



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102675311 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201210148814. 0

(22) 申请日 2012. 05. 03

(66) 本国优先权数据

201110160055. 5 2011. 06. 14 CN

(71) 申请人 苏春华

地址 510620 广东省广州市天河区中海康城
风信街 5 栋 302

申请人 张哲峰

(72) 发明人 苏春华 张哲峰

(51) Int. Cl.

C07D 471/04 (2006. 01)

A61K 31/4375 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

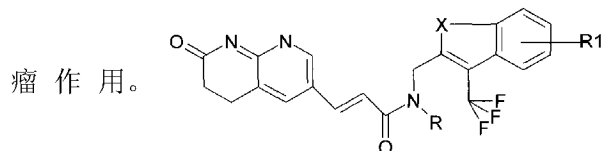
权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

一种氟代丙烯酰胺的衍生物

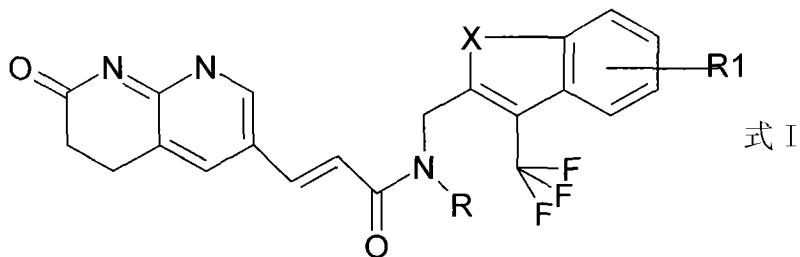
(57) 摘要

一种具有显著抗菌及抗肿瘤活性的新化合物, 结构如下 (式 I), 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 及甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 具有很好的抗菌作用, 对于人宫颈癌 HeLa 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞、人粘液性表皮样肺癌 A549 细胞, 人乳腺癌 MCF-7/s 细胞, 人神经胶质瘤 U251 细胞具有较好的抗肿瘤作用。



(式 I) R = -CH₃ 或 CF₃ X = O、S 或 NR₁
= -Cl、-F、-CH₃、-CF₃、-OCH₃、-OCF₃。

1. 式 I 所示的化合物及其在药学上可以接受的酸的盐及水合物：



R = -CH₃ 或 CF₃；

X = O、S 或 N；

R₁ = -Cl、-F、-CH₃、-CF₃、-OCH₃、-OCF₃。

2. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CH₃, X = O、S、N, R₁ = -H。

3. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CF₃, X = O、S、N, R₁ = -H。

4. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CH₃, X = O, R₁ = -H。

5. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CH₃, X = S, R₁ = -H。

6. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CH₃, X = N, R₁ = -H。

7. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CF₃, X = O, R₁ = -H。

8. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CF₃, X = S, R₁ = -H。

9. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其中 R = -CF₃, X = N, R₁ = -H。

10. 如权利要求 1-9 所述的化合物及其在药学上可以接受的酸的盐及水合物和其它药用辅料组成的药物组合物在制备用于治疗癌症、肿瘤或其相关病症的药物中的用途。

一种氟代丙烯酸酰胺的衍生物

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种用于抗菌作用的新化合物，该化合物对 MRSA、MSSA 具有很好的抗菌活性。

