



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1950376 B

(45) 授权公告日 2010.09.08

(21) 申请号 200580014409.8

代理人 陈文青

(22) 申请日 2005.05.26

(51) Int. Cl.

(66) 本国优先权数据

C07D 493/08(2006.01)

200410044336.4 2004.05.26 CN

A61K 31/352(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 31/12(2006.01)

2006.11.06

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/CN2005/000730 2005.05.26

Hikino, Hiroshi 等. Structure of curcumol. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 14 11.1966, 14(11), 1241-9.

(87) PCT申请的公布数据

W02005/116036 ZH 2005.12.08

袁文学等. 莪术醇磷酸酯单钠抗肿瘤实验研究. 沈阳药学院学报 1 3.1984, 1(3), 210-213.

(73) 专利权人 杭州民生药业有限公司

地址 310000 中国浙江省杭州市余杭塘路108号

Inayama, Seiichi 等. The absolute stereostructure of curcumol isolated from Curcuma wenyujin. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 32 9.1984, 32(9), 3783-6.

专利权人 绍兴民生医药有限公司

审查员 毛丹

(72) 发明人 王树龙 郭殿武 孟昭珂

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

权利要求书 5 页 说明书 48 页 附图 1 页

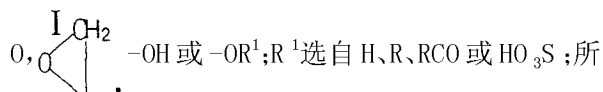
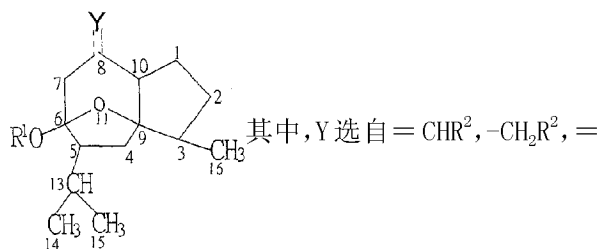
(54) 发明名称

瘤或抗病毒的药物中的应用。

莪术醇衍生物、含该衍生物的组合物及所述衍生物的制药用途

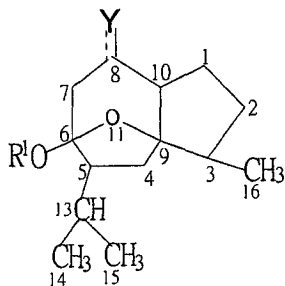
(57) 摘要

本发明提供了下式具有下式 I 结构的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐:



述的 R 选自 H; 饱和的或不饱和的直链 C₁₋₁₀ 烷基等; R² 选自 F; Cl; Br; I; H; -OH; -OR; -HSO₃ 等; 条件是 R¹, R² 不同时为 H。本发明也提供了含有所述衍生物或其药学上可接受的盐的抗肿瘤或抗病毒的药物组合物。本发明进一步提供了所述衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防和 / 或治疗肿

1. 一种具有下式 I 结构的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐：



I

其中, Y 选自 $=\text{CHR}^2$ 或 $-\text{CH}_2\text{R}^2$;

R^1 选自 H、R、RCO 或 HO_3S ;

所述的 R 选自饱和的或不饱和的直链 C_{1-10} 烷基;饱和的或不饱和的带支链的 C_{3-10} 烷基;饱和的或不饱和的、任选地被一个或多个选自硝基、磺酸基、卤原子和羟基的取代基所取代的 C_{6-12} 芳烃基;

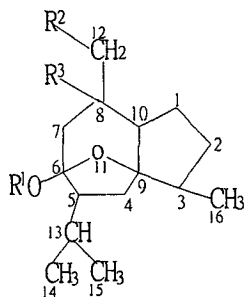
R^2 选自 F;Cl;Br;I;H; $-\text{OH}$; $-\text{HSO}_3$; $-\text{NO}_3$; RNH- ; $\text{R}'\text{NR}''$, 其中 R' 和 R'' 可相同或不同,各自选自如所述 R 所限定的基团;

或者 R^2 选自 ;

条件是 R^1 、 R^2 不同时为 H,

当 Y 为 $=\text{CH}_2$ 时, R^1 不为 CH_3 、 CH_3CH_2 、 CH_3CO 、 Br --CO ;

当 Y 为 $-\text{CH}_2\text{R}^2$ 时,所述的衍生物具有通式 II :



II

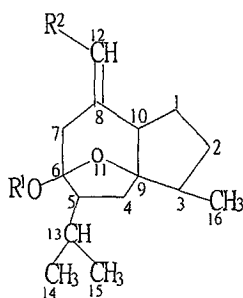
其中 R^1 、 R^2 的定义同上,

R^3 选自 F;Cl;Br;I;H; $-\text{OH}$; $-\text{HSO}_3$; $-\text{NO}_3$; $-\text{RNH}$; $\text{R}'\text{NR}''$, 其中 R' 和 R'' 可相同或不同,各自选自如所述 R 所限定的基团;

条件是 R^1 、 R^2 和 R^3 不同时为 H。

2. 根据权利要求 1 所述的莪术醇衍生物基或其药学上可接受的盐,其中所述的芳烃基选自 Ar- 、 ArCH_2- 、 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_3\text{ArCH}_2\text{CH}_2-$, Ar- 为苯基,或是被 F、Cl、Br、I、硝基、磺酸基或 1-3 个羟基取代的苯基。

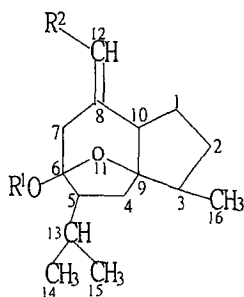
3. 根据权利要求 1 所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐,其中 Y 为 $=\text{CHR}^2$,所述的衍生物具有下式 III 结构:



III

其中 R^1 和 R^2 的定义与权利要求 1 中的相同。

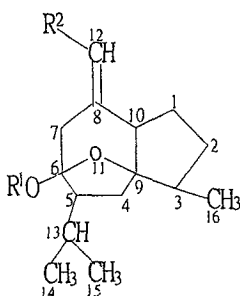
4. 根据权利要求 3 所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R^2 为 H。
5. 根据权利要求 3 所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R^1 为 HO_3S 、丙酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基。
6. 根据权利要求 3 所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 R^2 为 H, R^1 为 HO_3S 、丙酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基。
7. 一种莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐, 其中所述的衍生物或其药学上可接受的盐选自下列化合物:


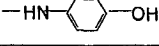
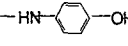




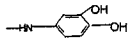
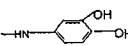


III

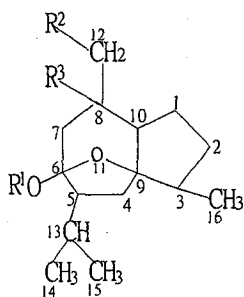
其中 R^2 为 H, R^1 为 HO_3S 或 NaO_3S 。

8. 一种莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐, 其中所述的衍生物或其药学上可接受的盐选自下列化合物:




化合物简称	R ¹	R ²
莪术醇丁酯	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO-	H
莪术醇异丁酯	(CH ₃) ₂ CHCO-	H
莪术醇苯甲酸酯		H
莪术醇对羟苯胺	H	
莪术醇对羟苯胺盐酸盐	H	
莪术醇哌嗪	H	
莪术醇哌嗪盐酸盐	H	
莪术醇杂环乙胺	H	
莪术醇杂环乙胺盐酸盐	H	
莪术醇 3, 4-二羟基苯胺	H	
莪术醇 3, 4-二羟基苯胺盐酸盐	H	
莪术醇正丁胺	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
莪术醇正丁胺盐酸盐	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
莪术醇叔丁胺	H	(CH ₃) ₃ CNH-
莪术醇叔丁胺盐酸盐	H	(CH ₃) ₃ CNH-
莪术醇单溴化物	H	-Br
莪术醇单羟基	H	-OH
莪术醇单硝酸酯	H	-NO ₃
莪术醇磺酸酯	HSO ₃ -	H
莪术醇磺酸酯钠盐	NaSO ₃ -	H
莪术醇丙烯酸酯	CH ₂ =CHCO-	H
莪术醇二乙醇胺	H	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-
莪术醇二乙醇胺盐酸盐	H	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-
莪术醇甲醚溴化物	CH ₃	-Br
莪术醇甲醚正丁胺	CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
莪术醇甲醚正丁胺盐酸盐	CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
莪术醇乙醚硝酸酯	CH ₃ CH ₂ -	-NO ₃

9. 一种莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐,其中所述的衍生物或其药学上可接受的盐选自下列化合物:

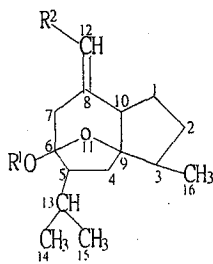


II

式中各基团的定义如下:

化合物简称	R ¹	R ²	R ³
莪术醇双溴物	H	-Br	-Br
莪术醇双硝酸酯	H	-NO ₃	-NO ₃
莪术醇双羟基物	H	-OH	-OH
无双键莪术醇单溴化物	H	H	-Br
无双键莪术醇单羟基物	H	H	-OH
无双键莪术醇单硝酸酯	H	H	-NO ₃
无双键莪术醇对羟苯胺	H	H	-HN-  -OH
无双键莪术醇对羟苯胺盐酸盐	H	H	-HN-  -OH
莪术醇双对羟苯胺	H	-HN-  -OH	-HN-  -OH
莪术醇双对羟苯胺盐酸盐	H	-HN-  -OH	-HN-  -OH
莪术醇双哌嗪	H		
莪术醇双哌嗪盐酸盐	H		
无双键莪术醇哌嗪	H	H	
无双键莪术醇哌嗪盐酸盐	H	H	
无双键莪术醇甲醚正丁胺	CH ₃	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH
无双键莪术醇甲醚正丁胺盐酸盐	CH ₃	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH

10. 一种莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐,其中所述的衍生物或其药学上可接受的盐选自下列化合物:



化合物简称	R ¹	R ²
莪术醇对羟苯胺	H	
莪术醇对羟苯胺盐酸盐	H	
莪术醇丁酯	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO-	H
莪术醇异丁酯	(CH ₃) ₂ CH ₂ CO-	H
莪术醇苯甲酸酯		H
莪术醇单溴化物	H	-Br
莪术醇磺酸酯	HSO ₃ -	H
莪术醇磺酸酯钠盐	NaSO ₃ -	H
莪术醇哌嗪	H	
莪术醇哌嗪盐酸盐	H	
莪术醇正丁胺	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
莪术醇正丁胺盐酸盐	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
莪术醇叔丁胺	H	(CH ₃) ₃ CNH-
莪术醇叔丁胺盐酸盐	H	(CH ₃) ₃ CNH-

11. 一种抗肿瘤或抗病毒的药物组合物,它包含药物有效量的如权利要求 1-10 任一所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的赋形剂和 / 或添加剂。

12. 如权利要求 1-10 任一所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防和 / 或治疗肿瘤的药物中的应用。

13. 如权利要求 1-10 任一所述的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐在制备抗病毒药物中的应用。

14. 根据权利要求 13 所述的应用,其中所述的病毒选自 HIV 病毒、流感病毒、疱疹病毒和乙肝病毒。

莪术醇衍生物、含该衍生物的组合物及所述衍生物的制药用途

技术领域

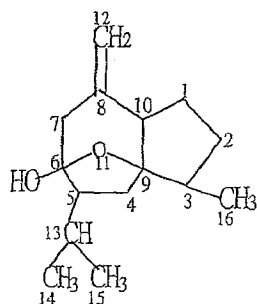
[0001] 本发明涉及莪术醇衍生物、含该衍生物的组合物及所述衍生物在制备抗肿瘤、抗病毒药物中的应用。

背景技术

[0002] 莪术为姜科植物蓬莪术、广西莪术或温莪术（温郁金）的根茎。味苦、辛，性温。能行气破血，消积止痛。主治症瘕痞块、淤血经闭、食积胀痛。其挥发性油用于治疗宫颈癌，已经收入 1977 年中国药典（第 463 页）。其有效成分为挥发性油，含量为 1% -2.5%，油中主要成分为多种倍半萜类：莪术酮、莪术双酮、新郁金二酮、表莪术醇、莪术烯、莪术醇、异莪术醇、原莪术醇、去氢莪术二酮等二十余种化学成分。而莪术醇和莪二酮是莪术油中治疗癌症主要的有效成分。

[0003] 莪术醇 (Curcumol)，也叫姜黄环氧奥醇、姜黄醇。分子式： $C_{15}H_{24}O_2$ ，分子量：236.34，[CAS]4871-97-0，熔点 141-142，具有以下的结构式：

[0004]



[0005] 莪术醇 75mg/Kg 皮下注射对小鼠肉瘤 37、宫颈癌、艾氏腹水癌 EAC 均有较高的抑制率。肿瘤明显减小者，可见瘤组织周围纤维细胞明显增多，内有一层淋巴细胞，吞噬细胞包围肿瘤细胞等免疫反应出现。

[0006] 莪术醇不但有明显的抗肿瘤作用，而且还有免疫、升白、抗血栓、抗菌、保肝、防肾衰竭等作用。同时，无明显的毒性，副作用也比较小。

[0007] 所以，莪术醇是一种十分有用的天然药物，但是也存在着不少的缺陷：

[0008] 1、水溶性极差，难于制成合适浓度的稳定的药液。

[0009] 2、瘤体和局部注射时，疼痛较重。推注过快会出现胸闷、面部潮红、呼吸困难等症状。

[0010] 3、治疗肿瘤的种类有局限性。

[0011] 4、毒性比较大。

[0012] 虽然对早期宫颈癌的治疗总有效率达到 70% 以上，但是，还存在进一步提高药效的可能。

发明内容

[0013] 本发明的一个目的是提供稳定性、溶解性好，在脂相和水相中的分配系数更佳、抗

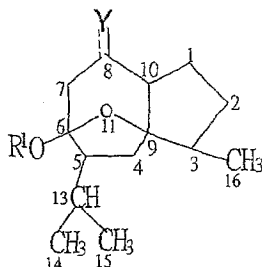
肿瘤、抗肿瘤的谱更广、药效更好、毒性小的莜术醇衍生物。

[0014] 本发明的另一个目的是提供含有所述莜术醇衍生物的药物组合物

[0015] 本发明的再一个目的是提供所述的莜术醇衍生物在制药中的应用。

[0016] 本发明是通过如下的构思实现的：一种具有下式 I 结构的莜术醇衍生物或其药学上可接受的盐：

[0017]



I

[0018] 其中, Y 选自 $=\text{CHR}^2$, $-\text{CH}_2\text{R}^2$, $=\text{O}$, $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$, $-\text{OH}$ 或 $-\text{OR}^1$;

[0019] R^1 选自 H、R、RCO 或 HO_3S ;

[0020] 所述的 R 选自 H; 饱和的或不饱和的直链 C_{1-10} 烷基; 饱和的或不饱和的带支链的 C_{3-10} 烷基, 或 C_{3-10} 烷醚, C_{3-10} 烷硫醚; 饱和的或不饱和的、任选地被一个或多个选自硝基、磺酸基、卤原子和羟基的取代基所取代的 C_{3-8} 环烷基或 C_{6-12} 芳烷基;

[0021] Y^1NY^2 、 Y^1CONY^2 , 其中 Y^1 为 H 或 C_{1-8} , Y^2 为 C_{1-8} ;

[0022] 选自： $\begin{array}{c} (Z)_n \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} (Z)_n \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} (Z)_n \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} (Z)_n \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} (Z)_n \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} (Z)_n \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$ 的杂环, 其中 P 为 S, O 或 N, Z 为一个或多个选自 H、羟基, 饱和的或不饱和的直链 C_{1-6} 烷基、饱和的或不饱和的带支链的 C_{3-6} 烷基, $n = 1-3$; 或者

[0023] R^1 为咖啡酸、藤黄酸、异藤黄酸、新藤黄酸或甘草酸的酰基;

[0024] R^2 选自 F; Cl; Br; I; H; $-\text{OH}$; $-\text{OR}$; $-\text{HSO}_3$; $-\text{NO}_3$; RNH- ; $\text{R}'\text{NR}''$, 其中 R' 和 R'' 可相同或不同, 各自选自如所述 R 所限定的基团; $\text{H}_2\text{NRNH-}$;

[0025] 或者 R^2 为选自吡啶基、吡咯基、咪唑基、三氮唑基、四唑基、二噁唑基、二噁二唑基、

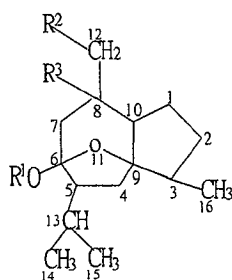
哌啶基、 R-N 、 --- 、 --- 、 --- 、 --- 或 --- ;

[0026] 条件是 R^1 、 R^2 不同时为 H,

[0027] 当 Y 为 $-\text{OH}$ 或 $-\text{OR}^1$ 时, $\text{Y}\cdots$ 为单键,

[0028] 当 Y 为 $-\text{CHR}^2$ 时, 所述的衍生物具有通式 II:

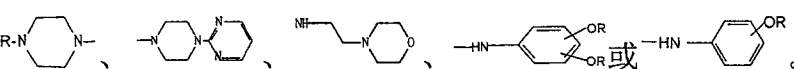
[0029]



II

[0030] 其中 R^1, R^2 的定义同上,

[0031] R^3 选自 F ;Cl ;Br ;I ;H ;-OH ;-HSO₃ ;-NO₃ ;-RNH ;R' NR'', 其中 R' 和 R'' 可相同或不同,各自选自如所述 R 所限定的基团 ;H₂NRNH- ;

