

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610117131.3

[51] Int. Cl.

C07D 209/56 (2006.01)

C07D 409/12 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/541 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 21 日

[11] 公开号 CN 1931840A

[22] 申请日 2006.10.13

[21] 申请号 200610117131.3

[71] 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路 130 号

[72] 发明人 钱旭红 张志超 肖义 刘凤玉  
吕哲

[74] 专利代理机构 上海顺华专利代理有限公司  
代理人 陈淑章

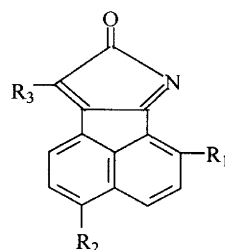
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

## [54] 发明名称

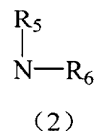
一类 DNA 靶分子及其诱导细胞凋亡和抗肿瘤的应用

## [57] 摘要

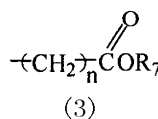
本发明涉及一种 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物及其用途。所说的衍生物具有式(1)所示结构。经实验证明：本发明所创制的 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物能在  $0.01 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$  的浓度范围内，以剂量依赖的方式诱导培养的肿瘤细胞凋亡和显著抑制动物体内肿瘤生长，是一类活性很高的细胞凋亡诱导剂和抗肿瘤化合物。式(1)中， $R_1$ ， $R_2$ 分别选自 H，含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基或由式(2)所示的基团，且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H； $R_3$  为 CN 或  $\text{COOR}_4$ ，其中  $R_4$  为 H， $C_1 \sim C_6$  的烷基或  $C_1 \sim C_6$  的卤代烷基；式(2)中， $R_5$  为 H 或  $C_1 \sim C_6$  的烷基； $R_6$  为含 S 的五元或六元芳杂环基，(3)或(4)，其中： $R_7$  为 H 或  $C_1 \sim C_6$  的烷基， $R_8$ ， $R_9$  分别选自  $C_1 \sim C_6$  的烷基中一种， $n = 1 \sim 6$ 。



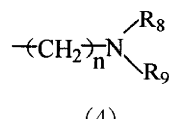
(1)



(2)

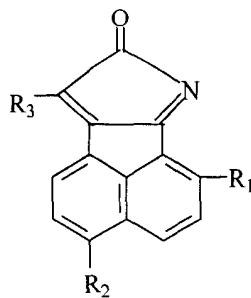


(3)



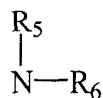
(4)

1、一种 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物，其具有式 (1) 所示结构：



(1)

式 (1) 中， $R_1, R_2$  分别选自 H，含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基或由式 (2) 所示的基团，且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H； $R_3$  为 CN 或  $\text{COOR}_4$ ，其中  $R_4$  为 H， $C_1 \sim C_6$  的烷基或  $C_1 \sim C_6$  的卤代烷基；



(2)

式 (2) 中， $R_5$  为 H 或  $C_1 \sim C_6$  的烷基； $R_6$  为含 S 的五元或六元芳杂环基， $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)COR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N(R}_8\text{)(R}_9\text{)}$ ，

其中： $R_7$  为 H 或  $C_1 \sim C_6$  的烷基， $R_8, R_9$  分别选自  $C_1 \sim C_6$  的烷基中一种， $n=1 \sim 6$ 。

2、如权利要求 1 所说的 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物，其特征在于，其中当  $R_3$  为 CN 时， $R_1$  为 H、含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基或由式 (2) 所示的基团， $R_2$  为 H 或含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基，且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H。

3、如权利要求 2 所说的 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物，其特征在于，其中  $R_1$  为 H、含 1~3 个 N、S 或/和 O 的六元杂环基或由式 (2) 所示的基团， $R_2$  为 H 或含 1~3 个 N、S 或/和 O 的六元杂环基，且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H；而式 (2) 中， $R_5$  为 H 或  $C_1 \sim C_3$  的烷基， $R_6$

为含 S 的五元芳杂环基、 $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)COR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N(R}_8\text{)(R}_9\text{)}$ ，

其中： $R_7$  为 H 或  $C_1 \sim C_3$  的烷基， $R_8, R_9$  分别选自  $C_1 \sim C_3$  的烷基中一种， $n=1 \sim 4$ 。

4、如权利要求 3 所说的 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物，其特征在于，所说的衍生物是：

3-(*N*, *N*'-二乙氨基-乙胺基)-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-腈, 3-(4-丁酸乙酯-丁胺基)-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-腈, 3-(噻吩基-2-基-甲氨基)-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-腈, 3-硫吗啉基-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-腈, 3,6-二吗啉基-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-腈或 6-硫吗啉基-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-腈。

5、如权利要求1所说的8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯衍生物,其特征在于,其中当 $R_3$ 为 $\text{COOR}_4$ 时,其中 $R_4$ 为H,  $C_1\sim C_6$ 的烷基或 $C_1\sim C_6$ 的卤代烷基,  $R_1, R_2$ 分别选自H, 含1~3个N、S或/和O的五元或六元杂环基或由式(2)所示的基团, 且 $R_1$ 和 $R_2$ 不同时为H; 式(2)中,

$R_5$ 为H或 $C_1\sim C_6$ 的烷基;  $R_6$ 为含S的五元或六元芳杂环基,  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N}\begin{matrix} \nearrow R_8 \\ \searrow R_9 \end{matrix}$

其中:  $R_7$ 为H或 $C_1\sim C_6$ 的烷基,  $R_8, R_9$ 分别选自 $C_1\sim C_6$ 的烷基中一种,  $n=1\sim 6$ 。