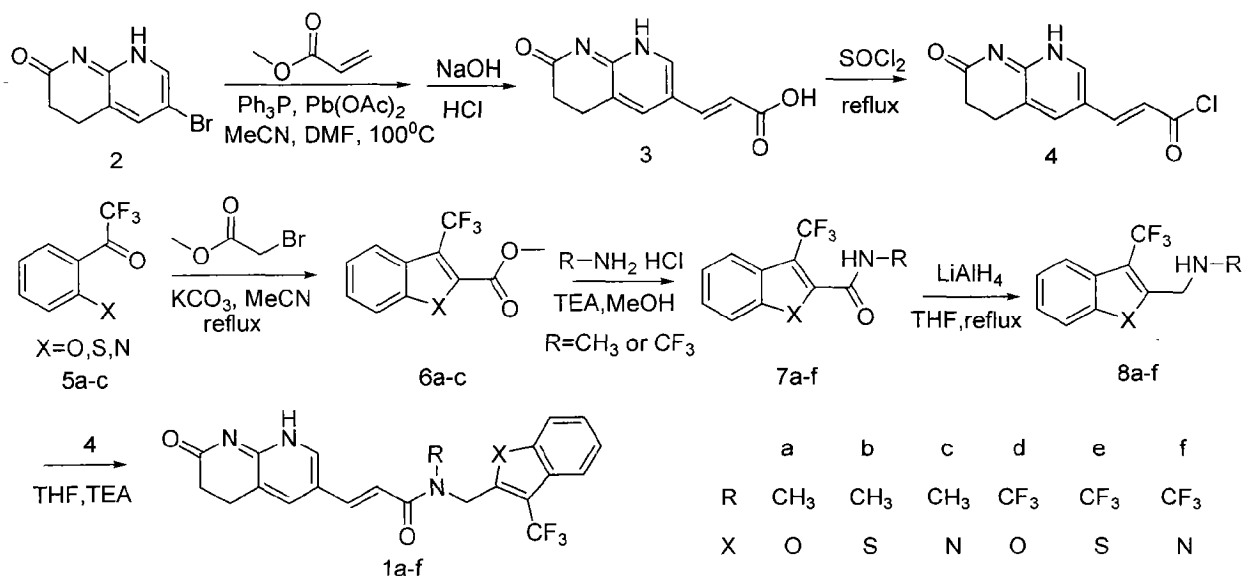
背景技术：

[0002] 近年来，随着抗生素的广泛应用（包括人和动物）、糖皮质激素及免疫抑制剂应用的增加以及老年患者的增多，肺部耐药菌感染问题日益突出。这些耐药菌常见的有耐青霉素肺炎链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、耐万古霉素肠球菌（VRE）、产超广谱 β 内酰胺酶（ESBL）革兰阴性菌等。有关耐甲氧西林金黄色葡萄球菌也是比较棘手的问题，自首株 MRSA 检出以来的 40 余年，MRSA 感染在世界各地一直呈上升趋势，美国国家院内感染监测（NNIS）报道，1975 年 182 所医院 MRSA 占金葡菌感染总数的 2.4%，1997 年上升至 24.8%。国内 90 年代后京、沪等地大型医院 MRSA 分离率均超过金葡菌感染总数的 50% 以上。MRSA 具有多重耐药性，对所有 β 内酰胺类抗生素（包括含酶抑制剂）耐药，并常对喹诺酮类、氨基糖苷类、大环内酯类抗生素及克林霉素等耐药。临床证实，糖肽类抗生素（万古霉素、去甲万古霉素、替考拉宁）对 MRSA 敏感，目前已成为临床上首选药物。1997 年日本发现对万古霉素中度敏感的金黄色葡萄球菌（VISA），2002 年美国发现耐万古霉素的金黄色葡萄球菌（VRSA），迄今为止，全世界已报道多例 VISA 及 2 例 VRSA 感染的病例。VISA 感染可选用糖肽类与其他抗生素联合治疗，如利福平、阿米卡星 / 阿贝卡星等，亦可选用新型抗生素，如奎奴普丁 / 达福普丁（quinupristin/dalfopristin）、利奈唑胺（linezolid）等，VRSA 感染可选用新型抗生素。然而这些药物在临床应用一段时间后均产生了不同程度的耐药性，因此探究针对耐药菌的新抗生素成为了必要。我们合成了一系列如权利要求 1 所述的化合物，经过实验证明具有较好的抗菌作用和一定的抗肿瘤作用。

发明内容

[0003] 我们提供了一种氟代丙烯酸酰胺化合物，这种化合物对耐甲氧西林金葡菌（MRSA）、甲氧西林敏感金葡菌（MSSA）的抑菌效果显著，优于去甲基万古霉素等抗生素，同时通过实验证明该化合物具有抗肿瘤作用。这种化合物可通过下列的路线来制备：

[0004]

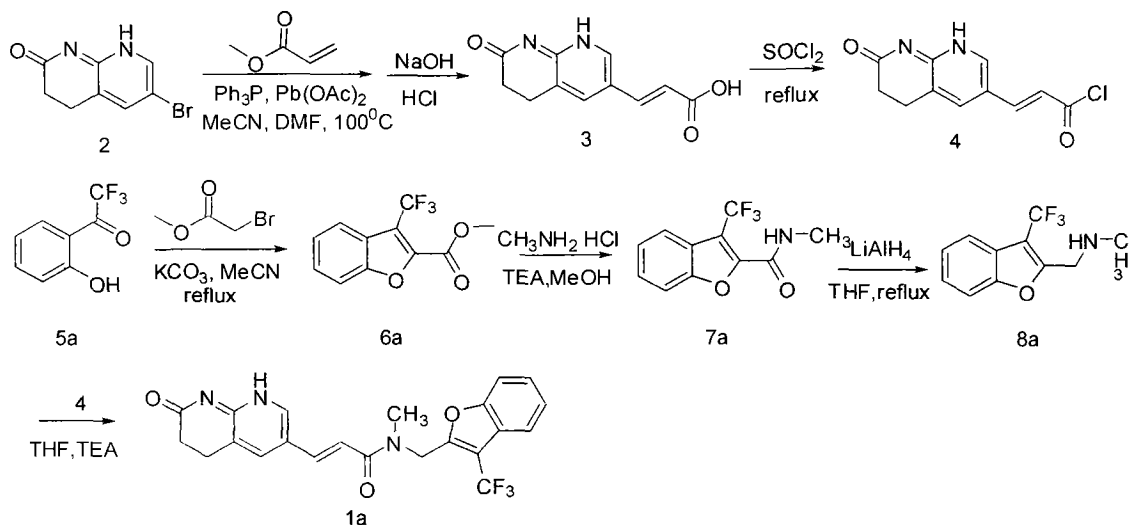


[0005] 其中化合物 1a-f 指 R = -CH₃ 或 CF₃、X = O、S 或 N、R₁ = -H 时 6 个不同的化合物。

具体实施例：

[0006] 实施例 1：化合物 1a 的合成

[0007]



[0008] 1) 化合物 3 的合成：

[0009] 将 45.4 克原料 2, 20.6 克丙烯酸甲酯和 1.26 克三苯基磷溶于 100.0mL 的 DMF 和 200.0mL 的乙腈中, 加入醋酸铅 0.66 克, 反应体系用氮气置换三次, 在氮气氛围下, 100℃ 中搅拌过夜。停止反应, 冷却至室温, 抽滤, 滤液减压蒸馏除去溶剂后加入 400.0mL 10.0% 的氢氧化钠溶液, 搅拌 3 小时后, 浓盐酸调节 pH = 3.0 左右, 有大量的固体析出, 抽滤, 滤饼用乙醇重结晶, 50℃ 下真空干燥 5 小时后得到 26.5 克化合物 3, 产率为 61%。HNMR(400Hz, CDCl₃) : 11.01 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.61 (d, J = 13.6Hz, 1H), 6.42 (d, J = 13.6Hz, 1H), 2.84 (t, J = 4.8Hz, 2H), 2.51 (t, J = 4.8Hz, 2H); MS(m/z) : 219.2。