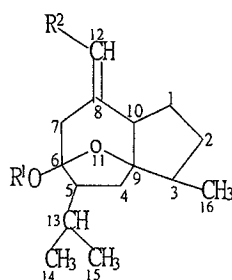
[0032] 或者 R^2 为选自吡啶基、吡咯基、咪唑基、三氮唑基、四唑基、二噁唑基、二噁二唑基、哌啶基、。

[0033] 在优选的技术方案中,所述的芳烃基优选地选自 Ar-, ArCH₂-, ArCH₂CH₂-, CH₃ArCH₂CH₂-, Ar- 为苯基,或是被 F、Cl、Br、I、硝基、磺酸基或 1-3 个羟基取代的苯基。当 Y 为 =CHR² 时, R^2 宜为 H ; R^1 宜为 HO₃S、丙酰基、丁酰基、异丁酰基或苯甲酰基。


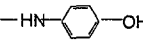
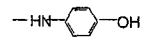




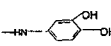
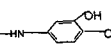
[0034] 在另一个优选的实施方案中,当 Y 为 =CHR² 时, R^2 为 H, R^1 为 HO₃S 或 NaO₃S。

[0035] 最好的莜术醇衍生物或其药学上可接受的盐选自下列化合物 :

[0036]



III

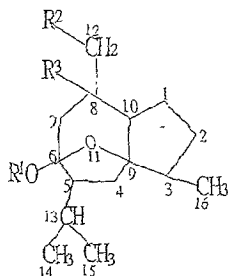
编号	化合物简称	R ¹	R ²
1	莪术醇乙酯	CH ₃ CO-	H
2	莪术醇丁酯	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO-	H
3	莪术醇异丁酯	(CH ₃) ₂ CH ₂ CO-	H
4	莪术醇苯甲酸酯		H
5	莪术醇对羟苯胺	H	
6	莪术醇对羟苯胺盐酸盐	H	
7	莪术醇哌嗪	H	
8	莪术醇哌嗪盐酸盐	H	
9	莪术醇杂环乙胺	H	
10	莪术醇杂环乙胺盐酸盐	H	
11	莪术醇 3, 4-二羟基苯胺	H	
12	莪术醇 3, 4-二羟基苯胺 盐酸盐	H	
13	莪术醇正丁胺	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
14	莪术醇正丁胺盐酸盐	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
15	莪术醇叔丁胺	H	(CH ₃) ₃ CNH-
16	莪术醇叔丁胺盐酸盐	H	(CH ₃) ₃ CNH-
17	莪术醇单溴化物	H	-Br
18	莪术醇单羟基	H	-OH
19	莪术醇单硝酸酯	H	-NO ₃
20	莪术醇磺酸酯	HSO ₃ -	H
21	莪术醇磺酸酯钠盐	NaSO ₃ -	H
22	莪术醇丙烯酸酯	CH ₂ =CHCO-	H
23	莪术醇二乙醇胺	H	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-
24	莪术醇二乙醇胺盐酸盐	H	(CH ₃ CH ₂) ₂ N-
25	莪术醇甲醚	CH ₃	H
26	莪术醇甲醚溴化物	CH ₃	-Br
27	莪术醇甲醚正丁胺	CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-

[0037]

[0038]	28	莜术醇甲醚正丁胺盐酸盐	CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
	29	莜术醇乙醚硝酸酯	CH ₃ CH ₂ -	-NO ₃

[0039] 或者,所述的衍生物或其药学上可接受的盐有下式结构:

[0040]



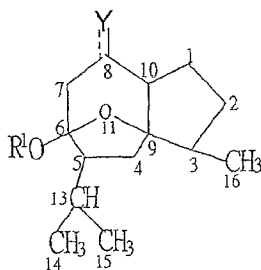
II

[0041] 式中各基团的定义如下:

编号	化合物简称	R ¹	R ²	R ³
30	莜术醇双溴物	H	-Br	-Br
31	莜术醇双硝酸酯	H	-NO ₃	-NO ₃
32	莜术醇双羟基物	H	-OH	-OH
33	莜术醇氢化物	H	H	H
34	无双键莜术醇单溴化物	H	H	-Br
35	无双键莜术醇单羟基物	H	H	-OH
36	无双键莜术醇单硝酸酯	H	H	-NO ₃
37	无双键莜术醇对羟苯胺	H	H	-HN--OH
38	无双键莜术醇对羟苯胺盐酸盐	H	H	-HN--OH
39	莜术醇双对羟苯胺	H	-HN--OH	-HN--OH
40	莜术醇双对羟苯胺盐酸盐	H	-HN--OH	-HN--OH
41	莜术醇双哌嗪	H		
42	莜术醇双哌嗪盐酸盐	H		
43	无双键莜术醇哌嗪	H	H	
44	无双键莜术醇哌嗪盐酸盐	H	H	
45	无双键莜术醇甲醚正丁胺	CH ₃	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH
46	无双键莜术醇甲醚正丁胺盐酸盐	CH ₃	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH

[0043] 或者,所述的衍生物或其药学上可接受的盐有下式结构:

[0044]



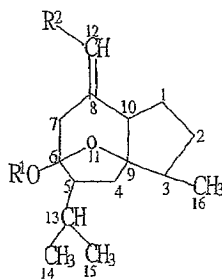
I

[0045] 式中各基团的定义如下：

编号	化合物简称	R ¹	Y
[0046] 47	莪术醇环氧化合物	H	
48	莪术醇酮	H	O
49	莪术醇酮乙酯	CH ₃ CO-	O



[0047] 在本发明的另一个最佳实施方案中,最好的莪术醇衍生物或其药学上可接受的盐选自下列化合物：

[0048]



[0049]

莪术醇对羟苯胺	H	
莪术醇对羟苯胺盐酸盐	H	
莪术醇丙酯	CH ₃ CH ₂ CO-	H
莪术醇丁酯	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO-	H
莪术醇异丁酯	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CO-	H
莪术醇苯甲酸酯		H
莪术醇单溴化物	H	-Br
莪术醇磺酸酯	HSO ₃ -	H

[0050]	莜术醇磺酸酯钠盐	NaSO ₃ ⁻	H
	莜术醇哌嗪	H	
	莜术醇哌嗪盐酸盐	H	
	莜术醇正丁胺	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
	莜术醇正丁胺盐酸盐	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-
	莜术醇叔丁胺	H	(CH ₃) ₃ CNH-
	莜术醇叔丁胺盐酸盐	H	(CH ₃) ₃ CNH-

[0051] 本发明也提供了一种抗肿瘤或抗病毒的药物组合物,它包含药物有效量的如上所述的莜术醇衍生物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的赋形剂和 / 或添加剂。

[0052] 本发明进一步提供了如上所述的莜术醇衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防和 / 或治疗肿瘤的药物中的应用。

[0053] 本发明也提供了如上所述的莜术醇衍生物或其药学上可接受的盐在制备抗病毒药物中的应用,其中所述的病毒选自 HIV 病毒、流感病毒、肝炎病毒和疱疹病毒。

[0054] 莜术醇是莜术油中含量比较多的一个组分,对市售的莜术油经过分离提纯后得到纯度比较高(可以达到 75% 以上,需要时可以达到 99% 以上)的莜术醇,这种较高纯度的莜术醇用作对其进行结构修饰的反应原料。下面将分类介绍莜术醇衍生物的一般制备方法:

[0055] 莜术醇的加氢物的制备

[0056] 将莜术醇溶解于适当的有机溶剂(如甲醇等)中,加入少量的加氢催化剂(钨碳等),在室温常压强烈搅拌下通入氢气。就可以得到莜术醇 8、12 位碳碳双键被氢加成了的莜术醇的衍生物。

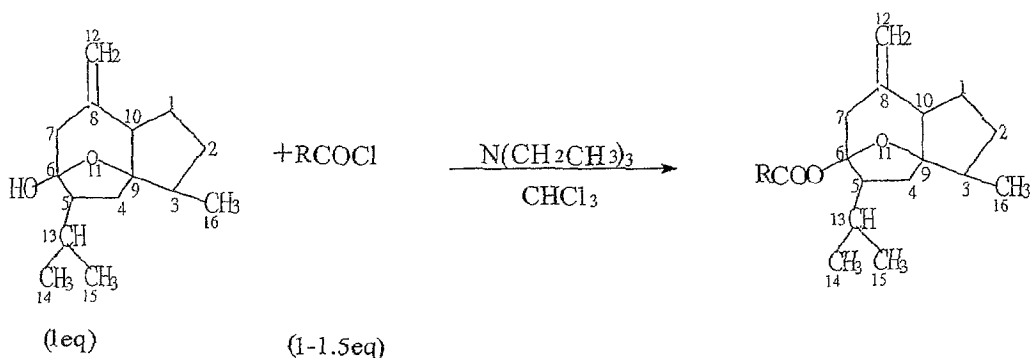
[0057] 莜术醇(⁶C 上的羟基)酯化物的制备

[0058] 莜术醇⁶C 上存在羟基,所以它就具有一般醇的通性,能够以通常的方法来制备莜术醇的酯:如以莜术醇为起始原料,溶解于适当的有机溶剂(如异丙醚、DMF、二氧六环、甲苯、二氯甲烷、氯仿、乙酸等)中,与羧酸在催化剂(对甲苯磺酸、二甲胺磺酰氯与二甲胺与 DMAP 复合、二苯胺与 DPAT 复合、DMAP 与 DPC 复合、有机钛,对甲苯磺酸等)存在下反应;与酰氯在缚酸剂(如吡啶、三乙胺等)的存在下反应;酸酐回流反应,都能生成相应的莜术醇酯,然后,经过分离、纯化处理,得到纯度较高的莜术醇酯。除非另作说明,下列流程中“r. t.”代表“室温”,“reflux”代表“回流”,“or”代表或,“hr”代表“小时”。

[0059] 1、莜术醇与酰氯的酯化

[0060] 莜术醇溶解于氯仿中与等摩尔或过量的酰氯在缚酸剂过量的三乙胺存在下,在常温或回流数小时,即可以得到相应的莜术醇酯(下式中 R 的限定同上):

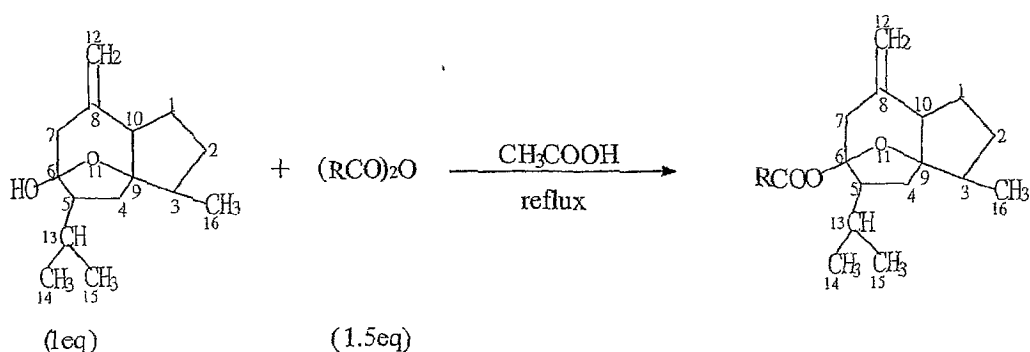
[0061]



[0062] 2、莜术醇与酸酐的酯化

[0063] 莜术醇溶解于羧酸中（一般为乙酸）中与过量的酸酐，回流数小时，即可以得到相应于酸酐的莜术醇酯（下式中 R 的限定同上）：

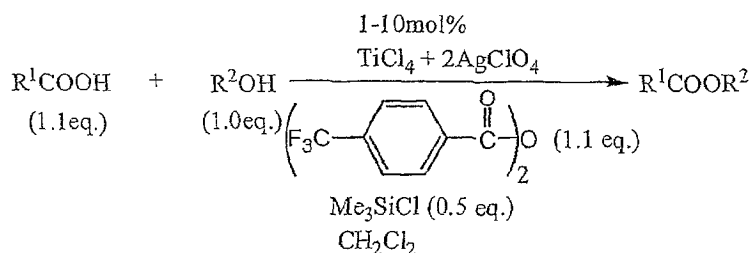
[0064]



[0065] 3、莜术醇在有机钛试剂催化剂与有机酸的酯化

[0066] 莜术醇溶解于二氯甲烷中，在有机钛试剂作催化剂及三甲基氯硅烷为辅助催化剂作用下，等当量的酸酐作脱水剂，几乎等摩尔的羧酸和莜术醇在室温下就可以高收率地生成莜术醇相应的酯（下式中 R¹ 为 R，R 的限定同上，R²OH 为莜术醇）：

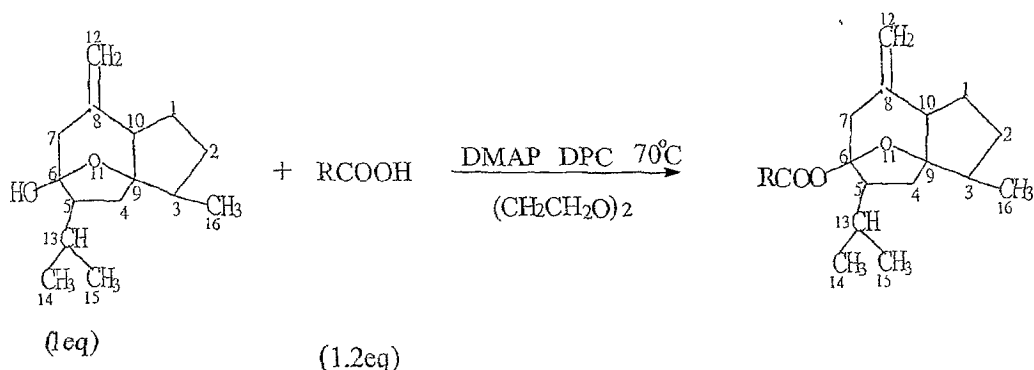
[0067]



[0068] 4、莜术醇在 DMAP 与 DPC 催化下与有机酸的酯化

[0069] 莜术醇溶解于二氧六环中，与略为过量的羧酸，在 DMAP 与 DPC 催化下，70 反应约 100 小时，就可以高收率地生成莜术醇相应的酯（下式中 R 的限定同上）：

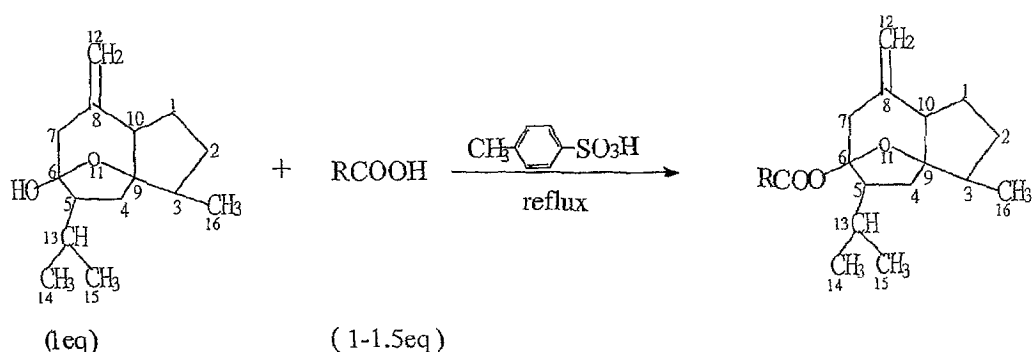
[0070]



[0071] 5、莪术醇在对甲苯磺酸催化下与有机酸的酯化

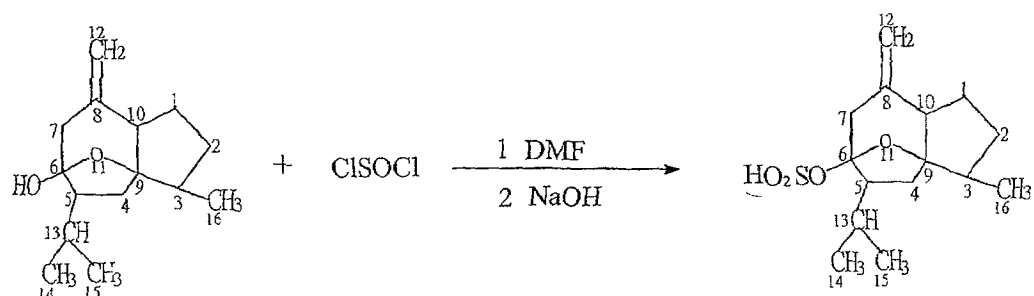
[0072] 莪术醇溶解于甲苯中，与过量的羧酸，在对甲苯磺酸催化下，回流分水反应，生成莪术醇相应的酯（下式中 R 的限定同上）：

[0073]



[0074] 6、莪术醇溶解于适当的有机溶剂（DMF、乙酸乙酯或吡啶等）中，与氯化亚砷反应，经过处理后，再用碱性溶液处理，得到莪术醇的硫酸酯：

[0075]



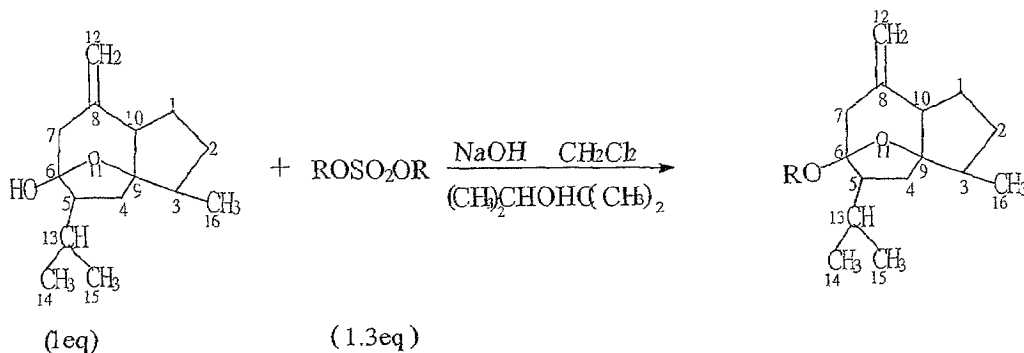
[0076] 相似的，以上述制备得到的莪术醇的加氢衍生物为原料，同样能进行上述 1-6 的反应，制备获得相应的莪术醇氢化物的酯。

