



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106397439 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610814140.1

(22)申请日 2016.09.11

(71)申请人 兰州大学

地址 730000 甘肃省兰州市天水南路222号

(72)发明人 刘映前 王美娟 宋子龙 杨茜茹

成丕乐 赵永龙 陈海乐 李俊采

(74)专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任  
公司 62102

代理人 张晋

(51) Int. Cl.

C07D 471/22(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

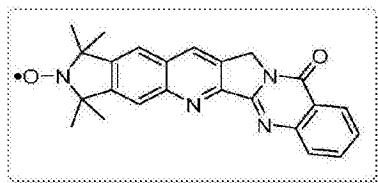
权利要求书2页 说明书7页

## (54)发明名称

一种自旋标记骆驼宁碱A化合物、制备方法及其用途

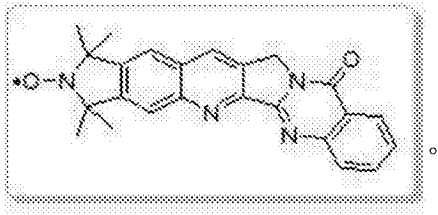
## (57)摘要

本发明公开如式(I)所示的一种自旋标记骆驼宁碱A化合物,以及这种化合物的制备方法和其在制备抗肿瘤药物中的用途。经体外抗肿瘤活性筛选结果表明,与骆驼宁碱A相比,本发明所合成的自旋标记骆驼宁碱A化合物对人肺腺癌细胞(A549)、人乳腺癌细胞株(MDA-MB-468)、人卵巢癌细胞(SKOV3)和人结肠癌细株(HCT 116)表现出较强的抑制活性,具有很好的应用前景。



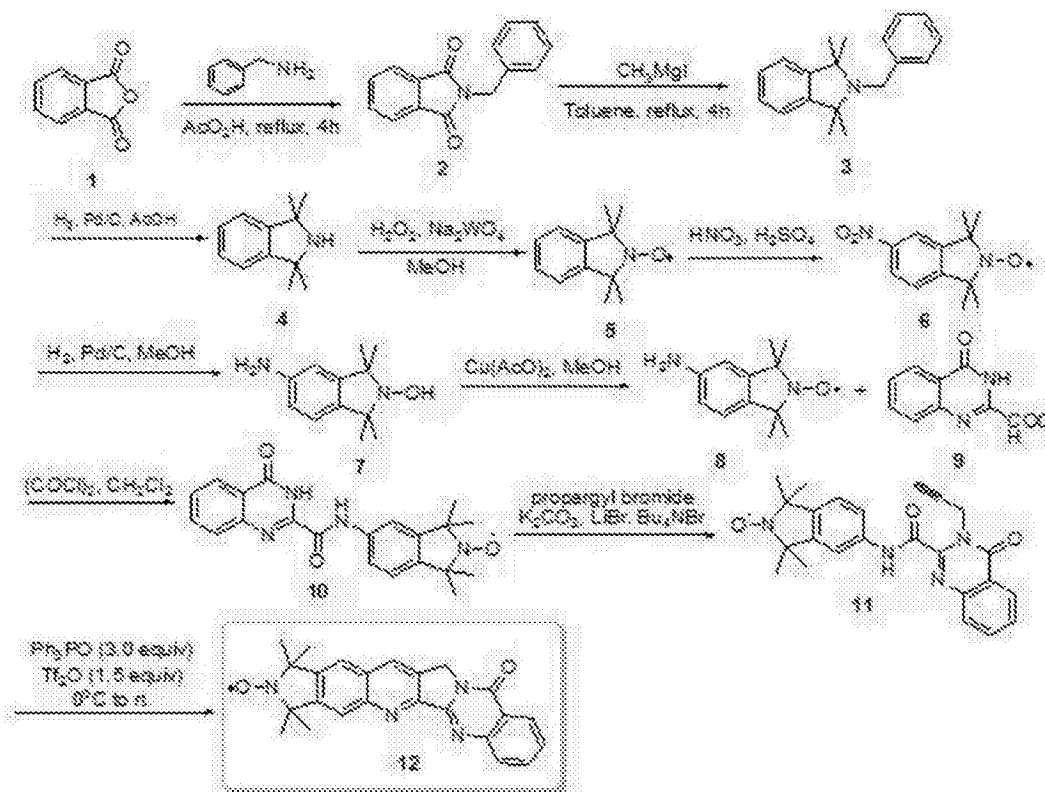
(I)

## 1. 如式 (I) 所示的自旋标记骆驼宁碱A化合物



(I)

## 2. 权利要求1所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物制备方法, 其特征在于如反应式 (II) 所示,



(II)

