

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610033788.1

[51] Int. Cl.

C07F 9/09 (2006.01)

C07F 9/12 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100393731C

[22] 申请日 2006.2.23

[21] 申请号 200610033788.1

[73] 专利权人 中国科学院广州化学研究所

地址 510650 广东省广州市天河区乐意居

[72] 发明人 邹永 王志新 张学景 周玥
何树杰 林慧贞

[56] 参考文献

CN1706851A 2005.12.14

CN1616388A 2005.5.18

CN1465580A 2004.1.7

US5561122A 1996.10.1

antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A - 4 prodrugs. george r et al. anti. cancer drug design, Vol. 10 . 1995

synthesis of water - soluble prodrugs of the cytotoxic agent combretastatin A4. simon b et al. bioorganic &med. chem. lett. , Vol. 6 No. 2. 1996

审查员 刘芳

[74] 专利代理机构 广州科粤专利代理有限责任公司

代理人 潘伟健

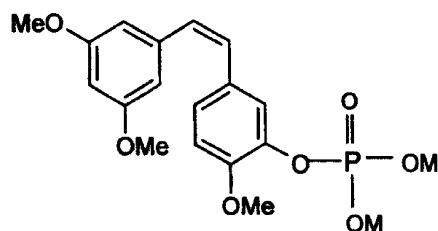
权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

(Z) - 3'-羟基 -3, 4', 5 - 三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐及其制备方法、药物组合物和用途

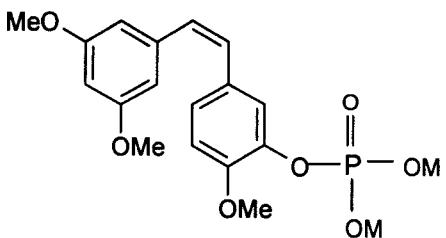
[57] 摘要

本发明涉及式(1)的化合物，其中 M 表示 K^+ 、 Na^+ 或 NH_4^+ ；还涉及其制备方法、药物组合物和在抗肿瘤内皮细胞和抗血管增生治疗中的应用。其制备方法是 (Z) - 3' - 羟基 -3, 4', 5 - 三甲氧基二苯乙烯在缚酸剂存在的条件下与磷酰化试剂反应生成磷酰化中间体，然后在碱溶液中回流得到产物。式(1)的化合物不但对多种肿瘤细胞株的生长显示良好的抑制活性，而且还能与肿瘤血管内皮细胞中的微管蛋白结合，抑制其聚合、阻止有丝分裂，导致为肿瘤供应氧气及养分的血管堵塞，发挥靶向抗血管作用，使肿瘤细胞因缺血而死亡，另外在较低浓度下可使异常增殖的内皮细胞发生形态学改变而脱落。因此式(1)的化合物可以用于防治肿瘤和抗血管增生。



式 (1)

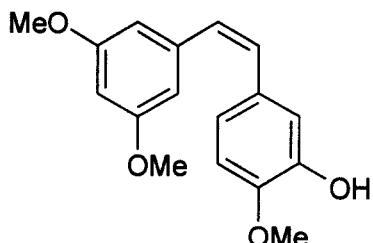
1. 通式 (1) 的化合物:



其中 M 表示 K^+ 、 Na^+ 或 NH_4^+ 。

2. 权利要求 1 所述化合物的制备方法，其特征是包括以下的步骤：

(1) 以惰性溶剂为溶剂，式(2)的化合物在常温下和缚酸剂的存在下与磷酰化试剂反应，得到磷酰化中间体；



式(2)

(2) 将得到的磷酰化中间体于碱溶液中加热到 50~100℃ 反应，纯化后得到权利要求 1 所述的通式 (1) 化合物。

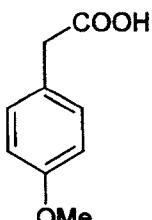
3. 根据权利要求 2 所述的化合物的制备方法，其特征是步骤(1)中所述的惰性溶剂为二氯甲烷、二氯乙烷或苯，其用量是式(2)的化合物摩尔数的 15~40 倍，所述的缚酸剂是吡啶或三烷基胺，缚酸剂的用量是式(2)的化合物的摩尔数的 4~8 倍，所述的磷酰化试剂是 $(Bu^tO)_2P(O)Cl$ 、 $P(O)Cl_3$ 或 $P(O)Br_3$ ，磷酰化试剂的用量是式(2)的化合物摩尔数的 5~8 倍，反应时间为 2~8h；步骤 (2) 所述的碱是浓度范围为 0.2~1.5mol/L 的 NaOH、KOH、氨水、碳酸铵、醇钠或醇钾，碱的用量为式(2)的化合物摩尔数的 2 倍，反应时间为 6~15h，所述的纯化是用水、水和甲醇的混合溶剂、水和乙醇的混合溶剂、甲醇和丙酮的混合溶剂或水和丙酮的混合溶剂重结晶。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的化合物的制备方法，其特征是步骤 (1) 所述的缚酸剂是三乙胺，所述的磷酰化试剂是 $P(O)Cl_3$ ，步骤 (2) 所述的纯化是用水和丙酮的混合溶剂重结晶。