[0077] 莪术醇（⁶C 上的羟基）醚化物的制备

[0078] 莪术醇⁶C 上存在羟基，所以它也就具有一般醇的通性，莪术醇溶于适当的有机溶剂中（如异丙醚、DMF、二氧六环、甲苯、二氯甲烷、氯仿）能够与硫酸二酯（ROSO₂OR）或与碘烷（RI）在碱性的溶液中反应生成相应的醚，然后，经过分离、纯化处理，得到纯度较高的莪术醇醚。

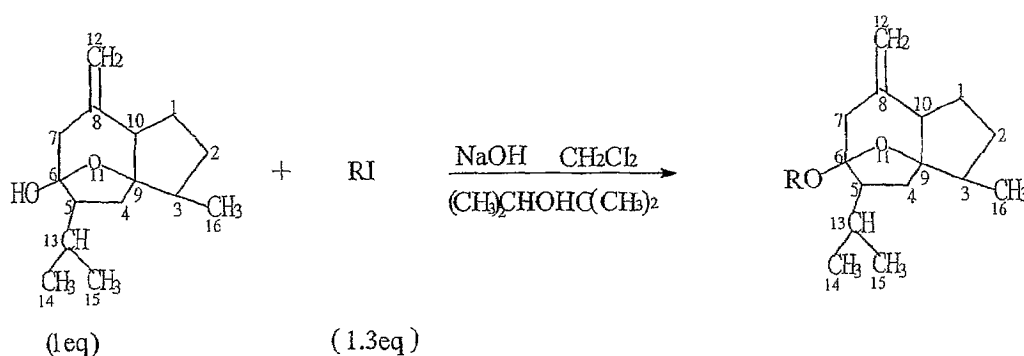
[0079] 1、莪术醇溶解于异丙醚和二氯甲烷中（下式中 R 的限定同上）：

[0080]



[0081] 2、莜术醇溶解于异丙醚和二氯甲烷中与碘烷反应（下式中 R 的限定同上）：

[0082]



[0083] 相似的，以上述制备得到的莜术醇的加氢衍生物为原料，同样能进行上述 1-2 的反应，制备获得相应的莜术醇氢化物的醚。

[0084] 莜术醇 ^8C 与 ^{12}C 之间存在着双键，它和它的烯烃化合物一样具有被加成和被氧化的性质。它极易与卤素、卤化氢起加成反应，生成莜术醇的双卤化物、单卤化物；也能被氢、氢化锂铝等还原，生成莜术醇的氢化物，同时也能够被烷基环氧化物所加成，生成莜术醇的环氧化物；还可以被高锰酸钾等氧化剂氧化，生成莜术醇的氧化物、双羟基化合物。

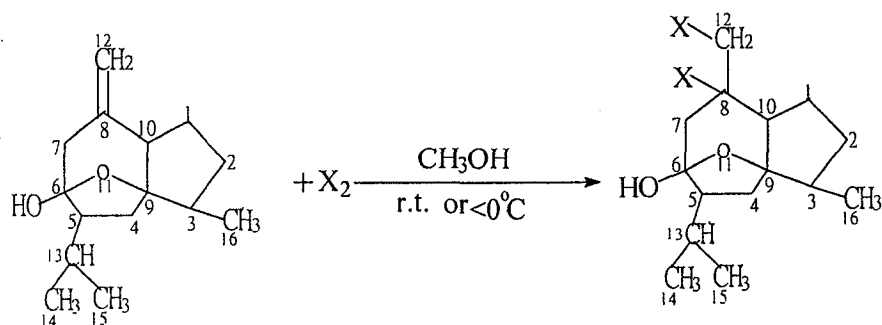
[0085] 经过上述反应得到的莜术醇的卤化物上的卤原子在适当的有机溶剂中，在室温时就极易被 RNH 、 $-\text{R}'\text{NR}''$ (R' 、 R'' 为 R，可以不相同)、 H_2NRNH ，其中 R 的限定如上所定义，或为杂原子环基团，如吡啶、吡咯、咪唑、三氮唑、四唑、二噁唑、二噁二唑、哌啶（只要分子中含有氮氢键： $\text{H}-\text{N}<$ ）或其简单的衍生物、

(邻、间或对位) (其中 R 的限定如上所定义或为 H) 取代而生成相应的胺类衍生物。

[0086] 1、莜术醇与卤素加成物的制备

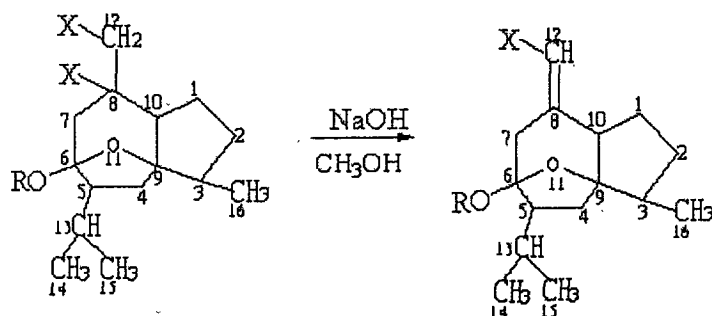
[0087] 莜术醇溶解于适当的有机溶剂（如氯仿、甲醇等）中，在室温或低于 0°C 时，就极易与卤素 (X_2 , X 为 Cl_2 、 Br_2 、 I_2 ，最佳为 Br_2) 发生加成反应，生成在 ^8C 、 ^{12}C 各加一个卤原子的莜术醇的衍生物。

[0088]



[0089] 制备得到的双卤化物, 在无水的有机溶剂中, 碱性时很容易脱去一个卤化氢, 而得到使 8C 与 ^{12}C 之间的双键得以恢复的单卤化物

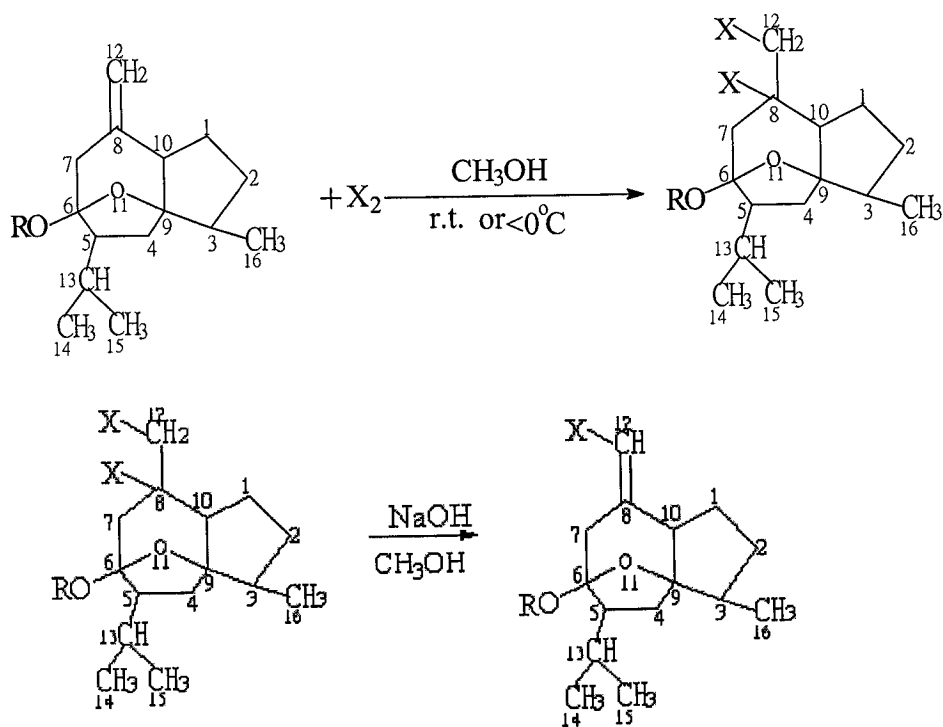
[0090]



[0091] 也可以以上述制备得到的莪术醇 (6C 上的羟基) 酯化物、莪术醇的 (6C 上的羟基) 醚化物 (R 的限定同上, 但是不包括带有双键的烯烃类) 为起始原料, 溶解于适当的有机溶剂 (如氯仿、甲醇等) 中, 在室温或低于 $0^\circ C$ 时, 与卤素发生加成反应, 生成在 8C 、 ^{12}C 各加一个卤原子的莪术醇相应衍生物。相似的制备得到的双卤化物, 在无水的有机溶剂中, 碱性时很容易脱去一个卤化氢, 而得到使 8C 与 ^{12}C 之间的双键得以恢复的单卤化物:

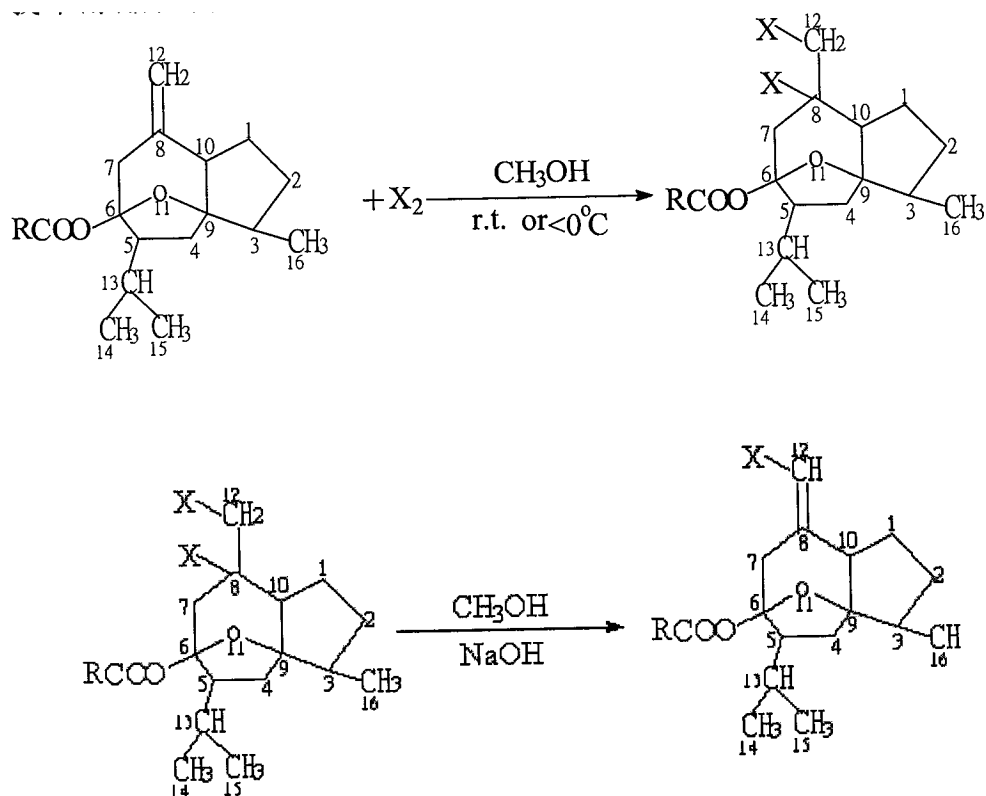
[0092] 莪术醇醚衍生物的卤化及卤化氢的脱除:

[0093]



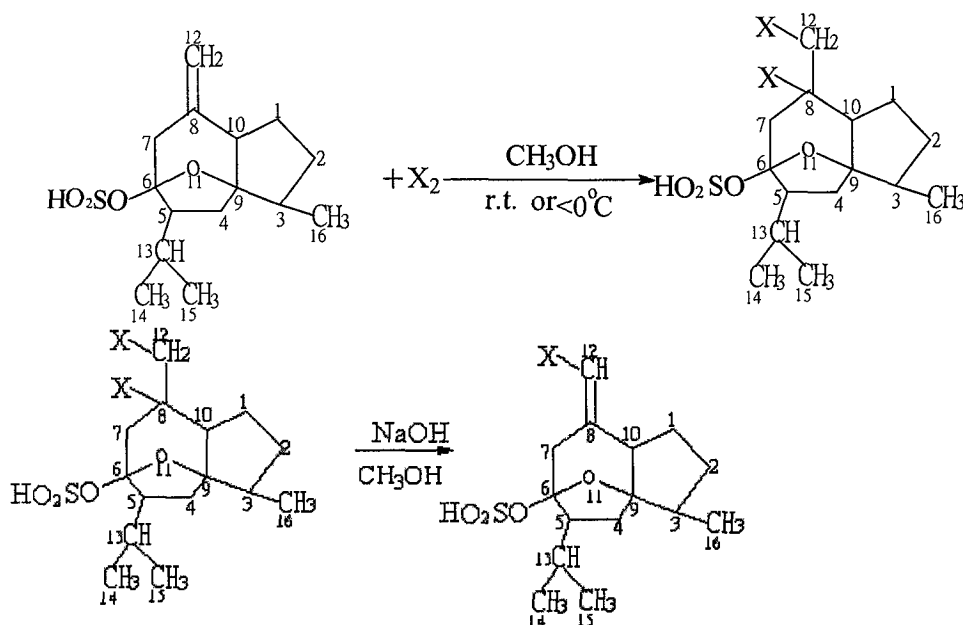
[0094] 莜术醇酯化衍生物的卤化及卤化氢的脱除：

[0095]



[0096] 莜术醇硫酸酯衍生物的卤化及卤化氢的脱除：

[0097]



[0098] 莜术醇与卤化氢的加成方法与莜术醇与卤素的加成方法相同，只是 8C 加上一个H， ^{12}C 加上一个X。

[0099] 将上述制备得到的溴化物或氯化物溶解在无水甲醇中，加入氟化物（例如 NH_4F 、 NaF ）室温下反应，就可以得到相应的莜术醇的氟取代物。

[0100] R 含有双键的莜术醇酯的卤化物的制备方法为：先以莜术醇的卤化物为原料，然

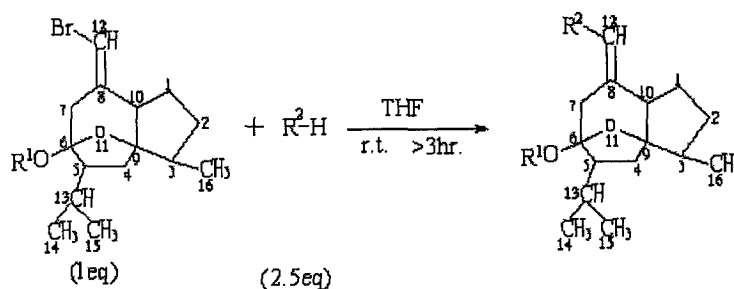
后以上述莪术醇酯化的方法来获得。

[0101] 莪术醇卤化物中卤原子置换产物的制备

[0102] 将上述制备得到的衍生物（或莪术醇）卤化物（单卤化物或双卤化物）中的一种（主要为溴化物）溶解于适当的无水有机溶剂（乙腈、四氢呋喃等）中，加入干燥过量（一般 2-3.5 倍摩尔量）的胺类 R^2-H （在此 R^2 为胺类，包括含氮杂环）在室温下反应 3 小时以上，产物经过硅胶柱分离；或者经过重结晶来提纯，得到相应的莪术醇胺类衍生物或其盐（ R^1 、 R^2 的限定同上）。

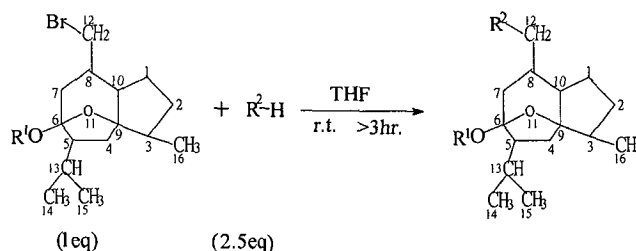
[0103] 单卤化物（ 8C 与 ^{12}C 之间为双键）的胺化（ R^1 、 R^2 的限定同上）：

[0104]



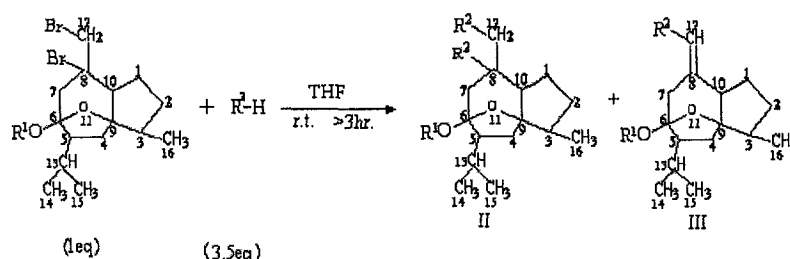
[0105] 单卤化物（ 8C 与 ^{12}C 之间为单键）的胺化（ R^1 、 R^2 的限定同上）：

[0106]



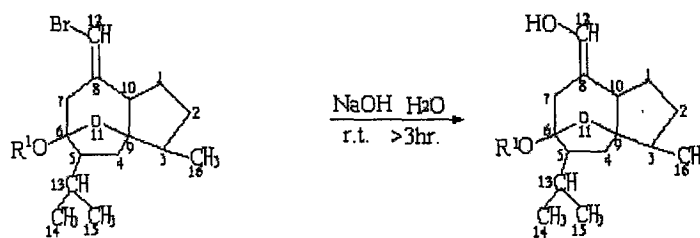
[0107] 双卤化物的胺化，双卤化物的胺化得到的大部分的是 8C 与 ^{12}C 恢复了双键的单胺化衍生物（式 II）和少量的双胺化物（式 III）（ R^1 、 R^2 的限定同上）：

