



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113683645 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 07

(21) 申请号 202111025525.7

(22) 申请日 2021.09.02

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113683645 A

(43) 申请公布日 2021.11.23

(73) 专利权人 湖北科技学院

地址 437000 湖北省咸宁市咸宁大道88号

(72) 发明人 王小波 王宇静 杨晓松 熊惠娟

(74) 专利代理机构 武汉明正专利代理事务所

(普通合伙) 42241

专利代理师 刘璐

(51) Int. Cl.

C07F 15/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109810148 A, 2019.05.28

CN 110054652 A, 2019.07.26

CN 110330534 A, 2019.10.15

CN 110790699 A, 2020.02.14

US 2014088307 A1, 2014.03.27

WO 2020186328 A1, 2020.09.24

Jianhui Zhu, et al..DNA Cross-Linking Patterns Induced by an Antitumor-Active Trinuclear Platinum Complex and Comparison with Its Dinuclear Analogue.Chem. Eur. J..2009,第15卷(第21期),5245-5253.

审查员 魏真

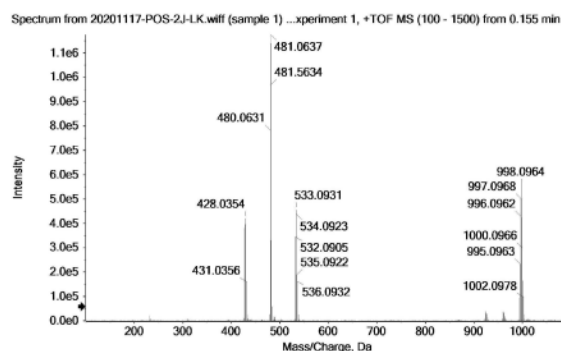
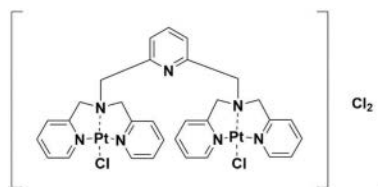
权利要求书1页 说明书5页 附图6页

(54) 发明名称

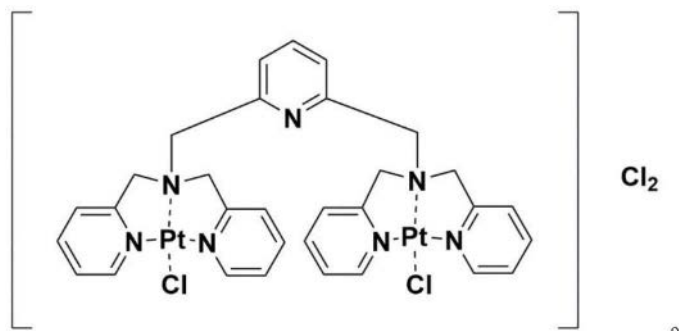
一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于新型铂类配合物开发技术领域,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物及其制备方法和应用。本发明以2,6-二溴甲基吡啶为起始原料,与二甲基吡啶胺发生1:2的取代反应,生成中间体BPA-TPA,BPA-TPA与 K_2PtCl_4 经配位反应生成本发明的目标配合物 Pt_2 -BPA-TPA。本发明首次以含有5个吡啶环的多吡啶化合物BPA-TPA为配体,设计合成出对称性的双核单功能铂(II)配合物,其表现出的抗肿瘤活性,具有良好的潜在药用价值,有望成为新型非经典铂类抗癌药物的备选之一,从而克服现有铂类药物的耐药性较突出及毒副作用较明显的问题。本发明所述具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物,其结构式如下:



1. 一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物,其特征在于,其结构式如下:



2. 权利要求1所述的具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将2,6-二溴甲基吡啶、二甲基吡啶胺和碳酸钾溶解于乙腈中,于30℃下搅拌反应至溶液由起始的黄色变为橙红色后,过滤除去碳酸钾,滤液减压浓缩至干,得黄褐色油状液体,为BPA-TPA粗产品;

2) 向步骤1)得到的黄褐色油状液体中加入沸程60-90℃的石油醚,于80℃下剧烈搅拌,取出澄清的石油醚溶液,静置冷却,析出白色絮状结晶,为BPA-TPA配体纯品,真空干燥后收集;

3) 将步骤2)得到的BPA-TPA配体纯品溶于甲醇, K_2PtCl_4 溶于水,两者混合后于室温和黑暗条件下搅拌反应48h,得混合物;

4) 将步骤3)得到的混合物离心,弃去上清液,固体产物依次用二氯甲烷、乙醇、丙酮和无水乙醚洗涤,直至洗涤塔澄清,真空干燥后得白色粉末,即为双核Pt(II)配合物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤1)中,2,6-二溴甲基吡啶、二甲基吡啶胺和碳酸钾的物质的量之比为1:2:2。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤1)中,搅拌反应时间为2h。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤2)中,于80℃下剧烈搅拌,向步骤1)得到的黄褐色油状液体中重复多次加入沸程60-90℃的石油醚提取,并将所得的BPA-TPA配体纯品合并,真空干燥后收集。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤2)中,BPA-TPA与 K_2PtCl_4 的物质的量之比为1:2。

