



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102993018 A

(43) 申请公布日 2013.03.27

(21) 申请号 201210285027.0

(22) 申请日 2012.08.10

(71) 申请人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区朝晖六区
潮王路 18 号

(72) 发明人 周彧 夏春年 陈友宝 曾方
胡惟孝 高建荣

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 王兵

(51) Int. Cl.

C07C 205/56 (2006.01)

C07C 201/12 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

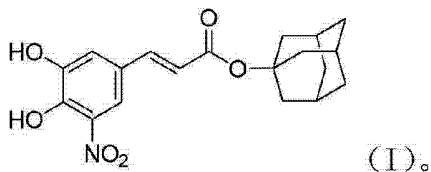
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

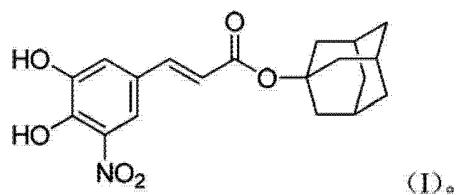
一种 5-硝基咖啡酸金刚醇酯及其在制备抗肿瘤药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种如式(I)所示的 5-硝基咖啡酸金刚醇酯,并公开了其制备方法及其在制备抗肿瘤药物中的应用,特别是在制备抗胃癌、肝癌或白血病药物中的应用。



1. 一种如式(I)所示的 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯：



2. 如权利要求 1 所述的 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯在制备抗肿瘤药物中的应用。
3. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在于所述 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯在制备抗胃癌、肝癌或白血病药物中的应用。

一种 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯及其在制备抗肿瘤药物中的应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有广谱抗肿瘤活性的化合物 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯及其在抗肿瘤方面的用途。

(二) 背景技术

[0002] 无论在世界范围内还是在中国,以恶性肿瘤(癌症)、心血管疾病以及糖尿病等为代表的慢性病(或者说非传染性疾病),正在成为人类的长期威胁。其中,癌症位列首位。

[0003] 1988 年, Grunberger 等人(Experientia, 44:230-232, 1988) 首次从蜂胶中分离出咖啡酸苯乙酯(简称 CAPE), 并证实 CAPE 对细胞具有选择性的毒杀作用。他们以受到病毒诱发转型的细胞为底物, 发现 $2 \mu\text{g/ml}$ 浓度的 CAPE, 便可以有效抑制这些不正常细胞的成长, 但是对于正常的小鼠细胞, 即使 CAPE 的浓度提高 5 倍 ($10 \mu\text{g/ml}$) 时, 仍不具毒性。陈建宏等(Cancer Letters, 108 :211-214, 1996) 研究表明, 在 HL-60 细胞中, CAPE 可以分别抑制 DNA、RNA 和蛋白质的合成, 所对应的 IC_{50} 浓度分别为 $1.0 \mu\text{M}$ 、 $5.0 \mu\text{M}$ 和 $1.5 \mu\text{M}$ 。2002 年, Nagaoka 等(Bioorganic&Medicinal Chemistry, 10 :138-144, 2002) 研究了 CAPE 对结肠癌细胞 26-L5 的抑制作用发现 EC_{50} 为 $0.15 \mu\text{M}$, 而且对人肺癌 A-549 细胞, 人纤维肉瘤细胞 HT-1080 和人宫颈癌细胞(HeLa) 等也有明显的抑制作用。李衍章等(Cancer Letters, 153, 51-56, 2000) 研究发现, CAPE 对人乳腺癌细胞(MCF-7) 也有明显的作用, 当 CAPE 浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率为 50%; 而当浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率达 100%。此外, 对黑色素瘤细胞(SK-Mel-28, SK-Mel-170) 也有明显的抑制作用(Science, 229 :984, 1985)。

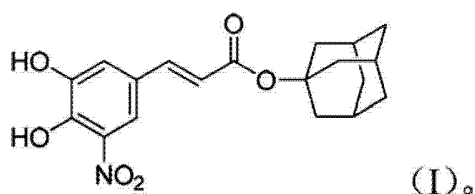
(三) 发明内容

[0004] 本发明即是为了提供一种新的具有显著抗肿瘤活性的咖啡酸酯:5- 硝基咖啡酸金刚醇酯及其制备方法。

[0005] 为达到发明目的本发明采用的技术方案是:

[0006] 一种如式(I) 所示的 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯, 又名 3- (3, 4- 二羟基 -5- 硝基苯基) - 丙烯酸金刚酯。

[0007]

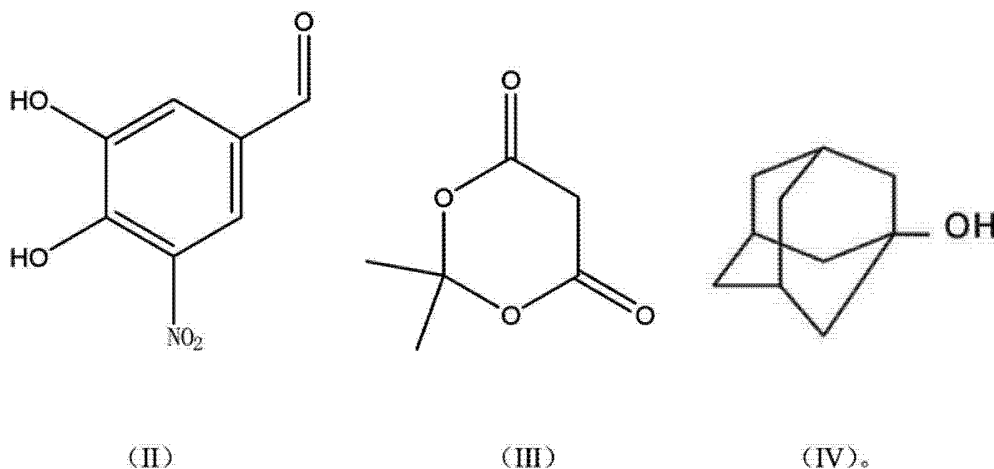


[0008] 所述 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯的制备方法系以 3, 4- 二羟基 -5- 硝基苯甲醛、丙二酸亚异丙酯和 1- 金刚醇为反应底物, 经醇解和缩合反应而制得。

[0009] 具体的, 本发明所述的 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯的可按以下方法制得: 式(III) 所示的丙二酸亚异丙酯和式(IV) 1- 金刚醇在极性溶剂中, 加热回流, 进行醇解反应 3 ~ 5 小

时,冷却后向反应液中加入式(II)所示的 3,4-二羟基-5-硝基苯甲醛、缚酸剂和缩合催化剂,于 0 ~ 120℃ (优选 100~120℃)进行缩合反应 10 ~ 24 小时,反应结束后反应体系分离纯化制得所述 5-硝基咖啡酸金刚醇酯;

[0010]



[0011] 所述式(II)所示的 3,4-二羟基-5-硝基苯甲醛、式(III)所示的丙二酸亚异丙酯和式(IV) 1-金刚醇的物质的量之比为 1:1.2~1.3:1.2~1.3, 优选 1:1.25:1.25。

[0012] 所述极性溶剂为甲苯,所述缚酸剂为吡啶。

[0013] 所述缩合催化剂为哌啶。

[0014] 所述极性溶剂的用量以式(III)所示的丙二酸亚异丙酯的物质的量为 1.5~3mL/mmol。

[0015] 所述缚酸剂的用量以式(II)所示的 3,4-二羟基-5-硝基苯甲醛的物质的量为 0.5~1mL/mmol。

[0016] 所述缩合催化剂的物质的量与式(II)所示的 3,4-二羟基-5-硝基苯甲醛的物质的量之比为 0.5~5:1。

[0017] 所述反应体系分离纯化方法为:反应结束后,反应体系减压蒸馏除去溶剂,残液冷却后加入乙醇溶解,再加入乙酸乙酯,搅拌 20~60min,然后依次用稀 HCl、NaHCO₃ 溶液、蒸馏水洗涤,干燥后抽干溶剂后得固体粗品,固体粗品再用体积比为 1:1 的乙醚、苯混合溶剂重结晶得 5-硝基咖啡酸金刚醇酯纯品。

