



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103772696 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410003747. 2

(22) 申请日 2014. 01. 06

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄西
路 336 号

(72) 发明人 王海龙 刘善奎 谭晓军

(51) Int. Cl.

C08G 65/333 (2006. 01)

C08G 65/332 (2006. 01)

C08G 65/22 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 31/4745 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

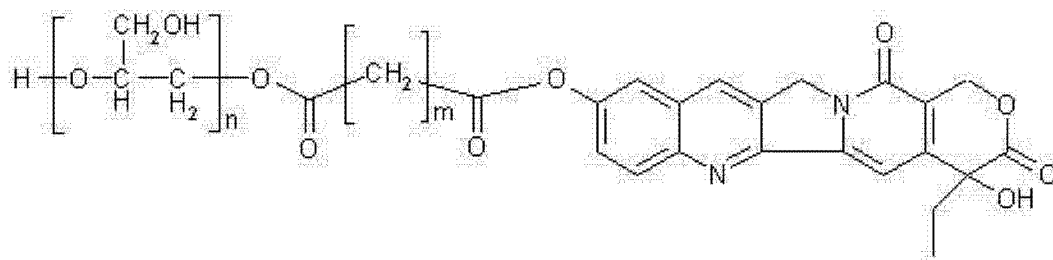
(54) 发明名称

一种羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物

(57) 摘要

本发明涉及一种羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物,其特征 在于聚甘油脂肪酸与羟基喜树碱 10 位羟基形成酯的结构。本发明介绍了其结构特征、常规制备方法以及在抗肿瘤药物方面的用途。

1. 一种羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物,其特征在於聚甘油脂肪酸与羟基喜树碱 10 位羟基形成酯的结构,其结构如式 I 所示:



式 I

其中, n 值为 3~50, m 值为 1-5。

2. 权利要求 1 所述的化合物,其特征在於聚甘油部分为带有侧链的聚甘油。
3. 权利要求 1 所述的化合物,其特征在於聚甘油部分的聚合度 n 优选为 10 或 20。
4. 权利要求 1 所述的化合物,其特征在於脂肪酸部分的 m 值优选为 2 或 3。
5. 权利要求 1 所述的化合物及其组合物,其用途为用于制备抗肿瘤药物。

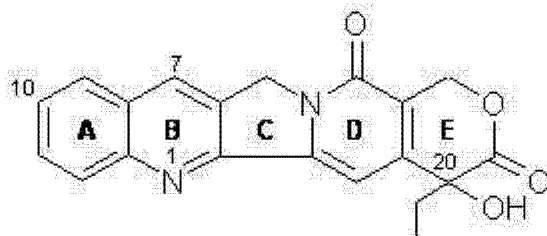
一种羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物

技术领域

[0001] 在此处键入技术领域描述段落。本发明涉及药物领域,特别是涉及一种羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物及其制备方法,以及其在制备抗肿瘤药物方面的用途。

背景技术

[0002] 喜树碱(Camptothecin, CPT),其结构如式(I)所示,最早由美国科学家 Wall 从中国特有植物喜树中分离得到,是一种有毒生物碱。喜树碱具有优异的抗肿瘤活性,但也有很大的毒副作用。喜树碱抗癌作用的优异表现,引起人们很大的兴趣,相继对它天然存在的或人工合成的类似物进行研究,以寻找新的抗肿瘤药物。在这其中,羟基喜树碱(Hydroxycamptothecin, HCPT)与喜树碱相比,具有抗癌疗效更高、毒副作用更少的优点,在胃癌、肝癌、白血病、乳腺癌、头颈部肿瘤的治疗中具有很强的应用价值,在我国临床中已广泛使用;羟基喜树碱的衍生物,10-羟基-7-乙基喜树碱(SN-38)的水溶性前药(Iriontecan,伊立替康)、10-羟基-9-二甲氨基甲基喜树碱(Topotecan,托普替康)也已分别于1994年和1999年上市,用于结直肠癌、卵巢癌及小细胞肺癌的治疗。除此之外,还有大量的喜树碱类似物或衍生物尚在研发之中,如中国专利文献 I (授权公告号 CN100432076/C)介绍了含有二氢呋喃环的喜树碱衍生物,中国专利文献 II (申请公布号 CN102574866A)介绍了14-硝基、14-氨基和14-取代氨基喜树碱衍生物,中国专利文献 III (申请公布号 CN102731772A)介绍了喜树碱类化合物的聚乙二醇衍生物。



