

一种多取代苯甲酰胺化合物及其制备方法和应用

技术领域

本发明设计合成药物技术领域，具体涉及一种多取代苯甲酰胺化合物及其制备方法和应用。

背景技术

猪伪狂犬病（Pseudorabies, PR）是由疱疹病毒科（Herpesviridae）的伪狂犬病病毒（Pseudorabies virus, PRV）引起的多种家畜以发热、奇痒（猪除外）、繁殖障碍、脑脊髓炎为主要症状的一种高度接触性传染病。世界动物卫生组织（OIE）将其列为 B 类动物疫病，我国将其列为二类动物疫病。

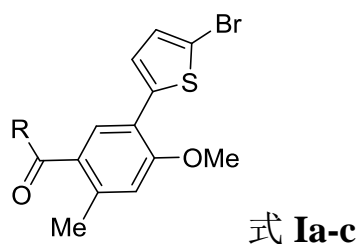
目前，免疫接种是预防和控制 PR 的主要措施。国内外已研制成功伪狂犬的常规弱毒疫苗、灭活疫苗以及基因缺失疫苗（包括基因缺失弱毒苗和灭活苗），这些疫苗都能有效地减轻或防止 PR 的 I 临床症状，从而减少该病造成的经济损失。国内主要应用灭活苗和弱毒苗预防 PR，具有良好的免疫效果。灭活疫苗安全性较高但具有使用剂量大、成本高，偶尔有过敏反应的缺点。弱毒疫苗虽然成本低，免疫源性好，但也有未经充分致弱的弱毒苗的毒力可能会返强而导致疾病的流行以及建立潜伏感染，并有可能散毒的隐患。

与疫苗不同，小分子药物具有诸多的优点，比如生产成本低（容易仿制）、方便储存，运输方便、能穿过细胞膜，作用于细胞内靶点、组织渗透性更好、能部分通过血脑屏障、没有免疫原性、广谱性等。根据文献检索，目前尚未发现国内外对抗伪狂犬病毒的小分子药物的设计、合成及相关活性研究。

发明内容

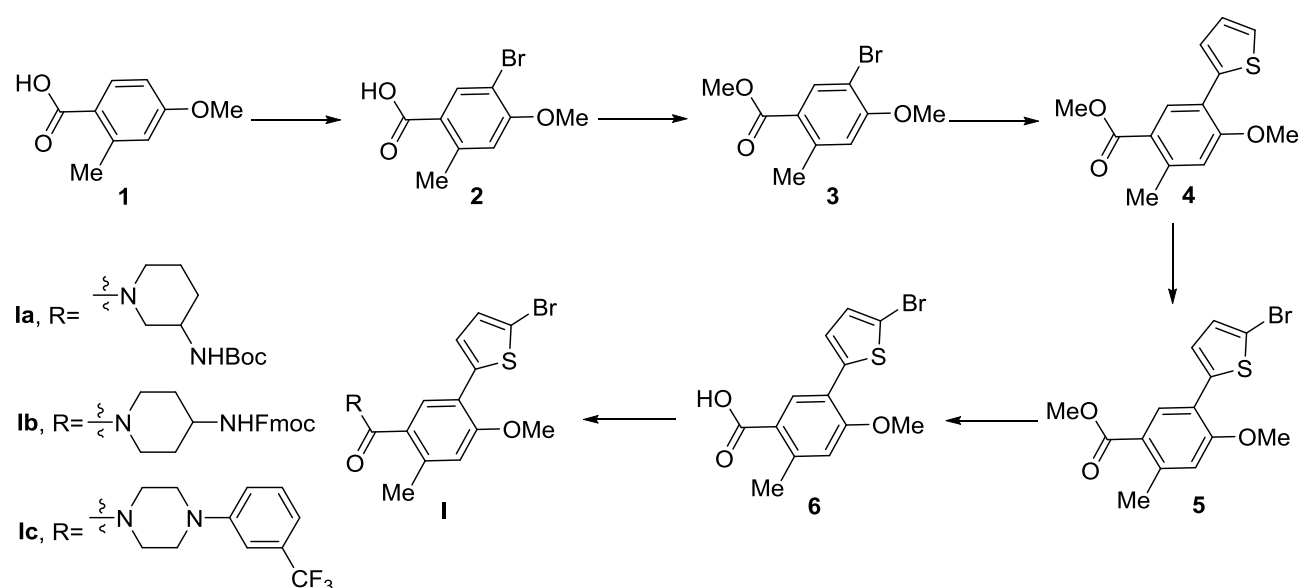
为了克服现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种多取代苯甲酰胺化合物及其制备方法和应用。本发明所采用的技术方案如下：

