



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106946888 B

(45)授权公告日 2018.06.01

(21)申请号 201710222048.0

(22)申请日 2017.04.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106946888 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(73)专利权人 福建拓路建设有限公司  
地址 362601 福建省泉州市永春县五里街  
镇真武路前洋小区1-2号店

(72)发明人 冯炎 谢瑞刚 王冬雷

(51)Int.Cl.  
C07D 487/04(2006.01)  
A61K 31/5377(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

US 20060079543 A1,2006.04.13,说明书第

[0025]-[0068]段和附图1-14.

CN 103209960 A,2013.07.17,说明书第  
[0005]-[0421]段.

Mostafa M.Ghorab,et al.,.Synthesis of  
novel pyrrole and pyrrolo[2,3-d]  
pyrimidine derivatives bearing  
sulfonamide moiety for evaluation as  
anticancer and radiosensitizing agents.  
《Bioorganic & Medicinal Chemistry  
Letters》.2010,第20卷第6316-6320页.

宋浩斌等.磺酰胺类抗肿瘤药物研究进展.  
《中国新药杂志》.2009,第18卷(第2期),第108-  
115和122页.

审查员 李伟

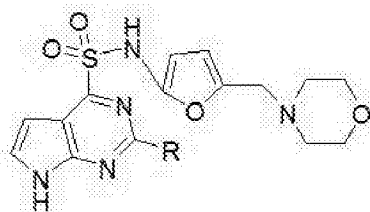
权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种磺酰胺基衍生物及其在制备抗肿瘤药  
物中的用途

(57)摘要

本发明公开了一种磺酰胺基衍生物式(I)及  
其在制备抗肿瘤药物中的用途,

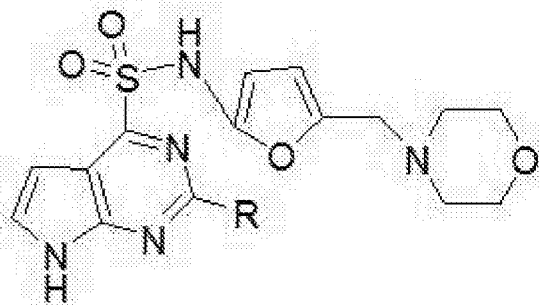


其中,R为-

式(I)

(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>,n=0~6。

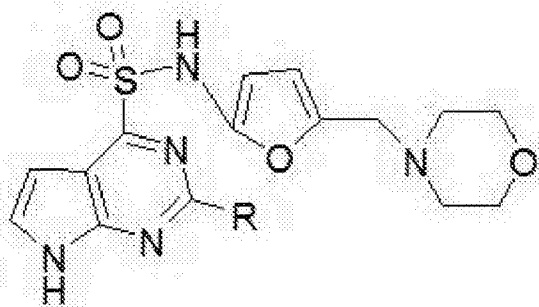
1. 一种磺酰胺基衍生物式(I)



式(I)