6、如权利要求5所说的8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯衍生物, 其特征在于, 其中 $R_4$ 为H,  $C_1\sim C_3$ 的烷基或 $C_1\sim C_3$ 的单卤代烷基,  $R_1, R_2$ 分别选自H, 含1~3个N、S或/和O的六元杂环基或由式(2)所示的基团, 且 $R_1$ 和 $R_2$ 不同时为H; 式(2)中,  $R_5$ 为H或 $C_1\sim C_3$ 的烷

基;  $R_6$ 为含S的五元芳杂环基,  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N}\begin{matrix} \nearrow R_8 \\ \searrow R_9 \end{matrix}$

其中:  $R_7$ 为H或 $C_1\sim C_3$ 的烷基,  $R_8, R_9$ 分别选自 $C_1\sim C_3$ 的烷基中一种,  $n=1\sim 4$ 。

7、如权利要求6所说的8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯衍生物, 其特征在于, 所说的衍生物是: 8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸, 8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸甲酯, 3-(噻吩基-2-基-甲氨基)-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸甲酯, 8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸-2-溴乙基酯或 3-硫吗啉基-8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸-2-溴乙基酯。

8、如权利要求1~7中任意一项所述的8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯衍生物作为细胞凋亡诱导剂。

9、如权利要求1~7中任意一项所述的8-氧-8*H*-苾并[1,2-*b*]吡咯衍生物作为抗肿瘤化合物。

## 一类 DNA 靶分子及其诱导细胞凋亡和抗肿瘤的应用

### 技术领域

本发明涉及一类 DNA 靶分子及其用途，具体地说，涉及一种 8-氧-8H-茚并[1,2-b]吡咯衍生物及其用途。

### 背景技术

脱氧核糖核酸（DNA）是生物的基本遗传物质，是遗传信息的载体。许多分子能与 DNA 结合，破坏 DNA 的模板作用，影响基因调控和表达功能，从而诱发很多生物效应。DNA 与其它分子的相互作用是生物化学和分子生物学中的重要领域。研究小分子物质与 DNA 的相互作用有助于人们对 DNA 与蛋白质相互作用方式的了解，而且对进一步指导人工核酸的合成以及 DNA 高级结构的研究具有重要意义。

在医药研究中，DNA 与靶向药物分子相互作用的研究不仅可以从分子水平阐明生命过程机理、疾病的致病机制，而且可以引导药物的设计与合成、药物体外筛选以及探讨药物的治病机理。另外，对双链 DNA（或单链 DNA）具有选择性结合或者具有序列特异性结合的靶向药物分子可以作为 DNA 分子杂交与否或识别特定序列 DNA 指示剂，这是 DNA 生物传感器研究的一个重要内容。新颖的 DNA 靶向化合物的设计对于化学、生物学和医药学都具有非常重要的理论意义和应用价值。在医学研究和新药设计中，为了寻求符合要求的 DNA 靶向药物分子，必须详尽的了解 DNA 与靶向药物分子间的相互作用。在生物体系中，靶向药物分子与 DNA 的结合是复杂的，结合模式主要包括外部静电结合、沟区结合和嵌插结合等。影响靶向药物分子与 DNA 相互作用的因素很多，如靶向药物分子的结构（包括分子的形状、大小、柔性）、靶向药物分子间的相互作用、溶液的性质以及溶液中其它分子与靶向药物分子或 DNA 的相互作用等。

嵌插型 DNA 靶向分子在研究小分子与 DNA 的相互作用以及肿瘤治疗中有着极其重要的用途。作为有效的 DNA 嵌入剂，它们一般都含有  $\pi$  电子缺乏的共轭的平面刚性结构和碱性支链，其中平面芳香或芳香杂环体系易于嵌插到 DNA 碱基对中，而碱性支链则可通过静电吸引与 DNA 结合，同时碱性支链对化合物的细胞毒性也起到非常重要作用。A.Ramos 曾经报导过一系列萘酰亚胺化合物的抗肿瘤能力，结果显示当支链中的氮原子被碳原子、硫原子和氧原子取代时将导致化合物活性的丧失（Curr. Med. Chem.-Anti Cancer Agents, 2001,1:237）。Stephanie Blanchard 也评价了不同化合物对 L1210 小鼠白血病细胞系的细胞毒性作用（J. Med.

Chem, 2004,47:978), 正如期望的那样, 比较那些没有取代基的化合物, 带有 N-二烷基侧链的衍生物具有较低的  $IC_{50}$  值。此外, 还有一些其它的嵌入剂也获得了同样的结果, 如蒽并吡唑、吡唑吡啶、蒽-4-甲酰胺、二羟蒽二酮以及它的氮杂类似物等(J. Med. Chem, 2004,40:3749)。

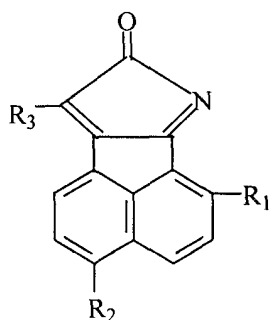
#### 发明内容

本发明目的之一在于, 提供一种新型 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物;

本发明目的之二在于, 提供上述新型 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物的用途。

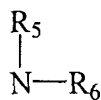
本发明是在 ZL 02148400.7 (发明人为钱旭红和肖义等) 所公开的 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯-9-腈及其衍生物的基础上, 在母体引入新的活性基团, 创制了本发明所涉及的 DNA 靶分子(新型 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物), 并经实验证实: 本发明所创制的 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物能在  $0.01\mu\text{M} \sim 10\mu\text{M}$  的浓度范围内, 以剂量依赖的方式诱导培养的肿瘤细胞凋亡和显著抑制动物体内肿瘤生长, 是一类活性很高的细胞凋亡诱导剂和抗肿瘤化合物。

本发明所说的 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物具有式 (1) 所示结构:



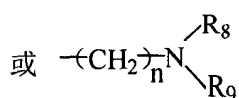
(1)

式 (1) 中,  $R_1, R_2$  分别选自 H, 含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基或由式 (2) 所示的基团, 且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H;  $R_3$  为 CN 或  $\text{COOR}_4$ , 其中  $R_4$  为 H,  $C_1 \sim C_6$  的烷基或  $C_1 \sim C_6$  的卤代烷基;



(2)

式 (2) 中,  $R_5$  为 H 或  $C_1 \sim C_6$  的烷基;  $R_6$  为含 S 的五元或六元芳杂环基,  $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{OR}_7$



其中:  $R_7$  为 H 或  $C_1 \sim C_6$  的烷基,  $R_8, R_9$  分别选自  $C_1 \sim C_6$  的烷基中一种,  $n=1 \sim 6$ 。

本发明一个优选方案是: 当  $R_3$  为 CN 时,  $R_1$  为 H、含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六

元杂环基或由式(2)所示的基团[式(2)中所包含取代基的含义与前文所述相同],  $R_2$  为 H 或含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基, 且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H;

更优选的方案是: 当  $R_3$  为 CN 时,  $R_1$  为 H、含 1~3 个 N、S 或/和 O 的六元杂环基(如吗啉基、硫吗啉基或哌嗪基等)或由式(2)所示的基团, 式(2)中,  $R_5$  为 H 或  $C_1\sim C_3$  的

烷基;  $R_6$  为含 S 的五元芳杂环基,  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)OR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N(R}_8\text{)(R}_9\text{)}$

其中:  $R_7$  为 H 或  $C_1\sim C_3$  的烷基,  $R_8, R_9$  分别选自  $C_1\sim C_3$  的烷基中一种,  $n=1\sim 4$ ;  $R_2$  为 H 或含 1~3 个 N、S 或/和 O 的六元杂环基(如吗啉基、硫吗啉基或哌嗪基等), 且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H。

本发明另一个优选方案是: 当  $R_3$  为  $\text{COOR}_4$  (其中  $R_4$  为 H,  $C_1\sim C_6$  的烷基或  $C_1\sim C_6$  的卤代烷基) 时,  $R_1, R_2$  分别选自 H, 含 1~3 个 N、S 或/和 O 的五元或六元杂环基或由式(2)所示的基团, 且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H; 式(2)中,  $R_5$  为 H 或  $C_1\sim C_6$  的烷基;  $R_6$  为含 S 的五

元或六元芳杂环基,  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)OR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N(R}_8\text{)(R}_9\text{)}$

其中:  $R_7$  为 H 或  $C_1\sim C_6$  的烷基,  $R_8, R_9$  分别选自  $C_1\sim C_6$  的烷基中一种,  $n=1\sim 6$ ;

更优选的方案是: 当  $R_3$  为  $\text{COOR}_4$  (其中  $R_4$  为 H,  $C_1\sim C_3$  的烷基或  $C_1\sim C_3$  的单卤代烷基) 时,  $R_1, R_2$  分别选自 H, 含 1~3 个 N、S 或/和 O 的六元杂环基(如吗啉基、硫吗啉基或哌嗪基等)或由式(2)所示的基团, 且  $R_1$  和  $R_2$  不同时为 H; 式(2)中,  $R_5$  为 H 或  $C_1\sim C_3$  的烷

基;  $R_6$  为含 S 的五元芳杂环基,  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{C(=O)OR}_7$  或  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{N(R}_8\text{)(R}_9\text{)}$

其中:  $R_7$  为 H 或  $C_1\sim C_3$  的烷基,  $R_8, R_9$  分别选自  $C_1\sim C_3$  的烷基中一种,  $n=1\sim 4$ 。

制备本发明所说的 8-氧-8H-苈并[1,2-b]吡咯衍生物的方法包括如下步骤:

以 8-氧-8H-苈并[1,2b]吡咯-9-腈(其制备参见 ZL 02148400.7)为起始原料, 将其置于有机溶剂(如乙腈、四氢呋喃、吡啶、N,N-二甲基甲酰胺或二甲基亚砷)中, 与相应的伯或仲胺(亲核试剂)于  $20\sim 100^\circ\text{C}$ , 反应(芳香氢亲核取代反应) 0.5~24 小时, 蒸出溶剂后即得目标物之一。

和

先将 8-氧-8H-苈并[1,2-b]吡咯-9-腈置于由浓硫酸和发烟硫酸组成酸中(温度控制在  $0\sim 5^\circ\text{C}$ ), 在  $15\sim 25^\circ\text{C}$  反应 10~20 小时得 8-氧-8H-苈并[1,2-b]吡咯-9-甲酸, 然后与相应的醇或卤代烷进行酯化反应获得相应的酯(8-氧-8H-苈并[1,2-b]吡咯-9-甲酸酯), 最后将 8-氧-8H-

苊并[1,2-b]吡咯-9-甲酸酯与相应的伯或仲胺按上述方法经取代反应后即得目标物之二。

#### 附图说明

图1~图5为3-硫吗啉基-8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯-9-腈(化合物7)与培氧细胞共孵育后经流式细胞仪检测结果图。

其中:横坐标为DNA浓度,纵坐标为细胞数,化合物7与培氧细胞共孵育,其浓度分别为0、0.1、1、5、10 $\mu$ M。

#### 具体实施方式

确认本发明所说8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物可作为细胞凋亡诱导剂和抗肿瘤化合物(包括体内和体外)的实验方法是,首先通过MTT等方法测定IC<sub>50</sub>。

如HeLa细胞体外抑制实验使用MTT法。MTT比色试验是一种检测细胞存活和生长的方法,目前已广泛用于抗肿瘤药物筛选,细胞毒性试验等。具体步骤如下:

- 1) 接种细胞:将HeLa细胞用0.25%胰蛋白酶消化,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液配成单个细胞悬液,以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于96孔培养板中,每孔体积200 $\mu$ l。
- 2) 培养细胞:将培养板移入CO<sub>2</sub>孵箱中,37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度下培育24小时后,加入化合物浓度从1 $\mu$ M到100 $\mu$ M,继续培养72小时。
- 3) 呈色:每孔加入MTT溶液(5mg/ml)20 $\mu$ l,孵育4小时,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。然后,每孔加入150 $\mu$ l DMSO,振荡10分钟,使结晶物充分溶解。
- 4) 比色:选择570nm波长,在酶标仪上测定各孔光吸收值,记录结果。计算细胞存活率:试验组光吸收值/对照组光吸收值 $\times 100\%$ ,用细胞存活率对化合物剂量对数作图求出IC<sub>50</sub>值(细胞增殖率降为50%时所需化合物浓度)。

P388细胞体外抑制实验也使用MTT法,具体方法如下:按不同肿瘤生长速率,将一定数量处于对数生长期的肿瘤细胞90 $\mu$ l孔接种于96孔微量培养板内,培养24h后加入药液10 $\mu$ l/孔,对每个细胞株,每个浓度均为三个复孔。另设无细胞调零孔、如果药物有颜色要做相应药物浓度无细胞调零孔。肿瘤细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养48小时后,加MTT(Sigma)液5mg/ml用生理盐水配制20 $\mu$ l/孔;继续培养4小时后,加入三联液(10%SDS-5%异丁醇-0.01mol/lHCl)50 $\mu$ l/孔,于CO<sub>2</sub>培养箱中过夜。然后用酶标仪测OD<sub>570</sub>值。按下列公式计算被测物对癌细胞生长的抑制率:

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{对照组 OD 值} - \text{治疗组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%。$$

A549细胞体外抑制实验使用磺酰罗丹明B(Sulforhodamine B, SRB)蛋白染色法,具体方法如下:根据细胞生长速率,将处于对数生长期的肿瘤细胞以90 $\mu$ l/孔接种于96孔培养

板,贴壁生长 24 小时再加药 10 $\mu$ l/孔。每个浓度设三复孔。并设相应浓度的生理盐水溶媒对照及无细胞调零孔。肿瘤细胞在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 小时,然后倾去培养液,用 10% 冷 TCA 固定细胞,4 $^{\circ}$ C 放置 1 小时后用蒸馏水洗涤 5 次,空气中自然干燥。然后加入由 1% 冰醋酸配制的 SRB (Sigma) 4mg/ml 溶液 100 $\mu$ l/孔,室温中染色 15 分钟,去上清液,用 1% 醋酸洗涤 5 次,空气干燥。最后加入 150 $\mu$ l/孔的 Tris 溶液,酶标仪 520nm 波长下测定 A 值。按下列公式计算被测物对癌细胞生长的抑制率:

$$\text{肿瘤抑制率} = (A_{540 \text{ 对照孔}} - A_{540 \text{ 给药孔}}) / A_{540 \text{ 对照孔}} \times 100\%。$$

体内抗肿瘤活性的实验方法是:首先培养肝癌细胞系 H22,按 200 $\mu$ l/只接种于小鼠右腋下,制备成肿瘤动物模型。接种 5 天后,瘤块形成,开始按照浓度梯度每日一次静脉或局部注射化合物的 30%DMSO 溶液。实验期间每周两次测定肿瘤长径(a)及与之相垂直的短径(b),按公式  $1/2ab^2$  计算瘤块体积,并观测动物存活时间。结果表明,本发明中的化合物均有不同程度抑制肿瘤生长、延长肿瘤模型动物生存时间的作用。

本发明还通过流式细胞仪检测了本发明所说 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯衍生物在体内、体外诱导细胞凋亡的作用。在体外试验中,选择 HeLa 细胞为靶细胞,用 RPMI1640 培养液将细胞稀释成密度约为  $5 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液,加入 96 孔细胞培养板中,每孔加入 200 $\mu$ l 肿瘤细胞悬液。按浓度梯度分别加入指定化合物,同时设细胞对照组和阳性药物环磷酰胺对照组。CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 24 小时后,70%冷乙醇固定;体内试验中,取经过化合物处理的肿瘤模型动物的肿瘤组织,制备单细胞悬液,同时设定未经处理的肿瘤模型动物为对照,70%冷乙醇固定。上机检测前洗去固定液,碘化丙啶染色,流式细胞仪检测。计算机自动对各峰的位置、峰高度、细胞周期各时相百分比进行分析。结果表明,效果最佳的化合物在 0.01-10 $\mu$ M 之间以剂量依赖的方式诱导细胞凋亡,凋亡率在 5.1-33.8%。

下面通过实施例对本发明作进一步说明,其目的仅在于更好理解本发明的内容而非限制本发明的保护范围:

#### 实施例 1

##### 8-氧-8H-苊并[1,2-b]吡咯-9-腈(化合物 1)

在 500mL 单口烧瓶中,依次加入 0.1mol 苊醌,0.11mol 丙二腈,150ml 乙腈,加热至回流,反应 4h,反应混合物由淡黄色浑浊变为橙红透明。冷至室温后,过滤,收集橙红色滤饼,得 1-二氰基亚甲基-2-氧-苊,粗产率 96%。

在 500mL 单口烧瓶中,依次加入 1-二氰基亚甲基-2-氧-苊粗品 0.05mol,碳酸钾 1g,200ml 乙腈,加热至回流,反应 4h,大量土黄色固体析出。冷至室温后,过滤,水洗,收集滤饼得化合物 1,收率 95%。

