



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110407769 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 08

(21) 申请号 201810391254.9

A61P 21/00 (2006.01)

(22) 申请日 2018.04.27

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110407769 A

(56) 对比文件

CN 103214431 A, 2013.07.24

CN 101891706 A, 2010.11.24

US 2014107141 A1, 2014.04.17

EP 2647627 A1, 2013.10.09

(43) 申请公布日 2019.11.05

(73) 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

黄朝辉 等. 新型苯并硫氮杂酮类非ATP 竞争GSK-3β 抑制剂的设计、合成和活性评价.《中国现代应用药理学》. 2012, 第29卷 (第11期), 第988-992页.

(72) 发明人 楚勇 高扬 叶德泳

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事务所 (普通合伙) 31268

专利代理人 吴桂琴

Ramesh Samineni et al.. Versatile Route to Benzoannulated Medium-Ring Carbocycles via Aryne Insertion into Cyclic 1,3-Diketones: Application to a Synthesis of Radermachol.《Org. Lett.》. 2016, 第18卷第2832-2835.

(51) Int. Cl.

C07D 281/10 (2006.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

审查员 苏敬雷

权利要求书1页 说明书13页 附图2页

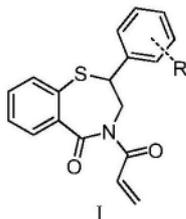
(54) 发明名称

3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂萘-5(2H)-酮类化合物及其药物用途

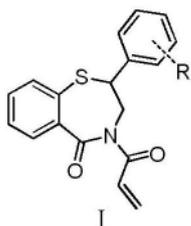
(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,涉及式I结构通式的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂萘-5(2H)-酮类化合物及其在医药上的应用。该类化合物能选择性地抑制糖原合成激酶-3β (GSK 3β) 的活性,可用于制备预防和/或治疗具有GSK 3β 异常病理特征的疾病的药物,所述疾病包括癌症、神

经类疾病、炎症、代谢综合症等。



1. 一种式I结构的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物,



其中,R取自氢原子、卤素基、三氟甲基、C1-3的烷基、C1-3的烷氧基、C2-4的烷氧羰基。

2. 按权利要求1所述的式I结构的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物,其特征在于,所述的卤素选自氟、氯或溴。

3. 权利要求1-2所述的式I结构的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物在用于制备预防和/或治疗具有GSK 3 β 异常病理特征的疾病的药物或其组合物中的用途。

4. 按权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的药物或其组合物含有治疗有效量的权利要求1-2中任意一项所述的化合物或其可药用盐,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

5. 按权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的具有GSK 3 β 异常病理特征的疾病为癌症、神经类疾病、炎症或代谢综合症。

6. 按权利要求5所述的用途,其特征在于,所述癌症为肝癌、胆管癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、骨肉瘤、卵巢癌、输卵管癌、胃肠间质瘤、神经胶质瘤、头颈部癌症、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或骨髓增生异常综合症。

7. 按权利要求5所述的用途,其特征在于,所述神经类疾病为阿尔茨海默病、帕金森病、双向情感障碍、强直性肌营养不良、进行性核上麻痹或自闭症谱系障碍。

8. 按权利要求5所述的用途,其特征在于,所述代谢综合症是糖尿病。

3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物及其药物用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及一类新的式I结构3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物及其药物用途。本发明所述的式I结构3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物是糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)的非ATP竞争型抑制剂,能在微摩尔浓度抑制GSK-3 β 的活性,且对测试的多种蛋白激酶均无明显的抑制作用。所述的式I结构化合物对癌症,如卵巢癌显示出较好的体外抑制活性,可用于治疗卵巢癌等癌症。本发明所述的式I结构化合物可用于制备预防和/或治疗具有GSK-3 β 异常病理特征的疾病的药物,所述疾病包括癌症、神经类疾病、炎症、代谢综合症等。

背景技术

[0002] 现有技术公开了糖原合成激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β ,GSK-3 β)是一种脯氨酸导向的多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能够磷酸化糖原合成酶并使其失活。研究表明,GSK-3 β 能够磷酸化多种底物蛋白,在调控细胞的分化、代谢、凋亡以及基因表达等方面都起着重要作用,与II型糖尿病、阿尔茨海默病、肿瘤、中风、双向情感障碍和炎症等疾病的发生发展密切相关。

[0003] 研究表明,GSK-3 β 通过磷酸化信号转录因子如c-Myc、c-Jun、p53,参与NF- κ B信号通路,并影响凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax以及周期相关蛋白cyclinD1等表达,影响细胞的生存和增殖,这种情况下GSK-3 β 发挥肿瘤促进剂的作用(Beurel E,et al.,Prog.Neurobiol.79(2006)173-189,McCubrey JA,et al.,54(2014)176-196)。研究发现,GSK3在一些实体瘤,如结肠癌,肝癌,卵巢癌和胰腺癌中过度表达,抑制GSK-3 β 的活性将会减缓这几类肿瘤的发展进程(Sharkoori A,et al.,Biochem Biophys Res Commun.334(2005)1365-1373,Wang Z,et al.,Nature 455(2008)1205-1210,Ougolkov AV,et al.,Cancer Res.65(2005)2076-2081,Cao Q,et al.,Cell Res.16(2006)671-677)。

[0004] 资料显示,卵巢癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一,因其在早期无明显的临床症状及在治疗过程中的耐药性问题,卵巢癌的5年生存率低于43%(http://www.ons.gov.uk/ons/dcp171778_240942.pdf)。目前,临床上治疗卵巢癌主要采用手术切除并结合紫杉醇和铂类为主的药物治疗。尽管铂类结合的药物可以缓解并提高患者的生存率,然而高复发率和复发后的耐药性问题是导致其高死亡率的主要原因之一。

[0005] 现有研究表明,GSK-3 β 能够促进卵巢癌细胞的增殖,因此可能会成为治疗卵巢癌的一个潜在靶点。2006年LiCl被报道显示出较好的体内抗卵巢癌细胞增殖作用,但生理水平的LiCl对卵巢癌的作用很小(Cao Q,et al.,Cell Res.16(2006)671-677,Novetsky AP,et al.,Int J Gynecol Cancer 23(2013)361-366)。近期研究表明,ATP竞争性抑制剂9ING41、BIO和AZD1080在体外均表现出抗卵巢癌增殖作用(Tyvette S,et al.,Anticancer Drugs.22(2011)978-985,Yu AS,et al.,Tumor Biol.37(2016)4857-4864,Chen S,et al.,Drug Des.Devel.Ther.10(2016)1225-1232),为GSK-3 β 作为治疗卵巢癌靶点提供了