[0010] 2) 化合物 4 的合成：

[0011] 将 26.4 克化合物 3 加入到 100.0mL 的氯化亚砷中, 在 80℃ 下回流 3 小时, 减压蒸

馏除去没有反应完的氯化亚砷后得到化合物 4, 产品不经后处理, 用氮气保护低温保存备用即可。

[0012] 3) 化合物 6a 的合成:

[0013] 将 0.2mol 的原料 5a, 0.24mol 的溴乙酸甲酯和 0.6mol 的无水碳酸钾在 200mL 的乙腈中回流过夜。停止加热, 冷却至室温, 抽滤, 滤液减压蒸馏后用乙醇重结晶, 得到化合物 6a。C₁₁H₇F₃O₃, 33.2 克, 产率为 68%。HNMR(400Hz, CDCl₃): 7.49(m, 1H), 7.42(m, 1H), 7.19(m, 1H), 7.13(m, 1H), 3.88(s, 3H); MS(m/z): 245.2。

[0014] 4) 化合物 7a 的合成

[0015] 将 0.05mol 化合物 6a, 0.1mol 甲胺盐酸盐和 0.1mol 三乙胺加入到 100.0mL 的甲醇中, 在 60℃ 下搅拌 5 小时。停止反应, 反应液冷却至室温, 减压蒸馏除去甲醇, 加入 100.0mL 冰水, 有大量的固体析出, 抽滤, 得到固体, 用水洗涤 (50mL×3) 后用乙醇重结晶后得到化合物 7a。C₁₁H₈F₃NO₂, 11.2 克, 产率为 92%, MS(m/z): 244.2。

[0016] 5) 化合物 8a 的合成:

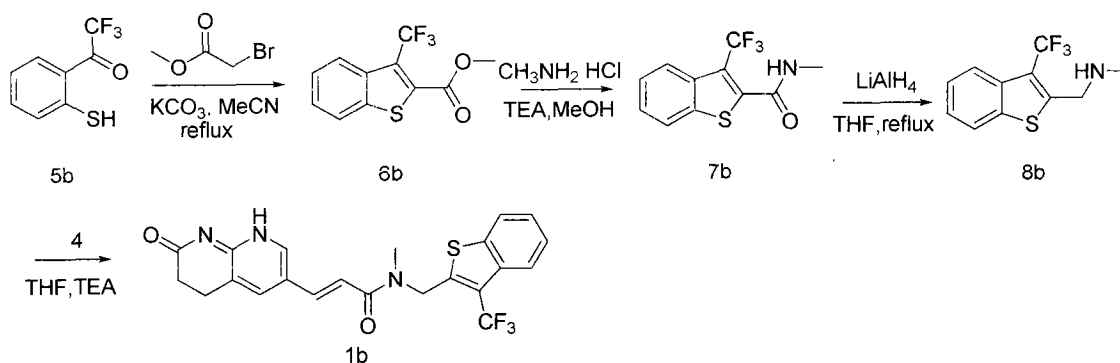
[0017] 将 0.04mol 化合物 7a 溶于 80mL 的 THF 中, 在冰水浴中分批加入 0.02mol 四氢铝锂, 加毕, 在 70℃ 下回流 3 小时, 冷却至室温, 在冰水浴中慢慢滴加 100.0mL 氯化铵饱和溶液, 抽滤, 滤液分层, 取上层有机相, 水相用 DCM 萃取 (30mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压蒸馏后得到固体, 乙醇结晶后得到化合物 8a。C₁₁H₁₀F₃NO, 8.1 克, 产率为 88%, MS(m/z): 230.1。

[0018] 6) 化合物 1a 的合成:

[0019] 将 10.0mmol 化合物 4 和 12.0mmol 化合物 8a 溶于 50.0mL 的 THF 中, 在冰浴下滴加 15.0mmol 三乙胺的 20.0mL 的 THF 溶液。滴加完毕后, 反应液在室温下继续搅拌 3 小时, 停止反应, 倒入 100mL 水, 分层, 水层用 DCM 萃取 (50mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后减压蒸馏得到化合物 1a 的粗产品, 经无水乙醇重结晶后得到目标化合物 1a。C₂₂H₁₈F₃N₃O₃, 3.3 克, 产率为 79%, HNMR(400Hz, CDCl₃): 8.51(s, 1H), 8.01(s, 1H), 7.89(s, 1H), 7.50(d, J = 13.6Hz, 1H), 7.49(m, 1H), 7.42(m, 1H), 7.19(m, 1H), 7.13(m, 1H), 6.98(d, J = 13.6Hz, 1H), 4.07(s, 2H), 2.90(s, 3H), 2.83(t, J = 4.8Hz, 2H), 2.51(t, J = 4.8Hz, 2H); MS(m/z): 430.4。

[0020] 实施例 2: 化合物 1b 的合成

[0021]



[0022] 1) 化合物 6b 的合成:

[0023] 将 0.2mol 的原料 5b, 0.24mol 的溴乙酸甲酯和 0.6mol 的无水碳酸钾在 200mL 的乙腈中回流过夜。停止加热, 冷却至室温, 抽滤, 滤液减压蒸馏后用乙醇重结晶, 得到化合物

6b。C₁₁H₇F₃O₂S, 37.4 克, 产率为 72%。MS(m/z): 261.2。

[0024] 2) 化合物 7b 的合成:

[0025] 将 0.05mol 化合物 6b, 0.1mol 甲胺盐酸盐和 0.1mol 三乙胺加入到 100.0mLd 的甲醇中, 在 60℃ 下搅拌 5 小时。停止反应, 反应液冷却至室温, 减压蒸馏除去甲醇, 加入 100.0mL 冰水, 有大量的固体析出, 抽滤, 得到固体, 用水洗涤 (50mL×3) 后用乙醇重结晶后得到化合物 7b。C₁₁H₈F₃NOS, 12.5 克, 产率为 96%, MS(m/z): 260.2。

[0026] 3) 化合物 8b 的合成:

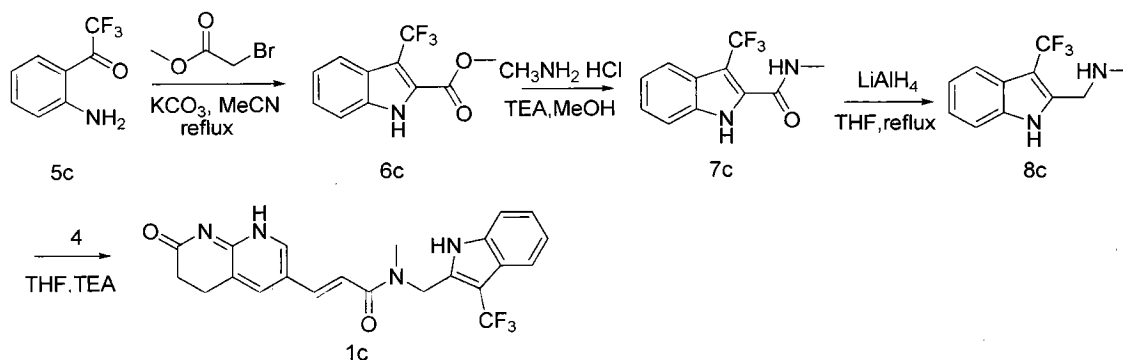
[0027] 将 0.04mol 化合物 7b 溶于 80mL 的 THF 中, 在冰水浴中分批加入 0.02mol 四氢铝锂, 加毕, 在 70℃ 下回流 3 小时, 冷却至室温, 在冰水浴中慢慢滴加 100.0mL 氯化铵饱和溶液, 抽滤, 滤液分层, 取上层有机相, 水相用 DCM 萃取 (30mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压蒸馏后得到固体, 乙醇结晶后得到化合物 8b。C₁₁H₁₀F₃NS, 9.3 克, 产率为 95%, MS(m/z): 246.2。

[0028] 4) 化合物 1b 的合成:

[0029] 将 10.0mmol 化合物 4 和 12.0mmol 化合物 8b 溶于 50.0mL 的 THF 中, 在冰浴下滴加 15.0mmol 三乙胺的 20.0mL 的 THF 溶液。滴加完毕后, 反应液在室温下继续搅拌 3 小时, 停止反应, 倒入 100mL 水, 分层, 水层用 DCM 萃取 (50mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后减压蒸馏得到化合物 1b 的粗产品, 经无水乙醇重结晶后得到目标化合物 1b。C₂₂H₁₈F₃N₃O₂S, 3.6 克, 产率为 81%, HNMR(400Hz, CDCl₃): 8.51(s, 1H), 8.01(s, 1H), 7.89(s, 1H), 7.86(m, 1H), 7.78(m, 1H), 7.50(d, J = 13.6Hz, 1H), 7.33(m, 1H), 7.31(m, 1H), 6.98(d, J = 13.6Hz, 1H), 4.22(s, 2H), 2.90(s, 3H), 2.83(t, J = 4.8Hz, 2H), 2.51(t, J = 4.8Hz, 2H); MS(m/z): 446.5。

[0030] 实施例 3: 化合物 1c 的合成:

[0031]



[0032] 1) 化合物 6c 的合成:

[0033] 将 0.2mol 的原料 5c, 0.24mol 的溴乙酸甲酯和 0.6mol 的无水碳酸钾在 200mL 的乙腈中回流过夜。停止加热, 冷却至室温, 抽滤, 滤液减压蒸馏后用乙醇重结晶, 得到化合物 6c。C₁₁H₈F₃O₂N, 27.2 克, 产率为 56%。MS(m/z): 244.2。

[0034] 2) 化合物 7c 的合成:

[0035] 将 0.05mol 化合物 6c, 0.1mol 甲胺盐酸盐和 0.1mol 三乙胺加入到 100.0mLd 的甲醇中, 在 60℃ 下搅拌 5 小时。停止反应, 反应液冷却至室温, 减压蒸馏除去甲醇, 加入 100.0mL 冰水, 有大量的固体析出, 抽滤, 得到固体, 用水洗涤 (50mL×3) 后用乙醇重结晶后得到化合物 7c。C₁₁H₉F₃N₂O, 11.1 克, 产率为 91%, MS(m/z): 243.2。

[0036] 3) 化合物 8c 的合成 :

