哌啶酮类法尼基转移酶抑制药的微波幅射合成与抗肿瘤活性

葛燕丽,姜凤超

(华中科技大学同济医学院药学院,武汉　430030)

[**摘　要**] **目的**　合成设计哌啶酮类法尼基转移酶抑制药,并对其抗肿瘤活性进行初步评价。**方法**　以取代苯甲醛为起始原料,经 Perkin 反应和 Michael 加成,最后在微波辐射条件下环合得到目标化合物,并用 MTT 法测试它们抑制人 Hela 细胞和 ANC-1 细胞的 IC_{50} 值。**结果**　采用微波辐射技术合成哌啶酮类化合物,反应时间为 20 ~ 45 min,产率为 36.0% ~ 67.1%。经 ^{1}H-NMR、ESI-MS 及 IR 对化合物的结构确证,总共合成 11 个新化合物。初步抗肿瘤活性测试结果显示 11 个目标化合物均有抑瘤活性,其中 8 个化合物 IC_{50} 值低于氟尿嘧啶。**结论**　哌啶酮类法尼基转移酶抑制药的合成路线可靠,具有显著抗肿瘤活性。

[**关键词**]　法尼基转移酶抑制药;微波辐射;抗肿瘤活性

[**中图分类号**]　R962;R914.2　　[**文献标识码**]　A　　[**文章编号**]　1004-0781(2005)07-0576-04

Synthesis and Antitumor Activities of Piperidone Farnesyltransferase Inhibitors

GE Yan-li, JIANG Feng-chao(*School of Pharmacy*, *Tongji Medical College* , *Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430030, *China*)

ABSTRACT　**Objective**　To synthesize the piperidone farnesyltransferase inhibitors under microwave irradiation and to observe their antitumor activities in vitro.　**Methods**　Under microwave irradiation condition, the target compounds were synthesized by cyclization reaction from the substance which was synthesized from 2-substituted benzaldehyde by the Perkin reaction and Michael addition. The IC_{50} values of antitumor activities to human Hela cell and ANC-1 cell were tested by MTT method.　**Results**　The target compounds under microwave irradiation were obtained within 20 – 45 min. The average production rate were 36.0% – 67.1%. Eleven new compounds were identified by IR, ^{1}H-NMR and ESI-MS, and all of them showed antitumor activities in preliminary experiments. IC_{50} values of eight compounds were below that of 5-Fu.　**Conclusion**　The synthesis method of piperidone farnesyltransferase inhibitors is reliable. And piperidone farnesyltransferase inhibitors have certain antitumor activities.

KEY WORDS　Farnesyltransferase inhibitors; Microwave irradiation; Antitumor activity

法尼基转移酶抑制药(farnesyltransferase inhibitor, FTI)作为一类新型、低毒、安全的抗肿瘤药物已受到广泛的重视。到目前为止,已经发现和合成了许多具有法尼基转移酶抑制活性的化合物,其中不少化合物已经进入临床试验[1],如 R115777, SCH66336 和 BMS-214662[2]。研究表明[3],非肽类法尼基转移酶抑制剂的药效模型一般包括一个疏水中心、一个氢键受体以及一个 Zn^{2+} 结合位点。Nara 等[4]设计并合成了一系列对法尼基转移酶具有良好抑制活性的哌啶酮类法尼基转移酶抑制药。结合已知的药效模型[3]和哌啶酮类抑制药的构效关系[4],笔者以哌啶酮环为基本骨架,保留硝基、吡啶环及取代芳环结构进行设计,得到 11 个新的哌啶酮类化合物,并对其体外抗肿瘤活性进行了测试。

[**收稿日期**]　2005-02-01　　[**修回日期**]　2005-04-20

[**作者简介**]　葛燕丽(1980 –),女,湖北通城人,在读硕士,主要从事药物化学研究。

[**通讯作者**]　姜凤超,男,河南泌阳人,教授,硕士生导师,主要从事药物化学研究。电话:027 – 83692749, E-mail: fengchao@ mails. tjmu. edu. cn。