依据。

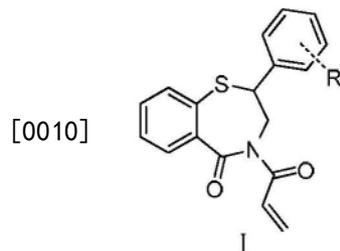
[0006] 目前报道的大多数GSK-3 β 抑制剂为ATP竞争性抑制剂,由于ATP结合区域在500多种激酶中高度保守,因此作用于该活性区域所带来的选择性及特异性问题不容忽视。相较于ATP竞争型抑制剂,已知的非ATP竞争型抑制剂结构类型并不多。但自2002年TDZD-8作为首个非ATP竞争型GSK-3 β 抑制剂被报道后,开发活性更高的非ATP竞争型抑制剂成为GSK-3 β 抑制剂研究的热点。该类抑制剂不仅具有较好的激酶选择性,而且在细胞水平和动物水平的测试中也显示出很好的活性。目前处于临床IIb期用于治疗阿尔兹海默病和进行性核上性麻痹症(PSP)的NP12就属于非ATP竞争型抑制剂,也表明非ATP竞争作用模式的优势。

[0007] 此外,GSK-3 β 参与调控多条信号转导通路,正常水平的GSK-3 β 对于维持机体的生理活动至关重要。研究发现引起机体生物功能失调的GSK-3 β 水平只是正常水平的2-3倍,而过度抑制其活性很可能会导致严重的毒副作用。

[0008] 基于现有技术的基础,本申请的发明人拟提供具有更精细更温和的调节作用的GSK-3 β 抑制剂,具体涉及一类新的结构的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物及其药物用途。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供新的GSK-3 β 抑制剂,具体涉及一类新的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物,其结构通式如下式I所示:



[0011] 其中,R取自氢原子、卤素基、三氟甲基、C1-3的烷基、C1-3的烷氧基、C2-4的烷氧羰基。

[0012] 优选地,所述的卤素基选择氟、氯或溴。

[0013] 本发明所述的式I结构的3,4-二氢-苯并硫氮杂草酮化合物经体外酶水平测试,显示出较好的GSK-3 β 抑制活性,且对多种激酶如CDK1,CDK2,EGFR,c-Met,c-Kit等均无明显抑制,显示出较高的激酶选择性。

[0014] 本发明所述的式I结构的3,4-二氢-苯并硫氮杂草酮化合物经酶动力学测试表明对GSK-3 β 的作用模式为非ATP竞争抑制。

[0015] 经实验证实,所述的化合物能选择性地抑制糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)的活性,能在微摩尔浓度抑制GSK-3 β 的活性,且对测试的多种蛋白激酶均无明显的抑制作用,且对癌症,如卵巢癌显示出较好的体外抑制活性。

[0016] 本发明的另一目的是提供式I所示的化合物在制备预防或治疗具有GSK-3 β 异常病理特征的疾病的药物中的用途;可用于制备预防或治疗具有GSK-3 β 异常病理特征的疾病的药物或其组合物。

[0017] 优选地,所述的药物或其组合物,是指含有治疗有效量的式I结构的化合物或其互

变异构体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式、或其可药用盐,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0018] 优选地,所述具有GSK-3 β 异常病理特征的疾病包括癌症、神经类疾病、炎症、代谢综合症。

[0019] 本发明所述的式I结构的化合物在体外均表现出较好的抗卵巢癌细胞增殖活性,可用于制备预防或治疗卵巢癌疾病的药物,但不受限与此。

[0020] 优选地,所述癌症包含肝细胞肝癌、胆管癌、鼻咽癌、乳腺癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、口腔癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、骨肉瘤、卵巢癌、输卵管癌症、胃肠间质瘤、神经胶质瘤、头颈部癌症、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合症。

[0021] 优选地,所述神经类疾病包括阿尔茨海默病、帕金森病、双向情感障碍、强直性肌营养不良、进行性核上麻痹、自闭症谱系障碍等。

[0022] 优选地,所述代谢综合症包括糖尿病。

[0023] 本发明提供了一类新的式I结构3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物及其药物;所述的化合物是糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)的非ATP竞争型抑制剂,能在微摩尔浓度抑制GSK-3 β 的活性,且对测试的多种蛋白激酶均无明显的抑制作用。所述的化合物可用于制备预防和/或治疗具有GSK-3 β 异常病理特征的疾病的药物,所述疾病包括癌症、神经类疾病、炎症、代谢综合症等。

附图说明

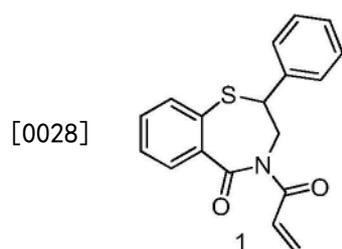
[0024] 图1是本发明所述的化合物1的GSK-3 β 活性测试的动力学数据双倒数图,其中,GS-2浓度不变时,12.5 μ M和30 μ M浓度的1的直线与对照组直线相交于X轴,表明化合物1为非ATP竞争型抑制剂(A),ATP浓度不变时,12.5 μ M和30 μ M浓度的1的直线与对照组直线相交于X和Y轴以外,表明化合物1为非底物竞争型抑制剂(B)。

[0025] 图2是本发明所述的化合物11对卵巢癌细胞系A2780的细胞凋亡影响图,其中,(A)随着化合物浓度的增加(10,15,20 μ M),早期凋亡和晚期凋亡细胞比例也随之增加,(B)A2780细胞凋亡比例。结果表明化合物11可引起A2780的细胞凋亡。

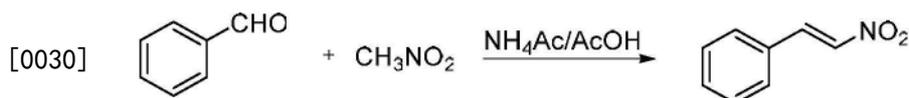
具体实施方式

[0026] 本发明所述的3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮化合物的制备参见以下实施例。

