(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114920755 A
(43)申请公布日 2022.08.19

(21)申请号 202210116139.7

(22)申请日 2022.02.07

(71)申请人 天津中医药大学
地址 301617 天津市静海区团泊新城西区鄱阳湖路10号

(72)发明人 牟佳佳 付岚岚 邓雁如 邱爽 王萌

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 李婷 刘继富

(51)Int.Cl.
C07D 493/04(2006.01)
C07D 311/30(2006.01)
A61K 31/357(2006.01)
A61K 31/352(2006.01)
A61K 31/4025(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61K 31/541(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书17页

(54)发明名称

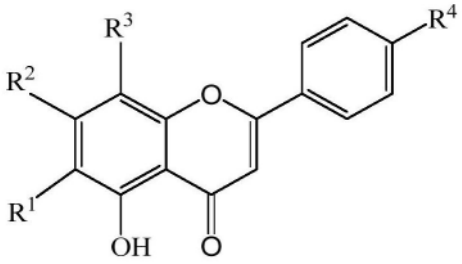
具有黄酮母核的化合物及其在制备CDK1抑制剂中的用途

(57)摘要

本申请涉及医药技术领域,提供了一种具有黄酮母核的化合物及其在制备CDK1抑制剂中的用途。该化合物具有黄酮母核结构,具有较高的体外CDK1抑制活性,对体外MCF-7细胞和RAW264.7细胞有抑制作用;其能够用于制备CDK1抑制剂,具有很好的应用前景。

CN 114920755 A

1.一种式(I)的化合物：

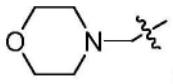


（I）

其中，R^1选自氢、羟基、$R^4R^5NCH_2$-或-CH_2-X；所述X选自C_3-C_6不饱和杂环基或C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^4和R^5各自独立地选自C_1-C_6烷基；

R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代，R^1和R^2可以连接成环；

R^3选自氢、$R^6R^7NCH_2$-或-CH_2-Y；所述Y选自C_3-C_6不饱和杂环基或至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；

且R^1和R^3不同时为  ；

当R^1和R^2连接成环时，Y选自$R^6R^7NCH_2$-或C_3-C_6不饱和杂环基；

R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基；

当R^2选自C_1-C_6烷氧基且所述烷氧基上的一个氢原子被卤素取代时，R^4选自C_1-C_3烷氧基。

2.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1和R^2连接成C_4-C_{12}饱和杂环，所述饱和杂环的杂原子为O；R^3选自$R^6R^7NCH_2$-，R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^4选自氢。

3.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1选自氢；

R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代；

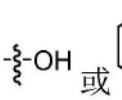
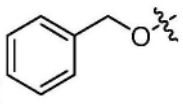
R^3选自氢或-CH_2-Y，所述Y选自至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基；所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N或S；

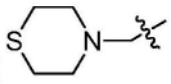
R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基；

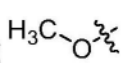
当R^2选自C_1-C_6烷氧基且所述烷氧基上的一个氢原子被卤素取代时，R^4选自C_1-C_3烷氧基。

4.根据权利要求3所述的化合物，其中，

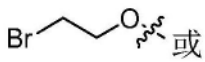
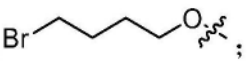
(1)R^1选自 ；

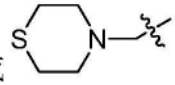
R^2选自  或  ；

R^3选自-H或  ；

R^4选自-H或  ；或者

(2)R^1选自-H；

R^2选自  或  ；

R^3选自-H或  ；

R^4选自 。

5.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1选自羟基；

R^2选自C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基取代；

R^3选自氢或-CH_2-Y，所述Y选自至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基；所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N或O；

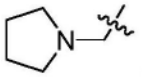
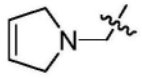
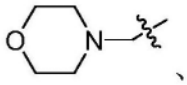
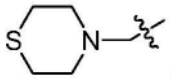
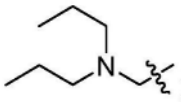
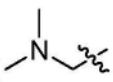
R^4选自氢。

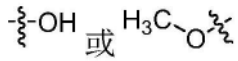
6.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1选自$R^4R^5NCH_2$-或-CH_2-X；所述X选自C_3-C_6不饱和杂环基或C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^4和R^5各自独立地选自C_1-C_6烷基；

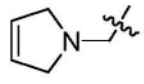
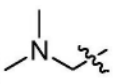
R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代；

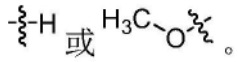
R^3选自氢、$R^6R^7NCH_2$-或-CH_2-Y；所述Y选自C_3-C_6不饱和杂环基，所述不饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N；R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；

R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基。

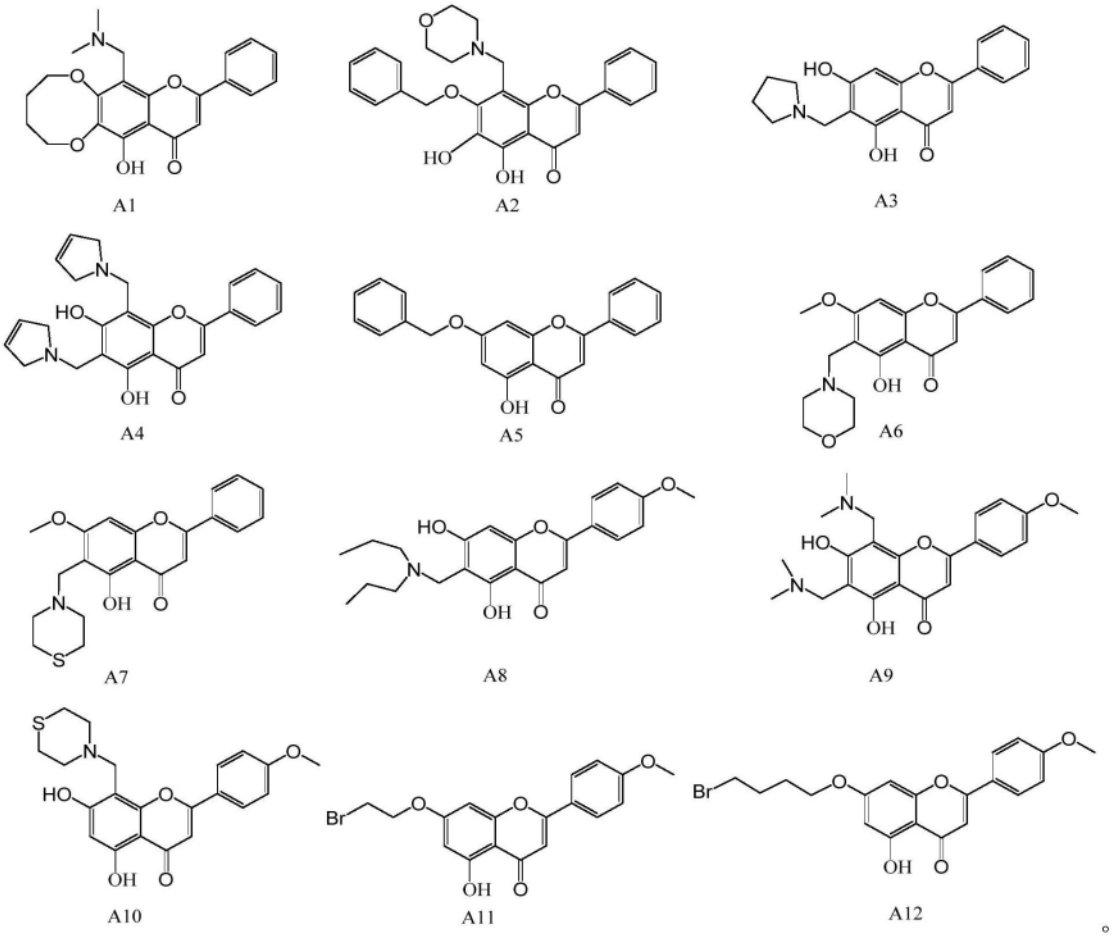
7.根据权利要求6所述的化合物，其中，R^1选自  、  、  、  、  或  ；

R^2选自-OH或  ；

R^3选自-H、  或  ；

R^4选自-H或  。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的化合物，其中，所述化合物选自以下A1至A12所示的化合物：



