

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 9 月 8 日 (08.09.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/148193 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07F 15/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/108275
- (22) 国际申请日: 2016 年 12 月 1 日 (01.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610112246.7 2016 年 2 月 29 日 (29.02.2016) CN
- (71) 申请人: 东南大学 (SOUTHEAST UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市玄武区四牌楼 2 号, Jiangsu 210096 (CN)。
- (72) 发明人: 苟少华 (GOU, Shaohua); 中国江苏省南京市玄武区四牌楼 2 号, Jiangsu 210096 (CN)。
- (74) 代理人: 南京经纬专利商标代理有限公司 (NANJING JINGWEI PATENT & TRADEMARK AGENCY CO., LTD); 中国江苏省南京市鼓楼区中山路 179 号 12 楼 B 座, Jiangsu 210005 (CN)。

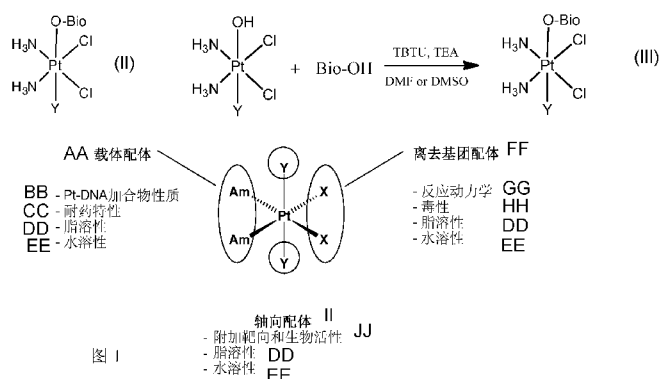
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: TETRAVALENT PLATINUM COMPLEX CONTAINING BIOACTIVE GROUP AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一类含有生物活性基团的四价铂配合物及其制备方法



(57) Abstract: Disclosed is a tetravalent platinum complex containing a bioactive group and preparation method therefor, wherein the tetravalent platinum complex is a platinum(IV) complex and has a structure as represented by formula II. In formula II, Y represents OH or Cl; and Bio represents a bioactive group. The platinum(IV) complex is prepared according to the equation as presented by formula III. In formula III, Y represents OH or Cl; Bio-OH represents a bioactive compound; TBTU represents a coupling reagent O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate; TEA represents a catalyst triethylamine; DMF represents a solvent N,N-dimethylformamide; and DMSO represents a solvent dimethylsulfoxide. By using cisplatin as the bottom face of an octahedron, introducing a micro-molecular targeting group or pharmaceutically active group into an axial position, and introducing a hydroxyl group or helium atom is introduced into another axial position, an anti-tumor tetravalent platinum complex capable of overcoming cisplatin resistance is provided, so as to obtain a platinum(IV) complex with high efficiency and low toxicity.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2017/148193 A1



本发明是一类含有生物活性基团的四价铂配合物及其制备方法，所述的四价铂配合物即铂(IV)配合物，其结构如式 II 所示。式 II 中，Y 为 OH 或 Cl；Bio 代表生物活性基团。所述的铂(IV)配合物，按照式 III 所示的反应式进行，式 III 中，Y 为 OH 或 Cl；Bio-OH 代表具有生物活性的化合物，TBTU 代表偶联试剂 O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸，TEA 代表催化剂三乙胺，DMF 代表溶剂 N,N-二甲基甲酰胺，DMSO 代表溶剂二甲亚砜；采用顺铂为八面体底面，在一个轴向位置引入小分子靶向或药物活性基团，另一个轴向位置引入羟基或氯原子，提供具有克服顺铂耐药的抗肿瘤四价铂配合物，以期获得高效低毒的铂(IV)药物。

一类含有生物活性基团的四价铂配合物及其制备方法

技术领域

本发明涉及抗肿瘤四价铂配合物，具体涉及以顺铂骨架为四价铂配合物八面体结构的底面，在一轴向位置引入单个具有生物活性的基团，在另一轴向位置引入羟基或氯原子，得到一类具有抗肿瘤活性的铂(IV)配合物；本发明还涉及该类铂配合物的制备方法及应用。

背景技术

顺铂、卡铂和奥沙利铂等抗肿瘤二价铂药物已被广泛应用于临床，用于治疗相关的癌症。作为第一个在临床上使用的金属抗肿瘤药物，顺铂主要作用于 DNA 的鸟嘌呤 N7 位靶点，通过与 DNA 交联形成加合物，使肿瘤细胞发生凋亡，导致细胞停滞和细胞死亡。大量研究表明，顺铂触发癌细胞死亡主要包括四个阶段：(1) 跨膜转运：通过主动扩散和被动吸收的方式产生细胞摄取；(2) 水合离解：由于细胞内外氯离子的浓度差，容易形成铂(II)水合阳离子；(3) 靶向迁移：铂(II)离子与 DNA 形成 Pt-DNA 加合物；(4) DNA 损伤致死：通过作用于 DNA，导致癌细胞的死亡。

根据上述机制，顺铂类药物在静脉注射后，到达肿瘤细胞之前，会与血液中的亲核物质如谷胱甘肽作用中毒失活。因此，现有顺铂类药物存在一些严重缺陷：一是表现出相应的毒性，主要是肾脏毒性和骨髓毒性；二是用药后产生的耐药性。这些不足在一定程度上限制了这些铂(II)药物的应用。

近年来的研究发现，铂(IV)配合物具有较好的稳定性，能够减少与体内亲核物质的反应，引入一定的轴向基团可以调节铂(IV)配合物亲水性和亲脂性，促进药物的吸收。铂(IV)离子在体内经还原生成铂(II)离子后，可与癌细胞 DNA 作用，如果在铂(IV)配合物的轴向引入生物活性基团，则可能与铂(II)离子产生协同抗肿瘤活性。因此，铂(IV)配合物作为抗肿瘤前药引起了人们广泛的关注。

铂(IV)配合物的构效关系见图 1，主要包括以下几个方面：X 离去基团配体主要影响化合物的反应动力学、毒性、溶解性；Am 载体配体主要影响 Pt-DNA 加合方式和抗肿瘤活性；Y 轴向配体主要决定药物的靶向性、生物活性和进入肿瘤细胞的能力，影响化合物的氧化还原性质，即在低氧的肿瘤组织中被还原的能力。因此，通过引入功能型轴向配体可以增加药物的靶向性和脂溶性，克服毒副作用，增加化合物的抗肿瘤活性。

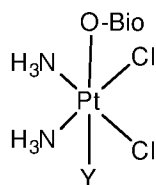
尽管人们在铂(IV)药物研究方面开展了一些工作，设计和制备了多个类型的配合物，希

望利用铂(IV)配合物的空间结构, 获得高效低毒、与顺铂类药物无交叉耐药或具有选择性治疗作用的药物。但是迄今为止, 目前还没有能够实现靶向或克服顺铂耐药的铂(IV)配合物作为药物上市。

发明内容

技术问题: 本发明的目的在于利用铂(IV)配合物的空间结构, 采用顺铂为八面体底面, 在一个轴向位置引入小分子靶向或药物活性基团, 另一个轴向位置引入羟基或氯原子, 提供具有克服顺铂耐药的抗肿瘤四价铂配合物, 以期获得高效低毒的铂(IV)药物; 本发明还提供了这些铂(IV)配合物的制备方法, 以及它们在制备抗肿瘤药物上的应用。

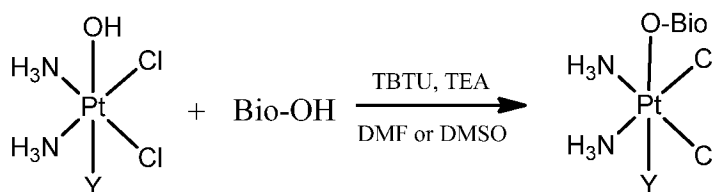
技术方案: 本发明是一类含有生物活性基团的四价铂配合物, 所述的四价铂配合物即铂(IV)配合物, 其结构如式 II 所示:



式 II

式 II 中, Y 为 OH 或 Cl; Bio 代表生物活性基团。

本发明的一类含有生物活性基团的四价铂配合物的制备方法, 所述的铂(IV)配合物, 按照式 III 所示的反应式进行,



式 III

式 III 中, Y 为 OH 或 Cl; Bio-OH 代表具有生物活性的化合物, TBTU 代表偶联试剂 O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸, TEA 代表催化剂三乙胺, DMF 代表溶剂 N,N-二甲基甲酰胺, DMSO 代表溶剂二甲亚砜;

具体采用如下方法: 将等摩尔的反应物 Bio-OH 和偶联试剂 TBTU 于无水 DMF 或 DMSO 混合, 在室温搅拌下, 加入等摩尔的 TEA, 然后加入等摩尔的 Pt(IV) 反应物 A 或 B, 反应液于氮气保护下在 30-60℃ 度下搅拌 12-48 小时, 然后减压除去溶剂, 浓缩液经硅胶柱层析分离, 洗脱液为二氯甲烷与甲醇混合溶剂, 得到黄色固体产物;