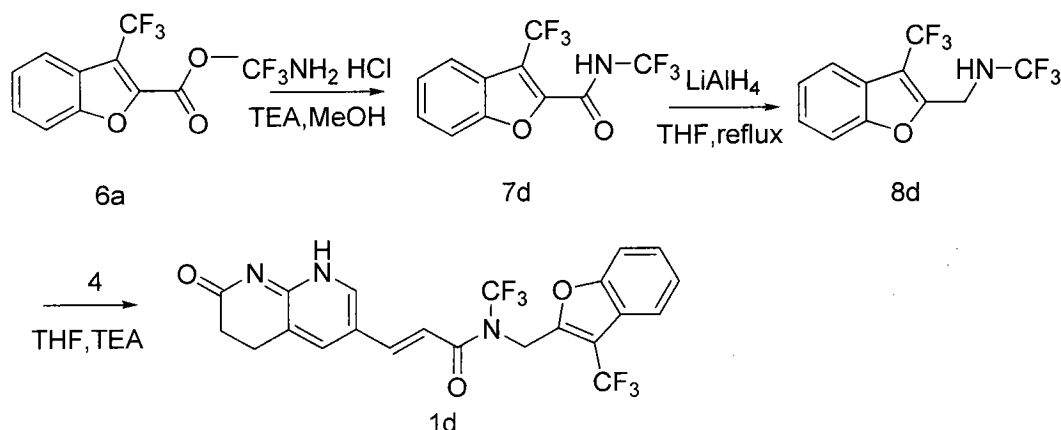
[0037] 将 0.04mol 化合物 7c 溶于 80mL 的 THF 中, 在冰水浴中分批加入 0.02mol 四氢铝锂, 加毕, 在 70°C 下回流 3 小时, 冷却至室温, 在冰水浴中慢慢滴加 100.0mL 氯化铵饱和溶液, 抽滤, 滤液分层, 取上层有机相, 水相用 DCM 萃取 (30mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压蒸馏后得到固体, 乙醇结晶后得到化合物 8c。C₁₁H₁₁F₃N₂, 8.4 克, 产率为 92%, MS(m/z) :229.2。

[0038] 4) 化合物 1c 的合成 :

[0039] 将 10.0mmol 化合物 4 和 12.0mmol 化合物 8c 溶于 50.0mL 的 THF 中, 在冰浴下滴加 15.0mmol 三乙胺的 20.0mL 的 THF 溶液。滴加完毕后, 反应液在室温下继续搅拌 3 小时, 停止反应, 倒入 100mL 水, 分层, 水层用 DCM 萃取 (50mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后减压蒸馏得到化合物 1c 的粗产品, 经无水乙醇重结晶后得到目标化合物 1c。C₂₂H₁₉F₃N₄O₂, 3.1 克, 产率为 73%, HNMR(400Hz, CDCl₃) :10.01 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.50 (d, J = 13.6Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 6.98 (d, J = 13.6Hz, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.71 (m, 1H), 4.26 (s, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.83 (t, J = 4.8Hz, 2H), 2.51 (t, J = 4.8Hz, 2H); MS(m/z) :429.4。

[0040] 实施例 4 : 化合物 1d 的合成 :

[0041]



[0042] 1) 化合物 7d 的合成 :

[0043] 将 0.05mol 化合物 6a, 0.1mol 三氟甲胺盐酸盐和 0.1mol 三乙胺加入到 100.0mL 的甲醇中, 在 60°C 下搅拌 5 小时。停止反应, 反应液冷却至室温, 减压蒸馏除去甲醇, 加入 100.0mL 冰水, 有大量的固体析出, 抽滤, 得到固体, 用水洗涤 (50mL×3) 后用乙醇重结晶后得到化合物 7d。C₁₁H₅F₆NO₂, 13.3 克, 产率为 89%, MS(m/z) :298.1。

[0044] 2) 化合物 8d 的合成 :

[0045] 将 0.04mol 化合物 7d 溶于 80mL 的 THF 中, 在冰水浴中分批加入 0.02mol 四氢铝锂, 加毕, 在 70°C 下回流 3 小时, 冷却至室温, 在冰水浴中慢慢滴加 100.0mL 氯化铵饱和溶液, 抽滤, 滤液分层, 取上层有机相, 水相用 DCM 萃取 (30mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压蒸馏后得到固体, 乙醇结晶后得到化合物 8d。C₁₁H₇F₆NO, 9.9 克, 产率为 88%, MS(m/z) :284.1。

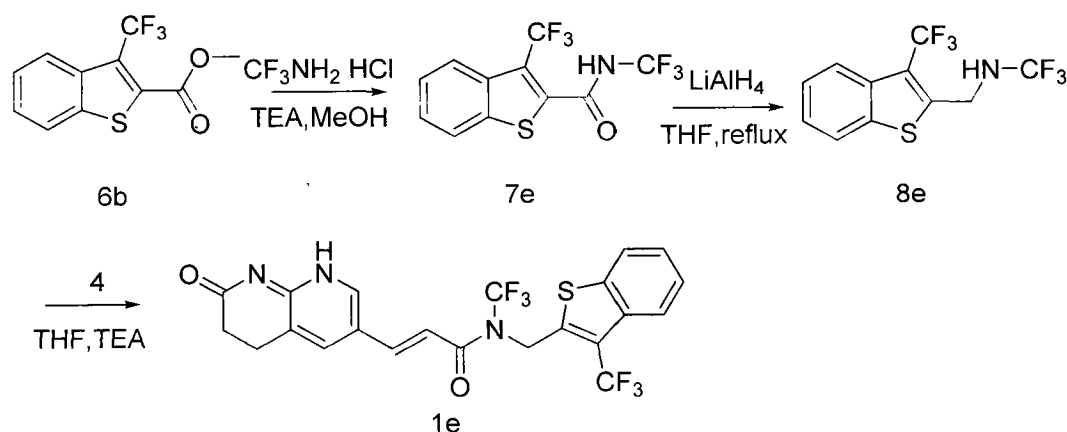
[0046] 3) 化合物 1d 的合成 :