即将邻苯二甲酸酐1和苄胺溶于适量的冰醋酸中, 加热回流获得中间体2, 然后将中间体2溶于适量的二甲苯中, 惰性气体保护下在60~70℃之间下在前述液体中缓慢加入甲基碘化镁, 再将反应液逐渐加热至165℃~180℃回流反应2小时, 反应结束后在此温度下减压蒸除大部分溶剂, 然后冷却至室温, 向其中加入大量石油醚得浑浊液, 将其通过硅藻土抽滤, 收集所有滤液, 将滤液置于空气中24小时后再用碱性氧化铝进行层析, 经浓缩后得到产物3, 再在产物3中加入20~30毫升的冰醋酸使其溶解, 然后加入10%的钯碳, 搅拌均匀后将反应体系在4个大气压的惰性气体保护下进行充分反应, 将反应液固液分离后浓缩得到淡黄色中间产品4, 将中间体4溶于50毫升的甲醇/乙腈=14/1(体积比)中, 然后依次加入碳酸氢钠(15eq), 二水合钨酸钠(0.55eq), 最后加入30%(体积比)的双氧水溶液, 此浑浊反应液在常温下充分搅拌反应, 反应结束后加入少量水淬灭反应, 除去溶剂, 加入适量的水和1N的硫酸溶液进行萃取, 合并有机相, 以硫酸镁干燥过滤后, 减压浓缩后得到黄色产品5, 在冰

浴条件下在中间体5中缓慢,将加入浓硫酸并搅拌,在冰浴条件下搅拌30分钟后将其置于60℃的油浴中反应20分钟,然后再将其置于冰浴中,将发烟硝酸逐滴加入到上述溶液中,滴加完毕后,在冰浴条件下搅拌反应30分钟后再常温下搅拌过夜,次日,将此橘红色反应液加热至100℃反应20分钟,然后置于冰浴中,将10% (质量比) 的氢氧化钠溶液缓慢加入其中调节pH值至8左右,用氯仿将其进行萃取,合并有机相,以硫酸镁干燥后过滤,减压浓缩得黄色固体6,将中间体6用甲醇溶解,再在其中加入10%的干钨碳,搅拌均匀,用氢气加压至1个大气压,搅拌反应6小时,反应结束后过滤,减压浓缩滤液得到黄色固体7,再将中间体7溶于甲醇中,然后加入醋酸铜醋酸铜(0.128eq),常温下搅拌反应3小时,反应结束后用氯仿淬灭反应,浓缩后得固体残渣,以石油醚/乙酸乙酯为洗脱剂经柱层析得到淡黄色的固体纯品8,将化合物9先溶于干燥的二氯甲烷当中,加入催化量的DMF,然后将草酰氯溶于30~50毫升的干燥二氯甲烷中,冰浴条件下以缓慢滴将其滴入上述反应液中,反应1.5小时后将反应液减压浓缩得固体结晶,将其再溶于干燥二氯甲烷中,并在冰浴条件下缓慢滴入含中间体8(1.5eq)、碳酸氢钠(4.5eq)的30~50毫升干燥二氯甲烷溶液中反应,反应结束后加入水淬灭反应,并用氯仿萃取反应液,合并有机相,以硫酸镁干燥过滤后减压浓缩得固体残渣,以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到黄色固体产品10,将产物10(3.6mmol)溶于甲苯(50mL)和水(0.2mL)中,然后依次加入碳酸钾(7.2mmol),溴化锂(7.2mmol),TBAB(0.4mmol),溴丙炔(5.7mmol),然后将反应升温至80℃充分反应,反应结束后将反应液减压浓缩的固体残渣,以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到橘黄色固体产品11,将三苯基氧磷(2.75eq)溶于30~50毫升干燥二氯甲烷中,在冰浴条件下将三氟甲磺酸酐(1.38eq)溶于30~50毫升的干燥二氯甲烷中,再将溶有三氟甲磺酸酐的二氯甲烷缓慢地滴加进入溶有三苯基氧磷的二氯甲烷溶液,在零摄氏度下搅拌反应30分钟,将中间体11溶于30~50毫升的干燥二氯甲烷中,在冰浴条件下将其缓慢滴加到三氟甲磺酸酐的二氯甲烷溶液中,搅拌并充分反应,反应完毕后加入10% (体积比) 的碳酸氢钠水溶液淬灭反应,减压浓缩后得固体残渣,以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到橘黄色目标化合物12。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于层析用硅胶柱采用200~300目的柱层析用硅胶。

4. 根据权利要求1所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物用于制备抗肿瘤药物。

5. 根据权利要求1所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物在制备治疗人肺腺癌的药物中的应用。

6. 根据权利要求1所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物在制备治疗人乳腺癌的药物中的应用。

7. 根据权利要求1所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物在制备治疗人卵巢癌细胞的药物中的应用。

8. 根据权利要求1所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物在制备治疗人结肠癌细的药物中的应用。

## 一种自旋标记骆驼宁碱A化合物、制备方法及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种自旋标记骆驼宁碱A化合物,以及这种化合物的制备方法和其在制备抗肿瘤药物中的用途。属于医药领域。