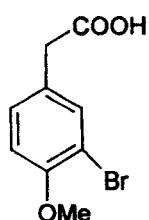
5. 根据权利要求 2 或 3 所述的化合物的制备方法，其特征是式 (2) 的化合物的制备包括以下的步骤：

(1) 下式(3)的化合物在乙酸溶液中与溴在 0~20℃ 的温度下反应，经纯化得到式(4)的

化合物：

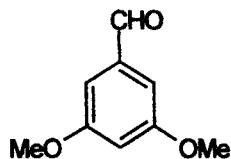


式(3)

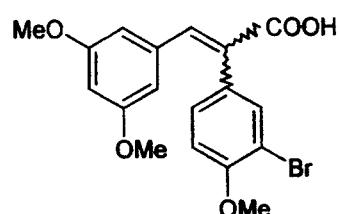


式(4)

(2) 将得到的式(4)的化合物与以下式(5)的化合物在三乙胺催化下，于醋酸酐中加热至80~120℃，反应后酸化、纯化，得到下述式(6)的化合物；

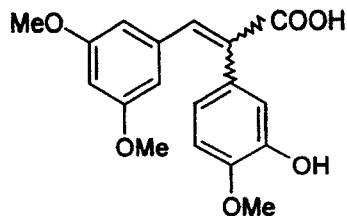


式(5)



式(6)

(3) 式(6)的化合物在强碱溶液中，二价铜盐存在下，在100~120℃反应，再经酸化、纯化，得到下述式(7)的化合物；



式(7)

(4) 式(7)的化合物在有机碱和金属的催化作用下210~240℃脱羧，经分离、纯化得到式(2)的化合物。

6. 根据权利要求5所述的化合物的制备方法，其特征是步骤(1)所述的式(3)的化合物与溴的摩尔比为1:1，乙酸的用量为式(3)的化合物或溴的摩尔数的5~8倍，反应时间是1~3h，所述的纯化是用乙醇、乙醇和水的混合溶剂或乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂重结晶；步骤(2)中式(4)的化合物和式(5)的化合物的摩尔比是1:1，醋酸酐的用量是式(4)或(5)的化合物的摩尔数的8~10倍，三乙胺的用量是式(4)或(5)的化合物的摩尔数的1.5~2.0倍，反应时间为6~8h，所述的纯化是用乙酸乙酯萃取，并采用乙醇、乙醇和水的混合溶剂、丙酮和石油醚的混合溶剂或氯仿和石油醚的混合溶剂重结晶；步骤(3)所述的强碱溶液是质量分数为8%~20%的NaOH或KOH溶液，碱的用量为式(6)的化合物摩尔数的60~80倍，所述的二价铜盐的用量为式(6)的化合物摩尔数的1~1.5倍，所述的二价铜盐是硫酸铜、氯化铜、硝酸铜

或碱式碳酸铜，反应时间为 48~72h，所述的纯化是用氯仿和石油醚的混合溶剂、乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂、乙醇和水的混合溶剂或氯仿和石油醚的混合溶剂重结晶；步骤(4)中所述的有机碱是吡啶、哌啶或喹林，有机碱的用量为式(7)的化合物摩尔数的 20~25 倍，所述的金属是 Fe、Al、Zn 或 Cu，金属的用量为式(7)的化合物摩尔数的 7.5~8 倍，反应时间是 2~8 小时，所述的纯化是用体积比 1:4~1:10 的乙酸乙酯-石油醚为洗脱剂的柱层析分离方法或质量为待分离混合物质量的 30~50 倍的硅胶为载体进行柱层析。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的化合物的制备方法，其特征是步骤 (1) 所述的纯化是用乙醇或乙醇和水的混合溶剂，步骤 (2) 所述的纯化是用乙醇重结晶；步骤(3)所述的强碱溶液是质量分数为 8%~20% 的 NaOH 溶液，所述的二价铜盐是硫酸铜，所述的纯化是用乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂重结晶；步骤(4) 中所述的有机碱是喹啉，所述的金属是 Cu。