7. 权利要求1所述的双核Pt(II)配合物在制备防治肝癌和肺癌的药物中的应用。

一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于新型铂类配合物开发技术领域,具体涉及一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织(WHO)2020年12月发布的数据,2020年全球有1930万人被诊断出患有癌症,有1000万人死于癌症,癌症已成为全球第二大死因。当前临床治疗各种肿瘤的手段主要有手术、化疗与放疗。在种类繁多的化疗药物中,铂类配合物无疑是经典的抗肿瘤药物之一,如顺铂、卡铂、奥沙利铂等。有统计显示,约40%-80%的各种肿瘤患者都接受过或正在接受含铂类药物(单独或联合使用)的化疗,并成为多种癌症治疗的标准方案或一线方案。

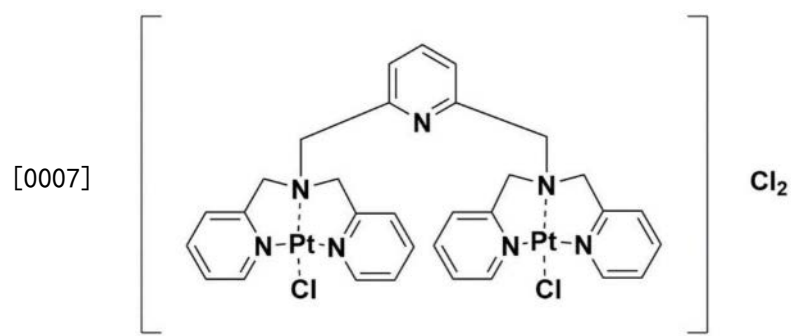
[0003] 经典的铂类药物在癌症治疗领域大获成功,但迄今仅有顺铂、卡铂和奥沙利铂被批准在全球使用,奈达铂、依铂与洛铂则分别在日本(1995年)、韩国(1999年)和中国(2010年)单独上市。究其原因主要有二:(1)毒副作用较明显,包括肾毒性、神经毒性、骨髓抑制、恶心、呕吐、脱发和乏力等;(2)耐药性较突出,包括内源性耐药性和获得性耐药性。毒副作用与耐药性的存在限制了当前铂类药物的更广泛应用,也促使人们不断研究、开发具有高抗癌活性、毒副作用弱、无交叉耐药性的新型铂类药物。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术中存在的技术问题,提供一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物及其制备方法和应用,其对肿瘤细胞具有优异的细胞毒活性,而对正常细胞的毒性则很小。

[0005] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0006] 一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物,其结构式如下:



[0008] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。

[0009] 本发明的另一目的是提供上述双核Pt(II)配合物的制备方法。

[0010] 具体的技术方案如下:

[0011] 一种具有抗肿瘤活性的双核Pt(II)配合物的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 将2,6-二溴甲基吡啶、二甲基吡啶胺和碳酸钾溶解于乙腈中,于30℃下搅拌反应至溶液由起始的黄色变为橙红色后,过滤除去碳酸钾,滤液减压浓缩至干,得黄褐色油状液体,为BPA-TPA粗产品;

[0013] 2) 向步骤1)得到的黄褐色油状液体中加入沸程60-90℃的石油醚,于80℃下剧烈搅拌,取出澄清的石油醚溶液,静置冷却,析出白色絮状结晶,为BPA-TPA配体纯品,真空干燥后收集;

[0014] 3) 将步骤2)得到的BPA-TPA配体纯品溶于甲醇, K_2PtCl_4 溶于水,两者混合后于室温和黑暗条件下搅拌反应48h,得混合物;

[0015] 4) 将步骤3)得到的混合物离心,弃去上清液,固体产物依次用二氯甲烷、乙醇、丙酮和无水乙醚洗涤,直至洗涤塔澄清,真空干燥后得白色粉末,即为 Pt_2 -BPA-TPA。

[0016] 进一步,步骤1)中,2,6-二溴甲基吡啶、二甲基吡啶胺和碳酸钾的物质的量之比为1:2:2。

[0017] 进一步,步骤1)中,搅拌反应时间为2h。

[0018] 进一步,步骤2)中,于80℃下剧烈搅拌,向步骤1)得到的黄褐色油状液体中重复多次加入沸程60-90℃的石油醚提取,并将所得的BPA-TPA配体纯品合并,真空干燥后收集。

[0019] 进一步,步骤2)中,BPA-TP与 K_2PtCl_4 的物质的量之比为1:2。

[0020] 本发明的最后目的是提供上述双核Pt(II)配合物的应用。

[0021] 具体的技术方案如下:

[0022] 一种双核Pt(II)配合物在制备防治肝癌、肺癌、宫颈癌和乳腺癌的药物中的应用。

[0023] 本发明的有益效果是:

[0024] 1) 本发明首次以含有5个吡啶环的多吡啶化合物BPA-TPA为配体,创造性的设计合成出一个双核铂(II)配合物,此配合物属于新化合物,在本领域和现有文献中尚无报道。

[0025] 2) 本发明通过 1H -NMR和HRMS等表征手段确定了上述新型双核铂(II)配合物的结构,并证明了所陈述的方法能成功制备目标双核铂(II)配合物。

