

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817137.3

[51] Int. Cl.

A61K 31/409 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07D 487/22 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100406010C

[22] 申请日 2002.8.29 [21] 申请号 02817137.3

[30] 优先权

[32] 2001.8.31 [33] JP [31] 264918/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/008707 2002.8.29

[87] 国际公布 WO2003/018007 日 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.1

[73] 专利权人 前田浩

地址 日本熊本县熊本市

[72] 发明人 前田浩 泽智裕

[56] 参考文献

US5849259A 1998.12.15

DE2645079A 1978.4.13

WO9118006A 1991.11.28

水溶性金属卟啉衍生物的合成及其对癌细胞生长的抑制活性. 孙炳银, 李淑蓉, 长尾则男, 宇田泰三. 中国药学杂志, 第 30 卷第 12 期. 1995

审查员 杜文华

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 5 页

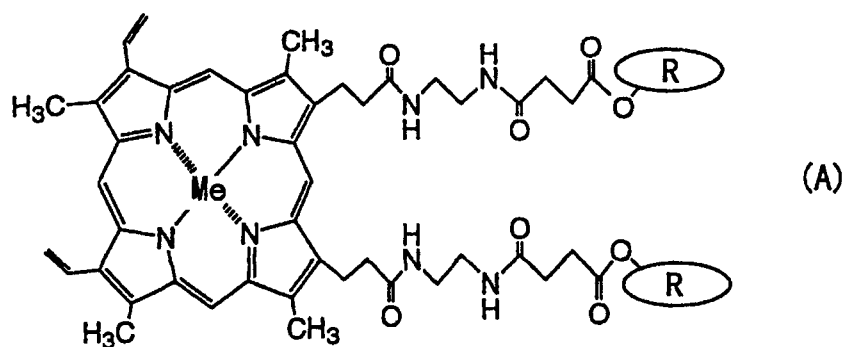
[54] 发明名称

抗癌剂及其制备方法

[57] 摘要

含有与两性或水溶性聚合物(尤其是与聚乙二醇结合的锌-原卟啉(ZnPP))相结合的血红素加氧酶抑制性金属卟啉衍生物作为活性成分的抗癌剂。因为与聚乙二醇之类的两性或水溶性聚合物相结合,这类活性成分可通过静脉注射施用,并且由于它具有肿瘤定向选择性传输作用,因而可产生显著的抗癌效应。

1. 通式(A)表示的与聚乙二醇相结合的血红素加氧酶抑制性金属卟啉衍生物,



其中, R 是聚乙二醇, Me 是 Zn。

2. 制备如权利要求 1 所述的与聚乙二醇相结合的血红素加氧酶抑制性金属卟啉衍生物的方法, 其特征在于, 所述方法包括将乙二胺引入原卟啉 IX, 通过添加活性聚乙二醇将聚乙二醇链引入原卟啉, 最后将 Zn 原子螯合入卟啉环。

抗癌剂及其制备方法

发明领域

本发明涉及具有轻微副作用且在肿瘤内良好积聚，因而有非常强的抗癌效应的抗癌剂，以及其制备方法。具体而言，本发明涉及含有与两性或水溶性聚合物相结合的血红素加氧酶抑制性金属卟啉衍生物作为活性成分的抗癌剂。本发明还涉及这类抗癌剂的高效制备方法。

背景技术

本发明的发明者研究了有关癌症生长或其抑制过程与血红素加氧酶活性之间的相互作用，发现该种血红素加氧酶可在肿瘤组织内高度表达。血红素加氧酶可在肿瘤或正常组织中降解血红素并产生胆绿素(biliverdin)、一氧化碳和游离态铁。

胆绿素在细胞内很容易转化为胆红素，这种胆红素是十分强力的抗氧化物。从而，胆红素能够在宿主(癌症患者)体内起着抵抗白血细胞产生的各种活性氧(如超氧化物、 H_2O_2 或一氧化氮等)的防卫物质的作用。也就是说，这样产生的胆红素，可抵消能够在宿主体内抵抗癌症细胞或感染的微生物的毒性氧化防卫能力。因而，一旦阻遏了血红素加氧酶，就不再有胆红素产生，肿瘤细胞也就会被白血细胞固有的防卫能力所产生的各种氧化物质所杀死。

本发明的发明者曾探索了锌原卟啉(ZnPP)这种血红素加氧酶抑制剂的抗肿瘤效应。他们将该抑制剂质注入患肿瘤大鼠的肿瘤供血动脉，使之定向选择性传输入肿瘤部位，从而确证了其在大鼠中的抗肿瘤作用(K. Doi 等: Br. J. Cancer 80, 1945-54, 1999)。