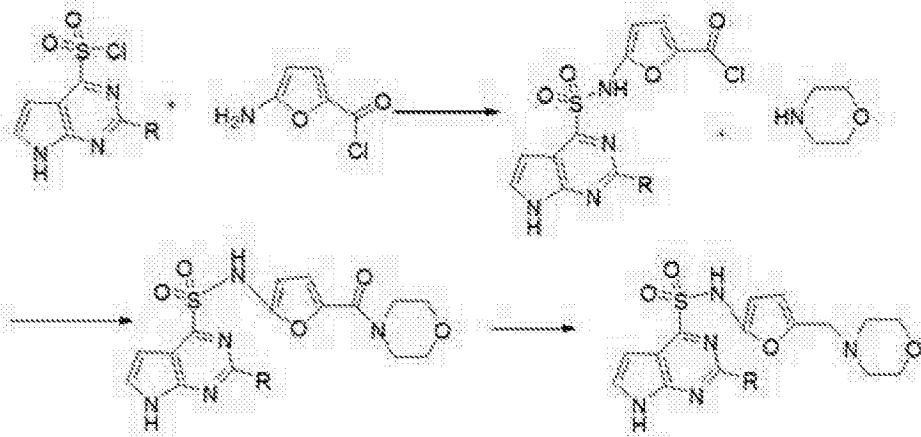
其中,R为 $-(CH_2)_nCH_3$ , $n=0\sim 6$ 。

2. 一种磺酰胺基衍生物式(I)的合成路线,

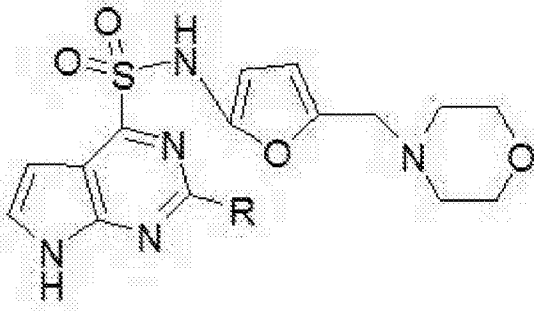


式(I)

其中,R为 $-(CH_2)_nCH_3$ , $n=0\sim 6$ ,其特征是,



3. 一种磺酰胺基衍生物式(I)在制备抗肿瘤药物中的用途,



式 (I)

其中,R为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>,n=0~6。

4.如权利要求3所述的用途,其特征是,所述肿瘤为恶性肿瘤,所述恶性肿瘤为实体瘤或非实体瘤。

5.如权利要求4所述的用途,其特征是,所述实体瘤为肝癌、肺癌、神经胶质瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌,所述非实体瘤为白血病。

6.一种抗肿瘤组合物,其特征在于,包括权利要求1所述的磺酰胺基衍生物式(I)及医学上可接受的辅料。

## 一种磺酰胺基衍生物及其在制备抗肿瘤药物中的用途

### 技术领域

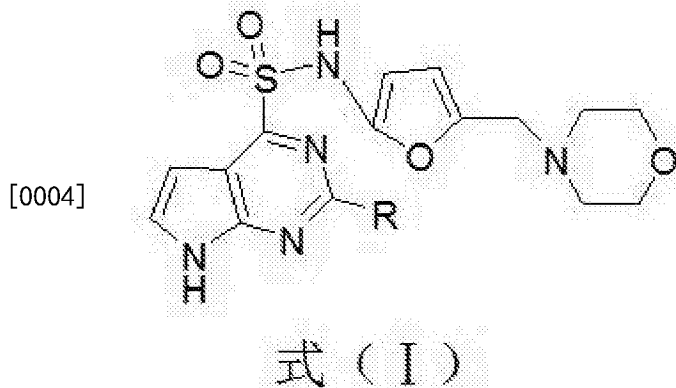
[0001] 本发明涉及一种磺酰胺基衍生物式(I)及其在制备抗肿瘤药物中的用途,尤其涉及一种磺酰胺基衍生物式(I)在肝癌、肺癌、神经胶质瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、白血病中的应用。

### 背景技术

[0002] 癌症为生命科学领域重大议题,恶性肿瘤严重威胁着人类的生存质量成为人类健康的第一杀手。多年来人类一直在不断的进行抗肿瘤药物的研究,寻找新型高效、低毒的抗肿瘤药物一直是国内外医药研发的热点。世界各国对抗肿瘤药物的筛选都非常重视,投入了大量的人力、物力、财力,每年都有大量的化合物(化学合成、天然产物和微生物发酵产物)经过抗肿瘤药物筛选。小分子化合物在肿瘤研发中具有重要地位。每年都有大量的小分子化合物实体被设计出来并进行不同适应症药物的活性筛选,但是由于设计化合物的初始目的和设计者研究兴趣的不同,很多化合物的开发并不全面,很多优秀的药理药效功能不能得到开发,另一方面,由于新设计的化合物一般都以化合物专利的形式进行保护,更加广泛地用途开发对于非专利权人存在专利壁垒,商业价值低。


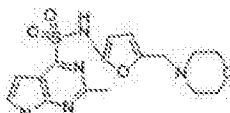

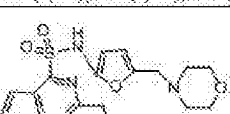
### 发明内容


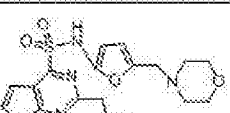

[0003] 本发明的目的在于提供一种磺酰胺基衍生物式(I)及其在制备抗肿瘤药物中的用途,尤其涉及一种磺酰胺基衍生物式(I)在肝癌、肺癌、神经胶质瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、白血病中的应用。磺酰胺基衍生物式(I)