[0018] 本发明所述的 5-硝基咖啡酸金刚醇酯可应用于制备抗肿瘤药物。具体的,所述 5-硝基咖啡酸金刚醇酯可应用于制备抗胃癌、肝癌或白血病药物。

[0019] 本发明的有益效果主要体现在:合成了一种新化合物;经体外活性筛选得到的 5-硝基咖啡酸金刚醇酯对 SCG7901、HepG2 和 HL-60 的抑制 IC₅₀ 分别为 4.59 μM、3.84 μM 和 4.06 μM,生长曲线表明 5-硝基咖啡酸金刚醇酯对 SCG7901 细胞有明显的时-效关系,急性毒性实验显示 5-硝基咖啡酸金刚醇酯具有很低的毒性。因此,具有抗肿瘤新药开发应用前景。

(四) 附图说明

[0020] 图 1

5-硝基咖啡酸金刚醇酯对 SGC7901 的抑制曲线

(五) 具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0022] 实施例 1:5-硝基咖啡酸金刚醇酯的制备

[0023] 将 152.2g (1.0mol) 香兰素溶于 500mL 冰醋酸中,在冰浴冷却下慢慢滴加 150mL 质量浓度 65% ($d=1.4\text{g/mL}$) 的浓 HNO_3 ,温度控制在 20°C 以下。加完后在常温下反应 1.5h。将反应液倒入 2L 水中搅拌 0.5h。过滤,滤饼用 3L 水打浆洗涤 2 次。抽干得黄色固体 5-硝基香兰素,低温干燥得 181.6g 产品。收率:92.1%,熔点: $172\text{--}173^\circ\text{C}$ (文献值 $177\text{--}178^\circ\text{C}$ (Grenier 等, *J. Physi. Org. Chem.*, 13:511-517, 2000))。

[0024] 取 5-硝基香兰素 66g 溶于 77.8g 冰醋酸中,再加入 289g 重蒸浓氢溴酸。在 $116\text{--}120^\circ\text{C}$ 回流 20h 后加入 5.0g 活性碳搅拌 0.5h,趁热过滤,滤饼用少量热冰醋酸打浆洗涤,过滤,合并所有冰醋酸层。加入 160mL 蒸馏水,搅匀。自然冷却到室温后,再冷却到 -10°C ,析出大量黄色固体。搅拌 2h。趁冷过滤,滤饼用适量的蒸馏水打浆洗涤 2 次。抽干得黄色固体 3,4-二羟基-5-硝基苯甲醛,低温干燥得 36.6g 产品。收率:59.7%,熔点: $142\text{--}143^\circ\text{C}$ (文献值 $145\text{--}146^\circ\text{C}$ (Perza 等, *J. Med. Chem.*, 35, 4584-8, 1992))。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500MHz) δ ppm:9.91 (s, 1H, CHO), 8.23 (d, 1H, $J=1.9\text{Hz}$, Ar-H), 7.77 (d, 1H, $J=1.9\text{Hz}$, Ar-H)。

[0025] 将丙二酸亚异丙酯 0.72g (5mmol), 1-金刚醇 0.76g (5mmol) 和 10mL 甲苯加入 50mL 三口瓶中,在 110°C 回流 4h 后自然冷却。向冷却到室温的反应液中加 3,4-二羟基-5-硝基苯甲醛 0.73g (4mmol) 和吡啶 2.0mL,搅拌,待固体全溶后加哌啶 1.0mL。于 106°C 下搅拌回流约 10 小时, TLC 点板跟踪直至反应完全结束。反应后减压蒸馏去除溶剂,残液冷却后加入 5mL 乙醇溶解后加入 30mL 乙酸乙酯,搅拌 0.5h。用稀 HCl、 NaHCO_3 溶液和蒸馏水各 30mL 洗涤;无水 MgSO_4 干燥过夜。抽干溶剂后得棕黄固体 0.82g,收率 57.1%,用体积比为 1:1 乙醚、苯混合溶剂重结晶得淡黄色晶体,即为 5-硝基咖啡酸金刚醇酯。

[0026] 熔点: $176\text{--}177^\circ\text{C}$; 结构表征:IR (KBr) $\nu\text{ cm}^{-1}$:3446, 2912, 2851, 1700, 1636, 1545, 1384; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz) δ ppm:10.54 (brs, 1H, OH), 7.69 (d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$, Ar-H), 7.44 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, α -H), 7.32 (d, 1H, $J=2.1\text{Hz}$, Ar-H), 6.32 (d, 1H, $J=16.0\text{Hz}$, β -H), 2.13-2.16 (m, 9H, 3CH_2 , 3CH), 1.61-1.65 (m, 6H, 3CH_2)。