不过，使用 ZnPP 作为抗肿瘤药物在其性质上还存在一些问题。首先，它本身几乎不溶于水，因而我们采用油性配方来溶解 ZnPP，以至这种油性方剂只能选定肿瘤供血动脉施行注射，如此操作，与通常的静脉内或皮下注射相比较，要求具备相当熟练精细的技巧。其次，对于原生的或原始的 ZnPP，无法保证其(ZnPP)在癌症组织内具有选择性积聚作用，并产生肿瘤选择性抗癌效应，该药物会在除了肿瘤之外的全身广泛分布。因而，就要关注其各种意外的副作用。

相反,本发明的发明者都是在实体肿瘤的血管渗透性方面具有专门研究的肿瘤生物学专家,对于大分子治疗药剂对肿瘤组织(由于其独有的解剖学特性以及多种血管渗透性因素的作用,而)具有较大的选择性渗透作用方面,具备丰富的知识;而且,还了解可在各种肿瘤组织内长期长期滞留的各种大分子物质。因而,这种现象被定名为“增强的渗透性和滞留(EPR)效应”(Y. Matsumura, H. Maeda: Cancer Res 47: 6387-92, 1986; H. Maeda: 《酶调节作用进展》(Advances in Enzyme Regulation) (G. Weber 编), Elsevier 科学有限公司,阿姆斯特丹, 41, 189-207, 2001)。

根据 EPR 效应的观点,凡是其分子量大于 40,000 的各种药物,都可在血浆中长时间保持高浓度存在,可在静脉注射后滞留数小时甚至数天之久;而在肿瘤内的浓度更可在 24-48 小时内提高数倍之多。这意味着,如果药物的分子量更大于 40,000,这类大分子药物就有可能对肿瘤部位进行定向选择。

同时,还对对于血红素加氧酶具有抑制作用的金属卟啉衍生物及其改良的施用方法,一起配套进行了研究。其研究结果是,将两性或水溶性聚合物与金属卟啉相结合,就可能使之形成水溶性金属卟啉衍生物,从而具有多能性并便于临床使用,不必进行动脉内施用,而且可施行静脉注射。其通过聚合过程所呈现的 EPR-效应,可产生在肿瘤内高度有效的积聚作用,以及长期保持对血红素加氧酶的酶抑制活性。据在小鼠中的实验结果表明,只要注射 2-3 次,就可能完全抑制肿瘤的生长,这是一个显著的结果。

有关对于血红素加氧酶具有抑制活性的金属卟啉衍生物与两性或水溶性聚合物相结合的问题,在过去尚未见过报道,此前更未曾见到关于其制备方法的介绍。本发明的发明者研究制定了一种通过酰胺键将两性或水溶性聚合物与金属卟啉相结合的合成方法。由此种方法制成的与聚合物相结合的金属卟啉衍生物,都是过去未曾报道过的新的化合物系列。

发明概述

本发明是以对血红素加氧酶具有抑制活性的金属卟啉衍生物作为活性成分的抗癌剂,尤其是与水溶性和脂溶性两性聚合物或水溶性聚合物结合的锌-原卟啉(ZnPP)。

本发明还涉及用两性或水溶性聚合物通过酰胺键与不同的血红素抑制性金属卟啉衍生物相结合,可用作抗癌剂配料的一类新颖有效化合物系列,以及这类化合物的制备方法。

附图简述

图 1 所示是与乙二胺偶合的原卟啉以及聚乙二醇(PEG)结合的原卟啉的凝胶过滤层析图象。

图 2 所示是血红素加氧酶 PEG-ZnPP 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线图。

图 3 所示是流式细胞仪分析数据,其中,培养的癌细胞经聚乙二醇-锌原卟啉处置后呈现更强的氧化物曝光特性。

图 4 所示是 PEG-ZnPP 在患有实体瘤的小鼠模型中的抗肿瘤效应。

图 5 所示是经静脉内施用 PEG-ZnPP 时或施用后体重的变化情况。

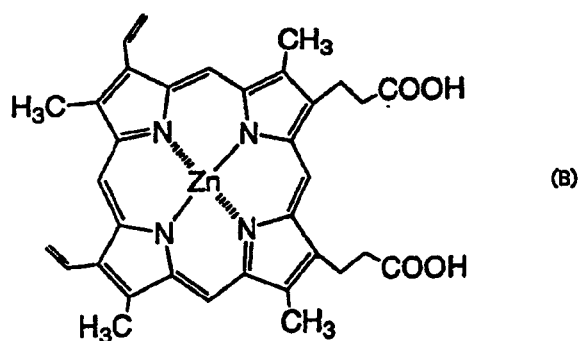
实施本发明的最佳实施方案

被结合的两性或水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、各种明胶、以及上述各种物质的衍生物,例如,琥珀酰化衍生物、聚氨基酸衍生物(如聚合型的天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、酪氨酸等),羟丙基和其他烷基丙烯酸酯聚合物、苯乙烯马来酸共聚物(SMA)和它们的衍生物。在这些具有两性和水溶性特征的聚合物中,更加优选的是 PEG 和 SMA。优先采用的聚乙二醇的分子量为 2000-5000。