[0005] 其中,R为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>,n=0~6。

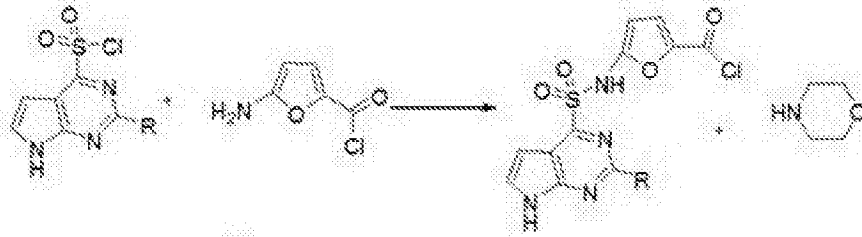
[0006]

编号	n 值	结构
a	0	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.42(t,4H), 3.57(t,4H), 3.76(s,2H), 6.11(d,1H), 6.93(d,1H), 7.19(d,1H), 7.43(d,1H), 7.91(s,1H), 9.33(d,1H), 9.53(s,1H).</p>
b	1	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.17(s, 3H), 2.41(t, 4H), 3.56(t, 3H), 3.73(s, 2H), 6.11(d, 1H), 6.92(d, 1H), 7.07(d, 1H), 7.34(d, 1H), 7.89(s, 1H), 9.47(s, 1H).</p>
c	2	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.28(t,3H), 2.42(t,4H), 2.76(d,2H), 3.57(t,4H), 3.76(s,2H), 6.12(d,1H), 6.94(d,1H), 7.07(d,2H), 7.36(d,2H), 7.92(s,1H), 9.46(s,1H).</p>
d	3	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.95(t,3H), 1.71(m,2H), 2.42(t,4H), 2.87(t,2H), 3.57(t,4H), 3.76(s,2H), 6.12(d,1H), 6.94(d,1H), 7.05(d,1H), 7.36(d,1H), 7.91(s,1H), 9.50(s,1H).</p>

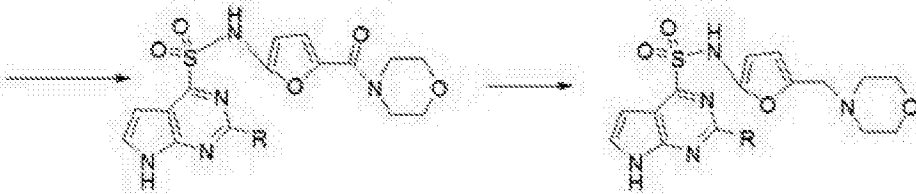
编号	n 值	结构
e	4	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.90(t,3H), 1.30(m,2H), 1.59(m,2H), 2.42(t,4H), 2.87(t,2H), 3.57(t,4H), 3.76(s,2H), 6.12(d,2H), 6.94(d,2H), 7.09(d,2H), 7.36(d,2H), 7.91(s,1H), 8.24(s,1H).</p>
f	5	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.91(m,3H), 1.34(m,4H), 1.58(m,2H), 2.41(t,4H), 2.86(t,2H), 3.56(t,4H), 3.74(s,2H), 6.10(d,1H), 6.91(d,1H), 6.99(d,1H), 7.34(d,1H), 7.89(s,1H), 9.48(s,1H).</p>
g	6	 <p><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.89(m,3H), 1.29(m,6H), 1.59(m,2H), 2.42(t,4H), 2.87(t,2H), 3.57(t,4H), 3.76(s,2H), 6.12(d,1H), 6.94(d,1H), 7.12(d,1H), 7.37(d,1H), 7.91(s,1H), 9.33(s,1H).</p>

[0007] 进一步地,式(I)表示的化合物、其盐或其溶剂化合物。

[0008] 进一步地,式(I)的合成路线为



[0009]