<sup>1</sup>H NMR (400M, DMSO):  $\delta$  8.71-8.69 (d, J=8.0Hz, 1H), 8.67-8.65 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.64-8.62 (d,



$J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 8.42-8.40 (d,  $J=7.6\text{Hz}$ , 1H), 8.04-8.08 (t,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.99-7.95 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H);  
 $^{13}\text{C}$  NMR (100M, DMSO):  $\delta$  177.48, 138.26, 137.73, 134.40, 132.72, 131.82, 131.37, 128.91, 127.94, 127.37, 126.13, 122.22, 119.72, 113.82, 113.38;  
IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2231, 1643, 1577;  
ESI-MS:  $\text{M}+\text{Na}^+$ (253,  $m/z$ )。

## 实施例 2

### 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸的合成 (化合物 2)

在 50mL 单口烧瓶中, 加入 60mL 浓硫酸或者 25mL 发烟硫酸, 在  $0\sim 5^{\circ}\text{C}$  下, 分批加入 0.05mol 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈, 加完后在室温继续反应 16 小时。然后小心缓慢的将其滴入碎冰中, 同时剧烈的搅拌, 滴完后, 静置, 小心的过滤, 滤饼用大量水洗涤, 直至滤液呈中性, 滤饼干燥后得化合物 2, 收率 95%, M.p.  $245^{\circ}\text{C}$ 。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d^6$ )  $\delta=11.41(\text{s}, 1\text{H}, \text{OH}^*)$ , 8.95 (d, 1H,  $J=7.2\text{ Hz}$ ), 8.55 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ ), 8.53 (d, 1H,  $J=7.2\text{ Hz}$ ), 8.48 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ ), 7.96 (dd, 1H,  $J_1=8.0\text{ Hz}$ ,  $J_2=7.2\text{ Hz}$ ), 7.88 (dd, 1H,  $J_1=8.0\text{ Hz}$ ,  $J_2=7.2\text{ Hz}$ )。

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3208, 1774, 1700, 1636, 1583, 1570。

MS (API-ES)  $m/z$  ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$  248.1。

## 实施例 3

### 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸甲酯 (化合物 3)

在 100mL 圆底烧瓶内, 依次加入 0.01mol 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸, 50mL 乙腈为溶剂, 大大过量的碘甲烷, 氮气保护下, 加热至  $35^{\circ}\text{C}$  反应。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 80:1) 得化合物 3, 收率 98%。M.p.  $202^{\circ}\text{C}$ 。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=9.12(\text{d}, 1\text{H}, J=7.2\text{ Hz})$ , 8.75 (d, 1H,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 8.31 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ ), 8.25 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ ), 7.87 (dd, 1H,  $J_1=8.0\text{ Hz}$ ,  $J_2=7.2\text{ Hz}$ ), 7.77 (dd, 1H,  $J_1=8.0\text{ Hz}$ ,  $J_2=7.6\text{ Hz}$ ), 3.20 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3^*$ )。

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3068, 2933, 1765, 1712, 1645, 1586, 1571。

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  计算  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{NO}_3$  264.0661, 实验值 264.0672。

## 实施例 4

### 3-(*N,N'*-二乙氨基-乙胺基)-8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈 (化合物 4)

在 50mL 单口烧瓶中, 依次加入 0.5mmol 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈和 *N,N'*-二乙基乙二胺 2mmol, 20mL 乙腈作溶剂, 在室温下搅拌反应 1 小时。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 10:1) 得化合物 4。收率 42%。m. p.  $>300^{\circ}\text{C}$ 。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d^6$ )  $\delta$  8.97 (d, 1H,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 8.61 (d, 1H,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 7.98 (d, 1H,  $J=9.2\text{ Hz}$ ), 7.91 (dd, 1H,  $J=8.0, 7.6\text{ Hz}$ ), 7.06 (1H, d,  $J=9.2\text{ Hz}$ ), 3.79 (br s, 2H,  $-\text{NHCH}_2$ ), 2.93 (br

s, 2H, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.38-2.41 (m, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.12-1.15 ppm (m, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3313, 2968, 2213, 1324, 1574, 1522.

HRMS (ESI) *m/z* (M - H)<sup>-</sup> 计算 C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O 343.1559, 实验值 343.1557。

### 实施例 5

#### 3-(4-丁酸乙酯-丁胺基)-8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈 (化合物 5)

在 50mL 单口烧瓶中, 依次加入 0.5mmol 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈和 4-氨基丁酸乙酯 2mmol, 20mL 乙腈作溶剂, 在室温下搅拌反应 4 小时。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 15: 1) 得化合物 5。收率 45%。m.p.138.5-139.5℃  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sup>6</sup>) δ 9.58(br s, 1H, -NH), 8.90 (d, 1H, *J*=8.0 Hz), 8.55(d, 1H, *J*=8.0 Hz), 7.93(d, 1H, *J*=9.2 Hz), 7.87 (dd, 1H, *J*=8.0, 7.6 Hz), 7.02 (d, 1H, *J*=8.8 Hz), 4.05 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, *J*=6.8 Hz), 3.61 (q, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, *J*=7.2 Hz), 2.52-2.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 1.99-1.96 (m, 2H, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.68 ppm(t, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, *J*=6.8 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 177.1, 172.5, 156.0, 138.8, 132.4, 131.1, 1129.6, 128.0, 127.0, 125.8, 122.1, 116.1, 114.3, 111.4, 108.1, 63.0, 45.2, 30.7, 30.6, 17.0 ppm;

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3326, 2979, 2218, 1723, 1627, 1576, 1531.

