



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102030765 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 27

(21) 申请号 200910179116. 5

(22) 申请日 2009. 09. 28

(71) 申请人 青龙科技股份有限公司

地址 336000 江西省宜春市袁州区经济开发  
区工业大道南大道

(72) 发明人 方起程 杨栋

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

代理人 黄革生 贾士聪

(51) Int. Cl.

*C07D 519/00* (2006. 01)

*A61K 31/409* (2006. 01)

*A61K 41/00* (2006. 01)

*A61P 35/00* (2006. 01)

权利要求书 7 页 说明书 25 页 附图 10 页

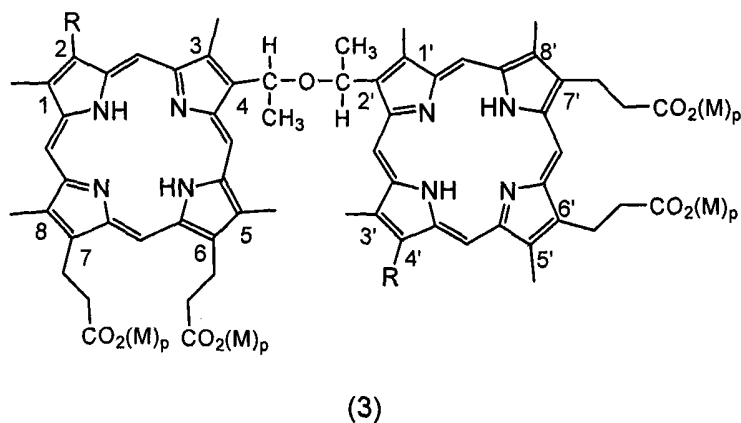
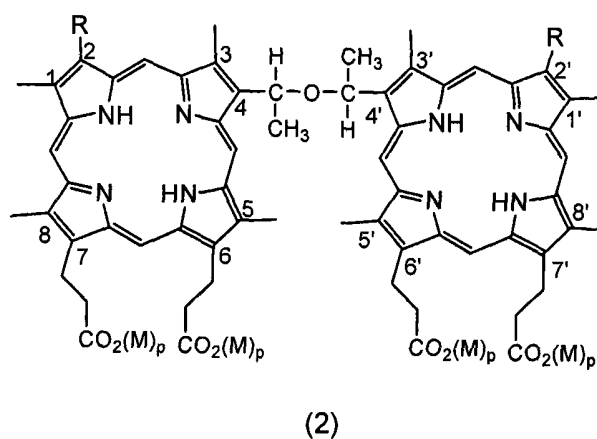
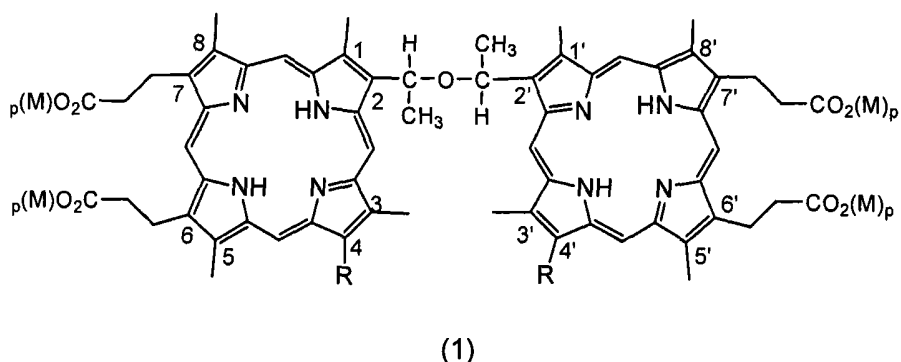
(54) 发明名称

以醚键结合的卟啉二聚体盐及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及以醚键结合的卟啉二聚体盐及其制备方法。具体而言, 本发明涉及一类新的以醚键结合的卟啉二聚体盐、其混合物、其制备方法、包含其的药物组合物及其作为光动力疗法的光敏剂的用途。

1. 式 (1)、(2) 或 (3) 的以醚键结合的卟啉二聚体盐,



其中

R 独立地选自  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  链烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{1-6}$  烷氧基和  $C_{1-6}$  酰基, 其任选地被一个或多个选自卤素和羟基的取代基取代,

M 是碱金属、碱土金属或  $NH_4^+$ ,

p 是 M 的化合价数的倒数。

2. 根据权利要求 1 所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐, 其中 R 独立地选自任选被一个或多个羟基取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  链烯基、 $C_{2-6}$  炔基和  $C_{1-6}$  酰基, M 是碱金属或  $NH_4^+$ , 且 p 是 1。

3. 根据权利要求 2 所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐, 其中 R 独立地选自  $CH=CH_2$ 、 $CH(OH)CH_3$  和  $COCH_3$ , M 是碱金属或  $NH_4^+$ , 且 p 是 1。

4. 根据权利要求 3 所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐, 其中 R 独立地选自  $CH=CH_2$  和  $CH(OH)CH_3$ , M 是碱金属或  $NH_4^+$ , 且 p 是 1。

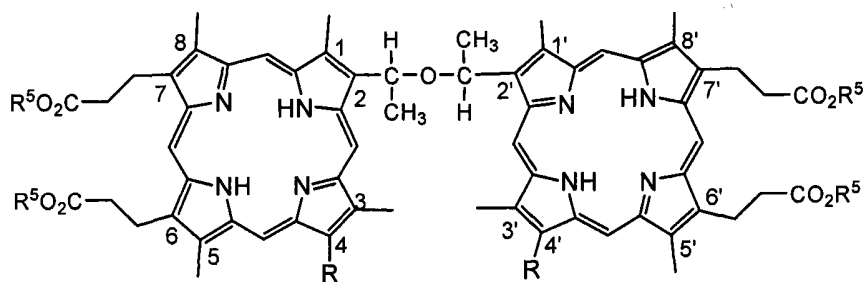
5. 根据权利要求 1 至 4 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐,其中 M 是碱金属。

6. 根据权利要求 5 所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐,其中 M 是 Na 或 K。

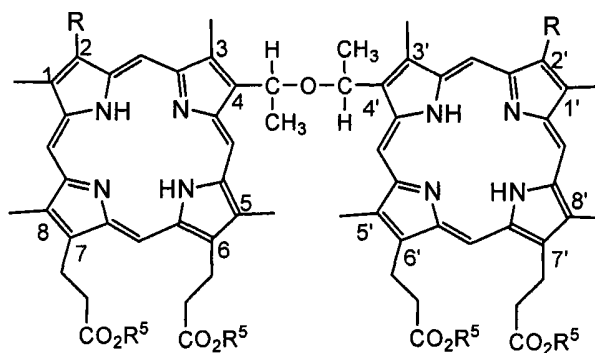
7. 根据权利要求 1 所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐,其选自二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚,二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚,1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基醚,二 [1-[6,7-二丙酸钾-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚,二 [1-[6,7-二丙酸钾-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚,1-[6,7-二丙酸钾-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钾-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基醚,二 [1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚,二 [1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚,和 1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸铵-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基醚。

8. 制备权利要求 1 至 7 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐的方法,所述方法包括以下步骤:

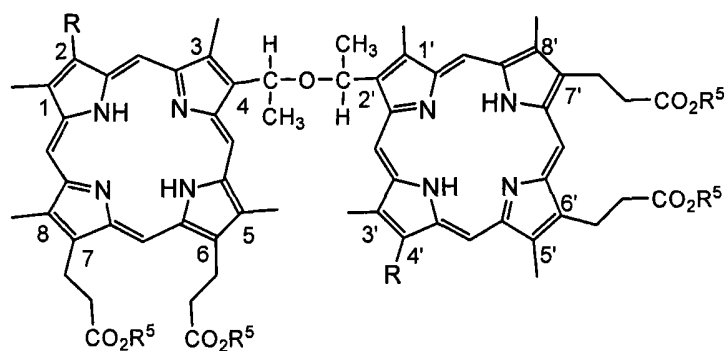
a) 将式 (4)、(5) 或 (6) 的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯或其混合物溶解在能与步骤 b) 中的碱水溶液混溶的溶剂中,形成溶液,



(4)

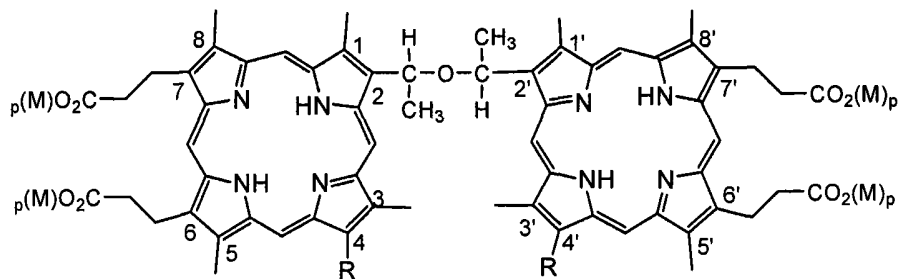


(5)

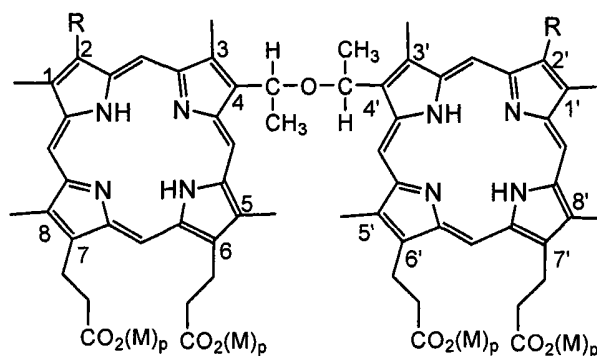


(6)

