



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.05.003

新型 Caspase-3 抑制剂 1, 2-苯并异噻唑-3-酮-1, 4-二取代-1, 2, 3-三唑类衍生物的合成

刘伟¹, 郭振飞², 燕志慧², 卢美琪³, 杨诚³

(1. 天津科技大学理学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
3. 天津市国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

摘要: 为探究对 Caspase-3 有更高抑制活性的非肽类小分子抑制剂, 用“点击反应”合成了一系列 1, 2-苯并异噻唑-3-酮-1, 4-二取代-1, 2, 3-三唑类衍生物. 通过体外 Caspase-3 和 Caspase-7 抑制活性测试发现, 化合物 7c 对 Caspase-3 有最好的抑制活性, IC_{50} 达到 11.0 ± 1.2 nmol/L. 为了更好的理解这些化合物与 Caspase-3 蛋白的相互作用模式, 进行了分子对接实验. 结果表明, 化合物 7c 与蛋白作用位点具有很好的结合模式, 验证了该化合物具有很好的体外 Caspase-3 抑制活性.

关键词: 抑制剂; 1, 2-苯并异噻唑-3-酮; 分子对接; 点击反应; Caspase-3

中图分类号: R914.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2014)05-0010-05

Synthesis of 1, 2-benzisothiazol-3-one-derived 1, 2, 3-triazoles as a Novel Class of Caspase-3 Inhibitors

LIU Wei¹, GUO Zhenfei², YAN Zhihui², LU Meiqi³, YANG Cheng³

(1. College of Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
3. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to get a non-peptide inhibitor with higher inhibitory activities against caspase-3, a series of 1, 2-benzisothiazol-3-one-derived 1, 4-disubstituted 1, 2, 3-triazoles was prepared using the “click reaction” and evaluated as inhibitors against caspase-3, -7. The most potent caspase-3 inhibitor was found to be 7c with IC_{50} -values of 11.0 ± 1.2 nmol/L. Moreover, in order to better rationalize the action and the binding mode of these compounds, docking studies were carried out. The result suggests that there is good binding mode between 7c and caspase-3 protein.

Key words: inhibitor; 1, 2-benzisothiazol-3-one; docking; click reaction; caspase-3

凋亡或程序性细胞死亡是细胞组织发展和保持内环境稳定的重要生理过程. 正常的细胞凋亡是机体必须的代谢过程, 但是细胞的非正常凋亡往往会引发各种各样的病症, 例如: 神经退行性疾病, 缺血性损伤, 自身免疫性疾病及癌症^[1]. Caspase 家族参与细胞凋亡的整个过程, 已发现的 15 种 Caspase 蛋白可以分为 3 类: Caspase-1、-4、-5、-11 参与白介素前体活化, 与细胞炎症有关; Caspase-2、-8、-9、-10 等是凋

亡上游调节子, 是凋亡起始者; Caspase-3、-6、-7 是凋亡的执行者^[2]. 其中, Caspase-3 在细胞凋亡中起着关键的作用. 许多疾病都与 Caspase-3 的异常激活有关, 因此, Caspase-3 蛋白被认为是 1 个有药物开发前景的靶点, Caspase-3 抑制剂的研究也成为了热点.

依据 Caspase-3 蛋白底物的特异性, 目前已设计并合成了大量肽类和非肽类抑制剂. 大部分肽类抑制剂对 Caspase-3 有很高的抑制活性, IC_{50} 一般在纳

收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-05-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(21302139)

作者简介: 刘伟(1978—), 男, 天津人, 副教授, liuwe2006@tust.edu.cn.

摩尔级别^[3-5],但是肽类抑制剂代谢稳定性差、细胞渗透性差等因素限制了其应用.这就促使了对非肽类抑制剂的研究.例如:以5-硝基靛红为母核合成了一系列的衍生物,个别衍生物对 Caspase-3 的 IC₅₀ 在纳摩尔级别^[6-7]. 噻啉酮和异噻啉酮类化合物也被证实对 Caspase-3 有很好的抑制活性,IC₅₀ 在微摩尔至毫摩尔范围^[8]. 最近,本研究组^[9]通过高通量筛选发现了1个对 Caspase-3 有抑制活性的母核,1,2-苯并异噻唑-3-酮(IC₅₀ = 46.7 μmol/L). 经结构修饰,发现其衍生物对 Caspase-3 有很好的抑制活性,IC₅₀ 达到 31 nmol/L,但是该系列化合物水溶性差,仍需继续进行结构改造.