HRMS (ESI) *m/z* (M + H)<sup>+</sup> 计算 C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 360.1348, 实验值 360.1349。

### 实施例 6

#### 3-(噻吩基-2-基-甲氨基)-8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈 (化合物 6)

在 50mL 单口烧瓶中, 依次加入 0.5mmol 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈和 2-甲氨基噻吩 2mmol, 20mL 乙腈作溶剂, 在室温下搅拌反应 12 小时。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 12: 1) 得化合物 6。收率 38%。m.p.250℃。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO): δ=9.79 (br s, 1H, NH<sup>\*</sup>), 8.94 (d, 1H, *J*=8.0 Hz), 8.67 (d, 1H, *J*=8.8 Hz), 8.10 (d, 1H, *J*=7.6 Hz), 7.86 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>=7.6 Hz, *J*<sub>2</sub>=8.0 Hz), 7.50 (d, 1H, *J*=3.6 Hz), 7.23 (d, 1H, *J*=3.6 Hz), 7.08 (d, 1H, *J*=8.8 Hz), 7.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>=3.6 Hz, *J*<sub>2</sub>=3.6 Hz), 4.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub><sup>\*</sup>)<sub>2</sub>).

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3320, 2920, 2217, 1628, 1572, 1492.

HRMS (ESI) *m/z* (M - H)<sup>-</sup> 计算 C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>OS 340.0545, 实验值 340.0546。

### 实施例 7

#### 3-硫吗啉基-8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈 (化合物 7)

在 50mL 单口烧瓶中, 依次加入 0.5 mmol 8-氧-8*H*-苈并[1,2-*b*]吡咯-9-腈和 2 mmol 硫吗啉, 20mL 乙腈作溶剂, 在室温下搅拌反应 8 小时。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-丙酮 60: 1) 得化合物 7。收率 35%; m.p. 232℃。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sup>6</sup>) δ 8.61 (d, 2H, *J*=8.0 Hz), 8.12 (d, 1H, *J*=8.8 Hz), 7.94 (dd, 1H, *J*=8.0, 8.0 Hz), 7.40 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz), 3.94(t, 4H, *J*=4.8 Hz, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S), 2.97 ppm (t, 4H,

$J=4.8$  Hz,  $N(CH_2CH_2)_2S$ ).

IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2219, 1624, 1572, 1499.

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 计算  $C_{19}H_{14}N_3OS$  332.0858, 实验值 332.0861。

### 实施例 8

#### 3-(噻吩基-2-基-甲氨基)-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸甲酯 (化合物 8)

在 50mL 圆底烧瓶内, 依次加入 0.5mmol 8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸酯和 2-甲胺基噻吩 2.5mmol, 20mL 乙腈为溶剂, 加热至 60℃ 反应。TLC 跟踪, 反应结束后减压蒸去乙腈, 经两次硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 12: 1) 得化合物 8。收率 41%。M.p. 240 °C。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $d^6$ -DMSO):  $\delta=9.71$ (br s, 1H,  $NH^*$ ), 8.87 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz), 8.77 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz), 8.60 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz), 7.86 (dd, 1H,  $J_1=7.6$  Hz,  $J_2=8.0$  Hz), 7.46 (d, 1H,  $J=3.6$  Hz), 7.23 (d, 1H,  $J=3.6$  Hz), 7.09 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz), 7.02 (dd, 1H,  $J_1=3.6$  Hz,  $J_2=3.6$  Hz), 4.98 (s, 2H,  $CH_2^*$ ), 2.97ppm (s, 3H,  $COOCH_3^*$ ).

IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3298, 2923, 1748, 1710, 1693, 1624, 1563, 1525.

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M + Na$ )<sup>+</sup> 计算  $C_{21}H_{14}N_2NaO_3S$  397.0623, 实验值 397.0614。

### 实施例 9

#### 8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸-2-溴乙基酯 (化合物 9)

在 100mL 圆底烧瓶内, 依次加入 0.01mol 8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸, 50mL 乙腈为溶剂, 大大过量的 1, 2-二溴乙烷, 氮气保护下, 加热至 35℃ 反应。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 70: 1) 得化合物 9。收率 18%。m.p. 205-206 °C。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta=9.10$  (d, 1H,  $J=7.6$  Hz), 8.74 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz), 8.31 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz), 8.26 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz), 7.86 (dd, 1H,  $J_1=7.6$  Hz,  $J_2=7.6$  Hz), 7.77 (dd, 1H,  $J_1=8.0$  Hz,  $J_2=7.6$  Hz), 4.13 (t, 2H,  $J=6.4$  Hz,  $CH_2^*CH_2Br$ ), 3.66 (t, 2H,  $J=6.4$  Hz,  $CH_2CH_2^*Br$ ).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta=178.7$ , 168.7, 166.3, 142.9, 137.2, 136.5, 134.2, 132.7, 132.3, 131.6, 129.3, 128.1, 127.5, 125.3, 121.3, 39.5, 28.3.

IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3063, 2921, 1769, 1712, 1647, 1585, 1572.

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M + Na$ )<sup>+</sup> 计算  $C_{17}H_{10}BrNNaO_3$  377.9742, 实验值 377.9730。

### 实施例 10

#### 3-硫吗啉基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸-2-溴乙基酯 (化合物 10)

在 50 mL 圆底烧瓶内, 加入 0.01 mol 8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-甲酸-2-溴乙基酯, 50 mL 乙腈为溶剂, 大大过量的硫吗啉, 氮气保护下, 加热至 60℃ 反应。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-甲醇 70: 1) 得化合物 10。收率 35%。m.p. 173 °C。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta=9.03$  (d, 1H,  $J=8.4$  Hz), 8.78 (d, 1H,  $J=7.2$  Hz), 8.44 (d, 1H,  $J=8.0$

Hz), 7.82 (dd, 1H,  $J_1=7.2$  Hz,  $J_2=8.4$  Hz), 7.20 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz), 4.11((t, 2H,  $J=6.4$  Hz,  $\text{OCH}_2^*$ ), 3.64 (t, 2H,  $J=6.4$  Hz,  $\text{CH}_2^*\text{Br}$ ), 3.72 (br s, 4H,  $-\text{N}(\text{CH}_2^*\text{CH}_2)_2\text{S}$ ), 3.00 ppm (br s, 4H,  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2^*)_2\text{S}$ ).