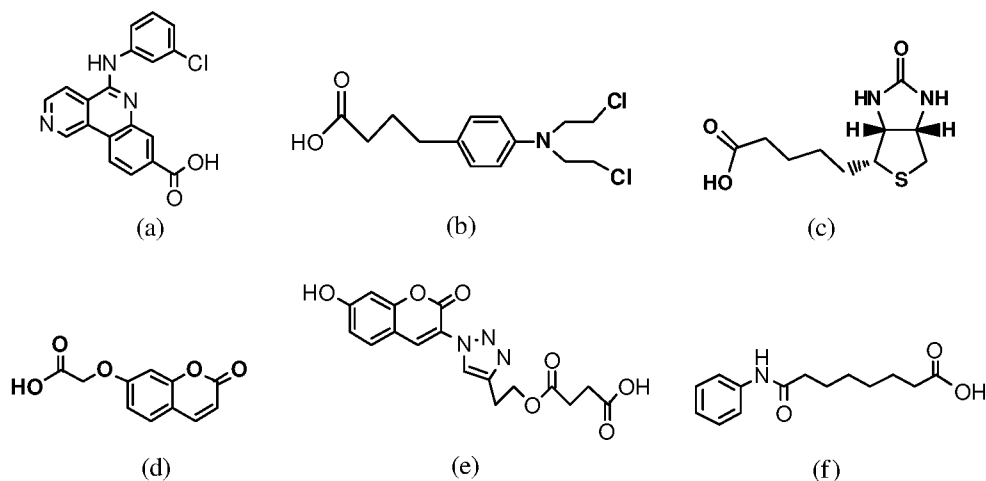
Pt(IV) 反应物 A 和 B 的结构如式 IV 表示,



式 IV

其中 A 代表顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂], 通过顺铂和双氧水在水中反应制备获得; B 代表顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)Cl], 通过顺铂和氯代丁二酰亚胺在水中反应制备获得。

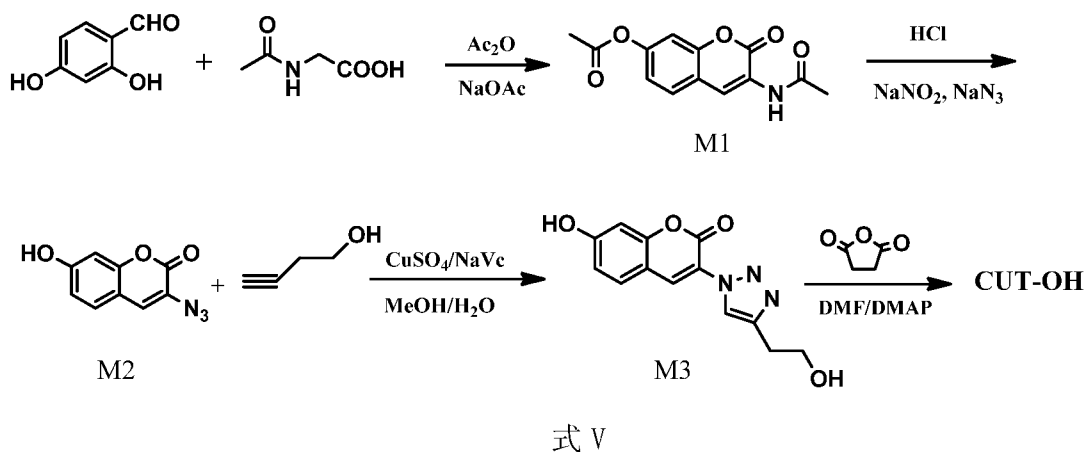
所述的 Bio-OH 代表具有生物活性的化合物结构由式 I (a-f) 所示,



式 I

其中, (a) 为已知进入临床试验的靶向抗肿瘤药物 silmitasertib, 是一种蛋白激酶 CK2 抑制剂, 简称为 CX-OH; (b) 为已知上市药物苯丁酸氮芥, 是一种靶点为 DNA 的抗肿瘤药物, 简称为 CHL-OH; (c) 为生物素, 即维生素 H, 简称为 BT-OH; (d) 为具有抗氧化抗癌作用的天然产物香豆素的羧酸衍生物, 简称为 CUA-OH; (e) 为具有抗氧化抗癌作用的天然产物香豆素的三氮唑羧酸衍生物, 简称为 CUT-OH; (f) 为已知抗肿瘤药物 SAHA 的羧酸衍生物, 是一种 PARP 抑制剂, 简称为 SAA-OH。

所述的 CUT-OH 的制备按式 V 所示的反应式进行,



制备 CUT-OH 采用如下制备方法：

1) 将等摩尔的 2,4-二羟基苯甲醛和乙酰甘氨酸及三倍量的乙酸钠加入乙酸酐中，搅拌回流 4h，将反应液冷却至室温，倒入冰水中，得到黄色沉淀物，过滤，用冰水洗涤两次，干燥固体得中间体 M1；

2) 将 M1 加入浓盐酸:乙醇为 2:1 的混合溶液中，回流 1h，将反应液冷却至室温，倒入冰水中，然后在冰浴条件下，缓慢加入二倍量的亚硝酸钠，加完搅拌 15 min 后，再缓慢加入三倍量的叠氮化钠，继续搅拌 15 min，过滤出褐色沉淀，水洗，柱层析分离得中间体 M2，洗脱液为石油醚:乙酸乙酯为 5:1 混合溶剂；

3) 将 M2 悬浮于甲醇，加入等摩尔的丁-3-炔-1-醇和少量抗坏血酸钠，氮气保护下室温搅拌 10 min，再将溶于水的二倍量的五水硫酸铜加入到反应液中，室温避光搅拌 4h，然后旋蒸除去反应液中的甲醇，加水析出黄色固体，过滤，所得固体用纯水洗涤两次，干燥得中间体 M3；

4) 将 M3 溶于 DMF，加入二倍量的丁二酸酐和催化量的 DMAP，50℃ 反应过夜，冷却至室温，浓缩反应液，柱层析分离得浅黄色产物，洗脱液为石油醚:乙酸乙酯:甲醇为 10:10:1 混合溶剂。

有益效果：

(一)、体外抗肿瘤活性

对所制备的化合物用人肺癌细胞 A549、结肠癌细胞 HCT-116、肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MCF-7 与 MDA-MB-231、卵巢癌细胞 A2780、胰腺癌细胞 PANC-1、胃癌细胞 SGC-7901 与顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP、脑胶质瘤细胞 U87 或神经胶质细胞瘤细胞 U251 进行了体外抗肿瘤活性评价，顺铂作为阳性对照。观察化合物在不同浓度下对肿瘤细胞生长的抑制情况。

含有靶向蛋白激酶 CK2 抑制剂基团 CX 的化合物 1 和 2 的实验数据见表 2。化合物 1 对 CK2

高表达的癌细胞 MCF-7、HepG2、HCT-116 和 A2780 的活性优于顺铂 2.5-4.5 倍，对 CK2 中度表达的癌细胞 SGC-7901 或低表达的癌细胞 PANC-1 的抑制率与顺铂相近，值得注意的是该化合物对顺铂耐药癌细胞 SGC-7901/CCCP 有显著抑制作用，耐药因子为 0.60。化合物 2 对 CK2 高、中表达的癌细胞的活性稍低于顺铂，但其对顺铂耐药癌细胞 SGC-7901/CCCP 也表示出显著的抑制作用，耐药因子达到 0.24。表 2 数据表明靶向基团的引入使铂(IV)配合物较顺铂的抗肿瘤活性有明显提高，轴向含有羟基基团的化合物 1 比轴向含有氯原子的化合物 2 的活性较好。

含有靶点为 DNA 的 CHL 基团的化合物 3 的实验数据见表 3。该化合物对所测癌细胞的活性与顺铂相当，它对顺铂耐药癌细胞 SGC-7901/CCCP 有一定的抑制作用，耐药因子为 2.65。

含有生物素 BT 基团的化合物 4 和 5 的实验数据见表 4。化合物 4 对所测的两个癌细胞的活性都低于顺铂，但化合物 5 对肝癌细胞 HepG2 和胃癌细胞 SGC701 比较敏感，细胞毒活性优于顺铂，特别是对顺铂耐药癌细胞 SGC-7901/CCCP 尤为敏感，其活性是顺铂的 21 倍，耐药因子为 0.42。结果表明轴向含有羟基基团的化合物 4 比轴向含有氯原子的化合物 5 的活性较弱。

含有香豆素羧酸衍生物 CUA 基团的化合物 6 的实验数据也见表 4。化合物 6 对所有测试的癌细胞的活性都高于顺铂，如针对结肠癌细胞 HCT116 的细胞毒活性是顺铂的 30 倍，对胃癌细胞 SGC-7901 的细胞毒活性是顺铂的 23 倍，对顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP 的细胞毒活性是顺铂的 19 倍，但是其耐药因子为 5.31。

含有香豆素的三氮唑羧酸衍生物 CUT 基团的化合物 7 的实验数据见表 5。化合物 7 对脑胶质瘤细胞 U87 和神经胶质细胞瘤细胞 U251 的活性都优于顺铂，细胞毒活性是顺铂的 2-3 倍。

含有 PARP 抑制剂 SAA 基团的化合物 8 的实验数据见表 6。化合物 8 对所测试的癌细胞的活性与顺铂相当，有的稍强，有的稍弱，但其对顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP 的细胞毒活性是顺铂的 11 倍，耐药因子为 0.66。

以上结果表明，引入生物活性基团至顺铂为母体的铂(IV)配合物表现出有效的抗肿瘤活性。

(二)、体内抗肿瘤活性

用所制备的化合物 1 对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植肿瘤生长及作用进行了体内抗肿瘤活性评价，顺铂和 CX-OH 及其联合用药作为对照。