[0108]



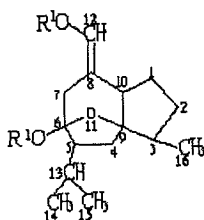
[0109] 莪术醇（或上述制备得到的莪术醇衍生物）的单卤化物（ 8C 与 ^{12}C 含双键或单键）溶解于适当的有机溶剂（甲醇、乙醇、丙酮等），室温与氢氧化钠的水溶液置换反应，其中的卤原子被羟基所取代（ R^1 的限定同上）：

[0110]



[0111] 上述反应得到的 ^{12}C 增加了一个羟基的莪术醇酯衍生物, ^{12}C 的羟基也能发生酯化和醚化反应, 得到相应的莪术醇的衍生物 (R^1 的限定同上):

[0112]



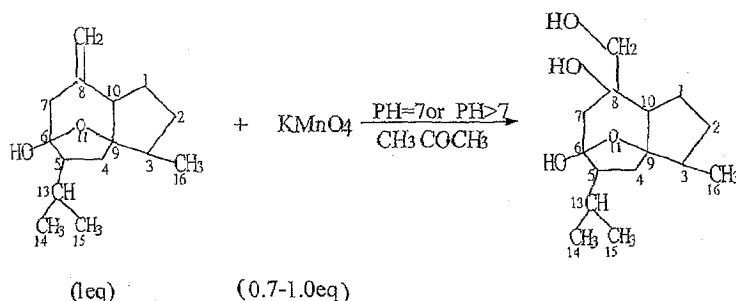
[0113] 莪术醇的卤化物 (主要为溴化物) 溶解于适当的溶剂 (甲醇水溶液 50% -95% 等) 中, 与硝酸银溶液反应, 就可以制备得到莪术醇相应的硝酸酯衍生物。

[0114] 莪术醇中双键被氧化的衍生物的制备

[0115] 莪术醇在适当的有机溶剂中 (丙酮、乙酸、丙酸等), ^8C 与 ^{12}C 之间的双键很容易被高锰酸钾、双氧水等氧化试剂所氧化而生成莪术醇的双羟基衍生物或莪术醇的酮衍生物。

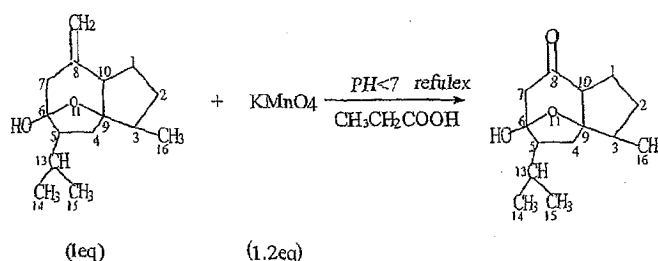
[0116] 莪术醇在等摩尔高锰酸钾和中性到碱性的丙酮溶液中氧化, 生成莪术醇的双羟基衍生物:

[0117]



[0118] 莪术醇在过量的高锰酸钾乙酸溶液中氧化, 生成莪术醇酮衍生物:


[0119]



[0120] 在本反应中生成的衍生物也能酯化和醚化, 得到相应的酯或醚。

[0121] 莪术醇环氧衍生物的制备

[0122] 将莪术醇溶解于适当的有机溶剂 (氯仿、二氯甲烷等) 中, 在室温下加入间氯过氧苯甲酸反应, 然后用 5% 的氢氧化钠溶液洗涤几次, 用无水硫酸钠干燥, 真空脱除有机溶剂。

再经过硅胶柱分离,得到通式 (III) 中 Z 为  的化合物。

[0123] 此化合物在微酸性溶液中打开氧环,从而得到通式 (I) 中 R^2 为 OH、 R^3 为 H 的化合物。而开环后的化合物,经过酯化(或烷基化)反应(采用方法一莪术醇⁶C 上的羟基酯化、方法二的烷基化反应)即可以得到通式 (II) 中 R^3 为 H、 R^2 为 OR^1 的化合物(其中 R^1 的限定如上所定义)。

[0124] 附图简述

[0125] 图 1 显示了对本发明化合物和莪术醇进行测定,得到的乙型肝炎病毒 e 抗原样品 OD_{450} 测定值。

[0126] 图 2 显示了对本发明化合物和莪术醇进行测定,得到的与阳性对照相比较,样品 HBeAg 的降低百分率

具体实施方式

[0127] 下面结合具体实施例对本发明作进一步详尽阐述。

[0128] 制备实施例一莪术醇(⁶C 上的羟基)酯化物的制备

[0129] (1) 2.48 克(95%, 0.01 摩尔)莪术醇溶解于 50 毫升氯仿中,加入少量的无水硫酸镁搅拌 3 小时,过滤除去硫酸镁,再加入少量三乙胺后,在室温下滴加乙酰氯 1.06 克(98%, 0.11 摩尔)放置反应 24 小时。然后倾入碎冰中,用冷水洗涤氯仿溶液直到中性,水相弃之。有机相用无水硫酸镁干燥,真空脱除氯仿。得到淡黄色的产物,以 95 : 5 的 60-90 石油醚 : 乙酸乙酯以及 200-300 目的硅胶柱子分离后得到母体上的羟基被酯化的乙酸酯莪术醇。即式 (I) 中的 R^1 为 CH_3CO 的衍生物(1 号化合物) 1.55 克无色至白色的油状物。收率 : 58%, HPLC : 99.5%。

[0130] 采用美国 ThermoFinnigan 公司 FlashEA1112 型元素分析仪分析发现 : C 73.554%, H 9.308%; 分子式 ($C_{17}H_{26}O_3$) 计算 : C 73.344%, H 9.414%。

[0131] Finnigan MAT8430 质谱仪分析得出产物的分子量为 278。

[0132] 采用 BrukerACF-300 型核磁共振仪,以 $CDCl_3$ 为溶剂检测,图谱显示有 17 个碳信号,26 个质子信号。

[0133] 这确证得到的产物是 1 号化合物。

[0134] (2) 将 2.48 克(95%, 0.01 摩尔)莪术醇溶解于 50 毫升二氧六环中,加入少量的无水硫酸镁搅拌 3 小时,过滤除去硫酸镁,加入适量的 DMAP 与 DPC,再加入 0.91 克 CH_3CH_2COOH (98%, 0.012 摩尔)在 70 反应 100 小时,然后将反应物倾入冰水中,用乙醚或乙酸乙酯等溶剂多次提取此倾析物中的目标产物,弃水相,合并有机相,并无硫酸镁干燥后除去有机溶剂,得到的粗品用硅胶柱分离,得到纯度较高莪术醇丙酸酯无色油状物 2.15 克。即式 (III) 中的 R^1 为 CH_3CH_2CO 的衍生物,收率 82.1%。HPLC : 98.8%。

[0135] Finnigan MAT8430 质谱仪分析得出产物的分子量为 292。

[0136] 采用 BrukerACF-300 型核磁共振仪,以 $CDCl_3$ 为溶剂检测,图谱显示有 18 个碳信号,28 个质子信号。

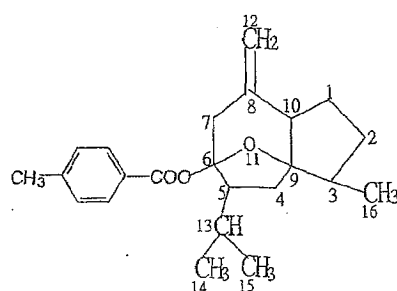
[0137] (3) 将 2.48 克(95%, 0.01 摩尔)莪术醇溶解于 30 毫升乙醚中,加热回流数小时,然后将反应物冷却倾入冰水中,用氢氧化钠溶液中和过量的乙醚,调节水溶液的 PH 值

到 7-8,用乙醚或乙酸乙酯等溶剂多次提取倾析物中的目标产物,弃水相,合并有机相,并无硫酸镁干燥后除去有机溶剂,得到的粗品用硅胶柱分离,得到纯度较高莪术醇丙酸酯淡黄色油状物 1.8 克。即 1 号化合物,收率 64%。HPLC :99.1%。

[0138] (4) 将 2.48 克 (95%,0.01 摩尔) 莪术醇溶解于 50 毫升氯仿中,加入对甲基苯甲酰氯 1.9 克 (97%,0.012 摩尔) 和 5 毫升吡啶,加热回流数小时,然后将反应物冷却后倾入冰水中,用乙醚或乙酸乙酯等溶剂多次提取倾析物中的目标产物,弃水相,合并有机相,并无硫酸镁干燥后除去有机溶剂,得到的粗品用硅胶柱分离,得到纯度较高莪术醇对甲基苯甲酸酯白色的油状物 2.3 克。即通式 () 中的 R^1 为 CH_3ArCO 的衍生物 (如下式 XV 所示),收率 64.7%。HPLC :99.5%。Finnigan MAT8430 质谱仪分析得出产物的分子量为 354。

[0139] 采用 BrukerACF-300 型核磁共振仪,以 $CDCl_3$ 为溶剂检测,图谱显示有 23 个碳信号,30 个质子信号。

[0140]



XV

[0141] (5) 将 1 克莪术醇溶解于 30 毫升的 DMF 中,再取 2 毫升氯化亚砷溶解于 10 毫升 DMF 中。将氯化亚砷滴加到莪术醇溶液中,控制反应液温度在 20-25°C,保持反应 3 小时。然后将反应物倾入 100 毫升水中,水解 2 小时,用 60 毫升乙醚提取,得到油状的莪术醇硫酸酯,再经过硅胶柱分离得到 0.87 克产物,HPLC :98.5%。将其溶解于 5 毫升甲醇,用 1N 氢氧化钠溶液调节使 PH 为 8。蒸干,残余物用乙酸乙酯处理。得到棕黄色粉末,莪术醇硫酸酯钠盐。此盐易溶于水。即得到通式 (III) 中的 R^1 为 HO_3S 或 NaO_3S 的衍生物 (20 号化合物或 21 号化合物)。

[0142] 将 NaO_3S 衍生物检测:

[0143] 以 $CDCl_3$ 为溶剂,磁共振仪检测,图谱显示有 15 个碳信号,23 个质子信号。

[0144] 质谱仪分析得出产物的分子量为 354。

[0145] 制备实施例二莪术醇 (6C 上的羟基) 烷基化物的制备

[0146] 在一个带有搅拌、0-50 温度计和 25 毫升恒压滴液漏斗的 100 毫升三口烧瓶中,加入莪术醇 2.45 克 (0.01 摩尔,96%),异丙醚 60 毫升,二氯甲烷 5 毫升,搅拌完全溶解后,加入少量的无水硫酸镁搅拌 3 小时,过滤除去硫酸镁。取 1.55 克硫酸二甲酯 (0.012 摩尔) 溶解于加有 10 毫升干燥过的异丙醚的恒压滴液漏斗中,开启搅拌,控制溶液温度在 35,缓慢地滴加硫酸二甲酯溶液。滴加完成后,滴加氢氧化钠溶液 (0.025 摩尔) 继续搅拌反应 12 小时以上。然后将反应物倾入 60 克冰水中,用乙醚 70 毫升分三次提取 (30、30、10 毫升),合并乙醚溶液。用水洗涤乙醚,直至中性,再用无水硫酸镁干燥乙醚溶液,过滤除去硫酸钠,室温真空脱除乙醚得到深褐色的固体,用 1 : 50-100 倍 200-300 目的硅胶,以石油醚:乙

酸乙酯 = 95 : 5 为洗脱液, 得到含量 :99.2% (HPLC) 的 ^6C 上的羟基被甲氧基化了的莪术醇衍生物 (即通式 III 中 R^1 为 CH_3- , R^2 为 H 的化合物) 1.9 克。收率 :76%, MP :71-73。

[0147] 元素分析发现 :C 76.935%, H 10.296%。

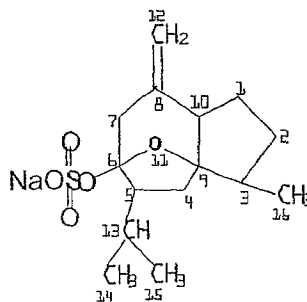
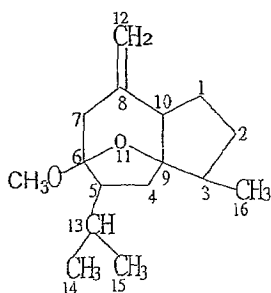
[0148] 分子式 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$) 计算 :C 76.752%, H 10.467%。

[0149] 以 CDCl_3 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 16 个碳信号, 26 个质子信号。

[0150] 质谱仪分析得出产物的分子量为 250。

[0151] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物, 即 ^6C 转化为甲氧基的莪术醇甲醚衍生物。结构式如下

[0152]



[0153] 莪术醇甲醚衍生物

莪术醇硫酸酯钠盐

[0154] 制备实施例三莪术醇与卤素加成物的制备

[0155] (1) 将莪术醇 2.45 克 (0.01 摩尔, 96%) 溶解于 45 毫升甲醇中, 加入少量的无水硫酸镁干燥后, 过滤除去硫酸镁。保持反应物料在 5-10 $^{\circ}\text{C}$ 和较好的搅拌下缓慢地向莪术醇的甲醇溶液中滴加干燥的液溴 0.61 毫升 (3.15 克 / 毫升, 0.012 摩尔)。加完溴素后继续搅拌反应 5-30 分钟, 直到溶液基本退色, 真空除去甲醇后, 得到粗的莪术醇溴化物, 可以直接用于实施例六。或将此淡黄色的粗品经过硅胶柱的分离得到比较纯的目标产物, 接近无色的很稠的油状物 2.81 克。收率 71%, HPLC :99.2%。即得到式 II 中 R^1 为 H , R^2 、 R^3 都为溴原子的莪术醇的双溴化物 (30 号化合物)。

[0156] 元素分析发现 :C 45.630%, H 6.028%。

[0157] 分子式 ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Br}_2$) 计算 :C 45.477%, H 6.107%。

[0158] 以 CDCl_3 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 24 个质子信号。

[0159] 质谱仪分析得出产物的分子量为 396。

[0160] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物, 第 30 号化合物。

[0161] (2) 将步骤 (1) 得到的双溴化物 2 克 (0.005 摩尔) 溶解于 40 毫升无水甲醇中, 加入少量的无水硫酸镁搅拌干燥过滤除去硫酸镁后, 加入干燥过的含氢氧化钠 0.21 克 (95%, 0.005 摩尔) 的甲醇溶液。在室温下放置反应 12 小时以上, 然后将深色的反应物倒入水中, 用乙醚分多次提取, 用水洗涤乙醚, 直到洗液 PH 值为 7 左右, 无水硫酸镁干燥乙醚后, 真空除去溶剂, 得到颜色较深的粘稠物, 经过硅胶柱分离, 可以得到 8 与 12 位碳碳原子间脱除了一个溴化氢而形成了双键的莪术醇衍生物。得到了莪术醇的单溴代衍生物 (第 34 号化合物) 0.83 克, 收率 53%, HPLC :98.2%, 淡黄色油状物 (式 XI)。 R^1 为 H 、 R^2 为 Br 。

[0162] 元素分析发现 :C 57.214%, H 7.650%。

[0163] 分子式 ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Br}$) 计算 :C 56.967%, H 7.649%。

[0164] 以 CDCl_3 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 24 个质子信号。

[0165] 质谱仪分析得出产物的分子量为 316。

[0166] 这确证得到的反应产物就是第 34 号化合物。

[0167] 制备实施例四莪术醇与氢卤酸加成物的制备

[0168] 将莪术醇 2.45 克 (0.01 摩尔, 96%) 溶解于 45 毫升甲醇中, 加入少量的无水硫酸镁搅干燥后, 过滤除去硫酸镁, 保持反应物料在 5-10°C 和较好的搅拌下缓慢地向莪术醇的甲醇溶液中导入干燥的过量的溴化氢 (加入溴化氢的摩尔数为莪术醇的 1.2 倍左右), 加完后继续搅拌反应物 1 小时左右, 得到粗的莪术醇深褐色的一溴化物, 将此粗品经过硅胶柱的分离得到比较纯的目标产物莪术醇单溴化物, 即得到通式 (II) 中 R^3 为溴原子 R^2 为 H 的莪术醇单卤化物 (第 34 号化合物)。

[0169] 元素分析发现 :C 57.965%, H 7.582%。

[0170] 分子式 ($C_{15}H_{25}O_2Br$) 计算 :C 56.786%, H 7.943%。

[0171] 以 $CDCl_3$ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 25 个质子信号。

[0172] 质谱仪分析得出产物的分子量为 317。

[0173] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。

[0174] 将上述制备得到的溴化物或氯化物溶解在无水甲醇中, 加入氟化物 (例如 NH_4F 、 NaF) 室温下反应, 就可以得到相应的莪术醇的氟取代物。

[0175] 制备实施例五、莪术醇加氢物的制备

[0176] (1) 将莪术醇 2.45 克 (0.01 摩尔, 96%) 溶解于 45 毫升甲醇中, 加入少量的无水硫酸镁搅拌干燥后过滤除去硫酸镁, 加入少量的加氢催化剂 (钨碳等), 在室温常压强烈搅拌下通入氢气。通氢反应维持 24 小时以上, 结束加氢反应后, 过滤回收钨碳。将滤液室温下真空除去溶剂甲醇, 得到淡黄色的油状物, 经过硅胶柱分离, 即可以得到莪术醇 8-12 位碳碳双键被氢加成了的接近无色粉末化合物 (莪术醇的二氢衍生物), 1.9 克, HPLC :98.1%, 熔点 :75-77°C, 即得到通式 (II) 中 R^1 为 H, R^2 、 R^3 都为 H 的莪术醇的二氢衍生物 (第 33 号化合物)。