[0027] 实施例1:制备4-丙烯酰基-2-苯基-3,4-二氢-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(1),其结构式如下所示:

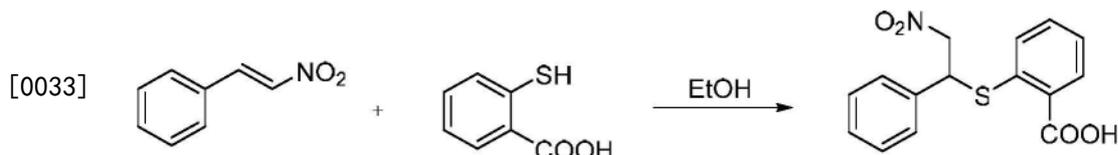


[0029] 第一步:(E)-2-硝基乙烯基苯的制备



[0031] 向反应瓶中加入苯甲醛(10.6g,0.1mol),硝基甲烷(10.7mL,0.2mol),醋酸铵(7.7g,0.1mol),冰醋酸(100mL),回流3h。加入200mL饱和食盐水,乙酸乙酯萃取,合并有机层并用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥。减压浓缩得黑褐色固体,甲醇洗涤过滤得黄色针状固体6.8g,收率46%,直接用于下步反应。

[0032] 第二步:2-((2-硝基-1-苯乙基)硫代)-苯甲酸的制备



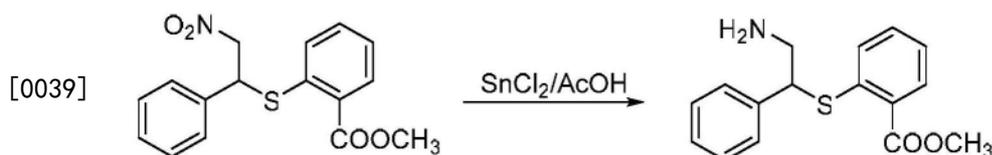
[0034] 向反应瓶中加入(E)-2-硝基乙烯基-苯(6.7g,0.04mol),巯基水杨酸(6.9g,0.04mol),乙醇(70mL),回流12h。冷至室温,析出固体,过滤得白色粉末状固体8.8g,收率65%。

[0035] 第三步:2-((2-硝基-1-苯乙基)硫代)-苯甲酸甲酯的制备



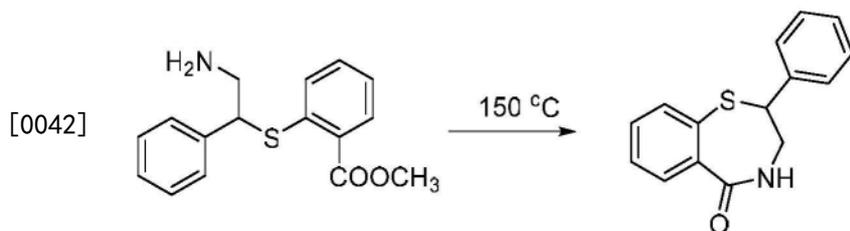
[0037] 向反应瓶中加入2-((2-硝基-1-苯乙基)硫代)-苯甲酸(9.1g,0.03mol),甲醇(60mL),冰浴下滴加氯化亚砷(8.9mL,0.14mol)。滴加完毕,升温回流过夜。冷至室温析出固体,过滤,滤饼用少量甲醇洗涤,得白色固体7.3g,收率77%。

[0038] 第四步:2-((2-氨基-1-苯乙基)硫代)-苯甲酸甲酯的制备



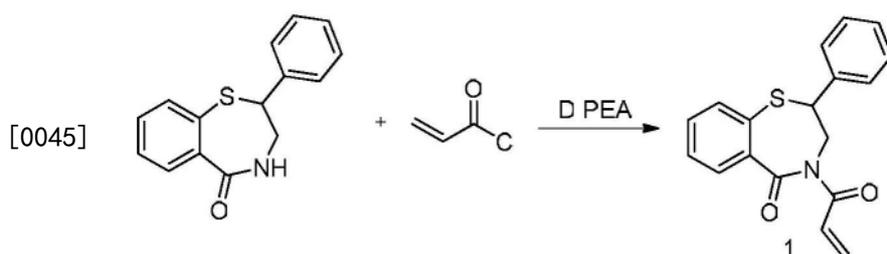
[0040] 向反应瓶中加入2-((2-硝基-1-苯乙基)硫代)-苯甲酸甲酯(6.7g,0.02mol),氯化亚锡(19.2g,0.08mol),冰醋酸(19.5mL,0.32mol),甲醇(80mL),回流3h。冷至室温,冰浴下滴加碳酸钾(58.7g)的水溶液(90mL),滴加完毕,乙酸乙酯萃取,减压浓缩得褐色糖浆状物。将所得物溶于乙酸乙酯(50mL),加入乙醚/浓盐酸(1:1)80mL,振荡分层,水层用乙醚萃取三次,减压浓缩。所得物溶于乙酸乙酯,冰浴下加入碳酸钾的水溶液(18.7g溶于30mL水),调pH至碱性,乙酸乙酯萃取。有机层经无水硫酸钠干燥,减压浓缩得粗品,经硅胶柱层析(DCM:MeOH=80:20)得褐色糖浆状物2.9g,收率48%。

[0041] 第五步:3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮的制备



[0043] 向反应瓶中加入2-((2-氨基-1-苄基)硫代)-苯甲酸甲酯(2.9g,0.01mol),于150℃下加热12h。冷至室温,析出固体,乙腈洗涤,得类白色粉末状固体0.35g(3-19a),收率13%。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 8.60(d,J=6.8Hz,1H),7.70-7.50(m,4H),7.44-7.18(m,5H),4.78-4.63(m,1H),3.52-3.37(m,1H),3.25-3.10(m,1H)。

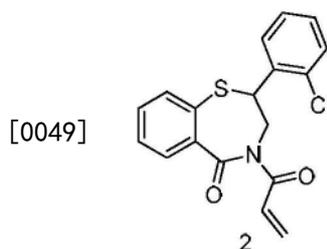
[0044] 第六步:制备4-丙烯酰基-2-苯基-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(1)