[0026] 3) 本发明通过体外抗肿瘤实验和对相关蛋白如p21、casepase-3的表达量的测定,证实了目标双核铂(II)配合物具有优异的抗肿瘤活性,且对正常细胞的毒性较弱;其表现出的抗肿瘤活性令其具有良好的潜在药用价值,有望成为新型非经典铂类抗癌药物的备选之一,尤其是有望用于抗非小细胞肺癌药物的制备,从而克服现有铂类药物的耐药性较突出及毒副作用较明显的问题,为未来设计、合成新型铂类配合物药物做出一些有益的探索和提供有价值的借鉴。

附图说明

[0027] 图1为本发明实施例1中BPA-TPA的 1H -NMR图谱;

[0028] 图2为本发明实施例1中BPA-TPA的 ^{13}C -NMR图谱;

[0029] 图3为本发明实施例1中 Pt_2 -BPA-TPA的 1H -NMR图谱;

[0030] 图4为本发明实施例1中 Pt_2 -BPA-TPA的HRMS图谱;

[0031] 图5为本发明实施例1中 Pt_2 -BPA-TPA对HepG2细胞的抑制情况图;

[0032] 图6为本发明实施例1中 Pt_2 -BPA-TPA对A549细胞的抑制情况图;

[0033] 图7为本发明实施例1中 Pt_2 -BPA-TPA对HepG2细胞中p21和casepase-3的表达量影

响情况图；

[0034] 图8为本发明实施例1中Pt₂-BPA-TPA对A549细胞中p21和casepase-3的表达量影响情况图；

[0035] 图9为本发明实施例1中Pt₂-BPA-TPA对H9c2细胞中p21和casepase-3的表达量影响情况图。

具体实施方式

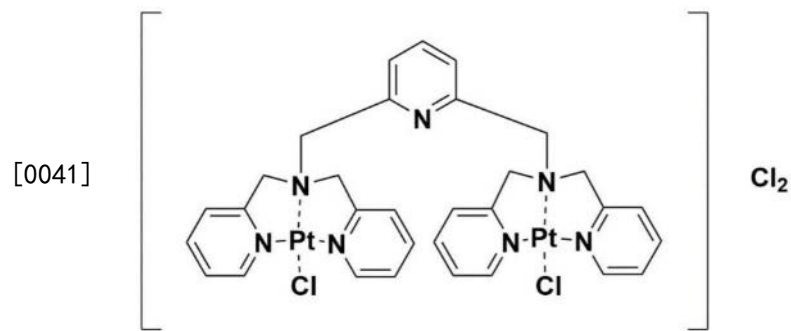
[0036] 以下对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0037] 除非另有说明,本发明实施例采用的原料及设备为本技术领域常规原料及设备(常规市售品),皆可于市场购得。

[0038] 本发明实施例中提及的原料2,6-二溴甲基吡啶参照现有文献(Zhang X.WO Pat, 97/13763,1997.)实现制备。

[0039] 实施例1

[0040] 具有如下结构式的双核Pt(II)配合物的制备:



[0042] 在100ml的圆底烧瓶中,加入溶有2,6-二溴甲基吡啶(1.2g,4.5mmol)的8ml乙腈溶液,然后加入溶有二甲基吡啶胺(1.8g,9.0mmol)的16ml乙腈溶液,再加入碳酸钾粉末(1.3g,9.4mmol)。于30℃下搅拌反应2h,溶液由起始的黄色变为橙红色。过滤,滤液旋干,得黄褐色油状液体。随后在80℃下剧烈搅拌,以沸程60-90℃的石油醚多次提取。合并石油醚提取液,静置冷却,析出白色絮状结晶。抽滤,得产物BPA-TPA1.3g,收率:56%。

[0043] 如图1和图2所示,BPA-TPA:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)ppmδ8.51(d,4H),7.60(m,9H),7.43(d,2H),7.12(m,4H),3.91(s,8H),3.89(s,4H)。¹³C-NMR(100MHz,CDCl₃)δ159.32,158.61,149.05,136.87,136.45,123.00,122.00,121.17,60.20。

[0044] 在另一100ml的圆底烧瓶中,加入BPA-TPA(248mg,0.5mmol),以10ml甲醇溶解。称取K₂PtCl₄(410mg,1.0mmol)以10ml纯水溶解后也加入圆底烧瓶中。置于室温和黑暗条件下搅拌反应48h。离心,弃去上清液,固体产物依次用二氯甲烷、乙醇、丙酮和无水乙醚洗涤,直至洗涤塔澄清。真空干燥后得白色粉末固体108mg,即为目标双核Pt(II)配合物Pt₂-BPA-TPA,收率:21%。

[0045] 如图3和图4所示,Pt₂-BPA-TPA:¹H-NMR(400MHz,DMSO-d₆)ppmδ8.60(d,4H),8.18(t,4H),7.74(d,4H),7.59(s,3H),7.55(t,4H),7.12(m,4H),3.91(s,8H),3.89(s,4H)。HRMS(m/z):[Pt₂Cl₂-BPA-TPA+6H₂O]²⁺理论值534.0958,实测值534.0923;[Pt₂Cl₂-BPA-TPA]²⁺理论值480.0629,实测值480.0631;[Pt₂Cl₂-BPA-TPA+Cl]⁺理论值995.0981,实测值995.0963。

