(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 115427423 B
(45)授权公告日 2024.08.16

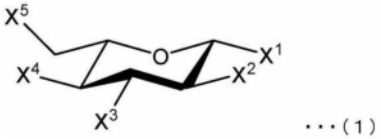
(21)申请号 202180025320.0
(22)申请日 2021.03.31
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115427423 A
(43)申请公布日 2022.12.02
(30)优先权数据
2020-066177 2020.04.01 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/013857 2021.03.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/201109 JA 2021.10.07
(73)专利权人 奥碧奥株式会社
地址 日本京都府京都市
(72)发明人 山口荣一 饭岛秀树
(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
专利代理师 吕琳 朴秀玉
(51)Int.Cl.
C07H 23/00(2006.01)
A61K 31/7135(2006.01)
A61K 41/00(2020.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07F 1/12(2006.01)
C07F 9/50(2006.01)
C07F 19/00(2006.01)
(56)对比文件
Navarro, Maribel 等.Metal-chloroquine derivatives as possible anti-malarial drugs: evaluation of anti-malarial activity and mode of action.Malaria Journal .2014,第13卷第471/1-471/17页.
审查员 刘晓旭
权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54)发明名称

金属糖类络合物

(57)摘要

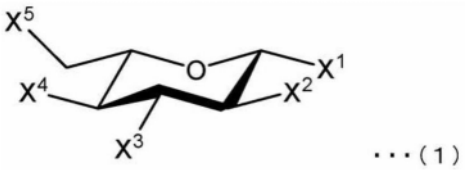
一种下述通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物。[式(1)中,X^1表示－SAuR^1基,X^2、X^3、X^4以及X^5分别独立地表示－OR^2基、－NH_2基或氟原子。R^1表示配体,R^2表示氢原子或有机基团。]



...(1)

CN 115427423 B

1.一种L－葡萄糖衍生物,其由下述通式(1)表示,



···(1)

式(1)中,X^1表示－SAuR^1基,X^2、X^3、X^4以及X^5分别独立地表示－OR^2基,R^1表示三乙基膦配体,R^2表示氢原子或乙酰基。

金属糖类络合物

技术领域

[0001] 本发明涉及金属糖类络合物。

背景技术

[0002] 近年来,作为癌症的非侵入性治疗方法,温热疗法(hyperthermia)受到关注。温热疗法是利用癌细胞(恶性肿瘤细胞)比正常细胞不耐热的性质,通过加热患部来杀灭癌细胞或改变癌细胞周围的环境、或者增强癌症治疗的效果,由此实现提高患者生存率的方法(例如,参照非专利文献1)。作为温热疗法中的加热方法,例如可列举出向患部照射射频波(RF波)的方法。这种方法被称为高频温热疗法治疗。

[0003] 再者,在通常的向患部照射射频波的方法中,难以选择性地加热癌细胞,周围的正常细胞也会被加热,因此存在能量效率差、对患者的负担大等问题。对此,在专利文献1中,提出了将磁性粒子等作为RF吸收增强子(敏化药物)引导至肿瘤(患部),提高RF波的加热效率的方法。作为将RF吸收增强子引导至肿瘤的方法,例如提出了作为流体的一部分通过注射等直接导入肿瘤的方法;使用MRI引导至患部的方法等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特表2007—536016号公报

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Killock,D.Nature Reviews Clinical Oncology,15:266,2018.

发明内容

[0009] 发明所要解决的问题

[0010] 然而,在专利文献1等以往的方法中,存在难以仅向肿瘤选择性地引导RF吸收增强子、或者难以向深部的癌特别是胰腺癌的癌细胞引导RF吸收增强子等问题。

[0011] 因此,本发明的目的之一在于提供一种敏化药物,该敏化药物可以选择性地被摄入癌细胞中,在高频温热疗法治疗时,能够选择性地使靶部位产生热。

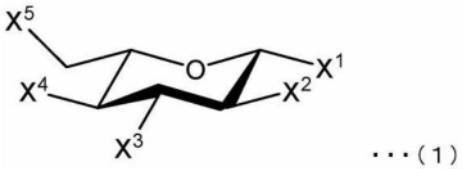
[0012] 此外,作为癌症的一般治疗法之一,已知有使用抗癌剂的方法。通常,抗癌剂不仅作用于癌细胞,还作用于正常细胞,结果出现强烈的副作用。如何减轻该副作用成为癌症治疗中的问题。对此,掌握癌细胞特异性表达的分子来抑制癌细胞的增殖、转移的分子靶向药受到关注。根据分子靶向药,可期待抑制由经典的抗癌剂引起的副作用。然而,实际上被称为癌细胞特异性表达的分子也在正常细胞中表达,而且分子靶向药也作用于与设想不同的分子等,经常产生副作用。不言而喻的是,人体是细胞的集合。只要是细胞,其活动的能量源、增殖就需要碳源。因此,近年来,不是以我们生物体内存在的特定的蛋白、分子为靶点,而是通过标记被摄入细胞的分子来识别癌症的方法再次受到关注(Ono K.et al.,Cancers 2020)。

[0013] 再者,如果存在对正常细胞呈低毒性且选择性地被癌细胞摄入而呈现毒性的化合

物,则可期待副作用的减轻。因此,本发明的另一目的在于提供一种对正常细胞呈低毒性且选择性地被癌细胞摄入而呈现毒性的化合物。

[0014] 用于解决问题的方案

[0015] 为了解决上述问题,本发明人等进行了深入研究,结果发现了以下的通式(1)所示的L—葡萄糖衍生物。

[0016] 

···(1)

[0017] [式(1)中,X^1表示—SAuR^1基,X^2、X^3、X^4以及X^5分别独立地表示—OR^2基、—NH_2基或氟原子。R^1表示配体(ligand),R^2表示氢原子或有机基团。]

[0018] 根据该L—葡萄糖衍生物,如实施例所示,可选择性地被摄入癌细胞中。在该L—葡萄糖衍生物的存在下,如实施例所示,RF波的加热效率提高,因此能够作为敏化药物发挥功能。如实施例所示,该L—葡萄糖衍生物对正常细胞呈低毒性且可期待提高对癌细胞的选择性的效果。

[0019] 通过本发明的L—葡萄糖衍生物发挥上述效果的理由未必明确,但本发明人等的考察如下所示。

[0020] L—葡萄糖是自然界中少见的分子,但为作为自然界中广泛存在的葡萄糖的D—葡萄糖的光学异构体。D—葡萄糖借助存在于细胞膜的葡萄糖转运蛋白(GLUT、SGLT)被摄入细胞内,成为能量源或者碳源,另一方面,L—葡萄糖被认为无法通过葡萄糖转运蛋白,几乎不被摄入正常细胞中。

[0021] 另一方面,本发明的L—葡萄糖衍生物的至少一部分可能会选择性地被摄入癌细胞中。

[0022] 除此以外,认为本发明的L—葡萄糖衍生物在分子中包含金原子(Au),因此可能会得到加热效果。进而,本发明的L—葡萄糖衍生物在分子中包含金原子(Au),因此在被摄入癌细胞中时,金原子可能会对癌细胞呈现显著的毒性。

[0023] 发明效果

[0024] 根据本发明,能够提供一种敏化药物,该敏化药物可以选择性地被摄入癌细胞中,在高频温热疗法治疗时,能够选择性地使靶部位产生热。而且,根据本发明,能提供一种对正常细胞呈低毒性且选择性地被癌细胞摄入而呈现毒性的化合物。

附图说明

[0025] 图1是表示RF波照射单元的示意图。

[0026] 图2是表示对培养天数4DIV(体外天数:Days In Vitro)的MIN6给药LGG时的死亡细胞数量的比例的图。

[0027] 图3的(A)是培养天数5DIV的MIN6的代表性光学显微镜照片,图3的(B)是对培养天数5DIV的MIN6给药LGG后的细胞的代表性光学显微镜照片,图3的(C)是对培养天数5DIV的MIN6预先给药PHT后隔一定时间给药LGG的细胞的代表性光学显微镜照片。

[0028] 图4是图3的光学显微镜照片的放大图。

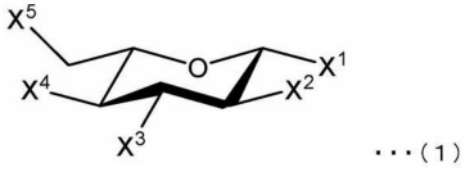
[0029] 图5是表示在PHT存在下和不存在下给药LGG时通过表示活细胞的活性的荧光标记物Calcein(钙黄绿素)的荧光强度来进行评价的结果的图。

[0030] 图6是表示对培养天数19DIV的MIN6给药LGG时的死亡细胞数量的比例的图。

具体实施方式

[0031] 以下,对本发明的优选实施方式详细地进行说明。但本发明并不限定于以下的实施方式。

[0032] 本实施方式的L－葡萄糖衍生物具有下述通式(1)所示的结构。

[0033] 

