

2-位亚甲基头孢类抗生素的设计、合成与生物活性

赵录生¹, 王亚江^{2*}, 庞纪平¹, 刘志友², 李鹏旺¹, 赵平², 孟红²

1. 天津市医药集团有限公司, 天津 300204

2. 天津市医药集团技术发展有限公司, 天津 300193

摘要: **目的** 设计合成具有抗菌活性的2-位亚甲基头孢类抗生素。**方法** 以7-苯乙酰氨基-3-氯甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯(GCLE)为起始原料, 经Mannich反应、酶解、缩合等反应制得2-位亚甲基头孢类抗生素。通过微量稀释法测定了其标准金黄色葡萄球菌、标准肺炎克雷伯杆菌的最小抑菌浓度。**结果** 合成了4个新化合物8a~8d, 利用¹H-NMR和MS确证了结构, 初步测试显示较好的抗菌活性。**结论** 初步生物活性试验结果显示化合物8a、8b和8d对标准金黄色葡萄球菌的抗菌活性均与头孢克肟和头孢地尼相当, 化合物8a、8b对标准肺炎克雷伯杆菌的抗菌活性与头孢克肟和头孢地尼相当。

关键词: 2-位亚甲基头孢类抗生素; Mannich反应; 酶解; 抗菌活性

中图分类号: R914; R978

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)04-0487-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.005

Design, synthesis and bioactivity of 2-methylene-cephalosporin antibiotics

ZHAO Lu-sheng¹, WANG Ya-jiang², PANG Ji-ping¹, LIU Zhi-you², LI Peng-wang¹, ZHAO Ping², MENG Hong²

1. Tianjin Pharmaceutical Holdings Ltd., Tianjin 300204, China

2. Tianjin Pharmaceutical Tech-development Co., Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To design and synthesize 2-methylene-cephalosporin antibiotics for antibacterial activity. **Methods** 2-methylene-cephalosporin antibiotics were synthesized from the starting material GCLE via Mannich reaction, enzymolysis, and condensation, etc. The study on antibacterial activity was carried out using micro-dilution to detect the minimum inhibitory concentrations (MIC) on standard *Staphylococcus aureus* and standard *Bacillus canalis* capsulatus. **Results** The four novel compounds were synthesized. All the compounds were characterized by ¹H-NMR and MS. The preliminary test showed that the compound had good antibacterial activities. **Conclusion** Through the preliminary bioactivity test, the results show that the antibacterial activities of the compounds 8a, 8b, and 8d on standard *Staphylococcus aureus* are the same to those of cefixime and cefdinir, and the antibacterial activities of the compounds 8a and 8b on standard *Bacillus canalis* capsulatus are the same to those of cefixime and cefdinir.

Key words: 2-methylene-cephalosporin; Mannich reaction; enzymolysis; antibacterial activity

头孢类抗生素母核中含有β内酰胺环, 这是必不可少的药效基团, 大多数结构改造也是以此为母核进行的。近年来, 通过半合成结构改造, 在降低毒性、克服耐药性、改善生物利用度和提高疗效等方面, 已创制了不少具有高度抗菌活性的新品种^[1-2]。

构效关系研究认为, 可改造的部分有母核上的7、3、2位(图1)。7位酰胺键上侧链的改变对扩大抗菌谱, 提高抗菌活性有决定性作用; 3位侧链的改变对药物的活性及药动学有一定的影响; 2位的取代可增强对β内酰胺酶的抑制能力^[3]。本研究

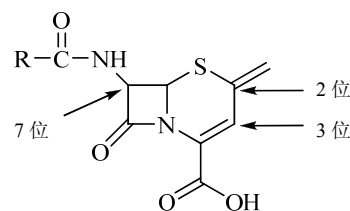


图1 头孢菌素化合物的基本结构

Fig. 1 Basic structure of cephalosporins compounds

通过在3位引入甲硫四氮唑基和噻二唑基, 在7位引入(Z)-2-甲氧亚氨基-2-(2-氨基-4-噻唑基)-硫代乙

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 天津市科技攻关计划重大科技项目(05YFGDGX09500)