[0046] 本实施例以2,6-二溴甲基吡啶为起始原料,与二甲基吡啶胺发生1:2的取代反应,生成中间体BPA-TPA,BPA-TPA与 K_2PtCl_4 经配位反应生成本实施例的目标配合物 Pt_2 -BPA-TPA。

[0047] 实施例2

[0048] 对实施例1制得的 Pt_2 -BPA-TPA进行体外抗肿瘤活性实验。

[0049] 2.1细胞株与细胞培养

[0050] 选取人肝癌细胞HepG2、人非小细胞肺癌细胞A549及大鼠正常心肌细胞H9c2等3种细胞株。

[0051] 所有细胞株均培养在含100U/ml青霉素、10wt%胎牛血清、100U/ml链霉素的RPMI-1640培养液内,置于含5%CO₂体积浓度的37℃孵箱中培养。

[0052] 2.2待测配合物的溶液配制

[0053] 将配合物首先以DMSO溶解,配制成10mM的储备液。然后用生理缓冲液分别稀释成12.5、25、50、100μM的终溶液(DMSO的终浓度≤1%),测试各种浓度下配合物对所选肿瘤细胞和正常细胞的抑制程度。

[0054] 2.3细胞生长抑制实验(CCK-8法)

[0055] 将对数生长期的HepG2、A549和H9c2细胞以 4×10^3 cells/孔接种于96孔板,置于37℃、5%CO₂条件下培养,至细胞90%融合后,用无血清培养基孵育2h使细胞同步化。随后,弃去上清,分别加入含有各配合物(0μM,12.5μM,25μM,50μM,100μM)的DMEM培养基孵育48h,孵育结束前3h,每孔加入10μL CCK-8溶液。孵育结束后,弃去各孔上清液,每孔加入150μL DMSO,细胞振荡仪上振荡10min,待结晶物充分溶解后置酶标仪450nm波长测定OD₄₅₀。

[0056] 2.4测定结果分析

[0057] 由图5和图6可知:

[0058] 1) 本发明实施例1所合成的双核Pt(II)配合物对HepG2及A549细胞均表现出一定的抑制作用。

[0059] 2) 不论HepG2或A549,双核Pt(II)配合物对它们的抑制活性均优于对照组顺铂;而对于两种不同类型的癌细胞,双核Pt(II)配合物对人非小细胞肺癌细胞A549的抑制活性明显强于人肝癌细胞HepG2;其对A549细胞的IC₅₀值在24μM以下。

[0060] 实施例3

[0061] 对实施例1制得的 Pt_2 -BPA-TPA进行p21和caspase-3表达量影响的测定实验。

[0062] 3.1Western blot实验

[0063] 以细胞裂解液(#9803,CST,USA)将HepG2或A549或H9c2裂解匀浆后,在4℃、12000rpm条件下离心15min,提取总蛋白。用BCA蛋白试剂盒(A53225,Thermo Fisher Scientific,USA)测定提取的总蛋白的浓度。以α-tublin(GB11200,ServiceBio,Wuhan,China),活化的caspase 3(9661S,CST,USA)和p21(A1483,ABclonal,Wuhan,China)为标记抗体对上述蛋白进行免疫印迹分析。详细操作及分析方法参见文献(Meng X,He C,Chen X, et al.J.Ethnopharmacol.,2021,268,113579)。

[0064] 3.2实验结果分析

[0065] 由图7、图8和图9可知:

[0066] 1) 在人肝癌细胞HepG2与人非小细胞肺癌细胞A549中,本发明实施例1制得的双核

铂(II)配合物使得活化的caspase 3和p21均明显上调,表明本发明所述双核铂(II)配合物具有良好的抗癌活性。

[0067] 2) 在HepG2中,本发明实施例1制得的双核铂(II)配合物使得活化的caspase 3和p21的表达量分别为对照组CON的5倍和4倍。

[0068] 3) 在A549中,本发明实施例1制得的双核铂(II)配合物使得活化的caspase 3和p21的表达量分别为对照组CON的4倍和6倍。

[0069] 4) 在大鼠正常心肌细胞H9c2中,本发明实施例1制得的双核铂(II)配合物使得活化的caspase 3和p21的表达量均为对照组CON的2倍,表明本发明所述双核铂(II)配合物对正常细胞的毒性较弱。

[0070] 综上所述,本发明所述的双核铂(II)配合物 Pt_2 -BPA-TPA在体外表现出优异的抗肿瘤活性,且对正常细胞的毒性较弱。本发明所合成的新型双核铂(II)配合物 Pt_2 -BPA-TPA表现出的抗肿瘤活性令其具有良好的潜在药用价值,有望成为新型非经典铂类抗癌药物的备选之一,尤其是有望用于抗非小细胞肺癌药物的制备,从而克服现有铂类药物的耐药性较突出及毒副作用较明显的问题。