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2916, 1753, 1703, 1628, 1601, 1570.

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 计算  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$  457.0222, 实验值 457.0211。

### 实施例 11

3,6-二吗啉基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-腈 (化合物 11)

在 50mL 单口烧瓶中, 依次加入 0.5mmol 8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-腈和 5 mmol 吗啉, 20mL 乙腈作溶剂, 在室温下搅拌反应 10 小时。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-丙酮 50:1) 得化合物 11。收率 45%; m. p. 180°C。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.21 (d, 1H,  $J=10$  Hz), 8.05 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz), 7.59 (d, 1H,  $J=10$  Hz), 7.31 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz), 3.88 (br s, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ ), 3.82 (br s, 4H,  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ ), 3.54 (br s, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ ), 3.46 ppm (br s, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ ).

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2219, 1610, 1546, 1502.

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 计算  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$  401.1614, 实验值 401.1606。

### 实施例 12

6-硫吗啉基-8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-腈 (化合物 12)

在 50mL 单口烧瓶中, 依次加入 0.5mmol 8-氧-8*H*-茚并[1,2-*b*]吡咯-9-腈和 5mmol 吗啉, 20mL 乙腈作溶剂, 在室温下搅拌反应 8 小时。反应结束后, 减压蒸去乙腈, 粗产品经硅胶柱层析分离 (二氯甲烷-丙酮 60:1) 得化合物 12。收率 12%; m. p. 247°C。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.36 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz), 8.31 (d, 1H,  $J=9.6$  Hz), 8.24 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz), 7.81 (d, 1H,  $J=9.6$  Hz), 7.73 (dd, 1H,  $J=7.6, 7.6$  Hz), 3.81 (br s, 4H,  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{S}$ ), 2.88 ppm (br s, 4H,  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{S}$ ).

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3431, 2924, 2852, 2224, 1618, 1600.

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 计算  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{OS}$  332.0858, 实验值 332.0851。

### 实施例 13

体外抗肿瘤活性实验。采用细胞培养法对本发明中的系列化合物进行抗肿瘤活性实验, 通过 MTT 法测定  $\text{IC}_{50}$ 。选择 HeLa 细胞为靶细胞, 用 RPMI1640 培养液将细胞稀释成密度约为  $5 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 200 $\mu\text{l}$  肿瘤细胞悬液。按浓度梯度分别加入指定化合物的 100%DMSO 溶液, 终浓度 100, 50, 10, 5, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 $\mu\text{M}$ , 同时设培养细胞肿瘤对照组和抗肿瘤药物环磷酰胺阳性对照组。CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 24 小时后, 每孔加入 MTT 溶液 20 $\mu\text{l}$ , 用酶测定 570nm 下光密度 (OD) 值, 根据光密度值计算

各孔肿瘤细胞的存活率。实验重复三次，取其平均值。用细胞存活率对化合物剂量对数作图求出  $IC_{50}$  值（细胞增殖率降为 50% 时所需化合物浓度），结果见表 1。

表 1 不同化合物抗肿瘤活性

化合物	细胞毒性 ( $IC_{50}$ , $\mu M$ )		
	Hela	P388	A549
化合物 1	21.2	---	---
化合物 2	24.2	---	---
化合物 3	40.9	0.80	0.45
化合物 4	6.8	---	---
化合物 5	4.8	---	---
化合物 6	1.1	---	---
化合物 7	0.17	---	---
化合物 8	1.3	11.3	6.69
化合物 9	1.3	1.34	5.51
化合物 10	1.2	1.41	8.03
化合物 11	>100	---	---
化合物 12	2.8	---	---

#### 实施例 14

通过流式细胞仪检测了本发明所指的化合物在体内、体外诱导细胞凋亡的作用。在体外试验中，选择 Hela 细胞为靶细胞，用 RPMI1640 培养液将细胞稀释成密度约为  $5 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液，加入 96 孔细胞培养板中，每孔加入 200 $\mu$ l 肿瘤细胞悬液。按浓度梯度分别加入指定化合物的 100%DMSO 溶液，终浓度 100, 50, 10, 5, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 $\mu$ M，同时设培养细胞肿瘤对照组和抗肿瘤药物环磷酰胺阳性对照组。CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 24 小时后，冷乙醇固定。上机检测前洗去固定液，碘化丙啶染色，流式细胞仪检测。计算机自动对各峰的位置、峰高度、细胞周期各时相百分比进行分析。结果表明，效果最佳的化合物在 0.01-10 $\mu$ M 之间以剂量依赖的方式诱导细胞凋亡，凋亡率在 5.1-33.8%（见图 1-图 5）。可见凋亡峰，凋亡率分别为 3.2%、5.1%、7.9%、15.5%、33.8%。

#### 实施例 15

体内抗肿瘤活性测试。选择化合物 7 进行活体动物实验。选择饲养的中国昆明小鼠，随即分组，每组 10 只。采用右下肢皮下荷瘤的方法，取传代 7 天的含有 H22 细胞的小鼠癌性腹水，按 1: 2 稀释，取 0.2ml 于右下肢皮下接种，荷瘤后 4 天，见荷瘤部位有一小指甲大小