近年来,三唑合成因“点击反应”的特异性、高产率等特点在药物化学中倍受青睐^[10]. 此外,在分子中引入1,2,3-三唑基团有如下好处:(1)1,2,3-三唑是肽键的生物等排体;(2)1,2,3-三唑代谢稳定,并能形成氢键,从而提高水溶性,有利于药物与其目标的结合;(3)1,2,3-三唑可连接2个药效团,得到1种创新双官能团药物,这在构建生物活性分子和功能分子中起到了越来越重要的作用;(4)1,2,3-三唑及其衍生物是非常重要的药物化学模型,具有生物活性多样性,如抗结核、抗 HIV 和抗菌等.此外,在已报道的 Caspase-3 抑制剂文献中,1,2,3-三唑也被引入活性分子中,用于结构改造.例如:在2008年,Ng 等^[11]报道了1,2,3-三唑类衍生物作为 Caspase-3 抑制剂,其活性都在微摩尔级别.最近,Robert 等^[7]报道了靛红1,4-二取代的1,2,3-三唑类化合物作为 Caspase-3 抑制剂,发现抑制活性最好的衍生物的 IC₅₀ 达到了 4.5 nmol/L. 因此,本文将1,2,3-三唑环引入1,2-苯并异噻唑-3-酮类 Caspase-3 抑制剂结构中,希望可以进一步提高该类化合物对 Caspase-3 的体外抑制活性,还同时评估了其同族蛋白 Caspase-7 的体外抑制活性.

1 材料与方法

1.1 主要原料

1,2-苯并异噻唑-3-酮、抗坏血酸钠、三光气、丙炔氨、各种取代苯胺等,分析纯,购自北京百灵威科技有限公司.

用于分别检测化合物对 Caspase-3 和 Caspase-7 体外抑制活性的四肽荧光底物 Ac-LDEVD-AMC 和

Ac-DEVD-AMC,购自上海吉尔生化有限公司.

甲醇、三乙胺、二氯甲烷及四氢呋喃等溶剂,分析纯,购自北京化学试剂公司,使用前均经重蒸除水.

1.2 仪器

循环水式真空泵,河南省予华仪器有限公司;集热式恒温加热磁力搅拌器,郑州长城科工贸;低温恒温反应浴,巩义市京华仪器有限公司;Avance DPX-400 MHz 核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;傅里叶变换红外光谱仪,珀金埃尔默仪器有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 目标化合物的合成方法

取代苯胺(4 mmol)、0.552 g(8 mmol)亚硝酸钠溶于 15 mL 水中,冷却至 0 °C,并滴加 15 mL (12 mmol) HCl 溶液,搅拌 30 min 即得化合物 2 溶液;向上述溶液中滴加 15 mL 叠氮化钠(0.312 g, 4.8 mmol)水溶液,反应 4 h 后用二氯甲烷萃取,收集有机层,并旋除二氯甲烷,得到有机叠氮产物 3^[12].

将溶于 40 mL 二氯甲烷的 1.28 g(40 mmol)丙炔氨逐滴加入溶于 40 mL 二氯甲烷的三光气溶液中,并滴加 6 mL 三乙胺,反应 12 h 后旋除溶剂;将残余物溶于 40 mL 二氯甲烷中,并滴入溶有 3.02 g(20 mmol)1,2-苯并异噻唑-3-酮的 20 mL 四氢呋喃溶液中,反应 12 h 后旋除溶剂;将固体溶于 30 mL 丙酮与 30 mL 水的混合溶剂中,抽滤,所得固体为末端炔化合物 6.

将 0.650 g(2.8 mmol)末端炔、4 mmol 有机叠氮溶于 30 mL 甲醇中,并加入催化剂 CuSO₄(0.032 g, 0.2 mmol)和抗坏血酸钠(0.08 g, 0.4 mmol). 室温反应 12 h,旋除溶剂,硅胶柱层析分离得目标 1,2,3-三唑类化合物(7a—7n). 目标化合物的合成路线如图 1 所示.

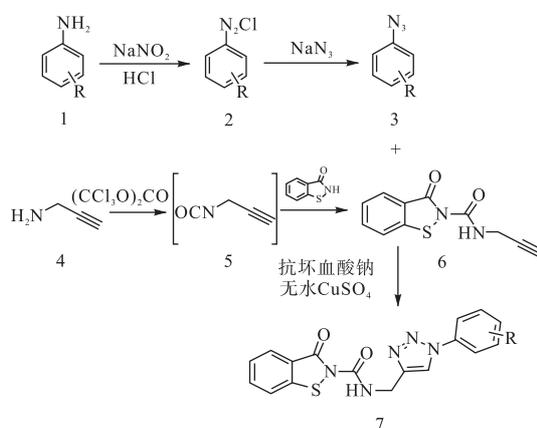


图 1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthesis pathway of target compound 7