实验结果见表 7（受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤生长的抑制作用），图 2 为受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤生长体积变化的影响，图 3 为受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤生长的抑制作用，图 4 为受试样品对人胃癌细胞

SGC-7901 裸鼠异种移植瘤裸鼠体重的影响。由表 7 数据可知, 化合物 1 的抑瘤率远高于等剂量的顺铂和 CX-OH。与顺铂和 CX-OH 联合用药相比, 化合物 1 的抑瘤率高于顺铂结合低频次给药的 CX-OH 联合用药, 与顺铂结合高频次给药的 CX-OH 联合用药相当。如图 2 和图 3 所示, 无论是移植瘤的体积还是重量数据, 化合物 1 与顺铂结合高频次给药的 CX-OH 联合用药能够显著抑制裸鼠异种移植瘤生长, 高于其它测试组。值得注意的是图 4, 化合物 1 对受试动物体重几乎没有影响, 而顺铂及其与 CX-OH 联合用药对动物体重影响较大, 说明化合物 1 的毒性较小, 具有高效低毒的特点。

附图说明

图 1. 铂(IV)配合物的构效关系。

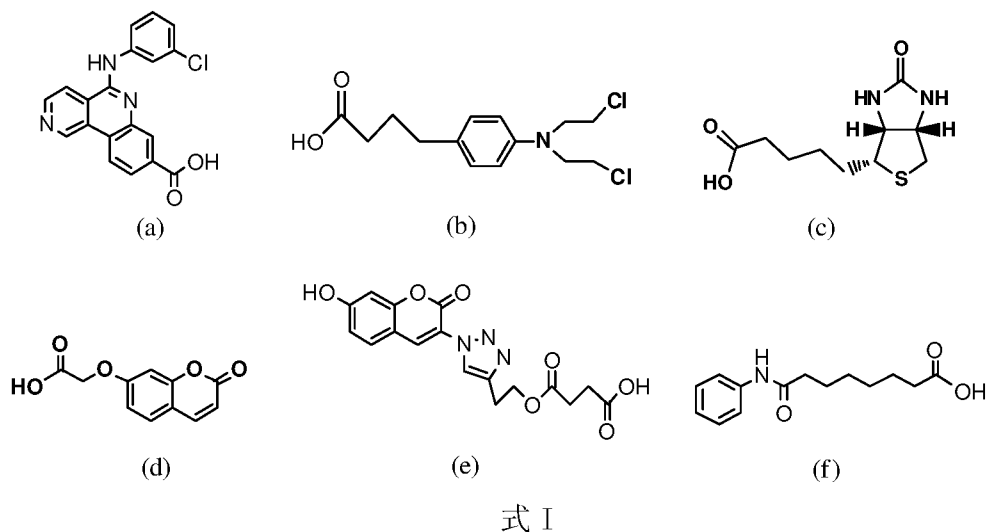
图 2. 受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤生长体积变化的影响。

图 3. 受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤生长的抑制作用。

图 4. 受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤裸鼠体重的影响。

具体实施方式

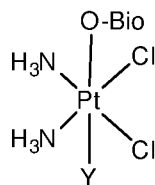
本发明所涉及的靶向或药物活性基团为已知具有生物活性的化合物或其衍生物, 它们的结构由式 I (a-f) 所示,



其中, (a) 为已知进入临床试验的靶向抗肿瘤药物(silmitasertib), 是一种蛋白激酶 CK2 抑制剂, 简称为 CX-OH; (b) 为已知上市药物苯丁酸氮芥, 是一种靶点为 DNA 的抗肿瘤药物, 简称为 CHL-OH; (c) 为生物素, 即维生素 H(在许多肿瘤细胞中生物素受体过表达), 简称为 BT-OH; (d) 为具有抗氧化抗癌作用的天然产物香豆素的羧酸衍生物, 简称为 CUA-OH; (e) 为具有抗氧化抗癌作用的天然产物香豆素的三氮唑羧酸衍生物, 简称为 CUT-OH; (f) 为已知抗

肿瘤药物 SAHA 的羧酸衍生物，是一种 PARP 抑制剂，简称为 SAA-OH。

本发明所述的铂(IV)配合物，其结构如式 II 所示：



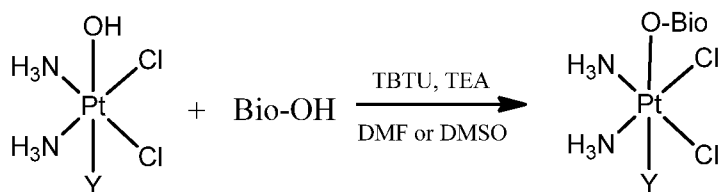
式 II

式 II 中，Y 为 OH 或 Cl；Bio 代表生物活性基团，为式 I(a-f) 所示化合物结构的母体 CX、BT、CHL、CUA、CUT 或 SAA；具体代表性化合物的结构如表 1 所示：

表 1. 代表性化合物 1-8 的结构

化合物编号	结构式	化合物代号	结构式
1		5	
2		6	
3		7	
4		8	

制备式 II 所示的铂(IV)配合物, 根据式 III 所示的反应式进行,



式 III

式 III 中, Y 为 OH 或 Cl; Bio-OH 代表式 I(a-f) 所示的化合物, 如 CX-OH、BT-OH、CHL-OH、CUA-OH、CUT-OH 或 SAA-OH; TBTU 代表偶联试剂 O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸, TEA 代表催化剂三乙胺, DMF 代表溶剂 N,N-二甲基甲酰胺, DMSO 代表溶剂二甲亚砜。

制备式 II 所述的铂(IV)配合物, 采用如下制备方法: 将等摩尔的反应物 Bio-OH 和偶联试剂 TBTU 于一定体积的无水 DMF 或 DMSO 混合, 在室温搅拌下, 加入等摩尔的 TEA, 然后加入等摩尔的 Pt(IV) 反应物 A 或 B, 反应液于氮气保护下在 30-60°C 度下搅拌 12-48 小时, 然后减压除去溶剂, 浓缩液经硅胶柱层析分离, 洗脱液为二氯甲烷与甲醇混合溶剂, 得到黄色固体产物。

Pt(IV) 反应物 A 和 B 的结构如式 IV 表示,

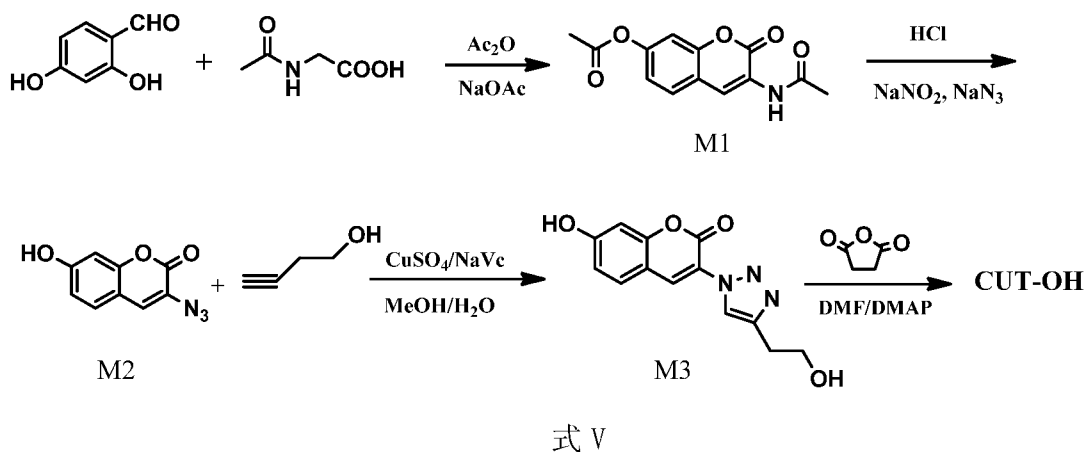


式 IV

其中 A 代表顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂], 按文献方法 (Can. J. Chem. 1982, 60, 529) 通过顺铂和双氧水在水中反应制备获得; B 代表顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)Cl], 按文献方法 (Inorg. Chem. 2014, 53, 9326) 通过顺铂和氯代丁二酰亚胺在水中反应制备获得。

反应物 Bio-OH 中, CX-OH (J. Med. Chem., 2011, 54, 635)、CHL-OH (Anti-cancer Drugs, 2006, 17, 511)、CUA-OH (Colloid Polym. Sci. 2014, 292, 85) 和 SAA-OH (J. Med. Chem., 2010, 53, 1937) 参照相应文献报道的方法制备; BT-OH 为商品。

