.5	79.4	74.9	ND
[0095]	I ₇	77.3	79.5	81.8	78.4	ND
	I ₈	76.8	83.8	80.1	73.9	ND
	I ₉	69.8	65.8	74.6	72.6	ND
	I ₁₀	81.1	87.5	84.6	81.9	ND
	I ₁₁	89.6	82.0	90.9	85.1	26.8
	I ₁₂	80.8	83.7	84.1	83.5	25.9
	I ₁₃	85.2	91.4	84.7	80.8	26.3
	I ₁₄	84.3	88.7	90.8	86.1	24.7
	I ₁₅	86.7	91.2	93.5	87.8	25.1
	I ₁₆	71.6	75.4	79.0	73.7	27.2
	I ₁₇	74.2	83.1	78.9	72.3	30.6
[0096]	I ₁₈	72.4	74.5	79.4	ND	33.0
	I ₁₉	ND	86.3	89.6	ND	28.5
	I ₂₀	ND	77.3	78.9	ND	23.8

[0097] ND: 未检测

[0098] 实施例3细胞内ROS水平测定

[0099] ROS-Glo过氧化氢测试法 (Promega, Southampton, UK) 通过直接探测细胞里H₂O₂水平测量ROS改变。细胞接种到96孔细胞培养板里并用受试药物 (0.01~12.5μM) 培养24小时。每孔加入过氧化氢底物溶液且在恒温CO₂培养箱37℃孵育6小时。孵育结束后,每个孔加入ROS-Glo探测液室温下孵育20分钟。荧光通过BioTek Synergy HT多模式酶标仪探测。

[0100] 选择本发明通式I化合物中I₄~I₈、I₁₁~I₁₅、I₁₈、I₁₉为代表,对其在肿瘤细胞内的ROS水平进行了测试。用DCFH-DA作为荧光探针测定了人宫颈癌Hela细胞在加入药物处理后的ROS变化情况,从荧光强度的变化可定量反映细胞内的ROS水平。结果表明,本发明化合物I₄~I₈、I₁₁~I₁₅、I₁₈、I₁₉在12.5μM可以明显提升Hela细胞中的ROS含量,是control组3.7~8.9倍,优于阳性对照药PL (control组的3.2倍)。

[0101] 实施例4本发明化合物对TrxR抑制活性研究

[0102] 受试药物 (12.5μM) 对TrxR活性影响通过TrxR活性测试盒 (BioVision, Milpitas, CA, USA) 评估。简单地说,细胞株在离心管中用1x buffer液溶解后冰浴20分钟,然后在10000×g 4℃下离心15分钟。上清液转移到新的离心管里,蛋白浓度通过Bio-Rad蛋白测试法计算。样品用buffer液稀释到2X工作浓度。每份样品准备两孔 (含和不含抑制剂) 且一式三份。反应缓冲液和加了抑制剂的反应缓冲液根据说明书准备。读数前使用BioTek Synergy HT多模式酶标仪震荡后5分钟内每隔20秒在412nm波长下测定吸光度。

[0103] 实验结果表明化合物I₁~I₂₀在12.5μM浓度下均对TrxR具有显著抑制活性,其抑制活性数据见表3,大部分化合物均显示出比阳性对照药茚麦明碱更强或相当的抑制活性,提示本发明的苯基亚烯丙基环己烯酮衍生物具有较好的TrxR抑制活性,与其显示出抗肿瘤活

性相一致。

[0104] 表3本发明部分化合物体外TrxR抑制率% (12.5 μ M)

	Compd.	Inhibition (%)	Compd.	Inhibition (%)
	PL	86.7	I ₁₁	90.7
	I ₁	83.9	I ₁₂	95.1
	I ₂	89.7	I ₁₃	94.8
	I ₃	88.9	I ₁₄	97.3
	I ₄	90.6	I ₁₅	96.6
[0105]	I ₅	95.1	I ₁₆	89.2
	I ₆	92.5	I ₁₇	87.6
	I ₇	89.8	I ₁₈	90.6
	I ₈	93.4	I ₁₉	93.8
	I ₉	86.5	I ₂₀	85.3
	I ₁₀	91.2		