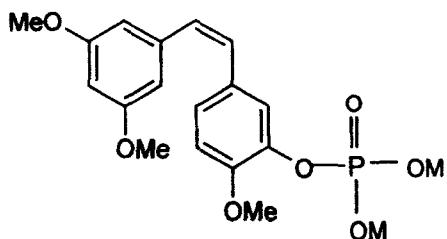
8. 用于制备抗肿瘤血管内皮细胞和抗血管增生的药物组合物，其中含有治疗有效量权利要求 1 所述化合物和一种或一种以上药学上可接受的载体。

9. 权利要求 1 所述的化合物在制备抗肿瘤血管内皮细胞和抗血管增生治疗领域中的应用。

(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐及其制备方法、
药物组合物和用途

技术领域

本发明涉及一种二苯乙烯的衍生物，具体来说是涉及下述式（1）的(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐，及其制备方法、药物组合物和其在抗肿瘤内皮细胞和抗血管增生治疗领域中的应用。

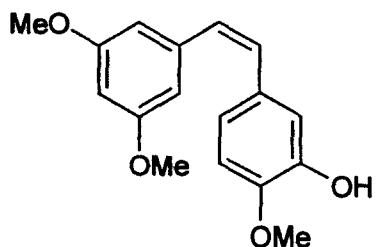


式 (1)

其中 M 表示 K^+ 、 Na^+ 或 NH_4^+ 。

背景技术

(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯：



式(2)

是一个以羟基和甲氧基为取代基的二苯乙烯类化合物。M. Roberti 等人 (*J. Med. Chem.*, 2003, 46, 3546) 的研究证实，该化合物具有很强的抑制 HL-60 细胞增殖活性 (IC_{50} 为 $0.03 \mu M$) 及诱导 HL-60 细胞凋亡活性 (AC_{50} 为 $0.04 \mu M$)；对多药耐药性的 HL-60R 细胞也具有很强的抑制活性 (IC_{50} 为 $0.025 \mu M$ 、 AC_{50} 为 $0.03 \mu M$)；该化合物的抑制 HL-60 及 HL-60R 细胞生长活性远远高于与其对比的白藜芦醇及一些经典的抗肿瘤药物，如依托泊甙、Citarabine、5-氟尿嘧啶、顺铂等，仅次于柔红霉素；更为重要的是，其对具有耐药性的 HL-60R 细胞的抑制活性远远高于依托泊甙、citarabine 和柔红霉素。但是式（2）的化合物水溶性极低，不利于血管给药。

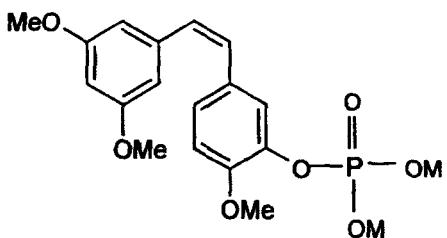
发明目的

本发明的目的是开发出一种水溶性较高的二苯乙烯衍生物。本发明的另一目的是开发出

这种二苯乙烯衍生物的制备方法。本发明的又一目的是开发出这种二苯乙烯衍生物的药物组合物。本发明的再一目的是开发出这种二苯乙烯衍生物在制备抗肿瘤内皮细胞和抗血管增生治疗药物中的应用。

我们通过将式(2)的化合物在缚酸剂存在的条件下与磷酰化试剂反应生成磷酰化中间体，然后在碱溶液中回流得到式(1)的化合物，这种水溶性磷酸酯盐具有很好的抑制肿瘤细胞生长活性、微管蛋白聚合抑制活性及靶向抗肿瘤血管活性，与药学上可接受的载体混合可以制成有抗癌和抗血管增生作用的药物组合物，从而实现了本发明的目的。

本发明的(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐，其结构由下述式(1)表示：



式 (1)

其中 M 表示 K^+ 、 Na^+ 或 NH_4^+ 。

本发明的(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐的制备方法，其特征是包括以下的步骤：

(1) 以惰性溶剂为溶剂，式(2)的化合物在常温下和缚酸剂的存在下与磷酰化试剂反应，得到磷酰化中间体；

(2) 将得到的磷酰化中间体于碱溶液中加热到 50~100°C 反应，纯化后得到式(1)的化合物。

以上式(1)的化合物的制备方法的优选条件是：

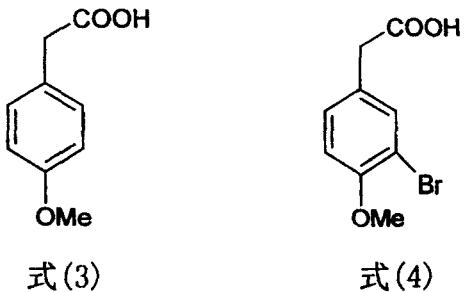
步骤(1)中所述的惰性溶剂为二氯甲烷、二氯乙烷、苯等，其用量是式(2)的化合物摩尔数的 15~40 倍，所述的缚酸剂可以是吡啶、三烷基胺，最好是三乙胺，缚酸剂的用量是式(2)的化合物的摩尔数的 4~8 倍；所述的磷酰化试剂可以是 $(C_2H_5O)_2P(O)Cl$ 、 $P(O)Cl_3$ 或 $P(O)Br_3$ 等，最好是 $P(O)Cl_3$ ，磷酰化试剂的用量是式(2)的化合物摩尔数的 5~8 倍；反应时间为 2~8h。