[0010] 进一步地,式(I)在制备抗肿瘤药物中的用途。

[0011] 进一步地,所述肿瘤为恶性肿瘤,所述恶性肿瘤为实体瘤或非实体瘤。

[0012] 优选地,所述实体瘤为肝癌、肺癌、神经胶质瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌,所述非实体瘤为白血病。

[0013] 一种抗肿瘤组合物,其特征在于,包括权利要求1所述的磺酰胺基衍生物式(I)及医学上可接受的辅料。

[0014] 本发明没有对磺酰胺基衍生物式(I)或包含磺酰胺基衍生物式(I)的组合物的施用方式进行特别限制,代表性的施用方式包括(但并不限于):口服、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)、和局部给药。用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,磺酰胺基衍生物式(I)与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,或与下述成分混合:(a)填料或增容剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸;(b)粘合剂,例如羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶;(c)保湿剂,例如甘油;(d)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、碳酸钠;(e)缓溶剂,例如石蜡;(f)吸收加速剂,例如季胺化合物;(g)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(h)吸附剂,例如高岭土;(i)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠。胶囊剂、片剂和丸剂中,剂型也可包含缓冲剂。

[0015] 其中,胃肠道给药制剂是目前最为常见的用药形式,且实验操作方便,因此,本发明具体实施方式中采用灌胃给药进行磺酰胺基衍生物式(I)的药效试验,但这并不表示,磺酰胺基衍生物式(I)抗肿瘤的用药形式仅限于胃肠道给药,本领域技术人员可以根据磺酰胺基衍生物式(I)的物理化学性质,结合现代制剂技术和病患的实际需要,将其制备成注射剂、头皮吸收制剂、植入制剂等多种制剂,从而扩大其给药途径,并提高药物靶向性或有效避免不必要的毒副作用。

[0016] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酞剂。除了活性化合物外,液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油,特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物等。

[0017] 除了这些惰性稀释剂外,组合物也可包含助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

[0018] 除了活性化合物外,悬浮液可包含悬浮剂,例如乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

[0019] 用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液,和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

[0020] 用于局部给药的本发明化合物的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。活性成分在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂,或必要时可能需要的推进剂一起混合。

[0021] 本发明化合物可以单独给药,或者与其他药学上可接受的其他药物联合给药。

[0022] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其他多种形式的修改、替换或变更。

## 具体实施方式

[0023] 实施例 1

[0024] 5-[2-甲基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯的合成

[0025] 将5-氨基呋喃基-2-甲酰氯的水溶液(17.5 mmol)置于冰水浴条件下,然后将2-甲基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰氯(10 mmol)滴加入上述体系中,滴加过程中内部温度控制在20-24°C之间,滴加完毕后,撤去冰水浴,常温搅拌10小时后,加入NaCl(4 g),继续搅拌1小时。用二氯甲烷(200 mL, 100 mL x 2)萃取,有机相用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,蒸干溶剂后,用丙酮和乙醇(3:1)重结晶,得3 g 5-[2-甲基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯,产率88%,为白色固体粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.18(s, 3H), 7.12(d, 1H), 7.37(m, 2H), 7.72(d, 1H), 7.90(s, 1H), 9.48(s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 25.37, 100.83, 101.36, 120.08, 124.61, 126.61, 145.33, 153.14, 154.91, 155.40, 157.73, 159.40

[0026] 其中,2-甲基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰氯

[0027] <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.18(s, 3H), 7.11(d, 1H), 7.35(d, 1H), 7.89(s, 1H).

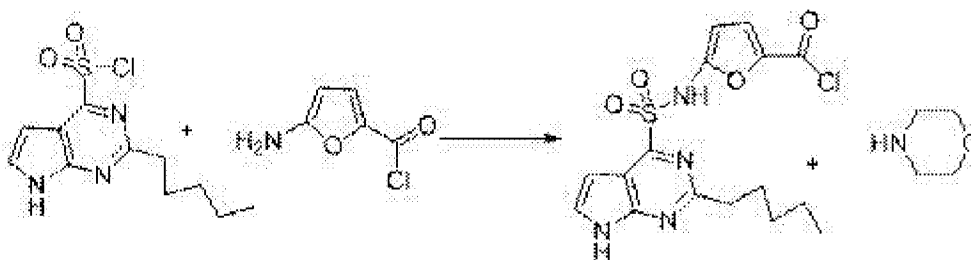
[0028] 2-甲基-N-2-[5-(吗啉基-4-羰基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺的合成