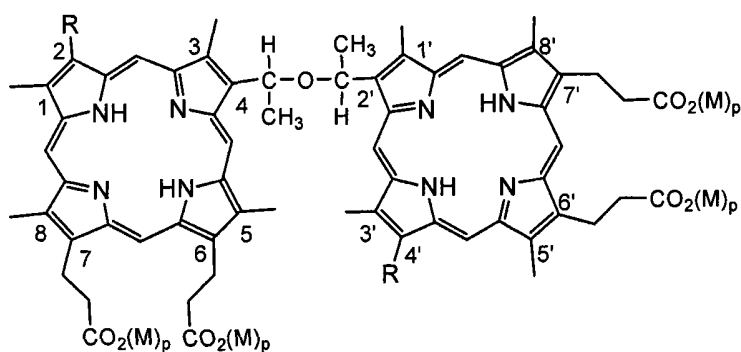
b) 将步骤 a) 中所得的溶液与碱水溶液反应, 所述碱是碱金属氢氧化物、碱土金属氢氧化物、氨或氢氧化铵, 生成式 (1)、(2) 或 (3) 的以醚键结合的卟啉二聚体盐或其混合物,



(1)



(2)



(3)

其中  $R^5$  独立地选自  $C_{1-6}$  烷基,  $R$ 、 $M$  和  $p$  如权利要求 1-7 中所定义, 还任选地包括以下步骤

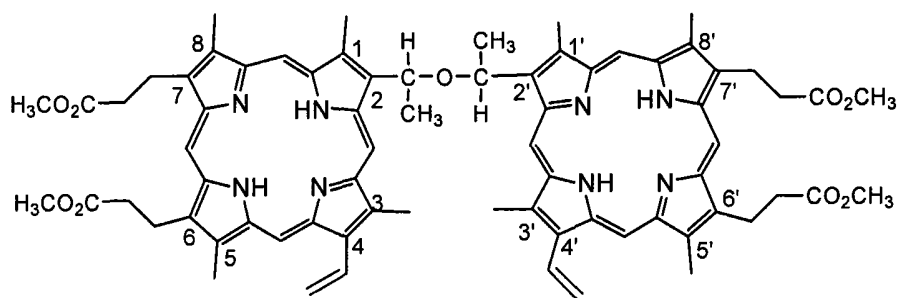
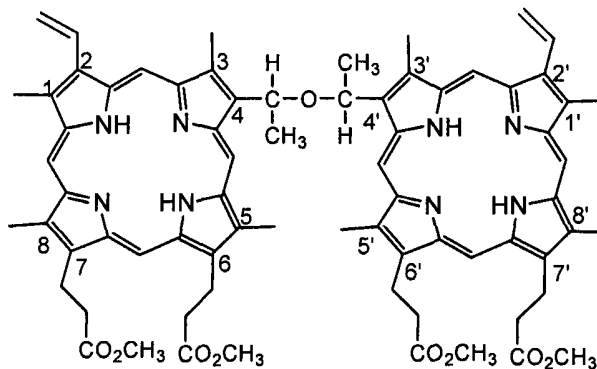
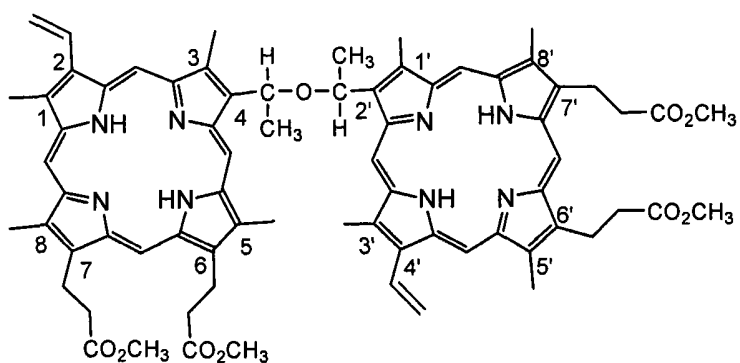
c) 将步骤 b) 中所得的以醚键结合的卟啉二聚体盐的混合物分离成单个异构体。

9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中步骤 a) 中所用的溶剂选自: 低级链烷醇类, 例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇等; 多元醇类, 例如乙二醇、1,2-丙二醇、甘油等; 环状醚类, 例如四氢呋喃、二氧杂环己烷、吗啉等; 酮类, 例如丙酮等; 腈类, 例如乙腈、丁二腈等; 酰胺类, 例如甲酰胺、 $N,N$ -二甲基甲酰胺等; 亚砷和砷类, 例如二甲亚砷、环丁砷等; 乙二醇醚类, 例如乙二醇一甲醚、乙二醇一乙醚; 二甘醇; 或它们任意比例的混合物。

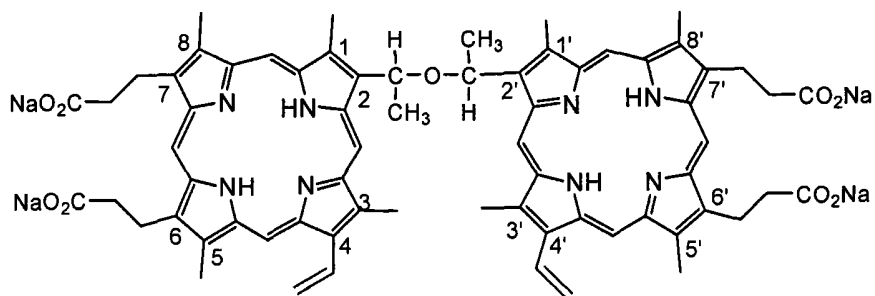
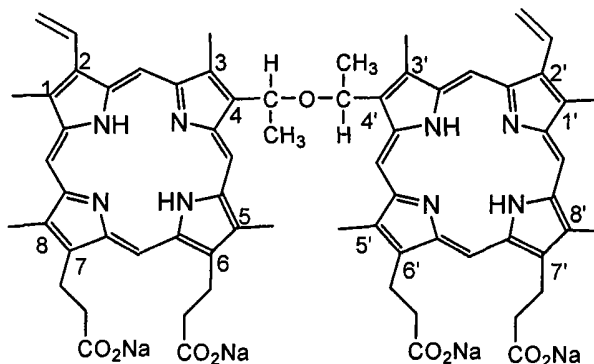
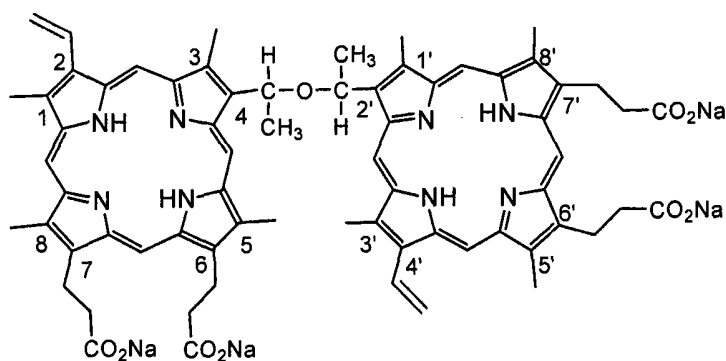
10. 根据权利要求 8 或 9 中任意一项所述的方法, 其中步骤 b) 中所用的碱水溶液浓度在  $0.01\text{mol/L}$  至饱和浓度范围内, 例如  $0.1\text{mol/L}$ 。

11. 根据权利要求 8 所述的方法, 其包括以下步骤:

a) 将式 DVDME-1、DVDME-2 或 DVDME-3 的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯或其混合物溶解在能与步骤 b) 中的碱水溶液混溶的溶剂中, 形成溶液,

**DVDME-1****DVDME-2****DVDME-3**

b) 将步骤 a) 中所得的溶液与氢氧化钠水溶液反应,生成式 DVDMS-1、DVDMS-2、DVDMS-3 的以醚键结合的卟啉二聚体盐或其混合物,

**DVDMS-1****DVDMS-2****DVDMS-3**

还任选地包括以下步骤

c) 将步骤 b) 中所得的以醚键结合的卟啉二聚体盐的混合物分离成单个异构体 DVDMS-1、DVDMS-2、DVDMS-3。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中步骤 a) 中所用的溶剂是甲醇、乙醇、四氢呋喃、丙酮或它们的混合物, 优选四氢呋喃。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的方法, 其中步骤 b) 中所用的氢氧化钠溶液浓度为 0.1mol/L。

14. 一种混合物, 其包含两种或更多种权利要求 1 至 7 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐。

15. 根据权利要求 14 所述的混合物, 其基本由选自以下的化合物组成: 二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙烯基 -2-吡吩]乙基]醚, 二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙烯基 -4-吡吩]乙基]醚, 1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙烯

基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基醚,二[1-[6,7-二丙酸钾-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚,二[1-[6,7-二丙酸钾-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚,1-[6,7-二丙酸钾-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钾-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基醚,二[1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚,二[1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚,和 1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸铵-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基醚。

16. 根据权利要求 15 所述的混合物,其基本由二[1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚、二[1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚和 1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4'-乙烯基-2'-吡吩]乙基醚组成。

17. 用于光动力疗法的药物组合物,其包含权利要求 1 至 7 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐或者权利要求 14 至 16 中任意一项所述的混合物,并任选地包含一种或多种可药用的赋形剂。

18. 权利要求 1 至 7 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐或者权利要求 14 至 16 中任意一项所述的混合物在制备药物中的用途,所述药物用作光动力疗法的光敏剂。

19. 根据权利要求 18 所述的用途,其中所述药物作为光敏剂用于治疗或诊断:恶性肿瘤,例如实体瘤,如膀胱癌、食管癌、支气管癌、口腔颌面部癌、鼻咽癌、肋膜间皮瘤、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、阴茎癌、宫颈癌、乳腺癌及乳腺癌切除术后皮下转移结节、肛周肿瘤及肛周肿瘤扩大切除术后癌残留、卡波西肉瘤、肺癌、胃癌、胆管癌、前列腺癌、黑色素瘤和脑肿瘤;癌前病变,例如巴雷特氏食管、口腔粘膜白斑等;良性病变,例如老年性眼底黄斑病变、动脉粥样硬化斑块、类风湿性关节炎、皮肤微血管畸形、牛皮癣、红斑狼疮皮损等。