SMA 是苯乙烯与马来酸的可变顺序的共聚物,其中马来酸的羧基可供直接或间接与金属卟啉相结合。SMA 共聚物本身或其衍生物中的马来酸可部分酯化。

金属卟啉衍生物是一种复杂的化合物,其中的金属以稳定的配位作用与卟啉环螯合,优选采用原卟啉是因为其在各类卟啉化合物中容易取得。

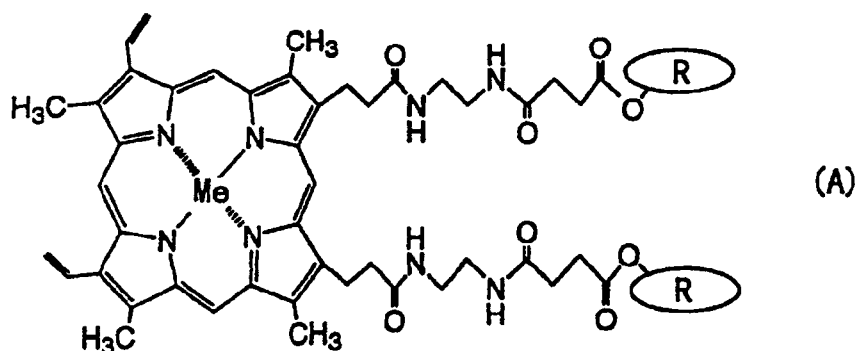
在可供协调的金属成分中,对于血红素加氧酶并无抑制作用的铁,具有毒性的汞,以及不能形成协调性螯合作用的各种单价金属,都不可采用。除上述之外的其他金属,例如,锌、锡、钴和铜等都可以使用,其中优选采用的是锡和锌复合物。不过,已知锡也具有毒性。因而,最理想的就是 ZnPP,其化学结构如下图(B)所示。



本发明的抗癌剂是将金属卟啉与两性或水溶性聚合物结合而获得的任何大分子化合物。然而,据我们发现,由于金属卟啉是非水溶性的,因而这类聚合物很难与金属卟啉进行直接结合。为了实现这类化学结合过程,最好在金属配位之前使聚合物与卟啉结合,然后将金属配合。

直接地以及引入合适的功能性间隔物基团都可容易地使卟啉与聚合物相结合。

例如,在对 ZnPP 进行合成时,可将聚合物与原卟啉中的两个羧基团直接相结合,但是这种直接结合方法并不合适,因为所述的各羧基团在这种反应过程的活性很差。本发明的研究人员已经探索出了对于 PEG 与 ZnPP 相结合的几种有效的合成方法,并且已经成功地通过酰胺键使 ZnPP 与 PEG 相结合的合成过程(式(A))。



(上式中的 R 是指两性或水溶性聚合物, Me 是金属)

聚合物结合的 ZnPP(B)可按如下连续反应程序进行合成:

- (1) 在原卟啉 IX 中引入一个氨基;
- (2) 使之与聚合物相结合; 最后
- (3) 将锌成分配位进卟啉环内。

例如, PEG 与 ZnPP 相结合的反应步骤图解程序如下:

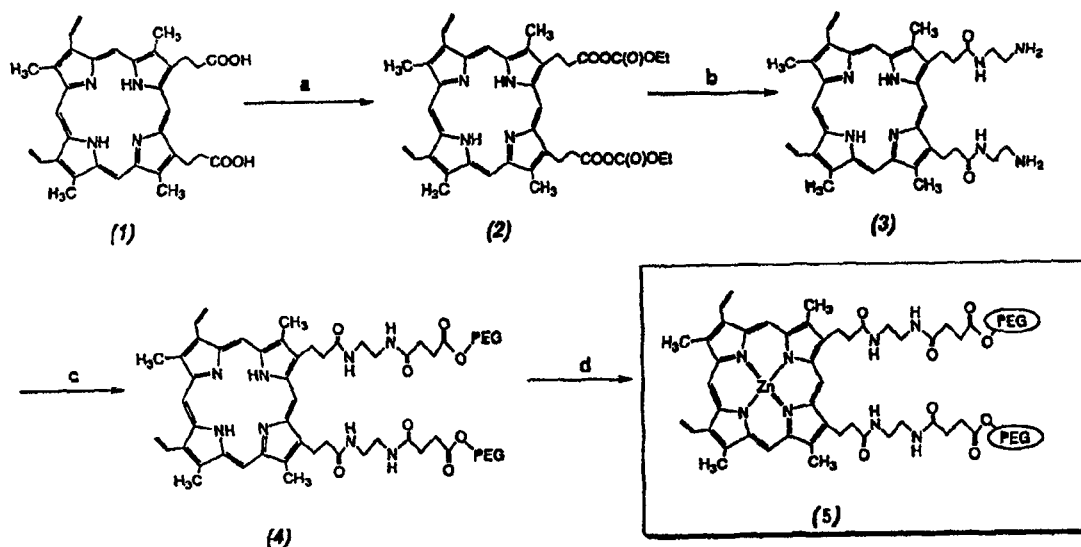
[反应(a)] 用溶于四氢呋喃的氯甲酸乙酯(化合物(2))活化原卟啉 IX(化合物(1));