步骤(2)所述的碱可以是浓度范围为 0.2~1.5mol/L 的 $NaOH$ 、 KOH 、氨水、碳酸铵、醇钠或醇钾等，碱的用量为式(2)的化合物摩尔数的 2 倍；反应时间为 6~15h；所述的纯化可以是用水、水和甲醇的混合溶剂、水和乙醇的混合溶剂、甲醇和丙酮的混合溶剂或水和丙酮的混合溶剂重结晶，最好是用水和丙酮的混合溶剂重结晶。

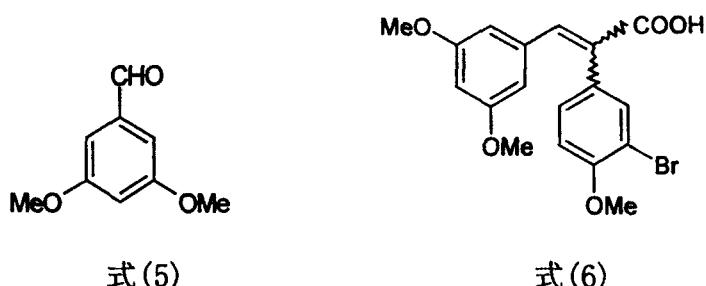
式(2)的化合物的制备可以采用常规的方法，即先将羟基进行保护，Wittig 反应得到

二苯乙烯骨架化合物，得到的顺反式混合的产物经过分离得到顺式化合物脱掉保护基后得到产物(文献: J Med Chem, 2003, 46: 3546)。最好是采用本发明提供的方法，通过 Perkin 缩合反应构建二苯乙烯骨架，再经官能团转化得到，其特征是包括以下的步骤:

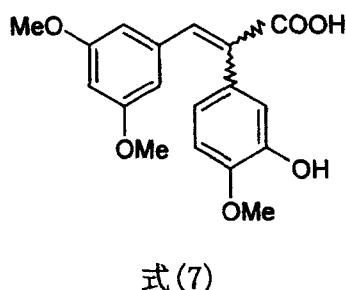
(1) 下式(3)的化合物在乙酸溶液中与溴在0~20℃的温度下反应，经纯化得到式(4)的化合物;



(2) 将得到的式(4)的化合物与以下式(5)的化合物在三乙胺催化下，于醋酸酐中加热至80~120℃，反应后酸化、纯化，得到下述式(6)的化合物;



(3) 式(6)的化合物在强碱溶液中，二价铜盐存在下，在100~120℃反应，再经酸化、纯化，得到下述式(7)的化合物;



(4) 式(7)的化合物在有机碱和金属的催化作用下210~240℃脱羧，经分离、纯化得到式(2)的化合物。

上述式(2)的化合物的制备方法的优选条件是:

步骤(1)所述的式(3)的化合物与溴的摩尔比为1:1，乙酸的用量为式(3)的化合物或溴的摩尔数的5~8倍，反应时间是1~3h，所述的纯化可以是用乙醇、乙醇和水的混合溶剂或乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂重结晶等，最好是用乙醇或乙醇和水的混合溶剂重结晶；步骤(2)中式(4)的化合物和式(5)的化合物的摩尔比是1:1，醋酸酐的用量是式(4)或(5)的化合