20. 一种药盒,其包含权利要求 1 至 7 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐或权利要求 14 至 16 中任意一项所述的混合物;以及将其作为光敏剂用于光动力疗法的说明书。

21. 根据权利要求 20 所述的药盒,其中所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐或所述的混合物是溶液的形式。

22. 根据权利要求 20 所述的药盒,其中所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐或所述的混合物是冻干制剂的形式,并且所述药盒还包含用于将该冻干制剂进行重新配制以进行施用的溶剂,例如注射用水或注射用 5%葡萄糖溶液。

23. 检测权利要求 1 至 7 中任意一项所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐或权利要求 14 至 16 中任意一项所述的混合物的高效液相色谱方法,其特征在于使用反相色谱柱,检测波长为 400nm,流动相是甲醇和 1%醋酸水溶液的混合物。



## 以醚键结合的卟啉二聚体盐及其制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及光动力疗法 (Photodynamic therapy, PDT) 中的光敏剂 (Photosensitizer) 及其制造方法。具体而言,本发明涉及一类新的以醚键结合的卟啉二聚体盐、其制造方法、包含其的药物组合物及其作为光动力疗法的光敏剂的用途。

### 背景技术

[0002] PDT 是利用光敏剂的光动力效应进行疾病治疗的新方法,目前主要用于治疗和诊断恶性肿瘤以及某些癌前病变和良性病变。光动力效应用于疾病的治疗时,需具备两个条件,一是光敏剂注入体内后会在病变组织中形成较高的蓄积,二是靶部位易于接受特定波长光的照射。因为只有这样,强烈的光动力效应才会发生,病变组织才会受到充分破坏。一般说来,恶性肿瘤、某些癌前病变和良性病变会较多地摄取光敏剂,只要这些病灶处于特定波长光能够抵达照射的范围,就有可能是 PDT 的适应症。关于光敏剂在病变组织中蓄积的原因,一种广泛接受的理论是,光敏剂是带有正电荷并倾向于在酸性环境中沉淀的化合物,病变组织例如肿瘤组织内有一个具有乳酸,并带有高负电荷的微小结构,且是无氧新陈代谢的环境,而正常细胞却是具有有氧新陈代谢的特性,所以当光敏剂进入肿瘤患者体内以后,在一段时间内会在肿瘤组织中形成相对高浓度的积聚,并与肿瘤细胞结合。此时用与之相匹配的特定波长光照射肿瘤组织,将激活其中的光敏剂分子,在肿瘤组织内引发一系列光化学反应,生成活性很强的单态氧和超氧负离子自由基,进而和邻近的生物大分子发生氧化反应,直接损伤、灭活肿瘤细胞,并破坏肿瘤组织内的微血管网,导致肿瘤组织的广泛坏死。PDT 对靶组织具有一定的选择性,同时具有较好的杀伤可控性,因此可在确保肿瘤灭活目标的情况下尽可能减少正常组织的损伤,是一种微侵袭性、低毒性、非产热性的局部治疗手段,具有广阔的应用前景。

[0003] 光敏剂一直是光动力疗法研究的核心问题。PHOTOFRIN 是美国罗斯威尔派克肿瘤研究所 (Roswell Park Cancer Institute) 研制的第一个抗癌光敏剂,后由加拿大 QLT 公司 (Quadra Logic Technologies Phototherapeutics Inc) 开发生产。该光敏剂自 1996 年获得美国 FDA 批准上市后,开始在北美以及英国、德国等欧洲国家和日本、韩国等亚洲国家应用,现已得到多国的权威认可,成为梗阻性食道癌、梗阻性支气管肺癌和巴雷特氏食管 (Barrett's esophagus) 的主要治疗手段。加拿大 QLT 公司还曾于 1990 年 6 月 5 日就 PHOTOFRIN 这一产品在中国申请了名称为“稳定的冻干聚血卟啉醚 / 酯组合物”的发明专利 (申请号为 90104366.4)。在德国和俄罗斯,PHOTOFRIN 有相应的仿制药,药品名分别为 Photosam 和 Photogem。

[0004] 虽然 PHOTOFRIN 对光动力疗法起了很大的推动作用,但也存在一些显著的缺点。PHOTOFRIN 是一种由 8 个以上卟啉衍生物组成的混合制剂,有效成分不明确,因此无可控的质量标准。其主要不良反应为皮肤光毒性,由于在皮肤中的存留时间长达数周,容易引起皮肤光敏副反应,如可能会出现皮疹、水泡、色素沉着等,因此用药后 4-6 周内,患者需生活在一个避光的环境。另外,PHOTOFRIN 价格昂贵,每瓶 (75mg) 市售价 1600-2300 美元,所以我

国一直未注册进口。2006年中国国家食品药品监督管理局批准重庆市华鼎现代生物制药有限公司正式生产光敏剂“喜泊分 (Hiporfin)”。 “喜泊分”也是由多种卟啉衍生物组成的混合制剂,类同 PHOTOFRIN,但临床使用效果不如 PHOTOFRIN,主要原因是质量不稳定,其所选择的质控标示化合物“血卟啉”是抗肿瘤光动力活性很低而皮肤光毒性又较高的成分,不能起到控制质量的作用。

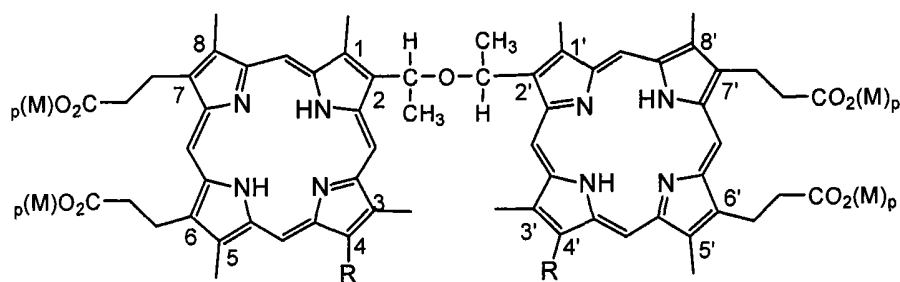
[0005] 经检索可知 Thomas J. Dougherty 和 Ravindra K. Pandey 曾于 1990 年 9 月 18 日提交了美国专利申请,名称为“用于光动力治疗的精制血卟啉二聚体和三聚体 (PURIFIED HEMATOPORPHYRIN DIMERS AND TRIMERS USEFUL IN PHOTODYNAMIC THERAPY)” (专利号: 5,190,966,授权公告日:1993 年 3 月 2 日)。他们在 Journal of Medicinal Chemistry 1990 年第 33 卷第 7 期 2032-2038 页中发表的题目为“作为光动力疗法光敏剂的卟啉二聚体 (Porphyrin Dimers as Photosensitizers in Photodynamic Therapy)”一文中介绍了用单一的羟乙基-乙烯基-次卟啉二甲酯异构体合成相应的以醚键结合的卟啉二聚体二甲酯异构体或用 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次卟啉二甲酯 (2(4)-(1-hydroxyethyl)-4(2)-vinyl-deuteroporphyrin dimethyl ester),即两个异构体混合物合成三个以醚键结合的卟啉二聚体甲酯异构体混合物的方法。小鼠在体光动力活性试验显示上述的单一的或混合的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯及其相应的混合羧酸均具有相同强度的光动力活性,而血卟啉、羟乙基-乙烯基-次卟啉和原卟啉 (即在 PHOTOFRIN 中含量高达 95% 以上的单分子化合物) 的光动力活性均非常弱。但是,以醚键结合的卟啉二聚体甲酯或羧酸难溶于水,至今未见用作光动力疗法的光敏剂。

[0006] Christopher J. Byrne 等 在 Australia Journal of Chemistry 1990 年第 43 卷 1889-1970 页中发表的题目为“以醚键结合的二聚体和三聚体血卟啉衍生物成分的合成 (The Synthesis of the Dimer and Trimer Ether-Linked Components of Hematoporphyrin Derivative)”一文中介绍了合成以醚键结合的二聚体和三聚体血卟啉衍生物的方法:用混合的 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基-次卟啉二甲酯 [2(4)-(1-hydroxyethyl)-4(2)-vinyldeuteroporphyrin dimethyl ester] 为原料,溶于无水二氯甲烷,加溴化氢气体饱和的无水二氯甲烷溶液。摇匀后,加塞密闭放置于暗处 1 小时。加水和二氯甲烷,将二氯甲烷层分出,用水洗涤,减压回收二氯甲烷。粗产物采用硅胶色谱柱进行分离,分别可得以醚键结合的卟啉二聚体甲酯的  $\alpha$  异构体和  $\beta$  异构体。

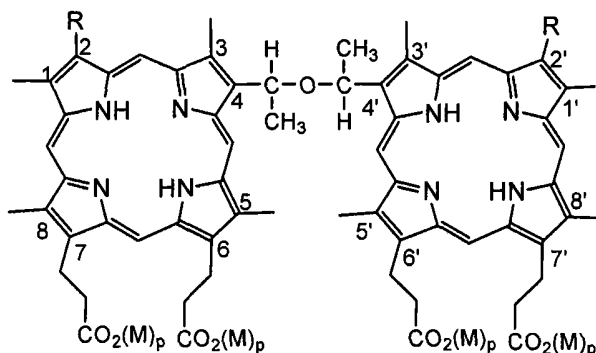
## 发明内容

[0007] 本发明的化合物属于以醚键结合的卟啉二聚体盐,是一类可溶于水、性质稳定、光动力活性强、皮肤光毒性小、质量可控的新型光敏剂,可用于光动力疗法,例如用于治疗或诊断恶性肿瘤、癌前病变或良性病变。一方面,本发明提供了式 (1)、(2) 或 (3) 的以醚键结合的卟啉二聚体盐,