9.一种CDK1抑制剂,包含权利要求1-8中任一项所述的化合物中的至少一种。

10.权利要求1-8中任一项所述的化合物在制备CDK1抑制剂中的用途。

具有黄酮母核的化合物及其在制备CDK1抑制剂中的用途

技术领域

[0001] 本申请涉及医药技术领域，特别是涉及一种具有黄酮母核的化合物及其在制备CDK1抑制剂中的用途。

背景技术

[0002] 肿瘤是一种常见恶性疾病，是目前危害人类健康的主要病症之一，其严重影响人类正常生活且易引发并发症，导致生活质量持续下降。肿瘤的发生通常是由于细胞的无限增殖引起的，因其会使基因发生突变，从而导致细胞周期调节失控，形成肿瘤。从20世纪70年代初发现细胞周期调控机制以来，细胞周期关卡成为了抗肿瘤药物研究的重要靶点。

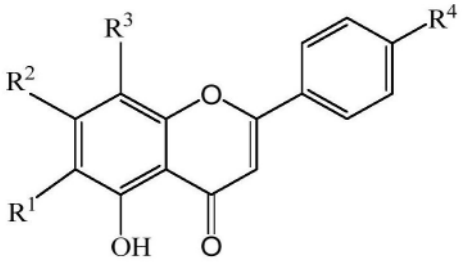
[0003] 调控细胞周期的因子主要有三类：即细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases，CDKs)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors，CDKIs)。其中，CDKs属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族，为细胞周期调节的关键激酶，是细胞周期调控网络的核心，它的过度表达引起的细胞增殖失控，是引发肿瘤细胞形成的主要原因，所以抑制这种异常活化是治疗肿瘤的方法之一。CDK1能够控制哺乳动物细胞从G2期进入M期，在整个细胞周期过程中CDK1起到不可或缺的作用，在没有间期CDKs(CDK2、3、4、6)的情况下，CDK1仍然可以驱动细胞周期进程，推动细胞完成有丝分裂过程。因此，具有较好的CDK1抑制效果的抑制剂是迫切需要的，以用于治疗肿瘤。

发明内容

[0004] 本申请的目的在于提供一种具有黄酮母核的化合物，其具有较好的CDK1抑制效果。

[0005] 具体技术方案如下：

[0006] 本申请第一方面提供了一种式(I)的化合物：

[0007] 

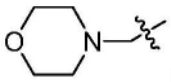
(I)

[0008] 其中，R^1选自氢、羟基、$R^4R^5NCH_2$-或-CH_2-X；所述X选自C_3-C_6不饱和杂环基或C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^4和R^5各自独立地选自C_1-C_6烷基；

[0009] R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代，R^1和R^2可以连接成环；

[0010] R^3选自氢、$R^6R^7NCH_2$-或-CH_2-Y；所述Y选自C_3-C_6不饱和杂环基或至少含有两个杂原

子的C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；

[0011] 且R^1和R^3不同时为  ；

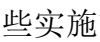
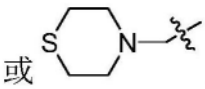
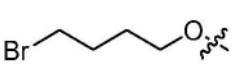
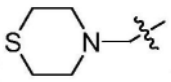
[0012] 当R^1和R^2连接成环时，Y选自$R^6R^7NCH_2$-或C_3-C_6不饱和杂环基；

[0013] R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基；

[0014] 当R^2选自C_1-C_6烷氧基且所述烷氧基上的一个氢原子被卤素取代时，R^4选自C_1-C_3烷氧基。

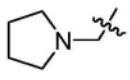
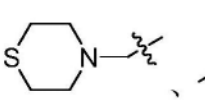
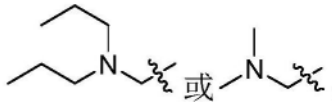
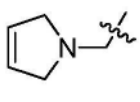
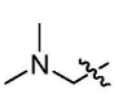
[0015] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1和R^2连接成C_4-C_{12}饱和杂环，所述饱和杂环的杂原子为O；R^3选自$R^6R^7NCH_2$-，R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^4选自氢。

[0016] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自氢；R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代；R^3选自氢或-CH_2-Y，所述Y选自至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基；所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N或S；R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基；当R^2选自C_1-C_6烷氧基且所述烷氧基上的一个氢原子被卤素取代时，R^4选自C_1-C_3烷氧基。

[0017] 在一些实施方式中，式(I)的化合物中，(1)R^1选自 ；R^2选自  或；R^3选自或  ；R^4选自或；或者，(2)R^1选自；R^2选自或  ；R^3选自或  ；R^4选自。

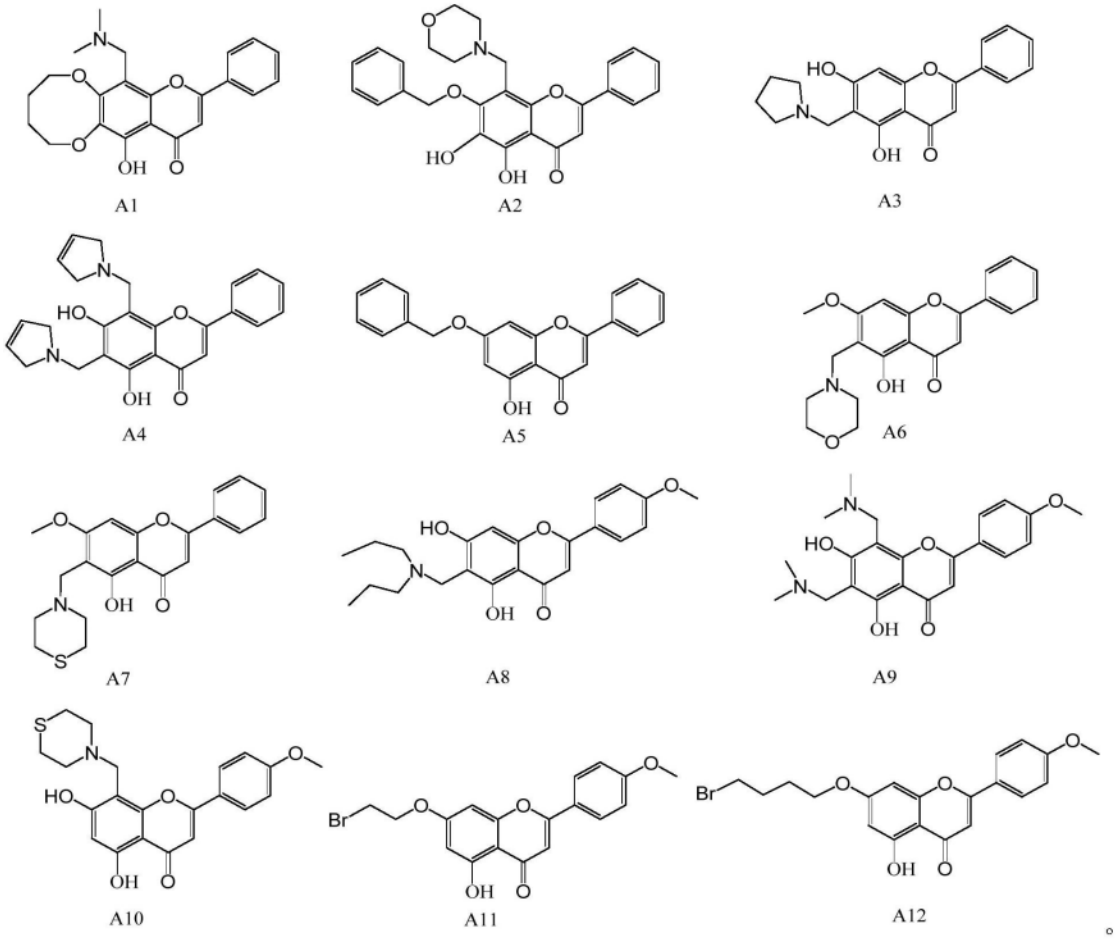
[0018] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自羟基；R^2选自C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基取代；R^3选自氢或-CH_2-Y，所述Y选自至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基；所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N或O；R^4选自氢。

[0019] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自$R^4R^5NCH_2$-或-CH_2-X；所述X选自C_3-C_6不饱和杂环基或C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^4和R^5各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代；R^3选自氢、$R^6R^7NCH_2$-或-CH_2-Y；所述Y选自C_3-C_6不饱和杂环基，所述不饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N；R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基。