CUT-OH 的制备按式 V 所示的反应式进行,



式 V

制备 CUT-OH 采用如下制备方法：

1. 将等摩尔的 2,4-二羟基苯甲醛和乙酰甘氨酸及三倍量的乙酸钠加入一定体积的乙酸酐中，搅拌回流 4h，将反应液冷却至室温，倒入冰水中，得到黄色沉淀物，过滤，用冰水洗涤两次，干燥固体得中间体 M1；
2. 将 M1 加入浓盐酸和乙醇 (2:1) 的混合溶液中，回流 1h，将反应液冷却至室温，倒入冰水中，然后在冰浴条件下，缓慢加入二倍量的亚硝酸钠，加完搅拌 15 min 后，再缓慢加入三倍量的叠氮化钠，继续搅拌 15 min，过滤出褐色沉淀，水洗，柱层析分离得中间体 M2，洗脱液为石油醚和乙酸乙酯 (5:1) 混合溶剂；
3. 将一定量的 M2 悬浮于甲醇，加入等摩尔的丁-3-炔-1-醇和少量抗坏血酸钠，氮气保护下室温搅拌 10 min，再将溶于少量水的二倍量的五水硫酸铜加入到反应液中，室温避光搅拌 4h，然后旋蒸除去反应液中的甲醇，加水析出黄色固体，过滤，所得固体用纯水洗涤两次，干燥得中间体 M3；
4. 将一定量的 M3 溶于 DMF，加入二倍量的丁二酸酐和催化量的 DMAP，50℃ 反应过夜，冷却至室温，浓缩反应液，柱层析分离得浅黄色产物，洗脱液为石油醚、乙酸乙酯和甲醇 (10:10:1) 混合溶剂。

按本发明方法制备的铂(IV)配合物经核磁氢谱和质谱确定了化合物的分子结构，有的化合物还经核磁碳谱进行了表征。化合物质谱中，准分子离子峰均出现铂元素的多个同位素峰。

表 1 所示代表性铂(IV)配合物对一些人肿瘤细胞具有显著的抑制作用，有的超过顺铂，特别是有的化合物对顺铂耐药癌细胞表现敏感，具有克服顺铂耐药的能力。这些癌细胞包括肺癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、脑胶质瘤和神经胶质细胞瘤细胞。化合物 1 的体内试验表明，含有靶向药物基团的四价铂配合物表现出高效低毒的抗肿瘤活性，可应用于制备抗癌药物。

本发明由下述实施例进一步的说明，但这些说明并不限制本发明。除特别指出外，一些反应物包括顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]和顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)Cl]都采用文献方法制备。

(一)、化合物的制备

实施例 1. 化合物 1 的制备

将157.4 mg (0.45 mmol) CX-OH和144.5 mg (0.45 mmol) TBTU溶于15 mL 无水DMF，室温搅拌10 min，然后加入45.5 mg (0.45 mmol) TEA，继续搅拌5 min后，再加入150.0mg (0.45 mmol) 顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]，氮气保护下50℃反应48 h。浓缩反应液，浓缩液经硅胶柱层析分离，洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂 (10:1)，得黄色产物79.9 mg，产率40 %。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): δ 4.23 (s, 6H), 7.13 (d, J = 7.9, 1H), 7.44 (t, J = 8.0, 1H), 7.97 (d, J = 8.4, 1H), 8.07 (d, J = 8.6, 1H), 8.27 (m, 2H), 8.46 (t, J = 2.0, 1H), 8.61 (d, J = 5.9, 1H), 8.82 (d, J = 8.5, 1H), 9.14 (d, J = 5.9, 1H), 9.7 (s, 1H), 10.2 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, ppm): δ 116.73, 119.53, 120.53, 122.58, 122.75, 122.92, 124.37, 124.54, 127.26, 128.69, 130.46, 132.10, 142.27, 143.66, 147.92, 148.10, 150.46, 167.57. ESI-MS: [M-H]⁺ = 665.1.

实施例 2. 化合物 2 的制备

用反应物顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)Cl]替代顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]参照实施例 1 所述方法制备，得黄色产物，产率 38 %。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): δ 6.38 (s, 6H), 7.16 (d, J = 8.1, 1H), 7.49 (t, J = 8.2, 1H), 7.99 (d, J = 8.4, 1H), 8.08 (d, J = 8.4, 1H), 8.3 (m, 2H), 8.61 (d, J = 5.6, 1H), 8.85 (d, J = 8.5, 1H), 9.01 (d, J = 5.6, 1H), 9.7 (s, 1H), 10.2 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, ppm): δ 116.87, 119.53, 120.52, 121.85, 122.29, 122.60, 124.28, 125.38, 127.58, 128.77, 130.62, 133.28, 135.44, 142.40, 143.48, 147.77, 148.22, 150.41, 173.19. ESI-MS: [M-H]⁺ = 681.9

实施例 3. 配合物 3 的制备

将 100.0 mg (0.33 mmol) CHL-OH 溶于 5 mL 无水 DMF，加入 105.6 mg (0.33 mmol) TBTU，室温搅拌 5 min，然后加入 33.3 mg (0.33 mmol) TEA，继续再搅拌 10 min 后，加入 115.8 mg (0.33 mmol) 顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)Cl]，氮气保护下室温反应 24 h。浓缩反应液，浓缩液经硅

胶柱层析分离, 洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂 (5:1), 得到黄色固体 95.7 mg, 产率为 46%。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.67–1.72 (2H, m), 2.19–2.24 (2H, m), 2.45 (2H, m), 3.69 (8H, s), 6.02–6.35 (6H, m), 6.64–6.67 (2H, d), 7.02–7.05 (2H, d). ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 637.9$ (100%)。

实施例 4. 配合物 4 的制备

将 122.1 mg (0.50 mmol) BT-OH 和 160.5 mg (0.50 mmol) TBTU 溶于 10 mL 无水 DMSO, 室温搅拌 15 min, 然后加入 50.6 mg (0.50 mmol) TEA, 继续搅拌 15 min 后, 再加入 160.7 mg (0.50 mmol) 顺, 顺, 反- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OH})_2]$, 氮气保护下 60°C 反应 36 h。浓缩反应液, 浓缩液经硅胶柱层析分离, 洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂 (5:1), 得到黄色固体 50.0 mg, 产率 18%。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.34–1.48 (m, 6H), 2.18 (t, 2H), 2.60 (s, 1H), 2.80 (m, 1H), 3.10 (s, 1H), 4.14 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 5.94 (m, 6H), 6.32 (d, 2H). ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 559.1$, $[\text{M}+\text{Cl}]^- = 595.0$.

实施例 5. 配合物 5 的制备

将 134.0 mg (0.55 mmol) BT-OH 和 176.6 mg (0.55 mmol) TBTU 溶于 10 mL 无水 DMSO, 室温搅拌 15 min, 然后加入 55.7 mg (0.55 mmol) TEA, 继续搅拌 15 min 后, 再加入 193.9 mg (0.55 mmol) 顺, 顺, 反- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OH})\text{Cl}]$, 在氮气保护下 40°C 反应 24h。浓缩反应液, 浓缩液经硅胶柱层析分离, 洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂 (5:1), 得到黄色固体 100.1 mg, 产率: 31%。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.62–1.35 (m, 6H), 2.23 (s, 2H), 2.57 (m, 3H), 2.81, 3.11, 4.15 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 6.18–6.36 (m, 8H). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 25.01, 25.98, 28.66, 33.97, 36.62, 55.93, 59.66, 61.48, 163.22, 181.05. ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 577.0$.

实施例 6. 配合物 6 的制备

将 110.0 mg (0.50 mmol) CUA-OH 和 160.5 mg (0.50 mmol) TBTU 溶于 20 mL 无水 DMSO, 室温搅拌 15 min, 然后加入 50.6 mg (0.50 mmol) TEA, 继续搅拌 15 min 后, 再加入 160.7 mg (0.50 mmol) 顺, 顺, 反- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OH})_2]$, 在氮气保护下 60°C 反应 48h。浓缩反应液, 浓

浓缩液经硅胶柱层析分离，洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂（5:1），得到黄色固体 50.0 mg，产率：19%。

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.24(s, 1H), 4.65(s, 2H), 5.95(m, 6H), 6.28(d, 1H), 6.94(m, 2H), 7.60(d, 1H), 7.99(d, 1H). ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 535.0$.

实施例 7. 配合物 7 的制备

将 201.6 mg (0.54 mmol) CUT-OH 和 173.4 mg (0.54 mmol) TBTU 溶于 30 mL 无水 DMF，室温搅拌 10 min，然后加入 54.5 mg (0.54 mmol) TEA，继续搅拌 10 min 后，再加入 180.4 mg (0.54 mmol) 顺, 顺, 反- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OH})_2]$ ，氮气保护下 50℃ 反应 36h。反应液旋蒸除去溶剂后，浓缩液经柱层析分离，洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂（5:1），得到黄色固体 90.1 mg，产率：24%。

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 2.45(4H, s), 3.02-3.05 (2H, m), 4.28-4.31 (2H, m), 5.82-5.93 (6H, m), 6.30 (1H, s), 6.46-6.48 (1H, d), 7.39-7.41 (1H, d), 8.25 (1H, s), 8.29 (1H, s). ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 688.1$.

实施例 8. 配合物 8 的制备

将 77.8 mg (0.31 mmol) SAA-OH 和 100.2 mg (0.31 mmol) TBTU 溶于 15 mL 无水 DMF，室温搅拌 5 min，然后加入 31.6 mg (0.31 mmol) TEA，继续搅拌 5 min 后，再加入 110.2 mg (0.31 mmol) 顺, 顺, 反- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OH})\text{Cl}]$ ，氮气保护下 50℃ 反应 12h。反应液旋蒸除去溶剂后，浓缩液经柱层析分离，洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合溶剂（15:1），得到黄色固体 57.9 mg，产率：32%。

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.31 (s, 4H), 1.53 (d, $J = 28.7$ Hz, 5H), 2.35 - 2.18 (m, 4H), 6.18 (s, 7H), 7.01 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.28 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 25.53, 28.95, 36.78, 39.62, 39.76, 39.90, 40.04, 40.18, 40.31, 40.45, 119.52, 123.36, 129.08, 171.73. ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 582.0$.