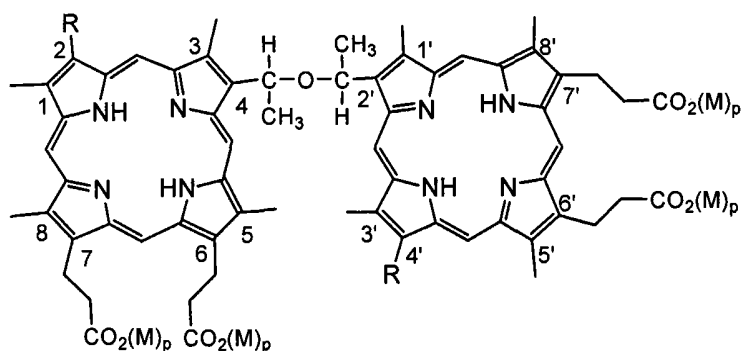
[0008]



(1)



(2)



(3)

[0009] 其中

[0010] R 独立地选自  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  链烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{1-6}$  烷氧基和  $C_{1-6}$  酰基，其任选地被一个或多个选自卤素和羟基的取代基取代，

[0011] M 是碱金属、碱土金属或  $NH_4^+$ ，

[0012] p 是 M 的化合价数的倒数，

[0013] 以及其溶剂合物，尤其是水合物。

[0014] 在一个实施方案中，本发明提供了上述的以醚键结合的卟啉二聚体盐，其中 R 独立地选自任选被一个或多个羟基取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  链烯基、 $C_{2-6}$  炔基和  $C_{1-6}$  酰基，M 是碱金属或  $NH_4^+$ ，且 p 是 1，以及其溶剂合物，尤其是水合物。

[0015] 在一个优选的实施方案中，本发明提供了上述的以醚键结合的卟啉二聚体盐，其中 R 独立地选自  $CH=CH_2$ 、 $CH(OH)CH_3$  和  $COCH_3$ ，M 是碱金属或  $NH_4^+$ ，且 p 是 1，以及其溶剂合物，尤其是水合物。

[0016] 在一个更优选的实施方案中,本发明提供了上述的以醚键结合的卟啉二聚体盐,其中 R 独立地选自  $\text{CH}=\text{CH}_2$  和  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , M 是碱金属或  $\text{NH}_4^+$ , 且 p 是 1, 以及其溶剂合物, 尤其是水合物。

[0017] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明提供了上述的以醚键结合的卟啉二聚体盐,其中两个 R 不同时是  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , 以及其溶剂合物, 尤其是水合物。

[0018] 在一个最优选的实施方案中,本发明提供了上述的以醚键结合的卟啉二聚体盐,其中 M 是碱金属,例如 Na 或 K, 以及其溶剂合物, 尤其是水合物。

[0019] 本发明的以醚键结合的卟啉二聚体盐的实例包括但不限于:

[0020] 二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-1),

[0021] 二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-2),

[0022] 1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠 -1',3',5',8'-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基醚 (DVDMS-3),

[0023] 二 [1-[6,7-二丙酸钾 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基]醚,

[0024] 二 [1-[6,7-二丙酸钾 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基]醚,

[0025] 1-[6,7-二丙酸钾 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钾 -1',3',5',8'-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基醚,

[0026] 二 [1-[6,7-二丙酸铵 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基]醚,

[0027] 二 [1-[6,7-二丙酸铵 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基]醚,和

[0028] 1-[6,7-二丙酸铵 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸铵 -1',3',5',8'-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基醚,

[0029] 以及其溶剂合物, 尤其是水合物。

[0030] 如上所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐以及其溶剂合物 (尤其是水合物) 在本文中被总称为“本发明的化合物”。

[0031] 与二聚体甲酯和羧酸相比,本发明的化合物具有显著的优点。首先,本发明的化合物能溶于水,这将使得配制过程更加简单、容易,并且消除了助溶的药物辅料对其活性的潜在不良影响;其次,本发明的化合物热稳定更好,我们在实验过程中发现,在碱性环境下,将二聚体钠盐在油浴上加热到  $80^\circ\text{C}$  避光回流 8 小时,未见二聚体钠盐分解。

[0032] 另一方面,本发明提供了两种或更多种本发明的化合物的任意比例的混合物。在一个实施方案中,所述混合物基本由选自二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-1)、二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-2)、1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠 -1',3',5',8'-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基醚 (DVDMS-3)、二 [1-[6,7-二丙酸钾 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基]醚、二 [1-[6,7-二丙酸钾 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基]醚、1-[6,7-二丙酸钾 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钾 -1',3',5',8'-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基醚、二 [1-[6,7-二丙酸铵 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙基 -2-吡吩]乙基]醚、二 [1-[6,7-二丙酸铵 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙基 -4-吡吩]乙基]醚和

1-[6,7-二丙酸铵-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-卟吩]乙基-1-[6,,7'-二丙酸铵-1',3',5',8'-四甲基-4-乙烯基-2-卟吩]乙基醚的化合物组成。优选地,所述混合物基本由 DVDMS-1、DVDMS-2 和 DVDMS-3 组成。上述混合物在本文中被总称为“本发明的混合物”。

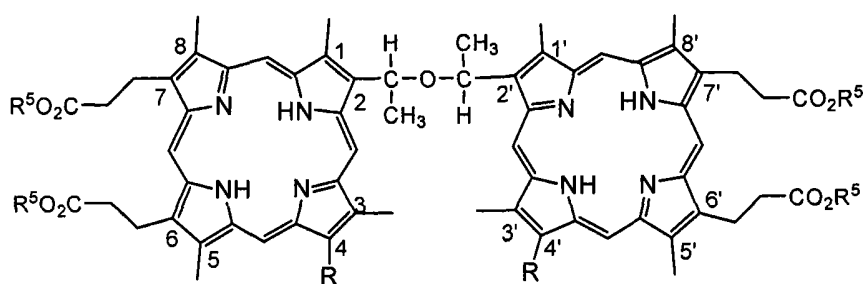
[0033] 本发明的化合物在混合后仍保持其作为光动力疗法光敏剂的活性,因此本发明的混合物也可不经分离直接用作光动力疗法的光敏剂。

[0034] 另一方面,本发明提供了用作光动力疗法光敏剂的本发明的化合物或本发明的混合物。

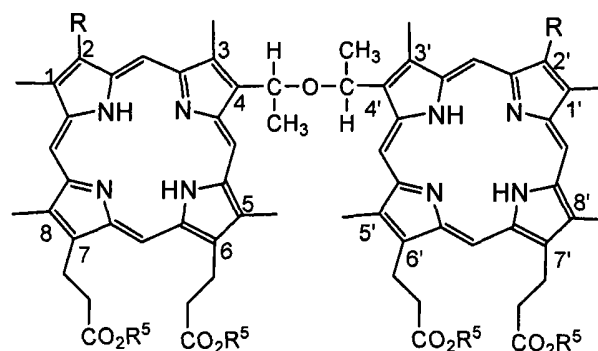
[0035] 另一方面,本发明提供了制备上述以醚键结合的卟啉二聚体盐的方法,所述方法包括以下步骤:

[0036] a) 将式 (4)、(5) 或 (6) 的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯或其混合物溶解在能与步骤 b) 中的碱水溶液混溶的溶剂中,形成溶液,

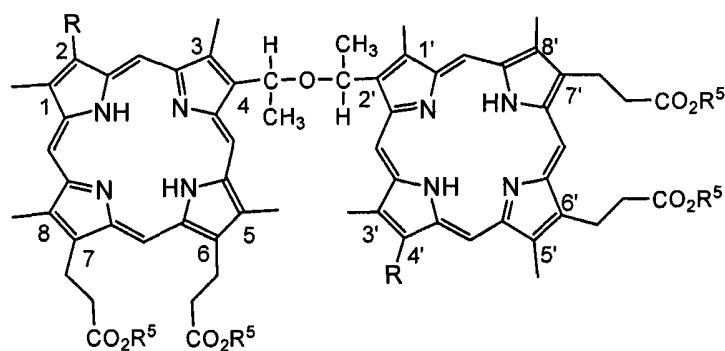
[0037]



(4)



(5)

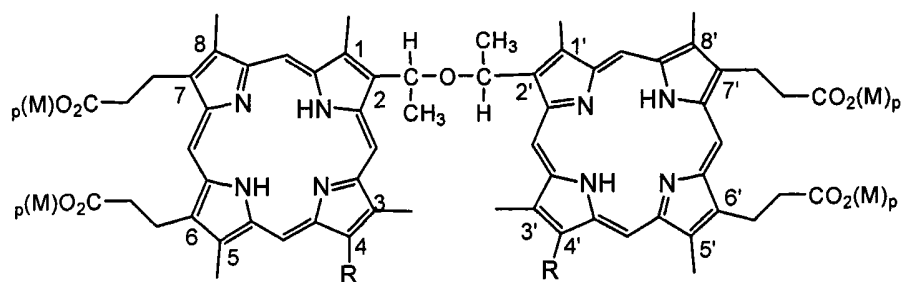


(6)

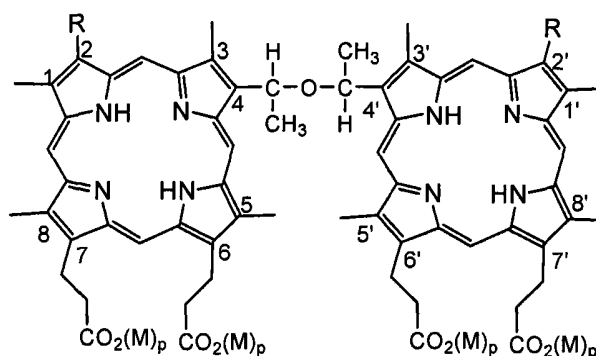
[0038] 其中  $R^5$  独立地选自  $C_{1-6}$  烷基,  $R$  如上文所定义,