[0020] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自  、  或  ；R^2选自或；R^3选自、  或  ；R^4选自或。

[0021] 在一些实施方式中，式(I)化合物选自以下A1至A12所示的化合物：

[0022]



[0023] 本申请第二方面提供了一种CDK1抑制剂,包含本申请第一方面所述的化合物中的至少一种。

[0024] 本申请第三方面提供了一种本申请第一方面所述的化合物在制备CDK1抑制剂中的用途。

[0025] 本申请有益效果:

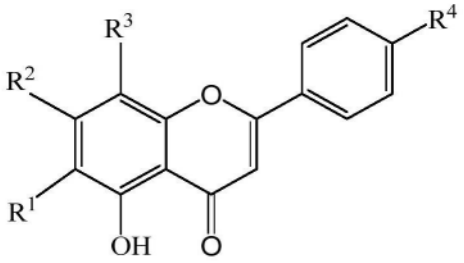
[0026] 本申请提供的具有黄酮母核结构的式(I)的化合物,具有较高的体外CDK1抑制活性,且对CDK1的抑制率高于对CDK4的抑制率,对体外MCF-7细胞和RAW264.7细胞有抑制作用;其能够用于制备CDK1抑制剂,具有很好的应用前景。

[0027] 当然,实施本申请的任一产品或方法并不一定需要同时达到以上所述的所有优点。

具体实施方式

[0028] 下面将结合本申请的实施例,对本申请中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员基于本申请所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范围。

[0029] 本申请第一方面提供了一种式(I)的化合物:

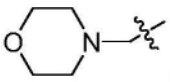
[0030] 

(I)

[0031] 其中，R^1选自氢、羟基、$R^4R^5NCH_2$-或-CH_2-X；所述X选自C_3-C_6不饱和杂环基或C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^4和R^5各自独立地选自C_1-C_6烷基；

[0032] R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代，R^1和R^2可以连接成环；

[0033] R^3选自氢、$R^6R^7NCH_2$-或-CH_2-Y；所述Y选自C_3-C_6不饱和杂环基或至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；

[0034] 且R^1和R^3不同时为  ；

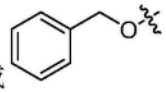
[0035] 当R^1和R^2连接成环时，Y选自$R^6R^7NCH_2$-或C_3-C_6不饱和杂环基；

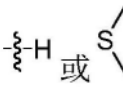
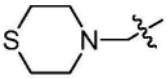
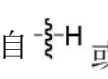
[0036] R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基；

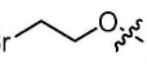
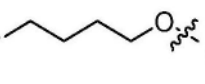
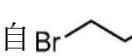
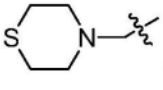
[0037] 当R^2选自C_1-C_6烷氧基且所述烷氧基上的一个氢原子被卤素取代时，R^4选自C_1-C_3烷氧基。

[0038] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1和R^2连接成C_4-C_{12}饱和杂环，所述饱和杂环的杂原子为O；R^3选自$R^6R^7NCH_2$-，R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^4选自氢。

[0039] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自氢；R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代；R^3选自氢或-CH_2-Y，所述Y选自至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基；所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N或S；R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基；当R^2选自C_1-C_6烷氧基且所述烷氧基上的一个氢原子被卤素取代时，R^4选自C_1-C_3烷氧基。

[0040] 在一些实施方式中，式(I)的化合物中：(1)R^1选自；R^2选自或  ；

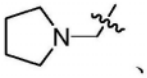
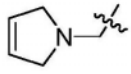
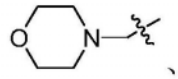
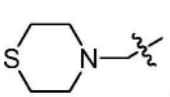
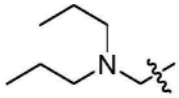
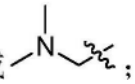
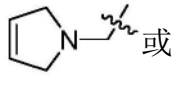
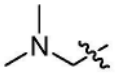
R^3选自  或  ；R^4选自或  ；或者

[0041] (2)R^1选自 ；R^2选自  或  ；R^3选自  或  ；

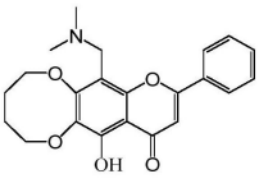
R^4选自 。

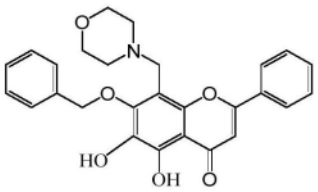
[0042] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自羟基；R^2选自C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基取代；R^3选自氢或-CH_2-Y，所述Y选自至少含有两个杂原子的C_3-C_6饱和杂环基；所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N或O；R^4选自氢。

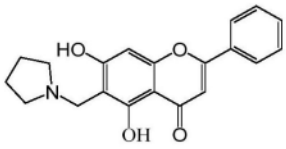
[0043] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自$R^4R^5NCH_2$-或-CH_2-X；所述X选自C_3-C_6不饱和杂环基或C_3-C_6饱和杂环基，所述不饱和杂环基、所述饱和杂环基的杂原子各自独立地选自O、N或S；R^4和R^5各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^2选自羟基或C_1-C_6烷氧基；所述烷氧基上的氢原子各自独立地可以被C_6-C_{12}芳基或卤素取代；R^3选自氢、$R^6R^7NCH_2$-或-CH_2-Y；所述Y选自C_3-C_6不饱和杂环基，所述不饱和杂环基的杂原子各自独立地选自N；R^6和R^7各自独立地选自C_1-C_6烷基；R^4选自氢或C_1-C_3烷氧基。

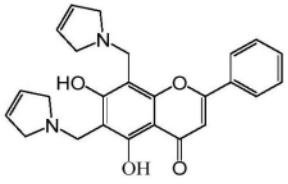
[0044] 在一些实施方式中，式(I)的化合物的R^1选自  、  、  、  、  或  ；R^2选自或；R^3选自、  或  ；R^4选自或。

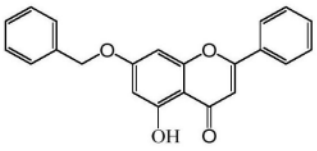
[0045] 在一些实施方式中，式(I)的化合物选自以下A1至A12所示的化合物：

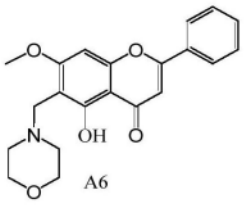

A1


A2

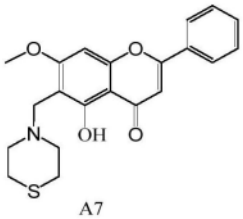

A3

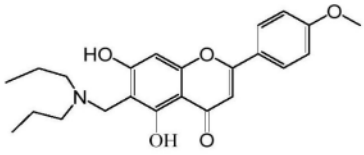

A4

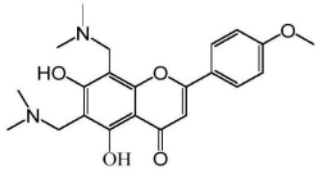

A5

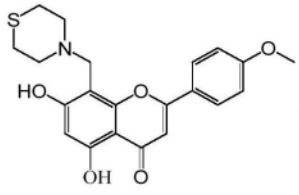

A6

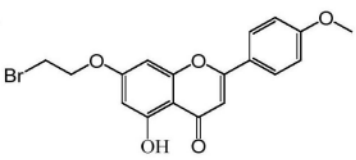
[0046]

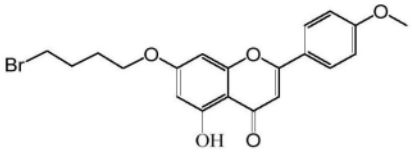

A7


A8


A9


A10


A11


A12

[0047] 本申请中，式(I)结构通式中使用的一般化学术语具有通常的含义。例如，除非另有说明，本申请所用的术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘，优选的卤素基团包括氟、氯和溴，更优选的卤素基团包括溴。