[0027] 实施例 2:5-硝基咖啡酸金刚醇酯的抗肿瘤活性测试

[0028] 人胃癌细胞株 SGC-7901、人肝癌细胞株 HepG-2 和人白血病 HL-60 为贴壁生长的细胞,实验操作如下:

[0029] (1) 将人胃癌细胞株 SGC-7901 或 HepG-2 或 HL-60 培养于含 10% 小牛血清 PRMI1640 培养液中,并置于 37°C 含 5% 湿饱和 CO_2 培养箱中,每 2-3 天传代 1 次。

[0030] (2) 取对数生长期的肿瘤细胞株,弃培养液,加 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞,加入 PRMI1640 培养液,中止消化,离心,去除上清液,加入 PRMI1640 培养液混匀。

[0031] (3) 调整细胞悬液浓度,接种于 96 孔培养板,除去两侧的调零孔,其余每孔加入 $100\mu\text{L}$,铺板使待测细胞调密度至 1000-10000 个/孔(边缘空白调零孔用空白培养液填充)。

[0032] (4) 5%CO₂, 37℃ 孵育, 至细胞单层铺满孔底(96 孔平底板), 加入浓度梯度的药物。

[0033] 原则上, 细胞贴壁后即可加药, 或两小时, 或半天时间, 通常在前一天下午铺板, 次日上午加药。对一种化合物设有 5 个浓度梯度, 4 个复孔, 重复实验三次以保证实验数据的准确性。

[0034] (5) 5%CO₂, 37℃ 孵育 72 小时后, 于倒置生物显微镜下观察。

[0035] (6) 每孔加入 20 μl MTT 溶液 (5mg/ml, 即 0.5%MTT), 继续培养 4h。若化合物与 MTT 能够反应, 可先离心后弃去培养液, 小心用 PBS 冲 2-3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液。

[0036] (7) 终止培养, 小心吸去孔内培养液。

[0037] (8) 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜, 轻轻晃动, 使结晶物充分溶解。在酶标仪 OD490nm 处测量各孔的吸光值。

[0038] (9) 除了给药的三组实验组, 同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜)。

[0039] 通过实验并计算得到 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯对人胃癌细胞株 SGC-7901, 人肝癌细胞株 HepG-2 和人白血病 HL-60 的 IC₅₀ 分别为 1.65 μg/ml、1.38 μg/ml、1.46 μg/ml。

[0040] 实施例 3: 细胞曲线测定实验

[0041] 取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 贴壁生长的细胞用 0.25% 的胰酶消化, 吹打成单细胞悬液, 接种于 96 孔板中(细胞密度 1.0×10⁴ 和 1.5×10⁴ cells/mL), 每孔 100 μL。分别于 5%CO₂, 37℃ 培育 0h、24h、48h、72h、96h、120h、144h、168h、192h、216h、240h 后, 加药处理, 每种药物设 5 个浓度梯度(药物终浓度呈 1/2 等比递减), 同时设立对照组和空白组, 每组均设 4 个平行孔, 使每孔总体积为 200 μL。加入 20 μL 5mg/mL 的 MTT 溶液, 置于培养箱中 5%CO₂, 37℃ 孵育 4h, 然后弃去各孔中的上清液, 再加入 150 μL DMSO, 平面振荡混匀 10min, 待其各孔中的紫色结晶完全溶解后, 置于酶标分光光度读板仪下测定各孔中的吸光值 (OD, λ 570nm)。

[0042] 所得结果见图 1。

[0043] 由图 1 可知, 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯的药物作用于 SGC7901 细胞 24、36、48、72、96、120h 后, 可明显抑制细胞增殖, 并且该抑制作用呈一定的剂量依赖性与时间依赖性在一定剂量范围内, 5- 硝基咖啡酸金刚醇酯对 SGC7901 细胞的作用具有明显的时 - 效关系。