[0177] 元素分析发现 :C 75.832%, H 10.856%。

[0178] 分子式 ($C_{15}H_{26}O_2$) 计算 :C 75.581%, H 10.994%。

[0179] 以 $CDCl_3$ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 26 个质子信号。

[0180] 质谱仪分析得出产物的分子量为 238。这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。

[0181] (2) 莪术醇 1 克 (96%, 0.004 摩尔) 溶解于 50 毫升的无水乙醚中, 在常温下, 向反应液中滴加氢化铝锂 (约 0.005 摩尔), 加完后继续搅拌 3 小时, 真空除去乙醚, 得到淡黄色的粉末, 柱子分离, 得到白色粉末 0.58 克, 收率 61%, HPLC :98%、熔点 :78-80°C。即得到通式 (II) 中 R^2 、 R^3 都为 H 的莪术醇衍生物 (第 33 号化合物)。

[0182] 元素分析发现 :C 75.832%, H 10.856%。

[0183] 分子式 ($C_{15}H_{26}O_2$) 计算 :C 75.581%, H 10.994%。

[0184] 以 $CDCl_3$ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 26 个质子信号。

[0185] 质谱仪分析得出产物的分子量为 238。

[0186] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物莪术醇的二氢衍生物 (第 33 号化合物)。

[0187] 制备实施例六莪术醇卤化物中卤原子置换产物的制备

[0188] (1) 将制备实施例三 (1) 制备得到的莪术醇溴化物 6.0 克 (66%, 0.01 摩尔) 溶解于 80 毫升乙腈中, 加入少量的无水硫酸镁搅拌干燥三小时后, 过滤除去硫酸镁, 加入干燥过的正丁胺 2.6 克 (98%, 0.033 摩尔) 在室温下放置 24 小时以上, 室温真空除去溶剂。将此浅黄色的混合物用 50 毫升水和 60 毫升乙酸乙酯溶解置于梨形分液漏斗中, 用氨水等碱液调节溶液的 PH 值大于 9, 充分摇动, 水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。合并乙酸乙酯, 用水洗 (20 毫升 *4), 加水 40 毫升, 用盐酸调节溶液的 PH 值小于 7, 充分摇动, 最佳为 3, 弃乙酸乙酯。酸性的水溶液用 20 毫升的乙醚分 3 次洗涤, 弃乙醚。新的乙酸乙酯 60 毫升与水相混合, 调节 PH 值大于 9, 充分摇动, 水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。乙酸乙酯合并后用水洗 (20 毫升 *4), 然后用无水硫酸镁干燥, 常温下真空除去乙酸乙酯, 得到淡色的晶体 3.2 克。经过硅胶柱分离得到相应的莪术醇正丁胺化合物, (或者用丙酮重结晶) 得到无色颗粒晶体 2.2 克。收率 71.66%, HPLC :99.8%。熔点 :104-106°C。即得到通式 (III) 中 R¹ 为 H, R² 为 CH₃CH₂CH₂CH₂NH 的衍生物 (第 13 号化合物)。

[0189] 元素分析发现 :C 74.402%, H 10.650%, N 4.62%。

[0190] 分子式 (C₁₉H₃₃O₂N) 计算 :C 74.267%, H 10.749%, N 4.56%。

[0191] 以 CDCl₃ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 19 个碳信号, 33 个质子信号。

[0192] 质谱仪分析得出产物的分子量为 307。

[0193] 这说明得到的反应产物就是第 13 号化合物。

[0194] 将上述制备得到的莪术醇正丁胺衍生物溶解于丙酮中, 在 20-30°C 时, 搅拌下滴加浓盐酸 (或通入 HCL 气体), 使溶液的 PH 值为 6-7, 溶液中迅速就有白色的莪术醇正丁胺衍生物盐酸盐固体析出, 过滤洗涤并干燥, 即得到高纯度的莪术醇正丁胺衍生物盐酸盐晶体 (第 14 号化合物)。HPLC :99.95%, 熔点 :127-129°C。

[0195] (2) 将实施例三 (1) 制备得到的莪术醇溴化物 6.0 克 (66%, 0.01 摩尔) 溶解于 80 毫升乙腈中, 加入少量的无水硫酸镁搅拌干燥三小时后, 过滤除去硫酸镁, 加入干燥过的叔丁胺 2.6 克 (98%, 0.033 摩尔) 在室温下放置 24 小时以上, 室温真空除去溶剂。将此浅黄色的混合物用 50 毫升水和 60 毫升乙酸乙酯溶解置于梨形分液漏斗中, 用氨水等碱液调节溶液的 PH 值大于 9, 充分摇动, 水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。合并乙酸乙酯, 用水洗 (20 毫升 *4), 加水 40 毫升, 用盐酸调节溶液的 PH 值小于 7, 充分摇动, 最佳为 3, 弃乙酸乙酯。酸性的水溶液用 20 毫升的乙醚分 3 次洗涤, 弃乙醚。新的乙酸乙酯 60 毫升与水相混合, 调节 PH 值大于 9, 充分摇动, 水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。乙酸乙酯合并后用水洗 (20 毫升 *4), 然后用无水硫酸镁干燥, 常温下真空除去乙酸乙酯, 得到淡色的晶体 3.0 克。经过硅胶柱分离得到相应的莪术醇叔丁胺衍生物, 无色固体 2.0 克 (第 15 号化合物)。收率 65.4%, HPLC :98.8%。

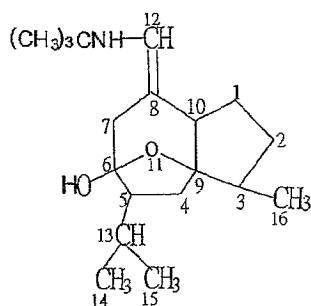
[0196] 熔点 :79-80°C。即得到通式 (III) 中 R¹ 为 H, R² 为 (CH₃)₃CNH- 的衍生物。

[0197] 以 CDCl₃ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 19 个碳信号, 33 个质子信号。

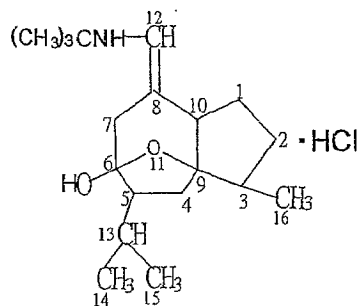
[0198] 质谱仪分析得出产物的分子量为 307。

[0199] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。结构式如下 :

[0200]



[0201] 莜术醇叔丁胺衍生物

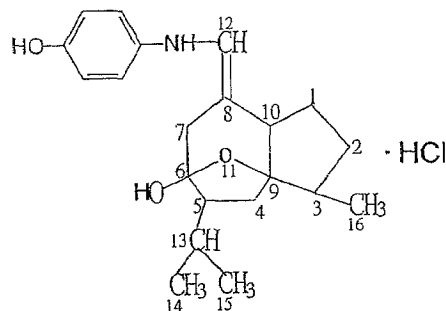
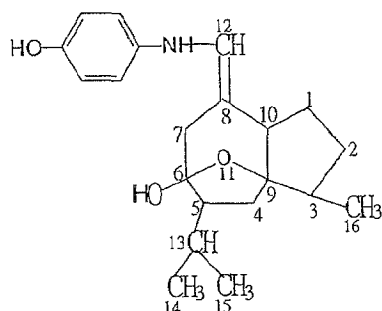


莜术醇叔丁胺衍生物盐酸盐

[0202] 将上述制备得到的莜术醇叔丁胺衍生物溶解于丙酮中,在 20-30℃时,搅拌下滴加浓盐酸(或通入 HCL 气体),使溶液的 PH 值为 6-7,蒸干丙酮析出白色的莜术醇叔丁胺衍生物盐酸盐粉末固体(第 16 号化合物),结构式如上。HPLC :99.95%,熔点:115-116℃。

[0203] (3) 将实施例三(1)制备得到的莜术醇溴化物 6.0 克(66%,0.01 摩尔)溶解于 80 毫升乙腈中,加入少量的无水硫酸镁搅拌干燥三小时后,过滤除去硫酸镁,加入对羟基苯胺 3.34 克(98%,0.03 摩尔)在室温下放置 24 小时以上,室温真空除去溶剂。将此深色的混合物用 50 毫升水和 100 毫升乙酸乙酯溶解置于梨形分液漏斗中,用氨水等碱液调节溶液的 PH 值大于 9,充分摇动,水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。合并乙酸乙酯,用 PH 值 8-9 的水洗(20 毫升*4),然后加水 40 毫升,用盐酸调节溶液的 PH 值小于 7,充分摇动,最佳为 3,弃乙酸乙酯。酸性的水溶液用 20 毫升的乙醚分 3 次洗涤,弃乙醚。新的乙酸乙酯 100 毫升与酸性水相混合,调节 PH 值大于 8-9,充分摇动,水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。乙酸乙酯合并后用水洗(20 毫升*4),有机相然后用无水硫酸镁干燥,常温下真空除去乙酸乙酯,得到淡黄色的固体 3.8 克。经过硅胶柱分离得到相应的莜术醇的对羟基苯胺化合物(或者经过重结晶),得到白色晶体 2.3 克。收率 67.1%,HPLC :99.2%。熔点:108-110℃。即得到通式(III)中 R¹ 为 H, R² 为 HOArNH- 的衍生物(第 5 号化合物)。结构式如下:

[0204]



[0205] 莜术醇的对羟基苯胺衍生物


莜术醇对羟基苯胺盐酸盐

[0206] 将上述制备得到的莜术醇对羟基苯胺衍生物溶解于丙酮中,在 40-50℃时,搅拌下滴加浓盐酸(或通入 HCL 气体),使溶液的 PH 值为 5-6,放置后析出淡黄色的莜术醇胺化物盐酸盐晶体。将此晶体在水中用活性炭脱色重结晶,即得到类白色的高纯度的莜术醇对羟基苯胺盐酸盐晶体(第 6 号化合物,结构式如上),HPLC :99.89%,熔点:147.5-149.5℃。将此盐酸盐检测:

[0207] 以 CDCl₃ 为溶剂,磁共振仪检测,图谱显示有 21 个碳信号,30 个质子信号。

[0208] 质谱仪分析得出产物的分子量为 379.5。

[0209] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。

[0210] (4) 将实施例三 (1) 制备得到的莪术醇溴化物 6.0 克 (66%, 0.01 摩尔) 溶解于 80 毫升乙腈中, 加入少量的无水硫酸镁搅拌干燥三小时后, 过滤除去硫酸镁, 加入对无水哌嗪 2.90 克 (98%, 0.031 摩尔) 在室温下放置 24 小时以上, 室温真空除去溶剂。将此淡黄色的混合物用 50 毫升水和 100 毫升乙酸乙酯溶解置于梨形分液漏斗中, 充分摇动, 水层再用 10 毫升乙酸乙酯提一次。合并乙酸乙酯, 用水洗 (20 毫升 *4), 然后加水 40 毫升, 用盐酸调节溶液的 PH 值为 3, 弃乙酸乙酯。酸性的水溶液用 20 毫升的乙醚分 3 次洗涤, 弃乙醚。新的乙酸乙酯 100 毫升与酸性水相混合, 调节 PH 值大于 9, 充分摇动, 水层用 10 毫升乙酸乙酯再提一次。乙酸乙酯合并后用水洗 (20 毫升 *4), 有机相然后用无水硫酸镁干燥, 常温下真空除去乙酸乙酯, 得到白色的固体 3.1 克。经过硅胶柱分离得到相应的莪术醇的哌嗪衍生物 (或者经过重结晶), 得到白色晶体 2.3 克。收率 71.8%, HPLC :99.2%。熔点 :128-130°C。即得到通式 (III) 中 R^1 为 H, R^2 为  的衍生物 (第 7 号化合物)。

[0211] 以 $CDCl_3$ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 19 个碳信号, 32 个质子信号。

[0212] 质谱仪分析得出产物的分子量为 320。

[0213] 这确证得到的反应产物是第 7 号化合物。

[0214] 将上述制备得到的莪术醇哌嗪衍生物溶解于丙酮中, 在 40-50°C 时, 搅拌下滴加浓盐酸 (或通入 HCL 气体), 使溶液的 PH 值为 5-6, 放置后析出白色的莪术醇胺化物盐酸盐晶体。将此晶体在水中用活性炭脱色重结晶, 即得到类白色的高纯度的莪术醇哌嗪盐酸盐晶体 (第 8 号化合物), HPLC :99.89%, 熔点 :150-152°C。

[0215] 相似地, 采用上述方法, 用乙胺与莪术醇的双卤化物反应, 得到米色的粉末晶体, 莪术醇乙胺衍生物, 即得到通式 (III) 中 R^1 为 H, R^2 为 CH_3CH_2NH 的衍生物, 熔点 :92-94°C。收率 :76%。

[0216] (5) 将实施例三 (1) 制备得到的莪术醇溴化物 6.0 克 (66%, 0.01 摩尔) 溶解于 40 毫升的甲醇水溶液 (甲醇 : 水 = 90 : 10) 中。在室温下, 10 小时内滴加 30% 的氢氧化钠水溶液 1.5 克, 再放置反应 24 小时以上, 调节溶液的 PH 到中性, 加入 40 毫升水, 用 50 毫升乙酸乙酯多次提取, 合并乙醚用水洗涤多次。然后用少量的无水硫酸钠干燥, 真空除去溶剂, 得到深褐色的粘稠的油状物 1.4 克, 经过硅胶柱的分离, 得到莪术醇的二羟基衍生物, 浅色晶体 0.87 克, 收率 :65%, 熔点 :163-165°C, HPLC :98.3%。即得到通式 (II) 中 R^3 、 R^2 为 OH 的化合物 (第 32 号化合物, 莪术醇双羟基化合物)。

[0217] 元素分析发现 :C 66.873%, H 9.458%。

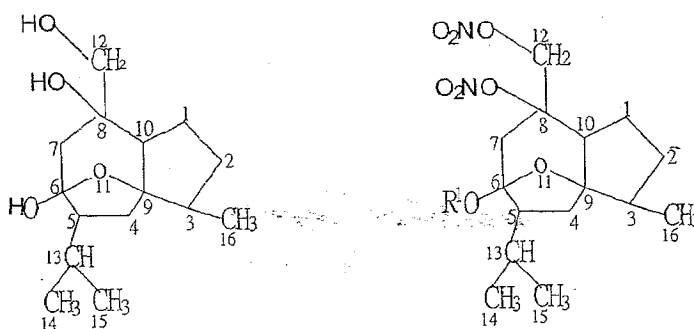
[0218] 分子式 ($C_{15}H_{26}O_4$) 计算 :C 66.636%, H 9.693%。

[0219] 以 $CDCl_3$ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 26 个质子信号。

[0220] 质谱仪分析得出产物的分子量为 270。

[0221] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。结构式如下 :

[0222]



[0223] 莪术醇双羟基化合物

莪术醇的双硝酸酯衍生物

[0224] (6) 将实施例三 (1) 制备得到的莪术醇溴化物 6.0 克 (66%, 0.01 摩尔) 溶解于 60 毫升甲醇中, 向此溶液中滴加含有 3.6 克 (99%、0.02 摩尔) 硝酸银 10 毫升的水溶液, 常温下放置过夜, 就有大量的类白色絮状沉淀析出, 加 60 毫升水和乙醚 (1 : 1), 分两次提取, 水相回收溴化银, 乙醚相用 40 毫升分两次洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 真空除去溶剂, 就可以得到莪术醇的双硝酸酯衍生物, 即分别得到通式 (I) R^3 、 R^2 被 NO_3 置换了的系列衍生物。结构式如上 (第 31 号化合物, 莪术醇的双硝酸酯衍生物)。

[0225] 制备实施例七莪术醇中双键被氧化的衍生物的制备

[0226] (1)、将莪术醇 2.45 克 (0.01 摩尔, 96%) 溶解于 40 毫升乙腈中, 用溶解了 1.6 克高锰酸钾 (98%, 0.01 摩尔) 的水溶液, 在常温下放置, 直到溶液的紫红色完全褪去, 然后真空除去乙腈, 用 1 : 1 的乙酸乙酯 - 水 100 毫升提取, 弃水相, 乙酸乙酯用水洗涤两次, 然后用无水硫酸钠干燥, 除去溶剂后得到深色的固体, 经过硅胶柱分离得到类白色晶体 2.1 克, 收率, 77.7%, 熔点: 163-165°C, HPLC : 98.8%。即得到通式 (II) 中 R^1 为 H、 R^2 、 R^3 为 OH 的化合物 (莪术醇双羟基化合物), 此类化合物在水中溶解度较大。

[0227] 元素分析发现 :C 66.873%, H 9.458%。

[0228] 分子式 ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$) 计算 :C 66.636%, H 9.693%。

[0229] 以 CDCl_3 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 26 个质子信号。

[0230] 质谱仪分析得出产物的分子量为 270。

[0231] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。

[0232] 得到的莪术醇双羟基衍生物经过烷基化、或酯化得到通式 (II) 中 R^5 、 R^6 都为 $R^1\text{O}$ 的莪术醇衍生物, R^1 的限定如上所定义。