实施例 9. CUT-OH 的制备

(1) M1 和 M2 的制备

将 2.76 g (20 mmol) 2,4-二羟基苯甲醛、2.34 g (20 mmol) 乙酰甘氨酸和 4.92 g (60 mmol) 乙酸钠加至 100 mL 乙酸酐中，搅拌回流 4h。冷却至室温，将反应液倒入冰水（约 500 mL）中，得到黄色沉淀物，过滤，用冰水洗涤 2 次，得到 M1 粗品。

将上述黄色固体置于反应瓶中，加入 30 mL 浓盐酸和乙醇（2:1）的混合溶液，回流 1h。

冷却至室温，将反应液倒入装有 40 mL 冰水中。Z 冰浴条件下，缓慢加入 2.76g(40 mmol)亚硝酸钠，加完搅拌 15 min，再缓慢加入 3.90 g(60 mmol)叠氮化钠，继续搅拌 15 min，过滤出褐色沉淀，水洗，柱层析分离得中间体 M2 1.51g，洗脱液为石油醚和乙酸乙酯 (5:1) 混合溶剂，产率 37%。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 6.76 (d, 1 H), 6.79–6.82 (dd, 1 H), 7.47–7.50 (d, , 1 H), 7.59 (s, 1 H), 10.51 (s, 1 H).

(2) M3 的制备

将 500.0 mg(2.46 mmol) M2 悬浮于 10 mL 甲醇中，172.3 mg(2.46 mmol)丁-3-炔-1-醇和 24.4 mg(0.12 mmol)抗坏血酸钠，氮气保护下室温搅拌 10 min，再将溶于 2 mL 水的 122.9 mg (0.49 mmol)五水硫酸铜加入到反应液中，室温避光搅拌 4h，然后旋蒸除去反应液中的甲醇，加入 10 mL 水析出黄色固体，过滤，固体用纯水洗涤两次，干燥得中间体 M3 604 mg，产率 90%。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 2.87–2.89 (2H, m), 3.69–3.71 (2H, m), 4.72(1H, s), 6.84(1H, s), 6.89–6.91 (1H, d), 7.74–7.75 (1H, d), 8.33 (1H, s), 8.55 (1H, s), 10.83 (1H, s). ESI-MS: $[\text{M-H}]^- = 272.1$.

(3) 产物的制备

将 200.0 mg(0.73 mmol)M3 溶于 10 mL DMF，加入 146.5 mg(1.46 mmol)的丁二酸酐和催化量的 DMAP，50℃反应过夜，冷却至室温，浓缩反应液，柱层析分离得浅黄色产物 231 mg，产率 85 %，洗脱液为石油醚、乙酸乙酯和甲醇 (10:10:1) 混合溶剂。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): δ 2.42(4H, s), 3.04–3.08 (2H, m), 4.30–4.34 (2H, m), 6.85(1H, s), 6.89–6.92 (1H, d), 7.73–7.76 (1H, d), 8.40 (1H, s), 8.57 (1H, s), 10.87 (1H, s), 12.15 (1H, s). ESI-MS: $[\text{M-H}]^- = 372.1$.

(二)、化合物的体外细胞毒活性测试

实验方法：采用 MTT 方法对本发明的代表性化合物和顺铂药物进行了细胞毒活性测试。取对数生长期的细胞计数，接种于 96 孔培养板内，每孔约 8000–10000 个细胞。过夜培养，待细胞贴壁后进行给药，分别设给药组，阳性对照组和阴性对照组。待测的化合物用 5%的葡萄糖水溶液或 DMSO 配制成贮液，临用前用细胞培养基稀释成一系列浓度，其中 DMSO 的终浓度不超过 4%。每个浓度设 3 个复孔。加药后培养 72 小时，加 20 μ l 浓度为 5mg/ml 的 MTT，37℃孵育 4 小时，去上清，加入 150 μ l 的 DMSO 溶解甲瓩。用酶标仪在 490 波长下测定每孔的 OD 值，并计算抑制率，做浓度-抑制率曲线计算 IC_{50} 值。

试验例 1

测试了化合物 1-2 对人乳腺癌细胞 MCF-7、肝癌细胞 HepG2、结肠癌细胞 HCT-116、卵巢癌细胞 A2780、胰腺癌细胞 PANC-1、胃癌细胞 SGC-7901 和顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP 的体外抗肿瘤活性, 顺铂作为阳性对照。观察化合物在不同浓度下对肿瘤细胞生长的抑制情况, 计算抑制率及其 IC_{50} 值来评价药物的细胞毒活性, 结果见表 2。

表 2. 化合物 1 和 2 的细胞毒活性

	$IC_{50} (\mu M)$							RF*
	MCF 7	HepG2	HCT 116	A2780	PANC 1	SGC 7901	SGC 7901 /CDDP	
CK2 表达	高	高	高	高	低	中	中	
顺铂	3.51 ± 0.21	8.49 ± 0.55	11.71 ± 1.19	13.98 ± 1.08	16.02 ± 2.09	1.86 ± 0.15	8.15 ± 0.63	4.38
化合物 1	0.80 ± 0.07	3.07 ± 0.19	3.49 ± 0.26	5.26 ± 0.75	15.23 ± 2.79	3.70 ± 0.28	2.23 ± 0.18	0.60
化合物 2	3.67 ± 0.28	15.50 ± 1.04	nd**	nd**	nd**	5.38 ± 0.51	1.30 ± 0.07	0.24

*, RF: 耐药因子=耐药癌细胞 IC_{50} 值/正常癌细胞 IC_{50} 值。

**, nd: 没有测定。

试验例 2

测试了化合物 3 对人结肠癌细胞 HCT-116、胃癌细胞 SGC-7901 和顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP 的体外抗肿瘤活性, 顺铂作为阳性对照。观察化合物在不同浓度下对肿瘤细胞生长的抑制情况, 计算抑制率及其 IC_{50} 值来评价药物的细胞毒活性, 结果见表 3。

表 3. 化合物 3 的细胞毒活性

化合物	$IC_{50} (\mu M)$			RF*
	HCT 116	SGC 7901	SGC 7901/CDDP	
顺铂	7.78 ± 0.63	1.11 ± 0.09	8.18 ± 0.73	7.37
化合物 3	4.37 ± 0.37	1.97 ± 0.21	5.23 ± 0.47	2.65

*, RF: 耐药因子=耐药癌细胞 IC_{50} 值/正常癌细胞 IC_{50} 值。

试验例 3

测试了化合物 4-6 对人结肠癌细胞 HCT-116、肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF-7、肝癌细胞 HepG2、胃癌细胞 SGC-7901 和顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP 的体外抗肿瘤活性, 顺铂作为阳性对照。观察化合物在不同浓度下对肿瘤细胞生长的抑制情况, 计算抑制率及其 IC_{50} 值来评价药物的细胞毒活性, 结果见表 4。

表 4. 化合物 4-6 的细胞毒活性

化合物	IC ₅₀ (μ M)						RF*
	HCT 116	A549	MCF7	HepG2	SGC 7901	SGC 7901/CDDP	
顺铂	9.34±0.85	4.51±0.35	6.40±0.48	6.94±0.48	1.86±0.15	8.15±0.63	7.37
化合物 4	nd**	nd**	15.63±0.87	11.71±0.83	nd**	nd**	
化合物 5	14.39±1.36	6.28±0.59	7.30±0.53	1.75±0.12	0.93±0.02	0.39±0.02	0.42
化合物 6	0.31±0.02	4.02±0.26	2.46±0.18	nd**	0.081±0.001	0.43±0.02	5.31

*, RF: 耐药因子=耐药癌细胞 IC₅₀ 值/正常癌细胞 IC₅₀ 值。

**, nd: 没有测定。

试验例 4

测试了化合物 7 对人脑胶质瘤细胞 U87 和神经胶质细胞瘤细胞 U251 的体外抗肿瘤活性, 顺铂作为阳性对照。观察化合物在不同浓度下对肿瘤细胞生长的抑制情况, 计算抑制率及其 IC₅₀ 值来评价药物的细胞毒活性, 结果见表 5。

表 5. 化合物 7 的细胞毒活性

化合物	IC ₅₀ (μ M)	
	U87	U251
顺铂	7.89	16.50±1.23
化合物 7	2.86	5.39±0.42

试验例 5

测试了化合物 8 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7、结肠癌细胞 HCT-116、胃癌细胞 SGC-7901 和顺铂耐药胃癌细胞 SGC-7901/CCCP 的体外抗肿瘤活性, 顺铂作为阳性对照。观察化合物在不同浓度下对肿瘤细胞生长的抑制情况, 计算抑制率及其 IC₅₀ 值来评价药物的细胞毒活性, 结果见表 6。

表 6. 化合物 8 的细胞毒活性

化合物	IC ₅₀ (μ M)					RF*
	MDA MB 231	MCF 7	HCT 116	SGC 7901	SGC 7901/CDDP	
顺铂	7.96±0.64	3.75±0.29	7.44±0.72	1.86±0.15	8.15±0.63	7.37
化合物 8	9.32±0.47	1.61±0.13	16.27±1.21	1.08±0.09	0.71±0.03	0.66