[反应(b)] 添加乙二胺就可获得带有二氨基的原卟啉(化合物(3));

[反应(c)] 添加活化的 PEG(化合物(4))将 PEG 引入原卟啉环;

[反应(d)] 最后, 在反应(c)的产物中添加乙酸锌而获得 PEG-ZnPP(化合物(5))。

如果添加乙酸锡, 就可以锡替代锌, 而获得聚乙二醇-锡原卟啉(PEG-SnPP)。



在两性或水溶性聚合物中，除了 PEG 之外，例如将化合物(3)和 SMA 进行类似的缩合也可使 SMA 与原卟啉相结合。

在式(A)所示的与两性或水溶性聚合物相结合的血红素加氧酶抑制性金属原卟啉可选择性地在实体瘤中积聚，并表现良好的抗肿瘤活性作用。因而这是一类新颖有效的抗肿瘤物质。可作为化合物(A)的一个范例的化合物(5) (其中的金属成分是锌，R 则是聚乙二醇)，是按照(a)至(d)所示的程序进行合成的。该反应产物的化学结构通过下列分析步骤进行了验证。

首先，对于导入原卟啉(化合物(3))的乙二胺的氨基的证据，是通过如下程序验证的：

- (1) 在 1641 cm^{-1} 、 1552 cm^{-1} 的红外吸收光谱显示了该化合物中有一个新形成的酰胺键(化合物 3 的结构)；
- (2) 以质谱仪分析法(MS)检测该化合物的分子量是 646，与根据化合物 3 的分子式计算的数值相同；

然后，将 PEG(分子量约为 5000)与氨基偶合，并引入原卟啉(化合物 3)，再与锌螯合。由此获得的 ZnPP 的结构在分子量和吸收光谱(UV/Vis)方面都相同。

据采用 TOF/MS(射程时间-质谱仪分析法)进行分子量检测，显示其质量接近 11,000 道尔顿。据紫外线吸收光谱显示其最大峰值为 425、543 和 583，说明式(5)是 PEG-ZnPP。

利用原卟啉 IX 作为起始原料通过反应步骤(a)-(d)进行 PEG-ZnPP 合成的操作程序，是一种新的加工方法。由此获得的与金属卟啉相结合的一种聚合物容易在水中溶解，可作为经静脉内或动脉内注射用的注射溶液。

[实施例]

有关 PEG-ZnPP 的制备程序、PEG-ZnPP 对于血红素加氧酶的抑制活性、以及本发明的静脉注射方法施用 PEG-ZnPP 的抗癌效果等问题，都将在以下各项实例中详细论述。不过，要注意的是，本发明并不限于这些实施例。

[加工方法的实施例]：聚乙二醇结合的锌原卟啉(PEG-ZnPP)的合成

将 100 毫克原卟啉 IX 溶于 20 毫升四氢呋喃，再在该溶液内加入 2.45 毫升三乙基胺。将溶液保存在 0°C 冰浴中，然后对溶液边搅拌边逐滴加入 1.7 毫升氯甲酸乙酯，令其持续反应 2 小时。随后进行过滤，除去其中形成的三乙基胺的盐酸盐，并加入 1.2 毫升乙二胺，再置于室温下 24 小时令其持续反应。然后将该反应混合液进行真空蒸发处理，以除去四氢呋喃，再用 50 毫升蒸馏水将所得固体物质清洗 7 次，可得到 60 毫克卟啉衍生物，其中每个分子含有 2 个氨基(反应 a 和 b)。

将 5 毫克化合物(3)溶于 25 毫升氯仿，再在溶液中加入 800 mg 聚乙二醇的琥珀酰亚胺酯(Shearwater; PEG, 分子量 5000)，室温下放置持续搅拌令其反应 24 小时[反应 c]。

将由此获得的 PEG-结合的原卟啉在 Sephadex LH60 上以氯仿作为洗脱剂，进行凝胶过滤层析处理。经凝胶过滤层析法处理的结果表明，在制备所得的 PEG-结合的原卟啉中，完全不含有未经反应的胺化的化合物(3)。而是显示了所有经胺化的原卟啉都与聚乙二醇发生反应而形成聚合型原卟啉。未修饰的原卟啉(如果有的话)将在 20 号组分中洗出，其洗脱体积与胺化的原卟啉相仿。

取 40 毫克乙酸锌加入 PEG-PP 溶液，室温下放置 2 小时，就可产生聚乙二醇结合型原卟啉(PEG-Zn-PP)(反应 d)。

[试验性实施例 1]：PEG-ZnPP 对于血红素加氧酶的抑制活性

在这方面采用取自大鼠脾脏的血红素加氧酶提纯物进行检测。方法是，在 37°C 下，在含有氯高铁血红素、血红素加氧酶底物、辅因子(NADPH, 烟碱腺嘌呤二核苷酸)、以及含有胆红素还原酶的细胞溶质组分((其中由氧化酶形成的胆绿素被转化为胆红素)的条件下进行检验。