[0044] 实施例 4: 急性毒性测定实验

[0045] 试验用药剂量分为三种, 高剂量、中剂量、低剂量, 浓度分别为 20mg/kg、10mg/kg、5mg/kg, 另设一组空白组为生理盐水。小鼠给药体积为 0.1mL/10g, 则对高剂量组而言: 20mg/kg=0.2mg/10g, 所以给药浓度为 2mg/ml, 则中低剂量组分别为 1mg/ml、0.5mg/ml。另外小鼠体重较大的约为 40-50g, 则设给药为 0.5ml 每天, 需连续给药 10 天, 每种剂量组有 4 只小鼠, 一共需给药量为 0.5×4×10×2=40ml, 所以三组一共需要 40+20+10=70ml 药物。

[0046] 将 16 只小鼠随机分成 4 组, 每组分别在头、背、尾设计好标记, 剩下一只不用标记以示区别。对小鼠进行灌胃给药, 给药量为 0.3ml, 每日给药一次, 连续 10 日, 停药次日断锥处死, 称体重, 剖取胸腺和脾脏, 计算胸腺、脾脏指数: 脾脏(胸腺)指数 = 脾脏(胸腺)重量 (mg) / 体重 (g)。

[0047] 下表 2 为实验初始时的小鼠体重:

[0048] 表 2. 实验初始小鼠情况(体重)

[0049]

	给药剂量	给药浓度	头 (标记)	背 (标记)	尾 (标记)	无标记
高剂量组	20mg/kg	2mg/ml	31.2g	33.3g	35.0g	30.5g
中剂量组	10 mg/kg	1 mg/ml	32.0g	31.8g	33.1g	28.3g
低剂量组	5 mg/kg	0.5 mg/ml	32.4g	34.5g	31.1g	35.0g
对照组	生理盐水	-	31.8g	28.5g	34.5g	39.3g

[0050] 之后连续给药 10 天,在第 11 天对小鼠进行解剖,解剖前小鼠的体重如表 3:

[0051] 表 3. 实验结束解剖前小鼠情况(体重)

[0052]

	给药剂量	给药浓度	头 (标记)	背 (标记)	尾 (标记)	无标记
高剂量组	20mg/kg	2mg/ml	33.4g	34.2g	36.0g	28.8g
中剂量组	10 mg/kg	1 mg/ml	33.3g	30.5g	34.5g	31.8g
低剂量组	5 mg/kg	0.5 mg/ml	31.5g	33.5g	30.8g	32.9g
对照组	生理盐水	-	33.0g	29.3g	34.2g	40.7g

[0053] 从表 2、3 可以看出,施加不同剂量的药物对小鼠体重没有太大的影响。另外,测试小鼠解剖后分别取四组中相同部位标记的小鼠的肺、肾、肝、心脏、胸腺、脾、胃做比较,发现各器官的颜色、状态、大小无差异,所以可见该药物在所给最大剂量下对小鼠无毒性。

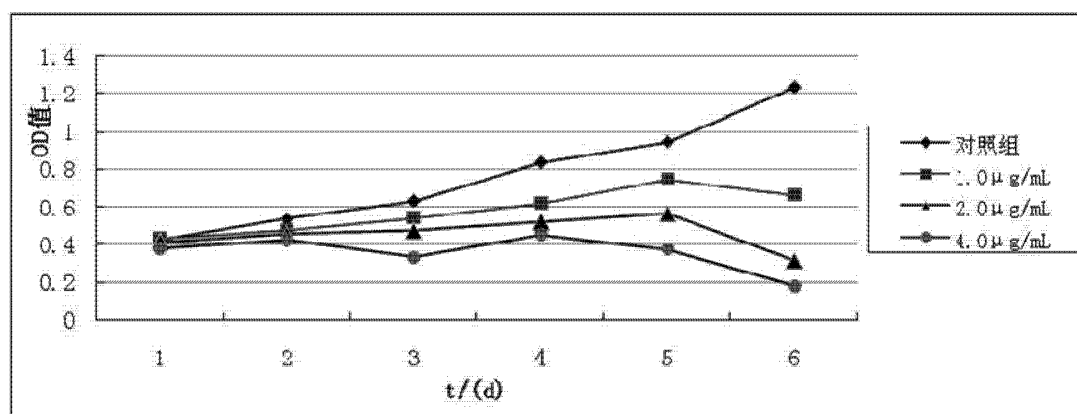


图 1