[0029] 将三乙胺加入5-[2-甲基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯(10mmol)的二氯甲烷溶液中,将吗啉(12 mmol)的二氯甲烷溶液滴加入体系中,室温搅拌16小时。用5%的碳酸钠水溶液洗涤反应体系,有机相用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,蒸干溶剂后,得到的固体快速柱色谱分离,得到3.4 g 2-甲基-N-2-[5-(吗啉基-4-羰基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺,产率86.9%,为淡黄色粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.21(s, 3H), 3.51(m, 4H), 3.61(m, 4H), 7.16(dd, 2H), 7.42(dd, 2H), 7.93(s, 1H), 9.25(s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 25.37, 44.83, 66.36, 100.83, 101.36, 115.51, 120.08, 126.61, 151.81, 154.91, 155.40, 157.73, 159.40, 160.39.

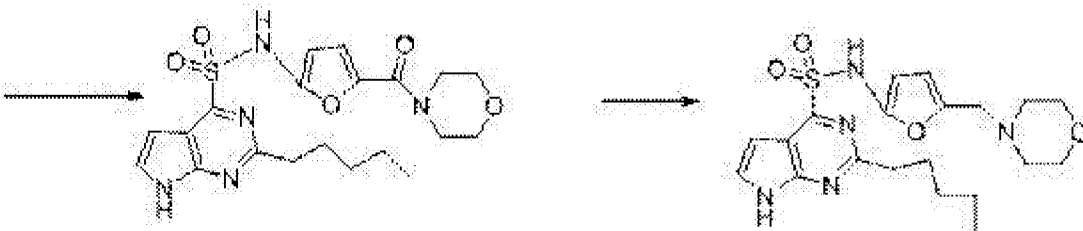
[0030] 2-甲基-N-2-[5-(吗啉甲基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺的合成

[0031] 用甲醇和四氢呋喃(2:1)混合溶剂溶解2-甲基-N-2-[5-(吗啉基-4-羰基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺(10 mmol),冰水浴条件下向其中加入硼氢化钠,搅拌半小时后撤去冰水浴,室温搅拌1小时,然后向其中加入200毫升水,过滤,所得固体经过快速柱色谱分离,得到3.2 g 2-甲基-N-2-[5-(吗啉甲基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺,产率84.8%,微黄色粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.17 (s, 3H), 2.41 (t, 4H), 3.56 (t, 3H), 3.75 (s, 2H), 6.11 (d, 1H), 6.92 (d, 1H), 7.07 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.89 (s, 1H), 9.47 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 25.37, 52.68, 55.18, 67.08, 96.87, 99.50, 100.83, 120.08, 126.61, 148.35, 154.91, 155.40, 156.75, 159.40. m/z: 377.12 (100.0%), 378.2 (18.5%).

[0032] 实施例2



[0033]



[0034] 5-[2-戊基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯的合成

[0035] 将5-氨基呋喃基-2-甲酰氯的水溶液(17.5 mmol)置于冰水浴条件下,然后将2-戊基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰氯(10 mmol)滴加入上述体系中,滴加过程中内部温度控制在15°C左右,滴加完毕后,撤去冰水浴,常温搅拌20小时后,加入20ml饱和食盐水,继续搅拌1小时。用二氯甲烷(200 mL, 100 mL x 2)萃取,有机相用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,蒸干溶剂后,用丙酮和乙醇(3:1)重结晶,得3.6 g 5-[2-戊基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯,产率91%,为白色固体粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.91 (m, 3H), 1.35 (m, 4H), 1.59 (m, 2H), 2.86 (t, 2H), 7.19 (d, 1H), 7.38 (t, 2H), 7.73 (d, 1H), 7.92 (s, 1H), 9.06 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.00, 23.16, 23.97, 30.73, 36.42, 100.83, 101.36, 117.48, 124.61, 126.61, 145.33, 153.14, 154.17, 157.73, 158.92, 163.15.