[0071] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

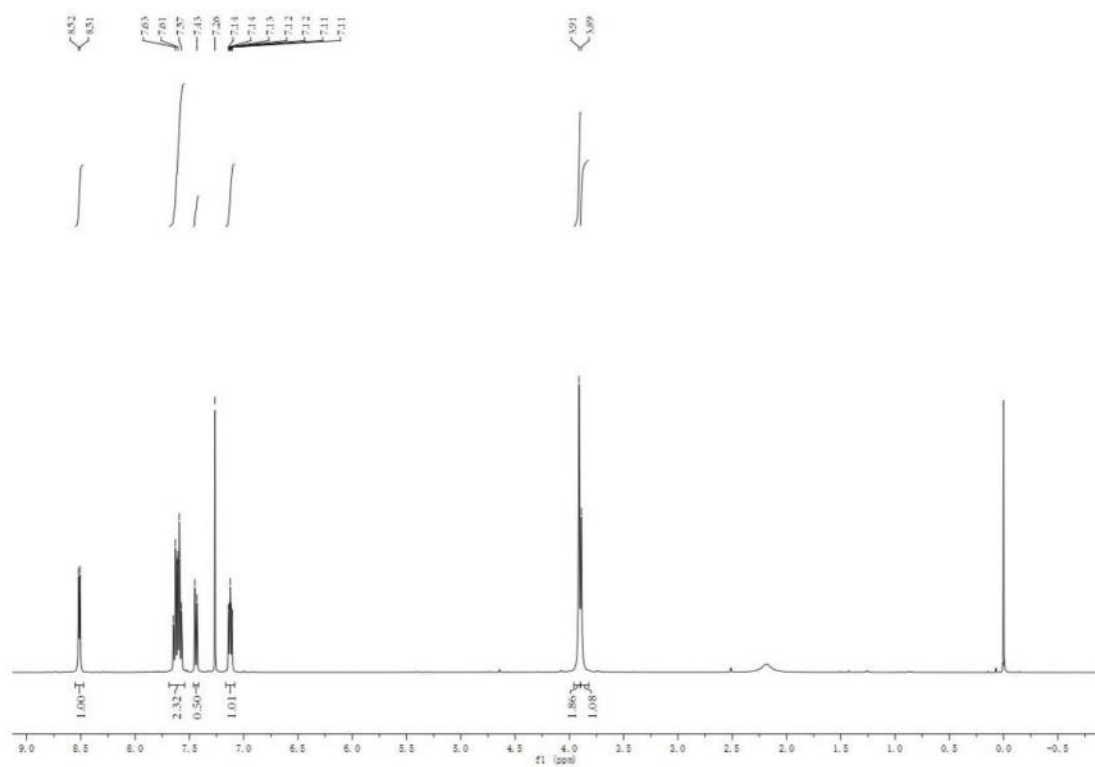


图1

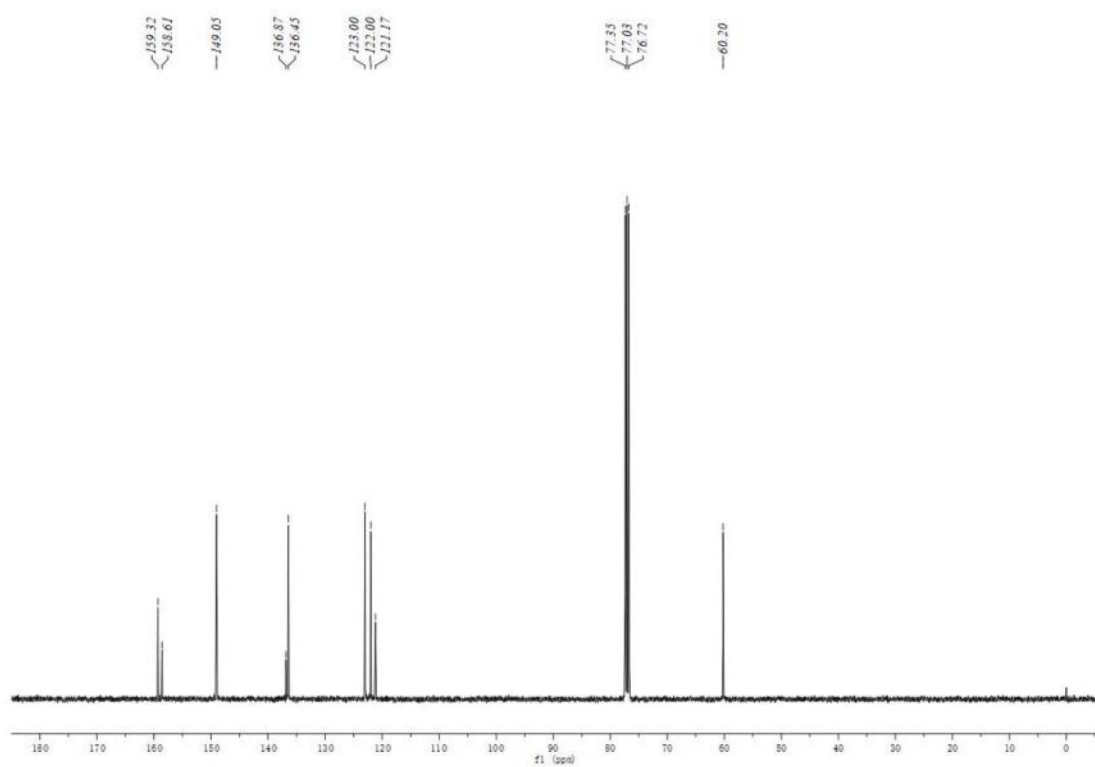