[0047] 将 10.0mmol 化合物 4 和 12.0mmol 化合物 8d 溶于 50.0mL 的 THF 中, 在冰浴下滴

加 15.0mmol 三乙胺的 20.0mL 的 THF 溶液。滴加完毕后,反应液在室温下继续搅拌 3 小时,停止反应,倒入 100mL 水,分层,水层用 DCM 萃取 (50mL×3),合并有机相,无水硫酸钠干燥后减压蒸馏得到化合物 1d 的粗产品,经无水乙醇重结晶后得到目标化合物 1d。C₂₂H₁₅F₆N₃O₃, 3.7 克,产率为 77%,HNMR(400Hz, CDCl₃):8.51(s, 1H),8.01(s, 1H),7.89(s, 1H),7.50(d, J = 13.6Hz, 1H),7.49(m, 1H),7.42(m, 1H),7.19(m, 1H),7.13(m, 1H),6.98(d, J = 13.6Hz, 1H),4.10(s, 2H),2.83(t, J = 4.8Hz, 2H),2.51(t, J = 4.8Hz, 2H);MS(m/z):484.4。

[0048] 实施例 5:化合物 1e 的合成:

[0049]



[0050] 1) 化合物 7e 的合成:

[0051] 将 0.05mol 化合物 6b,0.1mol 三氟甲胺盐酸盐和 0.1mol 三乙胺加入到 100.0mL 的甲醇中,在 60℃ 下搅拌 5 小时。停止反应,反应液冷却至室温,减压蒸馏除去甲醇,加入 100.0mL 冰水,有大量的固体析出,抽滤,得到固体,用水洗涤 (50mL×3) 后用乙醇重结晶后得到化合物 7e。C₁₁H₅F₆NOS, 15.0 克,产率为 94%,MS(m/z):314.2。

[0052] 2) 化合物 8e 的合成:

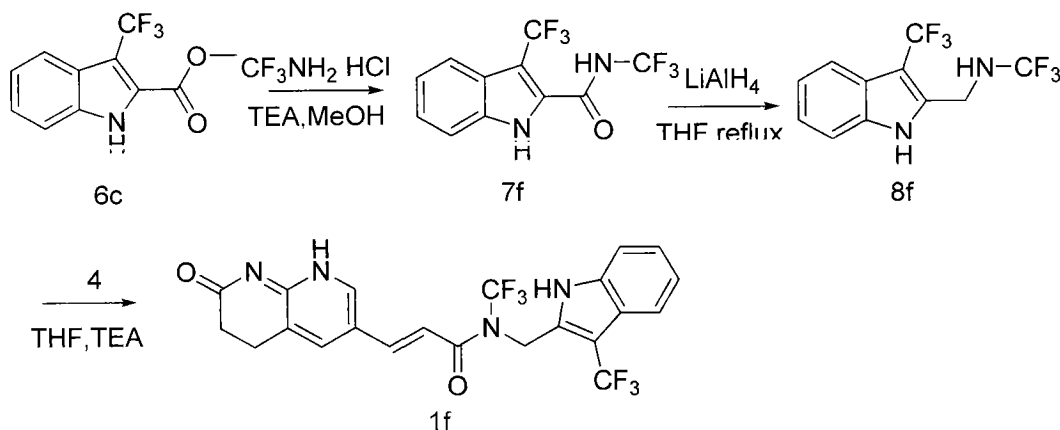
[0053] 将 0.04mol 化合物 7e 溶于 80mL 的 THF 中,在冰水浴中分批加入 0.02mol 四氢铝锂,加毕,在 70℃ 下回流 3 小时,冷却至室温,在冰水浴中慢慢滴加 100.0mL 氯化铵饱和溶液,抽滤,滤液分层,取上层有机相,水相用 DCM 萃取 (30mL×3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压蒸馏后得到固体,乙醇结晶后得到化合物 8e。C₁₁H₇F₆NS, 10.1 克,产率为 84%,MS(m/z):300.2。

[0054] 3) 化合物 1e 的合成:

[0055] 将 10.0mmol 化合物 4 和 12.0mmol 化合物 8e 溶于 50.0mL 的 THF 中,在冰浴下滴加 15.0mmol 三乙胺的 20.0mL 的 THF 溶液。滴加完毕后,反应液在室温下继续搅拌 3 小时,停止反应,倒入 100mL 水,分层,水层用 DCM 萃取 (50mL×3),合并有机相,无水硫酸钠干燥后减压蒸馏得到化合物 1e 的粗产品,经无水乙醇重结晶后得到目标化合物 1e。C₂₂H₁₅F₆N₃O₂S, 4.2 克,产率为 84%,HNMR(400Hz, CDCl₃):8.51(s, 1H),8.02(s, 1H),7.89(s, 1H),7.86(m, 1H),7.78(m, 1H),7.50(d, J = 13.6Hz, 1H),7.33(m, 1H),7.31(m, 1H),6.98(d, J = 13.6Hz, 1H),4.22(s, 2H),2.83(t, J = 4.8Hz, 2H),2.51(t, J = 4.8Hz, 2H);MS(m/z):500.4。

[0056] 实施例 6:化合物 1f 的合成:

[0057]



[0058] 1) 化合物 7f 的合成：

[0059] 将 0.05mol 化合物 6c, 0.1mol 三氟甲胺盐酸盐和 0.1mol 三乙胺加入到 100.0mLd 的甲醇中, 在 60°C 下搅拌 5 小时。停止反应, 反应液冷却至室温, 减压蒸馏除去甲醇, 加入 100.0mL 冰水, 有大量的固体析出, 抽滤, 得到固体, 用水洗涤 (50mL×3) 后用乙醇重结晶后得到化合物 7f。C₁₁H₆F₆N₂O, 13.6 克, 产率为 90%, MS(m/z) :297.2。