1　仪器

微波反应器用三乐牌 WP-650 型家用微波炉改装。熔点(mp)用北京泰克仪器有限公司的 X-5 型显微熔点测定仪测定,温度计未经校正。红外光谱用 Spectrum One 傅立叶红外光谱仪测定。磁共振氢谱用 PARIAN MERCURY VX-300 型氢谱仪测定,TMS 为内标。质谱用 LC QDECA XP plus 型质谱仪测定。

2　合成方法与结果

文献[4]以芳香醛为起始原料,经 Wittig 反应,Michael 加成得到 4-硝基-3-取代苯基-丁酸甲酯,再与芳香醛和伯胺环合得到哌啶酮类抑制剂。笔者在合成中间体取代的肉桂酸甲酯时改用 Perkin 反应,采用微波辐射方法环合得到目标化合物。合成路线如图 1。

2.1　邻氯肉桂酸(2a)的合成　参照文献[5]的方法合成。在干燥的 250 mL 三口烧瓶中,加入邻氯苯甲醛

14.0 g(0.1 mol)和无水碳酸钾 14.9 g(0.108 mol),在搅拌下加醋酐入 28.4 mL(0.3 mol),在约 140 ℃反应 2 h。反应完毕,用饱和碳酸钠溶液调节 pH 值至 8 ~ 9,活性炭脱色,用稀盐酸调节 pH 值至 4,抽滤,得粗品。用 95% 乙醇重结晶,得 15.1 g 白色针晶,产率 82.5%,mp 210.9 ~ 212.1℃。邻氟肉桂酸(2b)和邻甲氧基肉桂酸(2c)的合成方法同化合物 2a。2b:白色针晶,产率 78.7%,mp 180.4 ~ 181.3℃。2c:乳白色晶体,产率 67.8%,mp 186.1 ~ 186.3℃。

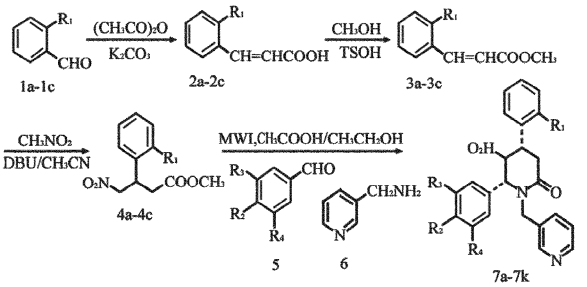

图 1　目标化合物的合成路线

2.2　邻氯肉桂酸甲酯(3a)的合成　参照文献[6]的方法合成。在干燥的 100 mL 三口烧瓶中,加入化合物 2 a 18.3 g(0.1 mol)和对甲苯磺酸 1.0 g,量取甲醇 40 mL 加入其中,搅拌回流 12 h,放置过夜。蒸去过量的甲醇,剩余物用乙醚溶解,依次用水、10% 碳酸钠溶液和水洗涤,用无水硫酸镁干燥,回收乙醚,得淡黄色液体 19.4 g,产率 98.7%,IR(KBr, cm^{-1})1 720,1 636,1 590,1 472,1 175。邻氟肉桂酸甲酯(3b)和邻甲氧基肉桂酸甲酯(3c)的合成方法同 3a。3b:淡黄色液体,产率 99.1%;3c:淡黄色液体,产率 93.8%。

2.3　4-硝基-3-(2-氯苯基)-丁酸甲酯(4a)的合成　参照文献[7]的方法合成。在锥形瓶中,加入 1,8-二氮杂二环-[5,4,0]壬烯(DBU)15.2 g(0.1 mol)和 CH_3NO_2 10.7 mL(0.2 mol),量取 CH_3CN 50 mL 加入其中。将锥形瓶放入低温恒温反应浴中,电磁搅拌,待温度降到 0℃,向其中滴加邻氯肉桂酸甲酯 19.7 g(0.1 mol)。在该温度下反应 20 h。将反应物倒入 400 mL 水中,用盐酸调节 pH 至 2,用乙醚提取,合并醚液,用水洗涤,无水硫酸镁干燥,回收乙醚,得黄色液体 25.8 g,产率 100%,IR(KBr, cm^{-1})1 737 ,1 554,1 477,1 437,1 377,1 173。4-硝基-3-(2-氟苯基)-丁酸甲酯(4b)和 4-硝基-3-(2-甲氧基-苯基)-丁酸甲酯(4c)的合成方法同 4a。4b:棕黄色液体,产率 100%;4c:黄色液体,产率 100%。