[0233] (2) 将莪术醇 2.45 克 (0.01 摩尔, 96%) 溶解 40 毫升乙酸中, 加入溶有 4 克的高锰酸钾的水溶液, 加热回流数小时后, 真空除去有机溶剂后, 用 100 毫升的 50% 的乙酸乙酯和水提取, 乙酸乙酯用水洗涤多次后, 用无水硫酸钠干燥, 真空除去溶剂, 得到深色的固体, 硅胶柱分离得到白色的莪术醇酮衍生物 1.45 克, 收率 : 61%, HPLC : 98%, 熔点 : 138-140°C。即通式 (III) 中 Z 为 O 的第 31 号化合物。

[0234] 元素分析发现 :C 70.865%, H 9.102%。

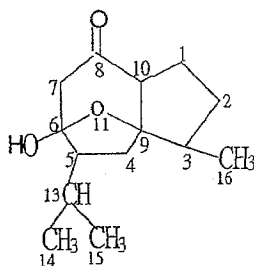
[0235] 分子式 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 计算 :C 70.560%, H 9.305%。

[0236] 以 CDCl_3 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 14 个碳信号, 22 个质子信号。

[0237] 质谱仪分析得出产物的分子量为 238。


[0238] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。结构式如下 :

[0239]



[0240] 制备实施例八 莪术醇环氧衍生物的制备

[0241] 将莪术醇 1 克 (96%, 0.004 摩尔) 溶解于 100 毫升氯仿中, 在室温下加入间氯过氧苯甲酸 2 克 (98%, 0.011 摩尔), 15-20°C 反应 8 小时, 然后用 5% 的氢氧化钠溶液洗涤几次,

[0242] 再用水洗涤到中性, 用无水硫酸钠干燥, 真空脱除溶剂。再经过硅胶柱分离, 得到通式 (I) 中 Z 为  的莪术醇的环氧衍生物 (第 48 号化合物)。得到白色粉末 0.504 克, 收率: 50%, HPLC: 98.5%。熔点: 130-132°C。

[0243] 元素分析发现: C 70.865%, H 9.102%。

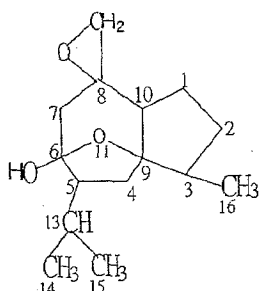
[0244] 分子式 (C₁₅H₂₄O₃) 计算: C 71.035%, H 9.046%。

[0245] 以 CDCl₃ 为溶剂, 磁共振仪检测, 图谱显示有 15 个碳信号, 24 个质子信号。

[0246] 质谱仪分析得出产物的分子量为 252。

[0247] 这说明得到的反应产物就是我们需要的目标物。结构式如下:

[0248]



[0249] 此化合物在微酸性溶液中打开氧环, 从而得到通式 (II) 中 R² 为 OH、R³ 为 H 的化合物。而开环后的化合物, 经过酯化 (或烷基化) 反应 (采用方法一莪术醇⁶C 上的羟基酯化、方法二的烷基化反应) 即可以得到通式 (II) 中 R³ 为 H, R² 为 OR¹ 的化合物 (其中 R¹ 的限定如上所定义)。

[0250] 试验实施例

[0251] 实施例一化合物体外肿瘤细胞抑制率的检测

[0252] 1. 试验化合物

[0253] 1-49 个新化合物和莪术醇 E 共 50 个。

[0254] 2. 材料

[0255] (1) MTT 以 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解 MTT, 调节浓度到 4mg/ml, 过滤除菌, 贮存于 4°C 的冰箱中。

[0256] (2) MTT 裂解液的配制 80g 的十二烷基磺酸钠溶解在 200ml 的 DMF 中, 水浴加热使之溶解, 加入 200ml 蒸馏水, 用 1:1 的 80% 乙酸和 1N 的 HCl 调节 PH 到 4.7。

[0257] (3) 使用的肿瘤细胞株

[0258] U-937 人组织细胞淋巴瘤

[0259] A-549 人肺腺癌细胞

[0260] Bel-7402 人肝癌细胞

[0261] MCF-7 人乳腺腺癌细胞

[0262] HeLa 人宫颈癌细胞

[0263] HL-60 人早幼粒白血病细胞

[0264] SMMC-7721 人肝癌细胞

[0265] LLC 小鼠 Lewis 肺癌

[0266] 3、操作方法

[0267] (1) 单细胞悬液接种于 96 孔板 ($\times 3$) (用 PRMI-1640 基础培养基将细胞稀释到 3×10^4 个 /ml, 每孔加入 200ug 稀释好的细胞), 37°C , 5% 的 CO_2 , 饱和湿度下培养 24 小时。每组 4 个平行样。

[0268] (2) 除去培养基, 取新配制培养基按表中浓度制备 (15 个化合物) 抗癌药物溶液, 每孔加入 200ug, 培养 48 小时。

[0269] (3) 每孔加入 2mg/ml 的 MTT20ug, 孵化 4 小时。

[0270] (4) 吸出孔中培养液, 快速翻转培养板甩去培养液, 加入 DMSO150ug/ 孔, 室温下震荡 10 分钟。

[0271] (5) 用酶联检测仪测 OD 值 ($\lambda = 570\text{nm}$)。

[0272] (6) 按下式分别计算细胞生长抑制率 (inhibition rate IR)。

[0273] $\text{IR}(\%) = [1 - (\text{实验组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值})] \times 100\%$

[0274] 实验结果如附表一所示。实验结果表明, 所有的化合物对 heLa 的抑制率都大于 50%。

[0275] 重复三次同样的试验过程, 结果见下表一、二、三。

[0276] 表一化合物体外抗肿瘤生物活性测试筛选结果

[0277]

测试指标：抑制率				浓度：50 μ g/ml				
样品名	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)
	U-937	A-549	Be1-7402	MCF-7	SMMC-7721	HL-60	Hela	LLC
1	45.45	-9.16	32.12	45.6	23.10	23.12	51.23	1.30
2	71.17	4.93	23.33	45.98	12.35	12.34	70.56	2.98
3	91.72	7.76	14.41	32.15	8.02	3.21	69.23	6.89
4	52.23	10.51	43.21	49.23	5.30	42.1	73.22	1.01
5	93.95	90.32	80.21	90.32	85.01	91.32	94.36	3.21
6	90.92	91.84	81.84	91.89	86.12	93.21	95.26	88.23
7	93.01	65.32	55.44	88.32	3.34	90.56	90.38	85.42
8	90.26	60.5	54.32	89.12	4.50	91.95	91.87	12.1
9	87.32	65.21	45.32	56.47	1.21	86.32	82.36	4.83
10	85.20	62.31	44.68	56.32	7.79	87.20	87.98	4.18
11	85.3	60.12	43.25	58.39	33.88	70.23	91.64	11.77

[0278] 续上表

[0279]

12	80.3	60.32	43.08	54.89	32.03	60.21	83.78	-10.89
13	51.10	7.59	33.16	54.67	3.71	0.12	66.32	0.24
14	82.88	8.09	32.00	56.30	6.14	2.45	75.46	-10.57
15	57.32	17.43	32.98	65.32	-2.50	8.23	70.02	-11.83
16	82.56	6.01	1.23	54.89	-2.50	2.31	68.99	1.13
17	87.18	4.68	-12.36	53.89	10.16	92.33	91.58	7.27
18	70.30	-2.24	13.58	57.89	13.39	4.26	60.32	4.18
19	50.97	2.51	4.32	12.6	23.01	54.03	55.67	-15.52
20	89.23	12.50	7.89	18.9	18.08	91.35	94.23	8.97
21	92.04	26.42	5.36	87.56	-7.26	93.12	91.69	10.47

12	80.3	60.32	43.08	54.89	32.03	60.21	83.78	-10.89
22	60.32	19.23	12.80	88.32	44.39	21.01	63.20	-6.01
23	81.60	-7.41	13.54	32.56	18.69	12.50	55.33	12.1
24	63.78	3.12	1.23	8.26	-1.59	2.63	54.62	4.83
25	86.94	13.68	5.68	9.53	0.24	-2.63	81.88	4.18
26	55.32	-3.24	3.45	43.21	0.97	-0.23	51.00	11.77
27	52.98	15.01	4.65	23.78	25.94	3.19	62.31	-10.89
28	59.32	1.23	-2.24	32.15	-3.78	2.98	58.75	0.24
29	25.32	3.89	2.51	37.85	4.26	42.12	56.98	-10.12
30	13.25	4.36	12.40	36.15	1.03	13.20	53.87	-1.83
31	-0.68	8.65	0.23	16.75	-1.96	16.50	57.98	1.13
32	65.32	-12.5	4.23	65.12	79.96	14.00	84.33	7.27
33	44.34	16.32	14.32	45.3	-7.44	1.32	60.89	4.18
34	35.23	2.31	1.11	1.23	-5.25	2.96	50.64	-18.52
35	7.36	3.89	3.65	3.89	5.23	3.12	59.88	8.97
36	6.98	9.21	0.22	-1.23	15.39	1.03	62.13	11.56
37	23.56	32.03	15.32	23.10	-2.32	56.23	63.75	1.21
38	19.30	3.71	13.56	11.32	-8.7	12.35	58.69	10.47
39	12.68	6.14	3.87	12.84	-0.33	3.16	58.75	-3.24
40	4.36	-2.50	13.2	27.35	11.65	8.88	64.26	4.21

[0280] 续上表

[0281]

41	8.65	-2.50	16.78	36.45	4.42	6.78	50.32	30.96
42	-12.5	10.16	2.15	34.21	6.86	2.73	55.64	9.99
43	16.32	13.39	9.15	43.21	-10.12	2.56	62.13	-2.06
44	35.64	23.01	-6.54	25.55	-10.53	3.71	55.14	23.35
45	32.19	2.10	3.01	26.78	-10.73	6.14	59.45	2.74
46	16.32	3.12	4.55	19.88	-0.86	-2.60	53.12	-12.99
47	86.47	-12.0	2.88	65.12	-1.43	10.32	83.66	-13.24
48	90.92	7.84	16.40	61.23	20.59	60.80	86.77	-8.04
49	78.65	5.36	2.69	0.65	-11.3	55.35	79.8	-0.15
E	28.01	-0.57	4.79	55.64	-11.5	1.32	86.75	-3.04

[0282] 表二（复筛）化合物体外抗肿瘤生物活性测试筛选结果

测试指标 : 抑制率				浓度: 50 μ g/ml				
样品名	结果 (%)	结果 (%)	结果 (%)	结果 (%)	结果 (%)	结果 (%)	结果 (%)	结果 (%)
	U-937	A-549	Bel-7402	MCF-7	SMMC-7721	HL-60	HeLa	LLC
1	34.26	-6.32	25.32	41.02	28.23	12.03	55.98	1.30
2	70.30	9.23	12.78	41.78	14.67	17.98	75.23	0.32
3	93.01	10.32	11.00	22.35	8.96	4.89	70.23	0.02
4	51.00	14.03	43.02	50.09	1.96	40.01	70.12	0.23
5	95.56	90.00	81.54	91.02	86.91	90.89	92.31	85.07
6	94.12	92.84	81.84	91.89	86.12	93.21	95.26	87.02
7	90.00	67.23	60.23	85.01	1.23	91.02	89.30	-2.99
8	91.32	58.56	50.45	85.23	2.30	90.17	92.00	1.02
9	71.32	60.45	24.32	54.23	11.23	85.02	80.23	2.31
10	80.20	55.06	40.32	53.26	4.44	85.03	86.49	2.36
11	85.01	56.32	43.25	57.39	22.13	68.23	89.02	1.23
12	80.23	65.01	38.02	55.01	32.09	61.20	85.36	-1.23
13	45.10	3.56	30.25	50.36	0.23	0.79	65.92	1.32
14	81.23	9.23	23.56	54.23	3.21	4.35	76.32	-14.29
15	50.12	12.33	31.20	60.12	-8.60	2.98	71.42	-10.12
16	80.12	10.19	8.99	50.32	2.63	15.00	70.32	0.22
17	85.12	5.23	-10.90	50.32	0.32	90.12	92.36	2.31
18	69.23	-0.32	11.23	54.32	0.69	7.32	65.03	0.22
19	42.23	3.10	8.95	0.16	12.301	55.98	50.27	-16.00
20	90.32	13.00	5.36	16.32	1.23	92.37	90.56	9.37
21	89.46	20.01	2.13	85.23	-1.82	90.89	90.11	1.89
22	50.23	12.36	0.23	85.02	40.32	21.03	61.88	-6.41
23	83.00	-1.89	10.77	23.66	4.96	13.56	60.23	13.20
24	52.31	0.32	4.32	35.02	12.30	0.98	50.12	1.32

[0283]

[0284] 续上表

[0285]

25	82.36	14.23	2.03	8.12	8.32	1.23	75.55	1.02
26	54.23	-3.12	-3.45	41.21	-0.97	-0.23	56.55	-11.77
27	50.98	5.23	2.31	14.36	20.36	5.969	60.21	-10.00
28	51.23	2.31	-0.45	19.98	-1.02	4.32	60.45	1.23
29	12.32	1.23	3.21	30.12	5.68	42.79	50.17	-1.95
30	13.10	4.01	9.84	30.56	4.56	4.12	56.89	-4.65
31	-12.61	4.82	8.42	14.87	-4.56	2.78	55.49	1.25
32	67.23	-12.5	4.23	65.02	82.59	13.41	80.12	7.05
33	43.21	14.32	14.89	39.30	-1.56	7.68	59.80	3.12
34	23.56	9.23	0.59	4.56	0.95	3.14	51.89	-11.22
35	0.23	2.77	6.78	9.87	4.32	3.99	64.01	8.23
36	5.32	1.20	0.02	-2.31	14.08	2.01	65.23	11.56
37	32.10	34.01	12.31	5.61	-8.36	50.12	62.17	0.32
38	13.00	0.96	-9.78	10.98	1.23	11.45	60.11	1.96

25	82.36	14.23	2.03	8.12	8.32	1.23	75.55	1.02
39	10.32	321	13.56	19.73	-0.98	9.58	60.99	-4.57
40	1.02	-12.37	25.43	14.38	-11.36	12.96	64.12	1.95
41	-1.02	-7.89	1.23	31.28	3.12	1.86	51.23	23.65
42	-1.03	3.12	14.36	30.12	0.79	3.14	54.03	1.79
43	12.30	11.24	-4.98	41.94	-8.98	2.00	59.66	-11.23
44	23.56	20.33	0.23	24.11	-7.89	5.37	50.01	17.565
45	12.32	0.32	5.02	20.73	-11.23	1.23	53.12	1.32
46	8.65	3.78	4.65	14.98	-0.45	-4.56	49.56	-17.56
47	85.39	-7.85	2.35	60.49	-3.25	1.96	80.79	-14.00
48	91.23	9.48	10.23	62.38	12.11	50.23	80.79	-4.32
49	75.23	4.23	14.02	1.56	-1.78	57.89	75.65	0.12
E	14.321	-11.32	9.87	50.23	-12.30	1.23	70.12	-8.90

[0286] 表三（复筛）化合物体外抗肿瘤生物活性测试筛选结果

[0287]

测试指标 : 抑制率				浓度: 50 μ g/ml				
样品名	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)	结果(%)
	U-937	A-549	Bel-7402	MCF-7	SMMC-7721	HL-60	Hela	LLC
5	91.03	91.23	78.97	95.53	85.01	95.14	94.55	86.54
6	94.09	90.12	83.56	94.13	87.12	95.55	92.33	85.02
7	91.23	65.29	65.23	84.12	1.23	90.23	89.12	-3.66
8	94.36	55.89	54.89	86.23	7.98	91.08	91.47	3.12
20	89.98	14.32	1.23	14.23	6.56	91.72	92.47	15.32
21	91.45	1.23	3.12	87.58	-2.93	89.79	91.67	7.58
E	19.78	-16.56	9.78	51.23	-0.23	1.79	78.56	-14.44

[0288] 实施例二化合物体外抗肿瘤 IC₅₀ 的实验

[0289] 1. 被试验的化合物

[0290] 5-14、17、20、21、E 共 15 个化合物以 5-FU 为阳性对照。

[0291] 2、材料

[0292] (1) MTT 以 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解 MTT, 调节浓度到 4mg/ml, 过滤除菌, 贮存于 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中。

[0293] (2) MTT 裂解液的配制 80g 的十二烷基磺酸钠溶解在 200ml 的 DMF 中, 水浴加热使之溶解, 加入 200ml 蒸馏水, 用 1 : 1 的 80% 乙酸和 1N 的 HCl 调节 PH 到 4.7。

[0294] (3) 使用的肿瘤细胞株

[0295] U-937 人组织细胞淋巴瘤

[0296] A-549 人肺腺癌细胞

[0297] Bel-7402 人肝癌细胞

[0298] MCF-7 人乳腺腺癌细胞

[0299] Hela 人宫颈癌细胞

[0300] HL-60 人早幼粒白血病细胞

[0301] SMMC-7721 人肝癌细胞

[0302] LLC 小鼠 Lewis 肺癌

[0303] 3、操作方法

[0304] (1) 单细胞悬液接种于 96 孔板 (用 PRMI-1640 基础培养基将细胞稀释到 3 \times 10⁴ 个/ml, 每孔加入 200 μ g 稀释好的细胞), 37 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO₂, 饱和湿度下培养 24 小时。每组 4 个平行样。