物的摩尔数的 8~10 倍，三乙胺的用量是式(4)或(5)的化合物的摩尔数的 1.5~2.0 倍，反应时间为 6~8h，所述的纯化可以是用乙酸乙酯萃取除掉杂质，并采用乙醇、乙醇和水的混合溶剂、丙酮和石油醚的混合溶剂、氯仿和石油醚的混合溶剂等重结晶，最好是用乙醇重结晶；步骤(3)所述的强碱溶液可以是质量分数为 8%~20% 的 NaOH 或 KOH 溶液等，最好是 NaOH 溶液，碱的用量为式(6)的化合物摩尔数的 60~80 倍，所述的二价铜盐的用量为式(6)的化合物摩尔数的 1~1.5 倍，所述的二价铜盐可以是硫酸铜、氯化铜、硝酸铜或碱式碳酸铜等，最好是硫酸铜，反应时间为 48~72h，所述的纯化可以用氯仿和石油醚的混合溶剂、乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂、乙醇和水的混合溶剂、氯仿和石油醚的混合溶剂等重结晶，最好是用乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂重结晶；步骤(4)中所述的有机碱可以是吡啶、哌啶或喹林等，最好是喹啉，有机碱的用量为式(7)的化合物摩尔数的 20~25 倍，所述的金属可以是 Fe、Al、Zn 或 Cu 等，最好是 Cu，金属的用量为式(7)的化合物摩尔数的 7.5~8 倍，反应时间是 2~8 小时，所述的纯化可以采用常用的载体进行柱层析，例如用体积比 1:4~1:10 的乙酸乙酯-石油醚为洗脱剂的柱层析分离方法或质量为待分离混合物质量的 30~50 倍的硅胶为载体进行柱层析等。

采用常规的 Wittig 反应制备式(2)的化合物，实验条件苛刻，成本高，产物为几乎等量的顺反式混合物，需进一步分离，因此收率低。而采用本发明的制备方法所用原料价廉易得，均属国内工业化原料，产物收率高。

用于抗肿瘤、抗血管增生的药物组合物，其中含有治疗有效量权利要求 1 所述化合物和一种或一种以上药学上可接受的载体。

本发明的式(1)的化合物可经口或不经口给药。经口服给药时，首先使该化合物与常规的药学上可接受的载体如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等混合，将其制成颗粒剂、胶囊、片剂等形式给药；非经口给药时可以注射液、输液剂或栓剂等形式给药。制备上述制剂时，可使用常规的制剂技术。

实验证明本发明式(1)的化合物可以用于肿瘤防治或辅助传统肿瘤药物治疗；也可以用于抗血管增生。

本发明的(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐不但对多种肿瘤细胞株的生长显示良好的抑制活性，而且还能与肿瘤血管内皮细胞中的微管蛋白结合，抑制其聚合、阻止有丝分裂，导致为肿瘤供应氧气及养分的血管堵塞，发挥靶向抗血管作用，使肿瘤细胞因缺血而死亡。另外通过人脐带静脉内皮细胞形态学试验证实其在较低浓度下可使异常增殖的内皮细胞发生形态学改变而脱落。因此，本发明的(Z)-3'-羟基-3,4',5-三甲氧基二苯乙烯的水溶性磷酸酯盐可用于制备治疗及辅助治疗癌症的药物和制备治疗血管增生类疾病的药物，如用于制备治疗癌症、血管瘤、声带神经瘤、纤维神经瘤、血管纤维瘤、沙眼、

化脓的肉芽瘤、结膜的毛细管扩张、牛皮癣、硬皮病、动脉硬化、风湿性关节炎、科隆氏症、子宫内膜异位症、肥胖症、糖尿病视网膜病变、血管增生性青光眼、早产儿视网膜病变、晶体后组织增生症、肉芽肿病、蛛状痔、遗传出血性毛细血管扩张、血管性血友病等药物。所以本发明的化合物具有良好的社会和经济价值。

本发明的制备方法操作简单，成本低，反应条件温和，收率高，后处理简单，采用环保的溶剂，环境污染小。

具体实施方式：

下列实施例是对本发明的进一步说明，但本发明不限于以下实施例。

实施例 1：

取对甲氧基苯乙酸（即式（3）的化合物）30.0g（0.18 mol）于三口烧瓶中，另加 60mL（1.05mol）冰醋酸溶解，然后滴加 9.5 mL 的溴（0.18 mol），45 min 滴完，再在冰浴下搅拌 1.5 小时，倒入冰水中，析出固体，过滤，干燥，制得产物 41.0 g，收率为 92.6%，用乙醇-水重结晶得到白色片状晶体，收率 70%，测得熔点为 113~114 °C（3-溴-4-甲氧基-苯乙酸的文献值为 114~115 °C），MS_n/z (%) : 244, 246（典型溴同位素峰），因此证实产物是 3-溴-4-甲氧基-苯乙酸（即式（4）的化合物）。