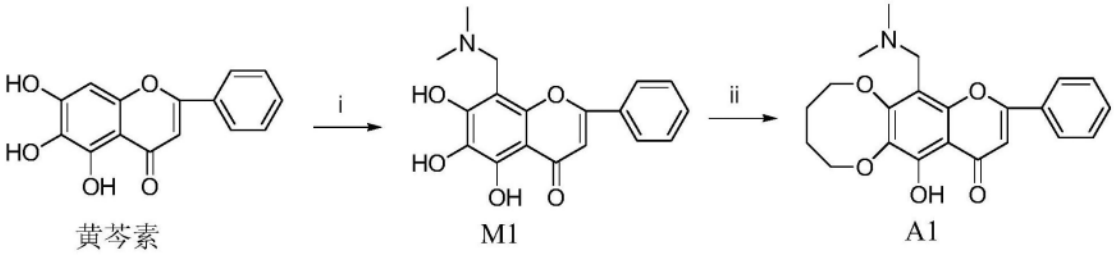
[0048] 本申请第二方面提供一种CDK1抑制剂，其包含本申请第一方面提供的化合物中的至少一种。

[0049] 本申请所述的CDK1抑制剂，其包括药学上可接受的载体和/或辅料和式(I)所示的化合物、其立体异构体、其互变异构体、其多晶型物、其溶剂化物及其药学上可接受的盐中的至少一种，还可以包括一种或多种具有治疗活性的可联合用药的化合物。

[0050] 本申请第三方面提供本申请第一方面提供的化合物在制备CDK1抑制剂中的用途。

[0051] 本申请提供的化合物的合成方法没有特别限制，可以采用本领域技术人员公知的任何方法进行合成。以下说明本申请化合物的合成过程。

[0052] 实施例1：化合物A1的合成

[0053] 

黄芩素 M1 A1

[0054] (i)称取黄芩素1.08g(0.004mol)于100mL反应瓶中，加入甲醇30mL溶解，边搅拌边加入37wt％的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和二甲胺0.241mL(0.010mol)，于45℃条件下反应。薄层色谱法监测反应进程，直至反应完全，有大量黄色固体析出；将黄色固体抽滤，用甲醇洗涤滤饼三次，将滤饼于真空干燥箱中烘干，得到化合物M1(称重1.17g，产率89.8％)。

[0055] 核磁共振氢谱分析：^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:8.05-8.07(m,2H,H-2′,6′),7.56-7.59(m,3H,H-3′,4′,5′),6.82(s,1H,H-3),4.21(s,2H,H-9),2.61(s,6H,H-10,11)。

[0056] 核磁共振碳谱分析：^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:181.2(C-4),162.6(C-2),161.3(C-7),149.8(C-8a),144.2(C-5),131.9(C-4′),131.8(C-1′),130.5(C-6),129.6(C-3′,5′),126.5(C-2′,6′),104.9(C-4a),101.5(C-3),97.0(C-8),53.5(C-9),43.2(C-10,11)。

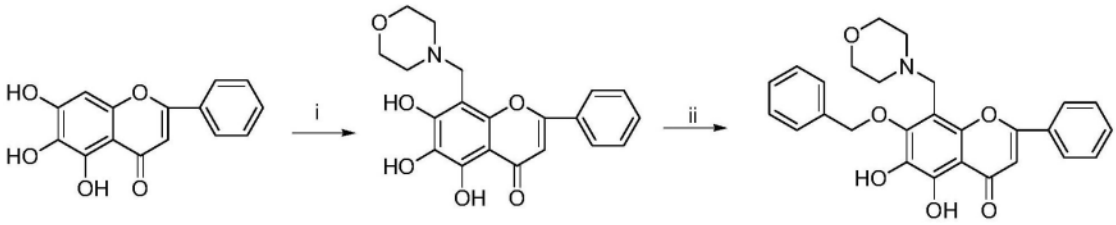
[0057] 高分辨质谱分析：HRMS(ESI)m/z[M+H]$^{+}$Calcd for $C_{18}H_{18}NO_5$ 328.1185found328.1199。

[0058] (ii)称取化合物M1 0.66g(0.002mol)，加入丙酮100mL，在搅拌条件下，依次加入1,4-二溴丁烷0.478mL(0.004mol)、碳酸钾1.28g和碘化钾1.54g，在氮气保护下，65℃条件下搅拌反应7h。将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾和碘化钾，在反应液中加入几滴甲酸，之后将反应液减压浓缩至干，降至室温后加入冰水，将化合物分散在水中形成悬浊液，调节pH至中性，然后过滤得滤饼。滤饼在真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷：甲醇＝100:1,v/v)，之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化，得到化合物A1。

[0059] 核磁共振氢谱分析：^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.93(s,1H,5-OH),8.10-8.12(m,2H,H-2',6'),7.54-7.62(m,3H,H-3',4',5'),7.06(s,1H,H-3),4.39(s,2H,H-9),4.19-4.20(m,2H,H-10),4.04-4.05(m,2H,H-13),2.09(s,6H,H-14,15),1.50-1.58(m,4H,H-11,12)。

[0060] 核磁共振碳谱分析：^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:183.2(C-4),164.0(C-2),157.6(C-7),152.9(C-8a),150.2(C-5),132.7(C-6),131.4(C-4'),130.4(C-1'),129.7(C-3',5'),126.9(C-2',6'),108.8(C-4a),105.5(C-3),104.9(C-8),73.4(C-10,13),70.8(C-9),28.8(C-11,12)。

[0061] 实施例2:化合物A2的合成

[0062] 

黄芩素 M2 A2

[0063] (i)称取黄芩素1.08g(0.004mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇30mL溶解,边搅拌边加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和吗啉0.696mL(0.008mol),于55℃条件下反应。薄层色谱法监测反应进程,直至反应完全,有大量黄色固体析出;将黄色固体抽滤,用甲醇洗涤滤饼三次,将滤饼于真空干燥箱中烘干,得到化合物M2(称重1.38g,产率93.5%)。

[0064] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d6,600MHz)δ:8.08-8.10(m,2H,H-2′,6′),7.58-7.63(m,3H,H-3′,4′,5′),6.96(s,1H,H-3),3.95(s,2H,H-9),3.62(brs,4H,H-11,12),2.61(brs,4H,H-10,13)。

[0065] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d6,150MHz)δ:182.7(C-4),163.0(C-2),154.7(C-7),148.5(C-8a),146.4(C-5),132.3(C-4′),131.6(C-1′),129.7(C-3′,5′),129.4(C-6),126.7(C-2′,6′),104.9(C-4a),104.1(C-3),100.6(C-8),66.5(C-11,12),53.1(C-10,13),52.0(C-9)。

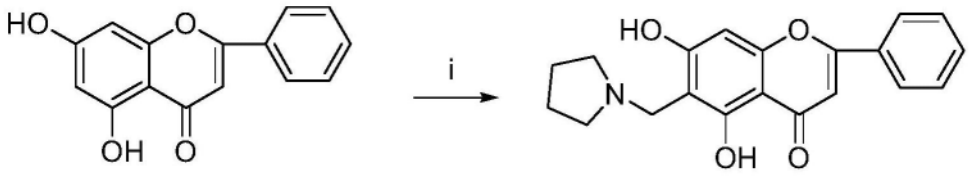
[0066] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z[M+H]$^{+}$Calcd for $C_{20}H_{20}NO_6$ 370.1291found370.1287。

[0067] (ii)称取化合物M2 1.29g(0.004mol),加入DMF(N,N-二甲基甲酰胺)40mL,在搅拌条件下,依次加入溴化苄0.594mL(0.005mol),碳酸钾1.67g和碘化钾1.99g,在氮气保护下,70℃条件下搅拌反应7h。将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾和碘化钾,在反应液中加入几滴甲酸,然后将反应液减压浓缩至干,降至室温后加入冰水,将化合物分散在水中形成悬浊液,调节pH至中性,然后过滤得滤饼。滤饼在真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物A2。

[0068] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.91(s,1H,5-OH),9.34(s,1H,6-OH),8.11-8.14(m,2H,H-2',6'),7.61-7.64(m,5H,H-3',4',5'),7.53-7.59(m,2H,H-3",5"),7.42-7.44(m,2H,H-2",6"),7.35-7.38(m,1H,H-4"),7.05(s,1H,H-3),5.25(s,2H,H-10),3.68(s,2H,H-9),3.50(brs,4H,H-12,13),2.40(brs,4H,H-11,14)。