[0036] 2-戊基-N-2-[5-(吗啉基-4-羰基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺的合成

[0037] 将5-[2-戊基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯(10mmol)溶于100 ml二氯甲烷溶液中,向其中加入1ml三乙胺,将吗啉(12 mmol)的二氯甲烷溶液滴加入体系中,室温搅拌10小时。用100 ml 5%的碳酸钠水溶液洗涤反应体系,有机相用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,蒸干溶剂后,得到的固体快速柱色谱分离,得到4 g 2-戊基-N-2-[5-(吗啉基-



4-羰基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺,产率89%,为淡黄色粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.91 (m, 3H), 1.35 (m, 4H), 1.59 (m, 2H), 2.87 (t, 2H), 3.51 (m, 4H), 3.61 (m, 4H), 7.15 (d, 1H), 7.20 (d, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.44 (d, 1H), 7.93 (s, 1H), 9.19 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.02, 23.16, 23.97, 30.73, 36.42, 44.83, 66.36, 100.83, 101.36, 115.51, 117.48, 126.61, 151.81, 154.17, 157.73, 158.92, 160.39, 163.15. m/z: 447.16 (100.0%), 448.16 (22.9%), 449.15 (4.5%) .

[0038] 2-戊基-N-2-[5-(吗啉甲基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺的合成

[0039] 用甲醇和四氢呋喃(1:1)混合溶剂溶解5-[2-戊基-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺基]呋喃基-2-甲酰氯(10 mmol),冰水浴条件下向其中加入硼氢化钠,维持温度低于5℃,搅拌半小时后撤去冰水浴,室温搅拌1小时,然后向其中加入200 ml水,过滤,所得固体经过快速柱色谱分离,得到3.8 g 2-戊基-N-2-[5-(吗啉甲基)呋喃基]-7H-(2,3-d)吡咯并嘧啶基-4-磺酰胺,产率88%,类白色粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.91 (m, 3H), 1.34 (m, 4H), 1.58 (m, 2H), 2.41 (t, 4H), 2.86 (t, 2H), 3.56 (t, 4H), 3.74 (s, 2H), 6.10 (d, 1H), 6.91 (d, 1H), 6.99 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.89 (s, 1H), 9.48 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.00, 23.16, 23.97, 30.73, 36.42, 52.68, 55.18, 67.08, 96.87, 99.50, 100.83, 117.48, 126.61, 148.35, 154.17, 156.75, 158.92, 163.15. m/z: 433.18 (100.0%), 434.18 (24.7%), 435.17 (4.5%) .

[0040] 试验例1:MTT(噻唑蓝)法测定磺酰胺基衍生物式(I)对不同肿瘤细胞的抑制作用。

[0041] 一、细胞株

[0042] 人肺癌细胞A549,人肝癌细胞SMMC-7721,人肝癌细胞Be1-7402,人神经胶质细胞瘤细胞U251,人大细胞肺癌细胞NCI-H460,人胃腺癌细胞BGC-823,人胃腺癌细胞SGC-7901,人卵巢腺癌细胞SK-OV-3,人乳腺癌细胞MCF-7,人慢性髓系白血病细胞K562。

[0043] 二、主要溶液配制:

[0044] 1.PBS缓冲液:

[0045] NaCl 8g、KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g,调ph 7.4,定容1L。

[0046] 2.胰蛋白酶溶液:

[0047] 0.25%的胰蛋白酶+0.02%EDTA,用PBS缓冲液配制,0.22μm滤膜过滤除菌,4℃备用。

[0048] 3.RPMI 1640细胞培养液:

[0049] (1) 10.4g/包RPMI 1640培养粉溶至三蒸水中,磁力搅拌20min;

[0050] (2) 加2g NaHCO<sub>3</sub>,继续搅拌10min;

[0051] (3) 加青霉素溶液(2×10<sup>5</sup>U/mL)0.5mL,链霉素溶液(2×10<sup>5</sup>U/mL)0.5mL;

[0052] (4) 加100ml灭活胎牛血清;

[0053] (5) 加1mol/L HCl,调PH至7.2,定容1L;

[0054] (6) 过滤除菌。

[0055] 4.受试药物梯度溶液:

[0056] (1) 磺酰胺基衍生物式(I)梯度溶液:磺酰胺基衍生物式(I)用少量DMSO溶解后(最终DMSO含量在0.1%以内),用RPMI 1640细胞培养液配置成128μg/ml,对半稀释配置成8个浓度梯度,即:64、32、16、8、4、2、1、0.5μg/ml,用前配制。

[0057] (2) 顺铂梯度溶液:顺铂注射液用RPMI 1640细胞培养液配置成128μg/ml,对半稀

释配置成8个浓度梯度,即128、64、32、16、8、4、2、1 $\mu$ g/ml,用前配制。

[0058] 三、实验分组:

[0059] 待测药物组(参见实验步骤部分)

[0060] 阳性对照药物组(与药物试验组相比,加入浓度梯度的待测药物改为加入浓度梯度的顺铂)

[0061] 对照组(与药物试验组相比,加入浓度梯度的待测药物改为加入不含药物的RPMI 1640细胞培养液)

[0062] 空白组(与对照组相比,不加细胞)

[0063] 四、实验步骤:

[0064] 1.取对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化,RPMI 1640细胞培养液调细胞悬液浓度为 $6 \times 10^4$ 个/mL。在96孔培养板中每孔加细胞悬液100 $\mu$ L,置37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h,细胞贴壁。

[0065] 2.移走RPMI 1640细胞培养液,加入浓度梯度的待测药物的RPMI 1640细胞培养液100 $\mu$ L,每个浓度设6个平行孔。将加药后的96孔板置于37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48h,倒置显微镜下观察药物的作用效果。

[0066] 3.96孔板离心后弃去培养液,小心用PBS冲2~3遍后,再加入含0.5% MTT的RPMI 1640细胞培养液100 $\mu$ L,继续培养4h。

[0067] 4.移走上清,每孔加入150 $\mu$ L二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10min,使formazan结晶充分溶解。

[0068] 5.在酶联免疫检测仪490nm处测量各孔的光密度(OD值)。

[0069] 6.平行孔OD值以mean $\pm$ SD表示,计算抑制率公式:[(OD<sub>对照组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)-(OD<sub>药物试验组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)]/(OD<sub>对照组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)\*100%。

[0070] 7.采用GraphPad Prism 5数据处理软件,通过绘制量效曲线计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

[0071] 五、实验结果

[0072] 磺酰胺基衍生物式(I)对10种人肿瘤细胞株均有不同程度的体外抑制作用,IC<sub>50</sub>(见表1)。与阳性药顺铂相比较,磺酰胺基衍生物式(I)不同结构对不同的人肿瘤细胞抑制程度有所差异,磺酰胺基衍生物式(I)不同结构之间也存在差别。由此,磺酰胺基衍生物式(I)可以用于制备抗肿瘤药物,肿瘤为恶性肿瘤,包括实体瘤或非实体瘤,其中实体瘤为肝癌、肺癌、神经胶质瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌,非实体瘤为白血病。

表1 式(I)和顺铂对10种人肿瘤细胞IC<sub>50</sub>值

	IC <sub>50</sub> (μg/ml)							
	顺铂	a	b	c	d	e	f	g
A549	◇	△	△	△	△	△	△	△
SMMC-7721	□	◇	◇	◇	◇	◇	◇	○
Bel-7402	□	□	△	△	□	□	□	□
U251	◇	◇	◇	□	◇	◇	◇	◇
NCI-H460	□	◇	□	◇	◇	○	○	○
BGC-823	□	△	□	□	△	□	□	□
SGC-7901	□	□	□	□	□	□	◇	○
SK-OV-3	○	□	△	△	□	□	◇	◇
MCF-7	◇	□	□	□	◇	◇	○	○
K562	◇	□	□	□	□	◇	◇	□

注: △≤1, 1<□≤5, 5<◇≤10, ○>10。

[0073]

[0074] 试验例2:Bel-7402肝癌移植瘤小鼠模型研究

[0075] 一、建立人肝癌裸鼠异体移植癌模型

[0076] SPF级Balb/c裸鼠,雄性,4周龄,取经人Bel-7402肝癌细胞裸鼠移植成瘤,再经裸鼠传代2代以上的瘤块,剪成约2\*2\*2mm,采用套管针接种于裸鼠腋部皮下,建立人肝癌裸鼠异体移植癌模型。