作者简介: 赵录生(1965—), 男, 高级工程师。

*通信作者 王亚江, 男, 河北邯郸人, 助理研究员, 主要从事化学药物的研发和开发。Tel: 13820429877 E-mail: wangyj@tjpr.com

酸苯并噻唑酯 (AE 活性酯) 和 (Z)-2-(2-氨基噻唑-4-基)-2-甲氧羰基甲氧亚氨基硫代乙酸苯并噻唑酯 (头孢克肟活性酯) 的活性侧链, 设计合成了 4 个新化合物, 以用于进行头孢类药物的筛选。

如目标化合物的合成路线 (图 2) 所示, 以 7-苯乙酰氨基-3-氯甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯 (GCLE) 为起始原料, 分别和甲基四氮唑和甲

基噻二唑缩合, 然后经氧化、Mannich 反应、还原、酯解、酶解、再分别与 AE 活性酯和头孢克肟活性酯缩合^[4-9], 得到目标化合物 8a、8b、8c、8d。所合成的 4 个目标化合物均经 ¹H-NMR 和 MS 进行了结构确证。

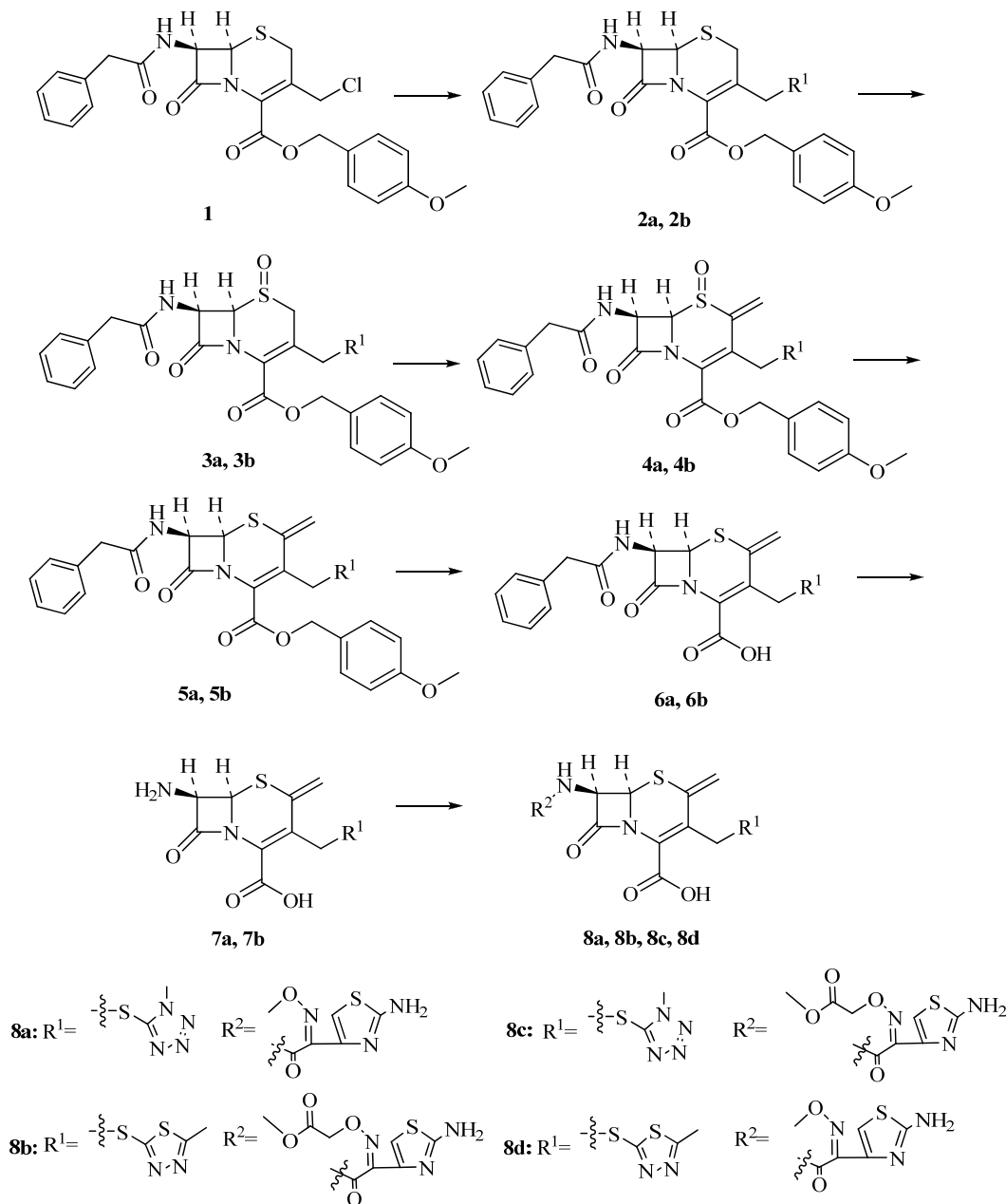


图 2 目标化合物的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of target compounds

1 仪器与试剂

Bruker ACP 400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); YRT—3 型数字熔点仪 (天津大学精密仪器厂)。

7-苯乙酰氨基-3-氯甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯 (GCLE) 为天津市医药集团技术发展有限公司提供 (质量分数 > 96%); 甲硫四氮唑为市售工业品, 其他试剂为市售化学纯或分析纯产品, 除

特别说明外, 不经处理直接使用。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 7-苯乙酰氨基-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯 (**2a**) 的合成 将甲硫四氮唑 14.5 g (125 mmol) 和适量二氯甲烷加入反应瓶中, 加入三乙胺 15 mL 和 GCLE (**1**) 50 g (103 mmol), 室温反应 10 h, 用饱和碳酸钠溶液洗至中性, 干燥, 浓缩得白色固体 55.9 g, 收率 96%。

用类似方法与甲基噻二唑 16.5 g 缩合制得 7-苯乙酰氨基-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯 (**2b**) 56.5 g, 收率 94%。