…(1)

[0034] [式(1)中,X^1表示－SAuR^1基,X^2、X^3、X^4以及X^5分别独立地表示－OR^2基、－NH_2基或氟原子。R^1表示配体,R^2表示氢原子或有机基团。]

[0035] 葡萄糖衍生物中存在D型和L型,通式(1)所示的结构为L型的葡萄糖衍生物。此外,在葡萄糖衍生物中可能存在端基差向异构体,即X^1朝向赤道方向的异头物(anomer)和X^1朝向轴方向的异头物,本实施方式的L－葡萄糖衍生物也可以是它们的混合物。

[0036] 作为R^1中的配体,例如可列举出:膦配体、硫醇盐配体(thiolate ligand)、烯烃配体等。

[0037] R^1优选为膦配体,更优选为三烷基膦配体,进一步优选为三乙基膦配体。

[0038] 作为R^2中的有机基团,例如可列举出:烷基、烯基、炔基、芳基、酰基等。这些基团可以进一步具有其他取代基。有机基团的碳原子数例如可以设为1～10,优选为1～5,更优选为1～3。

[0039] R^2优选为氢原子、烷基或酰基,更优选为氢原子或酰基,进一步优选为氢原子或乙酰基。

[0040] 通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物例如可以由L型的糖或其衍生物合成。作为L型的糖或其衍生物的具体例子,可列举出:L－葡萄糖、L－甘露糖、L－半乳糖、1,2:5,6－二－O－异亚丙基－α－L－呋喃葡萄糖等。

[0041] 作为由L型的糖或其衍生物合成通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物的方法,例如可列举出实施例所记载的方法等。通过适当组合实施例所记载的方法的各步骤或者利用以往公知的方法导入取代基,能合成各种衍生物。

[0042] 通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物可以适合用作在高频温热疗法治疗时利用的敏化药物。高频温热疗法治疗可以使用以往公知的装置。

[0043] 通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物可以在高频温热疗法治疗中的RF波的照射前或照射中进行给药。

[0044] 将通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物用作敏化药物的高频温热疗法治疗可以对癌症的治疗有效,特别是对胰腺癌、脑肿瘤、乳腺癌、子宫癌等各种癌症的治疗有效。

[0045] 通过使用通式(1)所示的L－葡萄糖衍生物,可以对癌症的治疗有效,特别是对胰腺癌、脑肿瘤、乳腺癌、子宫癌等各种癌症的治疗有效。

[0046] 通式(1)所示的L—葡萄糖衍生物例如可以口服剂(片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、糖浆剂等)、舌下片剂、注射剂(静脉内给药用、肌肉内给药用、皮下给药用、腹腔内给药用、关节内给药用、硬膜外给药用)、或者直接应用于子宫颈部、口腔内、皮肤等局部的形式进行给药。

[0047] 实施例

[0048] 以下,基于实施例对本发明更具体地进行说明,但本发明并不受实施例任何限定。需要说明的是,所合成的化合物的结构使用UPLC—MS、^{1}H—NMR、^{13}C—NMR等进行鉴定。需要说明的是,实施例中使用的缩写与化合物名的关系如下所示。

[0049] KSAc:硫代乙酸钾

[0050] NaOMe:甲醇钠

[0051] Et_3PAuCl:氯(三乙基膦)金(I)

[0052] DMF:N,N—二甲基甲酰胺

[0053] HOBt:1—羟基苯并三唑

[0054] WSC HCl:1—乙基—3—(3—二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐

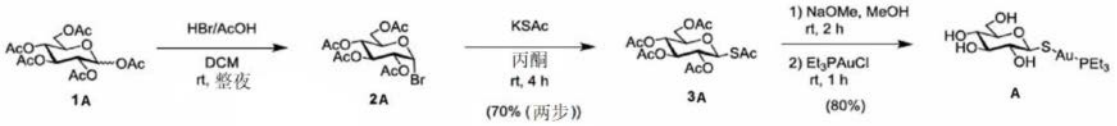
[0055] TMSOTf:三氟甲磺酸三甲基硅酯

[0056] THF:四氢呋喃

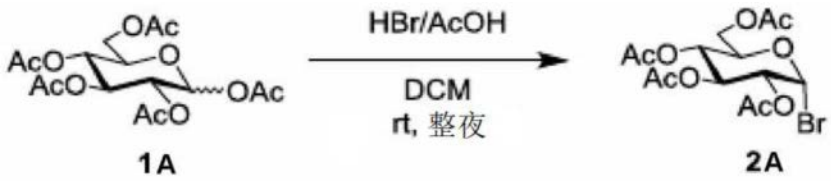
[0057] 参考合成例

[0058] 化合物A的合成

[0059] 以五—O—乙酰基—β—D—吡喃葡萄糖(化合物1A)为起始原料,按照以下的反应式来合成化合物A。

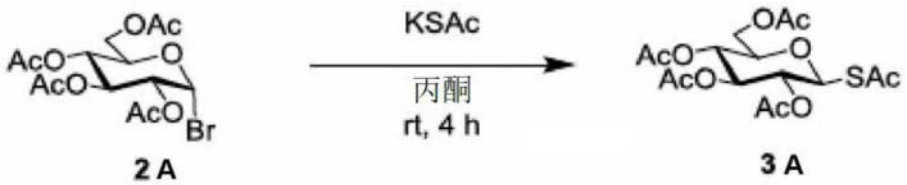
[0060] 

[0061] (1)化合物2A的合成

[0062] 

[0063] 在100mL茄形烧瓶中装入化合物1A(6.0g,15.4mmol)、二氯甲烷36mL,添加25%溴化氢—乙酸6.0mL。在室温下搅拌整夜后,加入水15mL进行分液操作。将得到的有机层用饱和碳酸氢钠水15mL、盐水(Brine)15mL清洗后,用硫酸钠干燥、浓缩。由此,得到7.9g的无色油状的化合物2A。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

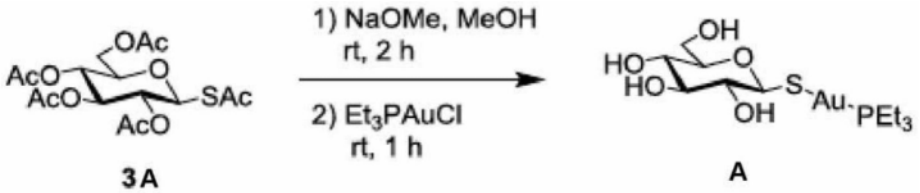
[0064] (2)化合物3A的合成

[0065] 

[0066] 在100mL烧瓶中装入化合物2A(6.3g)、丙酮30mL、KSAc(3.5g,30.7mmol),在室温下搅拌4小时。将反应液浓缩后,加入乙酸乙酯50mL、水30mL进行分液操作。收集了有机层后,

用盐水(Brine)30mL清洗,用硫酸钠使其干燥。通过使溶液浓缩,得到褐色油状的6.7g的粗产物。利用硅胶140g、展开溶剂:庚烷/乙酸乙酯=2:1~3:2进行精制。将目标馏分浓缩后,用庚烷200mL清洗、过滤,由此得到3.9g的浅桃色固体化合物3A(产率63%(两步))。

[0067] (3)化合物A的合成

[0068] 

[0069] 在500mL烧瓶中装入化合物3A(1.5g,3.7mmol)、甲醇150mL,在冰冷却下,在内温4℃下添加5MNaOMe甲醇溶液0.89mL。在室温下搅拌2小时后,添加Et_3PAuCl(1.4g,4.0mmol)。在室温下搅拌1小时后,将反应溶液浓缩,由此得到688mg的无色油状的粗产物。利用硅胶14.5g(吸附量1.5g)、展开溶剂:乙酸乙酯/甲醇=9:1~4:1进行精制,将目标馏分浓缩。将浓缩残渣溶于甲醇20mL,加入活性炭600mg,搅拌1小时,进行硅藻土过滤,得到化合物A((1—硫代—β—D—吡喃葡萄糖苷)(S—三乙基膦)金(I))。

[0070] 与从化合物3A(500mg,1.2mmol)出发,通过同样的方法得到的化合物A合并得到1.7g的无色无定形的化合物A(产率63%(两步))。

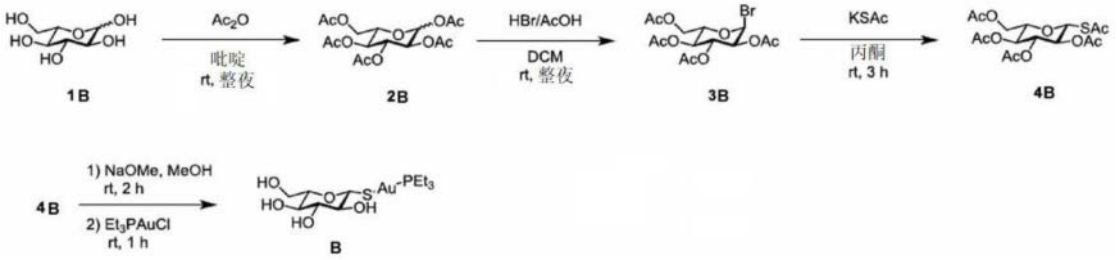
[0071] [比旋光度测定]