[0069] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:183.5(C-4),164.0(C-2),153.1(C-7),148.0(C-8a),147.9(C-5),137.9(C-1"),134.8(C-4'),132.6(C-1'),131.5(C-6),129.7(C-3',5'),128.8(C-3",5"),128.50(C-4"),128.4(C-2",6"),126.9(C-2',6'),107.2(C-4a),104.9(C-3),90.74(C-8),74.8(C-10),66.7(C-12,13),53.8(C-11,14),50.8(C-9)。

[0070] 实施例3:化合物A3的合成

[0071] 

白杨素 A3

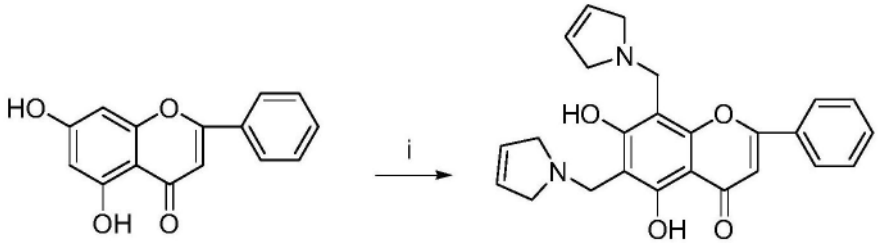
[0072] 称取白杨素1.01g(0.004mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇50mL溶解,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和四氢吡咯0.356mL(0.0043mol),于70℃条件下反应。薄层色谱法对反应进程进行监测,直至反应物斑点无明显变化,有固体析出,将固体抽滤,用甲醇洗涤滤饼三次,将滤饼于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物A3。

[0073] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:8.24(s,1H,7-OH),8.03-8.05(m,2H,H-2',6'),7.55-7.62(m,3H,H-3',4',5'),6.89(s,1H,H-3),6.42(s,1H,H-8),4.08(s,2H,H-9),3.02-3.03(m,4H,H-10,13),1.88-1.91(m,4H,H-11,12)。

[0074] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:181.7(C-4),169.2(C-2),164.4(C-7),163.0(C-8a),157.9(C-5),132.3(C-4'),131.4(C-1'),129.6(C-3',5'),126.7(C-2',6'),105.3(C-4a),103.8(C-3),102.2(C-6),94.9(C-8),53.4(C-10,13),48.5(C-9),23.4(C-11,12)。

[0075] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z[M+H]$^{+}$Calcd for $C_{20}H_{20}NO_4$ 338.1392found338.1369。

[0076] 实施例4:化合物A4的合成

[0077] 

白杨素 A4

[0078] 称取白杨素1.01g(0.004mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇50mL溶解,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和2,5-二氢吡咯0.384mL(0.005mol),于70℃条件下反应。薄层色谱法对反应进程进行监测,直至反应物斑点无明显变化,有固体析出,将固体抽滤,用甲醇洗涤滤饼三次,将滤饼于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得化合物A4。

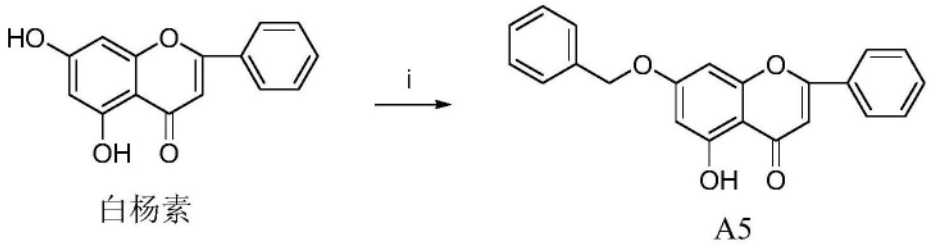
[0079] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:8.07-8.08(m,2H,H-2',6'),7.57-7.62(m,3H,H-3',4',5'),6.93(s,1H,H-3),5.85(brs,2H,H-12,13),5.82(brs,2H,H-16,17),4.14(s,2H,H-10),4.05(s,2H,H-9),3.65-3.67(m,8H,H-11,14,15,18)。

[0080] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.0(C-4),168.8(C-2),162.6(C-7),158.6(C-8a),155.3(C-5),132.3(C-4'),131.5(C-1'),129.6(C-3',5'),127.7(C-

2',6'),127.1(C-12,13),126.7(C-16,17),105.1(C-4a),104.9(C-3),102.1(C-8),101.9(C-6),59.3(C-11,14),59.2(C-15,18),49.5(C-9),47.7(C-10)。

[0081] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z[M+H]$^+$Calcd for $C_{25}H_{25}N_2O_4$ 417.1814found417.1860。

[0082] 实施例5:化合物A5的合成

[0083] 

白杨素 A5

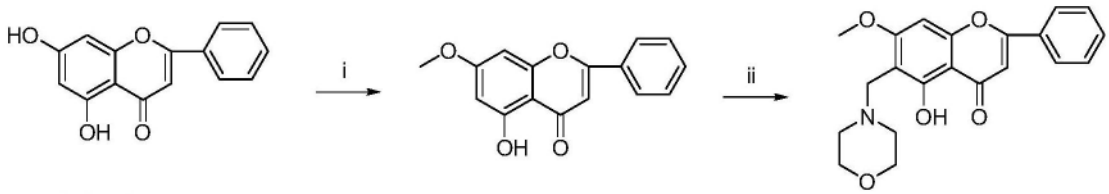
[0084] 称取白杨素0.51g(0.002mol)于三颈瓶中,加入丙酮100mL,在搅拌条件下,依次加入溴化苄0.594mL(0.005mol),碳酸钾1.66g和碘化钾1.99g,在氮气保护下,于70℃条件下搅拌反应。薄层色谱法对反应进程进行监测,生成物斑点无明显变化后,将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾和碘化钾,滤液调节pH至中性,随后减压浓缩至干。所得固体真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得化合物A5。

[0085] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.82(s,1H,5-OH),8.08-8.10(m,2H,H-2',6'),7.62-7.64(m,3H,H-3',4',5'),7.58-7.59(m,2H,H-2",6"),7.38-7.43(m,2H,H-3",5"),7.36-7.37(m,1H,H-4"),7.03(s,1H H-3),6.90(s,1H,H-8),6.48(s,1H,H-6),5.25(s,2H,H-9)。

[0086] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.6(C-4),164.8(C-2),164.0(C-7),161.7(C-8a),157.8(C-5),136.6(C-1"),132.6(C-4'),129.6(C-3',5'),129.0(C-3",5"),128.6(C-1'),128.4(C-2",6"),128.0(C-4"),126.9(C-2',6'),105.9(C-4a),105.5(C-3),99.2(C-8),94.1(C-6),70.5(C-9)。

[0087] 质谱分析:MS(ESI,positive)m/z:345.55[M+H]$^+$。

[0088] 实施例6:化合物A6的合成

[0089] 

白杨素 M6 A6

[0090] (i)称取白杨素0.51g(0.002mol)于三颈瓶中,加入无水乙醇100mL,在搅拌条件下,依次加入硫酸二甲酯0.379mL(0.004mol)和碳酸钾1.38g,在氮气保护下,65℃条件下搅拌反应4h。薄层色谱法监测反应进程,直至生成物斑点无明显变化后,将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾,滤液调节pH至中性,随后减压浓缩至干。所得固体在真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物M6。

[0091] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.81(s,1H,5-OH),8.09-8.10(m,

2H,H-2',6'),7.57-7.64(m,3H,H-3',4',5'),7.03(s,1H,H-3),6.80(d,J=2.2Hz,1H,H-8),6.39(d,J=2.2Hz,1H,H-6),3.88(s,3H,OCH_3)。

[0092] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.6(C-4),165.8(C-2),163.9(C-7),161.7(C-8a),157.8(C-5),132.6(C-4'),131.1(C-1'),129.6(C-3',5'),126.9(C-2',6'),105.8(C-4a),105.4(C-3),98.6(C-8),93.3(C-6),56.6(OCH_3)。