图2

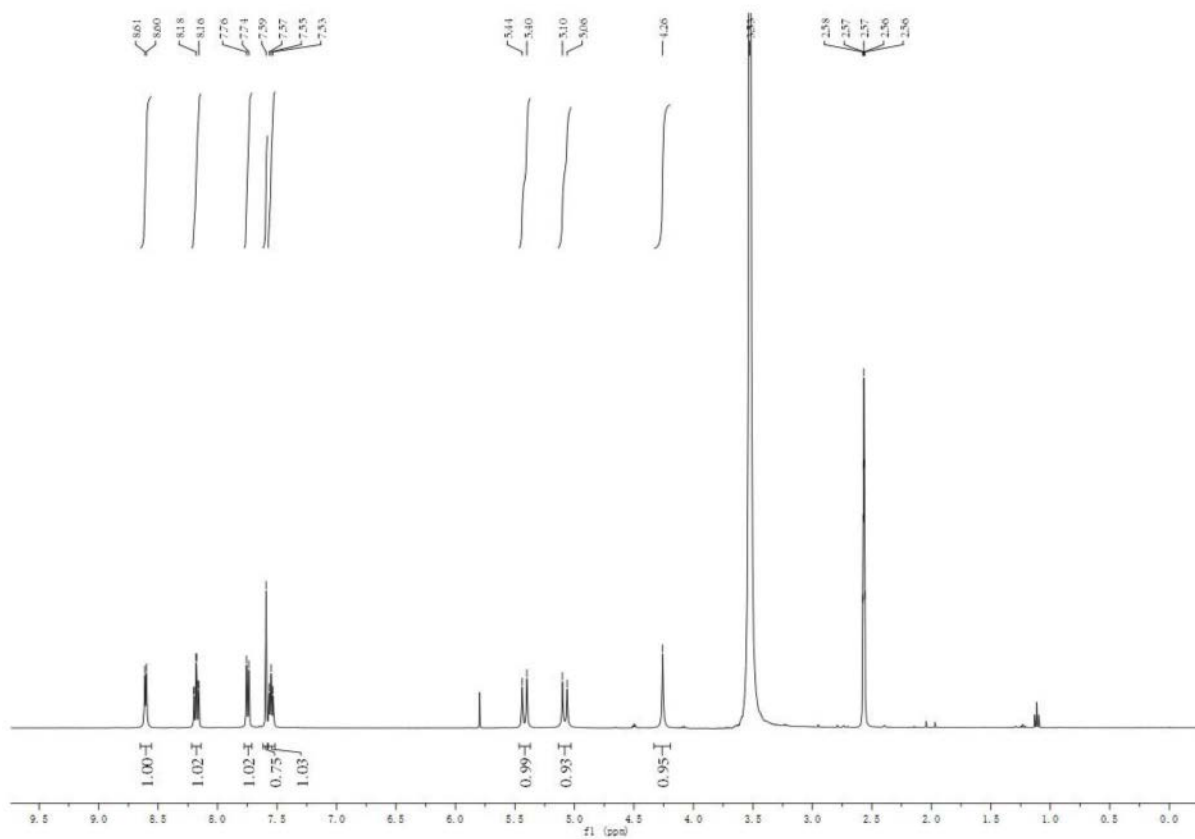


图3

Spectrum from 20201117-POS-2J-LK.wiff (sample 1) ...xperiment 1, +TOF MS (100 - 1500) from 0.155 min