第一个方面，本发明提供一种多取代苯甲酰胺化合物，具有如式 **Ia~c** 所示结构：



式 **Ia-c** 中，R 选自 3-叔丁氧羰基氨基哌啶 (**Ia**)、4-苄基氨基哌啶 (**Ib**)、N-(3-三氟甲基苯基)哌嗪 (**Ic**) 中的一种。

第二个方面，本发明提供上述多取代苯甲酰胺化合物的制备方法，是采用以下反应方程式，



所述制备方法包括以下步骤：

步骤 1，将化合物 **1** 的甲氧基邻位上进行溴化反应得到化合物 **2**；

步骤 2，将化合物 **2** 的羧基进行酯化反应得到化合物 **3**；

步骤 3，将化合物 **3** 的溴进行 Suzuki 偶联得到化合物 **4**；

步骤 4，将化合物 **4** 的噻吩上进行 α 位溴化得到化合物 **5**；

步骤 5，将化合物 **5** 进行酯水解反应得到化合物 **6**；

步骤 6，将化合物 **6** 的羧酸基团上引入如 **Ia**、**Ib**、**Ic** 中的 R 之一所示的基团。

优选地，所述步骤 1 中溴化反应采用溴素，并以铁粉为催化剂，所述化合物 **1**、所述溴素和所述铁粉的摩尔比为 1：（1.0~1.2）：（0.05~0.15）。

进一步地，所述步骤 1 中溴化反应具体包括：将化合物 **1**、铁粉以及二氯甲烷混合均匀后预冷；加入溴素反应；反应结束后采用二氯甲烷稀释反应液，依次采用硫酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤，保留有机相；然后采用无水硫酸镁干燥有机相，蒸干后重结晶，既得。

进一步地，所述步骤 2 中酯化反应具体包括：将化合物 **2** 和无水甲醇混合均匀，加入二氯亚砷，于回流状态下反应；反应完成后加入饱和碳酸氢钠溶液洗涤并萃取，有机相依次干燥、浓缩后精制，既得。

优选地，所述酯化反应精制的方法为柱层析。

优选地，所述步骤 3 中取代反应采用噻吩硼酸，并以 PdCl_2 为催化剂，所述化合物 **3**、所述噻吩硼酸和所述 PdCl_2 的摩尔比为：1：（1.05~1.2）：（0.05~0.2）。

进一步地，所述步骤 3 中取代反应具体包括：氩气保护下，将化合物 **3**、噻吩硼酸、碳酸钾、 PdCl_2 、二噁烷和水混合均匀，升温至 108~112℃ 反应；反应结束后过滤，滤液依次洗涤、干燥、浓缩后精制，既得。

优选地，所述取代反应精制的方法为柱层析。

优选地，所述步骤 4 中间位溴化反应采用 NBS，所述 NBS 和所述化合物 **4** 的摩尔比为（0.8~1.0）：1。

进一步地，所述步骤 4 中间位溴化反应具体包括：将化合物 **4**、DMF、NBS 混合均匀，室温下反应；反应结束后加入冰水，过滤，将滤饼干燥，既得。

优选地，所述步骤 5 中酯水解反应采用氢氧化锂为催化剂，所述氢氧化锂和所述化合物 **5** 的摩尔比为（4~4.5）：1。

进一步地，所述步骤 5 中酯水解反应具体包括：将化合物 **5**、甲醇、水混合均匀后，加入氢氧化锂，于 40~45℃ 反应；反应结果后依次浓缩、加水溶解、调 pH 至 2.0~2.5；将析出的固体过滤并干燥，既得。