[0039] b) 将步骤 a) 中所得的溶液与碱水溶液反应, 所述碱是碱金属氢氧化物、碱土金属氢氧化物、氨或氢氧化铵, 分别生成式 (1)、(2) 或 (3) 的以醚键结合的卟啉二聚体盐或其混合物,

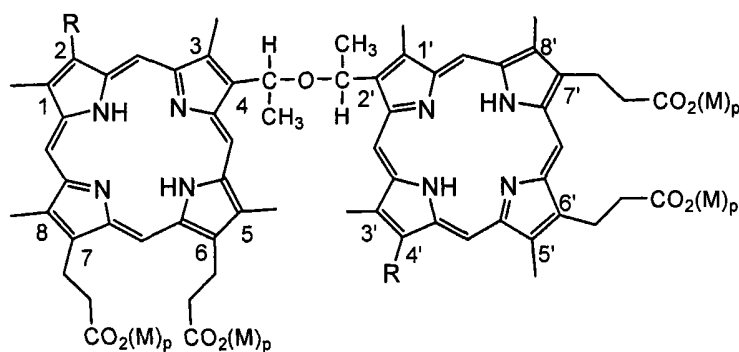
[0040]



(1)



(2)



(3)

[0041] 其中 R、M 和 p 如上文所定义,

[0042] 还任选地包括以下步骤

[0043] c) 将步骤 b) 中所得的以醚键结合的卟啉二聚体盐的混合物分离成单个异构体。

[0044] 步骤 a) 中所用的括式 (4)、(5)、(6) 的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯是已知化合物, 可以按照本领域已知的方法或本发明所述的方法 (尤其是实施例的方法) 以及这些方法的变型进行制备。例如, 关于其制备方法可参见以下文献: Christopher J. Byrne 等, Australia Journal of Chemistry, 1990, 43, 1889-1970; Ravindra K. Pandey 等, Journal of Medicinal Chemistry, 1990, 33, 2032-2038。

[0045] 步骤 a) 中所述的能与步骤 b) 中的碱水溶液混溶的溶剂优选选自: 低级链烷醇类,

例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇等；多元醇类，例如乙二醇、1,2-丙二醇、甘油等；环状醚类，例如四氢呋喃、二氧杂环己烷、吗啉等；酮类，例如丙酮等；腈类，例如乙腈、丁二腈等；酰胺类，例如甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺等；亚砷和砷类，例如二甲亚砷、环丁砷等；乙二醇醚类，例如乙二醇一甲醚、乙二醇一乙醚；二甘醇；或它们的混合物。溶剂的量不是关键的，只要能充分溶解反应物即可。

[0046] 步骤b)中所述的反应可以在宽范围的温度下进行，例如0-90℃，优选10-65℃，更优选20-60℃，例如在室温下进行。根据所用的条件，反应时间一般为几十分钟至几天，例如数小时，例如4-24小时，例如12小时。

[0047] 步骤b)中所述的碱可以是：碱金属氢氧化物，例如氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾；碱土金属氢氧化物，例如氢氧化钙、氢氧化镁；氨；和氢氧化铵等。例如，碱金属氢氧化物、碱土金属氢氧化物、氢氧化铵的水溶液或氨水，其浓度可以是任何适宜的浓度，例如0.01mol/L至饱和浓度，例如0.02mol/L、0.05mol/L、0.1mol/L、0.2mol/L、0.5mol/L、1mol/L的水溶液。

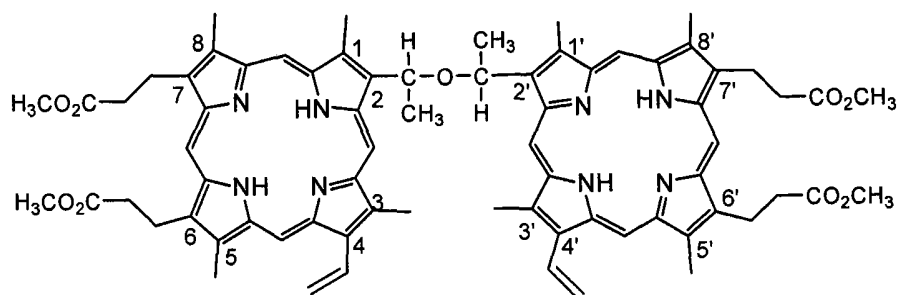
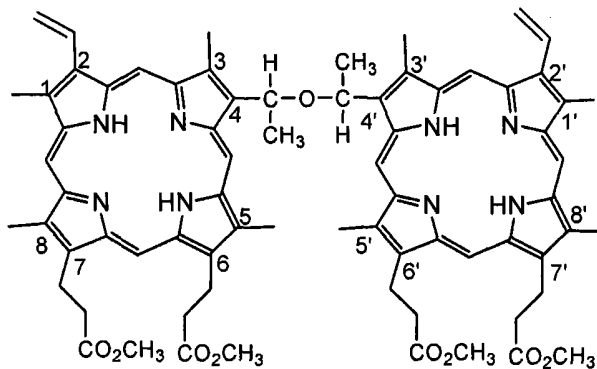
[0048] 如上所述，步骤b)中所得的混合物可以不经分离直接用作光动力疗法的光敏剂。

[0049] 在任选的步骤c)中，可以用任何适宜的方法将以醚键结合的卟啉二聚体盐的混合物分离成单个异构体，例如反相硅胶色谱法，例如使用反相硅胶作为固定相的薄层色谱法和柱色谱法，包括常压柱色谱法、闪式柱色谱法、中压柱色谱法和高效液相色谱法等。可以使用任何适宜的洗脱剂，例如反相硅胶色谱法用低级链烷醇（例如甲醇、乙醇）和水的混合溶液、乙腈和水的混合溶液等作为洗脱剂，例如所述低级链烷醇或乙腈与水的比例为5：95、10：90、20：80、30：70、40：60、50：50、60：40、70：30、80：20、90：10、95：5。

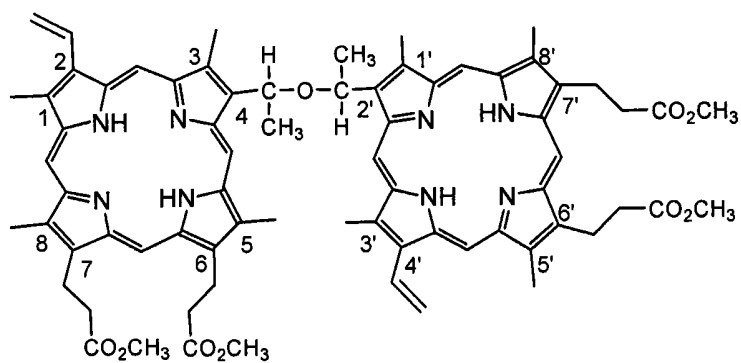
[0050] 在一个特定的实施方案中，本发明提供了制备本发明的化合物的方法，其中将以醚键结合的卟啉二聚体甲酯溶于四氢呋喃，向所得的溶液中加入氢氧化钠水溶液，例如0.1mol/L的氢氧化钠水溶液，制成以醚键结合的卟啉二聚体钠盐粗品，将该粗品装入回流洗脱器中，加适量无水乙醇回流，除去剩余的氢氧化钠，得到以醚键结合的卟啉二聚体钠盐混合物。采用反相硅胶柱色谱法对所述混合物进行分离。例如，将反相硅胶C18 50g用甲醇浸泡过夜，湿法装柱，用甲醇-水（40：60）平衡。取上述卟啉二聚体钠盐混合物样品1g，用水溶解，湿法上样，用流动相甲醇-水（40：60）洗脱。利用重力自然流出，流速2-3ml/min。每100ml为一流分，HPLC检查，分别收集包含不同卟啉二聚体钠盐的流分。必要时再进行反复柱层析，可分别得到精制的目的化合物。

[0051] 在一个实施方案中，本发明提供了制备本发明的化合物方法，其中所述的式(4)、(5)和(6)的化合物分别是DVDME-1、DVDME-2和DVDME-3，

[0052]

**DVDME-1****DVDME-2**

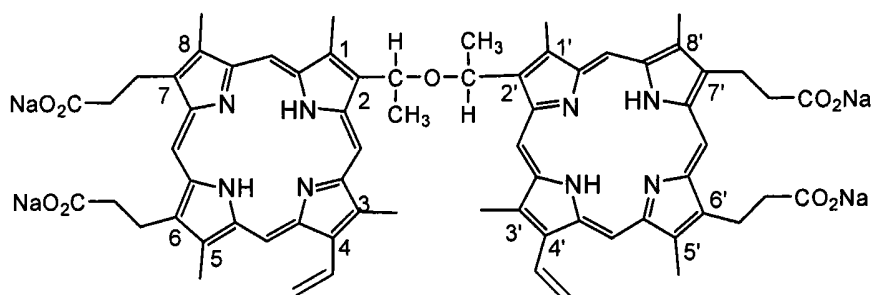
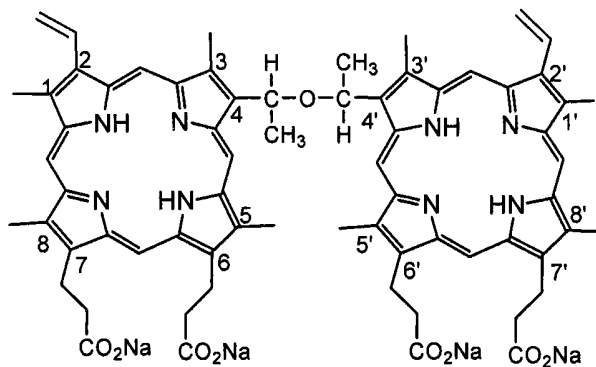
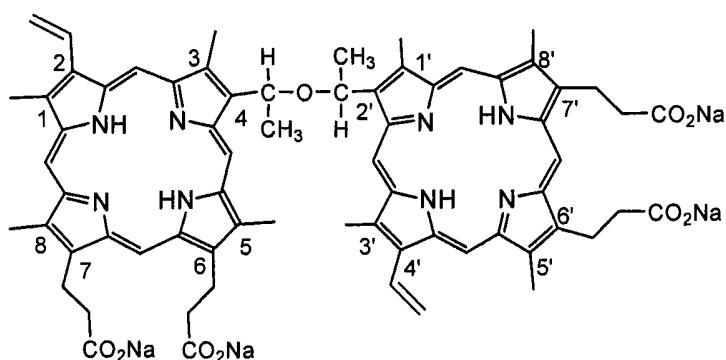
[0053]