2.1.2 7-苯乙酰氨基-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯-1-氧 (**3a**) 的合成 将化合物 **2a** 29 g (51 mmol) 和适量甲苯加入反应瓶中, 加入乙酸酐 27.5 mL、过氧化氢 (质量分数 30%) 15 mL, 室温反应 3 h 后, 加饱和碳酸氢钠溶液和亚硫酸氢钠溶液调 pH 至中性, 滤过得白色固体 25.3 g, 收率 85%。

用类似方法由 **2b** 30 g 制得 7-苯乙酰氨基-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯-1-氧 (**3b**) 26 g, 收率 85%。

2.1.3 7-苯乙酰氨基-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯-1-氧 (**4a**) 的合成 将化合物 **3a** 25 g (43 mmol)、二乙胺 9 mL (87.8 mmol)、三氟乙酸 7 mL (93.3 mmol)、甲醛 8.5 mL (质量分数 37%, 89.5 mmol)、叔丁醇 75 mL、二噁烷 200 mL 在 50 °C 条件下反应 3 h, 然后将反应液滴至水中, 滤过, 得土黄色固体 20 g, 收率 80%。

用类似方法由 **3b** 27 g 制得 7-苯乙酰氨基-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯-1-氧 (**4b**) 22.8 g, 收率 82%。

2.1.4 7-苯乙酰氨基-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯 (**5a**) 的合成 将化合物 **4a** 6 g (10 mmol)、二氯甲烷 100 mL、*N,N*-二甲基甲酰胺 10 mL 加入反应瓶中, 冰浴条件下加入三氯化磷 3.5 mL (40 mmol), 反应 3 h 后, 加入水和二氯甲烷, 二氯甲烷层干燥, 浓缩得棕黄色固体 4.6 g, 收率 80%。

用类似方法由 **4b** 6.4 g 制得 7-苯乙酰氨基-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸对甲氧基苄酯 (**5b**) 4.8 g, 收率 80%。

2.1.5 7-苯乙酰氨基-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**6a**) 的合成 将化合物 **5a** 1.2 g (2 mmol)、苯甲醚 50 mL 加入反应瓶中, 室温条件下加入三氟醋酸 7.5 mL, 搅拌 3 h 后加入醋酸乙酯 50 mL, 搅拌 10 min, 滤过, 醋酸乙酯 25 mL 洗涤 2 次, 得白色固体 0.8 g, 收率 64%。