2.5　4-(2-氯苯基)-6-(4-羟苯基)-5-硝基-1-(3-吡啶甲基)哌啶-2-酮(7a)的合成　在干燥的反应瓶中加入 3-氨甲基吡啶(化合物 6)0.02 mol(2.0 mL),在冰浴下加入冰乙酸 2.0 mL,量取无水乙醇 20 mL 加入其中,摇匀,加入化合物 4 a 0.01 mol(2.6 g)和对羟基苯甲醛 0.01 mol(1.2 g)。搅拌下用 325 W 的功率微波辐射 35 min。反应完毕,蒸去乙醇,剩余物用乙醚洗涤,得粗品。将粗品加入无水乙醇 20 mL 中加热回流 1 h。抽滤,得白色晶体 1.9 g,产率 43.4%,mp 239.4 ~ 240.5℃。化合物 7b-7k 合成方法同 7a。化合物的结构、微波辐射条件及理化常数见表 1。其波谱数据见表 2。

3　药理实验

采用 MTT 法测试了目标化合物 7a-7k 对人宫颈癌 Hela 细胞和胰腺癌 ANC-1 细胞的抑制活性。在 96 孔培养板中加入对数生长期的 Hela(ANC-1)细胞,每孔 10^4 个,置二氧化碳培养箱中培养 24 h。待其贴壁长满后(每孔约 10^5 个),分别分 5 个浓度(10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} 和 10^{-8} mol · L^{-1})给药,再培养 24 h ,加入 MTT,继续培养 4 h。取出,小心吸取每孔上清液,并加入二甲基亚砜,然后用酶标仪于 570 nm 处测其吸光度(*A* 值)。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照,计算细胞存活率,最后求得 IC_{50} 值,结果见表 3。

表 1　目标化合物 7a-7k 的结构、微波辐射条件和理化常数

化合物	R_1	R_2	R_3	R_4	功率/W	时间/min	产率/%	mp/℃
7a	Cl	OH	H	H	325	35	43.4	239.4 ~ 240.5
7b	Cl	OH	CH_3O	H	325	30	54.8	230.8 ~ 231.3
7c	Cl	$(CH_3)_2N$	H	H	325	25	36.1	185.8 ~ 186.8
7d	Cl	OH	Br	Br	325	45	45.2	237.6 ~ 238.5
7e	Cl	OH	CH_3O	Br	325	45	63.7	240.0 ~ 240.9
7f	F	OH	H	H	325	35	52.4	253.9 ~ 255.0
7g	F	OH	CH_3O	H	325	35	41.6	262.1 ~ 262.8
7h	F	$(CH_3)_2N$	H	H	325	20	36.0	248.4 ~ 249.2
7i	F	OH	Br	Br	325	40	41.2	226.9 ~ 227.8
7j	F	OH	CH_3O	Br	325	35	54.3	244.8 ~ 245.6
7k	CH_3O	OH	H	H	325	30	67.1	246.6 ~ 247.8