肿瘤开始给药，连续给药 7 天后取材，每组取 4 只，取血，肝，肾，其它动物观察生存期。

取材后测得瘤重及瘤体积见表 2。

表 2 体内抗肿瘤活性测试

分组	治疗后平均瘤体积	平均瘤重	治疗前体重-治疗后体重
对照组	0.36	0.61	0.43
0.3 mg/kg	0.43	0.62	-8.9
0.1 mg/kg	0.28	0.39	-1.06
0.03 mg/kg	0.98	1.1	0.27

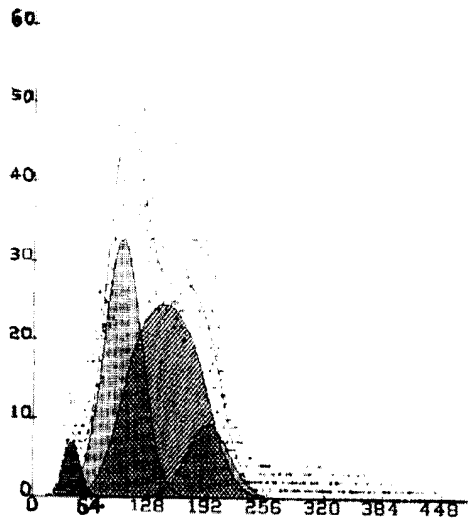


图 1

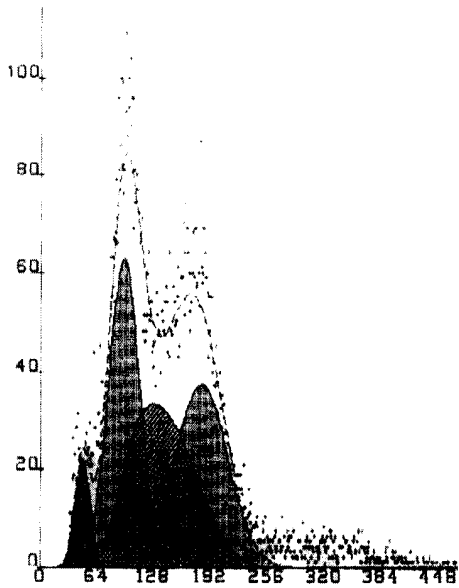


图 2

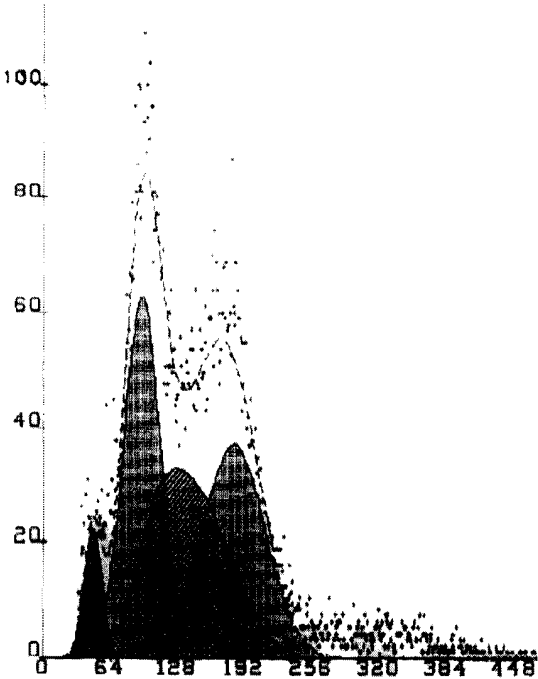


图 3

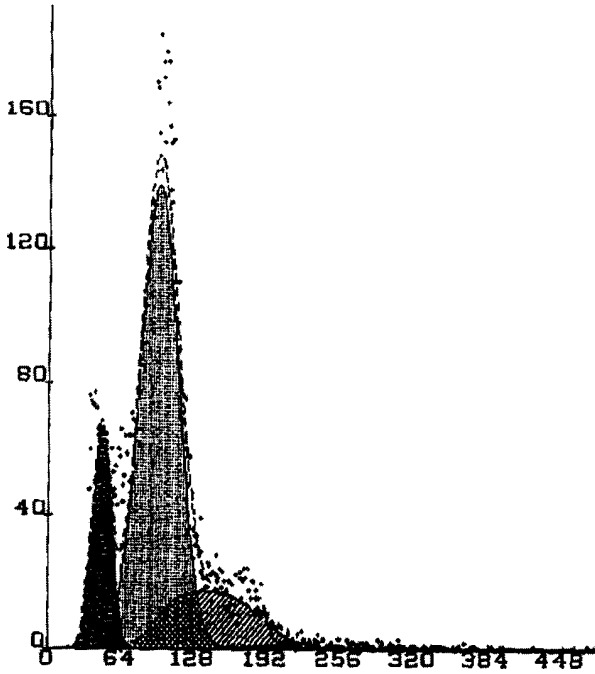


图 4



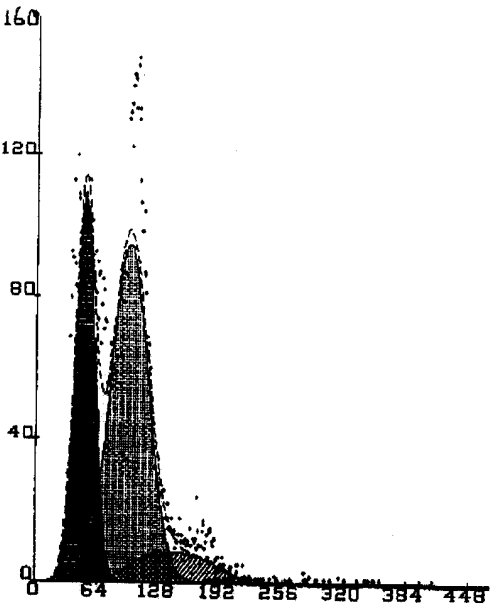


图 5