进一步地，所述步骤 6 采用叠氮磷酸二苯酯（DPPA）为催化剂，所述 DPPA 和所述化合物 **6** 的摩尔比为（1.5~2.0）：1。

进一步地，所述步骤 6 具体包括：将化合物 **6**、如 **Ia**、**Ib**、**Ic** 中之一所示基团的仲胺化合物、TEA、无水 N,N-二甲基甲酰胺混合均匀，预冷后加入 DPPA 反应；反应结束后依次用冰水猝灭、萃取；获得的有机相依次用饱和食盐水洗涤、干燥、浓缩后精制，既得。

优选地，所述步骤 6 中精制的方法为柱层析。

第三个方面，本发明提供上述多取代苯甲酰胺化合物或上述制备方法制备的多取代苯甲酰胺化合物在制备抗伪狂犬病毒药物上的应用。

第四个方面，本发明提供了一种抗伪狂犬病毒药物，包括上述的多取代苯甲酰胺化合物或上述制备方法制备的多取代苯甲酰胺化合物和药学上可接受的辅料。

本发明对所述抗伪狂犬病毒药物并无特殊限定，可以为片剂、胶囊剂、粉针剂或混悬剂等本领域技术人员熟知的剂型。

与现有技术相比，本发明的有益效果在于：

本发明发现了一种新的、具有良好抗伪狂犬病毒活性的多取代苯甲酰胺化

合物，研究表明式 Ia~b 所示的化合物能够抑制伪狂犬病毒活性，并且对大量病毒侵染细胞具有保护作用，因此表明该化合物能够用于制备具有伪狂犬病毒作用的食品 and/或药品，在抗伪狂犬病毒药物开发方面具有良好的应用前景。

附图说明

图 1 为本发明实施例 5 中在病毒感染量为 MOI=1 时各药物组对病毒的抑制作用对比图。

具体实施方式

本发明实施例采用的 PRV 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

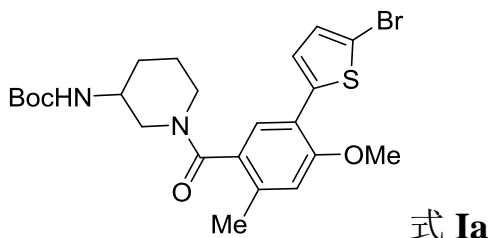
本发明实施例采用的 PK-15 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

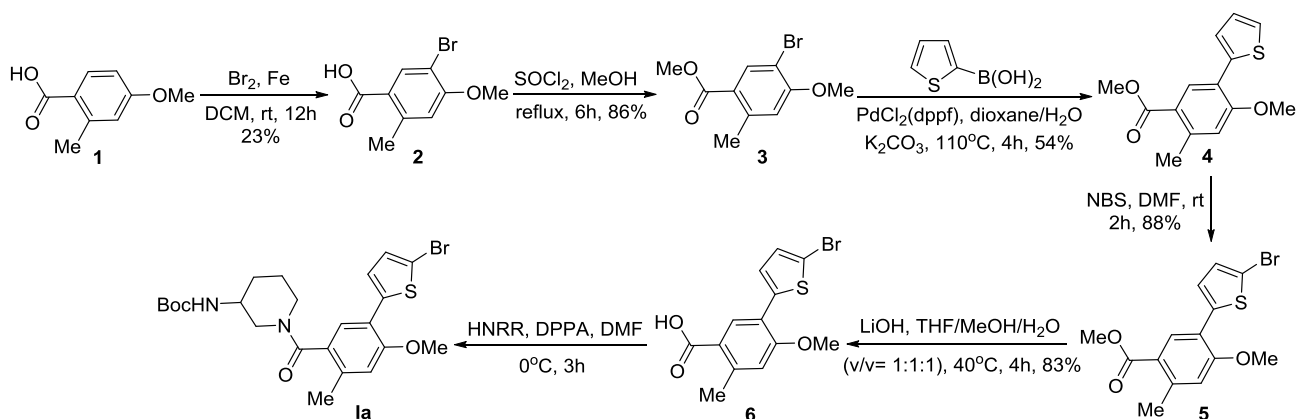
本发明提供了一种具有抗伪狂犬病毒作用的药物，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