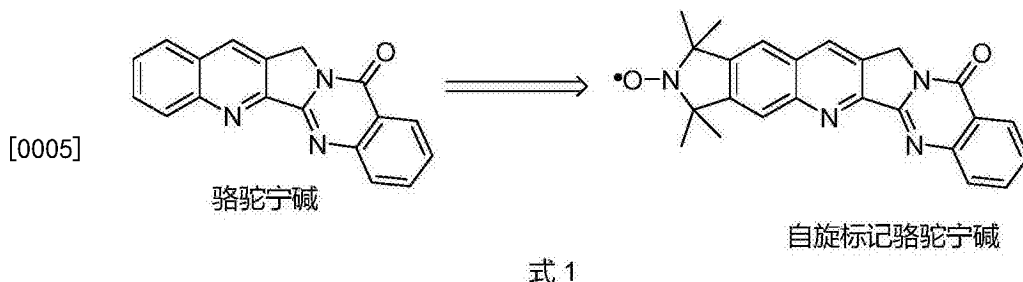
### 背景技术

[0002] 骆驼宁碱A是1997年从中国药用植物骆驼蒿 (*Peganum nigellastrum* Bunge.) 中分离出的一种天然喹唑啉类生物碱。科研工作者对骆驼宁碱A的关注,主要是因为发现骆驼宁碱A与具有抗癌活性的喜树碱有类似的化学结构,而且在体外对小鼠肿瘤细胞P388细胞系有抑制作用 ( $IC_{50} 1.8 \mu\text{g/mL}$ ), 并证明了它有类似喜树碱的抑制拓扑异构酶I活性 ((1) *Molecules*, 2011, 16, 4861-4883)。基于此,近年来科研工作者以骆驼宁碱A为先导模型,系统开展了骆驼宁碱A及其衍生物的全合成、结构优化以及抗肿瘤活性评价研究 ((1) *Org. Biomol. Chem.*, 2007, 5, 2486-2490; (2) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15, 4237-4246; (3) *Tetrahedron Letters*, 2011, 52, 1592-1596; (4) *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 6721-6723; (5) *Tetrahedron Letters*, 1998, 39, 9097-9098)。尽管近年来科研工作者在骆驼宁碱的衍生合成和抗肿瘤构效关系做了大量的研究工作,然而骆驼宁碱A作为一个抗肿瘤先导分子,仍存在抗肿瘤活性低和活性谱窄的问题,甚至经衍生与结构修饰后,衍生物抗肿瘤活性得不到有效改善或完全丧失。而截至目前仍未有一个有效的修饰和优化策略来改善该类分子的抗肿瘤效果。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种新的自旋标记骆驼宁碱化合物,同时,本发明的另一目的是提供这种化合物的制备方法及其在抗肿瘤药物中的用途。

[0004] 本发明所述的一种新的自旋标记骆驼宁碱化合物具有式1所示的化学结构,记为自旋标记骆驼宁碱A化合物:

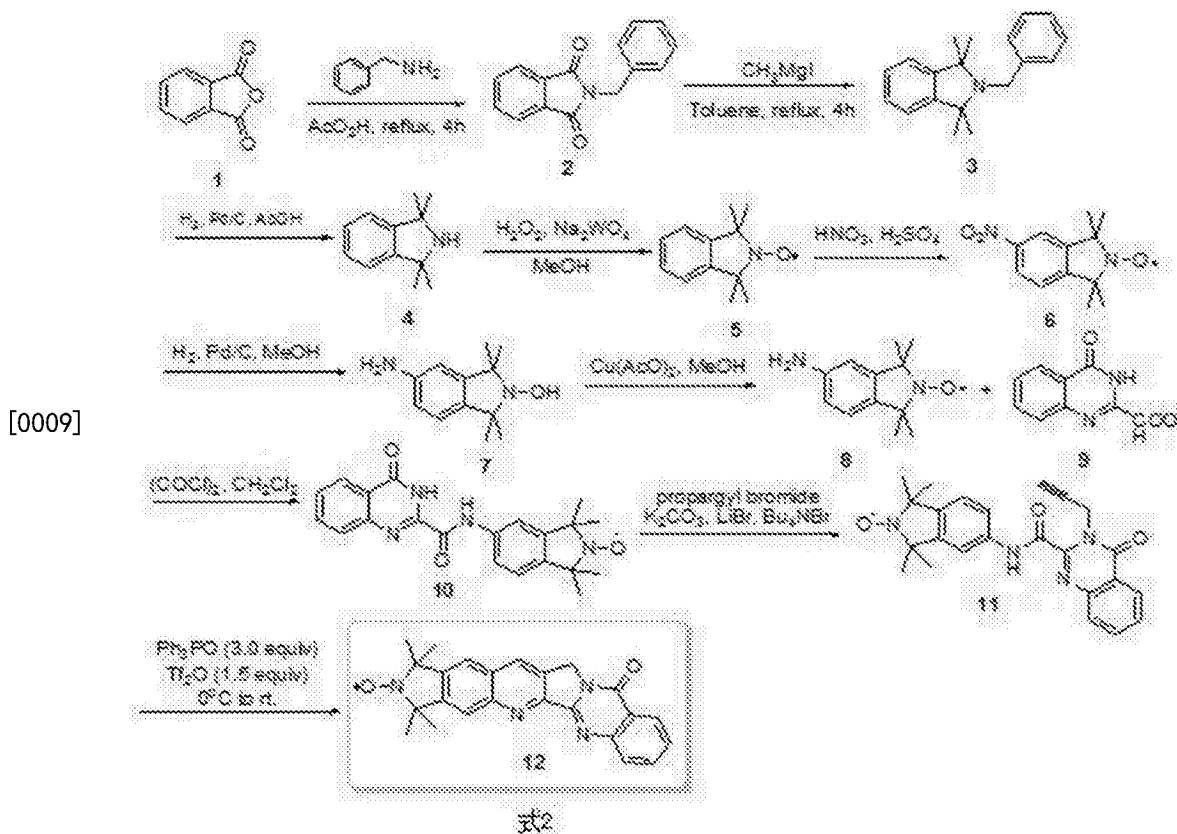


[0006] 近年来,大量实验证实了稳定氮氧自由基具有明确的抗肿瘤活性,在体内外对多种肿瘤具有选择性抑制作用,能增加化疗和放疗效果并降低其副作用,最令人鼓舞的是应用稳定氮氧自由基能够长期预防和延缓肿瘤的发生而无明显副作用,被认为是最具临床应用潜力的领域 ((1) *J. Heterocyclic Chem.* 2005, 42, 437~449; (2) *Free Radic. Biol. & Med.* 2007, 42, 1632~1650.)。特别是将稳定氮氧自由基标记于抗肿瘤药物分子中以改善其药效学特性成为其优化设计抗肿瘤药物的一种重要策略 (*Pure & Appl. Chem.* 1990, 62, 289~

294.)。稳定氮氧自由基标记(或称为自旋标记)的噻替哌、亚硝基脲、氮芥、顺铂类烷化剂(Acta Pharm.Sin.1988,23,792~798);鬼臼毒素类似物((1)Anticancer Drug Des.1993,8,193~202;(2)Europ.J.Med.Chem.2014,75,282~288)、5-氟脲嘧啶(高等学校化学学报,1992,13,1561~1563.)、阿霉素(高等学校化学学报,2000,21,884~887)、鱼藤酮(Bioorg.Med.Chem.Lett.2012,22,920~923)以及CA-4(Bioorg.Med.Chem.2013,21,1248~1256)等抗肿瘤分子被大量衍生合成,其药理活性评价表明:一些稳定氮氧自由基能迅速穿越细胞膜和血脑屏障,将其作为载体与一些抗癌药物相连,能促使运载药物优先穿过细胞膜,易于积累于肿瘤组织中,从而使其药物的抗癌活性保持甚至增加,使母体药物能更好发挥抗肿瘤活性。

[0007] 据此,为了提高骆驼宁碱A的抗肿瘤活性,以现有骆驼宁碱A的抗肿瘤构效关系为线索,本发明在保留骆驼宁碱A先导结构所具有的生物相容性和类药性基础上,通过全合成设计了一种“嵌合”型的自旋标记骆驼宁碱A化合物,经进一步评价实验表明本发明的这种化合物对人肺腺癌细胞(A549)、人乳腺癌细胞株(MDA-MB-468)、人卵巢癌细胞(SKOV3)和人结肠癌细株(HCT 116)4种肿瘤细胞株具有理想的抑制活性。

[0008] 本发明制备方法按如下化学反应式进行:



[0010] 自旋标记骆驼宁碱化合物制备方法如反应式2所示,即将邻苯二甲酸酐1和苄胺溶于适量的冰醋酸中,加热回流获得中间体2,然后将中间体2溶于适量的二甲苯中,惰性气体保护下在60~70℃之间下在前述液体中缓慢加入甲基碘化镁,再将反应液逐渐加热至165℃~180℃回流反应2小时,反应结束后在此温度下减压蒸除大部分溶剂,然后冷却至室温,向其中加入大量石油醚得浑浊液,将其通过硅藻土抽滤,收集所有滤液,将滤液置于空气中24小时后再用碱性氧化铝进行层析,经浓缩后得到产物3,再在产物3中加入20~30毫升的