以氯仿萃取法提取胆红素，并在 465 纳米波长下测定其吸光值进行定量。在添加 PEG-ZnPP 或未修饰的 ZnPP，或没有抑制剂的情况下，检测其对于血红素加氧酶的作用。绘制在 PEG-ZnPP 产生抑制作用时血红素加氧酶活性的 Lineweaver-Burk 曲线图。其结果如图 2 所示，表明 PEG-ZnPP 对于血红素加氧酶的抑制作用具有剂

量依赖性方式，其抑制常数(K_i)是 $0.13 \mu\text{M}$ 。这种抑制作用方式具有竞争性，其数值与未修饰的 ZnPP 相等。($K_i = 0.12 \mu\text{M}$)

[试验性实施例 2]：PEG-ZnPP 对培养的肿瘤细胞的作用

在塑料培皿中接种 A549 肺腺癌细胞系细胞，培育过夜，在各培皿中添加溶于蒸馏水中的 $5 \mu\text{M}$ 和 $10 \mu\text{M}$ PEG-ZnPP。然后，在 37°C 下培育 8 小时之后，在该细胞培养物中添加一种定量氧化抑制试剂二氯二氢荧光素二乙酯(DCDHF)，再培育 30 分钟。在氧化作用压力条件下，该 DCDHF 试剂就会发生氧化过程，并且在氧压作用条件下，会在细胞内形成荧光素而发生荧光现象。

对于这种荧光强度进行定量，就可反映出在细胞内氧化作用压力的程度。然后，对培养的细胞经胰蛋白酶处理后，回收细胞进行流式细胞仪方法分析，并对产生荧光的细胞群定量。其结果显示如图 3，其中表明，在 $5 \mu\text{M}$ 和 $10 \mu\text{M}$ 剂量时 PEG-ZnPP 的作用，与无药物时的情况相仿。据此图 3 所示的这组数据表明，PEG-ZnPP 是以剂量依赖性方式在细胞内产生高度的 PEG-ZnPP 氧化作用过程的。

[试验性实施例 3]：血红素加氧酶对小鼠实体瘤模型的抑制。

对平均体重 35 克的雄性 ddY 小鼠，在背部皮肤植入 S180 肉瘤细胞经过大约 1 周后，形成横径约为 5 毫米大小的实体瘤时，将溶于蒸馏水的 PEG-ZnPP 按每千克体重 0.5 毫克 ZnPP 的剂量，经尾静脉内(i. v.)注射。经 24 小时之后摘取其实体瘤，定量测定其血红素加氧酶，与实例 1 所述施用不含有 PEG-ZnPP 的蒸馏水的对照组小鼠的结果相仿。其肿瘤标本的获取和处理方法都相同。如表 1 所示，经静脉内(尾部)施用 PEG-ZnPP 时，显示出血红素加氧酶活性显著下降。未经改型处理的 ZnPP 则由于其难溶性就不能作静脉内施用。

[表 1] 经尾静脉内施用 PEG-ZnPP 对于肿瘤内的血红素加氧酶的抑制作用

药 物	肿瘤组织内的血红素加氧酶活性 (纳摩胆红素/毫克蛋白质/小时)	
对照组，不加药物	4.17 ± 1.07	(P < 0.02)
施用 PEG-ZnPP 组	2.30 ± 0.54	
施用未修饰的 PEG-ZnPP	不可能溶于水(不能用于注射)	

[实验性实施例 4]:在患有实体瘤的小鼠中 PEG-ZnPP 的抗肿瘤效应及体重变化。

与上述实验 3 类似,在 ddY 小鼠的背部皮下植入小鼠 S180 肉瘤,在植入肿瘤经 10、13、和 15 天之后,分别以 30 纳摩、30 纳摩、和 50 纳摩(只要 3 次)剂量的 PEG-ZnPP,分别施行尾静脉注射(还可参见图 4 中箭头标记所示)。对照组小鼠施用蒸馏水以替代 PEG-ZnPP。每个周日测量瘤体的大小,如图 4 所示。其中显示,与对照组相比较,PEG-ZnPP 组表现出肿瘤的生长受到明显的抑制。

同时测定的处理组小鼠和非处理组小鼠的体重如图 5 所示,PEG-ZnPP 处理组的体重并无明显的减失。

本发明在工业领域的适用性

根据本发明,抑制血红素加氧酶的金属卟啉衍生物可在水溶性和脂溶性方面使用,将其与两性或水溶性聚合物相结合就可制成供静脉注射用的衍生物。这是一类具有良好的肿瘤定向选择性积聚作用的新药。同时还发现了制备这种化合物的有效方法。