[0072] 将化合物A50.7mg溶于甲醇,形成5.00mL。使用池(cell)长度100mm的池,测定10次比旋光度,取去除了最大值和最小值后的平均值,其结果是,其平均值为+7.28度。

[0073] 实施例1

[0074] 化合物B的合成

[0075] 以L—(—)—葡萄糖(化合物1B)为起始原料,按照以下的反应式来合成化合物B。

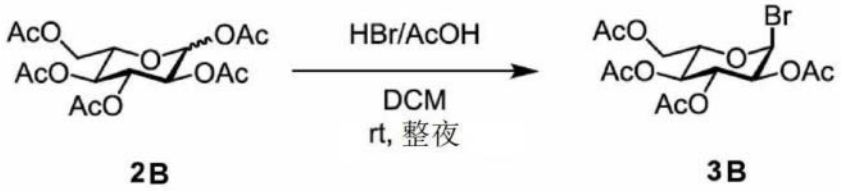
[0076] 

[0077] 化合物2B的合成

[0078] 

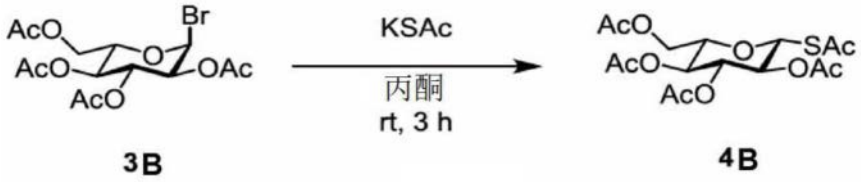
[0079] 在200mL茄形烧瓶中装入化合物1B(5.0g,27.6mmol)、吡啶50mL,添加乙酸酐15.7mL。在室温下搅拌整夜后,加入乙酸乙酯200mL、水100mL进行分液操作。将得到的有机层用1M盐酸50mL、盐水(Brine)50mL清洗并浓缩。由此,得到12.1g的无色油状的化合物2B。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0080] 化合物3B的合成

[0081] 

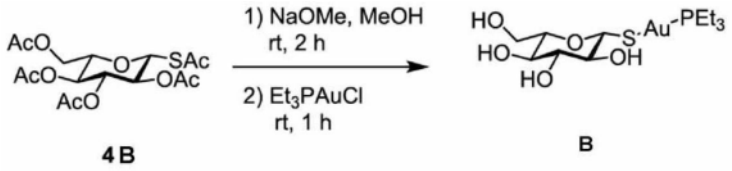
[0082] 在200mL茄形烧瓶中装入化合物2B(12.1g)、二氯甲烷60mL,添加25%溴化氢—乙酸10mL。在室温下搅拌整夜后,加入水100mL、氯仿100mL进行分液操作。将得到的有机层用饱和碳酸氢钠水100mL、盐水(Brine)100mL清洗后,用硫酸钠干燥、浓缩。由此,得到15.9g的无色油状的化合物3B。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0083] 化合物4B的合成

[0084] 

[0085] 在300mL茄形烧瓶中装入化合物3B(15.9g)、丙酮55mL、KSAc(6.4g,55.6mmol),在室温下搅拌4小时。将反应液浓缩后,加入乙酸乙酯100mL、水100mL进行分液操作。收集了有机层后,用盐水(Brine)30mL清洗,用硫酸钠使其干燥。通过使溶液浓缩,得到褐色油状的11.3g的粗产物。利用硅胶200g、展开溶剂:甲苯/乙酸乙酯=9:1~5:1进行精制,由此得到5.1g的橙色固体化合物4B(产率45%(三步))。

[0086] 化合物B的合成

[0087] 

[0088] 在300mL烧瓶中装入化合物4B(4.1g,10.1mmol)、甲醇100mL,在冰冷却下,在内温4℃下添加5MNaOMe甲醇溶液2.42mL。在室温下搅拌2小时后,添加Et_3PAuCl(3.18g,9.0mmol)。在室温下搅拌1小时后,将反应溶液浓缩,由此得到5.8g的无色油状的粗产物。利用硅胶100g(吸附量6.0g)、展开溶剂:乙酸乙酯/甲醇=9:1~4:1进行精制,将目标馏分浓缩,由此得到2.5g的化合物B((1—硫代—β—L—吡喃葡萄糖苷)(S—三乙基膦)金(I))(产率49%)。

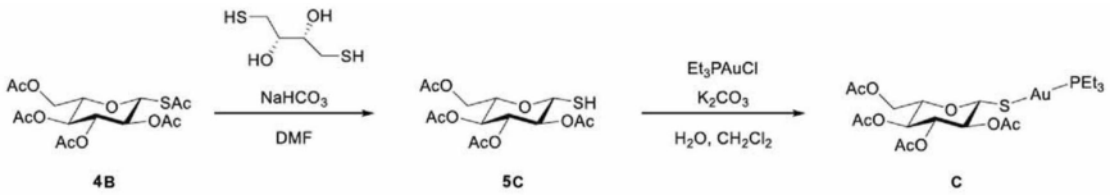
[0089] [比旋光度测定]

[0090] 将化合物B50.5mg溶于甲醇,形成5.00mL。使用池长度100mm的池,在20℃下测定10次比旋光度,取去除了最大值和最小值后的平均值,其结果为—8.73度。需要说明的是,与已知的D型的化合物A的比旋光度(+7.28度)相比,可确认到化合物B为L型。

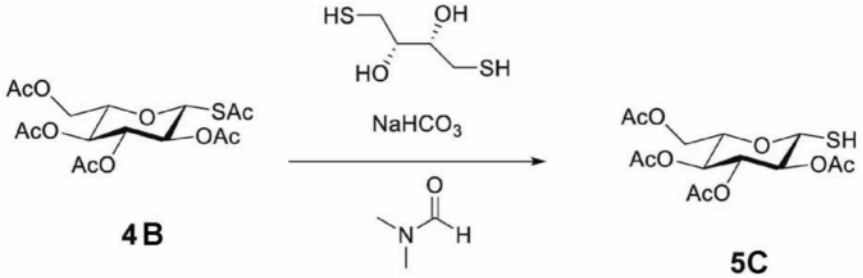
[0091] 实施例2

[0092] 化合物C的合成

[0093] 以实施例1的化合物4B为起始原料,按照以下的反应式来合成化合物C。

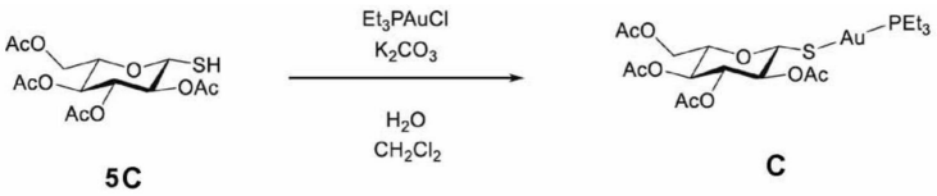
[0094] 

[0095] (1)化合物5C的合成

[0096] 

[0097] 在氩气流下,在100mL茄形烧瓶中装入化合物4B(19.0g)和DMF(19.0mL)。添加$NaHCO_3$(0.06g)和(2S,3S)—1,4—二巯基丁烷—2,3—二醇(1.80g),在室温下搅拌2小时。通过LC/MS确认原料消失后,在反应溶液中添加水/甲苯(20mL/20mL),进行分液。在有机层中加入无水Na_2SO_4,过滤后,用蒸发器将滤液减压浓缩,得到黄色溶液(3.09g)。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0098] (2)化合物C的合成

[0099] 

[0100] 在氩气流下,在100mL茄形烧瓶中装入化合物5C(3.1g)、CH_2Cl_2(14.0mL)以及水(14.0mL)。在冰冷却下,添加Et_3PAuCl(1.6g)和K_2CO_3(0.77g)。恢复到室温后,搅拌1小时。添加水(30.0mL),利用CH_2Cl_2(30.0mL)萃取两次。加入无水$MgSO_4$,过滤后,将滤液用蒸发器减压浓缩,得到黄色溶液(3.6g)。使用中性硅胶(60—210μm,64g),利用展开溶剂:庚烷/乙酸乙酯=1:1~1:3对粗品(3.6g)进行精制,将目标馏分浓缩,由此得到2.03g的白桃色固体化合物C((2,3,4,6—四—O—乙酰基—1—硫代—β—L—吡喃葡萄糖苷)(S—三乙基膦)金(I))(产率64%)。