冰醋酸使其溶解,然后加入10%的钨碳,搅拌均匀后将反应体系在4个大气压的惰性气体保护下进行充分反应,将反应液固液分离后浓缩得到淡黄色中间产品4,将中间体4溶于50毫升的甲醇/乙腈=14/1(体积比)中,然后依次加入碳酸氢钠(15eq),二水合钨酸钠(0.55eq),最后加入30%(体积比)的双氧水溶液,此浑浊反应液在常温下充分搅拌反应,反应结束后加入少量水淬灭反应,除去溶剂,加入适量的水和1N的硫酸溶液进行萃取,合并有机相,以硫酸镁干燥过滤后,减压浓缩后得到黄色产品5,在冰浴条件下在中间体5中缓慢,将加入浓硫酸并搅拌,在冰浴条件下搅拌30分钟后将其置于60℃的油浴中反应20分钟,然后再将其置于冰浴中,将发烟硝酸逐滴加入到上述溶液中,滴加完毕后,在冰浴条件下搅拌反应30分钟后再常温下搅拌过夜,次日,将此橘红色反应液加热至100℃反应20分钟,然后置于冰浴中,将10%(质量比)的氢氧化钠溶液缓慢加入其中调节pH值至8左右,用氯仿将其进行萃取,合并有机相,以硫酸镁干燥后过滤,减压浓缩得黄色固体6,将中间体6用甲醇溶解,再在其中加入10%的干钨碳,搅拌均匀,用氢气加压至1个大气压,搅拌反应6小时,反应结束后过滤,减压浓缩滤液得到黄色固体7,再将中间体7溶于甲醇中,然后加入醋酸铜醋酸铜(0.128eq),常温下搅拌反应3小时,反应结束后用氯仿淬灭反应,浓缩后得固体残渣,以石油醚/乙酸乙酯为洗脱剂经柱层析得到淡黄色的固体纯品8,将化合物9先溶于干燥的二氯甲烷当中,加入催化量的DMF,然后将草酰氯溶于30~50毫升的干燥二氯甲烷中,冰浴条件下以缓慢滴将其滴入上述反应液中,反应1.5小时后将反应液减压浓缩得固体结晶,将其再溶于干燥二氯甲烷中,并在冰浴条件下缓慢滴入含中间体8(1.5eq)、碳酸氢钠(4.5eq)的30~50毫升干燥二氯甲烷溶液中反应,反应结束后加入水淬灭反应,并用氯仿萃取反应液,合并有机相,以硫酸镁干燥过滤后减压浓缩得固体残渣,以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到黄色固体产品10,将产物10(3.6mmol)溶于甲苯(50mL)和水(0.2mL)中,然后依次加入碳酸钾(7.2mmol),溴化锂(7.2mmol),TBAB(0.4mmol),溴丙炔(5.7mmol),然后将反应升温至80℃充分反应,反应结束后将反应液减压浓缩的固体残渣,以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到橘黄色固体产品11,将三苯基氧膦(2.75eq)溶于30~50毫升干燥二氯甲烷中,在冰浴条件下将三氟甲磺酸酐(1.38eq)溶于30~50毫升的干燥二氯甲烷中,再将溶有三氟甲磺酸酐的二氯甲烷缓慢地滴加进入溶有三苯基氧膦的二氯甲烷溶液,在零摄氏度下搅拌反应30分钟,将中间体11溶于30~50毫升的干燥二氯甲烷中,在冰浴条件下将其缓慢滴加到溶有三氟甲磺酸酐的二氯甲烷溶液中,搅拌并充分反应,反应完毕后加入10%(体积比)的碳酸氢钠水溶液淬灭反应,减压浓缩后得固体残渣,以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到橘黄色目标化合物12。

[0011] 经体外抗肿瘤活性筛选结果表明,与骆驼宁碱A相比,本发明所合成的自旋标记骆驼宁碱A化合物对人肺腺癌细胞(A549)、人乳腺癌细胞株(MDA-MB-468)、人卵巢癌细胞(SKOV3)和人结肠癌细株(HCT 116)表现出较强的抑制活性。因此,本发明合成的化合物可用于制备抗肿瘤的药物。本发明所述的自旋标记骆驼宁碱A化合物结构新颖、产品纯度高,对肿瘤细胞表现出较强的抑制作用,具有很好的应用前景。

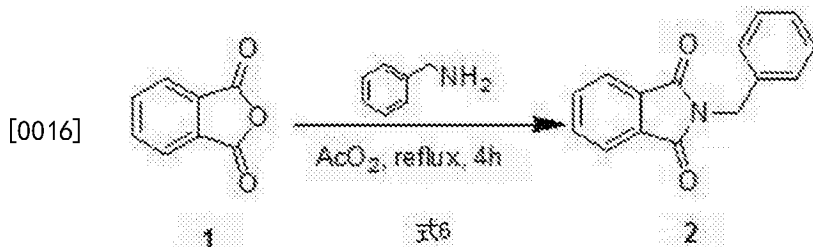
[0012] 以下通过具体实施方式,对本发明的上述内容做进一步的详细说明。但不应将此理解为对本发明的限。

## 具体实施方式

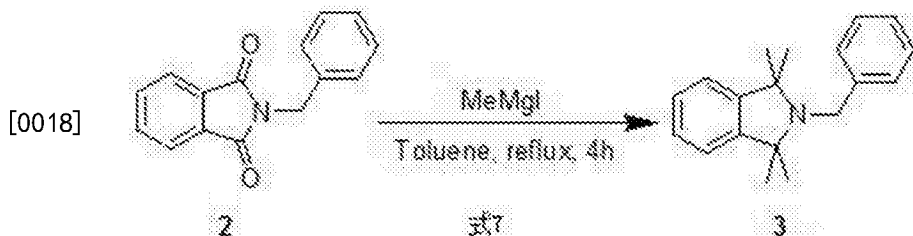
[0013] 一、本发明的自旋标记骆驼宁碱化合物的制备方法

[0014] 以下是本发明的自旋标记骆驼宁碱化合物最佳制备方法：

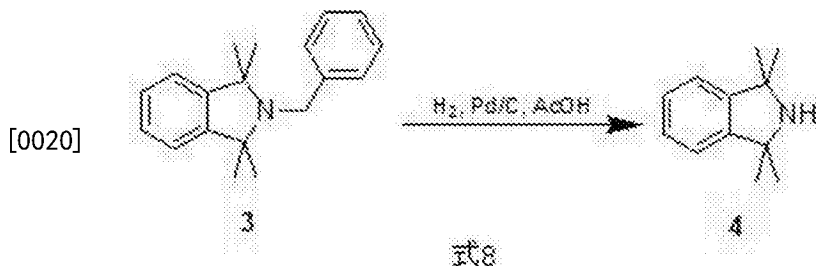
[0015] 1) 中间体2的合成：将邻苯二甲酸酐 (1.69eq) 置于适量的冰醋酸中，然后将苄胺 (2.3eq) 缓慢的加入其中。将此混合物加热回流反应5小时后，将热的反应液直接倒入冰水中，出现大量沉淀，抽滤后用冷水将滤饼冲洗几遍，晾干后得化合物2 (参考Chemistry-A European Journal, 2009, 15 (47) :12960-12962)，参见式6。