[0003] 式(I)喜树碱的化学结构

研究表明,喜树碱及其类似物的抗肿瘤活性,主要是通过抑制肿瘤细胞的拓扑异构酶 I (Topo I)的活性而发挥作用。在细胞分裂的 DNA 的复制过程中,Topo I 和 DNA 结合形成一个二元复合物,并使 DNA 在复制过程中有一个暂时的单链缺口,使其半保留复制能够顺利进行。若在此过程中给予喜树碱或其衍生物,其可以在细胞分裂的 S 期与 Topo I-DNA 复合物特异性结合,形成一个不可逆的 Topo I-CPT-DNA 三元复合物,使 DNA 的复制终止,从而产生对细胞的杀伤作用。

[0004] 喜树碱及其类似物对拓扑异构酶 I 的独特抑制作用,与其 E 环存在的内酯结构密切相关。因为研究表明,只有内酯形式的喜树碱才能和 Topo I-DNA 形成稳定的复合物,这可能是其发挥抗癌作用的重要环节。而内酯形式的喜树碱及其类似物,由于内酯的不稳定很容易可逆性开环以羧酸形式存在,因而在人血浆中存在着两种形式的平衡。由于只有酸性环境才有利于内酯形式的存在,且羧酸形式与血浆蛋白结合力更高,所以喜树碱及其

类似物进入血液后,其内酯形式的浓度要远远低于羧酸形式的浓度。更加不利的是,羧酸形式的喜树碱及其类似物抗肿瘤活性较内酯形式明显下降且不良反应增强,而内酯形式的喜树碱几乎不溶于水,且具有生物半衰期短,组织结合性差等不利特点。因此,提高喜树碱类似物的水溶性,延长其体内滞留时间,增加代谢的稳定性成为此类化合物及其制剂研究的重点。

[0005] 喜树碱类化合物生物半衰期短、几乎不溶于水的缺陷,目前上市的剂型并没有很好地解决。如在中国上市的“羟基喜树碱氯化钠注射液”和“注射用羟基喜树碱”,为了解决其在水中的溶解度问题,利用和碱的反应促使内酯环打开形成羧酸盐。虽然水溶性提高了,但由于内酯形式的羟基喜树碱浓度过低,仍存在着抗肿瘤活性明显降低,毒副作用增加的缺陷。

[0006] 为提高临床疗效,改善喜树碱类似物的诸多不利特点,人们的研究方向主要集中在两个方面。第一,对喜树碱的化学结构进行各种改造,如增加亲水性基团,使用前药技术等,国内外在这方面有大量的文献报道(如前述的中国专利文献 I ~ III),也取得了一定的应用性成果,如药物伊立替康和托普替康的上市。但这些应用性成果仍然存在着一些难以解决的问题,如药物在体内的分布和作用时间不尽如人意,使用不便等。为了解决这一类问题,人们相继在第二方面进行努力,即使用一些新型的药物递送系统(如纳米粒、脂质体、微乳、胶束等)以期达到理想的效果。这些新型药物递送系统,改变了喜树碱及其类似物在体内的药代动力学参数和生物分布特性,具有缓释、体内滞留时间延长、药物传递量增加等效果,从而能够起到提高疗效,减轻毒副作用的目的。