[0046] 向反应瓶中加入3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(255mg,1mmol),丙烯酰氯(160μL,2mmol),DIPEA(496μL,3mmol),DCM(20mL),室温反应过夜。二氯甲烷稀释,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析(PE:EA=85:15)得白色絮状固体100mg(3-26),收率32%。ESI-MS m/z:310.1[M+H]⁺,¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 7.87-7.76(m,1H),7.68-7.60(m,2H),7.57-7.48(m,1H),7.32-7.23(m,3H),7.22-7.06(m,3H),6.37(dd,J=16.7,1.9Hz,1H),6.00-5.86(m,1H),4.72(dd,J=11.6,5.1Hz,1H),4.55(dd,J=15.0,5.2Hz,1H),3.49(dd,J=15.0,11.6Hz,1H)。

[0047] 以下实施例中3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物均按实施例1的类似方法合成得到,但选用相应的不同起始原料。

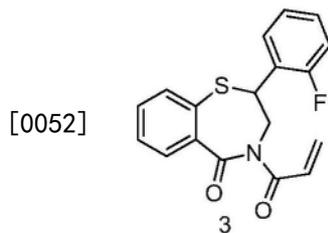
[0048] 实施例2:制备4-丙烯酰基-2-(2-氯苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(2),其结构式如下所示:



[0050] 白色固体,收率18%。ESI-MS m/z:344.1[M+H]⁺,¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 7.84(dd,J=5.7,3.4Hz,1H),7.71-7.61(m,2H),7.58-7.47(m,2H),7.39-7.24(m,2H),7.24-7.09(m,2H),6.39(dd,J=17.0,2.1Hz,1H),5.95(dd,J=10.1,2.0Hz,1H),5.03(dd,J=11.6,5.1Hz,1H),4.61(dd,J=15.0,5.1Hz,1H),3.58(dd,J=15.0,11.5Hz,1H)。

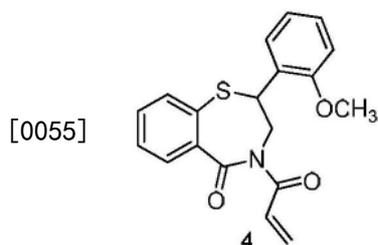
[0051] 实施例3:制备4-丙烯酰基-2-(2-氟苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮

杂草-5 (2H)-酮 (3), 其结构式如下所示:



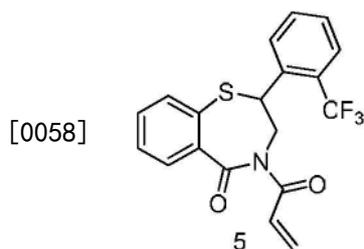
[0053] 得白色固体, 收率55%。ESI-MS m/z : 328.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.87-7.78 (m, 1H), 7.64 (t, $J=4.4$ Hz, 2H), 7.61-7.55 (m, 1H), 7.33 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.26-7.09 (m, 4H), 6.44-6.34 (m, 1H), 5.94 (dd, $J=10.4, 1.8$ Hz, 1H), 4.91 (dd, $J=11.6, 5.1$ Hz, 1H), 4.61 (dd, $J=14.9, 5.1$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J=14.9, 11.7$ Hz, 1H)。

[0054] 实施例4: 制备4-丙烯酰基-2-(2-甲氧基苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5 (2H)-酮 (4), 其结构式如下所示:



[0056] 得白色固体, 收率19%。ESI-MS m/z : 340.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.82-7.80 (m, 1H), 7.64-7.61 (m, 2H), 7.50-7.47 (m, 1H), 7.27 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=16.8, 10.4$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.84 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J=16.8$ Hz, 1H), 5.94 (dd, $J=10.4, 1.6$ Hz, 1H), 4.92 (dd, $J=12.0, 5.2$ Hz, 1H), 4.54 (dd, $J=14.8, 5.2$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.60 (dd, $J=14.8, 12.0$ Hz, 1H)。

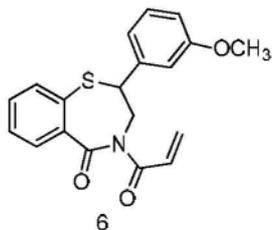
[0057] 实施例5: 制备4-丙烯酰基-2-(2-三氟甲基苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5 (2H)-酮 (5), 其结构式如下所示:



[0059] 得白色固体, 收率30%。ESI-MS m/z : 378.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.95-7.86 (m, 1H), 7.66 (dd, $J=7.7, 1.6$ Hz, 1H), 7.62-7.52 (m, 3H), 7.46-7.33 (m, 2H), 7.30-7.20 (m, 1H), 7.11 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J=16.9, 1.7$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J=10.4, 1.7$ Hz, 1H), 5.02 (dd, $J=11.0, 5.1$ Hz, 1H), 4.81 (dd, $J=14.7, 5.1$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J=14.7, 11.0$ Hz, 1H)。

[0060] 实施例6: 制备4-丙烯酰基-2-(3-甲氧基苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5 (2H)-酮 (6), 其结构式如下所示:

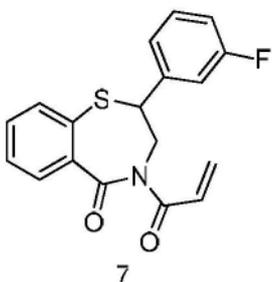
[0061]



[0062] 白色固体, 收率43%。ESI-MS m/z : 340.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.85-7.75 (m, 1H), 7.68-7.60 (m, 2H), 7.58-7.52 (m, 1H), 7.23-7.07 (m, 2H), 6.82 (dd, $J=8.3, 2.5$ Hz, 1H), 6.74-6.61 (m, 2H), 6.37 (dd, $J=16.9, 2.0$ Hz, 1H), 5.93 (dd, $J=10.2, 2.0$ Hz, 1H), 4.68 (dd, $J=11.3, 5.3$ Hz, 1H), 4.53 (dd, $J=14.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.48 (dd, $J=15.0, 11.5$ Hz, 1H)。

[0063] 实施例7: 制备4-丙烯酰基-2-(3-氟苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(7), 其结构式如下所示:

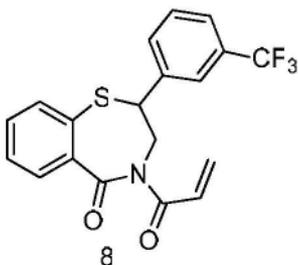
[0064]



[0065] 白色固体, 收率25%。ESI-MS m/z : 328.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.90-7.84 (m, 1H), 7.63-7.52 (m, 3H), 7.34-7.21 (m, 2H), 7.00-6.92 (m, 2H), 6.86 (dt, $J=9.7, 2.1$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J=16.8, 1.7$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J=10.4, 1.7$ Hz, 1H), 4.81 (dd, $J=14.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J=11.6, 5.2$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J=14.7, 11.6$ Hz, 1H)。

[0066] 实施例8: 制备4-丙烯酰基-2-(3-三氟甲基苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(8), 其结构式如下所示:

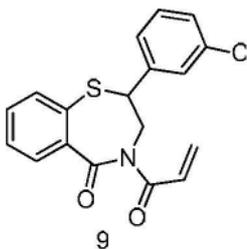
[0067]



[0068] 白色固体, 收率19%。ESI-MS m/z : 378.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.93-7.85 (m, 1H), 7.55 (d, $J=27.1$ Hz, 4H), 7.42 (q, $J=8.0, 6.1$ Hz, 2H), 7.38-7.32 (m, 1H), 7.32-7.23 (m, 1H), 6.54 (dd, $J=17.0, 1.6$ Hz, 1H), 5.90 (dd, $J=10.5, 1.6$ Hz, 1H), 4.82 (dd, $J=14.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.66 (dd, $J=11.4, 5.2$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J=14.6, 11.5$ Hz, 1H)。

[0069] 实施例9: 制备4-丙烯酰基-2-(3-氯苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(9), 其结构式如下所示:

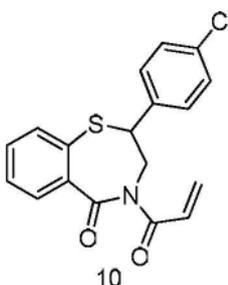
[0070]



[0071] 白色固体,收率36%。ESI-MS m/z : 344.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.89-7.79 (m, 1H), 7.62-7.52 (m, 3H), 7.33-7.19 (m, 3H), 7.15 (s, 1H), 7.04 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 6.52 (dd, $J=16.9, 1.7$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J=10.5, 1.7$ Hz, 1H), 4.79 (dd, $J=14.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.57 (dd, $J=11.5, 5.1$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J=14.7, 11.6$ Hz, 1H)。

[0072] 实施例10:制备4-丙烯酰基-2-(4-氯苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(10),其结构式如下所示:

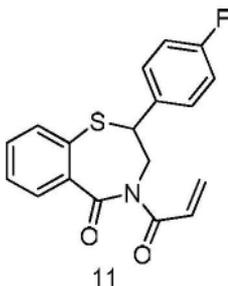
[0073]



[0074] 白色固体,收率56%。ESI-MS m/z : 344.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.88-7.85 (m, 1H), 7.57-7.53 (m, 3H), 7.30-7.23 (m, 3H), 7.07 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.52 (dd, $J=16.8, 1.6$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J=10.4, 1.6$ Hz, 1H), 4.77 (dd, $J=14.4, 5.2$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J=11.6, 5.2$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J=14.4, 11.6$ Hz, 1H)。

[0075] 实施例11:制备4-丙烯酰基-2-(4-氟苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(11),其结构式如下所示:

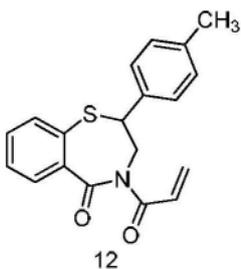
[0076]



[0077] 白色固体,收率83%。ESI-MS m/z : 328.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.91-7.82 (m, 1H), 7.62-7.52 (m, 3H), 7.27 (dd, $J=16.9, 10.4$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J=8.4, 5.2$ Hz, 2H), 6.97 (t, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.52 (dd, $J=16.8, 1.8$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J=10.5, 1.8$ Hz, 1H), 4.77 (dd, $J=14.6, 5.2$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J=11.5, 5.2$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J=14.7, 11.5$ Hz, 1H)。

[0078] 实施例12:制备4-丙烯酰基-2-(4-甲基苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(12),其结构式如下所示:

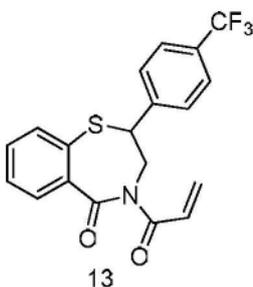
[0079]



[0080] 白色固体, 收率42%。ESI-MS m/z : 324.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.90-7.83 (m, 1H), 7.62-7.49 (m, 3H), 7.33-7.22 (m, 1H), 7.13-6.98 (m, 4H), 6.52 (dd, $J=16.9, 1.7$ Hz, 1H), 5.88 (dd, $J=10.4, 1.7$ Hz, 1H), 4.79 (dd, $J=14.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J=11.6, 5.2$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J=14.7, 11.6$ Hz, 1H), 2.31 (s, 3H)。

[0081] 实施例13: 制备4-丙烯酰基-2-(4-三氟甲基苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(13), 其结构式如下所示:

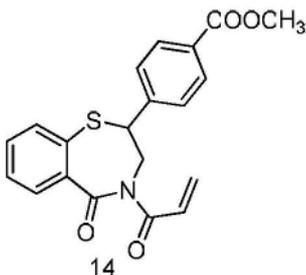
[0082]



[0083] 白色固体, 收率44%。ESI-MS m/z : 378.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.94-7.83 (m, 1H), 7.65-7.51 (m, 4H), 7.30 (dd, $J=16.8, 9.6$ Hz, 3H), 6.59-6.48 (m, 1H), 5.96-5.85 (m, 1H), 4.82 (dd, $J=14.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.66 (dd, $J=11.6, 5.1$ Hz, 1H), 3.40 (dd, $J=14.6, 11.6$ Hz, 1H)。

[0084] 实施例14: 制备4-丙烯酰基-2-(4-甲酰甲酸酯苯基)-3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮(14), 其结构式如下所示:

[0085]