*, RF: 耐药因子=耐药癌细胞 IC₅₀ 值/正常癌细胞 IC₅₀ 值。

(三)、化合物的体内抗肿瘤活性测试

实验方法：采用裸鼠，评价受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植肿瘤生长有无抑制作用及作用强度。

受试动物：BALB/c 裸小鼠，由上海灵畅生物科技有限公司提供。实验动物生产许可证：SCXK(沪) 2013-0018，合格证编号：2013001812710，实验动物使用许可证：SYXK(苏) 2011-0036。日龄：6w，体重：18-20g，性别：雌性，动物数：每组 5 只，共 35 只。

药物及试剂：顺铂、化合物 1 和 CX-OH，均用 5%葡萄糖注射液超声溶解。

组别及给药方案如下：

模型对照组：尾静脉注射 5%葡萄糖水，0.1ml/10g，每周一次，共给药 3 次；

化合物 1 (5mg/kg)：尾静脉注射 5mg/kg 药物溶液，0.1ml/10g，每周一次，共给药 3 次；

顺铂 (5mg/kg)：尾静脉注射 5mg/kg 的药物溶液，0.1ml/10g，每周一次，共给药 3 次；

CX-OH (5mg/kg)：灌胃 5mg/kg 的药物溶液，0.1ml/10g，每周一次，共给药 3 次；

CX-OH (5mg/kg)：灌胃 5mg/kg 的药物溶液，0.1ml/10g，隔天一次，共给药 11 次；

顺铂 + CX-OH (均为 5mg/kg)：尾静脉注射顺铂溶液，灌胃 CX-OH 溶液，0.1ml/10g，均为每周一次，共给药 3 次；

顺铂 + CX-OH (均为 5mg/kg)：尾静脉注射顺铂溶液，0.1ml/10g，每周一次，共给药 3 次，灌胃 CX-OH，0.1ml/10g，隔天一次，共给药 11 次；

试验例 6

收集培养的人胃癌 SGC-7901 细胞悬液，浓度为 1×10^7 个/ml，以每只 0.1ml 接种于裸小鼠右侧腋窝皮下。裸鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，接种 11 天后，肿瘤生长至 $100-150\text{mm}^3$ 时将动物随机分组，每组 5 只。同时，各组裸鼠开始给药，给药方案见组别与给药方案，使用测量瘤径的方法，动态观察受试样品的抗肿瘤效应。实验结束后，随即处死裸鼠，手术剥取瘤块称重。

肿瘤体积(tumor volume ,TV)的计算公式为： $TV=1/2ab^2$ ，其中 a、b 分别表示长宽。

根据测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV)，计算公式为：

$RTV=V_t/V_0$ ，其中 V_0 为分笼给药时(即 d_0)测量所得肿瘤体积， V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。

抗肿瘤活性的评价指标：相对肿瘤增殖率 T/C (%)，计算公式如下：

$$T/C (\%) = \frac{T_{RTV}}{C_{RTV}} \times 100$$

其中， T_{RTV} ：治疗组 RTV ； C_{RTV} ：模型组 RTV。

抗肿瘤活性的评价指标：肿瘤生长抑制率（%），计算公式如下：

$$\text{肿瘤生长抑制率} = \frac{\text{给药组平均瘤重} - \text{模型组平均瘤重}}{\text{模型组平均瘤重}} \times 100\%$$

均值用 $\bar{X} \pm SD$ 表示，组间分析用 t 检验进行统计学处理，应用 SPSS（Staffstical Package for the Social Science）17.0 对结果进行统计分析。

表 7. 受试样品对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠异种移植瘤生长的抑制作用

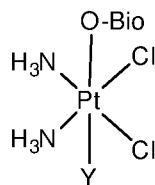
组别	动物数量	动物体重	肿瘤体积	给药方案	实验周期			
	起始（只）	起始（g）	起始（ cm^3 ）	给药方式	给药剂量	给药次数	给药频率	（天）
模型对照组	5	19.0±0.3	0.108±0.013	尾静脉注射	—	3	每周一次	21
顺铂	5	18.8±0.4	0.101±0.009	尾静脉注射	5mg/Kg	3	每周一次	21
化合物 1	5	19.1±0.3	0.105±0.012	尾静脉注射	5mg/Kg	3	每周一次	21
CX OH/W	5	19.3±0.4	0.103±0.012	灌胃	5mg/Kg	3	每周一次	21
CX OH/d	5	19.1±0.4	0.103±0.021	灌胃	5mg/Kg	11	隔天一次	21
顺铂+CX OH/W	5	18.9±0.5	0.102±0.012	尾静脉+灌胃	5mg/Kg	3	每周一次	21
顺铂+ CX OH /d	5	19.1±0.3	0.108±0.023	尾静脉+灌胃	5mg/Kg	3+11	每周+隔天	21

组别	动物数量	动物体重	肿瘤体积	相对肿瘤增殖率 T/C	肿瘤重	抑瘤率
	处死（只）	处死（g）	处死（ cm^3 ）		处死（g）	
模型对照组	5	23.1±0.5	2.396±0.128		2.459±0.441	
顺铂	5	17.3±0.5**	1.036±0.118**	45.81%	1.444±0.546*	41.27%
化合物 1	5	22.6±0.5	0.918±0.068**	39.13%	0.747±0.114**	69.63%
CX OH/W	5	23.1±0.5	1.874±0.173**	81.18%	2.123±0.471	13.63%
CX OH/d	5	22.9±0.4	1.583±0.148**	70.42%	1.672±0.653	31.99%
顺铂+ CX OH/W	5	17.2±0.1**	1.013±0.072**	44.52%	1.083±0.61**	55.95%
顺铂+ CX OH/d	5	17.3±0.2**	0.915±0.043**	38.71%	0.754±0.241**	69.35%

与模型对照组比较，* $P < 0.05$ ， ** $P < 0.01$

权利要求书

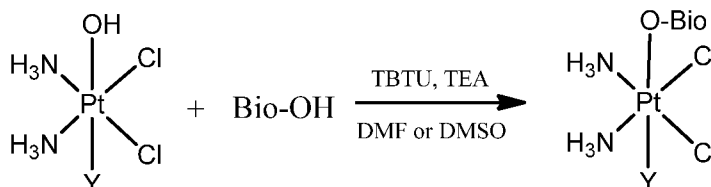
1. 一类含有生物活性基团的四价铂配合物，其特征在于，所述的四价铂配合物即铂(IV)配合物，其结构如式 II 所示：



式 II

式 II 中，Y 为 OH 或 Cl；Bio 代表生物活性基团。

2. 一种如权利要求 1 所述的一类含有生物活性基团的四价铂配合物的制备方法，其特征在于，所述的铂(IV)配合物，按照式 III 所示的反应式进行，



式 III

式 III 中，Y 为 OH 或 Cl；Bio-OH 代表具有生物活性的化合物，TBTU 代表偶联试剂 O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸，TEA 代表催化剂三乙胺，DMF 代表溶剂 N,N-二甲基甲酰胺，DMSO 代表溶剂二甲亚砜；

具体采用如下方法：将等摩尔的反应物 Bio-OH 和偶联试剂 TBTU 于无水 DMF 或 DMSO 混合，在室温搅拌下，加入等摩尔的 TEA，然后加入等摩尔的 Pt(IV) 反应物 A 或 B，反应液于氮气保护下在 30-60℃ 度下搅拌 12-48 小时，然后减压除去溶剂，浓缩液经硅胶柱层析分离，洗脱液为二氯甲烷与甲醇混合溶剂，得到黄色固体产物；

Pt(IV) 反应物 A 和 B 的结构如式 IV 表示，

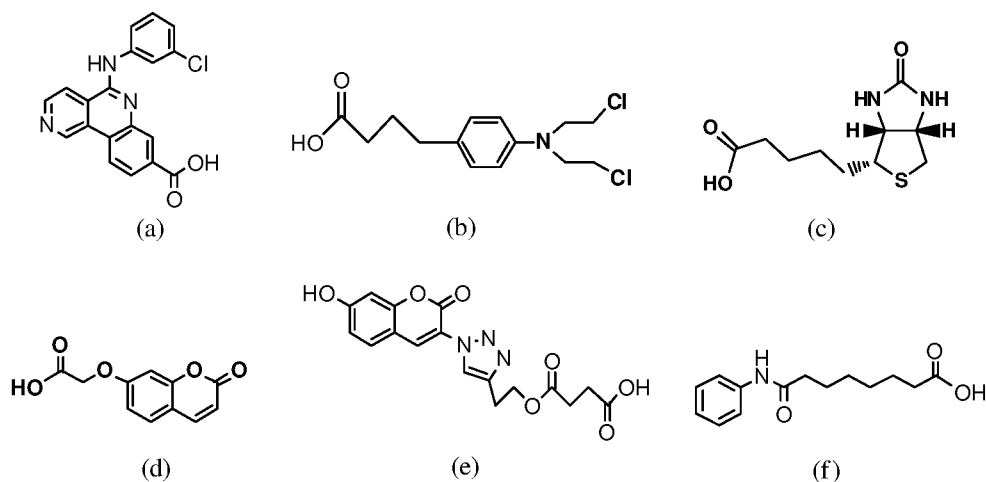


式 IV

其中 A 代表顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]，通过顺铂和双氧水在水中反应制备获得；B 代表顺, 顺, 反-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)Cl]，通过顺铂和氯代丁二酰亚胺在水中反应制备获得。