[0007] 在这些新型药物递送系统中,为增强药物的水溶性,延长体内循环时间,利用聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)对传递的药物或对药物递送系统本身进行修饰,是一种十分常见的选择。如美国FDA批准的第一个脂质体药物阿霉素便是采用聚乙二醇修饰的磷脂组方的,Hong Minghuang等(非专利文献 I, Journal of Controlled Release, 2010, 141: 22-29)将转铁蛋白、聚乙二醇与羟基喜树碱相结合,以增强其水溶性和靶向性,达到了良好的效果,刘克良等人的中国专利(中国专利文献 III)也提供了喜树碱类化合物的 PEG 化衍生物的制备方法及其用途,有关利用聚乙二醇对药物进行修饰更多的文献可以参考张越等人的综述(非专利文献 II, 河北科技大学学报, 2013, 34, 4: 355-365)。

[0008] 但是,PEG 修饰的药物及药物递送系统也存在一定的问题,其中最明显的便是聚乙二醇化的药物递送系统首次给药后,后续剂量的药物在血中循环时间变短,并在肝和脾中大量聚集,达不到有效的药物浓度及作用时间,这被称为“加速血流清除现象(accelerated blood clearance phenomenon, ABC)”。关于“ABC 现象”,在许多利用 PEG 修饰的药物或药物递送系统中,很早就被人们所发现,相关的报道也很多,如 Cheng TL 在 1999 年就介绍了由聚乙二醇修饰的蛋白引发抗 PEG 的 IgM 而出现快速被清除现象(非专利文献 III, Bioconjugate Chemistry, 1999, 10: 520-528)。对于由 PEG 引发的“ABC 现象”,其具体成因尚没有明确结论,有报道(非专利文献 IV, Journal of Controlled Release, 2006, 115: 243-250)认为“ABC 现象”是人体先天免疫系统作用的结果,其机理可能与 PEG 中的 $\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-}$ 重复单元有关,当 PEG 修饰的药物或药物递送系统第一次到

达免疫器官脾时, $\ast\text{---}\left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right]_n\text{---}\ast$ 链与脾边缘区的活性 B 细胞上的免疫球蛋白和相结合, 对 B 细胞产生特殊的刺激, 使其分泌抗 PEG 的 IgM, 从而导致药物或其传递系统在肝和脾聚集, 血中药物浓度降低而出“加速血流清除现象”, 使药物的作用时间缩短。

[0009] 聚甘油(Polyglycerol, PG)是重要的精细化工产品 & 合成中间体, 早在 20 世纪初其合成研究就已被报道, 但因产品质量问题, 在食品、医药和日化等方面的应用受到限制。近年来, 随着人们对聚甘油的深入研究和改进, 其品质大大提高, 目前, 已有一些大公司(如比利时苏威集团的苏威化学品、日本阪本药品工业株式会社、意大利 SPIGA 公司和济南东润精化科技有限公司等)提供商品化的高品质聚甘油, 可直接应用于化妆品及医药产品中。

[0010] 为了避免或减轻药物或药物递送系统的“ABC 现象”, 人们进行了许多其他有益的尝试。其中有文献(非专利文献 V, International Journal of Pharmaceutics, 2013, 456:235-242)将聚甘油修饰的磷脂酰乙醇胺(PG-DSPE)代替聚乙二醇修饰的磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)用于阿霉素脂质体的制备, 有效避免了“ABC 现象”。其

机理可能在于以支链聚甘油修饰的脂质, $\ast\left[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{O}\right]_n\text{---}\ast$ 重复单元中 $\text{---CH}_2\text{OH}$ 侧链的存在构

成立体位阻, 阻碍了 B 细胞免疫球蛋白与重复单元的相互作用和(或)有效结合, 使得 B 细胞缺乏有效的特殊刺激, 无法分泌或分泌极少的抗 PG 的 IgM, 从而消除或减少“ABC 现象”。但该研究仅局限于构成脂质体的磷脂材料, 对药物本身用聚甘油修饰会产生何种效果未做提及。