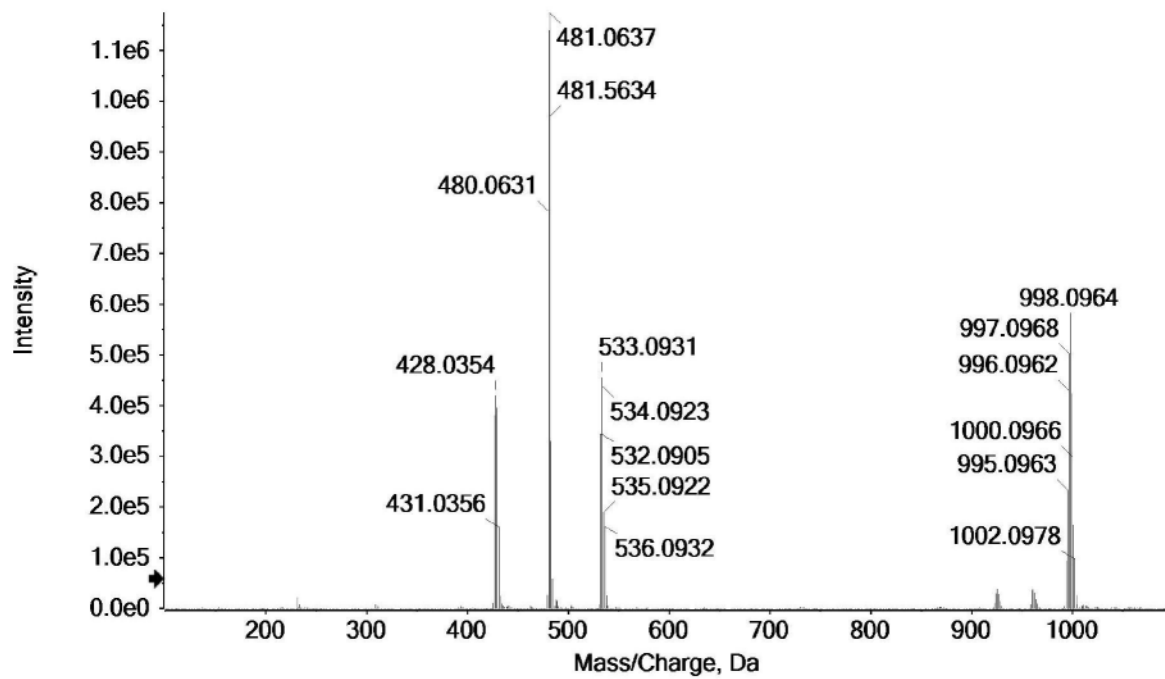


图4

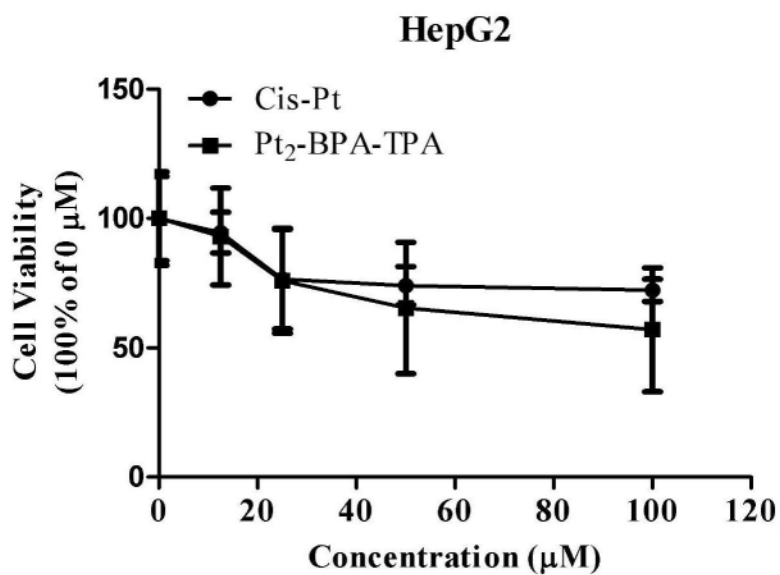


图5

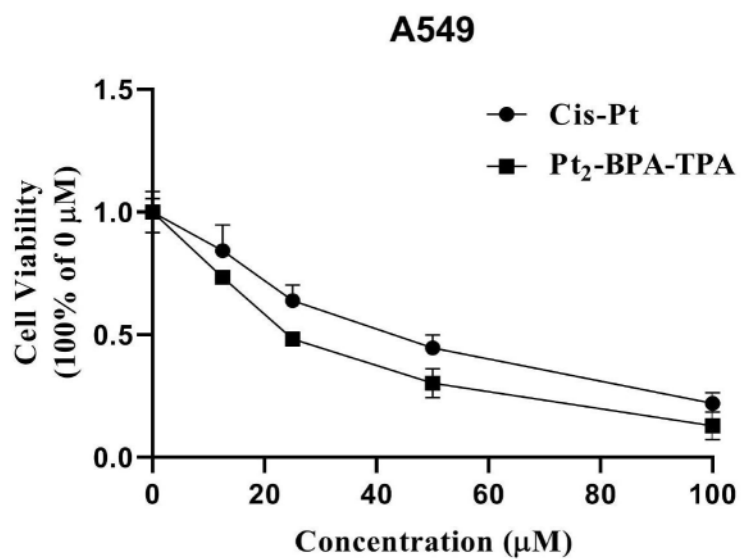


图6