用类似方法由 **5b** 1.2 g 制得 7-苯乙酰氨基-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**6b**) 0.8 g, 收率 64%。

2.1.6 7-氨基-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**7a**) 的合成 将化合物 **6a** 4 g (8.7 mmol)、磷酸盐溶液 50 mL 加入反应瓶中, 室温下用质量分数 5% 的氨水调节 pH 值至 7.8, 加入固定化青霉素 G 酰化酶 4 g, 加入质量分数 5% 氨水调节 pH 值为 7.8, 保持恒定, 待 pH 值不变后, 用盐酸调 pH 值至 3, 析出白色固体, 滤过, 得白色固体 2.6 g, 收率 79%。

用类似方法由 **6b** 4.8 g 制得 7-氨基-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**7b**) 2.9 g, 收率 78%。

2.1.7 7-[(*Z*)[(2-氨基-4-噻唑基)(甲氧亚氨基)乙酰基]氨基]-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**8a**) 的合成 将化合物 **7a** 2 g (5.9 mmol)、丙酮 10 mL、水 5 mL 加入到反应瓶内, 搅拌降温至 10 °C, 滴加三乙胺 0.6 mL, 再加入 AE 活性酯 2 g (5.9 mmol), 反应 14 h。反应完毕后, 蒸去溶剂, 加水 10 mL, 滤过, 滤液加入活性炭脱色, 滤过, 盐酸调节 pH 值至 3, 析出沉淀, 静置过夜, 抽滤, 10 mL 丙酮洗涤, 得淡黄色固体 2.5 g, 收率 81%。

用类似方法由 **7b** 1.9 g 与头孢克肟活性酯缩合制得 7-[2-氨基-4-噻唑基-2-(羧甲氧基亚胺)乙酰氨基]-3-(1-甲基四氮唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**8b**) 1.8 g, 收率 65%。

同理由 **7a** 1.6 g 与头孢克肟活性酯缩合制得 7-[2-氨基-4-噻唑基-2-(羧甲氧基亚胺)乙酰氨基]-3-[[[(1-甲基-1*H*-5-四氮唑基)硫]甲基]-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**8c**) 2.3 g, 收率 78%。

同理由 **7b** 1.9 g 制得 7-[(*Z*)[(2-氨基-4-噻唑基)(甲氧亚氨基)乙酰基]氨基]-3-(1-甲基噻二唑基-5-巯甲基)-2-亚甲基-头孢-3-烯-4-羧酸 (**8d**) 1.3 g, 收率 62%。

所有目标化合物经过硅胶柱色谱纯化乙腈-水

(9:1) 洗脱得到纯品。

化合物 **8a**: ESI-MS m/z : 524.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, NCH₃), 4.68 (2H, d, $J=12.5$ Hz, SCH₂), 5.10 (1H, d, $J=4.4$ Hz, CH), 5.50 (2H, d, $J=13.1$ Hz, CH₂), 5.66 (1H, dd, $J=9.2$ 、5.1 Hz, NCH), 6.73 (1H, s, SCH), 7.19 (2H, s, NH₂), 9.61 (1H, d, $J=7.3$ Hz, NH)。

化合物 **8b**: ESI-MS m/z : 598.0 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.66 (3H, s, CH₃), 3.76 (3H, s, OCH₃), 4.85 (2H, d, $J=13.3$ Hz, SCH₂), 4.68 (2H, s, OCH₂), 5.14 (1H, d, $J=4.7$ Hz, SCH), 5.55 (2H, d, $J=13.8$ Hz, CH₂), 5.71 (1H, dd, $J=6.2$ 、3.8 Hz, NCH), 7.60 (1H, s, SCH), 7.23 (2H, s, NH₂), 9.61 (1H, d, $J=7.1$ Hz, NH)。