[0086] 白色固体, 收率43%。ESI-MS m/z : 368.1 $[M+H]^+$, 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 7.89-7.79 (m, 3H), 7.69-7.59 (m, 2H), 7.55-7.49 (m, 1H), 7.33-7.23 (m, 2H), 7.21-7.09 (m, 1H), 6.36 (d, $J=16.8$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J=10.3$ Hz, 1H), 4.89-4.76 (m, 1H), 4.63-4.48 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.52 (t, $J=13.4$ Hz, 1H)。

[0087] 实施例15: 式I结构化合物对GSK-3 β 的体外酶抑制活性测试

[0088] 采用化学发光法进行测试, 荧光信号强度与剩余ATP的量成正比, 通过检测体系内剩余ATP的量进而推算出GSK-3 β 磷酸化底物GS-2时消耗的ATP量, 从而反映酶的活性水平。计算不同浓度下化合物的抑制率, 通过GraphPad软件拟合出半数抑制浓度 (IC_{50} 值)。

[0089] 所用的主要试剂:

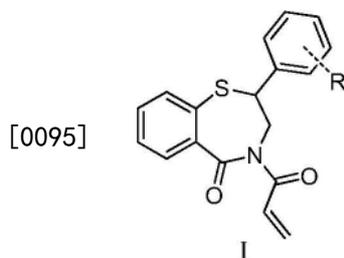
[0090] GSK-3 β (Millipore, Lot#:14-306); GS-2 (吉尔生化上海有限公司); ATP \cdot 2Na (Sigma-Aldrich); Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay (Promega corporation); TDZD-8 (MedChem Express Technologies, Lot#:HY-11012).

[0091] 实验方法:

[0092] 在96孔板上,将4 μ L含不同浓度化合物的DMSO溶液用14 μ L缓冲液稀释,依次加入2 μ L (10-20ng)的GSK-3 β ,20 μ L的GS-2 (12.5 μ M)和ATP (4 μ M)的缓冲液,于30 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,孵育完毕后加入40 μ L Kinase-Glo试剂,于30 $^{\circ}$ C下孵育10分钟,化学发光仪计数,GraphPad软件计算半数抑制浓度(IC₅₀值)。

[0093] 实验显示,本发明的3,4-二氢-2-苯基-苯并[f][1,4]硫氮杂草-5(2H)-酮类化合物对GSK-3 β 具有微摩尔浓度级的抑制作用。表1为部分实施例化合物的结构及活性数据。

[0094] 表1.部分实施例化合物对GSK 3 β 酶的抑制活性(IC₅₀)及对卵巢癌细胞系A2780的体外抑制活性(IC₅₀)



| 化合物编号. | R | GSK 3 β IC ₅₀ (μ M) | A2780 IC ₅₀ (μ M) |
|----------|----------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | H | 18.2 | 18.6 |
| 2 | 2-Cl | 11.3 | 8.6 |
| 3 | 2-F | 12.8 | 9.0 |
| 4 | 2-OMe | 10.5 | 13.6 |
| 5 | 2-CF ₃ | 9.4 | 10.6 |
| 6 | 3-OCH ₃ | 18.5 | 8.3 |
| [0096] 7 | 3-F | 4.3 | 15.5 |
| 8 | 3-CF ₃ | 4.7 | 19.3 |
| 9 | 3-Cl | 4.6 | 23.9 |
| 10 | 4-Cl | 4.8 | 15.3 |
| 11 | 4-F | 4.4 | 9.3 |
| 12 | 4-CH ₃ | 16.6 | 16.7 |
| 13 | 4-CF ₃ | 6.1 | 17.8 |
| 14 | 4-COOCH ₃ | 10.5 | 10.6 |

[0097] 实施例16:动力学测试确定所述的式I结构化合物对GSK 3 β 的作用模式

[0098] 测试一定浓度下化合物在一系列不同ATP浓度时的GSK 3 β 活性,计算出反应速率。通过反应速率的倒数(1/v)对ATP浓度的倒数(1/[ATP])作图得到 Lineweaver-Burk。直线的相交点反映出化合物的作用类型。若化合物的直线空白对照组的直线相交于Y轴,则表明化合物与ATP存在竞争关系,如果相交于X轴,则表明化合物与ATP不存在竞争关系;

[0099] 测试一定浓度下化合物在一系列不同GS-2浓度时的GSK-3 β 活性,计算出反应速率。通过反应速率的倒数(1/v)对GS-2浓度的倒数(1/[GS-2])作图得到Lineweaver-Burk。直线的相交点反映出化合物的作用类型。若化合物的直线空白对照组的直线相交于Y轴,则表明化合物与GS-2存在竞争关系,如果相交于X轴,则表明化合物与GS-2不存在竞争关系;

[0100] 测试与ATP作用模式时,保持GS-2浓度为6.25 μ M,ATP的终浓度为8.0 μ M,4.0 μ M,2.0 μ M,1.0 μ M,0.5 μ M。运用上述体外激酶活性测试方法测试不同ATP浓度下酶的活性。计算反应速率并对ATP浓度进行双倒数作图。测试与GS-2作用模式时,保持ATP浓度为2 μ M不变,GS-2的终浓度为12.5 μ M,6.25 μ M,3.13 μ M,1.56 μ M,0.78 μ M。运用上述体外激酶活性测试方法测试不同GS-2浓度下酶的活性。计算反应速率并对GS-2浓度进行双倒数作图。根据双倒数图判断化合物的作用模式;

[0101] 测试结果表明本发明所述式I结构的化合物是GSK-3 β 的非ATP竞争且非底物竞争抑制剂。

[0102] 实施例17:对本发明所述的式I结构化合物的体外激酶选择性评价

[0103] 采用酶联吸附滴定测试法(ELISA)测试本发明所述式I结构化合物对一系列酪氨酸蛋白激酶和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的抑制活性。