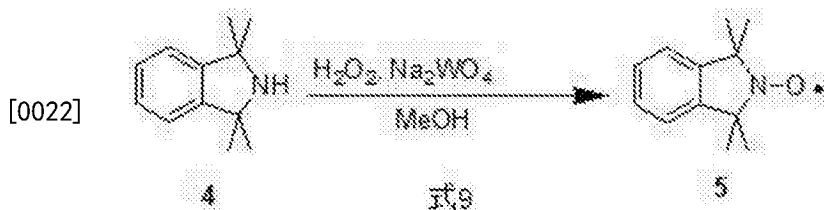
[0017] 2) 中间体3的合成：首先，将整个反应装置抽成真空，并用氩气置换3~5次，然后将甲基碘化镁 (6eq) 用注射器打入圆底烧瓶内，将其加热至90摄氏度，减压抽去溶剂乙醚，直至圆底烧瓶内的液体不再冒泡为止，恢复常压并将其降至60摄氏度。然后将中间体2 (1eq) 溶于适量的二甲苯中，将其用注射器缓慢地打入反应瓶内，保持反应液得温度在60~70摄氏度之间。注射完毕后，将反应液加热至165摄氏度回流反应2小时后，在此温度下减压蒸去一半溶剂；然后将反应温度升至180摄氏度在回流反应2小时，反应结束后在此温度下减压蒸除大部分溶剂，然后冷却至室温，向其中加入大量石油醚得浑浊液，将其通过硅藻土抽滤，并用石油醚冲洗滤饼若干次，收集所有滤液，将滤液置于空气中24小时后，溶液呈现紫罗兰色。将此紫色有机溶剂用碱性氧化铝进行层析，再次收集所有层析后的有机溶剂，减压浓缩后得到最终产品，热的状态下呈无色油状，冷却后呈白色固体结晶3 (参考Chemistry-A European Journal, 2009, 15 (47) :12960-12962)，参见式7。



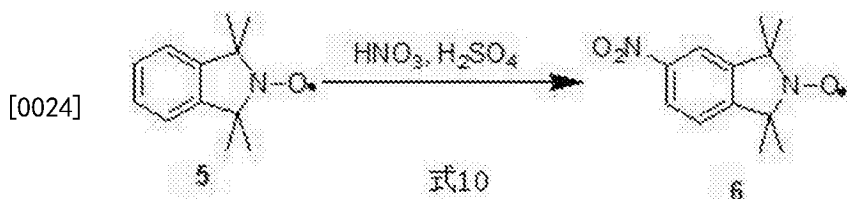
[0019] 3) 中间体4的合成：将中间体3 (621mg) 置于高压釜的内衬中，加入适量冰醋酸使其溶解，然后加入10%的干钯碳 (56.5mg)，搅拌均匀后将高压釜密封，将反应体系内部用氢气置换3~5次，最后将体系内充氢气直到4个大气压为止。反应5小时后，将此反应液过滤，滤饼用二氯甲烷冲洗，将滤液减压浓缩后溶于水中，然后用10%的氢氧化钠溶液调节pH值到9左右，用氯仿萃取3次，合并萃取液，用硫酸镁干燥过滤后，减压浓缩后得到淡黄色产品4 (参考Australian Journal of Chemistry, 1983, 36 (2) :397-401)，参见式8。



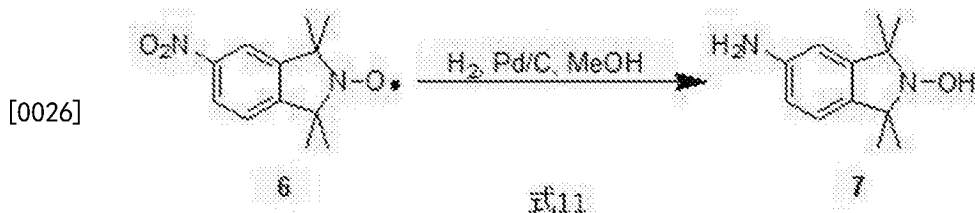
[0021] 4) 中间体5的合成:将中间体4 (18.8eq) 溶于适量的甲醇/乙腈=14/1中,然后依次加入碳酸氢钠 (15eq),二水合钨酸钠 (0.55eq),最后加入30%的双氧水溶液 (62eq),此浑浊反应液在常温下搅拌反应两天,反应结束后加入少量水淬灭反应。减压蒸去溶剂,加入适量的水和1N的硫酸溶液进行萃取,合并有机相,以硫酸镁干燥过滤后,减压浓缩后得到黄色产品5(参考Australian Journal of Chemistry,1983,36 (2):397-401),参见式9。