取制得的 3-溴-4-甲氧基苯乙酸 15.0g（0.06 mol），另称取 3, 5-二甲氧基苯甲醛（即式（5）的化合物）10.2g（0.06mol）加入反应瓶中，用 45.3 mL（0.48mol）醋酐溶解，滴加 12.5mL（0.09mol）的三乙胺，加热至 115°C，反应 6 小时。用浓盐酸酸化处理后倒入冰水中析出固体，所得固体用 NaOH 溶液溶解，乙酸乙酯萃取除去杂质，后酸化水层得淡黄色固体，干燥称重得 22.7g，收率为 94.3%；用乙醇重结晶得 20.4 g 淡黄色晶体，收率为 84.8%。测得熔点为 188~190°C，MS_n/z (%) : 393(M⁺)，¹H-NMR(CDCl₃) : 3.56 (s, 6H, 2×OMe), 3.89 (s, 3H, OMe), 6.26 (d, 2H, J=2.0Hz), 6.35 (t, 2H, J=2.0Hz), 6.89~6.91 (d, 1H, J_{AB}=8.4Hz), 7.14~7.16 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.47 (d, 1H, J=2.0Hz), 7.83 (s, 1H)。证实是 3-(3, 4, 5-三甲氧基苯基)-2-(3'-溴-4'-甲氧基苯基)-丙烯酸，即式（6）的化合物。

将 8.0g（0.02 mol）式（6）的化合物，62.0g（1.55mol）NaOH，4.8g（0.03mol）的 CuSO₄ 加入装有冷凝管的两口烧瓶中，加入 350mL 去离子水溶解，搅拌并加热至 110°C（浴温），反应 72h，反应完后过滤，用浓盐酸酸化，待固体全部析出后过滤，乙酸乙酯-石油醚重结晶，得淡黄色固体 4.4g，收率 65.5%，测得熔点为 178~191°C，MS_n/z (%) : 330(M⁺)，¹H-NMR(CDCl₃) : 3.56 (s, 6H, 2×OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 6.28~6.29 (d, 2H, J=2.0Hz), 6.33~6.34 (t, 1H, J=2.0Hz), 6.71~6.74 (d, 1H, J_{AB}=8.4Hz), 6.83~6.84 (d, 1H, J=8.4Hz), 6.87 (s, 1H), 7.80 (s, 1H)。证实是式（7）的化合物。

将式（7）的化合物 6.6g（0.02mol），Cu 粉 9.9 (0.15mol)g，喹啉 47.3mL(0.40mol)，

在 210℃下搅拌反应 8 小时。反应完成后常压过滤，用乙酸乙酯洗涤反应瓶和滤纸，滤液再用稀盐酸洗涤，有机层用硫酸镁干燥，浓缩得到深色油状液体。使用柱层析的方法进行纯化，洗脱剂为体积比 10:1 的石油醚-乙酸乙酯。分得白色晶体 3.0g，收率为 52.4%。经分析证实是式 (2) 的化合物，分析数据如下：Mp: 91~93℃, MS_{m/z} (%) : 286 (M⁺). ¹H-NMR (CDCl₃) : 3.66 (s, 6H, 2×OMe), 3.84 (s, 3H, OMe), 6.30 (s, 1H), 6.43 (s, 2H, J=4.0Hz), 6.42~6.45 (m, 2H, J_{AB}=8.0Hz), 6.68~6.70 (d, 1H, J=8.0Hz), 6.75~6.76 (d, 1H, J=8.0Hz), 6.87 (s, 1H)。

取式 (2) 的化合物 1.5g (0.005mol) 溶于 6mL (0.094mol) CH₂Cl₂ 中，然后加入 POCl₃, 2.6mL (0.028mol) 搅拌均匀。慢慢滴加 6mL (0.094mol) CH₂Cl₂ 溶解的 3.3mL (0.024mol) 三乙胺，室温下搅拌反应 6h。反应结束后用水洗涤多次，直至呈现弱酸性 pH 为 6~7 为止。有机层用无水硫酸镁干燥后，浓缩得黄色油状液体。向浓缩液中加入质量分数约为 1% 的 NaOH 溶液 30mL (0.01mol)，水浴加热至 70~80℃，剧烈搅拌反应 8h。反应液滤去不溶物，浓缩至干，用水-丙酮重结晶，得到白色固体 1.8g，收率为 87.8%。经分析证实是式 (1) 的化合物，其中 M 表示 Na⁺。分析数据如下：Mp: 236~238℃. FAB-MS_{m/z} (%) : 410 (M⁺). ¹H-NMR (CDCl₃) : 3.59 (s, 6H, 2×OMe), 3.73 (s, 3H, OMe), 6.32 (s, 1H), 6.44 (s, 2H), 6.41~6.45 (d, 1H, J=12.0Hz), 6.55~6.58 (d, 1H, J=12.0Hz), 6.69 (d, 1H, J=4.0Hz), 6.76 (d, 1H, J=4.0Hz), 7.28 (s, 1H)。