本发明的抗癌剂具有卓越的抗癌效应,且不会产生任何可感知的副作用或毒性作用。

由此可知,本发明的与聚合物相结合的抗癌剂是非常有效的具有卓越的肿瘤定向选择性质的药物,它有着新的不同于已知众多低分子量抗癌剂的作用方式。

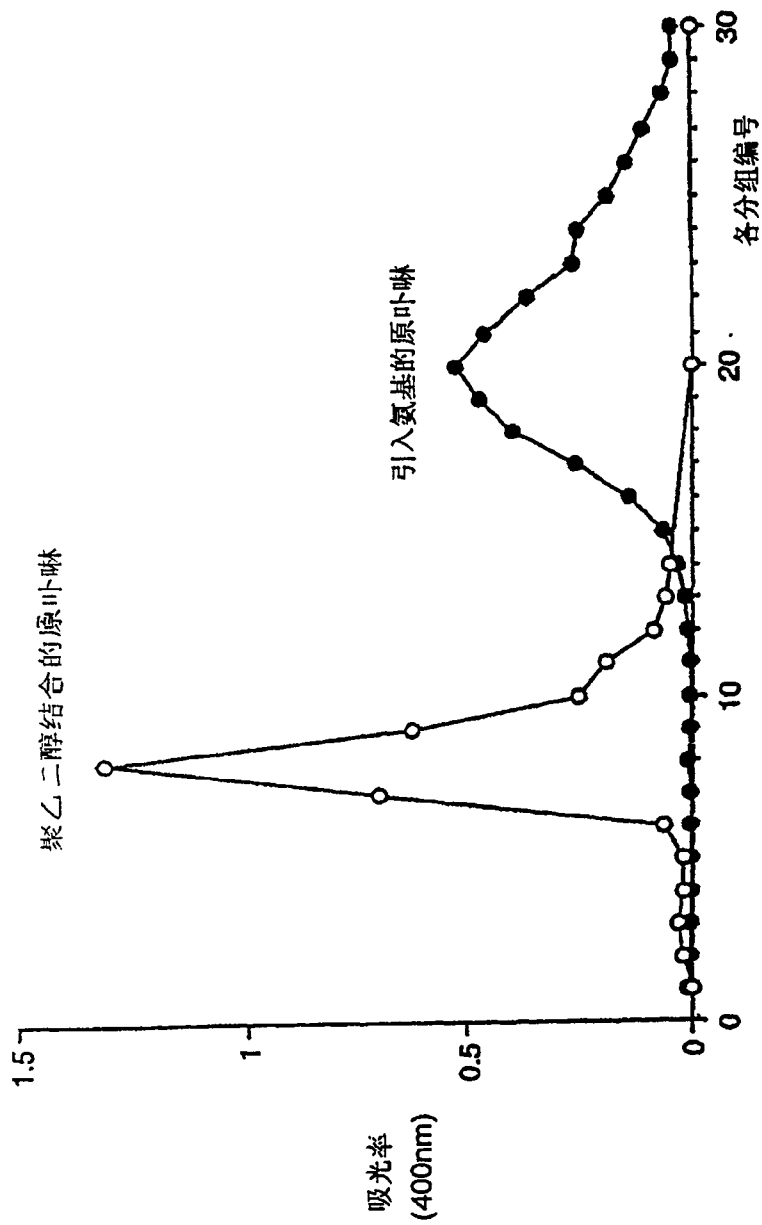


图 1

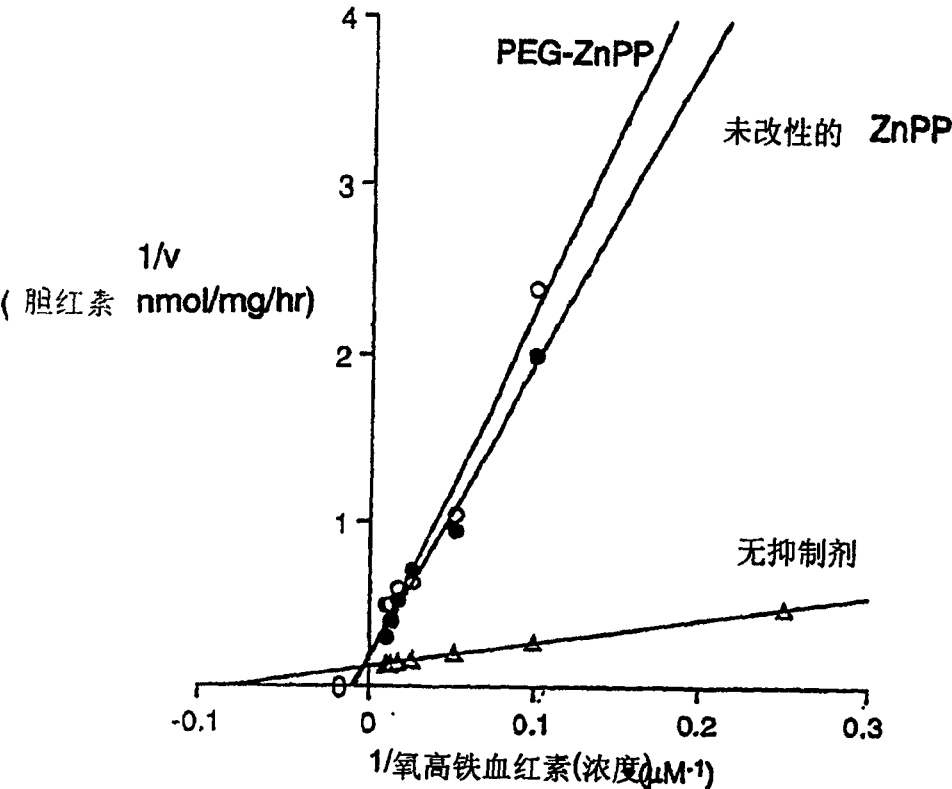


图 2

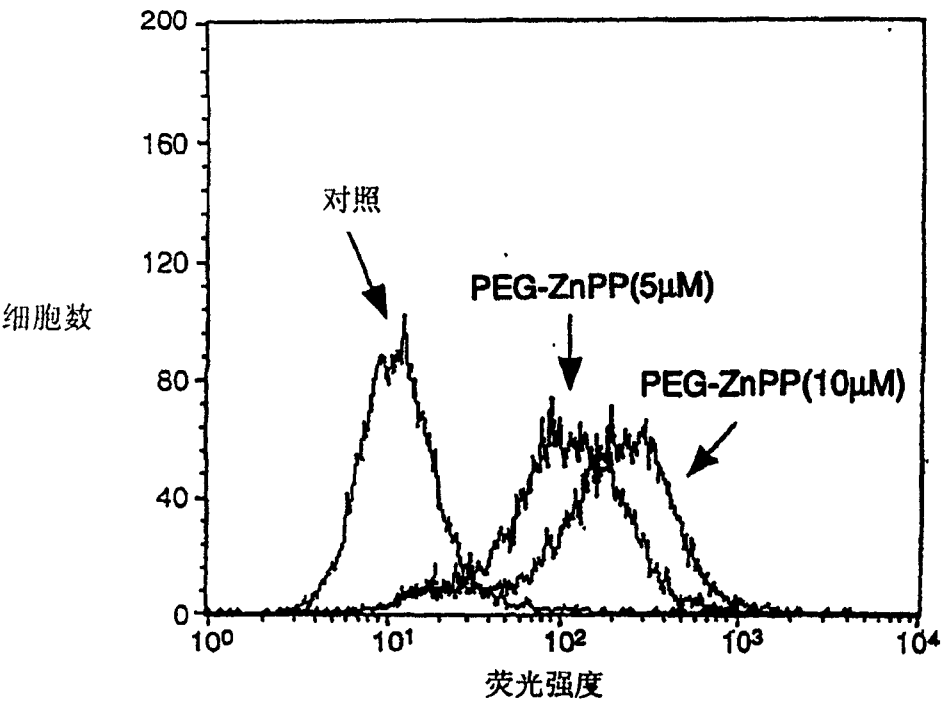