实施例 1

本实施例提供一种多取代苯甲酰胺化合物，具有如式 Ia 所示结构：



式 **1a** 所示化合物的制备方法为：



详细制备方法如下：

(1) 化合物 **2** 的合成：

向 250 毫升圆底烧瓶中加入 10 克化合物 **1** (2-甲基-4-甲氧基苯甲酸) (60.24mmol)、0.34 克铁粉 (6.02mmol) 以及 10 毫升二氯甲烷，置于-5℃下，预冷片刻。缓慢滴加 3.7 毫升溴素 (72.29mmol)，滴加完毕后，恢复至室温搅拌过夜。TLC 监测反应待原料消失，用 100 毫升二氯甲烷稀释反应液，并用 10%的硫酸氢钠溶液洗涤 2 次，再用饱和食盐水洗涤 1 次。无水硫酸镁干燥有机相，减压抽滤，旋干，用乙酸乙酯重结晶得到 3.40 克化合物 **2**，产率为 23%。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.56 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.08 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 12.70 (brs, 1H)。

(2) 化合物 **3** 的合成：

在氩气保护下，向火焰干燥的反应瓶中加入 4.1 克化合物 **2** (16.73mmol) 及 50 毫升绝对无水甲醇，置于冰浴条件下，缓慢滴加 1.45 毫升二氯亚砷 (20.08mmol)。滴加完毕后回流 5h，向反应液中加入 20 毫升饱和碳酸氢钠溶

液，用二氯甲烷萃取，合并有机相，干燥，浓缩，柱层析得到 3.7 克化合物 **3**，产率为 86%。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.55 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 7.08 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), MS: m/z 257.99 [M (Br⁷⁹) + H]⁺, 259.99 [M (Br⁸¹) + H]⁺。

(3) 化合物 **4** 的合成:

在氩气下，向反应瓶中加入 1.5 克化合物 **3** (5.8mmol)、0.89 克噻吩硼酸 (6.95mmol)、2.4 克碳酸钾 (17.4mmol)、0.42 克 PdCl₂ (dppf) (0.58mmol)、60 毫升二噁烷及 15 毫升水。升温至 110℃ 反应 4 h。反应液用硅藻土过滤，用乙酸乙酯洗滤饼 3 次，得到的滤液用饱和食盐水洗涤，干燥，浓缩后柱层析，得到 0.82 克化合物 **4**，产率为 54%。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.65 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 6.79 (s, 1H), 7.02 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.24 (ψt, J = 4.0 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 8.25 (s, 1H). MS: m/z 261.04 [M + H]⁺。

(4) 化合物 **5** 的合成:

向反应瓶中加入 0.7 克化合物 **4** (2.67mmol)、5 毫升 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 及 0.43 克 *N*-溴代丁二酰亚胺 (NBS, 2.40mmol)，在室温下反应 2h。向反应液中加入冰水，减压过滤，将得到的白色沉淀物干燥，即得到 0.8 克化合物 **5**，产率为 88%。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.65 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 6.79 (s, 1H), 7.02 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H). MS: m/z 340.98 [M (Br⁷⁹) + H]⁺, 343.00 [M (Br⁸¹) + H]⁺。