1.3.2 Caspase-3 蛋白及 Caspase-7 蛋白的体外酶活测定

Caspase-3 抑制剂的检测方法参考文献[9]. 本实验中的 Assay buffer : 0.1% CHAPS , 50 mmol/L HEPES (pH 7.5) , 100 mmol/L NaCl , 10% glycerol , 1 mmol/L EDTA ; 底物: Ac-LDEVD-AMC. 详细操作如下: 在室温的条件下, 在 96 孔板中放入人重组 Caspase-3 蛋白, 并孵育 10 min, 加入 2 μ L 溶于 DMSO 的一定浓度的抑制剂, 然后加入 2 μ L 底物 Ac-LDEVD-AMC, 收集荧光值 10 min, 依据所收集的荧光数据计算出该化合物的 15 个浓度梯度的剩余活性, 然后用 GraphPad Prism 5 作图分析, 横坐标为化合物浓度的常用对数值, 纵坐标为剩余活性. 然后计算出各个化合物的 IC_{50} .

人重组 Caspase-7 酶活测定实验条件与上述 Caspase-3 的类似, 只是底物改为 Ac-DEVD-AMC.

1.3.3 化合物 7c 与 Caspase-3 蛋白的分子对接

为了探究抑制剂与 Caspase-3 蛋白活性位点间的相互作用以及结合模式, 将抑制 Caspase-3 活性最好的化合物 7c 在 Schrödinger Suite 2010 软件中采用格莱德标准进行分子对接. 从 PDB 蛋白质网站选取与 Caspase-3 蛋白共晶的小分子化合物 (PDB ID code 3 H0E) 作为参照. 并且, 按以下方式处理蛋白: 去掉所有的硫酸根离子、水分子; 优化氢键网络; 用 LigPrep2.4 处理配体, 用 OPLS2005 力场处理配体的局部电荷, 并产生蛋白初始的 3 D 结构; 以配体为中心, 建立 1 个“盒子”, 大小为 1.2 nm.

2 结果与讨论

2.1 化合物 7c 的表征结果

抑制活性最好的化合物 7c 的核磁图谱如图 2 所示. 化合物 7c 的结构表征数据如下: 收率 0.72 g, 70%; 白色固体; 熔点 209.2~209.8 $^{\circ}$ C; 1 H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.36 (t, J = 6.0 Hz, 1 H), 8.74 (s, 1 H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.97~7.93 (m, 3 H), 7.80 (t, J = 7.6 Hz, 1 H), 7.52~7.42 (m, 3 H), 4.71 (d, J = 6.0 Hz, 2 H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO) δ 164.9, 162.1 (d, J = 244 Hz), 151.3, 145.9, 141.3, 134.5, 133.7 (d, J = 3 Hz), 127.0, 126.5, 125.1, 122.8 (d, J = 8 Hz), 122.6, 121.93, 117.2 (d, J = 23 Hz), 36.1; IR: 3 295, 1 699, 1 665, 1 516; ESI-

MS: 369.99 (M + H) $^{+}$.

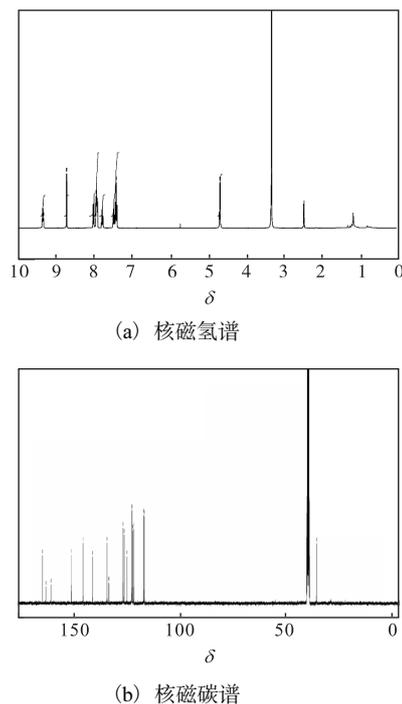


图 2 化合物 7c 的核磁表征图

Fig. 2 NMR spectrum of compound 7c

其他目标化合物的表征图谱和表征数据略.

2.2 生物活性测试

以先前合成的 1, 2-苯并异噻唑-3-酮衍生物^[9]作为阳性对照, 对一系列 1, 4-二取代-1, 2, 3-三唑类衍生物进行了活性评估, 其 IC_{50} 值见表 1.