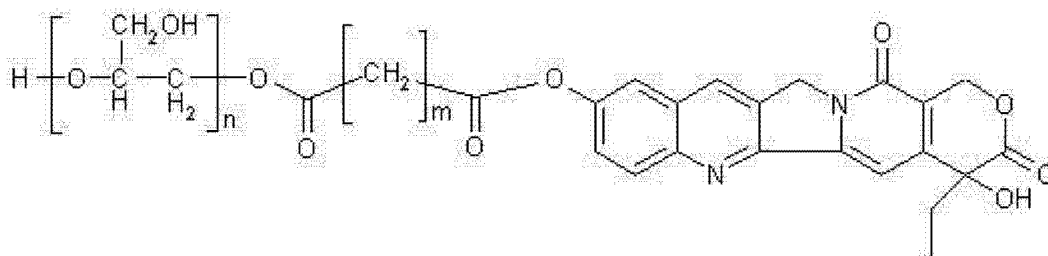
[0011] 因此, 针对喜树碱类化合物水中溶解度低、体内分布不佳、作用时间短、毒副作用强等缺点开发一种非聚乙二醇修饰的新的药物衍生物, 显得更有实际意义。

[0012]

发明内容

[0013] 本发明人通过研究发现, 喜树碱在 10 位羟基化生成羟基喜树碱后, 经聚甘油脂肪酸酯修饰, 其抗肿瘤活性无明显变化, 毒副作用降低, 在水中的溶解度大幅提高, 在体内的循环时间延长, 没有明显的“ABC 现象”。

[0014] 本发明涉及的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物, 其化学结构如式(II)所示。此结构为聚甘油的直链脂肪酸与羟基喜树碱 10 位羟基形成的酯结构。



[0015] 式(II)羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物化学结构

本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物, 其特征在于聚甘油部分为带有侧链的聚甘油, 聚甘油的聚合度 n 为 3-50, 优选值为 10 或 20。

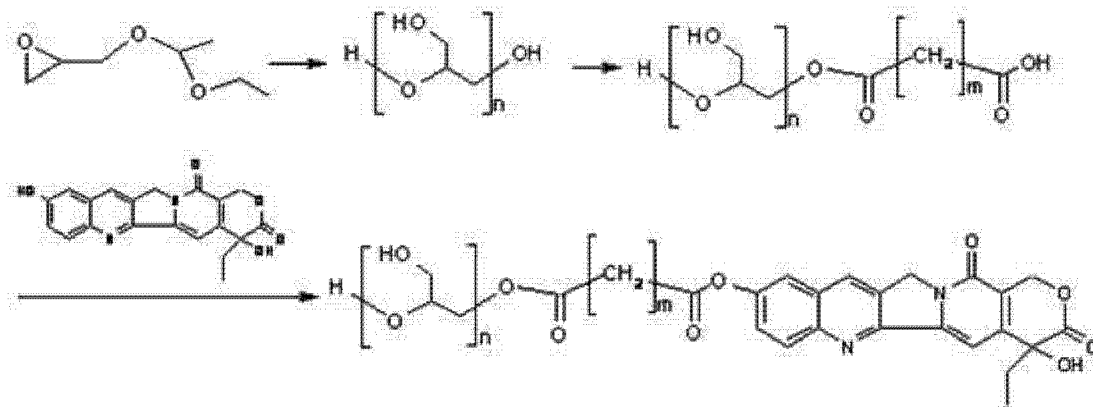
[0016] 本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物, 其特征在于 m 为 1-4, 优选值为 2

或 3。

[0017] 本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物,其用途为用于制备抗肿瘤药物。

[0018] 本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物, m 值为一确定的数值,聚甘油部分可为 n 值唯一确定的单一化合物,也可为以确定的 n 值为中心,具有一定分子量分布范围的化合物混合而成的高分子混合物。本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物,其优选化合物为羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯(代号为 PG1500-HCPT)。

[0019] 本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物,可以通过简单的化学方法合成而得到。其一般合成路线如式(III)所示。



[0020] 式(III)羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物一般合成路线

本发明以乙氧基乙基缩水甘油醚为原料,合成了羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物。各化合物经 HPLC 以及 TLC 分析,经质谱及氢谱、碳谱核磁分析,确认结构正确。