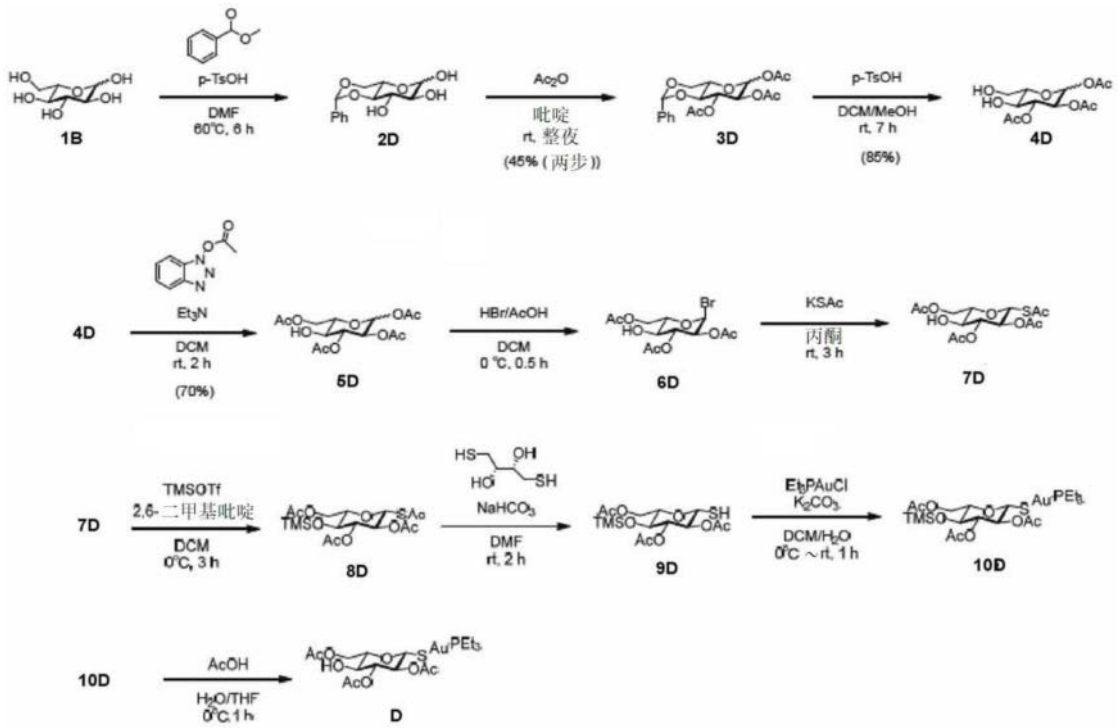
[0101] [比旋光度测定]

[0102] 将化合物C101.2mg溶于甲醇10.0mL,制备浓度1.01mg/mL的样品溶液。使用池长度100mm的池,在20℃下测定10次比旋光度,取去除了最大值和最小值后的平均值,其结果为+56.1度。需要说明的是,作为化合物C的D型的金诺芬(Auranofin)的比旋光度为—52度(参考Green Chemistry,2015,17,4,2545-2551),可确认到化合物C为L型。

[0103] 实施例3

[0104] 化合物D的合成

[0105] 以L—(—)—葡萄糖(化合物1B)为起始原料,按照以下的反应式来合成化合物D。

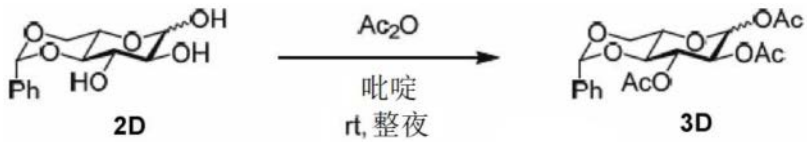
[0106] 

[0107] 化合物2D的合成

[0108] 

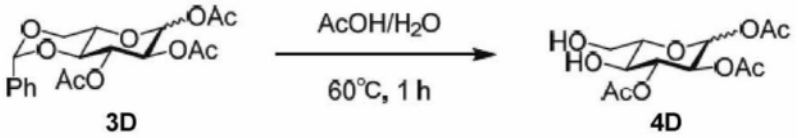
[0109] 在500mL茄形烧瓶中装入化合物1B(23.0g,128mmol)、DMF220mL,添加苯甲醛二甲缩醛(22.3g,147mmol)、CSA(2.97g,12.8mmol)。在室温下搅拌整夜后,加入三乙胺10mL使反应停止。将反应溶液在浴温60℃下减压浓缩,由此得到50.2g的黄色油状的化合物2D。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0110] 化合物3D的合成

[0111] 

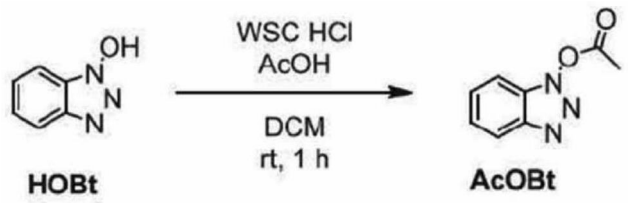
[0112] 在500mL茄形烧瓶中装入化合物2D(50.2g)、吡啶300mL。在冰冷却下,添加乙酸酐60.5mL(640mmol)。在室温下搅拌整夜后,将反应溶液注入乙酸乙酯200mL、水300mL混合溶液中。进行分液操作后,将得到的有机层用1M盐酸200mL清洗。进而,将有机层用饱和碳酸氢钠水200mL清洗。将有机层用硫酸钠干燥后,进行减压浓缩。用甲苯200mL共沸3次,由此得到56.1g的黄色固体粗产物(化合物3D)。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0113] 化合物4D的合成

[0114] 

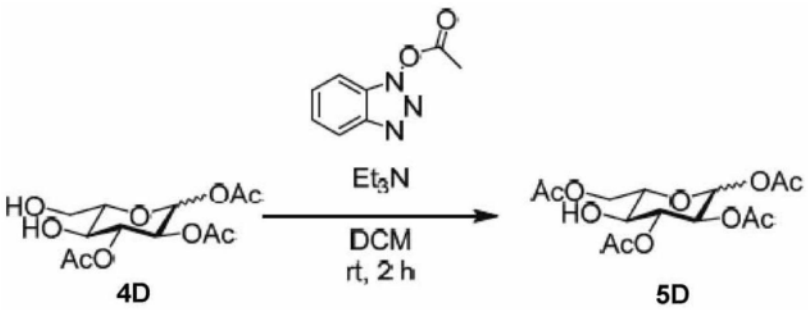
[0115] 在1L烧瓶中装入化合物3D(56.1g)、乙酸400mL、水100mL,在内温60℃下搅拌1小时。将反应溶液在浴温50℃下减压浓缩后,加入氯仿300mL、饱和碳酸氢钠水400mL进行分液操作。进而,用氯仿100mL萃取10次。将得到的有机层用硫酸镁干燥后,进行减压浓缩,由此得到43.3g的褐色油状的粗产物。利用硅胶900g、展开溶剂:氯仿/甲醇=100∶0~95∶5进行精制。将目标馏分浓缩,在40℃下减压干燥,由此得到19.5g的白色无定形的化合物4D。

[0116] AcOBt的合成

[0117] 

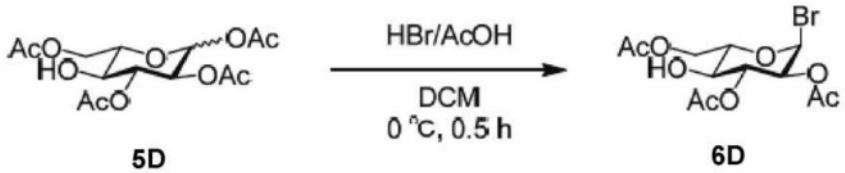
[0118] 在氩气氛下,在300mL茄形烧瓶中装入HOBt(10.3g,76.0mmol)、二氯甲烷100mL,添加WSC HCl(15.3g,79.8mmol)、乙酸(4.78mL,83.6mmol)。在室温下搅拌1小时后,用于化合物5D的合成。

[0119] 化合物5D的合成

[0120] 

[0121] 在氩气氛下,在500mL烧瓶中装入化合物4D(19.4g,63.3mmol)、二氯甲烷200mL,添加三乙胺(11.0mL,76.0mmol)。在冰冷却下,在内温40℃下滴加AcOBt。此时,内温上升至60℃。在室温下搅拌2小时后,加入水200mL进行分液操作。进而,用二氯甲烷100mL萃取3次。将得到的有机层用硫酸镁干燥,进行减压浓缩,由此得到29.1g的黄色油状的粗产物。利用硅胶600g、展开溶剂:庚烷/乙酸乙酯=1∶1~1∶2进行精制。将目标馏分在40℃下减压浓缩,使其干燥,由此得到13.2g的无色油状的化合物5D(产率60%)。