[0305] (2) 除去培养基, 取新配置培养基按系列浓度制备 (50 个化合物) 抗癌药物溶液, 每孔加入 200 μ g, 培养 48 小时。

[0306] (3) 每孔加入 2mg/ml 的 MTT 20 μ g, 孵化 4 小时。

[0307] (4) 吸出孔中培养液, 快速翻转培养板甩去培养液, 加入 DMSO 150 μ g/ 孔, 室温下震

荡 10 分钟。

[0308] (5) 用酶联检测仪测 OD 值 ($\lambda = 570\text{nm}$)。

[0309] (6) 绘制细胞活力曲线图, 求出 IC_{50} 。

[0310] 实验结果

[0311] 实验结果如下表四所示, 实验数据表明, 所有的化合物对 heLa 和 U-937 的 IC_{50} 比 E 和阳性 5-FU 对照接近或小, 证明很多新化合物的活性比母核莪术醇和阳性 5-FU 强。化合物 5、6 对所选的 8 种肿瘤细胞都有很强的抑制作用, 是广谱的抗肿瘤化合物。化合物 7、8 除了对 heLa 和 U-937 有很好的活性外, 对 U-937、HL-60 活性也很好。

[0312] 表四药用化合物筛选生物活性测试报告 (IC_{50})

[0313]

样品名	瘤株 IC_{50} (ug/ml)							
	HeLa	U-937	MCF	A-549	Bel-7402	HL-60	LLC	SMMC-7721
5	0.32	0.42	1.00	2.0	0.9	0.4	3.6	4.3
6	0.35	0.56	1.10	2.1	1.0	0.51	3.8	4.0
7	0.6	0.76	3.20			1.61		—
8	0.59	0.81	3.28			1.68		—
9	1.5	1.3						
10	1.53	2.1						
11	2.5	0.5						
12	2.4	0.65						
13	1.6	0.98						
14	1.5	0.58						
17	1.5	0.92	4.63			1.85		—
20	0.89	0.95	4.98			0.45		—
21	0.75	0.89	4.99	-	-	1.3	-	—
E	3.23	-	-	-	-	-	-	—
5-FU	2.86		1.53	0.7	0.54	0.51		

[0314] 实施例三化合物抗动物体内肿瘤活性实验

[0315] 化合物抗小鼠移植肉瘤 S-180 活性实验

[0316] 1、筛选的化合物

[0317] 我们选取了其中的第 6 号化合物 (莪术醇对羟苯胺盐酸盐)、第 8 号化合物 (莪术醇哌嗪酸盐)、第 21 号化合物 (莪术醇硫酸酯钠盐) 等三个化合物。

[0318] 2、材料

[0319] (1) 体重 18-22g 昆明鼠为实验鼠;

[0320] (2) 用注射用水 (其中化合物 6 溶解是需要加入 1% 的表面活性剂) 将三个化合物分别配制成 100mg/ml 的溶液备用。5-FU、喜树碱为阳性对照物对小鼠的用药量为 30mg/kg、1mg/kg;

[0321] (3) 0.9% 的生理盐水;

[0322] (4) 接种的肿瘤株为;

[0323] 肉瘤 S-180

[0324] 3、给药方式

[0325] 静脉注射。

[0326] 4、实验方法

[0327] 参照中华人民共和国药政管理局《新药 (西药) 临床前指导原则》和徐叔云等主编的《药物实验方法学》中相关的方法。取 20-22kg 昆明小鼠 120 只, 雄性, 正常饲养 3 天无异常, 常规腋下小鼠肉瘤 S-180, 4 小时后称重, 随机分组 10 只 / 组, 共 12 组。第一组给生理盐水 0.3 毫升, 为阴性对照组; 第二组给 5-FU 0.6mg / 只, 为阳性对照组; 第三组给羟基喜树碱 0.02mg / 只, 为阳性对照组。第四、五、六组注射浓度 10% 的化合物 6, 分别为 0.4ml / 只、0.2ml / 只、0.1ml / 只; 第七、八、九组注射浓度 10% 的化合物 8, 分别为 0.4ml / 只、0.2ml / 只、0.1ml / 只; 第十、十一、十二组注射浓度 10% 的化合物 20, 分别为 0.4ml / 只、0.2ml / 只、0.1ml / 只; 接种次日开始给药, 隔日连续给药, 1 次 / 天, 共六次。末次给药后次日称重处死, 剥取肿瘤称后称体重和瘤重, 按公式: $[(\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重}] \times 100\%$ 。计算肿瘤抑制率, 并对数据进行统计学处理。上述实验在相同条件下重复三次。

[0328] 实验结果见下表五; 实验结果表明: 对于小鼠肉瘤 S-180, 化合物 6 在三个不同的浓度下, 都有较好的抑制效果; 化合物 8 只有在浓度达到 40mg/kg, 才有抑制效果; 而化合物 21 几乎无抑制效果。

[0329] 表五 (第一次) 化合物抗小鼠移植肉瘤 S-180 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0330]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		20.3	22.1	2.50 ± 0.32	
二	5-FU	30	19.5	22.9	0.72 ± 0.23	71.2
三	羟基喜树碱	1	20.6	20.8	0.87 ± 0.28	65.2
四	化合物 6	40	19.9	22.0	0.62 ± 0.34	75.2
五		20	20.3	22.9	0.79 ± 0.21	68.4
六		10	19.6	22.3	1.1 ± 0.31	56

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
七	化合物 8	40	20.3	23.0	1.3±0.24	48
八		20	19.6	21.8	2.0±0.40	20
九		10	19.9	22.5	2.1±0.42	16
十	化合物 21	40	20.6	23.1	2.3±0.31	8
十一		20	19.9	22.5	2.4±0.43	4
十二		10	20.1	22.6	2.6±0.23	-

[0331] 表五 (第二次重复) 化合物抗小鼠移植肉瘤 S-180 活性实验结果 ($X \pm SD, n = 10$)

[0332]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		20.5	22.1	2.60±0.32	
二	5-FU	30	19.2	21.9	0.79±0.33	69.6
三	羟基喜树碱	1	20.0	20.8	0.92±0.38	64.6
四	化合物 6	40	19.5	22.0	0.71±0.44	72.7
五		20	20.7	21.9	0.82±0.32	68.8
六		10	20.6	22.3	1.1±0.31	57.7
七	化合物 8	40	20.7	23.0	1.4±0.37	46.1
八		20	20.6	21.8	2.2±0.29	15.4
九		10	21.0	23.5	2.2±0.31	15.4
十	化合物 21	40	20.1	23.1	2.4±0.36	7.6
十一		20	19.6	22.2	2.5±0.38	3.8
十二		10	20.4	22.6	2.5±0.42	3.8

[0333] 化合物抗小鼠移植肝癌 H22 活性实验

[0334] 重复化合物抗小鼠移植肉瘤 S-180 活性实验操作,但是接种的肿瘤株为肝癌 H22,上述实验在相同条件下重复三次。

[0335] 实验结果见下表六。实验结果表明:对于小鼠移植肝癌 H22,第 6 号化合物在三个不同的浓度下,都有较好的抑制效果;第 8 号化合物只有在浓度达到 40mg/kg,才有一定的抑制效果;而第 21 号化合物几乎无抑制效果。

[0336] 表六(第一次)化合物抗小鼠肝癌 H22 活性实验结果 ($X \pm SD, n = 10$)

[0337]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		19.6	22.2	3.02 ± 0.30	
二	5-FU	30	20.3	22.3	1.21 ± 0.31	60.0
三	羟基喜树碱	1	20.3	20.5	1.12 ± 0.28	63.9
四	化合物 6	40	19.9	22.1	1.15 ± 0.31	61.9
五		20	21.2	22.2	1.60 ± 0.29	47.0
六		10	20.6	22.0	2.8 ± 0.37	7.0
七	化合物 8	40	20.8	22.4	1.9 ± 0.36	37.1
八		20	21.0	21.9	2.9 ± 0.39	4.0
九		10	21.4	22.3	3.02 ± 0.33	-
十	化合物 21	40	20.5	22.1	2.9 ± 0.31	4.0
十一		20	19.2	22.0	3.03 ± 0.41	-
十二		10	20.3	22.1	3.00 ± 0.29	-

[0338] 表六(第二次)化合物抗小鼠肝癌 H22 活性实验结果 ($X \pm SD, n = 10$)

[0339]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		21.2	22.2	3.02±0.30	
二	5-FU	30	19.6	21.3	1.19±0.31	60.5
三	羟基喜树碱	1	20.3	20.2	1.00±0.28	66.9
四	化合物 6	40	20.8	22.4	1.21±0.31	60.3
五		20	20.3	22.0	1.58±0.29	47.7
六		10	20.1	21.0	2.6±0.37	13.9
七	化合物 8	40	20.4	21.4	1.93±0.36	36.1
八		20	21.8	21.9	2.9±0.39	4.0
九		10	21.0	22.3	3.10±0.33	-
十	化合物 21	40	20.5	22.1	3.0±0.31	1.0
十一		20	20.3	22.0	3.02±0.41	-
十二		10	19.2	22.1	3.03±0.29	-

[0340] 附表六（第三次）化合物抗小鼠肝癌 H22 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0341]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		20.2	22.0	3.02±0.30	
二	5-FU	30	19.9	20.3	1.08±0.31	64.2
三	羟基喜树碱	1	21.3	22.2	1.05±0.28	65.3
四	化合物 6	40	19.8	21.4	1.30±0.31	56.9
五		20	19.3	20.0	1.63±0.29	46.0

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
六		10	20.5	21.2	2.8±0.37	7.3
七	化合物 8	40	21.4	21.9	2.01±0.36	33.4
八		20	19.8	20.9	2.8±0.39	7.3
九		10	19.0	20.3	2.95±0.33	2.3
十	化合物 21	40	19.5	20.1	3.0±0.31	1.0
十一		20	19.3	21.0	3.01±0.41	-
十二		10	20.2	22.1	3.02±0.29	-

[0342] 化合物抗小鼠移植宫颈癌 U14 活性实验

[0343] 重复化合物抗小鼠移植肉瘤 S-180 活性实验操作,但是

[0344] (1) 接种的肿瘤株为小鼠宫颈癌 U14 ;

[0345] (2) 所用小鼠都为雌鼠。

[0346] 上述实验在相同条件下重复三次

[0347] 实验结果见下表七。实验结果表明:对于小鼠移植宫颈癌 U14,化合物 6、8、21 在三个不同的浓度下,都有较好的抑制效果;当给药浓度为 20mg/kg 以上时,对于小鼠移植宫颈癌 U14 的抑制率都达到 50% 以上,当给药浓度为 40mg/kg 时,对于小鼠移植宫颈癌 U14 的抑制率都达到 60% 以上,而化合物 6、21 更是达到 70% 以上。

[0348] 表七(第一次)化合物抗小鼠宫颈癌 U14 活性实验结果 ($X \pm SD, n = 10$)

[0349]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		19.2	22.0	3.51±0.30	
二	5-FU	30	20.9	21.3	2.10±0.31	40.2
三	羟基喜树碱	1	20.3	22.2	1.90±0.28	45.8
四	化合物 6	40	19.1	21.4	0.96±0.31	72.6
五		20	20.3	21.0	1.23±0.29	65.0

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
六		10	21.5	22.2	2.2±0.37	37.3
七	化合物 8	40	21.0	21.9	1.15±0.36	67.2
八		20	19.2	20.9	1.60±0.39	54.4
九		10	19.9	20.9	2.26±0.33	35.6
十	化合物 21	40	19.6	21.1	0.99±0.31	71.8
十一		20	19.9	21.0	1.52±0.41	56.7
十二		10	20.6	22.1	1.68±0.29	52.1

[0350] 表七 (第二次) 化合物抗小鼠宫颈癌 U14 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0351]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		19.8	22.6	3.40±0.30	
二	5-FU	30	20.0	21.3	1.95±0.31	42.6
三	羟基喜树碱	1	20.6	22.3	1.82±0.28	46.5
四	化合物 6	40	19.9	21.6	0.90±0.31	73.5
五		20	20.3	21.6	1.20±0.29	64.7
六		10	21.5	22.0	2.3±0.37	32.3
七	化合物 8	40	20.3	21.2	1.20±0.36	64.7
八		20	19.6	20.9	1.51±0.39	55.6
九		10	20.9	21.9	2.08±0.33	38.8
十	化合物 21	40	19.8	21.0	0.89±0.31	73.8
十一		20	19.9	21.1	1.46±0.41	57.1

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
十二		10	20.6	22.5	1.59±0.29	53.2

[0352] 表七（第三次）化合物抗小鼠宫颈癌 U14 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0353]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		19.2	22.2	3.62±0.30	
二	5-FU	30	20.5	21.0	2.10±0.31	42.0
三	羟基喜树碱	1	20.1	21.3	1.96±0.28	45.6
四	化合物 6	40	20.1	21.6	1.01±0.31	72.1
五		20	19.3	21.6	1.32±0.29	63.5
六		10	20.1	22.1	2.32±0.37	35.9
七	化合物 8	40	20.2	21.3	1.25±0.36	65.5
八		20	19.9	21.9	1.65±0.39	54.4
九		10	20.1	21.5	2.14±0.33	40.1
十	化合物 21	40	19.1	20.1	0.95±0.31	73.7
十一		20	19.7	21.0	1.51±0.41	58.3
十二		10	20.6	22.0	1.64±0.29	54.7

[0354] 化合物抗小鼠移植肺癌 Lewis 活性实验

[0355] 重复化合物抗小鼠移植肉瘤 S-180 活性实验操作,但是

[0356] (1) 接种的肿瘤株为小鼠肺癌 Lewis ;

[0357] (2) 化合物为 6,8 和 21 不再做活性实验 ;

[0358] (3) 实验鼠为六组。

[0359] 上述实验在相同条件下重复三次

[0360] 实验结果见下表八。实验结果表明:对于移植小鼠肺癌 Lewis,化合物 6 在三个不同的浓度下,都有一定的抑制效果;分别为:51.6%、44.8%、29.4%。当给药浓度为

40mg/kg 时,对于小鼠肺癌 Lewis 的抑制率与阳性对照的喜树碱相当,与 5-FU 相近。

[0361] 表八(第一次)化合物抗小鼠肺癌 Lewis 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0362]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		20.1	23.2	2.98 ± 0.30	
二	5-FU	30	19.5	21.0	1.34 ± 0.31	55.0
三	羟基喜树碱	1	19.8	21.0	1.50 ± 0.28	49.7
四	化合物 6	40	20.3	21.6	1.44 ± 0.31	51.7
五		20	19.6	21.1	1.71 ± 0.29	42.6
六		10	20.2	22.1	2.10 ± 0.37	29.5

[0363] 表八(第二次)化合物抗小鼠肺癌 Lewis 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0364]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		20.3	22.6	2.41 ± 0.30	
二	5-FU	30	19.8	21.5	1.10 ± 0.31	54.3
三	羟基喜树碱	1	19.1	21.0	1.20 ± 0.28	50.2
四	化合物 6	40	19.3	20.6	1.19 ± 0.31	50.6
五		20	19.2	21.8	1.34 ± 0.29	44.4
六		10	20.9	22.9	1.80 ± 0.37	25.3

[0365] 表八(第三次)化合物抗小鼠肺癌 Lewis 活性实验结果 ($X \pm SD$, $n = 10$)

[0366]

组别		剂量 (mg/kg)	平均体重 (g) 给药前	平均体重 (g) 给药后	瘤重 (g)	抑制率 (%)
一	生理盐水		21.0	24.6	2.70±0.30	
二	5-FU	30	21.3	23.5	1.25±0.31	53.7
三	羟基喜树碱	1	19.9	21.5	1.30±0.28	51.9
四	化合物 6	40	21.3	24.6	1.28±0.31	52.6
五		20	21.9	24.8	1.42±0.29	47.4
六		10	20.6	22.9	1.80±0.37	33.3

[0367] 实施例四体外抗 HIV-1 蛋白酶 (HIV-1 PR) 活性筛选

[0368] 测试原理 :HIV-1 蛋白酶在最佳反应条件和反应体系中可将荧光标记底物切开,检测酶反应产物中荧光强度来反映酶的活性。在反应体系中加入样品可用于筛选该酶的抑制剂。

[0369] 测试材料和方法 :

[0370] 1. HIV-1 PR :外购, -85℃ 保存。

[0371] 2. 样品处理 :样品临用前溶于 DMSO 配成适当浓度,并用双蒸水作 5 倍稀释,各 5 个稀释度。

[0372] 3. 阳性对照药 :印地那韦 (indinavir),由葛兰素公司提供。

[0373] 4. 测试方法 :样品稀释后加入含有荧光标记底物反应缓冲液中,并加入基因工程靶酶,在最佳反应条件下孵育,用 FLUO star Galaxy 荧光仪测定荧光值。

[0374] 测试结果 :

[0375] 表九样品抗 HIV-1 蛋白酶初筛报告

[0376] 测试样品在不同浓度下的抑制率及 IC₅₀

[0377]

样品名	50 (μ g/ml)	10 (μ g/ml)	2.0 (μ g/ml)	0.40 (μ g/ml)	0.08 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)
化合物 2	12.66	12.20	2.98	8.64	4.13	-
化合物 3	5.55	12.06	9.64	13.48	4.98	-
化合物 5	1.01	11.22	10.30	9.00	4.38	-

样品名	50 (μ g/ml)	10 (μ g/ml)	2.0 (μ g/ml)	0.40 (μ g/ml)	0.08 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)
化合物 6	7.07	13.15	2.99	1.7	0.89	-
化合物 7	1.43	3.51	4.31	6.32	14.06	-
化合物 8	1.40	0.62	5.27	2.64	9.74	-
化合物 17	9.94	6.15	-6.00	10.71	3.78	-
化合物 20	12.68	9.46	10.57	7.44	8.76	-
化合物 21	5.47	10.16	5.86	14.77	8.74	-
化合物 23	1.39	11.23	13.69	11.14	11.88	-
化合物 24	-0.63	2.57	11.62	13.48	3.32	-
化合物 33	9.14	1.30	10.63	11.41	13.21	-
化合物 47	0.56	1.78	12.94	12.32	6.89	-
	10nM					
	92.1					