图 3

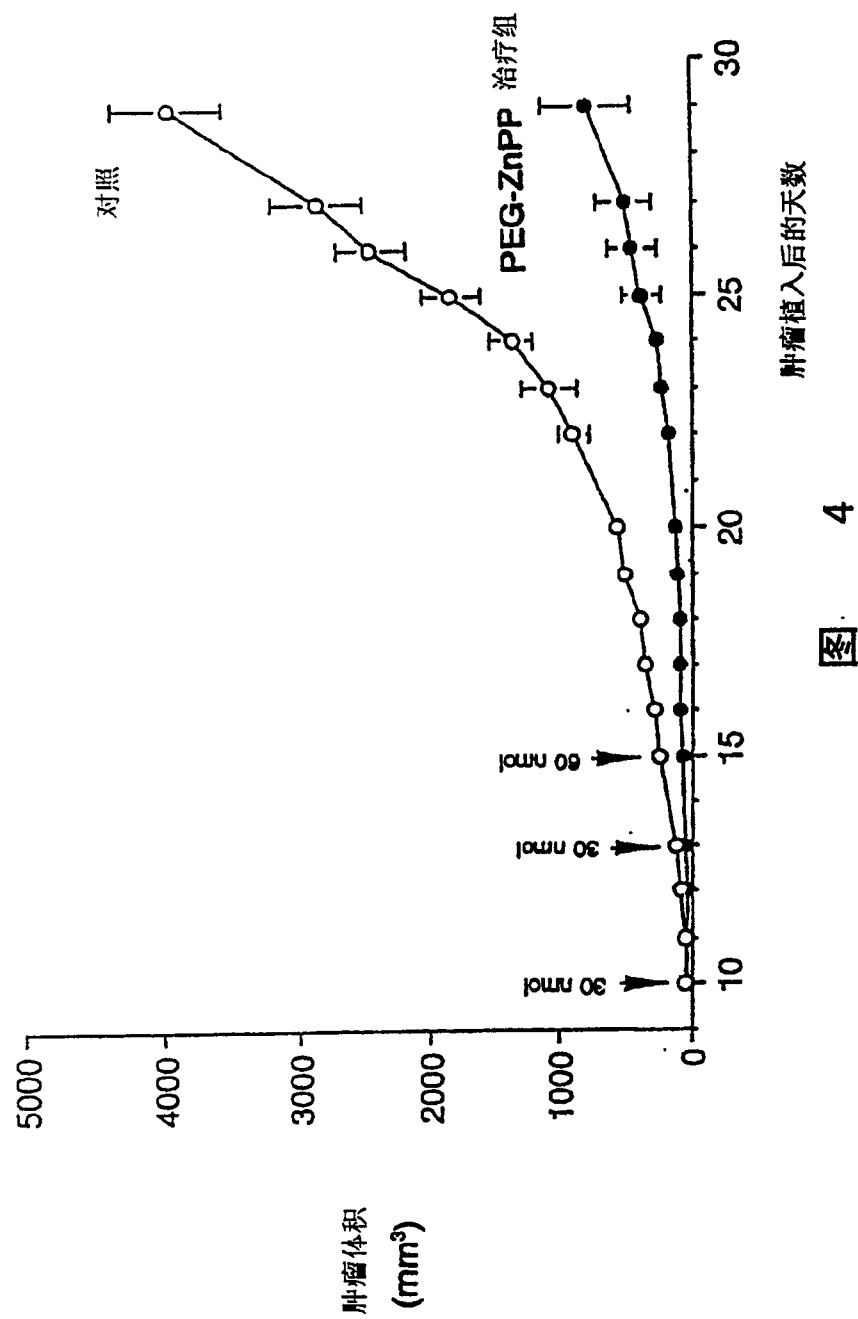


图 4

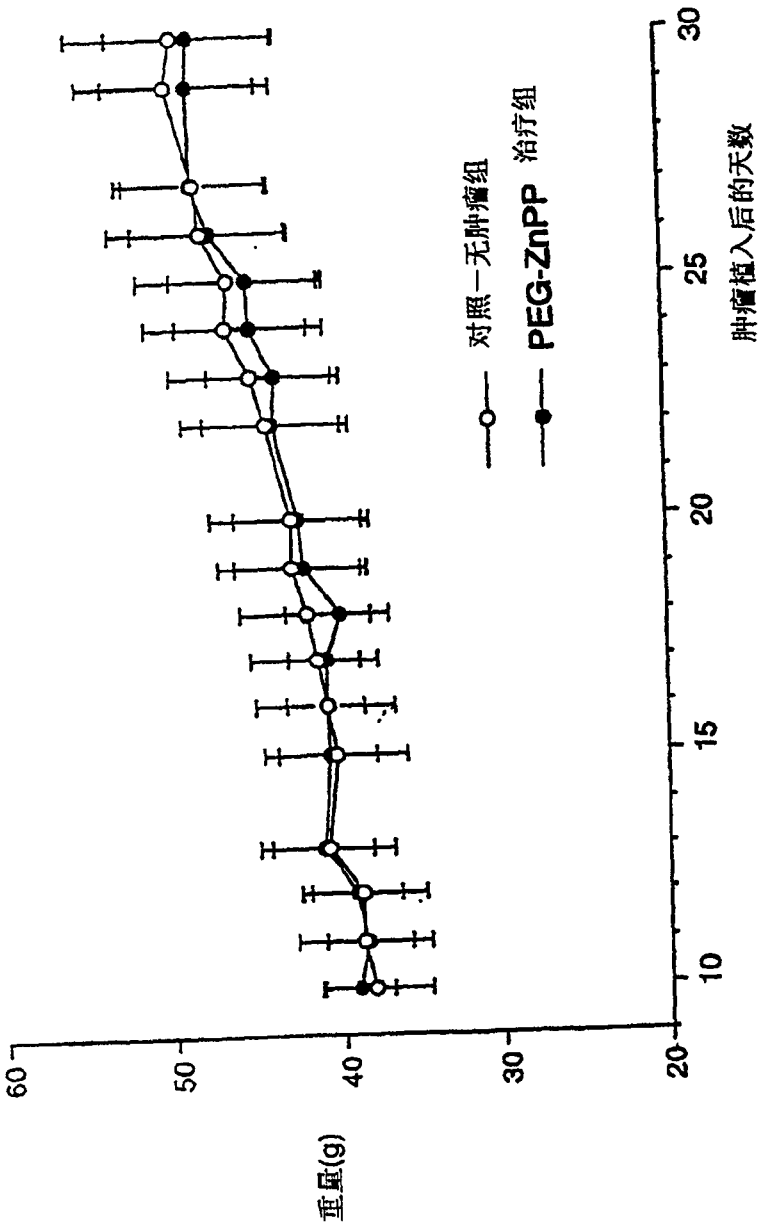


图 5