[0093] 质谱分析:MS(ESI,positive)m/z:269.11$[M+H]^+$。

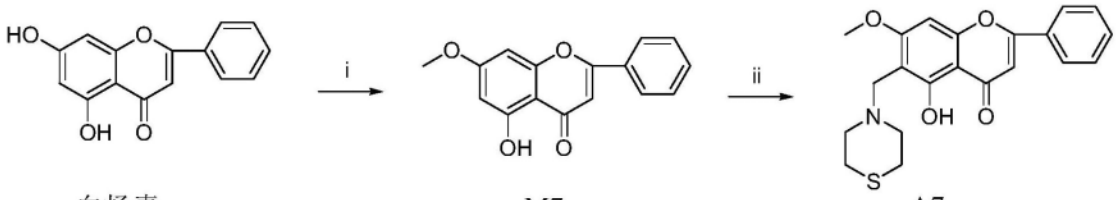
[0094] (ii)称取化合物M6 0.54g(0.002mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇40mL,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和吗啉0.348mL(0.004mol),于70℃条件下反应半小时后,加入1mL冰醋酸,薄层色谱法监测反应进程,直至反应物斑点无明显变化,有少量固体析出,旋干后使用甲醇复溶并调节pH至中性,再次旋干,将旋干后产物于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物A6。

[0095] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:13.14(s,1H,5-OH),8.11-8.12(m,2H,H-2',6'),7.58-7.65(m,3H,H-3',4',5'),7.06(s,1H,H-8),6.92(s,1H,H-3),3.90-3.92(m,3H,OCH_3),3.50-3.53(m,6H,H-9,11,13),2.40-2.45(m,4H,H-10,12)。

[0096] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.6(C-4),164.7(C-2),163.8(C-7),159.8(C-8a),157.2(C-5),132.6(C-4'),131.1(C-1'),129.6(C-3',5'),126.9(C-2',6'),108.4(C-4a),105.9(C-3),105.0(C-6),91.2(C-8),66.7(C-11,13),56.9(OCH_3),53.5(C-10.12),48.9(C-9)。

[0097] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z$[M+H]^+$Calcd for $C_{21}H_{22}NO_5$ 368.1498found368.1478。

[0098] 实施例7:化合物A7的合成

[0099] 

白杨素 M7 A7

[0100] (i)称取白杨素0.51g(0.002mol)于三颈瓶中,加入无水乙醇100mL,在搅拌条件下,依次加入硫酸二甲酯0.379mL(0.004mol)和碳酸钾1.38g,在氮气保护下,65℃条件下搅拌反应。薄层色谱用于监测反应进程,生成物斑点无明显变化后,将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾,滤液调节pH至中性,随后减压浓缩至干。所得固体在真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物M7。

[0101] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.81(s,1H,5-OH),8.09-8.10(m,2H,H-2',6'),7.57-7.64(m,3H,H-3',4',5'),7.03(s,1H,H-3),6.80(d,J=2.2Hz,1H,H-8),6.39(d,J=2.2Hz,1H,H-6),3.88(s,3H,OCH_3)。

[0102] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.6(C-4),165.8(C-2),163.9(C-7),161.7(C-8a),157.8(C-5),132.6(C-4'),131.1(C-1'),129.6(C-3',5'),126.9(C-2',6'),105.8(C-4a),105.4(C-3),98.6(C-8),93.3(C-6),56.6(OCH_3)。

[0103] 质谱分析:MS(ESI,positive)m/z:269.11[M+H]$^+$。

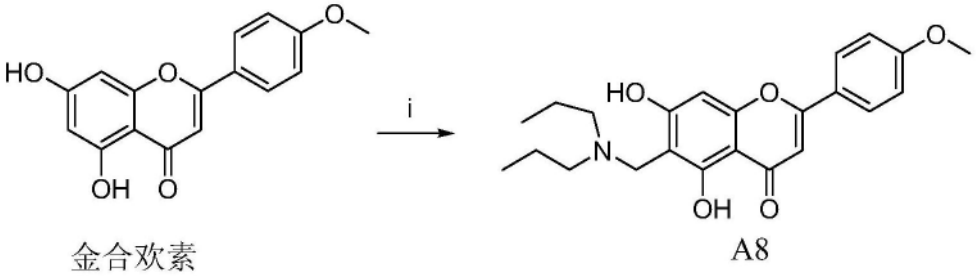
[0104] (ii)称取化合物M7 0.54g(0.002mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇40mL,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和硫代吗啉0.412mL(0.004mol),于70℃条件下反应半小时后,加入1mL冰醋酸,薄层色谱法监测反应进程,直至反应物斑点无明显变化,有少量固体析出,旋干后使用甲醇复溶并调节pH至中性,再次旋干,将产品于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物A7。

[0105] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:13.17(s,1H,5-OH),8.10-8.13(m,2H,H-2',6'),7.58-7.65(m,3H,H-3',4',5'),7.06(s,1H,H-8),6.92(s,1H,H-3),3.92(s,3H,OCH_3),3.53(s,2H,H-9),2.68-2.72(m,4H,H-10,12),2.54-2.57(m,4H,H-11,13)。

[0106] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.6(C-4),164.8(C-2),163.8(C-7),159.8(C-8a),157.2(C-5),132.6(C-4'),131.1(C-1'),129.6(C-3',5'),126.9(C-2',6'),108.6(C-4a),105.9(C-3),105.0(C-6),91.2(C-8),57.0(C-10,12),54.7(OCH_3),49.4(C-9),27.6(C-11,13)。

[0107] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z[M+H]$^+$Calcd for $C_{21}H_{22}NO_4S$ 384.1270found384.1241。

[0108] 实施例8:化合物A8的合成

[0109] 

金合欢素 A8

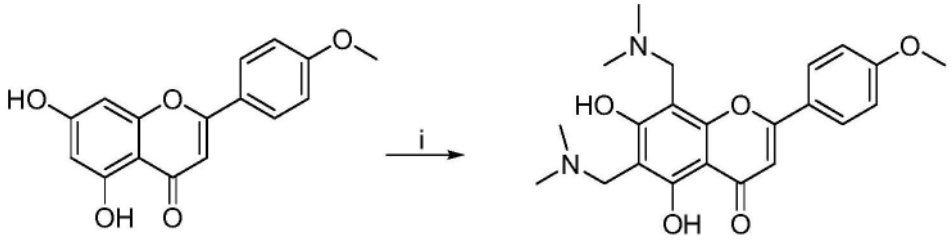
[0110] 称取金合欢素1.14g(0.004mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇50mL溶解,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和二丙胺0.820mL(0.006mol),于65℃条件下反应,用薄层色谱法监测反应进程,直至反应物斑点无明显变化,有固体析出,将固体抽滤,用甲醇洗涤滤饼三次,将滤饼于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得化合物A8。

[0111] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:8.18(s,1H,7-OH),8.01(dd,J_1=6.8Hz,J_2=2.2Hz,2H,H-2',6'),7.09-7.11(m,2H,H-3',5'),6.82(s,1H,H-3),6.38(s,1H,H-8),3.92(s,2H,H-9),3.86(s,3H,OCH_3),2.60-2.63(m,4H,H-10,13),1.55-1.60(m,4H,H-11,14),0.87(t,J=7.3Hz,6H,H-12,15)。

[0112] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.0(C-4),168.2(C-2),163.4(C-7),162.7(C-8a),159.0(C-4'),157.2(C-5),128.7(C-2',6'),123.4(C-1'),115.0(C-3',5'),104.0(C-4a),103.8(C-3),102.7(C-6),94.8(C-8),56.0(C-10,13),55.0(OCH_3),49.6(C-9),18.8(C-11,14),11.9(C-12,15)。

[0113] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z[M+H]$^+$Calcd for $C_{23}H_{28}NO_5$ 398.1967found398.1949。

[0114] 实施例9:化合物A9的合成

[0115] 

金合欢素 A9

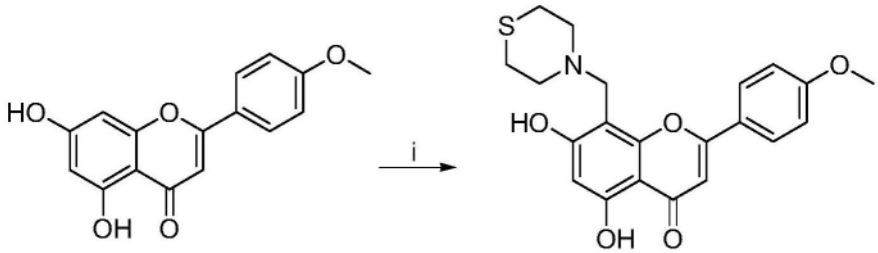
[0116] 称取金合欢素1.14g(0.004mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇50mL溶解,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和二甲胺0.303mL(0.013mol),于65℃条件下反应,用薄层色谱法监测反应进程,直至反应物斑点无明显变化,有固体析出,将固体抽滤,用甲醇洗涤滤饼三次,将滤饼于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得到化合物A9。