3. 根据权利要求 2 所述的一类含有生物活性基团的四价铂配合物的制备方法，其特征在

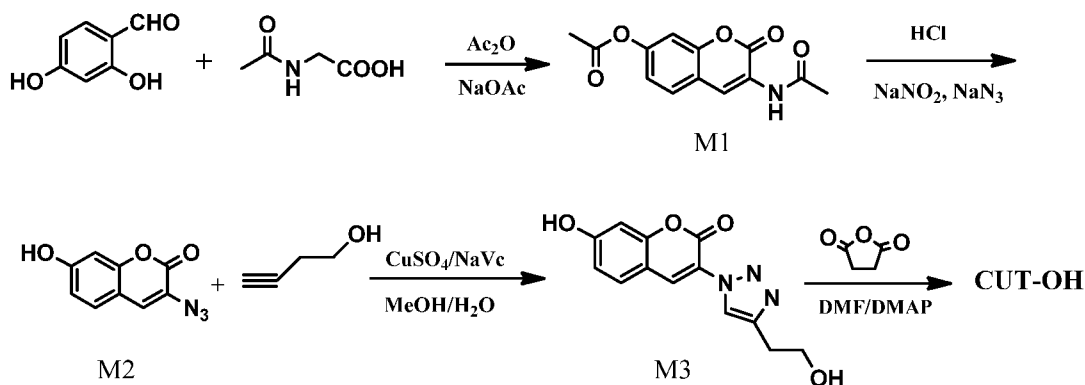
于, 所述的 Bio-OH 代表具有生物活性的化合物结构由式 I (a-f) 所示,



式 I

其中, (a) 为已知进入临床试验的靶向抗肿瘤药物 silmitasertib, 是一种蛋白激酶 CK2 抑制剂, 简称为 CX-OH; (b) 为已知上市药物苯丁酸氮芥, 是一种靶点为 DNA 的抗肿瘤药物, 简称为 CHL-OH; (c) 为生物素, 即维生素 H, 简称为 BT-OH; (d) 为具有抗氧化抗癌作用的天然产物香豆素的羧酸衍生物, 简称为 CUA-OH; (e) 为具有抗氧化抗癌作用的天然产物香豆素的三氮唑羧酸衍生物, 简称为 CUT-OH; (f) 为已知抗肿瘤药物 SAHA 的羧酸衍生物, 是一种 PARP 抑制剂, 简称为 SAA-OH。

4. 根据权利要求 2 所述的一类含有生物活性基团的四价铂配合物的制备方法, 其特征在于, 所述的 CUT-OH 的制备按式 V 所示的反应式进行,



式 V

制备 CUT-OH 采用如下制备方法:

1) 将等摩尔的 2,4-二羟基苯甲醛和乙酰甘氨酸及三倍量的乙酸钠加入乙酸酐中, 搅拌回流 4h, 将反应液冷却至室温, 倒入冰水中, 得到黄色沉淀物, 过滤, 用冰水洗涤两次, 干燥固体得中间体 M1;

2) 将 M1 加入浓盐酸:乙醇为 2:1 的混合溶液中, 回流 1h, 将反应液冷却至室温, 倒入冰水中, 然后在冰浴条件下, 缓慢加入二倍量的亚硝酸钠, 加完搅拌 15 min 后, 再缓慢加入三倍量的叠氮化钠, 继续搅拌 15 min, 过滤出褐色沉淀, 水洗, 柱层析分离得中间体 M2, 洗脱液为石油醚:乙酸乙酯为 5:1 混合溶剂;

3) 将 M2 悬浮于甲醇, 加入等摩尔的丁-3-炔-1-醇和少量抗坏血酸钠, 氮气保护下室温搅拌 10 min, 再将溶于水的二倍量的五水硫酸铜加入到反应液中, 室温避光搅拌 4h, 然后旋蒸除去反应液中的甲醇, 加水析出黄色固体, 过滤, 所得固体用纯水洗涤两次, 干燥得中间体 M3;

4) 将 M3 溶于 DMF, 加入二倍量的丁二酸酐和催化量的 DMAP, 50℃反应过夜, 冷却至室温, 浓缩反应液, 柱层析分离得浅黄色产物, 洗脱液为石油醚:乙酸乙酯:甲醇为 10:10:1 混合溶剂。

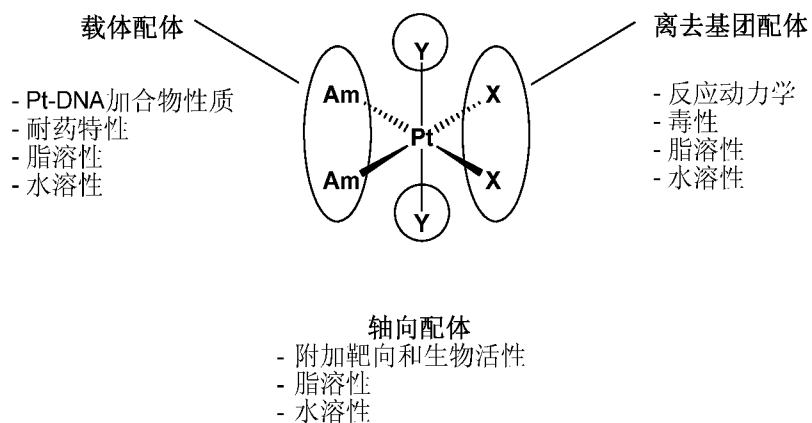


图 1

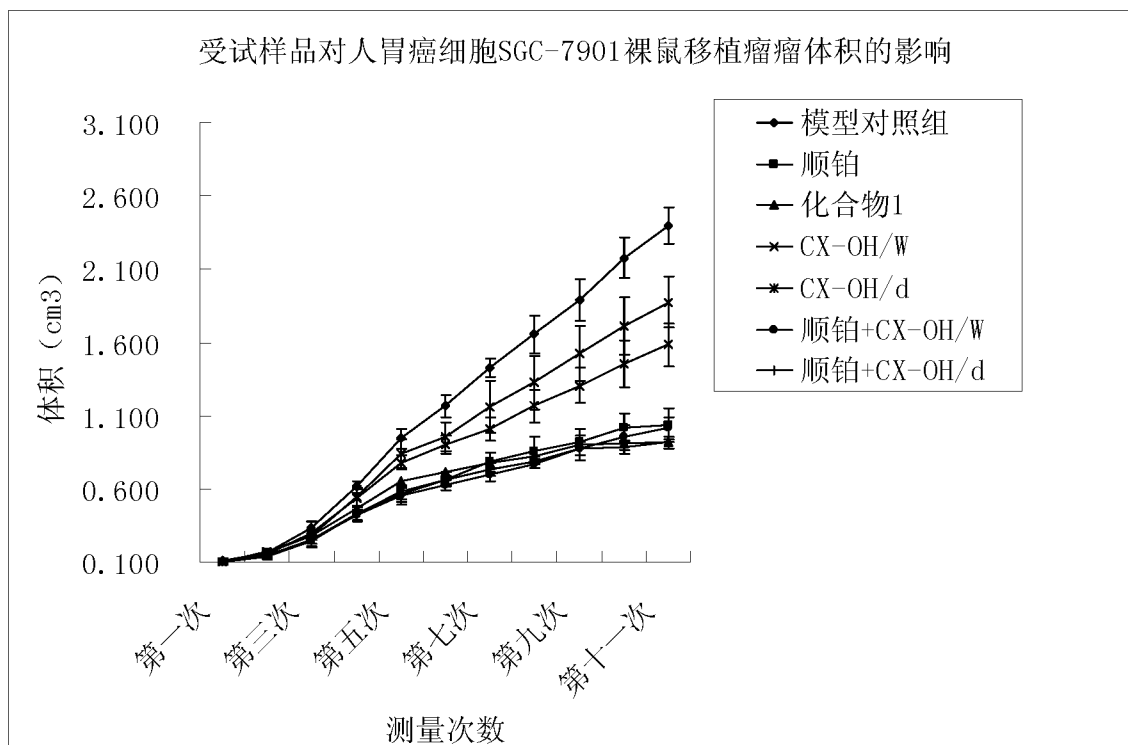
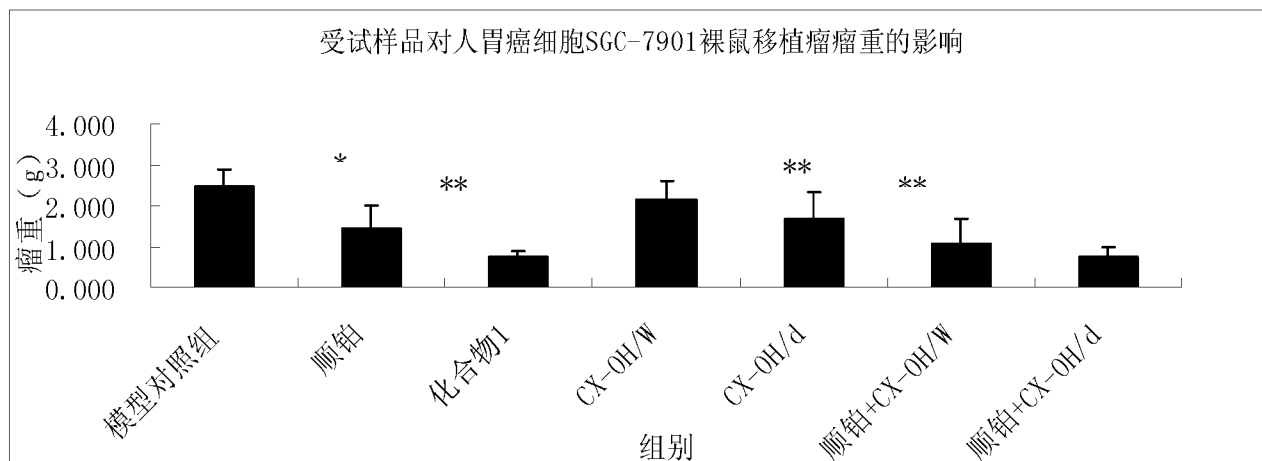