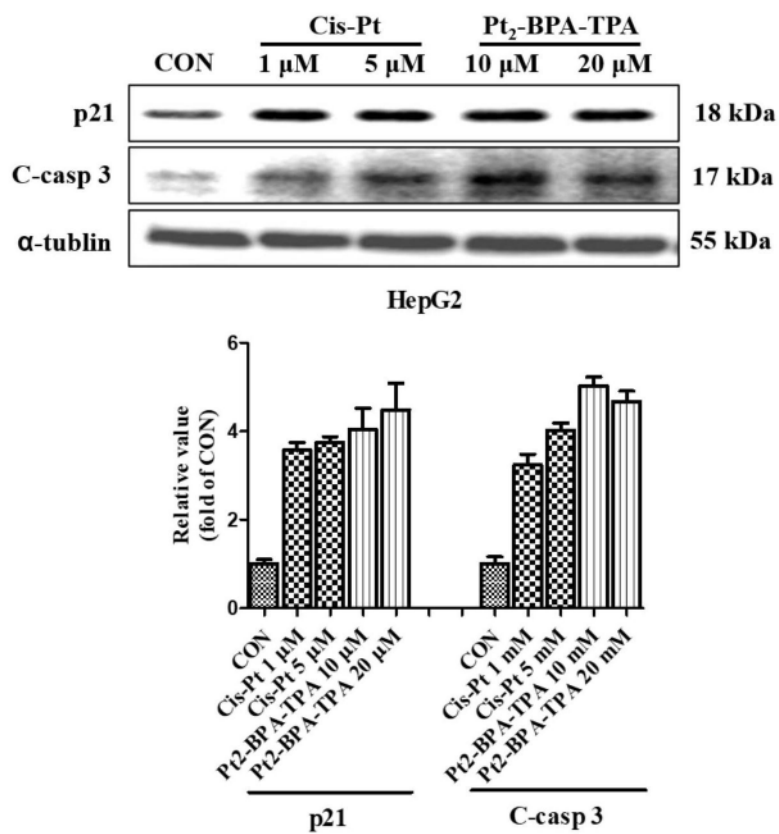


图7

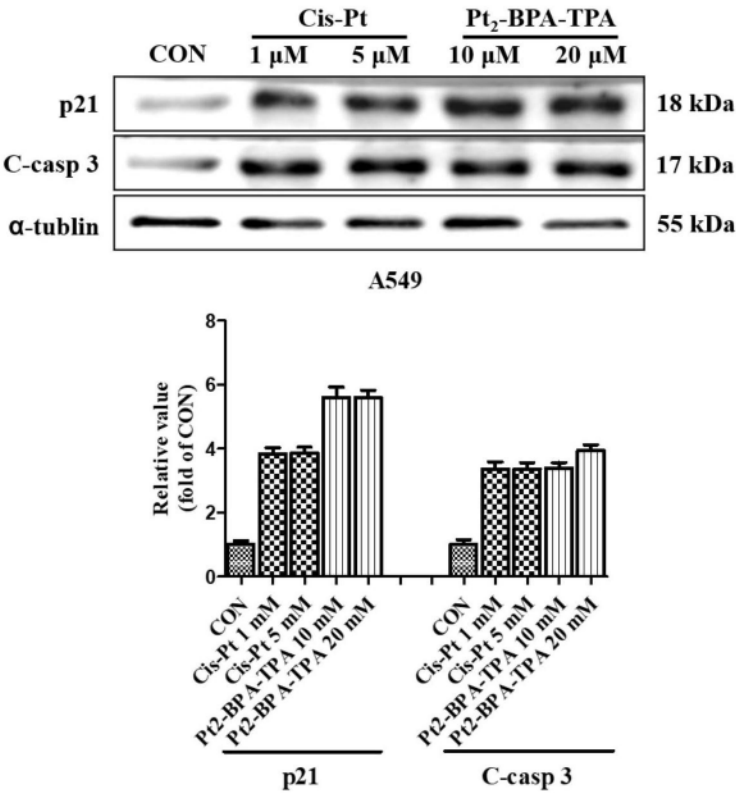


图8

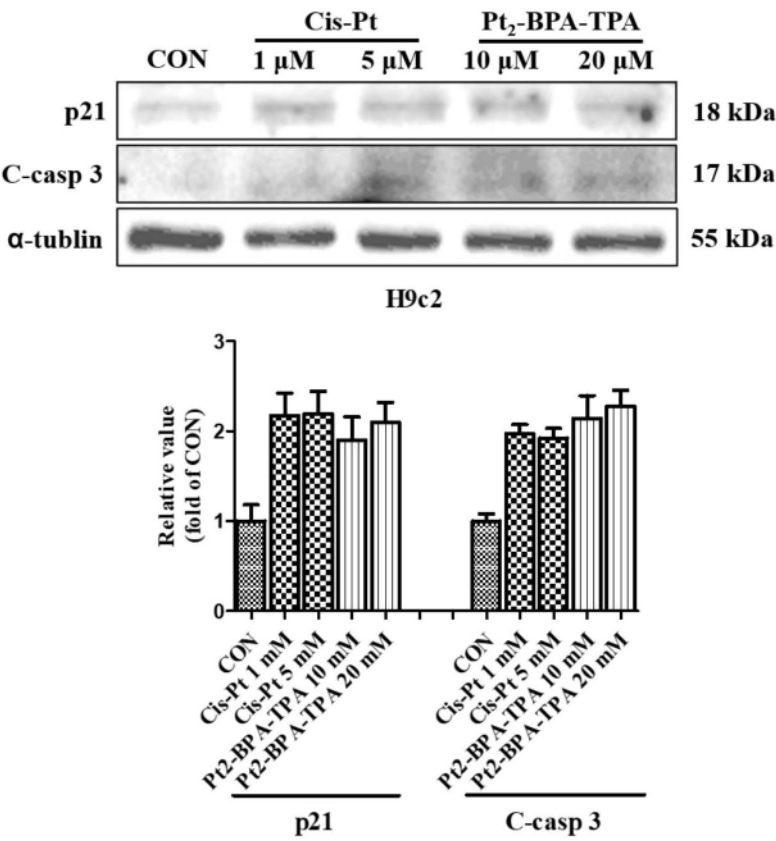


图9