化合物 **8c**: ESI-MS m/z : 582.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.67 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, NCH₃), 4.56 (2H, dd, $J=13.3$ Hz, SCH₂), 4.68 (2H, s, OCH₂) 5.04 (1H, d, $J=4.8$ Hz, SCH), 5.54 (2H, d, $J=13.4$ Hz, CH₂), 5.82 (1H, dd, $J=8.0$ 、4.8 Hz, NCH), 6.77 (1H, s, SCH), 7.24 (2H, s, NH₂), 9.63 (1H, d, $J=6.9$ Hz, NH)。

化合物 **8d**: ESI-MS m/z : 540.0 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.66 (3H, s, CH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 4.84 (2H, d, $J=15.2$ Hz, SCH₂), 5.12 (1H, d, $J=4.3$ Hz, SCH) 5.53 (2H, d, $J=14.0$ Hz, CH₂), 5.67 (1H, dd, $J=7.8$ 、3.9 Hz, NCH), 6.73 (1H, s, SCH), 7.19 (2H, s, NH₂), 9.62 (1H, d, $J=6.9$ Hz, NH)。

2.2 体外抗菌活性测定

分别精确称量头孢克肟、头孢地尼、化合物 **8a**、**8b**、**8c**、**8d** 各 1.6 mg, 加 1~2 mL DMSO 溶解后, 加生理盐水稀释到 5 mL, 用 0.22 μ m 直径滤膜滤过除菌得 2 mL, 再用无菌生理盐水稀释到 5 mL, 得到 128 μ g/mL 的药液, 然后用肉汤培养基进行倍比稀释得到 64、32、16、8、4、2 μ g/mL 的药液, 平皿中培养基凝固后用多点接种器接种试验菌 (1×10^8 CFU/mL), 于 35 $^{\circ}$ C 恒温培养 18 h 后观察结果, 无菌生长的平皿中所含的最低浓度即为最低抑菌浓度 (MIC), 结果见表 1。

以头孢克肟和头孢地尼为对照, 测定了 4 个目标化合物对标准金黄色葡萄球菌和标准肺炎克雷伯杆菌的 MIC, 结果表明, 化合物 **8a**、**8b**、**8d** 对标准金黄色葡萄球菌的抗菌活性均与头孢克肟和头孢地尼相当, 化合物 **8a**、**8b** 对标准肺炎克雷伯杆菌的抗菌活性与头孢克肟和头孢地尼相当。

表 1 目标化合物的 MIC 值

Table 1 MIC of the target compounds

化合物	MIC/(mg·mL ⁻¹)	
	标准金黄色葡萄球菌	标准肺炎克雷伯杆菌
头孢克肟	4	8
头孢地尼	4	8
化合物 8a	4	8
化合物 8b	4	8
化合物 8c	8	32
化合物 8d	4	16

致谢: 生物活性测试由天津药物研究院新药创新中心协助完成。

参考文献

- [1] 孙常晟. 药物化学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 201-211.
- [2] 尹 鹏, 周晓靓, 王荣先. β -内酰胺环改造及生物活性的研究进展 [J]. 天津药学, 2005, 17(6): 45-48.
- [3] 张士国, 李 红, 张向东, 等. 青霉素、头孢菌素分子结构与抗菌活性的关系 [J]. 化学研究与应用, 1997, 9(5): 500-503.
- [4] 马红梅, 王文梅, 鲍福刚, 等. C-3 位含硫甲基头孢菌素中间体的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(6): 278-280.
- [5] 孟 红, 王亚江, 赵 平, 等. 头孢类化合物的设计、合成和生物活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21(4): 267-272.
- [6] Gunda T E, Tamás L, Sályi S, *et al.* A very mild and quantitative oxidation of cephalosporins with dimethyldioxirane [J]. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36(39): 7111-7114.
- [7] Gunda T E. Mannich Reactions of cephalosporin sulfoxides and sulphones with imonium salts. An improved synthesis of 2-methylene-cephalosporins [J]. *Synth Commun*, 1992, 22(20): 2979-2986.
- [8] Spry D O. Tricyclic cephalosporins [P]. US: 3907785, 1975-09-23.
- [9] Barendse, Nico C M E, van der Klein, *et al.* Synthesis of the β -lactamase indicators cefesone and nitrocef [J]. *Synthesis*, 1998, 30(2): 145-147.