[0117] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:8.01(d,J=8.9Hz,2H,H-2',6'),7.12(d,J=8.9Hz,2H,H-3',5'),6.79(s,1H,H-3),3.86(s,3H,OCH_3),3.76(s,2H,H-9),3.68(s,2H,H-10),2.37(s,6H,H-11,12),2.26(s,6H,H-13,14)。

[0118] 核磁共振碳谱分析:^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:181.9(C-4),168.6(C-2),162.7(C-7),162.6(C-8a),158.3(C-4'),155.3(C-5),128.5(C-2',6'),123.8(C-1'),115.0(C-3',5'),104.1(C-4a),103.4(C-6),102.5(C-8),101.8(C-3),56.0(OCH_3),53.2(C-10),51.4(C-9),45.1(C-13,14),43.8(C-11,12)。

[0119] 高分辨质谱分析:HRMS(ESI)m/z[M+H]$^{+}$Calcd for $C_{22}H_{27}N_2O_5$ 399.1920found399.1679。

[0120] 实施例10:化合物A10的合成

[0121] 

金合欢素 A10

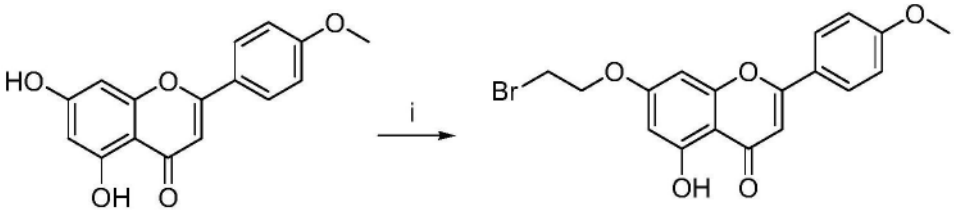
[0122] 称取金合欢素1.14g(0.004mol)于100mL反应瓶中,加入甲醇50mL溶解,在搅拌条件下,依次加入37wt%的甲醛水溶液0.486mL(含0.018mol甲醛)和硫代吗啉0.619mL(0.006mol),于65℃条件下反应,用薄层色谱法监测反应进程,直至反应物斑点无明显变化,有固体析出,将固体抽滤,用甲醇洗涤滤饼三次,将滤饼于真空干燥箱中干燥,后用硅胶层析柱分离(洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=100:1,v/v),之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化,得化合物A10。

[0123] 核磁共振氢谱分析:^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.98(s,1H,5-OH),8.01-8.05(m,2H,H-2',6'),7.10-7.14(m,2H,H-3',5'),6.86-6.88(m,1H,H-3),6.22(s,1H,H-6),3.86(s,3H,OCH_3),3.73(s,2H,H-9),2.79-2.89(m,4H,H-10,11),2.63-2.67(m,4H,H-12,13)。

[0124] 核磁共振碳谱分析：^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.5(C-4),163.7(C-2),163.5(C-7),162.8(C-8a),160.8(C-5),159.5(C-4'),128.8(C-2',6'),123.5(C-1'),115.1(C-3',5'),104.9(C-4a),103.8(C-3),101.4(C-8),99.1(C-6),56.0(C-10,11),54.6(OCH_3),52.0(C-9),27.6(C-12,13)。

[0125] 高分辨质谱分析：HRMS(ESI)m/z[M+H]$^+$Calcd for $C_{21}H_{22}NO_5S$ 400.1219found400.1196。

[0126] 实施例11：化合物A11的合成

[0127] 

金合欢素 A11

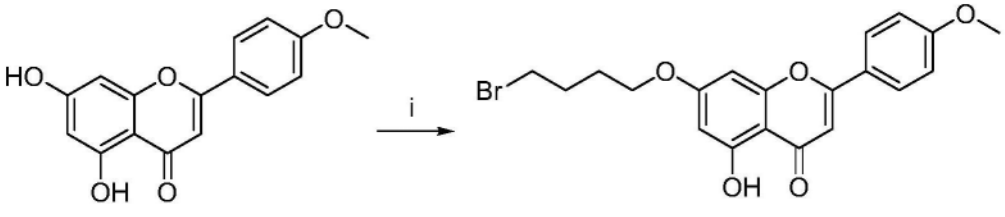
[0128] 称取金合欢素0.57g(0.002mol)于三颈瓶中，加入丙酮100mL，在搅拌条件下，依次加入1,2-二溴乙烷0.447mL(0.005mol)、碳酸钾1.66g和碘化钾1.99g，在氮气保护下，65℃条件下搅拌反应。薄层色谱法监测反应进程，生成物斑点无明显变化后，将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾和碘化钾，滤液调节pH至中性，随后减压浓缩至干。所得固体在真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷：甲醇＝100:1,v/v)，之后使用二氯甲烷和石油醚重结晶纯化，得化合物A11。

[0129] 核磁共振氢谱分析：^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.92(s,1H,5-OH),8.04-8.07(m,2H,H-2',6'),7.10-7.13(m,2H,H-3',5'),6.93(s,1H,H-3),6.83(s,1H,H-8),6.40(s,1H,H-6),4.45-4.47(m,2H,H-9),3.87(s,3H,OCH_3),3.84-3.86(t,J＝5.6Hz,2H,H-10)。

[0130] 核磁共振碳谱分析：^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.4(C-4),164.2(C-2),164.2(C-7),162.9(C-8a),161.7(C-4'),157.7(C-5),128.9(C-2',6'),123.1(C-1'),115.1(C-3',5'),105.5(C-4a),104.2(C-3),98.9(C-6),93.8(C-8),68.9(C-9),56.1(OCH_3),31.4(C-10)。

[0131] 质谱分析：MS(ESI,positive)m/z:392.14[M+H]$^+$。

[0132] 实施例12：化合物A12的合成

[0133] 

金合欢素 A12

[0134] 称取金合欢素0.57g(0.002mol)于三颈瓶中，加入丙酮100mL，在搅拌条件下，依次加入1,4-二溴丁烷0.635mL(0.005mol)、碳酸钾1.66g和碘化钾1.99g，在氮气保护下，65℃条件下搅拌反应。薄层色谱法监测反应进程，生成物斑点无明显变化后，将上述反应液过滤除去多余的碳酸钾和碘化钾，滤液调节pH至中性，随后减压浓缩至干。所得固体在真空干燥后用硅胶柱层析分离(洗脱剂为二氯甲烷：甲醇＝100:1,v/v)，之后使用二氯甲烷和石油醚

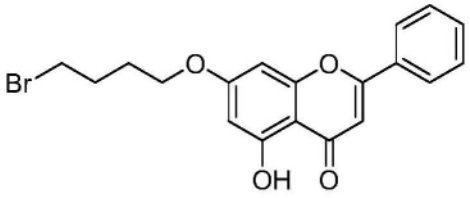
重结晶纯化，得化合物A12。

[0135] 核磁共振氢谱分析：^{1}H-NMR(DMSO-d_6,600MHz)δ:12.91(s,1H,5-OH),8.03-8.05(m,2H,H-2',6'),7.10-7.12(m,2H,H-3',5'),6.91-6.93(m,1H,H-3),6.77(s,1H,H-8),6.35-6.38(m,1H,H-6),4.06-4.34(m,2H,H-9),3.87(m,3H,OCH_3),3.29-3.37(m,2H,H-12),1.79-2.01(m,4H,H-10,11)。

[0136] 核磁共振碳谱分析：^{13}C-NMR(DMSO-d_6,150MHz)δ:182.4(C-4),164.1(C-2),162.9(C-7),162.9(C-8a),161.7(C-4'),157.7(C-5),128.8(C-2',6'),123.2(C-1'),115.1(C-3',5'),105.2(C-4a),104.2(C-3),98.8(C-6),93.6(C-8),67.9(C-9),56.1(OCH_3),30.1(C-12),29.9(C-10),28.7(C-11)。

[0137] 对比例1

[0138] 一种化合物D1，其结构式如下所示：

[0139] 