实施例 2：

取对甲氧基苯乙酸（即式 (3) 的化合物）16.6g (0.10 mol) 于三口烧瓶中，另加 46 mL (0.80mol) 冰醋酸溶解，然后滴加 5.1 mL 的溴 (0.10 mol)，45 min 滴完，再在冰浴下搅拌 3 小时，倒入冰水中，析出固体，过滤，干燥，制得产物 21.8 g，收率为 89.0%，用乙醇重结晶得到白色片状晶体，收率 74 %，测得熔点为 113~114 ℃ (3-溴-4-甲氧基-苯乙酸的文献值为 114~115 ℃)。因此证实产物是 3-溴-4-甲氧基-苯乙酸（即式 (4) 的化合物）。

称取制得的 3-溴-4-甲氧基苯乙酸 15.0 g (0.06 mol)，另称取 3, 5-二甲氧基苯甲醛 10.2 g (0.06 mol) 加入反应瓶中，用 56.7 mL (0.60mol) 醋酐溶解，滴加 16.6mL (0.12mol) 的三乙胺，加热至 120 ℃，反应 8 小时。用浓盐酸酸化处理后倒入冰水中析出固体，所得固体用 NaOH 溶液溶解，乙酸乙酯萃取除去杂质，后酸化水层得淡黄色固体，干燥称重得 21.4g，收率为 90.7 %；用丙酮-石油醚重结晶得 18.4 g 淡黄色晶体的 3-(3, 4, 5-三甲氧基苯基)-2-(3' -溴-4' -甲氧基苯基)-丙烯酸，收率为 78.0 %。

将 10.0 g (0.025 mol) 式 (6) 的化合物，84.0g (1.50mol) 的 KOH 固体，3.4g (0.025mol) 的 CuCl₂ 加入装有冷凝管的两口烧瓶中，加入 350 mL 去离子水溶解，搅拌并加热至 100℃ (浴温)，反应 48h，反应完后过滤，用浓盐酸酸化，待固体全部析出后过滤，氯仿-石油醚重结晶，得淡黄色固体的式 (7) 的化合物 5.0g，收率 60.6%。

将式 (7) 的化合物 6.6g (0.02mol)，Fe 粉 8.9 g (0.16mol)，吡啶 40mL (0.50mol)，在

回流状态下搅拌反应 2 小时。反应完成后常压过滤，用乙酸乙酯洗涤反应瓶和滤纸，滤液再用稀盐酸洗涤，有机层用硫酸镁干燥，浓缩得到深色油状液体。使用柱层析的方法进行纯化，洗脱剂为体积比 4:1 的石油醚-乙酸乙酯。分得浅黄色固体 3.4g，收率为 59.4%。

取上一步得到的浅黄色固体 1.5g(0.005mol)溶于 6.4mL(0.10mol)CH₂Cl₂中，然后加入 POBr₃ 4.1mL(0.04mol)搅拌均匀。慢慢滴加 6.4mL(0.10mol)CH₂Cl₂溶解的 3.2mL(0.04mol)吡啶，室温下搅拌反应 2h。反应结束后用水洗涤多次，直至呈现弱酸性 pH 为 6~7 为止。有机层用无水硫酸镁干燥后，浓缩得黄色油状液体。向浓缩液中加入质量分数约为 1% 的 NaOH 溶液 30mL，水浴加热至 100℃，剧烈搅拌反应 15h。反应液滤去不溶物，浓缩至干，用甲醇-丙酮重结晶，得到白色固体 1.5g，即式（1）的化合物，其中 M 表示 Na⁺，收率为 73.2%。

实施例 3：

式（2）的化合物的制备同实施例 1。

取式（2）的化合物 1.5g(0.005mol)溶于 6mL(0.094mol)CH₂Cl₂中，然后加入 (C₂H₅O)₂P(O)Cl 3.6mL(0.025mol)搅拌均匀。慢慢滴加 6mL(0.094mol)CH₂Cl₂溶解的 1.4mL(0.02mol)三甲胺，室温下搅拌反应 8h。反应结束后用水洗涤多次，直至呈现弱酸性 pH 为 6~7 为止。有机层用无水硫酸镁干燥后，浓缩得黄色油状液体。向浓缩液中加入 KOH 溶液 30mL(0.01mol)，水浴加热至 50℃，剧烈搅拌反应 6h。反应液滤去不溶物，浓缩至干，用水-甲醇重结晶，得到白色固体 1.8g，即式（1）的化合物，其中 M 表示 K⁺，收率为 81.4%。