[0378] 注：表中“-”表示样品在初始浓度物抑制 HTV-1 Pr 活性；

[0379] “*”表示样品自身有荧光，干扰检测系统，测定结果不准确。

[0380] 实验结果表明：以 200 μ g/ml 浓度筛选，发现各个化合物均无活性。

[0381] 实施例五体外抗 HIV-1 逆转录酶 (HIV-1 RT) 活性筛选

[0382] 测试原理：将 HIV-1 逆转录酶作用的模版包被在酶标版上，在最适酶反应条件和反应体系中，HIV-1 RT 可将含有 Biotin-dUTP 底物加到反应模版上，用链亲合素标记的辣根过氧化物酶检测酶反应物中 Biotin-dUTP 掺入量来反映酶的活性。在反应体系中加入样品可用于筛选该酶的抑制剂。

[0383] 测试材料和方法：

[0384] 1. HIV-1 RT：外购。

[0385] 2. 样品处理：样品临用前溶于 DMSO 配成适当浓度，并用双蒸水作 5 倍稀释，各 5 个稀释度。

[0386] 3. 阳性对照药：奈韦拉平 (NVP)，由常州三厂生产。

[0387] 4. 测试方法:样品稀释后加入含有 Biotin-dUTP 合基因工程靶酶的反应 Buffer 中,在最佳反应条件下孵育,以亲合素标记歌德辣根过氧化物酶系统显色,测定 OD₄₅₀ 值。

[0388] 表十样品抗 HIV-1 逆转录酶初筛报告

[0389]

编号	初始浓度	IC ₅₀	编号	初始浓度	IC ₅₀
化合物 2	原液的 1/150	*	化合物 20	200 μg/ml	-
化合物 3	原液的 1/150	*	化合物 21	200 μg/ml	-
化合物 5	200 μg/ml	-	化合物 23	200 μg/ml	-
化合物 6	200 μg/ml	-	化合物 24	200 μg/ml	-
化合物 7	200 μg/ml	-	化合物 33	200 μg/ml	-
化合物 8	200 μg/ml	-	化合物 47	200 μg/ml	-
化合物 17	200 μg/ml	-	NVP	10 μg/ml	0.21 μg/ml

[0390] 注:表中“-”表示样品在初始浓度无抑制 HIV-1 RT 的活性。

[0391] *表示样品在初始浓度有抑制 HIV-1 RT 的活性。

[0392] 实验结果表明:第 2、3 号化合物在浓度为 120ug/ml 时,抑制率为 60%,新化合物抗 HIV-1 逆转录酶,只是有活性,但是效果并不佳。

[0393] 实施例六体外抗 HIV-1 整合酶 (HIV-1IN) 活性筛选

[0394] 测试原理:用合成的 30 个寡核苷酸作供体底物,用合成的 20 个寡核苷酸作为靶底物,在 96 孔板包被供体底物加入纯化的 HIV-1 整合酶,进行 ELISA 反应,检测靶 DNA 的链转移的产物,以生物素标记的碱性磷酸酶系统显色,酶标仪测定 OD 值。在反应体系中加入样品可用于筛选该酶的抑制剂。

[0395] 测试材料和方法:

[0396] 1. HIV-1 IN:外购。

[0397] 2. 样品处理:样品 11 个,临用前溶于水或 DMSO 配成适当浓度,再作 5 倍稀释,4 个稀释度。原液两个液体样品用 DMSO 稀释 100 倍后再作 5 倍稀释,4 个稀释度。阳性对照药:S-y,上海有机所提供。

[0398] 3. 供体底物和靶底物:上海生工合成。

[0399] 4. 测试方法:样品稀释后加入供体底物包被 96 孔板中,并加入含有基因工程靶酶和 biotin- 靶底物的反应 Buffer 中,在最佳反应条件下孵育,以生物素标记的碱性磷酸酶系统显色,测定 405nm 吸收值 OD 值。

[0400] 测试结果:

[0401] 表十一样品抗 HIV-1 整合酶初筛报告

[0402]

编号	初始浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	编号	初始浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
化合物 2	1/1000(原液)	35.681	化合物 20	100	39.820
化合物 3	1/1000(原液)	35.983	化合物 21	100	-
化合物 5	100	-	化合物 23	100	-
化合物 6	100	-	化合物 24	100	-
化合物 7	100	-	化合物 33	100	-
化合物 8	100	-	化合物 47	100	-
化合物 17	100	-			-
S-y		0.545			

[0403] 注:表中“-”表示样品在初始浓度抑制 HIV-1 IN 活性的百分率小于 50%。

[0404] 实验结果表明:第 20 号化合物对 HIV-1 整合酶 (HIV-1 IN) 有比较好的抑制作用, IC₅₀ 为 39.820 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0405] 实施例七抗流感甲、乙型病毒活性筛选

[0406] 测试原理:以 MDCK(狗肾)细胞为病毒宿主,测定样品抑制病毒引起细胞病变程度 (CPE)。

[0407] 测试材料和方法:

[0408] 1. 病毒株:流感甲型病毒(济防 90-15),流感乙型病毒(济防 97-13),在鸡胚尿囊腔内培养传代(2003.8),-80℃保存。

[0409] 2. 样品处理:样品溶于 DMSO,再用培养液配成适宜初始浓度,用培养液作 3 倍稀释,各 8 个稀释度。

[0410] 3. 阳性对照药:病毒唑(RBV),浙江康裕药业有限公司(批号 960501)。

[0411] 4. 测试方法:MDCK 细胞接种 96 孔培养板,置 5% CO₂,37℃培养 24 小时。MDCK 细胞分别加入流感甲型病毒 10⁻³(60 倍 TCID₅₀)、流感乙型病毒 10⁻²(30 倍 TCID₅₀),37℃吸附 2 小时后倾去病毒液,分别加入不同稀释度药物。设病毒对照和细胞对照,37℃培养 36 小时,观察结果,记录 CPE,计算各样品抗流感病毒半数抑制浓度 (IC₅₀)。

[0412] 测试结果:

[0413] 表十二抗流感甲、乙型病毒初筛报告

[0414]

样品编号	TC ₅₀ (μg/ml)	对流感甲型		对流感乙型	
		IC ₅₀ (μg/ml)	SI	IC ₅₀ (μg/ml)	SI
25	>1000	-	-	-	-
21	>1000	47.72	20.96	-	-
E	>1000	-	-	-	-
6	192.45	-	-	-	-
14	143.17	-	-	-	-
8	192.45	-	-	-	-
2	原液的 1/12150	-	-	-	-
3	原液的 1/8403	-	-	-	-
RBV	>2000	2.06	970.87	6.17	324.15

[0415] 注：(1) 表中“-”表示样品在最大无毒剂量无抗流感甲、乙型病毒活性。

[0416] (2) TC₅₀：药物半数有毒浓度；IC₅₀：药物对病毒半数抑制浓度；SI：选择指数，SI = TC₅₀/IC₅₀。

[0417] 实验结果表明：第 20 号化合物有活性，但是，活性不是很强。

[0418] 实施例八抗疱疹病毒的药物筛选

[0419] 材料和方法

[0420] 实验样品：第 3-8、14、17、19、20、21、43 化合物和莜术醇 E，分别用 PBS 或无水乙醇配制成母液浓度，0.45um 滤器过滤除菌，置于 4℃ 避光保存备用。

[0421] 病毒和细胞：口膜疱疹病毒 (VSV)，293，BHK 细胞由中国科学院武汉病毒所肝炎及基因治疗组液氮保存。细胞在 CO₂ 培养箱中 37℃ 培养，培养液为 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清 (Gibico 公司)

[0422] 病毒制备及滴度测定：VSV 感染 BHK 细胞增殖病毒，2~3 天后离心去沉淀，收集细胞上清，用 TCID₅₀ 法测病毒滴度，-80℃ 避光保存备用。

[0423] 药物筛选：将 293 细胞计数，按 1.5×10^4 / 孔接种于 96 孔板中 37℃ CO₂ 培养过夜，将实验样品按一定浓度加入到细胞中，并用 MOI = 5×10^{-3} 的 VSV 感染细胞，同时设阴性阳性对照。感染后 12、24 小时观察细胞的病变情况，并用数码相机照相。

[0424] 实验结果：样品感染 24 小时后细胞病变及细胞状态见下表十三，

[0425] 表十三样品抗疱疹病毒初步筛选实验结果

[0426]

编号	样品浓度 (μ g/ml)	细胞病变及细胞状态	
		样品+VSV	样品
化合物 3	200	病变	一般
化合物 4	200	病变	好
化合物 5	200	病变	好
化合物 6	200	病变	好
化合物 7	200	病变	好
化合物 8	200	病变	好
化合物 14	200	病变、差	差
化合物 17	200	病变	好
化合物 19	200	病变	凋亡
化合物 20	200	病变	好
化合物 21	200	病变不明显	一般
化合物 43	200	病变、较差	较差
E	200	病变、较差	较差
VSV	MOI=0.005	病变	病变
PBS+培养基	1%	病变	好
乙醇+培养基	1%	病变	好

[0427] 部分感染 12 小时后细胞病变及细胞状态：由于样品的使用浓度较高 (200 μ g/ml)，对细胞的毒性较大，我们降低样品浓度 (50 μ g/ml) 进行筛选实验，结果见下表十四。

[0428]

样品编号	样品浓度(μ g/ml)	细胞病变及细胞状态	
		样品+VSV	样品
14	50	病变	好
43	50	病变	好
E	50	病变	好
VSV	MOI=0.005	病变	病变
PBS+培养基	1%	病变	好
乙醇+培养基	1%	病变	好

[0429] 初筛样品感染 12、24 小时后细胞病变及细胞状态

[0430] 第一轮初筛后，结果初步显示 13 个样品中，21 号具有一定的抗 VSV 的活性。进一步采用不同的实验浓度，对第 21 号化合物进行药物筛选实验，实验结果如下：

编号	样品浓度 (μ g/ml)	细胞病变及细胞状态		
		样品+VSV		12、24h 细胞状态
		12h	24h	
[0431] 化合物 21	12.5	病变	病变	好
	25	病变	病变	好
	50	大部分病变	病变	好
	100	部分病变	病变	好
	200	病变不明显	部分病变	一般

[0432] 实验结果表明：第 21 号化合物在浓度为 200 μ g/ml 时具有一定的抗 VSV 的活性。

[0433] 实施例九抗乙肝病毒的筛选

[0434] 1 材料和方法

[0435] 1.1 实验样品

[0436] 样品编号 6, 16, 14, 2, 3, 24, 17, 20, 33, 莜术醇, 25, 47, 21, 分别用 PBS 或无水乙醇配制成母液浓度, 0.45 μ m 过滤器过滤除菌, 置于 4 避光保存备用。

[0437] 1.2 病毒和细胞

[0438] HBV 重组杆状病毒 (vAcGFPHBVc), sf9、HepG2 细胞由中国科学院武汉病毒所肝炎及基因治疗组液氮保存。细胞在 CO₂ 培养箱 (FORMA 公司) 37 培养, 培养液为 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清 (Gibico 公司)

[0439] 1.3 病毒制备及滴度测定

[0440] vAcGFPHBVc 感染 sf9 细胞增殖病毒, 3 天后离心去沉淀, 收集细胞上清, 用 TCID₅₀ 法测 vAcGFPHBVc 病毒滴度, -80 避光保存备用。

[0441] 1.4 乙型肝炎病毒 e 抗原的检测 (ELISA 方法): 过程简述如下:

[0442] 1. 将反应板及试剂置于 37 平衡 30 分钟, 待测样品置于室温平衡 30 分钟;

[0443] 2. 每孔加入待测样品 50 μ l, 设阴阳性对照各 2 孔, 每孔加入阴性对照 (或阳性对照) 各 1 滴, 并设空白对照 1 孔;

[0444] 3. 每孔加入酶结合物 1 滴 (空白对照除外), 混匀, 封板, 置于 37 孵育 30 分钟;

[0445] 4. 洗板机洗板: 洗涤 5 次后拍干;

[0446] 5. 每孔加入显色剂 A 液、B 液各一滴, 混匀, 封板, 置于 37 孵育 15 分钟;

[0447] 6. 每孔加入终止液 1 滴, 混匀;

[0448] 7. 酶标仪读数, 取波长 450nm, 空白孔校零。

[0449] 乙型肝炎病毒 e 抗原诊断试剂盒购自上海实业科华生物技术有限公司。

[0450] 1.5 药物筛选

[0451] 将 HepG2 细胞计数, 按 1.5×10^4 /孔接种于 96 孔板中 37CO₂ 培养过夜, 将验样品按一定浓度加入到细胞中 37 孵浴 24 小时后, 用 MOI = 100 的 vAcGFPHB 转导处理的 HepG2 细胞, 同时设阴性阳性对照。感染后 4 天后观察细胞的生长情并用乙型肝炎病毒 e 抗原诊断试剂盒测定上清中的乙型肝炎病毒 e 抗原。

[0452] 2 实验结果

[0453] 2.1 乙型肝炎病毒 e 抗原的检测结果

[0454] 第一轮初筛后,排除药品对细胞的影响,结果初步显示 13 个样品中,化合物 6,16,2 号具有抗 HBV 的活性。

[0455]

编号	样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞状态	HBeAg 的 OD ₄₅₀	(阳性值 - 测定值) / 阳性值 $\times 100\%$
6	200	正常	0.126	93.42723
16	200	正常	0.502	73.81325
14	200	差	0.053	97.23516
2	200	正常	0.607	68.33594
3	200	正常	2.61	-36.1502
24	200	正常	2.387	-24.5179
17	200	差	0.073	96.19197
20	200	正常	2.201	-14.8148
33	200	差	0.068	96.45279
莪术醇	200	正常	2.654	-38.4455
25	200	差	2.527	-31.8206
47	200	差	0.365	80.95983
21	200	生长迟缓	0.137	92.85342
+		正常	1.917	
-		正常	0.057	

[0456] 附图 1 显示了乙型肝炎病毒 e 抗原样品 OD₄₅₀ 测定值,其中横坐标代表试验样品编号,它们各自与本发明化合物的对应关系如下所示:

[0457] 图中编号:1,2,3,4,5,6,7, A, B, C, D, E, F,

[0458] 化合物编号 6,16,14,2,3,24,17,20,33,莪术醇,25,47,21,

[0459] POSITIVE 代表阳性对照

[0460] NEGATIVE 代表阴性对照

[0461] 附图 2 显示了与阳性对照相比较,样品 HbeAg 的降低百分率,图中各编号的含义与图 1 中的相同。

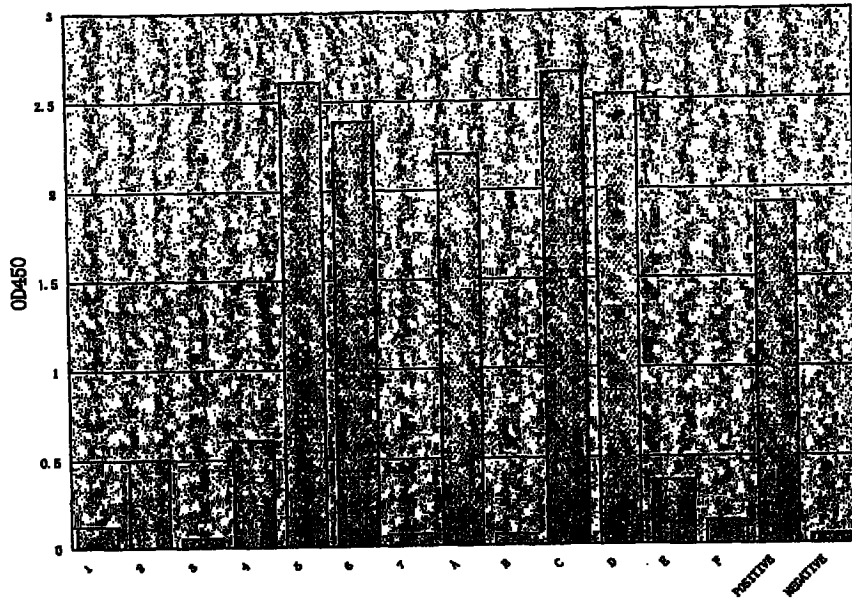


图 1

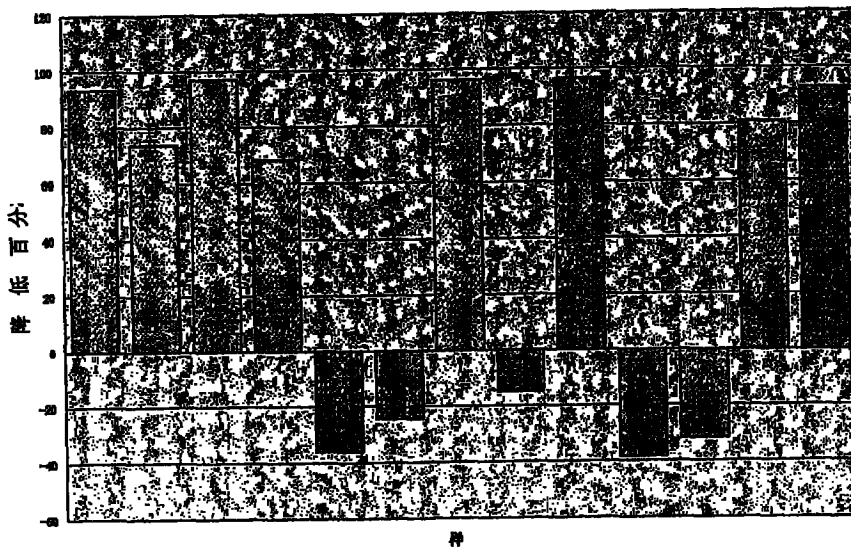


图 2