(5) 化合物 **6** 的合成:

向反应瓶中加入 0.6 克 **5** 化合物 (1.76mmol)，加入四氢呋喃、甲醇及水各 3 毫升，再加入 0.3 克水合氢氧化锂 (7.10mmol)，在 40℃ 下搅拌 4h。反应液浓缩，加水溶解，用稀盐酸调 pH 至 2.0，析出的固体过滤，干燥，得到 0.478

克化合物 **6**，产率为 83%。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.56 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.90 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H). MS: *m/z* 327.09 [M (Br⁷⁹) + H]⁺, 343.00 [M (Br⁸¹) + H]⁺。

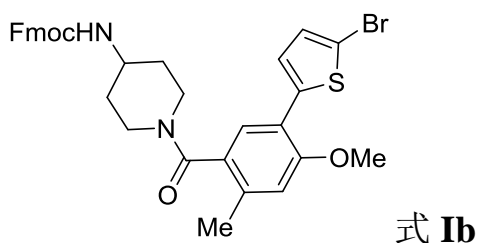
(6) 化合物 **Ia** 的合成:

在氩气下，向反应瓶中加入 30 毫克化合物 **6** (0.09mmol)、3-叔丁氧羰基氨基哌啶 (0.10mmol)、55 微升 TEA (0.38mmol) 以及 3 毫升干燥的 N,N-二甲基甲酰胺。反应瓶置于冰浴条件下，预冷片刻后加入 33 微升叠氮磷酸二苯酯 (DPPA, 0.15mmol)，继续反应至原料完全消失。反应液用冰水淬灭，并用乙酸乙酯萃取，合并有机相，用饱和食盐水洗涤，干燥，浓缩，干燥，柱层析得到 37 毫克 **Ia**，产率为 82%。

Ia 核磁结构鉴定如下：¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 1.42 (s, 9H), 1.58-1.65 (m, 2H), 1.68-1.90 (m, 2H), 2.48 (s, 3 H), 3.48-3.52 (m, 2 H), 3.56-3.72 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 6.92 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.62 (brs, 1H), 8.00 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 170.1, 158.2, 155.6, 140.8, 137.9, 131.1, 129.1, 129.0, 118.9, 114.8, 111.6, 79.5, 56.1, 53.1, 52.2, 47.7, 33.6, 28.4, 22.7, 18.4. HRMS: *m/z* 508.1039 [M (Br⁷⁹) + H]⁺, 510.1020 [M (Br⁸¹) + H]⁺。

实施例 2

本实施例提供一种多取代苯甲酰胺化合物，具有如式 **Ib** 所示结构:

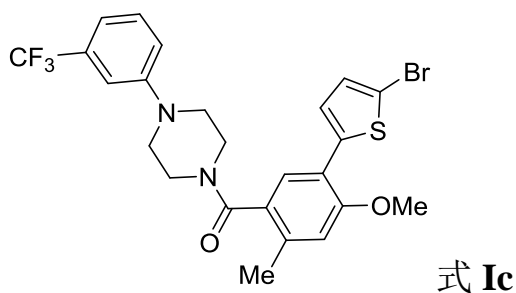


该多取代苯甲酰胺化合物的制备方法同实施例 1。

最终得到 43 毫克 **Ib**, 产率为 78%, 核磁结构鉴定如下: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.00-1.75 (m, 4H), 2.47 (s, 3 H), 3.65-3.58 (m, 6 H), 3.79 (s, 3H), 4.46 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.38-7.25 (m, 4H), 7.55 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.67 (brs, 1 H), 7.90 (d, $J=7.6$ Hz, 2 H), 8.55 (s, 1H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 170.0, 158.2, 156.0, 143.6, 140.8, 137.9, 131.1, 129.2, 129.1, 126.7, 125.2, 120.5, 118.9, 114.8, 111.6, 67.3, 56.5, 49.2, 47.0, 42.6, 29.6, 18.5. HRMS: m/z 653.1089 [$\text{M}(\text{Br}^{79}) + \text{Na}$] $^+$, 655.1068 [$\text{M}(\text{Br}^{81}) + \text{Na}$] $^+$ 。