实施例 4：

式（2）的化合物的制备同实施例 1。

取式（2）的化合物 1.5g(0.005mol)溶于 6mL(0.075mol)二氯乙烷中，然后加入 POCl₃ 2.6mL(0.028mol)搅拌均匀。慢慢滴加 6mL(0.075mol)CH₂Cl₂溶解的 3.3mL(0.024mol)三乙胺，室温下搅拌反应 4h。反应结束后用水洗涤多次，直至呈现弱酸性 pH 为 6~7 为止。有机层用无水硫酸镁干燥后，浓缩得黄色油状液体。向浓缩液中加入的氨水溶液 30mL(0.01mol)，水浴加热至 70~80℃，剧烈搅拌反应 6h。反应液滤去不溶物，浓缩至干，用水重结晶，得到白色固体 1.4g，即式（1）的化合物，其中 M 表示 NH₄⁺，收率为 70%。

实施例 5：体外抗肿瘤细胞增殖活性筛选——体外噻唑蓝 (MTT) 法

取处于对数生长期的 CNE-2 人低分化鼻咽癌细胞、KB-3-1 人口腔鳞癌细胞、MCF-7 人乳腺癌细胞、MGC803 人胃癌细胞、LoVo 人结肠癌细胞、HepG2 人肝癌细胞、HL-60 人急性早幼粒白血病细胞、Jurkat 人淋巴瘤细胞、Ramos 人淋巴瘤细胞、293 人胚肾细胞分别制备为细胞悬液，细胞密度约 2×10⁵/mL，加入 96 孔板中，每孔细胞数约 2000。待细胞贴壁后，将实施例 1 得到的式（1）的化合物按终浓度倍比稀释加入各自组中，每组为 4 个平行孔，设定 0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 为溶剂对照。加药后仍置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 72 h。

实验终止前 4 h 每孔加入 20 μ L 的 5mg/mL 的 MTT 溶液，再培养 4 h，测定前彻底弃去培养液部分，每孔加入 200 μ L DMSO，常温下振荡 10min，待生成的紫色结晶完全溶解后，使用 MULTISKAN 酶标仪在 570nm/630nm 双波长测定每孔 OD 值，数值利用下式计算求出细胞增殖抑制率 (IR)： $IR = 1 - OD_r/OD_c$ ，(OD_c : 对照组 OD 值, OD_r : 用药组 OD 值)，再利用 Bliss 法计算 IC_{50} 。结果是 CNE-2 的 IC_{50} (nM) = 31.61 ± 5.97, MGC803 的 IC_{50} (nM) = 414.08 ± 46.90, MCF-7 的 IC_{50} (nM) = 57.70 ± 6.04, HepG2 的 IC_{50} (nM) = 43.04 ± 2.55, LoVo 的 IC_{50} (nM) = 38.99 ± 3.22, HL-60 的 IC_{50} (nM) = 14.33 ± 5.70。

实施例 6：HUVEC 脱落实验

以人体脐带静脉内皮细胞(HUVECs)为模型进行活性测试。将 HUVECs 涂布于 12 孔的均已涂有 0.2% 的明胶的板上，每孔细胞数为 3×10^4 。24h 后，当细胞约有 30% 融合时，则使用不同浓度的待测药物(即实施例 1 得到的式(1)的化合物)进行处理 40min。处理之后，细胞脱落情况通过计数除去测试药物后的未脱落细胞来衡量，去除测试药物及溶剂的方法是用 HBSS 小心的清洗细胞以除去脱落的细胞，然后使胰蛋白酶化，便可计数未脱落细胞数。结果由脱落细胞百分率表示，结果均在误差范围内。结果浓度 0.01 μ mol/L 的式(1)的化合物对人体脐带静脉内皮细胞的细胞脱落百分数为 12%，浓度 0.1 μ mol/L 的细胞脱落百分数为 20%，浓度 1 μ mol/L 的细胞脱落百分数为 22%。

实施例 7：微管蛋白结合抑制实验

试验方法是先在 37℃ 的条件下将不同浓度的式(1)的化合物注入微管中，然后反应液用冰冷冻。加入 GTP，使用装有电子控温设备的 300nm Gliford 红外光谱记录仪以浊度测试聚合情况。注入 20min 后可以确定聚合程度。化合物测试每次平行进行三组，得到统计平均值。

实验的结果为：式(1)的化合物的 $IC_{50}=8 \mu\text{mol/L}$ 。

实施例 8：

将 86.5g 式(1)的化合物的晶体粉末与 1g 葡萄糖、10g 玉米淀粉和 1.5g 5% 玉米淀粉糊相混合均匀，用湿粒法使混合物形成颗粒。然后加入 1g 硬脂酸镁，通过压片法得到口服剂。

实施例 9：

3.2mg 式(1)的化合物的白色粉末，加入 1.6mL 的生理盐水中形成溶液。