表 2　目标化合物 7a-7k 的波谱数据

化合物	IRσ/cm^{-1}	ESI-MS *m/z*	^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$)δ
7a	3 436,1 664, 1 615,1 559	438.3 [M + H]$^+$	9.64(s, 1H),8.38(d, 1H),8.10(s, 1H),7.77(d, 1H),7.24 ~ 7.43 (m, 5H),7.11 (d, 2H),6.61(d, 2H),5.85(t, 1H),4.92 (d, 1H),4.46(d, 1H),4.37 ~ 4.43(m, 1H),4.16(d, 1H),3.03(dd, 1H),2.74 (dd, 1H)
7b	3 296,1 631, 1 557,1 447	468.3 [M + H]$^+$	9.19(s, 1H),8.35 1H),8.11(s, 1H),7.76(d, 1H),7.19 ~ 7.44(m, 5H),6.90(s, 1H),6.61(s, 2H),5.89(t, 1H),4.95(d, 1H),4.33 (d, 1H),4.26 ~ 4.49(m, 2H), 3.56(s, 3H),3.02(dd, 1H),2.75 (dd, 1H)
7c	2 896,2 809, 1 649,1 616, 1 555	465.4 [M + H]$^+$	8.37(d, 1H),8.12(s, 1H),7.78(d, 1H),7.22 ~ 7.43 (m,5H),7.10(d, 2H),6.57 (d, 2H),5.85(t, 1H),4.86(d, 1H),4.55(d, 1H),4.37 ~ 4.43(m,1H),4.04(d, 1H),3.03(dd, 1H),2.86(s,6H),2.73(dd, 1H)
7d	3 062,2 973, 2 945,2 869, 1 652,1 556	596.3 [M + H]$^+$	8.33(s, 1H),8.07(s, 1H),7.75(d, 1H),7.54(s, 1H),7.20 ~ 7.45(m, 6H),5.92 (t, 1H),5.09 (d, 1H),4.61 (d, 1H),4.43(s,1H),4.10 (d, 1H),3.57(s, 1H), 3.03(t, 1H),2.73(d, 1H)
7e	3 435,3 053, 3 026,2 978, 2 929,1 652, 1 557	548.3 [M + H]$^+$	9.66(s, 1H),8.33(d, 1H),8.12(s, 1H),7.75(d, 1H),7.17 ~ 7.45 (m, 5H),7.05 (s, 1H),6.91(s, 1H),5.92(t, 1H),5.02 (d, 1H),4.40 ~ 4.54(m, 2H),4.18(d, 1H),3.62(s, 3H),3.03(dd, 1H),2.75 (dd, 1H)
7f	3 449,3 058, 1 650,1 618, 1 558	422.3 [M + H]$^+$	9.66(s, 1H),8.38(d, 1H),8.11(s, 1H),7.65(t, 1H),7.42(d, 1H),7.13 ~ 7.34 (m, 4H),7.08(d, 2H),6.63(d, 2H),5.69(t, 1H),4.86 (d, 1H),4.59(d, 1H), 4.20 ~ 4.29(m, 1H),4.01(d, 1H),3.12(dd, 1H),2.75 (dd, 1H)
7g	3 410,1 628, 1 597,1 559	452.3 [M + H]$^+$	9.19(s, 1H),8.36 (d, 1H),8.13(s, 1H),7.65(t, 1H),7.14 ~ 7.42(m, 5H),6.88 (s, 1H),6.57 ~ 6.63(m, 2H),5.74(t, 1H),4.89(d, 1H),4.43 (d, 1H),4.19 ~ 4.31(m, 2H),3.58(s, 3H),3.13(dd, 1H),2.76 (dd, 1H)
7h	2 945,2 899, 1 639,1 618, 1 553	449.3 [M + H]$^+$	8.39(d, 1H),8.14(s,1H),7.66(t, 1H),7.43(d, 1H),7.13 ~ 7.32 (m, 4H),7.07 (d, 2H),6.59 (d, 2H),5.69(t, 1H),4.81(d, 1H),4.67(d, 1H),4.18 ~ 4.26(m, 1H),3.91(d, 1H),3.12(dd, 1H),2.86(s,6H),2.75(dd, 1H)
7i	3 063,2 981, 2 945,2 867, 1 652,1 588, 1 557	580.2 [M + H]$^+$	8.34(d, 1H),8.10(s, 1H),7.65(t, 1H),7.51(s, 2H),7.14 ~ 7.39(m, 5H),5.79 (t, 1H),5.02 (d, 1H),4.47 (d, 1H),4.20-4.29(m, 2H),3.57(s, 1H),3.14(t, 1H),2.74(dd, 1H)
7j	3 280,3 061, 2 971,2 941, 2 916,1 632, 1 558	530.4 [M + H]$^+$	9.68(s, 1H),8.35(d, 1H),8.14(s, 1H),7.64(t, 1H),7.143 ~ 7.414(m, 5H), 7.03(s, 1H),6.89(s, 1H),5.78(t, 1H),4.97 (d, 1H),4.22 ~ 4.43(m, 3H), 3.63(s, 3H),3.14(dd, 1H),2.76 (dd, 1H)
7k	3 434,1 641, 1 557	434.4 [M + H]$^+$	9.65(s, 1H),8.38(d, 1H),8.11(s, 1H),7.38 ~ 7.42(m, 2H),7.20 ~ 7.27(m, 2H), 7.08(d, 2H),6.88 ~ 6.98(m, 2H),6.64(d, 2H),5.72(t, 1H),4.84(d, 1H),4.59 (d, 1H),4.16 ~ 4.24(m, 1H),4.01(d, 1H),3.76(s, 3H),3.09(dd, 1H),2.62 (dd, 1H)