由表 1 可以看出: 大部分化合物对 Caspase-3 和 Caspase-7 的抑制活性都在纳摩尔级别; 在所合成的目标化合物中, 7c 对 Caspase-3 和 Caspase-7 都有很好的抑制活性, IC_{50} 分别是 11.0 ± 1.2 nmol/L 和 5.2 ± 0.4 nmol/L, 7 m 对 Caspase-3 和 Caspase-7 有最低的抑制活性, IC_{50} 分别是 $6\ 830 \pm 560$ nmol/L 和 $16\ 730 \pm 2.7$ nmol/L; 有趣的现象是目标化合物对 Caspase-7 的抑制活性普遍比 Caspase-3 的高, 例如: 7b 和 7c 对 Caspase-3 的抑制活性分别为 $IC_{50} = 15.0 \pm 0.9$ nmol/L 和 11.0 ± 1.2 nmol/L, 而 7b 和 7c 对 Caspase-7 的抑制活性分别为 $IC_{50} = 7.1 \pm 0.5$ nmol/L 和 5.2 ± 0.4 nmol/L, Chu 等^[7]在 2011 年也报道了类似结果; 化合物 7j 对 Caspase-3 的抑制活性大约是化合物 7i 对 Caspase-3 的抑制活性的 5 倍, 而对于 Caspase-7 的抑制活性, 化合物 7j 大约为化合物 7i 的 8 倍; 引入 1, 2, 3-三唑基团后, 化合物 7c 对 Caspase-3 的抑制活性是阳性对照的 3 倍左右.

表1 目标化合物7及阳性对照对人重组Caspase-3和Caspase-7的抑制活性

Tab. 1 Inhibitory activities of compounds 7 and positive control against human recombinant Caspase-3 and Caspase-7

化合物	R	收率/ %	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)	
			Caspase-3	Caspase-7
阳性对照			31.0	1 050.0
7a		72	11.4 ± 1.5	ND
7b		71	15.0 ± 0.9	7.1 ± 0.5
7c		70	11.0 ± 1.2	5.2 ± 0.4
7d		73	56.1 ± 2.5	30.6 ± 1.2
7e		72	ND	13.1 ± 1.8
7f		71	20.7 ± 0.1	14.6 ± 1.1
7g		70	ND	ND
7h		73	17.2 ± 1.4	17.2 ± 2.7
7i		75	130.2 ± 5.6	86.8 ± 8.8
7j		74	27.8 ± 4.4	11.0 ± 0.7
7k		73	ND	ND
7l		75	24.8 ± 2.1	10.0 ± 0.4
7m		71	6 830.0 ± 560.0	16 730.0 ± 2.7
7n		76	76.8 ± 3.2	25.3 ± 5.5

注: 阳性对照指 1,2-苯并异噻唑-3-酮衍生物,其结构为^[9]

ND 表示萃灭率高于 25%,可能存在假阳性,所以没给出数值;表中化合物的母体结构为

2.3 分子对接

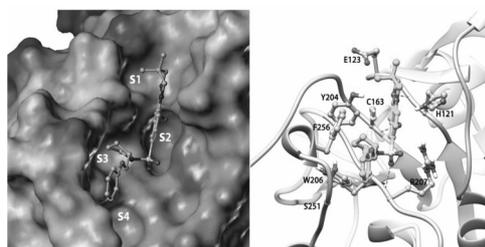
为了阐明 1,2,3-三唑化合物的生物活性,以便引导今后的结构改造,将化合物7c与Caspase-3蛋白进行了分子对接。为方便比较,将共晶抑制剂和阳性对照也与Caspase-3蛋白进行了对接,如图3所示。

由图3(a)可知:Caspase-3的活性位点包括S1、S2、S3、S4共4个口袋。共晶抑制剂小分子很好地填充在了4个口袋里面,在S1口袋里面,共晶抑制剂的噻唑与主链上H121的羰基形成了氢键,共晶抑制剂的羰基和磺酰基与主链上C163和R207上的NH分别形成了2个氢键;另外,共晶抑制剂的吡咯环和苯氧环在S3、S4口袋里面也有疏水作用。

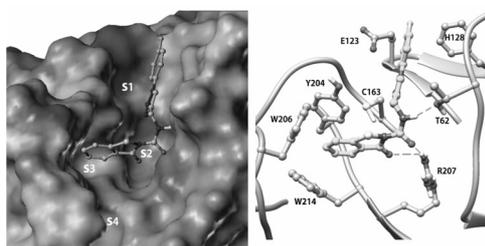
由图3(b)可知:与共晶抑制剂结合模式相似,化合物7c很好地填充在S1、S2、S3口袋里面,脲结构