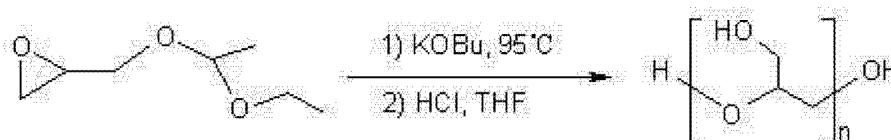
[0021] 根据本发明,本发明的羟基喜树碱的聚甘油脂肪酸酯衍生物,可用于制备抗肿瘤用途的药物及这些抗肿瘤药物在各种新型药物递送系统,包括但不限于纳米粒、脂质体、微乳、胶束等制备中的应用。

具体实施方式

[0022] 以下通过具体实施示例的形式对本发明的上述内容进行进一步的详细说明,但本发明的范围不仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均包含在本发明的范围之内。

[0023] 实施例一:羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯(PG1500-HCPT)的合成

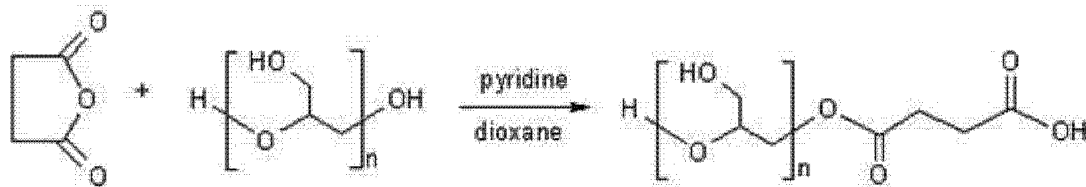
1. 聚甘油 1500 的合成(参考非专利文献IV, Journal of American Chemical Society 2002, 124: 9698-9699)



叔丁醇钾(0.7g, 6mmol)和乙氧基乙基缩水甘油醚(5.3g, 36mmol)置于烧瓶中,在 120°C 下减压蒸去叔丁醇。将反应物移入三颈瓶中,加温至 95°C,在不断搅拌和氮气流下,将乙氧基乙基缩水甘油醚(136.8g, 0.96mol)以 4mL/min 的速度滴入上述反应物中,滴加完

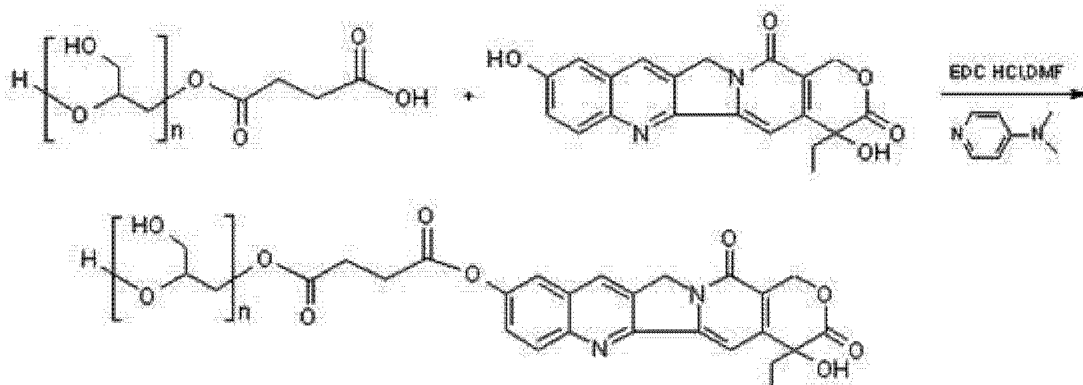
成后继续反应 6 小时。反应结束后,在反应混合物中加入四氢呋喃和盐酸,随后减压除去四氢呋喃。加入少量甲醇使反应物溶解,然后加入丙酮振荡,静置弃去上层溶液,此操重复两次。反应得到的下层的溶液在 80℃ 下减压除去溶剂,即得到平均分子量为 1500 的聚甘油 (48.1g,收率约 33%)。