**DVDME-3**

[0054] 所述的式 (1)、(2) 和 (3) 的化合物分别是 DVDMS-1、DVDMS-2 和 DVDMS-3,

[0055]



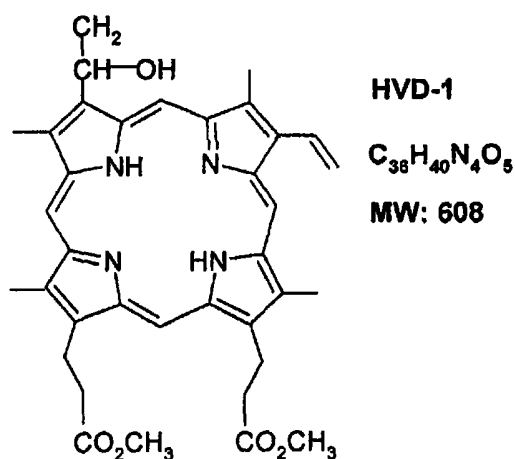
**DVDMS-1****DVDMS-2****DVDMS-3**

[0056] 就该反应而言,步骤 a) 中所用的溶剂优选是甲醇、乙醇、四氢呋喃、丙酮或它们的混合物,更优选四氢呋喃;步骤 b) 中所用的氢氧化钠水溶液可以是任何适宜的浓度,例如 0.01mol/L 至饱和浓度的水溶液,例如 0.02mol/L、0.05mol/L、0.1mol/L、0.2mol/L、0.5mol/L、1mol/L 的水溶液,优选 0.1mol/L 的水溶液。

[0057] 例如, DVDMS-1、DVDMS-2 和 DVDMS-3 可以按照流程图 1-3 中所示的方法来制备。

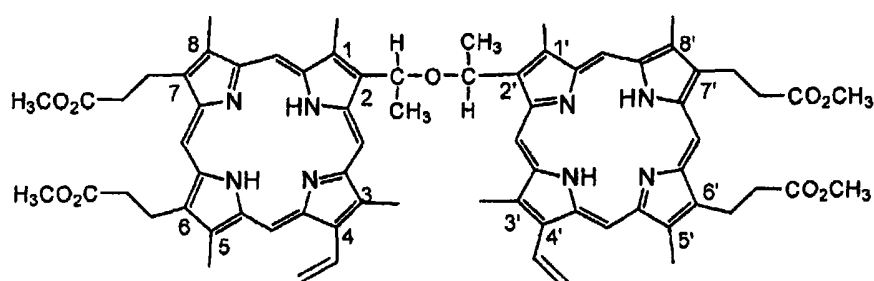
[0058] 流程图 1

[0059]



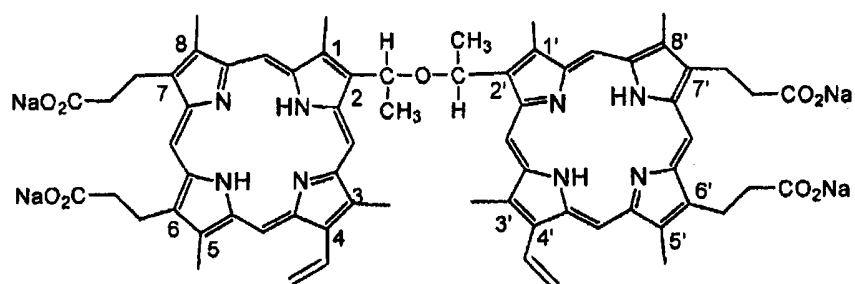
2-(1-羟乙基)-6,7-二[2-(甲氧基羰基)乙基]-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基卟啉 (I)

$HBr/CH_2Cl_2$



二[1-[6,7-二[2-(甲氧基羰基)乙基]-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-吡吩-2-基]乙基]醚