上的羰基和NH与R207和T62在S2口袋里面形成了3个氢键;7c的苯并异噻唑上的苯环深深地插入了疏水的S3口袋,形成了很强的疏水作用;而且,7c的对氟基苯环与F128残基有 π - π 共轭。综上所述,7c与Caspase-3有很好的结合,验证了它对Caspase-3蛋白有非常好的体外抑制活性。

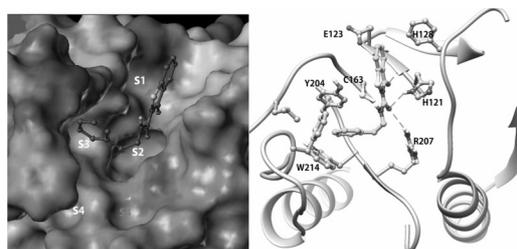
由图3(c)可知:与化合物7c的对接模型相似,阳性对照也是很好地填充在S1、S2、S3口袋里面,脲结构上的羰基和NH与R207和H121形成了3个氢键。但是,它的乙基苯环仅与Y204、W214上面的2个苯环形成弱的疏水作用。因此,化合物7c的活性是阳性对照的3倍左右。



(a) 共晶抑制剂



(b) 化合物7c



(c) 阳性对照化合物

图3 共晶抑制剂、化合物7c及阳性对照与Caspase-3的静电势表面图和作用模式图

Fig. 3 Electrostatic potential groove and interactive map between co-crystallized inhibitor, synthesized inhibitor 7c, and the control with Caspase-3, respectively

3 结语

本文合成了一系列结构新颖的1,4-二取代的

1, 2, 3-三唑类化合物, 并对其进行了分子水平的活性评价. 首先, 探究了它们对 Caspase-3 和 Caspase-7 的体外酶活活性, 结果表明目标化合物对 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性普遍达到纳摩尔级. 其次, 分子对接实验表明, 化合物7c 与 Caspase-3 蛋白可以形成多个氢键, 并有很强的疏水和 π - π 堆积作用, 良好的结合效果佐证了其具有很好的体外抑制活性. 这些实验结果为 Caspase-3 抑制剂的结构改造提供了方向.

参考文献:

- [1] Howley B, Fearnhead H O. Caspases as therapeutic targets[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, 12 (5a) : 1502–1516.
- [2] Podichetty A K, Wagner S, Faust A, et al. Fluorinated isatin derivatives. Part 3. New side-chain fluoro-functionalized pyrrolidinyl sulfonyl isatins as potent caspase-3 and-7 inhibitors[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2009, 1 (5) : 969–989.
- [3] Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis[J]. *Nature*, 1995, 376 (6535) : 37–43.
- [4] Newton A S, Glória P, Gonçalves L M, et al. Synthesis and evaluation of vinyl sulfones as caspase-3 inhibitors. A structure–activity study[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45 (9) : 3858–3863.
- [5] Glória P, Coutinho I, Gonçalves L M, et al. Aspartic vinyl sulfones: Inhibitors of a caspase-3-dependent pathway[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46 (6) : 2141–2146.
- [6] Chu W, Zhang J, Zeng C, et al. N-benzylisatin sulfonamide analogues as potent caspase-3 inhibitors: Synthesis, in vitro activity, and molecular modeling studies[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48 (24) : 7637–7647.
- [7] Chu W H, Rothfuss J, Zhou D, et al. Synthesis and evaluation of isatin analogs as caspase-3 inhibitors: Introduction of a hydrophilic group increases potency in a whole cell assay[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21 (8) : 2192–2197.
- [8] Kravchenko D V, Kysil V M, Tkachenko S E, et al. Pyrrolo[3, 4-c]quinoline-1, 3-diones as potent caspase-3 inhibitors. Synthesis and SAR of 2-substituted 4-methyl-8-(morpholine-4-sulfonyl)-pyrrolo[3, 4-c]quinoline-1, 3-diones[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 40 (12) : 1377–1383.
- [9] Liu D Z, Tian Z, Yan Z H, et al. Design, synthesis and evaluation of 1, 2-benzisothiazol-3-one derivatives as potent caspase-3 inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21 (11) : 2960–2967.
- [10] Meldal M, Tornøe C W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108 (8) : 2952–3015.
- [11] Ng S L, Yang P Y, Chen K T, et al. “Click” synthesis of small-molecule inhibitors targeting caspases[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2008, 6 (5) : 844–847.
- [12] Pagliai F, Pirali T, Del Grosso E, et al. Rapid synthesis of triazole-modified resveratrol analogues via click chemistry[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49 (2) : 467–470.

责任编辑: 常涛