[0060] 2) 化合物 8f 的合成：

[0061] 将 0.04mol 化合物 7f 溶于 80mL 的 THF 中, 在冰水浴中分批加入 0.02mol 四氢铝锂, 加毕, 在 70°C 下回流 3 小时, 冷却至室温, 在冰水浴中慢慢滴加 100.0mL 氯化铵饱和溶液, 抽滤, 滤液分层, 取上层有机相, 水相用 DCM 萃取 (30mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压蒸馏后得到固体, 乙醇结晶后得到化合物 8f。C₁₁H₈F₆N₂, 9.4 克, 产率为 83%, MS(m/z) :282.2。

[0062] 3) 化合物 1f 的合成：

[0063] 将 10.0mmol 化合物 4 和 12.0mmol 化合物 8f 溶于 50.0mL 的 THF 中, 在冰浴下滴加 15.0mmol 三乙胺的 20.0mL 的 THF 溶液。滴加完毕后, 反应液在室温下继续搅拌 3 小时, 停止反应, 倒入 100mL 水, 分层, 水层用 DCM 萃取 (50mL×3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后减压蒸馏得到化合物 1f 的粗产品, 经无水乙醇重结晶后得到目标化合物 1f。C₂₂H₁₆F₆N₄O₂, 3.5 克, 产率为 74%, HNMR(400Hz, CDCl₃) :10.01 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.50 (d, J = 13.6Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 6.98 (d, J = 13.6Hz, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.71 (m, 1H), 4.26 (s, 2H), 2.83 (t, J = 4.8Hz, 2H), 2.51 (t, J = 4.8Hz, 2H) ;MS(m/z) :482.4。

[0064] 实施例 7: 实施例 1 中化合物 1a 的抗菌活性研究

[0065] 材料与amp;方法

[0066] 抗菌药物: 实施例 1 中的 1a 化合物, 下面以 1a 代替。

[0067] 对照药: 盐酸去甲基万古霉素购自武汉远城化工有限公司

[0068] 被测菌株: 101 株 MRSA 和 105 株 MSSA 均获赠于广东药学院。

[0069] 培养基: 购自法国生物梅里埃公司, 批号: 811813401。

[0070] 方法: 采用二倍琼脂稀释法测定 1a 化合物和盐酸去甲基万古霉素对所有菌株的最低抑菌浓度 (MIC)。即先将两种抗生素分别以不同浓度 PH 的无菌磷酸盐缓冲液倍比稀释成 12 个浓度, 将各浓度的药液各 10ml, 分别加入到已溶化并冷至 50°C 左右的 M-H 琼脂中, 立即倾注平皿, 使培养基的抗生素最终浓度依次为 0.0625、0.125、0.25-128mg/L。用微

量多点接种仪将 10^8 - 10^9 CFU/ml 菌悬液接种到含不同浓度抗生素的上述琼脂平板表面,置 35°C 培养 24h 观察结果,以抑制细菌生长的最低抗生素浓度确定为 MIC。分别统计 MIC 范围、MIC₅₀、MIC₉₀,并根据抗菌药物敏感的临界浓度,计算对细菌的敏感率,同时描绘浓度积累抑菌百分率曲线。

[0071] 结果:1a 化合物和盐酸去甲基万古霉素抗菌效果比较如表 1 (MIC, mg/L):

[0072]

| | | 临界 浓度 | MIC 范围 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | 敏感率 (%) |
|------|-----------|----------|-------------|-------------------|-------------------|---------|
| MRSA | 1a 化合物 | 1 | 0.125 ~ 64 | 1 | 2 | 91.67 |
| | 盐酸去甲基万古霉素 | 4 | 0.25 ~ 64 | 4 | 8 | 55.77 |
| MSSA | 1a 化合物 | 2 | 0.0625 ~ 64 | 0.5 | 1 | 90.0 |
| | 盐酸去甲基万古霉素 | 4 | 0.125 ~ 64 | 0.5 | 2 | 58.20 |

[0073] 1a 化合物的抗菌活性优于盐酸去甲基万古霉素的抗菌活性,对 MRSA、MSSA 的敏感率也体现出了 1a 化合物相对于盐酸去甲基万古霉素的优势。

[0074] 实施例 8:本实施例采用本发明提供的化合物进行了体外抗肿瘤作用的筛选研究。

[0075] 实验材料:试验样品:实施例 1、实施例 2、实施例 3 中制备的 1a 化合物,1b 化合物,1c 化合物;

[0076] 对照:N,N'-二[3-(乙基氨基)丙基]-(顺)-1,4-丁二胺-2-烯,如权利要求书中式 (I) 化合物,其中 $R = -\text{CH}_2\text{CH}_3$; $X = \text{O}$; $R_1 = -\text{H}$

[0077] 试验样品和对照均为申请人实验室合成样品。所用药物称取 0.1g,加入 DMSO 1ml,配成 100mg/ml 原液, 4°C 保存。临用前融化后取适量以完全培养液稀释成相应浓度应用。

[0078] DMEM 培养液 (GIBCO, Invitrogen, U. S. A);胎牛血清 (FBS;GIBCO, Invitrogen); 100U/ml of penicillin, and $100\mu\text{g/ml}$ of streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA);甲基噻唑蓝 MTT(thiazolyl blue, Sigma, MO, U. S. A.);胰蛋白酶 (0.25% Trypsin, GIBCO, Invitrogen);DMSO(100ml, sigma 分装)为北京鼎国有限公司产品;其余试剂均为化学分析纯。

[0079] 人宫颈癌 HeLa 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞、人粘液性表皮样肺癌 A549 细胞,人乳腺癌 MCF-7/s 细胞,人神经胶质瘤 U251 细胞,人正常胚肾 HEK-293 细胞,均购于美国模式培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC),所有肿瘤细胞用 DMEM 培养基 (含 10% FBS, 100U/ml 青霉素和 $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素)、人正常胚肾细胞用 RPMI1640 培养基 (10% FBS, 100U/ml 青霉素和 $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素) 培养、传代,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中正常培养。