表 3　目标化合物 7a-7k 抑制 Hela 细胞和 ANC-1 细胞的 IC_{50} 值　　μmol · L^{-1}

化合物	Hela	ANC-1	化合物	Hela	ANC-1
7a	0.039	0.026	7g	1.070	0.814
7b	0.224	0.349	7h	24.774	29.651
7c	1.991	2.335	7i	1.288	1.510
7d	0.316	0.297	7j	0.878	0.706
7e	0.424	0.383	7k	0.386	0.193
7f	1.830	1.912	5-Fu	1.503	1.783

4　讨论

设计合成的 11 个目标化合物笔者未见文献报道，其结构均经^{1}H-NMR、ESI-MS 及 IR 确证。笔者改进了文献[4]的合成方法。在合成中间体取代的肉桂酸甲酯时改用 Perkin 反应，与 Wittig 反应相比，产物易分离纯化，较经济和符合绿色化学的要求。在合成目标化合物 7k 时，采用传统的合成方法反应时间为 24 h，产率为 64.7%；而采用微波辐射方法，只需 30 min，反应时间大大缩短，产率为 67.1%。初步活性筛选结果表明，目标化合物均具有抑瘤活性，其中 8 个化合物的 IC_{50} 值低于 5-Fu。R_1 为 Cl，R_2 为羟基，R_3 和 R_4 为 H 时，即目标化合物 7a 活性最好；而 R_2 为(CH_3)$_2$N-时活性

较差,如 7c 和 7h。

致谢:药理实验得到曾凡波教授和林佳亮的帮助与支持,在此表示感谢。

[参考文献]

[1] Haluska P, Dy G K, Adjei A A. Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(13): 1685 – 1700.

[2] Hunt J T, Ding C Z, Batorsky R, *et al*. Discovery of (R)-7-cyano-2, 3, 4, 5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1, 4-benzodiazepine (BMS-214662), a farnesyltransferase inhibitor with potent preclinical antitumor activity[J]. *J Med Chem*, 2000, 43(20): 3587 – 3595.

[3] Lee H, Lee J, Lee S, *et al*. A novel class of highly potent, selective, and non-peptidic inhibitor of ras farnesyltransferase (FTase)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(23): 3069 – 3072.

[4] Nara S, Tanaka R, Eishima J, *et al*. Discovery and structure-activity relationships of novel piperidine inhibitors of farnesyltransferase[J]. *J Med Chem*, 2003, 46(12): 2467 – 2473.

[5] 吴赛苏. [J]. 化学世界, 2002, 43(11):599 – 601.

[6] 俞善信,张鲁西,曾佑林. 硫酸铁铵催化合成肉桂酸甲酯[J]. 陕西化工, 1999, 28(4): 12 – 13.

[7] Ono N, Kamimura A, Kaji A. Michael addition of secondary nitroalkanes to β-substituted α, β-unsaturated compounds[J]. *Synthesis*, 1984, 3(2):226 – 227.