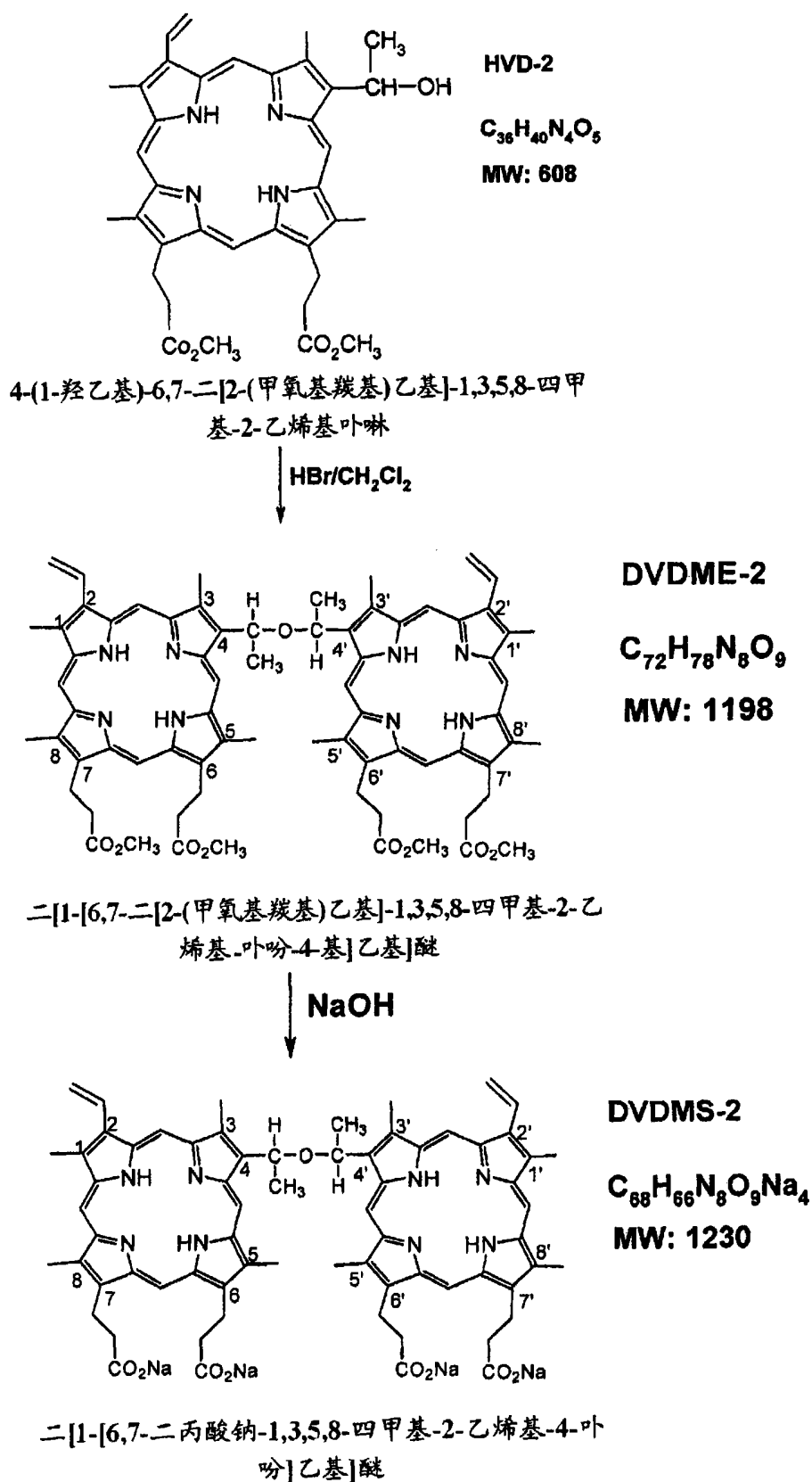
$NaOH$



二[1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚

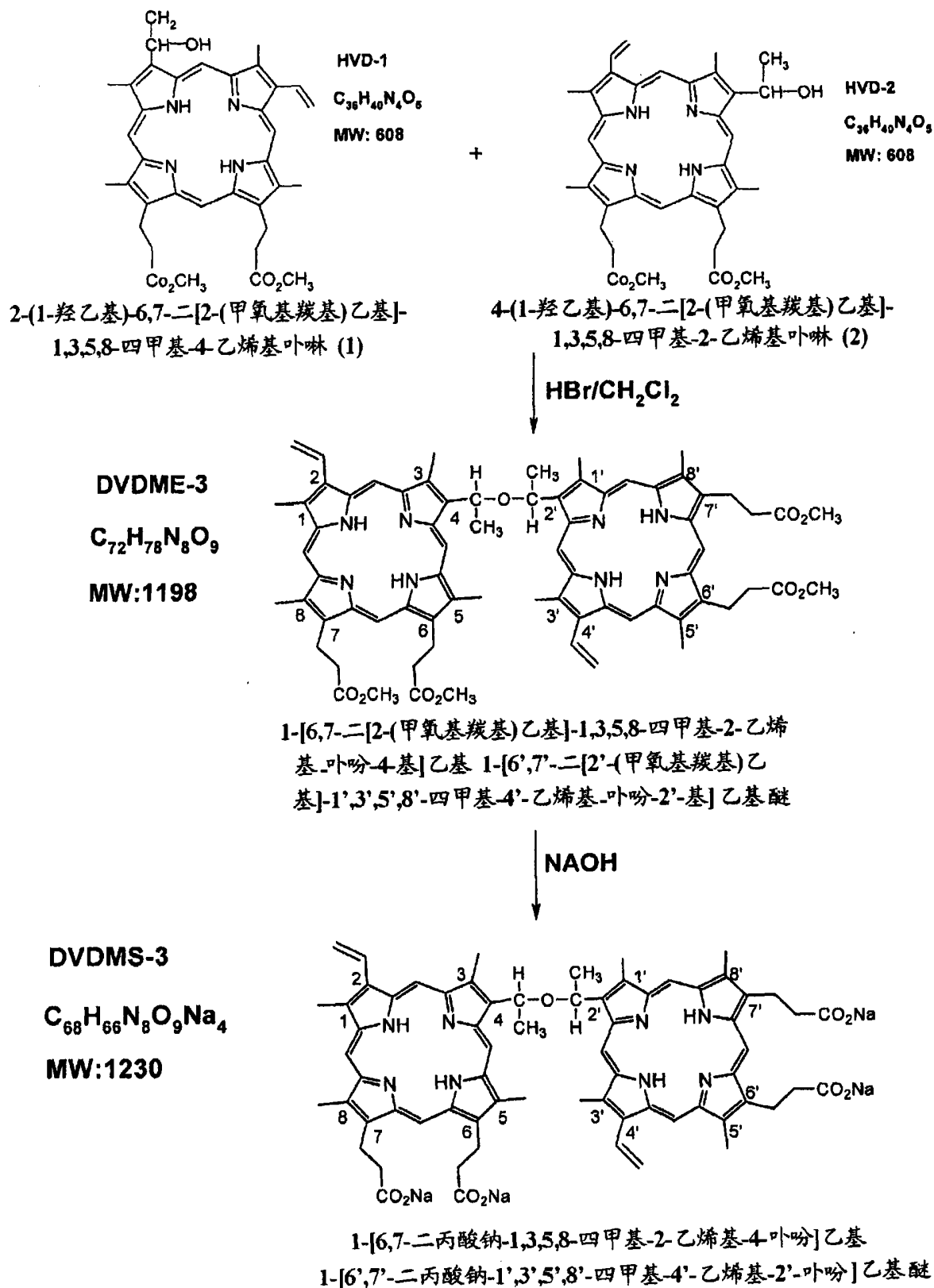
[0060] 流程图 2

[0061]



[0062] 流程图 3

[0063]



[0064] 另一方面,本发明提供了一种用于光动力疗法的药物组合物,其包含本发明的化合物或本发明的混合物,并且任选地包含一种或多种可药用的赋形剂。

[0065] 与现有技术的组合物例如 PHOTOFRIN 和喜泊分相比,本发明的组合物具有突出的优点。PHOTOFIRIN 和喜泊分都是 8 个以上卟啉类化合物的混合物 (PHOTOFIRIN 的 HPLC 图谱如图 17 所示,喜泊分的 HPLC 图谱如图 18 所示),其中占总量 95% 以上的成分均是抗肿瘤

光动力活性很低的卟啉化合物,包括血卟啉、羟乙基乙烯基次卟啉、原卟啉等,而高活性的卟啉二聚体盐则包含在占总量不到 5%的“杂质”中,所以药物整体效价低且质量不稳定。同时,主要成分血卟啉又有较高的皮肤光毒性,因此患者用药后避光时间长达 4-6 周,给患者的生活造成极大困扰,导致顺应性差。与此相反,本发明的化合物和混合物不仅是更有效的、毒性更低的抗癌光敏剂,而且可以用 HPLC 方法进行准确检测和定量,这使得本发明的组合物克服了现有市售光敏剂的上述缺陷,为有需要的患者提供了一种高效、低毒、质量可控的新药物。

[0066] 另一方面,本发明提供了本发明的化合物或本发明的混合物在制备药物中的用途,所述药物用作光动力疗法的光敏剂。

[0067] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明的化合物或本发明的混合物在制备药物中的用途,所述药物用作光动力疗法的光敏剂用于治疗或诊断恶性肿瘤、癌前病变或良性病变。更具体而言,所述药物可用于治疗或诊断:恶性肿瘤,例如实体瘤,如膀胱癌、食管癌、支气管癌、口腔颌面部癌、鼻咽癌、肋膜间皮瘤、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、阴茎癌、宫颈癌、乳腺癌及乳腺癌切除术后皮下转移结节、肛周肿瘤及肛周肿瘤扩大切除术后癌残留、卡波西肉瘤、肺癌、胃癌、胆管癌、前列腺癌、黑色素瘤和脑肿瘤;癌前病变,例如巴雷特氏食管、口腔粘膜白斑等;良性病变,例如老年性眼底黄斑病变、动脉粥样硬化斑块、类风湿性关节炎、皮肤微血管畸形、牛皮癣、红斑狼疮皮损等。

[0068] 另一方面,本发明提供了治疗或诊断个体的恶性肿瘤、癌前病变或良性病变的方法,其包括给所述个体施用有效量的本发明的化合物或本发明的混合物或其药物组合物,并施以有效量的特定波长的光照射。

[0069] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗或诊断个体的恶性肿瘤、癌前病变或良性病变的方法,其中所述恶性肿瘤是例如实体瘤,如膀胱癌、食管癌、支气管癌、口腔颌面部癌、鼻咽癌、肋膜间皮瘤、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、阴茎癌、宫颈癌、乳腺癌及乳腺癌切除术后皮下转移结节、肛周肿瘤及肛周肿瘤扩大切除术后癌残留、卡波西肉瘤、肺癌、胃癌、胆管癌、前列腺癌、黑色素瘤、脑肿瘤等;所述癌前病变是例如巴雷特氏食管、口腔粘膜白斑等;所述良性病变是例如老年性眼底黄斑病变、动脉粥样硬化斑块、类风湿性关节炎、皮肤微血管畸形、牛皮癣、红斑狼疮皮损等。

[0070] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了治疗和诊断个体的恶性肿瘤、癌前病变或良性病变的方法,其中所述个体是人。

[0071] 另一个方面,本发明提供了一种药盒,其包含本发明的化合物或本发明的混合物以及将本发明的化合物或本发明的混合物作为光敏剂用于光动力疗法的说明书。

[0072] 在一个实施方案中,本发明提供了一种药盒,其包含本发明的化合物或本发明的混合物的溶液以及将本发明的化合物或本发明的混合物作为光敏剂用于光动力疗法的说明书。

[0073] 在一个实施方案中,本发明提供了一种药盒,其包含本发明的化合物或本发明的混合物的冻干制剂;用于将所述冻干制剂进行重新配制以进行施用的溶剂,例如注射用水或注射用 5% 葡萄糖溶液;以及将本发明的化合物或本发明的混合物作为光敏剂用于光动力疗法的说明书。

[0074] 另一方面,本发明提供了一种检测本发明的化合物或本发明的混合物的高效液相

色谱方法,其特征在于使用反相色谱柱,检测波长为 400nm,流动相是甲醇和 1%醋酸水溶液。

**[0075] 定义**

**[0076]** 本文所用的术语“C<sub>1-6</sub> 烷基”意指具有 1 至 6 个碳原子的支链或直链的一价饱和烃基。优选 C<sub>1-4</sub> 烷基。其实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基和正己基等。

**[0077]** 本文所用的术语“C<sub>2-6</sub> 链烯基”意指具有 2 至 6 个碳原子的包含一个或多个双键的直链或支链一价不饱和烃基。优选 C<sub>2-4</sub> 链烯基。其实例包括但不限于乙烯基、丙-1-烯基、烯丙基、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-1,4-二烯基等。

**[0078]** 本文所用的术语“C<sub>2-6</sub> 炔基”意指具有 2 至 6 个碳原子的包含一个或多个三键的直链或支链一价不饱和烃基。优选 C<sub>2-4</sub> 炔基。其实例包括但不限于乙炔基、丙-1-炔基、丙-2-炔基、丁-1-炔基、戊-1-炔基、戊-1,3-二炔基等。

**[0079]** 本文所用的术语“C<sub>1-6</sub> 烷氧基”意指基团 R'-O-,其中 R' 是上文所定义的 C<sub>1-6</sub> 烷基。优选 C<sub>1-4</sub> 烷氧基。其实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、异戊氧基、新戊氧基和正己氧基等。

**[0080]** 本文所用的术语“C<sub>1-6</sub> 酰基”意指基团 R'-C(O)-,其中 R' 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的支链或直链的一价饱和烃基。优选 C<sub>1-4</sub> 酰基。其实例包括但不限于甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基和己酰基等。

**[0081]** “任选”或“任选地”意指随后所述的事件或情况可以发生但是不必发生,该描述包括该事件或情况发生的情形和不发生的情形。例如,“C<sub>1-6</sub> 烷基……,其任选地被一个或多个选自卤素和羟基的取代基取代”意指可以被、但不必须被一个或多个卤素和/或羟基所取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基,该描述包括未取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基和被一个或多个卤素和/或羟基取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基。

**[0082]** 本文所用的术语“卤素”意指氟、氯、溴和碘,优选氟、氯和溴,更优选氟和氯。

**[0083]** 本文所用的术语“羟基”意指基团 -OH。

**[0084]** 本文所用的术语“化合价数”意指化学元素的 1 个原子所形成的共用电子对数。离子的化合价数等于其电荷数。例如,碱金属以及 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的化合价数是 1,碱土金属的化合价数是 2。

**[0085]** 本文所用的术语“溶剂合物”意指溶剂分子与本文所述的以醚键结合的卟啉二聚体盐通过相互吸引力加合在一起所形成的溶剂加成形式。如果溶剂是水,则所形成的溶剂合物是水合物,如一水合物或二水合物;如果溶剂是醇,所形成的溶剂合物是醇合物,如与甲醇或乙醇的加成形式。