实施例 3

本实施例提供一种多取代苯甲酰胺化合物, 具有如式 **Ic** 所示结构:



该多取代苯甲酰胺化合物的制备方法同实施例 1。

最终得到 28 毫克 **Ic**, 产率为 81%, 核磁结构鉴定如下: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.47 (s, 3 H), 3.17-3.45 (m, 4 H), 3.60-3.78 (m, 4H), 3.78 (s, 3H), 6.99 (s, 1H), 7.12 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 69.9, 158.4, 151.2, 140.8, 137.8, 131.9, 131.1, 129.6, 128.5, 124.1, 122.3, 118.9, 114.8, 114.6, 112.2, 111.6, 56.3, 53.6, 50.2, 18.5. HRMS: m/z 561.0446 [$\text{M}(\text{Br}^{79}) + \text{Na}$] $^+$, 563.0421 [$\text{M}(\text{Br}^{81}) + \text{Na}$] $^+$ 。

实施例 4

苯甲酰胺化合物抗病毒活性的研究

(1) 苯甲酰胺化合物对 PK-15 细胞毒性研究

以含 1% 乙醇的细胞维持培养液作为溶剂，将实施例 1~3 的苯甲酰胺化合物和阳性对照（阿昔洛韦）连续二倍稀释，得到 5 个浓度梯度的稀释液。待 PK-15 细胞长至 80%-90% 时，按如下操作加入药物稀释液和 CCK-8，每组设置 8 个重复：

实验组：将实施例 1~3 的药物梯度稀释液按照 100 μ L/孔依次加入 96 孔板中；

对照组：将细胞维持培养液按照 100 μ L/孔加入 96 孔板中；

将 96 孔细胞培养板放置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中培养 48h。实验组和对照组于避光环境中加入 10 μ L /孔的 CCK-8。在 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的培养箱中培养 30min。于 450nm 处检测其吸光度值。按照测定的吸光度值计算抑制率：

抑制率=[（对照孔-试验孔）/对照孔]×100%，[1]

实验重复 3 次，取平均值。用 Reed-Muench 法计算药物 CC₅₀ 值，公式如下：

$$S=N-1+(H-R)/(H-L)，[2]$$

$$CC_{50}=C \times 2^{-S}，[3]$$

式[2]和[3]中，N 表示高于 50%抑制率的药物浓度序列号，H 表示高于 50%的抑制率，R 为 50%，L 为低于 50%的抑制率，C 代表序号为 1 的药物实验组药物浓度。通过计算得出实施例 1~3 的苯甲酰胺化合物的 CC₅₀ 值分别为 11.60 μ M、10.97 μ M 和 25.12 μ M 阿昔洛韦的 CC₅₀ 值为 1420.50 μ M。

(2) 苯甲酰胺化合物对 PRV 的半数抑制浓度(IC₅₀)的测定

将苯甲酰胺化合物用细胞培养液进行二倍稀释。将 PK-15 细胞接种至 96 孔板中，待其长至 80%-90%，按如下操作进行实验：

药物组：将 100 TCID₅₀ 的 PRV 接种于 96 孔板中，于 37℃，5% 的 CO₂ 中吸附 1h 后，弃掉 PRV 稀释液，用 PBS 清洗 3 次，分别加入 100μL 的药物稀释液（包括对照药物阿昔洛韦），每个浓度设置 8 个重复；