[0080] 实验仪器：酶标仪（美国 Bio-Rad, Model 550）；培养箱（Thermo Forma, Incubator, USA）；离心机（HITACHI, RX 系列, Himac CF 16RX）；倒置显微镜（leika TE2000, 日本），Thermo 可调式移液枪；SW-CJ-IFD 型单人单面净化工作台（苏州净化设备有限公司, NO :070587）；细胞培养瓶（Costar, USA），96 孔细胞培养板（Costar, USA），Delta320 梅特勒-托利多 METTLER 台式 pH 计。

[0081] 实验方法：将处于对数生长期，贴壁率达 80% 左右状态良好的上述细胞进行传代。弃培养基，以 PBS 冲洗 1-2 次除去血清，加入 1ml 0.25% 胰蛋白酶-0.01% EDTA (37°C 孵育) 消化 1-2min，加入含 FBS 培养基终止消化，800r/min 以下离心 2-3min 弃上清，重悬细胞于 10% FBS 的培养基中，取细胞悬液进行细胞计数，调整密度，以 1×10^5 /ml 接种于 96 孔板 (100 μ l/well)，并于 5% CO₂ 37°C 培养箱培养过夜。次日向细胞中加入不同浓度的 1a 化合物，1b 化合物，1c 化合物和对照药物，100 μ l/well (使其终浓度为 30, 60, 120, 240, 480 μ g/ml)；同时设空白对照组 (0 μ M)，复设 3 孔，继续培养。于药物作用 48h 后，弃培养基，每孔加入 100 μ l 含 0.5mg/ml MTT 的 PBS (PH7.2)，培养 4h 后，贴壁细胞快速翻板法去除培养基，每孔加入 100 μ l 的 DMSO，微量振荡仪振荡 5min，于 490nm 波长测定 OD 值，实验重复三次取平均值，计算 1A 化合物，1B 化合物，1C 化合物和对照各浓度药物对肿瘤细胞体外增殖的抑制率 (IR%)，按以下公式计算各浓度药物对肿瘤细胞体外增殖的抑制率 (IR%)： $IR\% = (1 - OD_{\text{样品}} / OD_{\text{对照}}) \times 100\%$ ，并用 SPSS11.5 软件计算 1a 化合物，1b 化合物，1c 化合物和对照组 (CONTROL) 的半数抑制浓度 IC₅₀。

[0082] 实验结果：试验结果 (表 1) 表明：系列化合物 1a 化合物，1b 化合物及 1c 化合物对所选 5 株肿瘤细胞的增殖抑制作用高于对照组。其中 1a 化合物，1b 化合物和对照对 HeLa 和 A549 细胞的抑制作用较为显著，而对正常细胞 (HEK-293) 的增殖抑制作用较小，实验结果见下表 1：

[0083]

表 1 化合物 1a、1b、1c 和对照组对 5 个肿瘤细胞系和正常细胞系的增值抑制, IC₅₀ (单位: μg/ml)

| IC50 细胞系 | 1a | | | 1b | | | 1c | | | 对照 (control) | | |
|------------------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------------|--------------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Hela | 108.53 | 115.60 | 96.54 | 95.34 | 85.6 | 97.11 | 144.37 | 149.76 | 162.8 | 331.76 | 310.3 | 328.74 |
| $\bar{x} \pm sd$ | | 102.54±8.48 | | | 96.23±1.25 | | | 153.59±13.03 | | | 323.6±11.6 | |
| A549 | 128.96 | 118.36 | 107.85 | 151.88 | 162.97 | 159.35 | 190.77 | 183.65 | 179.27 | 230.76 | 216.68 | 205.60 |
| $\bar{x} \pm sd$ | | 118.39±10.55 | | | 158.06±5.66 | | | 184.56±5.80 | | | 217.68±12.6 | |
| Bel-7402 | 240.16 | 237.40 | 269.62 | 315.77 | 300.25 | 323.26 | 221.78 | 211.63 | 216.76 | 343.67 | 357.69 | 338.02 |
| $\bar{x} \pm sd$ | | 249.06±17.86 | | | 313.09±11.74 | | | 216.72±5.07 | | | 346.46±10.13 | |
| U251 | 189.42 | 173.49 | 180.65 | 202.76 | 192.56 | 188.60 | 210.76 | 193.52 | 209.05 | 277.77 | 284.55 | 298.41 |
| $\bar{x} \pm sd$ | | 181.18±7.98 | | | 194.64±7.31 | | | 204.44±9.50 | | | 287.37±9.58 | |
| MCF-7 | 238.51 | 216.75 | 219.45 | 234.01 | 229.35 | 240.65 | 200.69 | 196.67 | 186.03 | 312.65 | 317.47 | 303.1 |
| $\bar{x} \pm sd$ | | 224.90±11.86 | | | 234.67±5.68 | | | 193.46±7.57 | | | 311.07±7.31 | |
| HEK-293 | 398.26 | 399.25 | 414.68 | 383.84 | 367.80 | 356.83 | 358.87 | 371.00 | 366.59 | 347.88 | 366.09 | 338.34 |
| $\bar{x} \pm sd$ | | 404.07±9.20 | | | 369.49±13.58 | | | 365.49±6.14 | | | 350.77±14.09 | |

上述肿瘤细胞系和正常细胞系 (HEK-293) 暴露于不同浓度的 1a、1b、1c 和对照组 48 小时, 其浓度分别为 30、60、120、240、480 μg/ml。抗增殖活性表示为 IC₅₀。所有结果重复 3 次, 数据以平均值±sd 表示。