[0122] 化合物6D的合成

[0123] 

[0124] 在氩气氛下,在300mL茄形烧瓶中装入化合物5D(8.5g,24.4mmol)、二氯甲烷(超脱水)60mL。在冰冷却下,在内温4℃下滴加30%溴化氢—乙酸30mL。在相同温度下搅拌30分钟后,将反应溶液注入冰水30mL中。进行分液操作后,用二氯甲烷30mL萃取2次。将得到的有机

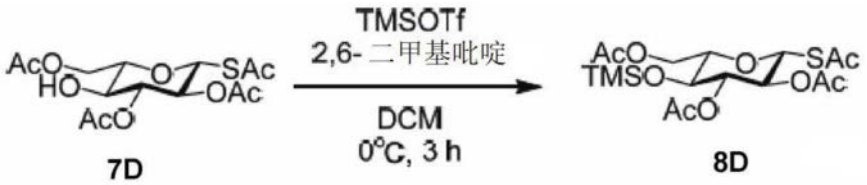
层用硫酸镁干燥后,在浴温30℃下减压浓缩。由此,得到10.5g的无色油状的化合物6D。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0125] 化合物7D的合成

[0126] 

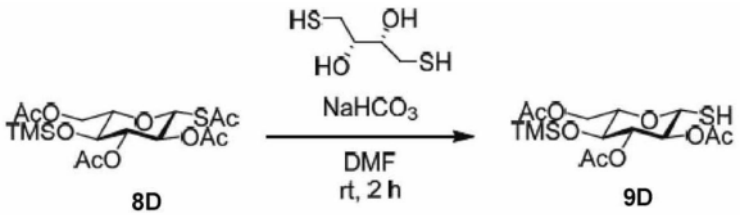
[0127] 在300mL茄形烧瓶中装入化合物6D(10.5g)、丙酮90mL、KSAc(3.1g,26.8mmol),在室温下搅拌3小时。将反应液浓缩后,加入乙酸乙酯200mL、水100mL进行分液操作。进而,用乙酸乙酯100mL萃取后,将有机层用硫酸钠干燥。将溶液减压浓缩,由此得到7.6g的褐色油状的粗产物。利用硅胶160g、展开溶剂:甲苯/乙酸乙酯=4:1~2:1进行精制,由此得到4.4g的黄色固体化合物7D(产率50%(两步))。

[0128] 化合物8D的合成

[0129] 

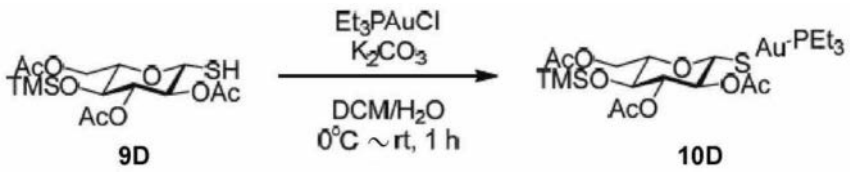
[0130] 在氩气氛下,在30mL茄形烧瓶中装入化合物7D(150mg,0.412mmol)、二氯甲烷2.0mL。在冰冷却下,添加2,6—二甲基吡啶(88.2mg,0.823mmmol)、TMSOTf(0.10mL,0.535mmol),在相同温度下搅拌3小时。将反应溶液注入氯仿10mL、水10mL的混合溶液中,进行分液操作。将得到的有机层用硫酸镁干燥。将该有机层减压浓缩,由此得到300mg的油状的粗产物。利用硅胶10g、展开溶剂:庚烷/乙酸乙酯=4:1~2:1进行精制,由此得到115mg的无色固体化合物8D(产率64%)。

[0131] 化合物9D的合成

[0132] 

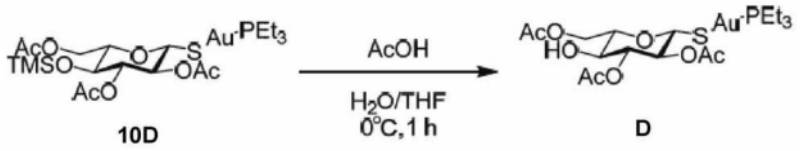
[0133] 在30mL茄形烧瓶中装入化合物8D(111mg,0.254mmol)、DMF1.0mL,添加碳酸氢钠(3.2mg,0.038mmol)、二硫苏糖醇(66.7mg,0.432mmol)。在室温下搅拌2小时后,加入甲苯10mL、水10mL进行分液操作。进而,利用甲苯10mL萃取2次。将得到的有机层用硫酸镁干燥后,将溶液减压浓缩。由此,得到140mg的黄色油状的化合物9D。不进行进一步的精制,进入下一步骤。

[0134] 化合物10D的合成

[0135] 

[0136] 在30mL茄形烧瓶中装入化合物9D(140mg)、二氯甲烷1.0mL、水1.0mL。在冰冷却下，添加碳酸钙(40mg,0.305mmol)、Et_3PAuCl(90mg,0.267mmol)。在室温下搅拌1小时后，加入氯仿10mL、水10mL进行分液操作。将得到的有机层用硫酸镁干燥后，进行减压浓缩，由此得到300mg的油状的粗产物。利用硅胶10g、展开溶剂庚烷/乙酸乙酯＝4∶1～1∶1进行精制。将目标馏分浓缩、干燥，由此得到55.7mg的无色油状的化合物10D(产率32％(两步))。进而，回收了41.9mg的化合物14(产率65％)。

[0137] 化合物D的合成

[0138] 

[0139] 在30mL茄形烧瓶中装入水1.0mL、乙酸0.10mL。在冰冷却下，滴加化合物10D(29.0mg,0.041mmol)的THF溶液(1.0mL)。在相同温度下搅拌1小时后，在反应溶液中添加乙酸乙酯10mL、饱和碳酸氢钠水10mL进行分液操作。将得到的有机层用硫酸镁干燥后，进行减压浓缩，由此得到24.4mg的化合物D((2,3,6－三－O－乙酰基－1－硫代－β－L－吡喃葡萄糖苷)(S－三乙基膦)金(I))(产率94％)。

[0140] ＜化合物的评价＞

[0141] 对实施例中得到的化合物进行以下所示的试验。

[0142] [RF波照射试验]

[0143] 为了确认由本发明的L－葡萄糖衍生物产生的温度上升效果，使用图1所示的RF波照射单元10，进行射频波(RF波)照射试验。RF波照射单元10具备：高频发生器1；与高频发生器1连接的上部电极3和下部电极5；以及用于遮蔽在上部电极3与下部电极5之间产生的电磁波的电磁屏蔽件7。在上部电极3与下部电极5之间设置试样S，当在上部电极3与下部电极5之间照射电磁波(RF波)时，产生电力线LEF，从而能进行RF波照射试验。RF波照射的条件设为频率(13.56MHz)。

[0144] 为了一边进行RF照射一边准确地测定试样S的温度，使用光纤温度计FL－2000(安立计器制)。将温度传感器FS100(安立计器制)的前端插入试样S的中心部来进行温度测定。

[0145] 作为试样S，使用以规定的金原子浓度(以金原子计为0ppm、308.9ppm)含有化合物D((2,3,6－三－O－乙酰基－1－硫代－β－L－吡喃葡萄糖苷)(S－三乙基膦)金(I))的含水凝胶。含水凝胶是生物体组织的模型，化合物D是包含金原子的L－葡萄糖衍生物。

[0146] 具体而言，将含有化合物D的凝胶封入聚苯乙烯制容器中而成的样品用作试样S。该样品按照以下的步骤制备。在由上部电极3和下部电极5夹住时，在电极间距离为28mm的聚苯乙烯制容器中封入包含规定浓度的化合物D的含水凝胶。

[0147] 对于不含化合物D的情况(以金原子计为0ppm)和包含化合物的情况(以金原子计为308.9ppm)，根据从30℃上升至35℃所需的时间求出升温速度(℃/min)。在不含化合物D的情况下，升温速度平均为2.5(℃/min)，标准误差SE为0.06℃。在包含化合物D的情况下，升温速度平均为2.9(℃/min)，标准误差SE为0.12℃。由这些结果可确认到，与不含化合物D的情况相比，在包含化合物D的情况下，升温速度增大。

[0148] ＜L－葡萄糖衍生物给药试验＞

[0149] 使用小鼠的胰岛β细胞的肿瘤化(胰岛瘤，Insulinoma)细胞株MIN6(Miyazaki

J.et al.,Endocrinology 127:126-132,1990)进行以下的实验。在此,就所有的实验而言,在96孔的孔板(well)中预先放入约1000个MIN6细胞,对于给药上述化合物B(以下称为LGG)的实验和给药上述化合物A(以下称为DGG)的对照实验,注意尽量避免外部干扰来进行。