[0104] ELISA实验操作:(a)酶反应底物Poly(Glu,Tyr)4:1用无钾离子的PBS(10 mM磷酸钠缓冲液,150mM NaCl,pH 7.2-7.4)稀释成20 μ g/mL,125 μ L/孔包被酶标板,置37 $^{\circ}$ C反应12-16小时。弃去孔中液体。洗板,用1 \times PBST(含0.1% Tween-20的无钾离子的PBS,200 μ L/孔)洗板三次,每次5分钟。于37 $^{\circ}$ C烘箱中干燥酶标板1-2小时。(b)每孔加入以反应缓冲液(50mM hepes pH 7.4,50mM MgCl₂,0.5mM MnCl₂,0.2mM Na₃VO₄,1mM DTT)稀释的ATP溶液49 μ L,每孔中加入1 μ L待测试化合物,再加入50 μ L以反应缓冲液稀释的FGFR1、KDR 激酶域重组蛋白启动反应,每次实验需设无ATP对照孔两孔。置37 $^{\circ}$ C摇床(100 rpm)反应1小时。弃去孔中液体,1 \times PBST洗板三次。(c)加入抗体PY99稀释液(抗体用含BSA 5mg/mL的PBST 1:500稀释),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C摇床反应0.5小时。弃去孔中液体,PBST洗板三次。(d)加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗稀释液(抗体用含BSA 5mg/mL的PBST 1:2000稀释),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C摇床反应0.5小时。弃去孔中液体,PBST洗板三次。(e)加入2mg/mL的OPD 显色液100 μ L/孔(用含有0.03% H₂O₂的0.1M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH= 5.4)稀释),25 $^{\circ}$ C避光反应1-10分钟。(f)加入2M H₂SO₄50 μ L/孔中止反应,用可调波长式微孔板酶标仪VERSAmx读数,波长为490nm。

[0105] 以上实验结果按下述公式计算抑制率

[0106] 样品的抑制率(%) = (1 - (化合物OD值 - 无ATP对照孔OD值) / (阴性对照OD值 - 无ATP对照孔OD值)) \times 100%。

[0107] 表2为化合物11在100 μ M浓度下对23种蛋白激酶的抑制率(%)数据,显示该化合物在100 μ M下对所测试的蛋白激酶均无明显抑制作用。激酶谱测试结果表明本发明所述的式I结构化合物表现出很高的激酶选择性。

[0108] 表2. 化合物11在100 μ M浓度下对蛋白激酶的抑制率(%)

| | 抑制率 (%) | 酪氨酸 | 抑制率 (%) | 酪氨酸 | 抑制率 (%) |
|--------|-----------------|------|-----------------|------|-------------|
| | GSK 3 β | 98.3 | PDGFR- α | 0 | c-Src 39.9 |
| | CDK2/cyclinE(h) | 47 | PDGFR- β | 51.9 | KDR 22.3 |
| | CK1(y) | 17 | VEGFR-1 | 17.7 | Ret -3.4 |
| [0109] | SAPK3(h) | 2 | c-Kit | 0 | AXL 6.6 |
| | MEK1(h) | 5 | ErbB2 | 45.5 | c-Met -0.5% |
| | PKA(h) | 26 | ErbB4 | 68.4 | ALK 6.6 |
| | MAPK2(h) | -13 | EGFR | 17.5 | FGFR1 13.9 |
| | PDK1(h) | -3 | EPH-A2 | 9.7 | IGF1R 13.6 |

[0110] 实施例18:本发明的式I结构化合物体外抑制肿瘤细胞增殖活性测试

[0111] 细胞培养

[0112] 卵巢癌细胞系A2780在(RPMI)-1640(Hyclone,USA)培养基(加入10%胎牛血清,100units/mL青霉素,100mg/mL链霉素)中培养。细胞在CO₂细胞培养箱中37℃培养。当细胞复苏后传代三次以上,长至80%满时且状态良好时可用于活性测试。

[0113] MTT法

[0114] 采用四氮唑MTT法测试化合物对细胞的增殖抑制活性。简言之,细胞种植于96孔板中,加入不同浓度的化合物孵育48h。然后每孔中加入20 μ L MTT(5 mg/mL)并孵育4h。吸去上清,每孔加入150 μ L DMSO并振摇20min。酶标仪读取570nm下各孔的光密度值(OD)。每个化合物在每个浓度下设三个复孔。按下式计算药物对细胞系的增殖抑制率:

[0115] 细胞增殖抑制率 = $(OD_{\text{阴性对照式}} - OD_{\text{试验}}) / (OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。以同一样品的不同浓度对细胞增殖抑制率作图可得到剂量反应曲线,用软件 GraphPad Prism 5分析,从中求出化合物的半数抑制浓度IC₅₀。

[0116] 实验结果如表1所示,本发明所述的式I结构化合物对卵巢癌细胞具有微摩尔浓度级的抑制作用。

[0117] 实施例19:本发明的式I结构化合物对细胞凋亡的影响

[0118] 细胞凋亡采用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天)进行分析。 2×10^5 /孔A2780细胞种植于6孔板中,在37℃培养箱中培养贴壁后,用含DMSO 或不同药物浓度的培养基处理。在37℃培养箱中培养48h后,经胰酶消化,离心收集细胞,并用1 \times PBS洗两次,离心收集细胞沉淀。每管加入195 μ L Annexin V-FITC结合液并轻轻重悬细胞,依次加入5 μ L Annexin V-FITC和10 μ L碘化丙啶染色液,轻轻混匀。室温避光孵育15分钟,流式细胞仪进行检测。结果表明,化合物11引起肿瘤细胞凋亡并具有浓度依赖性(如图2所示)。

[0119] 综上所述,本发明提供的式I结构化合物对于GSK 3 β 活性具有明显的抑制作用,且具有很高的激酶选择性,能用于制备治疗或预防具有GSK 3 β 异常病理特征的疾病的药物或其组合物。

[0120] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍,但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后,对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此,本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