病毒对照组：将 100 TCID₅₀ 的 PRV 接种于 96 孔板中，不加入任何药物；

空白组：PK-15 细胞不进行病毒感染和药物处理。

将 96 孔细胞培养板放置于 37℃，5% CO₂ 中培养 48h。实验组、对照组和空白组于避光环境中加入 10μL /孔的 CCK-8。在 37℃，5% 的培养箱中培养 30min。于 450nm 处检测其吸光度值。按照测定的吸光度值计算抑制率=（药物组-病毒对照组）/（空白组-病毒对照组）。根据抑制率采用 Reed-Muench 法计算 IC₅₀（计算方法同 CC₅₀）。实验重复 3 次，结果取平均值，实施例 1~3 的化合物的 IC₅₀ 分别为 0.65μM、0.82μM、1.63 μM 阿昔洛韦的 IC₅₀ 值为 148.21 μM。

选择指数（SI）可以评价山柰酚对 PRV 的抑制效果是否安全，计算公式如下：

$$SI=CC_{50}/IC_{50}, [4]$$

实施例 1~3 的苯甲酰胺化合物的选择指数分别为 17.75、13.36 和 15.34；阿昔洛韦的选择指数为 9.58。以上结果见表 1，苯甲酰胺化合物相较于阿昔洛韦，具有更强的抑制伪狂犬病毒活性。

表 1 苯甲酰胺化合物对伪狂犬病毒抑制活性测定

化合物	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI
苯甲酰胺（R 为 3-叔丁氧羰基氨基哌啶， 1a ）	11.60±0.87	0.65±0.11	17.75

说明书

苯甲酰胺 (R 为 4-苄基氨基吡啶, Ib)	10.97±0.52	0.82±0.09	13.36
苯甲酰胺 (R 为 <i>N</i> -(3-三氟甲基苯基) 吡嗪, Ic)	25.12±1.38	1.63±0.23	15.34
阿昔洛韦	1420.50±40	148.21±9.76	9.58

实施例 5

苯甲酰胺化合物对大量病毒侵染细胞的保护作用

将 PK-15 细胞接种于细胞六孔培养板中, 加入细胞生长培养液, 待细胞长至 70-80%, 按如下操作处理:

药物组: 将实施例 1~3 的苯甲酰胺化合物(5 μ M)以及阿昔洛韦(200 μ M), 与感染复数 (MOI) =1 的病毒液接种于细胞六孔培养板中, 于 37℃ 中吸附 1h, 然后移除病毒稀释液, 用 PBS 清洗 2-3 次, 于 37℃, 5%CO₂ 中培养 48h。

病毒对照组: 将 MOI=1 的病毒液接种于细胞六孔培养板中, 于 37℃ 中吸附 1h, 然后移除病毒稀释液, 用 PBS 清洗 2-3 次, 加入 1mL 细胞维持培养液, 于 37℃, 5%CO₂ 中培养 48h。

溶剂对照组: 将 MOI=1 的病毒液接种于细胞六孔培养板中, 于 37℃ 中吸附 1h, 然后移除病毒稀释液, 用 PBS 清洗 2-3 次, 加入 1mL 含 1% 无水乙醇的细胞维持培养液, 于 37℃, 5% CO₂ 中培养 48h。

将上述培养 48 h 后的细胞培养板从培养箱中取出, PBS 清洗 3 次, 立即提取 DNA, 将提取的 DNA 样品, 利用 TaqMan 探针荧光定量方法检测各样品的 Cq 值, 并计算病毒拷贝数。结果如图 1 所示, 在大量病毒感染下, 苯甲酰胺化合物同样具有良好的抑制 PRV 增殖活性, 呈剂量依赖性。在浓度为 5 μ M 时, 病毒基因组拷贝数降低了超过 50 倍。

综上，本发明发现了一种新的、具有良好抗伪狂犬病毒活性的多取代苯甲酰胺化合物，研究表明式 **Ia~c** 所示的化合物能够抑制伪狂犬病毒活性，并且对大量病毒侵染细胞具有保护作用，因此表明该化合物能够用于制备具有伪狂犬病毒作用的食物和/或药品，在抗伪狂犬病毒药物开发方面具有良好的应用前景。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。