[0150] 需要说明的是,源自小鼠胰脏的MIN6细胞是杂合细胞集团(heterogeneous cell populations)(Yamato,E.et al.,PLoS One 8:e61211,2013),培养开始后至4—5DIV左右,正常细胞即产生胰岛素的胰岛β细胞占主要的比例,虽然存在一部分显示病理学中所说的恶性细胞的性质的细胞,但其比例小。另一方面,推定为若培养天数超过例如10DIV而成为细胞状态整体恶化的时期,则恶性细胞的比例相对增加(Sasaki,A.et al.,Human Cell 2016,29,37-45)。

[0151] 对体外(Vitro)下的培养天数为4DIV(体外天数:Days In Vitro)的MIN6给药LGG。LGG是L—葡萄糖的1位OH基取代为—SAuP$(C_2H_5)_3$基而得到的L—葡萄糖衍生物。作为对照实验,也进行给药DGG的实验。DGG是D—葡萄糖的1位OH基取代为—SAuP$(C_2H_5)_3$基而得到的D—葡萄糖衍生物。

[0152] 具体而言,对于培养天数为4DIV的MIN6,给药0～1000μM的LGG和DGG,经过90分钟后,作为它们的浓度的函数,测定通过死亡细胞标记物PI(碘化丙啶:Propidium Iodide)评价的死亡细胞数量的比例。将其结果示于图2。在图2中,横轴表示DGG或LGG的浓度,纵轴表示PI荧光的每个细胞的平均强度的总和。其中,纵轴是将浓度1000μM的死亡细胞数量假定为各孔板(well)内的全部细胞数量,根据全部细胞数量的荧光强度进行标准化时的值(%)。折线为Eye guide(走向引导线)。

[0153] 根据图2的内插推定为,在给药DGG时,若其浓度超过1μM左右,则能够至少以本实验中使用的基准检测用PI评价的细胞死亡。DGG是公知化合物,可认为其细胞毒性是由进入细胞内的金原子(Au)引起的(Sutton B.M.et al.,J.Med.Chem.15:1095-98,1972;Wu,B.et al.,J.Med.Chem.62:7751-68,2019)。根据图2观察到,对于细胞被PI评价的核异常,呈现半数有效量(50%effective dose)的DGG的浓度在1μM至10μM之间。

[0154] 另一方面,推定为在给药LGG时,若其浓度超过10μM,则能够检测用PI评价的细胞死亡。在本实验条件中,观察到呈现半数有效量的LGG的浓度在10μM至100μM之间,因此推定为LGG对于胰岛β细胞株所代表的正常细胞的安全性比DGG高约10倍(约1位数)。

[0155] 在此,为了验证图2中明确示出的由LGG引起的细胞死亡是否确实由于LGG被摄入细胞内而引起,进行了进一步的实验。具体而言,在根皮素(phloretin,以下称为PHT)存在下给药LGG,对是否阻碍细胞死亡进行实验。

[0156] PHT作为针对水通道蛋白、葡萄糖转运蛋白等多种膜转运蛋白的抑制剂发挥功能(Ono K.et al.,Cancers 12:850,2020)。某物质(在此为LGG)的效果“被PHT阻碍”是指,该物质(即LGG)经由上述膜转运蛋白,至少一部分被转运至细胞内,该转运被PHT阻碍(Ono K.et al.,Cancers 12:850,2020)。即,推定若在PHT存在下对MIN6细胞应用L—葡萄糖衍生物,则由于PHT对非转运蛋白型转运机制的阻碍效果,LGG向一部分存在于杂合细胞集团中的“能够摄入L—葡萄糖衍生物的细胞”的摄入被阻碍。

[0157] 作为具体的实验,对于培养天数为5DIV的MIN6,(A)未给药LGG的情况(对照实验)、(B)用时10min给药100μM的LGG的情况、(C)预先给药150μM的PHT后用时10min给药100μM的LGG的情况,分别利用光学显微镜观察细胞状态。将其结果分别示于图3A～3C,将图3中的a

～i的放大图(放大图之间的比例尺全部相同)示于图4a～4i。

[0158] 在图3B以及作为其放大图的图4e中,在一部分细胞中确认到细胞质的一部分向细胞外突出的特征形态(参照箭头)。这样的形态在图3A以及作为其放大图的图4a～4d中未观测到,表示细胞状态的恶化。另一方面,在图3C以及作为其放大图的图4f～4i中,几乎观察不到显示细胞状态恶化的细胞。

[0159] 进而,在PHT存在下和不存在下,定量地分析LGG对细胞的影响。具体而言,与上述的图3的情况同样地,对于MIN6(5DIV),(A)未给药LGG的情况(对照)、(B)用时10min给药100μM的LGG的情况(LGG)、(C)预先给药150μM的PHT后用时10min给药100μM的LGG的情况(LGG+PHT),分别以表示活细胞的活性的荧光标记物Calcein(钙黄绿素)的荧光强度来进行评价。将其结果示于图5。在图5中,误差棒(Error bar)表示标准误差SE,括号内的数值表示分析出的ROI的数量。

[0160] 需要说明的是,钙黄绿素的荧光强度反映细胞内的水解酶酯酶的活性,钙黄绿素的荧光强度的降低表示细胞状态的恶化。图的纵轴表示对细胞设定的每个感兴趣区(region of interest,ROI)的钙黄绿素的平均荧光强度(arbitrary unit,A.U.)。统计分析使用Bonferroni-Dunn test。

[0161] 根据图5中的左(对照)柱(bar)与中央(LGG)柱的实验组的比较可知,LGG显著降低了MIN6细胞的活性。而且,根据中央(LGG)柱与右(LGG+PHT)柱的实验组的比较可知,通过PHT显著地阻碍了由LGG引起的细胞活性的降低。

[0162] 反复进行三次相同的实验,均得到相同的结果。这表示LGG的至少一部分经由被PHT阻碍的机制作用于MIN6细胞,使其细胞活性降低。最有可能的机理为:LGG经由“被PHT阻碍的通道那样的膜转运蛋白”(Sasaki A.et al.,Human Cell 2016,29,37-45)侵入细胞内,使细胞活性降低。如上所述,MIN6细胞中可能混合存在一部分表达这样的通道样蛋白的肿瘤细胞,LGG有可能被摄入这样的肿瘤细胞内,使细胞的活性减弱,而导致细胞死亡。

[0163] 进而,对于培养天数DIV长的MIN6,进行与图2相同的实验。关于DGG,将18DIV的结果示于图6,关于LGG,将19DIV的结果示于图6。其中,在任意情况下,均在DGG或LGG给药10分钟后进行观测。需要说明的是,标示(plot)表示死亡细胞数量的比例。

[0164] 根据该结果可知,在DIV大的情况下,加入LGG时的死亡细胞数量的比例的LGG浓度依赖性与加入DGG时的死亡细胞数量的比例的DGG浓度依赖性大致一致。原本在培养天数为18－19DIV的MIN6细胞中,死亡细胞的比例增加,培养环境恶化,因此推定为恶性肿瘤细胞在存活的细胞中所占的比例相对增加。对于这样的细胞群,LGG显著地导致了大量的细胞死亡。