[0024] 2. 聚甘油 1500 琥珀酸的合成



聚甘油 1500 (3.0g, 2mmol) 和丁二酸酐 (0.2g, 2mmol) 溶于 100mL 二氧六环中,加入少量吡啶作催化剂。上述溶液加热回流 24 小时以上直至反应达到平衡。反应物冷至室温后,加入乙醚析出沉淀,混合物在冰浴下搅拌 30 分钟,过滤得聚甘油 1500 琥珀酸粗品。粗品加入适量二氯甲烷溶解,再加入乙醚析出沉淀,混合物在冰浴下搅拌 15 分钟,将沉淀滤出并干燥,得聚甘油 1500 琥珀酸 (2.3g, 收率 44%)。

[0025] 3. 羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯的合成



羟基喜树碱 (0.29g, 0.8mmol)、聚甘油 1500 琥珀酸 (0.64g, 0.4mmol) 溶于 50mL 的无水 N, N-二甲基甲酰胺中,加入 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 280mg 和 1,4-二甲氨基吡啶 12mg。混合物在氮气保护下冰浴下搅拌反应 2 小时,然后再室温放置 24 小时。反应混合物中加入 5% NaHCO_3 以除去多余的羟基喜树碱,剩余物用二氯甲烷萃取 (100mL $\times$ 3),然后再分别用 5% NaHCO_3 溶液、水、0.1mol/L 的盐酸及饱和氯化钠溶液进行洗涤,减压浓缩得粗品。粗品为淡黄色固体,再用乙醚重结晶,得到类白色羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯固体。 ^1H NMR (DMSO): δ 0.82 (t, 3H, H-18), δ 1.91 (m, 2H, H-19), δ 3.23 - 4.57 (-CH₂OH), δ 5.26 (s, 2H, H-5), δ 5.46 (s, 2H, H-17), δ 7.37 (s, 1H, H-14), δ 7.60 (dd, 1H, H-11), δ 7.88 (d, 1H, H-9), δ 8.20 (d, 1H, H-12), δ 8.64 (s, 1H, H-7)。

[0026] 实施例二:羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯的抗肿瘤活性的评价

选择人肝癌细胞 HepG2, 人红白血病 K562 细胞两种细胞株,接种细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中,置于 37℃ 含 5%CO₂ 的细胞培养箱中,每 2 天换液一次,以 0.25% 胰酶消化分散细胞,并用锥虫蓝测试细胞活性,要求肿瘤细胞活性达 95% 以上。按每孔 10000 细胞数接种于 96 孔培养板中,在细胞培养箱中培养 4 小时,每孔加入 20 μL 药液,受试药

物浓度依次为 10.0、5.0、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625 $\mu\text{g/mL}$ ，每种药物浓度各设 5 个复孔，对照组加 DMEM 培养液，在 37℃ 含 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 72 小时。每孔加入新鲜配制的 0.5 mg/mL 四氮唑蓝的无血清培养液，于 37℃ 再培养 4 小时后弃上清。每孔加入二甲亚砜 200 μL ，使充分溶解，设定检测波长为 570 nm，参比波长为 450 nm，用酶标仪检测吸光度(OD 值)。按公式(1) 计算对肿瘤的抑制率，利用 Origin 软件作图，求出半数浓度(IC₅₀)，并给出实测最大最大抑制率(I_{max})，具体结果见表 1。由表中数据可见，羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯与羟基喜树碱对两种肿瘤细胞抑制作用相当，二者无明显差异。

$$[0027] \quad \text{抑制率} = \frac{(\text{对照组 OD 值} - \text{给药组 OD 值})}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

表 1 羟基喜树碱与羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯对肿瘤细胞生长的抑制作用

细胞	羟基喜树碱		羟基喜树碱聚甘油 1500 琥珀酸酯	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	I _{max} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	I _{max} (%)
HepG2	0.232	86.0	0.385	78.1
K562	<0.15625	92.3	<0.15625	93.3