[0077] 二、给药方案

[0078] 用游标卡尺测量每个动物瘤的长和宽,按公式: $V=1/2*ab^2$ 计算瘤体积,待瘤体积长至约100mm<sup>3</sup>开始给药,所有动物按瘤体积随机分为模型组、阳性药卡培他滨组(400mg/kg)、式(I)组(100mg/kg),每组8只,各组灌胃给药,剂量均为10ml/kg,1次/d,连续给药14d。

[0079] 三、瘤重及抑瘤率

[0080] 剥取瘤块,分析天平称瘤重,按以下公式计算抑瘤率。

[0081] 抑瘤率%=(模型组平均瘤重-给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重\*100%。

[0082] 与模型组比较,卡培他滨组和编号为a、c、e的三个化合物Bel-7402肝癌移植瘤小鼠瘤重均有下降,编号为a、c、e的三个化合物抑瘤率均高于卡培他滨组。编号为a、c、e的三个化合物Bel-7402肝癌移植瘤小鼠瘤重及抑瘤率见表2。

表 2 编号为 a、c、e 的三个化合物 Bel-7402 肝癌移植瘤小鼠瘤重及抑瘤率 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
模型组	1.36±0.30	—
卡培他滨组	0.74±0.26	45.6
a	0.43±0.15	68.4
c	0.56±0.19	58.8
e	0.68±0.32	50.0

[0084] 据研究表明,裸鼠移植肿瘤模型与临床治疗的药物治疗效果有明显的相关性,可以较好的预报药物的临床疗效。由此可以推知,式(I)可以作为抗肿瘤药物应用。

[0085] 试验例3:人肾上皮细胞(293T)的毒性研究

[0086] 本发明测试了磺酰胺基衍生物式(I)对人肾上皮细胞(293T)的细胞毒性,细胞毒性结果如表3,以塞来昔布作为阳性对照。每个化合物的毒性用抑制T细胞存活率到50%时的浓度(CC<sub>50</sub>)来表示。

[0087] 一、实验方法

[0088] (1)培养人肾上皮细胞(293T)直至达到其对数生长期末细胞趋于融合,用细胞消化液消化分散细胞,用细胞培养液配制成 $1 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬液。取96孔培养板,每孔中加入100 $\mu$ L的细胞悬液。轻轻水平转动培养板使细胞均匀地分散在皿孔的表面。

[0089] (2)置于含5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,在37 $\pm$  2 $^{\circ}$ C温度下培养24h。弃去原培养液,每孔加入100 $\mu$ L的空白对照液,阴性对照液,阳性对照液,100%和50%浓度的试验样品浸提液。每组至少设8孔。注:浸提原液或以培养基作稀释剂的系列浸提稀释液。采用0.9%氯化钠注射液浸提时,在稀释浸提时使用浓缩的2倍培养基。

[0090] (3)置于含5% CO<sub>2</sub>培养箱中,在37 $\pm$  2 $^{\circ}$ C温度下进行培养。培养48h。

[0091] (4)每个培养间期后,每孔加入MTT溶液20 $\mu$ L,置于含5% CO<sub>2</sub>培养箱中,在37 $\pm$  2 $^{\circ}$ C温度下培养5h。

[0092] (5)弃去孔内液体,每孔分别加入200 $\mu$ L DMSO,将培养板放置10min,水平摇晃使孔内溶液颜色均匀。

[0093] (6)用酶标仪测定吸光度,波长采用570nm。测得的CC<sub>50</sub>见表3所示。

[0094] 表3式(I)对293T细胞的抑制CC<sub>50</sub>值( $\mu$ mol/mL)

[0095]

编号	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol/mL)
塞来昔布	55.22
a	60.38
b	58.32
c	58.48
d	62.52

e	62.21
f	64.61
g	63.88

[0096] 本发明磺酰胺基生物式(I)的七个结构对人肾上皮细胞(293T)表现出了相当或者优于阳性对照药物的细胞毒性,因此式(I)可以应用于制备抗肿瘤药物。