[0165] 以上的结果示出:对正常细胞的毒性远低于DGG的LGG,至少其一部分选择性地被摄入癌细胞内部,可能在摄入后,金原子(Au)对癌细胞呈现显著的毒性。

[0166] 附图标记说明

[0167] 1:高频发生器;3:上部电极;5:下部电极;7:电磁屏蔽件;10:RF波照射单元;S:试样;LEF:电力线。

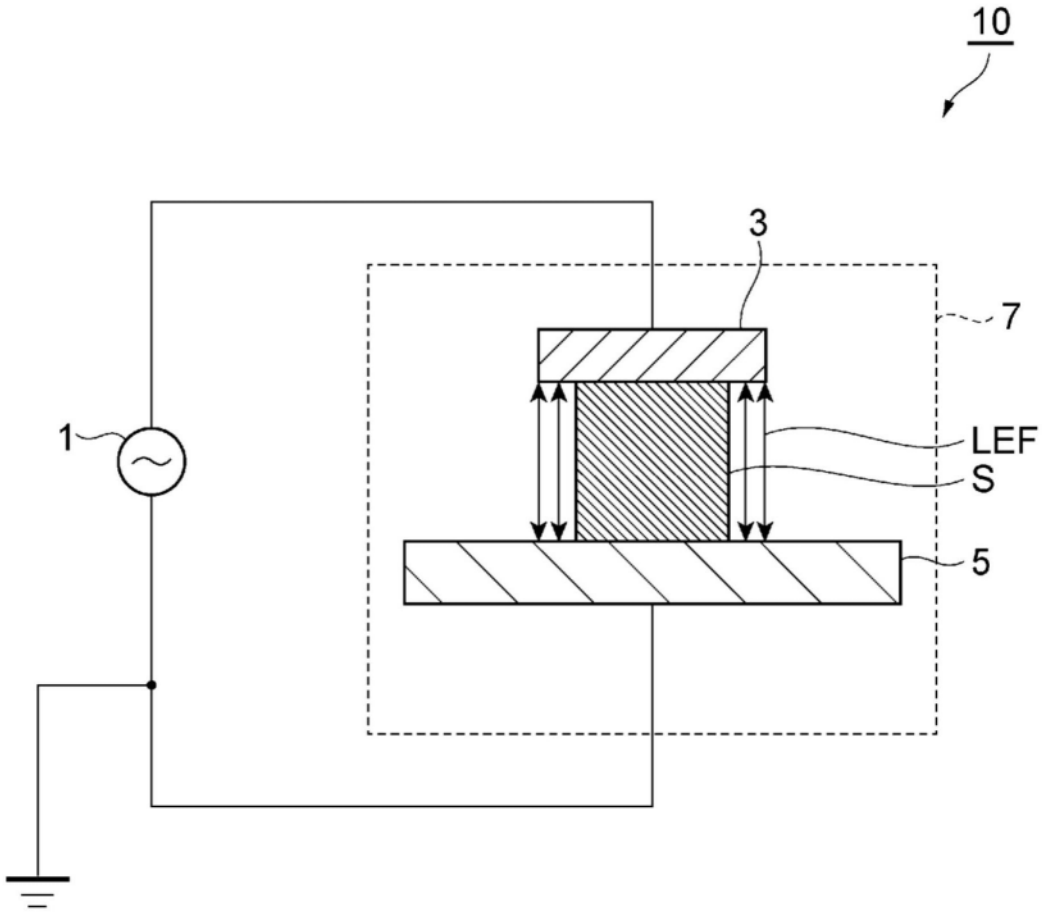


图1

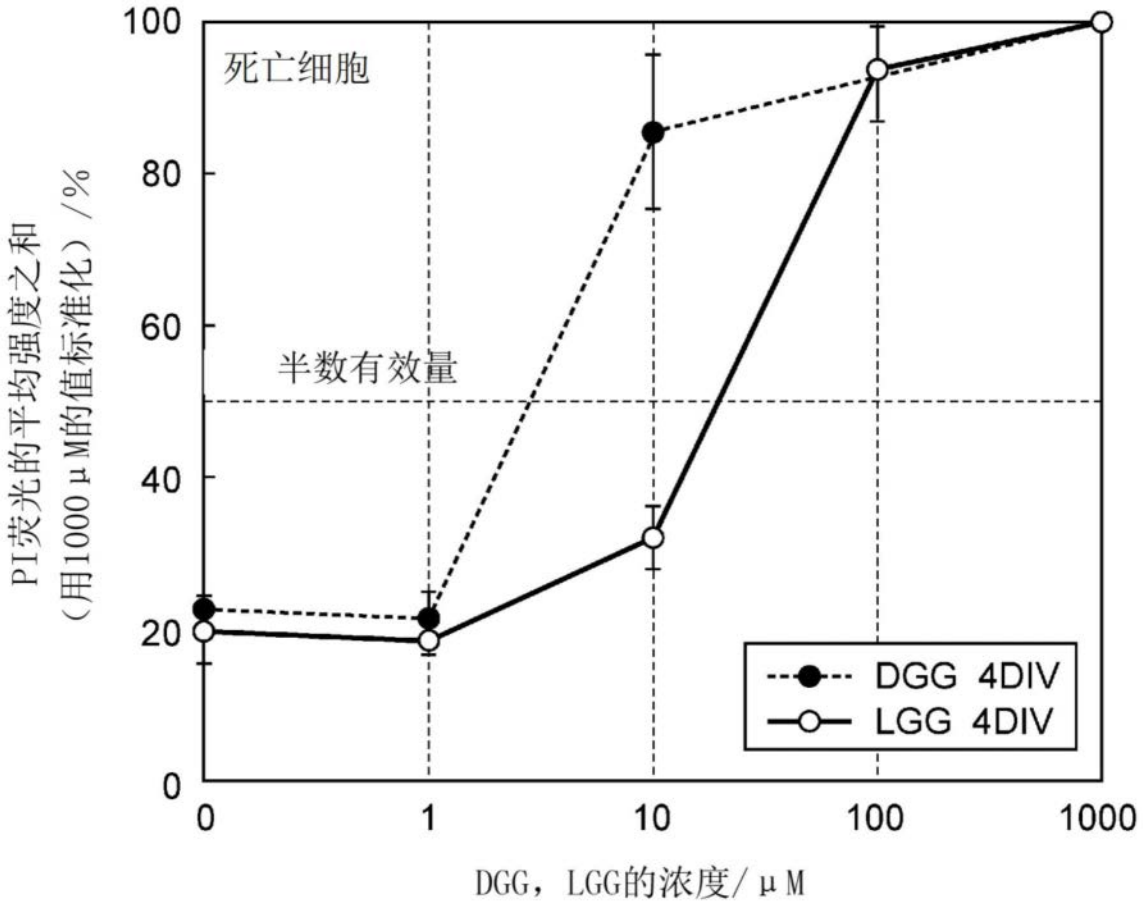

死亡细胞
半数有效量
PI荧光的平均强度之和
（用1000μM的值标准化）/%
DGG 4DIV
LGG 4DIV
DGG，LGG的浓度/μM
0
20
40
60
80
100
0
1
10
100
1000