图 2



与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3

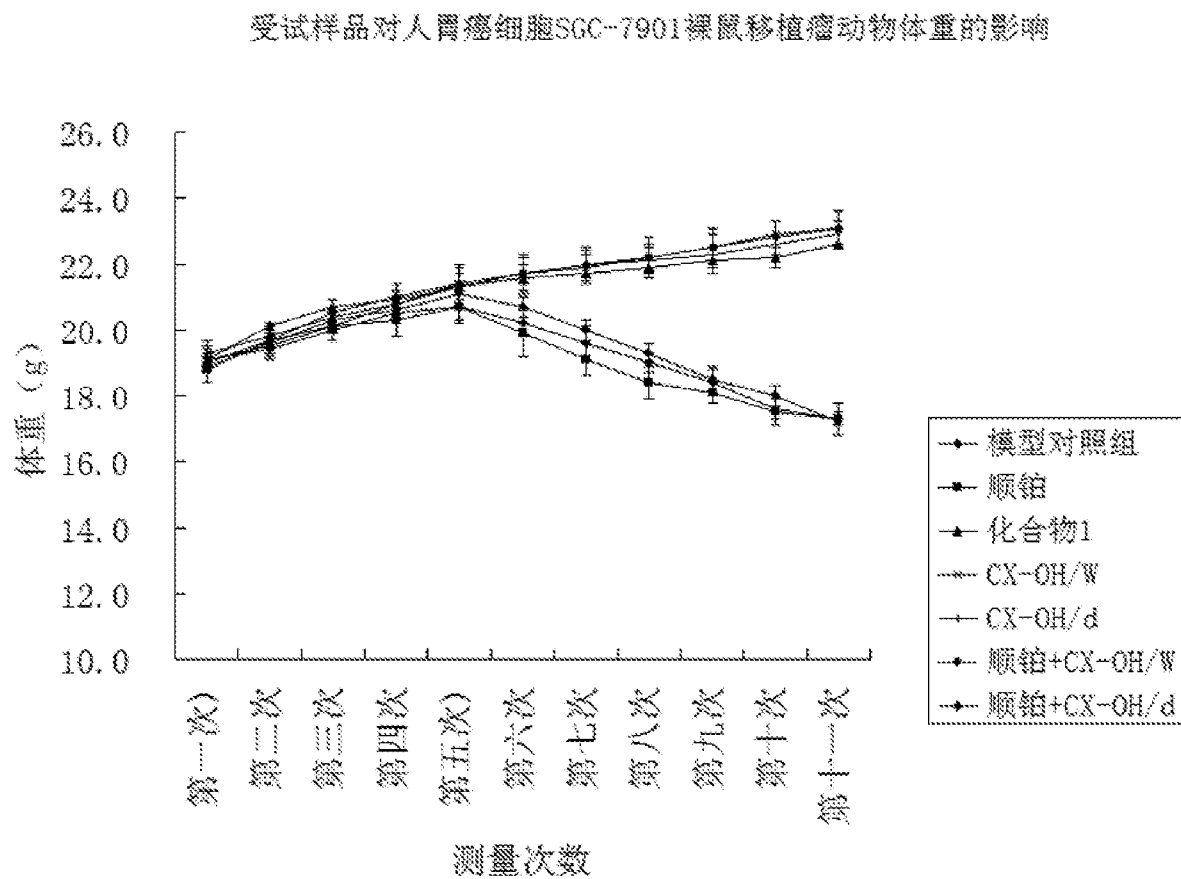


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/108275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F 15/00 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F 15, A61P 35

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, SIPOABS, DWPI, STN (CAPLUS, REGISTRY): Pt. IV, SAHA, PARP, platinum, tetravalence, complex, bioactivity, biological activity, silmitasertib, protein, kinase, inhibitor, leukeran, biotin, vitamine H, coumarin, cumarin, cancer, tumour, The structure of the compound according to claim 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105622674 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 01 June 2016 (01.06.2016) claims 1-4	1-4
X	CN 103554187 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 05 February 2014 (05.02.2014) description, page 1, paragraphs [0003] and [0004] and page 7, embodiment 4	1
Y	CN 103554187 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 05 February 2014 (05.02.2014) description, page 1, paragraphs [0003] and [0004] and page 7, embodiment 4	2
A	CN 103554187 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 05 February 2014 (05.02.2014) the whole document	3, 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 February 2017	Date of mailing of the international search report 07 March 2017
---	---

Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Chunyan Telephone No. (86-10) 62086303
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/108275

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC et al.) 30 December 2015 (30.12.2015) embodiment 18	2
A	WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC et al.) 30 December 2015 (30.12.2015) the whole document	1, 3, 4
X	US 20140378427 A1 (BLEND THERAPEUTICS et al.) 25 December 2014 (25.12.2014) description, paragraphs [0039]-[0031]	1
Y	US 20140378427 A1 (BLEND THERAPEUTICS et al.) 25 December 2014 (25.12.2014) description, paragraphs [0039]-[0031]	2
A	US 20140378427 A1 (BLEND THERAPEUTICS et al.) 25 December 2014 (25.12.2014) the whole document	3, 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/108275

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105622674 A	01 June 2016	None	
CN 103554187 A	05 February 2014	CN 103554187 B	30 March 2016
WO 2015200250 A1	30 December 2015	US 9403858 B2	02 August 2016
		AU 2015280204 A1	12 January 2017
		US 2016317549 A1	03 November 2016
		US 2016068557 A1	10 March 2016
		CA 2953350 A1	30 December 2015
US 20140378427 A1	25 December 2014	US 9480657 B2	01 November 2016

A. 主题的分类 C07F 15/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07F 15, A61P 35 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNKI, SIPOABS, DWPI, STN (CAPLUS, REGISTRY): 铂, Pt, 四价, IV, 配合物, 生物活性, 苯丁酸氮, 生物素, 维生素H, 香豆素, 蛋白激酶, 抑制剂, 癌, 肿瘤, SAHA, PARP, platinum, tetravalence, complex, bioactivity, biological activity, silmitasertib, protein, kinase, inhibitor, leukeran, biotin, vitamine H, coumarin, cumarin, cancer, tumour, 权利要求1中化合物的结构																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 105622674 A (东南大学) 2016年 6月 1日 (2016 - 06 - 01) 权利要求1-4</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第1页第[0003]-[0004]段, 以及第7页实施例4</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第1页第[0003]-[0004]段, 以及第7页实施例4</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 全文</td> <td>3-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC等) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 实施例18</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC等) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 全文</td> <td>1, 3-4</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 105622674 A (东南大学) 2016年 6月 1日 (2016 - 06 - 01) 权利要求1-4	1-4	X	CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第1页第[0003]-[0004]段, 以及第7页实施例4	1	Y	CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第1页第[0003]-[0004]段, 以及第7页实施例4	2	A	CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 全文	3-4	Y	WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC等) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 实施例18	2	A	WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC等) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 全文	1, 3-4
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 105622674 A (东南大学) 2016年 6月 1日 (2016 - 06 - 01) 权利要求1-4	1-4																					
X	CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第1页第[0003]-[0004]段, 以及第7页实施例4	1																					
Y	CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第1页第[0003]-[0004]段, 以及第7页实施例4	2																					
A	CN 103554187 A (中国科学技术大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 全文	3-4																					
Y	WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC等) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 实施例18	2																					
A	WO 2015200250 A1 (BLEND THERAPEUTICS INC等) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 全文	1, 3-4																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期 2017年 2月 27日		国际检索报告邮寄日期 2017年 3月 7日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张春艳 电话号码 (86-10)62086303																					

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	US 20140378427 A1 (BLEND THERAPEUTICS等) 2014年 12月 25日 (2014 - 12 - 25) 说明书[0039]-[0031]段	1
Y	US 20140378427 A1 (BLEND THERAPEUTICS等) 2014年 12月 25日 (2014 - 12 - 25) 说明书[0039]-[0031]段	2
A	US 20140378427 A1 (BLEND THERAPEUTICS等) 2014年 12月 25日 (2014 - 12 - 25) 全文	3-4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/108275

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105622674	A	2016年 6月 1日	无	
CN	103554187	A	2014年 2月 5日	CN	103554187 B 2016年 3月 30日
WO	2015200250	A1	2015年 12月 30日	US	9403858 B2 2016年 8月 2日
				AU	2015280204 A1 2017年 1月 12日
				US	2016317549 A1 2016年 11月 3日
				US	2016068557 A1 2016年 3月 10日
				CA	2953350 A1 2015年 12月 30日
US	20140378427	A1	2014年 12月 25日	US	9480657 B2 2016年 11月 1日