[0023] 5) 中间体6的合成:将中间体5 (7.07mmol) 置于圆底烧瓶中,在冰浴条件下将浓硫酸 (13.5mL) 缓慢滴入其中并搅拌,此时溶液呈红褐色。在冰浴条件下搅拌半小时左右后将其置于60摄氏度的油浴中反应20分钟,然后再将其置于冰浴中。待其冷却至零摄氏度,将发烟硝酸 (19.1mmol) 逐滴加入到上述溶液中,滴加完毕后,在冰浴条件下搅拌反应30分钟后再常温下搅拌过夜。次日,将此橘红色反应液加热至100摄氏度反应20分钟,然后置于冰浴中,将10%的氢氧化钠溶液缓慢加入其中调节pH值至8左右。用氯仿将其进行萃取,合并有机相,以硫酸镁干燥后过滤,减压浓缩得黄色固体6(参考(1) Australian Journal of Chemistry,1983,36 (2):397-401;(2) Bioconjugate Chemistry,2013,24 (6):1110-1117),参见式10。



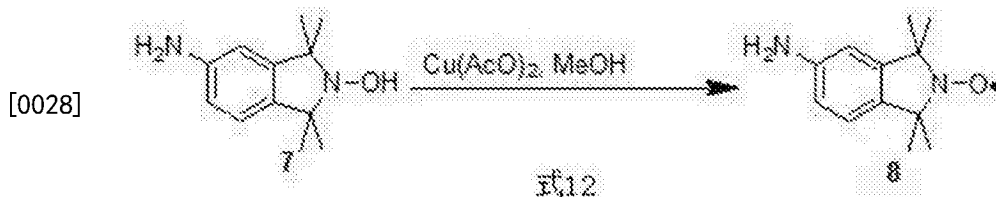
[0025] 6) 中间体7的合成:将中间体6 (6.38mmol) 置于高压釜内衬中并以适量甲醇溶解,加入10%的干钯碳 (150mg),搅拌均匀,用氢气将高压釜内部置换3~5次,最终用氢气加压至1个大气压,搅拌反应6小时。反应结束后过滤,减压浓缩滤液得到黄色固体7(参考Organic&Biomolecular Chemistry,2013,11 (25):4147-4153.),参见式11。



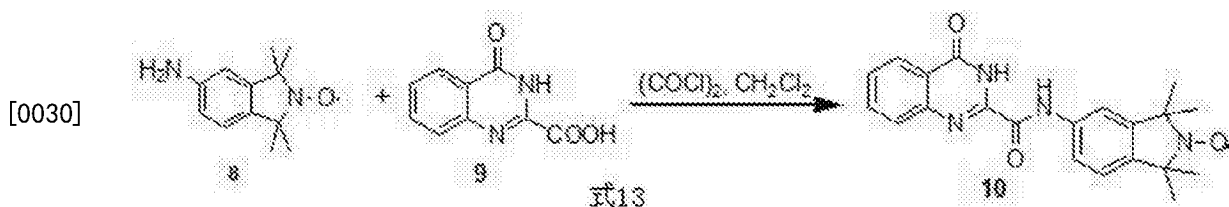
[0027] 7) 中间体8的合成:将中间体7 (6.38eq) 溶于适量的甲醇中,然后加入醋酸铜



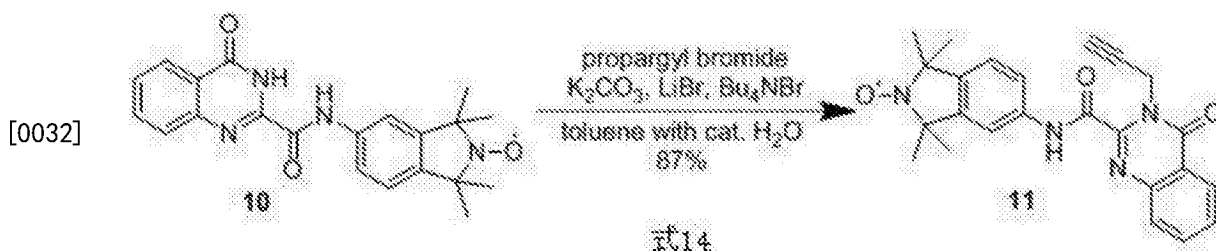
(0.128eq), 常温下搅拌反应3小时。反应结束后用氯仿淬灭反应, 减压浓缩后得固体残渣, 以石油醚/乙酸乙酯为洗脱剂经柱层析得到淡黄色的固体纯品8 (参考(1) *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11 (25): 4147-4153; (2) *Journal of the American Chemical Society*, 1975, 97 (5): 1273-1274), 参见式12。