图2

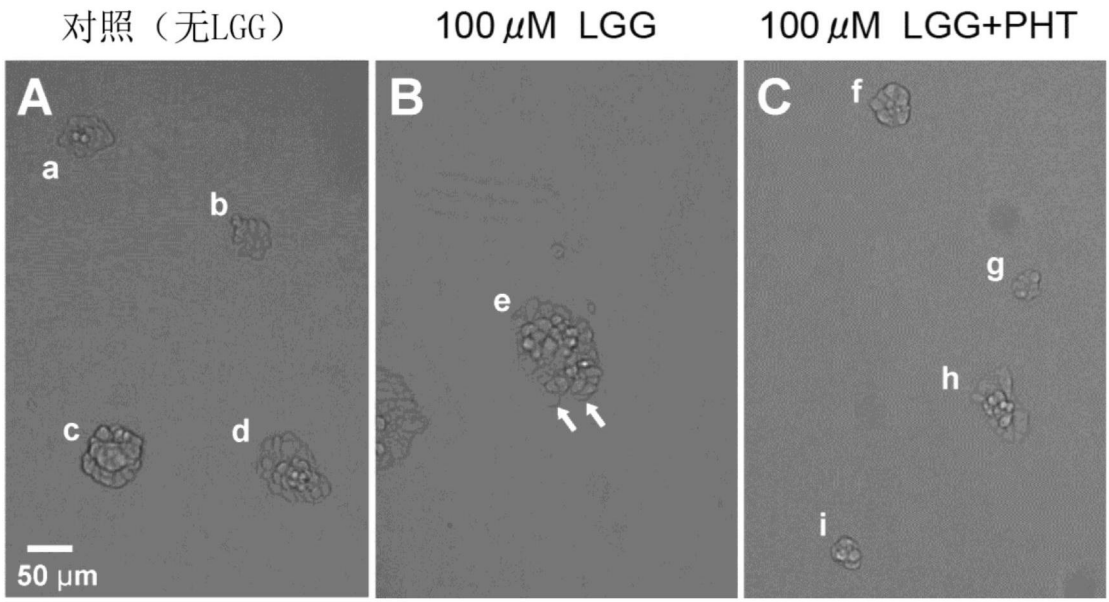

对照（无LGG）
100 μM LGG
100 μM LGG+PHT
A
B
C
a
b
c
d
e
f
g
h
i
50 μm

图3

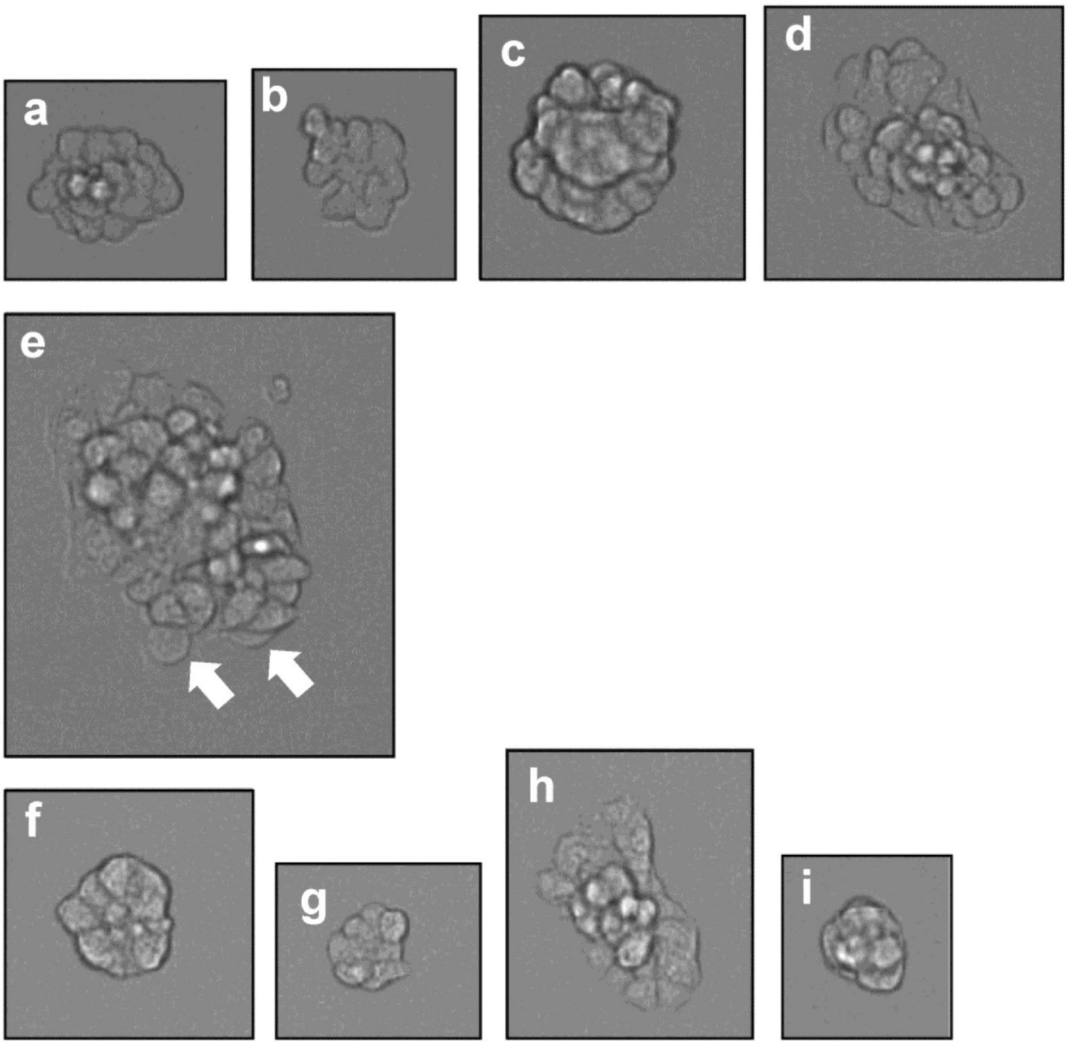


图4

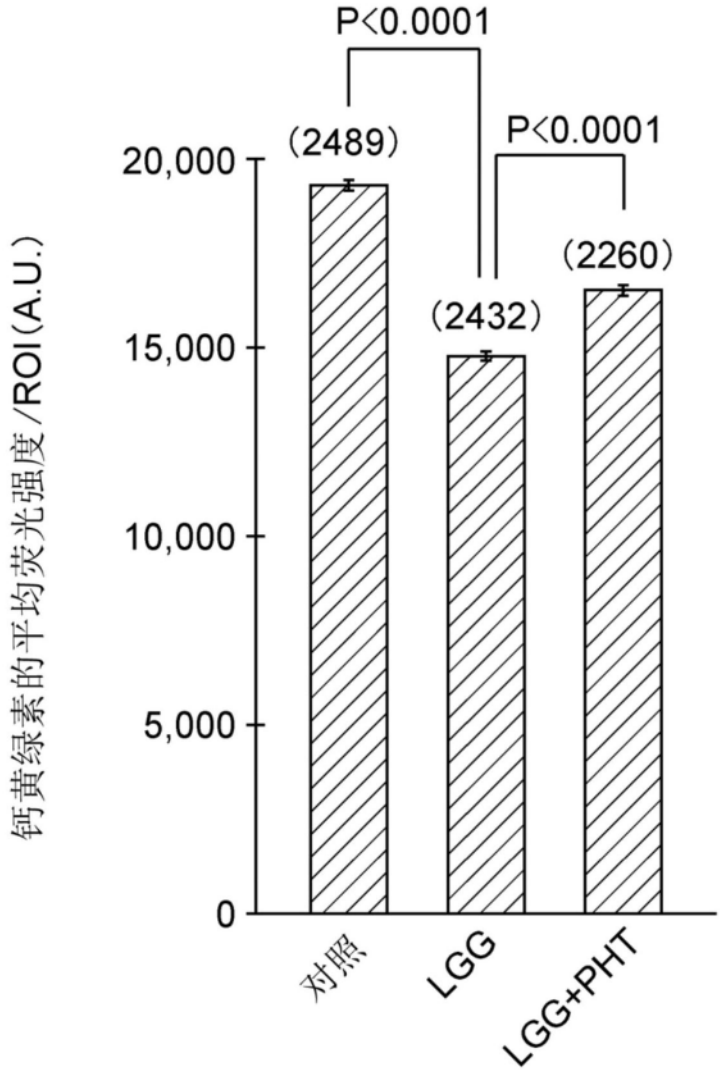

P<0.0001
P<0.0001
(2489)
(2432)
(2260)
20,000
15,000
10,000
5,000
0
钙黄绿素的平均荧光强度/ROI(A.U.)
对照
LGG
LGG+PHT

图5

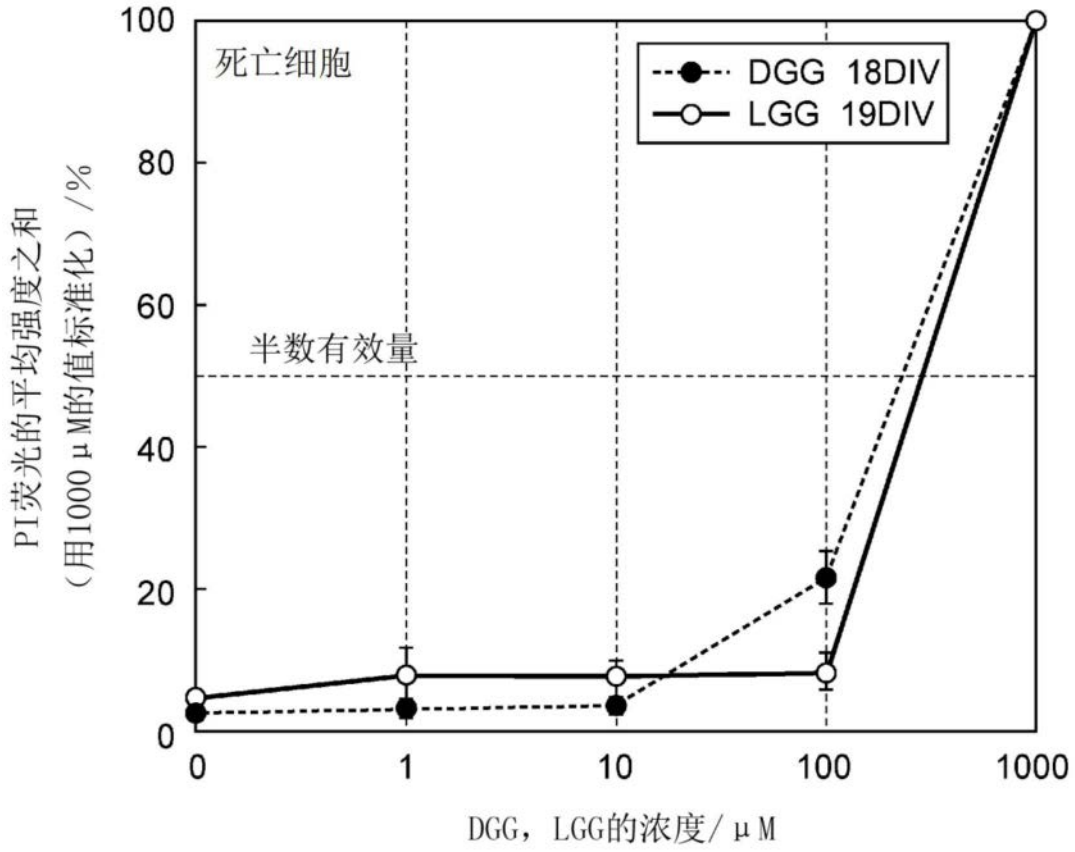

死亡细胞
DGG 18DIV
LGG 19DIV
半数有效量
PI荧光的平均强度之和
（用1000μM的值标准化）/%
100
80
60
40
20
0
0
1
10
100
1000
DGG，LGG的浓度/μM

图6