D1

[0140] 为了表征各化合物的活性效果，将各化合物进行如下活性实验。

[0141] 1、体外抑酶活性实验

[0142] 采用CDK1/Cyclin B1试剂盒(BPS Bioscience Inc.)、CDK4/Cyclin D3试剂盒(BPS Bioscience Inc.)和Kinase-Glo Max激酶检测试剂盒(Promega Corporation)对各化合物进行抑酶活性测定。

[0143] (1)实验方法

[0144] 分别使用DMSO(二甲基亚砜)将A1-A12、D1和黄芩素(阳性对照)配置成50μM的母液，之后将各母液用DMSO稀释至各化合物浓度分别为40μM、30μM、20μM和10μM。将上述各化合物浓度分别为50μM、40μM、30μM、20μM和10μM的溶液作为待测溶液。

[0145] 实验分为测试组、完全酶活性组和空白组，测试组、完全酶活性组和空白组又分别分为CDK1组和CDK4组。其中：测试组中每孔加入5μL各待测溶液、25μL底物工作液和20μL酶稀释剂(分别包括CDK1或CDK4)，完全酶活性组每孔加入5μL DMSO、25μL底物工作液和20μL酶稀释剂(分别包括CDK1或CDK4)，空白组中每孔加入5μL DMSO、25μL底物工作液和20μL 1×Kinase缓冲剂，所有测试组、完全酶活性组和空白组都设置三个复孔。

[0146] 将上述所有测试组、完全酶活性组和空白组在30℃的恒温条件下孵育(CDK1组孵育45分钟，CDK4组孵育60分钟)后加入发光试剂，继续在30℃的恒温条件下孵育15min，之后放入酶标仪中测量发光值。按照各试剂盒说明书中的方法进行加样、孵育和测定每孔的化学发光强度。

[0147] (2)数据分析

[0148] 收集各孔化学发光强度，根据下式计算抑制率：

[0149] $$抑制率=\left(1-\frac{测试组发光强度-空白组发光强度}{完全酶活性组发光强度-空白组发光强度}\right)\times 100\%$$

[0150] 根据各浓度下的抑制率，用GraphPad Prism 7.0软件分析数据，利用非线性S曲线回归拟合，得到IC_{50}(半数抑制浓度)。

[0151] (3)实验结果

[0152] 各化合物在50μM浓度下的抑制率以及选择性结果如表1所示，其中，选择性＝抑制率(CDK1)/抑制率(CDK4)。

[0153] 表1各化合物50μM浓度下抑制率以及选择性

[0154]

化合物	抑制率（%，50μM）		选择性
	CDK1	CDK4	
A1	29.40	10.96	2.68
A2	38.11	2.73	13.95
A3	31.72	NA	∞
A4	28.66	NA	∞
A5	39.51	NA	∞
A6	31.04	NA	∞
A7	20.47	NA	∞
A8	30.69	8.55	3.58
A9	35.53	2.73	13.01
A10	26.12	NA	∞
A11	37.60	1.43	26.29
A12	36.91	3.47	10.63

[0155]

黄芩素	18.85	NA	∞
D1	19.74	1.83	10.78

[0156] 注:NA表示“无活性”

[0157] 由表1结果可知，化合物A1-A12、黄芩素、D1对CDK1的抑制率均高于对CDK4的抑制率，其选择性数值均大于1。并且，化合物A1-A12对CDK1的抑制率均高于黄芩素、D1对CDK1的抑制率，说明化合物A1-A12具有更好的CDK1抑制活性。不限于任何理论，本申请发明人认为:对于黄酮类衍生物，B环4’位有甲氧基，A环8位曼尼希衍生化，6位曼尼希衍生化，7位醚化或者6,7为成环二醚，将有利于提高黄酮类衍生物的CDK1抑制活性。

[0158] 化合物A2、A5、A11、A12、黄芩素和D1的酶抑制结果(IC_{50})如表2所示。

[0159] 表2各化合物的酶抑制结果(IC_{50})

[0160]

化合物	IC_{50}（μM）	
	CDK1	CDK4
A2	42.23	543.78
A5	54.97	130.04
A11	43.64	NA
A12	51.43	NA
黄芩素	62.67	354.27
D1	58.36	NA

[0161] 注:NA表示“无活性”

[0162] 由表2结果可知,化合物A2、A5、A11、A12抑制CDK1的IC_{50}值均低于黄芩素和D1抑制CDK1的IC_{50}值,说明化合物A2、A5、A11、A12具有更好的CDK1抑制活性,且A2和A11的CDK1抑制活性比较接近。不限于任何理论,本申请发明人认为:对于黄酮类衍生物,7位醚化同时8位吗啉甲基曼尼希化,或者4’位有甲氧基同时7位醚化,对于提高CDK1抑制活性具有重要作用。

[0163] 2、体外抑制细胞增殖实验

[0164] 采用CCK-8试剂盒(北京博奥龙免疫技术有限公司)对化合物A11、D1和flavopiridol(夫拉平度,阳性对照)进行体外抑制细胞增殖实验。

[0165] (1)细胞培养

[0166] 采10v/v%胎牛血清(FBS)培养基,在37℃、5%CO_2(体积分数,其余为空气)条件下培养MCF-7细胞(人乳腺癌细胞)。

[0167] 采10v/v%胎牛血清(FBS)培养基,在37℃、5%CO_2(体积分数,其余为空气)条件下培养RAW264.7细胞(单核巨噬细胞)。

[0168] (2)细胞接种

[0169] 用对应的培养基分别对上述培养得到的细胞进行重悬,得到细胞密度为50个/μL的细胞悬液。分别添加100μL细胞悬液至96孔板中,使得细胞接种量为5000个/孔。

[0170] 将96孔板中的细胞分别置于对应的培养条件下培养过夜。

[0171] (3)添加化合物

[0172] 在相应的接种有MCF-7细胞和RAW264.7细胞的96孔板中,每孔分别加入100μL化合物A11溶液、D1溶液和夫拉平度溶液(均采用DMSO溶解后进行梯度稀释,再用各细胞对应的培养基稀释得到),使得孔中A11、D1和夫拉平度的浓度分别为30000nM、10000nM、3333nM、1111nM、370nM、123nM、41.1nM、13.7nM;采用DMSO和各细胞对应的培养基的混合物作为溶剂对照组(孔中A11、D1和夫拉平度的浓度均为0nM);且各孔DMSO终浓度为0.5v/v%,每个A11、D1和夫拉平度浓度设置三个复孔。

[0173] 将添加化合物后的96孔板中的细胞置于37℃、5%CO_2条件下继续培养24小时。

[0174] (4)数据收集和分析

[0175] 按照CCK-8试剂盒说明书中的方法,收集每孔的化学发光信号值。使用GraphPad Prism7.0软件分析数据,利用非线性S曲线回归拟合,得出剂量-响应曲线,并由此计算得到

IC_{50}值。

[0176] (5)结果分析

[0177] 各化合物的体外抑制细胞增殖实验的IC_{50}值如表3所示。

[0178] 表3各化合物的体外抑制细胞增殖实验结果(IC_{50})

[0179]

化合物	IC_{50}（μM）	
	MCF-7 细胞	RAW264.7 细胞
A11	130.65	68.36
夫拉平度	294.13	0.55
D1	201.4	108.7

[0180] 由表3结果可知,化合物A11对MCF-7细胞抑制活性超过夫拉平度(阳性对照)和D1,说明其对MCF-7细胞有很好的抑制作用;并且对RAW264.7细胞也有一定的抑制作用。不限于任何理论,本申请发明人认为:化合物A11抑制肿瘤细胞增殖的同时,还可能参与到细胞的炎症反应过程中。

[0181] 综上所述,本申请提供的具有黄酮母核结构的式(I)的化合物,具有较高的体外CDK1抑制活性,且对CDK1的抑制率高于对CDK4的抑制率,对体外MCF-7细胞和RAW264.7细胞有抑制作用;其能够用于制备CDK1抑制剂,具有很好的应用前景。

[0182] 本说明书中的各个实施例均采用相关的方式描述,各个实施例之间相同相似的部分互相参见即可,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处。

[0183] 以上所述仅为本申请的较佳实施例,并非用于限定本申请的保护范围。凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均包含在本申请的保护范围内。