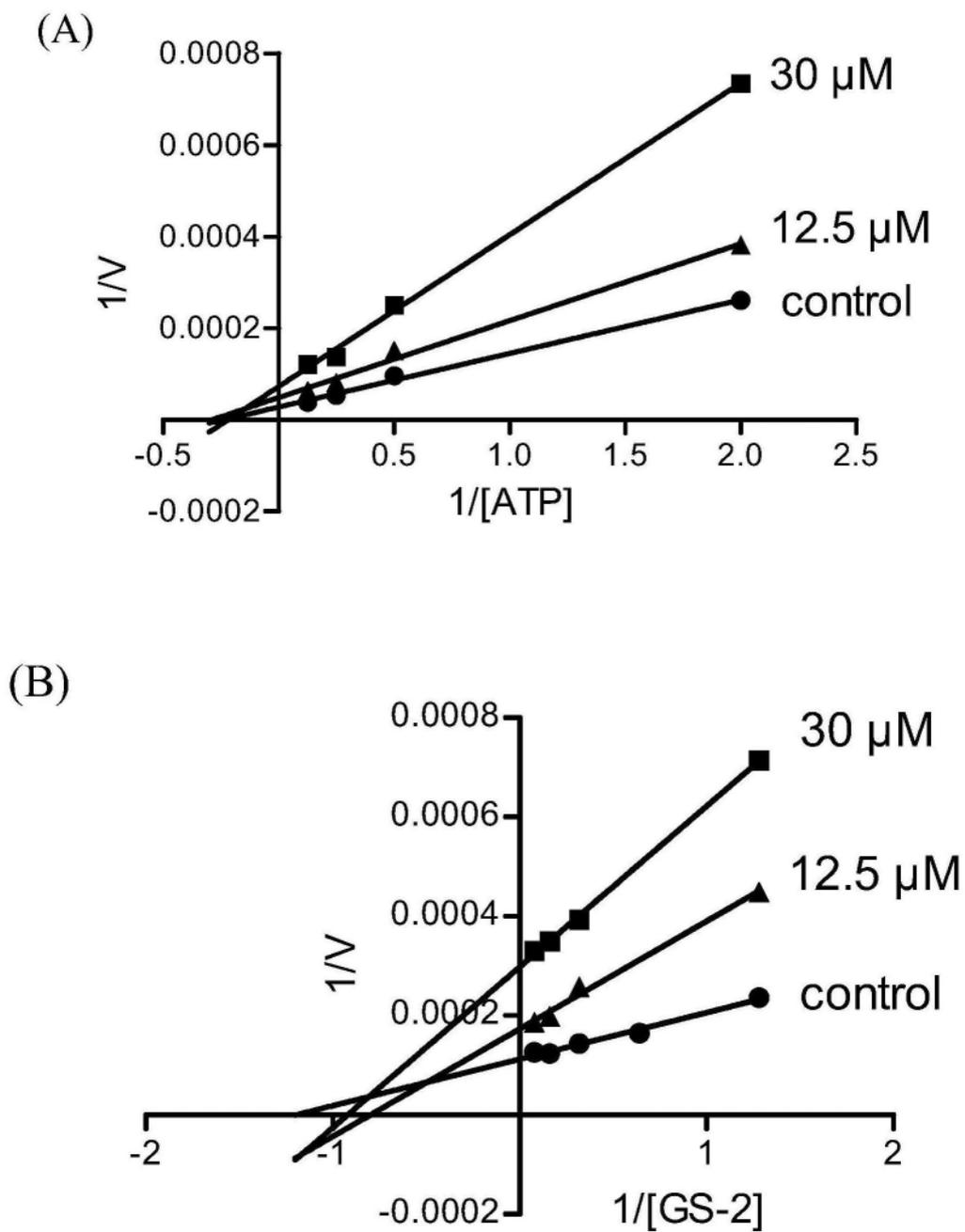
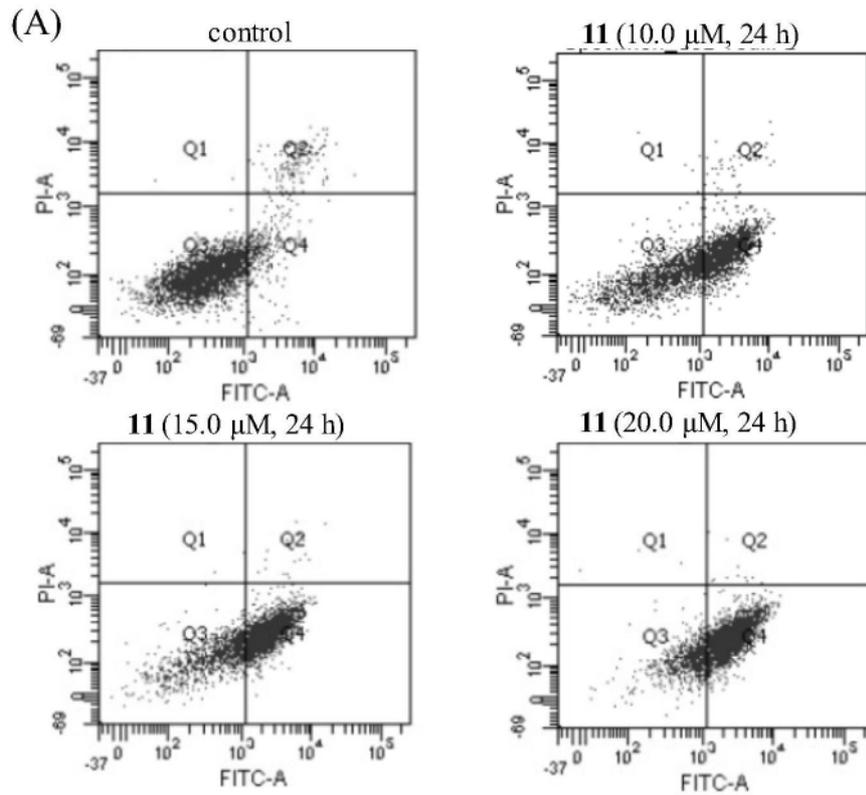


图1



(B)

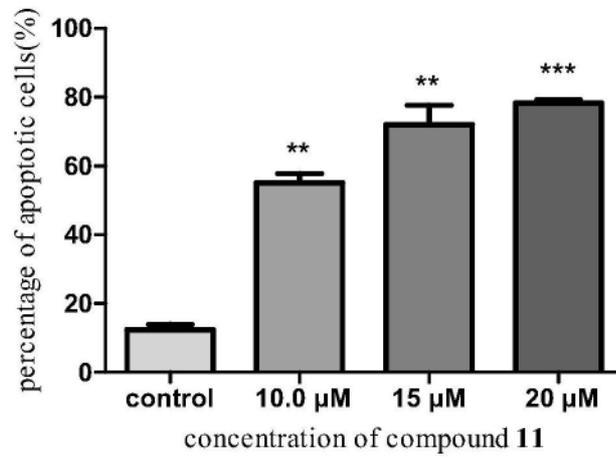


图2