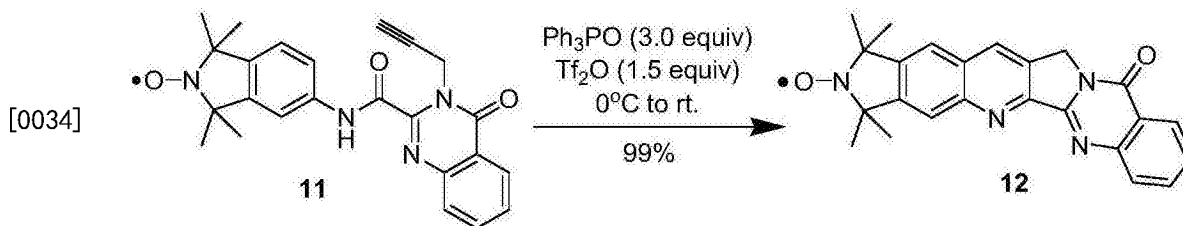
[0029] 8) 中间体10的合成: 将化合物9 (3eq) 先溶于干燥的二氯甲烷当中, 加入催化量的DMF, 然后将草酰氯 (9eq) 溶于适量的干燥二氯甲烷中, 冰浴条件下以恒压漏斗逐滴将其滴入上述反应液中。反应1.5小时后将反应液减压浓缩得固体结晶, 将其再溶于干燥二氯甲烷中, 并将其在冰浴条件下逐滴滴入含中间体8 (1.5eq), 碳酸氢钠 (4.5eq) 的干燥二氯甲烷溶液中。TLC监测反应进程, 反应结束后加入水淬灭反应, 并用氯仿萃取反应液, 合并有机相, 以硫酸镁干燥过滤后减压浓缩得固体残渣, 以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到黄色固体产品10, 参见式13。



[0031] 9) 中间体11的合成: 将中间体10 (3.6mmol) 溶于甲苯 (50mL) 和水 (0.2mL) 中, 然后依次加入碳酸钾 (7.2mmol), 溴化锂 (7.2mmol), TBAB (0.4mmol), 溴丙炔 (5.7mmol), 然后将反应升温至80摄氏度, 反应2小时。反应结束后将反应液减压浓缩的固体残渣, 以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到橘黄色固体产品11, 参见式14。



[0033] 10) 自旋标记的骆驼宁碱12的合成: 将三苯基氧膦 (2.75eq) 溶于干燥的二氯甲烷中, 在冰浴条件下将三氟甲磺酸酐 (1.38eq) 溶于适量的干燥二氯甲烷中并缓慢地滴加进入上述溶液, 在零摄氏度下搅拌反应30分钟。将中间体11 (0.92eq) 溶于适量的干燥二氯甲烷中, 在冰浴条件下将其缓慢滴加进入上述溶液中。TLC监测反应进程, 反应完毕后加入10%的碳酸氢钠水溶液淬灭反应。减压浓缩后得固体残渣, 以氯仿/甲醇为洗脱剂经柱层析纯化得到橘黄色目标化合物12。



[0035] IR (KBr) : 3438, 2982, 1678, 1628, 1609, 1576, 1487, 1468, 1442, 1385, 1367 (NO $\cdot$ ), 1239, 776, 694, 638  $\text{cm}^{-1}$ ; MS-ESI  $m/z$ : 399.2  $[\text{M}+2\text{H}]^+$ ; ESR:  $g=2.0079$ .

[0036] 二、自旋标记骆驼宁碱的抗肿瘤活性的试验方法及结果

[0037] 本发明的药理实验采用磺酰罗丹明B (sulforhodamine B, SRB) 比色法。肿瘤细胞培养选用10%胎牛血清 (FBS) 的RPMI-1640培养基, 将肿瘤细胞接种于96孔板, 每个孔培养  $3-5 \times 10^3$  个细胞, 加入不同浓度的待测试目标化合物溶液。培养72小时后, 每孔加入预冷的三氯乙酸溶液 (50%, w/v) 固定细胞, 冰箱中固定30分钟。待96孔板室温下晾干后, 每孔加入 0.04% (w/v) 的SRB染液 (1%的乙酸配制, 购自Sigma Chemical公司), 染色30分钟后倒掉染液, 用乙酸冲洗4次, 去除未结合的染料, 室温晾干。用100  $\mu\text{L}$  非缓冲Tris-base碱液溶解与细胞蛋白结合的染料, 水平摇床上振荡20分钟, 采用ELx800吸收光酶标仪 (美国Bio-Tek公司生产, 操作软件Gen5) 测定515nm处吸收值。所有试验设3个平行组或重复三次。自旋标记骆驼宁碱 (12) 的细胞毒活性测试结果见表1。

[0038] 表1自旋标记骆驼宁碱A (12) 和骆驼宁碱A的细胞毒活性试验结果

株 编号	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )			
	A-549	MDA-MB-468	SKOV3	HCT 116
自旋标记骆驼宁碱A (12)	$3.309 \pm 0.396$	$7.306 \pm 0.556$	$22.545 \pm 2.206$	$3.566 \pm 0.108$
骆驼宁碱 A	> 50	> 50	> 50	$42.5047 \pm 2.4019$

[0040] 注: (1) 筛选方法: 磺酰罗丹明B比色法; (2) 作用时间: 72小时。

[0041] 对4肿瘤细胞株体外细胞毒活性测试结果显示: 与骆驼宁碱A相比, 本发明所合成的自旋标记骆驼宁碱A化合物对人肺腺癌细胞 (A549) 的抑制活性提高了16倍以上; 对人乳腺癌细胞株 (MDA-MB-468) 的抑制活性提高了7倍以上、对人卵巢癌细胞 (SKOV3) 的抑制活性提高了2倍以上; 对人结肠癌细株 (HCT 116) 的抑制活性提高近14倍, 基于上述活性测试, 进一步说明通过本发明的这种优化策略, 可显著提高骆驼宁碱A的抗肿瘤活性, 为进一步开发高活性自旋标记骆驼宁碱A衍生物提供了理论依据。且本发明所述化合物表现出较好的应用前景。