复方左氧氟沙星喷雾剂皮肤刺激性研究

黄良永[1],王正军[1],杜士明[1],崔德斌[2]

(1. 郧阳医学院附属太和医院药学部,湖北十堰 442000;2. 湖北省新华医院药剂科,武汉 430015)

[摘 要] **目的** 观察复方左氧氟沙星喷雾剂对皮肤的刺激作用,并进行安全性评价。**方法** 制备复方左氧氟沙星喷雾剂,用皮肤刺激反应评分表评价复方左氧氟沙星喷雾剂对家兔和人体皮肤的刺激反应。**结果** 复方左氧氟沙星喷雾剂对兔正常皮肤的刺激分值为 0,对破损皮肤的刺激分值为 0.25;对人体皮肤的刺激分值为 0。**结论** 复方左氧氟沙星喷雾剂对家兔和人体皮肤无刺激性,可安全使用。

[关键词] 左氧氟沙星喷雾剂,复方 ;皮肤刺激性

[中图分类号] R978.69;R965 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2005)07-0579-02

复方左氧氟沙星喷雾剂由郧阳医学院附属太和医院制剂室研制,主要成分为左氧氟沙星和更昔洛韦,治疗皮肤病和性病。为了科学的评价复方左氧氟沙星喷雾剂的安全性,笔者依据外用药皮肤刺激性试验研究的要求[1,2],观察受试药物在接触家兔皮肤和人体皮肤后,在规定时间内对皮肤的刺激反应。

1 实验材料

1.1 实验动物 大耳白家兔 16 只,体重约 2 kg,雌雄各半,由郧阳医学院动物中心提供。

1.2 脱毛剂的配制 取硫化钠($Na_2S \cdot 9H_2O$)50 g,加入约 300 mL 的纯化水至溶解,另取洗衣粉 10 g 加入上述溶液,均匀搅拌,再加入适量淀粉搅匀,最后加入纯化水至 500 mL,使成稀糊状即得。

1.3 处方与制备

1.3.1 处方 盐酸左氧氟沙星 2.2 g,更昔洛韦 1.0 g,甘油 20 mL,5% 羟苯乙酯溶液 6 mL,1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液适量,注射用水加至 1000 mL。

1.3.2 制备 称取盐酸左氧氟沙星 2.2 g 和更昔洛韦 1.0 g,加 700 mL 水溶解后,加入甘油 20 mL,在搅拌下缓缓加入 5% 羟苯乙酯溶液 6 mL,用 1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液调节 pH 值 7.5,然后加水至 1 000 mL,半成品送检。将喷雾瓶用 5% 洁消精温水溶液浸泡 12 h,用水冲洗干净,用新鲜注射用水冲洗 3 次,沥干水后,在净化环境内灌装,贴标签,即得。将产品送检,全检合格后方可使用。

1.4 对照品 空白对照品:处方中除盐酸左氧氟沙星、更昔洛韦外,由其他辅料混合制备。对照药物:0.9% 氯化钠注射液(太和医院灭菌制剂室,批号:2004052111)。

2 实验方法

2.1 动物实验

2.1.1 给药方法 将 16 只家兔,随机均分为实验组和对照组,每组 8 只(正常皮肤和破损皮肤各 4 只),雌雄各半,于实验前 24 h,用弯剪刀剪去家兔背部脊柱两侧的长毛,将脱毛剂均匀涂于去毛处,5 min 后,用玻璃棒轻轻去毛,用棉球沾温水将脱毛剂和脱落的毛一并洗去[3](每侧约 50 cm^2,无红斑、水肿及破损);同时在实验组和对照组建立皮肤破损模型,方法是在去毛处,用无菌针头划井字,以划破表皮不流血为宜。实验组家兔左侧脱毛区喷匀复方左氧氟沙星喷雾剂,右侧为空白对照,对

[收稿日期] 2004-08-10 [修回日期] 2004-09-27

[作者简介] 黄良永(1966 –),男,湖北郧县人,主管药师,学士,主要从事药物分析工作。电话:0719 – 6889775。