**[0086]** 本文所用的术语“个体”意指动物,包括哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物意指哺乳动物类的任何成员,包括但不限于人、非人灵长类动物(如黑猩猩和其它猿类和猴类)、农场动物(如牛、马、绵羊、山羊和猪)、家养动物(如兔、犬和猫)、实验室动物(包括啮齿类动物,如大鼠、小鼠和豚鼠)等。非哺乳动物的实例包括但不限于鸟类等。

**[0087]** 本文所用的术语“有效量”意指本发明的化合物或本发明的混合物产生研究人员或临床医师所寻求或期望的生物学或医学响应的量。

**[0088]** 本文所用的术语“药盒”意指任何商业包装,其包含用于盛放本发明的化合物、本

发明的组合物或其药物组合物的容器,并且还任选地包含分开的容器如分开的小瓶或分开的铝箔包装,例如用以盛放重配溶剂。所述容器可以是本领域中已知的任何常规形状或形式,其由药学上可接受的材料制成。

[0089] 本文所用的术语“治疗”包括:

[0090] (i) 预防疾病,即,使疾病的临床症状在可能罹患该疾病但尚未感受到或显示出该疾病症状的个体中不发生,

[0091] (ii) 抑制疾病,即,阻止疾病或其临床症状的发展,或者

[0092] (iii) 减轻或治愈疾病,即,使疾病或其临床症状暂时性或永久性消退。

[0093] 本文所用的术语“可药用的赋形剂”表示这样的物质,其可用于制备药物组合物,一般是安全的、无毒的、在生物学或其它方面没有不希望的性质,包括在兽医学以及人药用上可接受的赋形剂。

[0094] 本文所用的术语“基本由……组成”(例如,“基本由 DVDMS-1、DVDMS-2 和 DVDMS-3 组成”)意指除了所述组分以外所述混合物不包含对其基本特性产生显著影响的物质。例如,意指以干重计算所述组分占混合物总重的至少 70% w/w,例如至少 80% w/w,至少 90% w/w,至少 95% w/w,至少 98% w/w,至少 99% w/w。

[0095] 本文所用的术语“低级链烷醇”意指被一个羟基取代的包含 1-7 个碳原子、优选包含 1-4 个碳原子、更优选包含 1-3 个碳原子、特别是 1-2 个碳原子的直链或支链的饱和烷烃。

[0096] 本说明书中没有详细定义的其他术语具有本领域技术人员所知的常规含义。

[0097] 剂量和施用

[0098] 本发明的化合物或本发明的混合物可以被配制成任何适宜的盖仑形式并且可通过任何适宜的途径被施用。本发明的化合物和本发明的混合物可以被配制成溶液、混悬剂、乳剂、冻干制剂等用于注射(例如动脉内、静脉内、肌内、皮下、腹膜内注射等)或输注施用,被配制成片剂、溶液、胶囊剂等用于口服施用,被配制成软膏剂、乳膏剂、栓剂、贴剂等用于局部施用,被配制成气雾剂、喷雾剂、粉末等用于吸入施用。优选的施用方式一般是注射/输注、口服和局部施用。注射/输注施用可使得本发明的化合物快速达到分布平衡,例如在 24 小时内达到分布平衡。

[0099] 将本发明的化合物或本发明的混合物配制成盖仑形式的方法和赋形剂均是本领域技术人员熟知的常规方法和已知赋形剂。例如,关于这些盖仑形式以及适合的赋形剂可参见:罗明生、高天惠主编,《药剂辅料大全》,第 2 版,四川科学技术出版社。制剂领域的技术人员可以在本说明书的教导范围内对制剂进行调整,以提供各种制剂用于特定的施用途径,而不使本发明的化合物或本发明的混合物不稳定或者损害它们的治疗活性。

[0100] 一般而言,对于动物例如人,本发明的化合物或本发明的混合物的有效量为 0.01-5mg/kg 体重,优选 0.05-4mg/kg 体重,更优选 0.1-2mg/kg 体重,更优选 0.2mg-1mg/kg 体重。但是,应当理解的是,本发明的化合物或本发明的混合物的有效量将由研究人员或临床医师根据合理医学判断来确定。具体的有效量将取决于许多因素,例如,所治疗的疾病的种类和严重程度;所用的具体化合物;所用的治疗光波长、光能流率和照射时间;患者的年龄、体重、一般健康状况;治疗的持续时间;合并用药;以及医学领域中众所周知的其它因素。在某些情况下,有效量可能高于上述范围的上限或低于上述范围的下限。

[0101] 本发明的化合物或本发明的混合物可以与本领域中已知的任何与血卟啉类光敏剂匹配的激发光源配合使用,例如英国 DIOMED 公司制造的 DIOMED 630 PDT 治疗机。就本发明而言,照射波长优选为  $631 \pm 3\text{nm}$ ,例如 630nm、631nm 或 632nm。

#### 附图说明

[0102] 图 1 是原卟啉二甲酯的 HPLC 图谱。

[0103] 图 2 是 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次卟啉二甲酯 (HVD-M,即 HVD-1 和 HVD-2 的混合物) 的 HPLC 图谱。

[0104] 图 3 是分离精制后的 2-(1-羟乙基)-4-乙烯基次卟啉二甲酯 (HVD-1) 的 HPLC 图谱。

[0105] 图 4 是分离精制后的 4-(1-羟乙基)-2-乙烯基次卟啉二甲酯 (HVD-2) 的 HPLC 图谱。

[0106] 图 5 是以醚键结合的卟啉二聚体甲酯三个异构体的混合物 (DVDME-M,即 DVDME-1、DVDME-2 和 DVDME-3 的混合物) 的 HPLC 图谱。

[0107] 图 6 是二 [1-[6,7-二丙酸甲酯-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚 (DVDME-1) 的 HPLC 图谱。

[0108] 图 7 是二 [1-[6,7-二丙酸甲酯-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚 (DVDME-2) 的 HPLC 图谱。

[0109] 图 8 是以醚键结合的卟啉二聚体钠盐混合物 (DVDMS-M,即 DVDMS-1、DVDMS-2 和 DVDMS-3 的混合物) 的 HPLC 图谱。

[0110] 图 9 是二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-1) 的 HPLC 图谱。

[0111] 图 10 是二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-1) 的冷喷雾 MS 图谱。

[0112] 图 11 是二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-2) 的 HPLC 图谱。

[0113] 图 12 是二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-2) 的冷喷雾 MS 图谱。

[0114] 图 13 是 1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4'-乙烯基-2'-吡吩]乙基醚 (DVDMS-3) 的 HPLC 图谱。

[0115] 图 14 是 1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4'-乙烯基-2'-吡吩]乙基醚 (DVDMS-3) 的冷喷雾 MS 图谱。

[0116] 图 15 是一些小鼠照片,其显示 DVDMS-1、DVDMS-2、DVDMS-3 和 DVDMS-M 在 2mg/kg 剂量下显示出强的肿瘤灭活效果,而在相同剂量下,同类光敏剂 PHOTOFRIN 和喜泊分均不产生肿瘤灭活效果。其中照片【1】显示,在组 1 中,PDT 后 48 小时,可见肿块均已消融,表面形成黑色痂膜,略下陷;照片【2】显示,在组 1 中,PDT 后 7 天,所有肿块均完全消融吸收,表面被覆黑色厚痂,无残留迹象;照片【3】显示,在组 1 中,PDT 后 14 天,10 只小鼠创面均处



修复中,未发现肿瘤残留迹象;照片【4】显示,在组 1 中,PDT 后 23 天,10 只小鼠创面接近完全修复,未发现肿瘤残留复发迹象;照片【5】显示,在组 4 中,PDT 后 7 天,所有肿瘤均继续增大,与单纯肿瘤对照组无明显差异;照片【6】显示,在组 5 中,PDT 后 7 天,所有肿瘤均继续增大,与单纯肿瘤对照组无明显差异;照片【7】显示,在组 6(单纯肿瘤对照组)中,在实验组 PDT 后 7 天,肿瘤自然生长的情况。

[0117] 图 16 是一些小鼠照片,其显示剂量为 2mg/kg 的 DVDMS-M 比剂量为 20mg/kg 的 PHOTOFRIN 和喜泊分具有更佳的肿瘤灭活效果。其中照片【8】显示,在组 9 中,当用药剂量为组 8 的 10 倍时,亦获得很好的肿瘤灭活效果,在 PDT 后 23 天,10 只小鼠创面大部已修复,未发现肿瘤残留复发迹象;照片【9】显示,在组 10 中,当用药剂量为组 8 的 10 倍时,亦获得较好的肿瘤灭活效果,在 PDT 后 23 天,多数小鼠创面已修复,其中仅 2 只(3# 和 8#) 明显可见肿瘤残留复发。

[0118] 图 17 是 PHOTOFRIN 的 HPLC 图谱。保留时间为 9.5&10.2 分钟的吸收峰是血卟啉(HP);保留时间为 20.0&22.1 分钟的吸收峰是次卟啉(HVD-1 和 HVD-2);保留时间为 36.7 分钟的吸收峰是原卟啉(PP);保留时间在 39.0 分钟以后的几个很小吸收峰是卟啉二聚体羧酸(是通过 LC/MS 鉴定的)。

[0119] 图 18 是喜泊分的 HPLC 图谱。保留时间为 9.4&9.8 分钟的吸收峰是血卟啉(HP);保留时间为 19.7&21.8 分钟的吸收峰是次卟啉(HVD-1 和 HVD-2);保留时间为 36.0 分钟的吸收峰是原卟啉(PP);在 36.0 分钟以后基本上看不到吸收峰,要加大 2-3 倍进样量才能见到卟啉二聚体羧酸的很小吸收峰,这就是为什么喜泊分的效价不如 PHOTOFRIN 的原因。

## 具体实施方式

[0120] 下文提供了本发明的化合物的一些实例及其制备方法。提供这些实例和制备方法的目的在于使本领域技术人员能够更加清楚地理解和实施本发明,而不是限制本发明的范围。

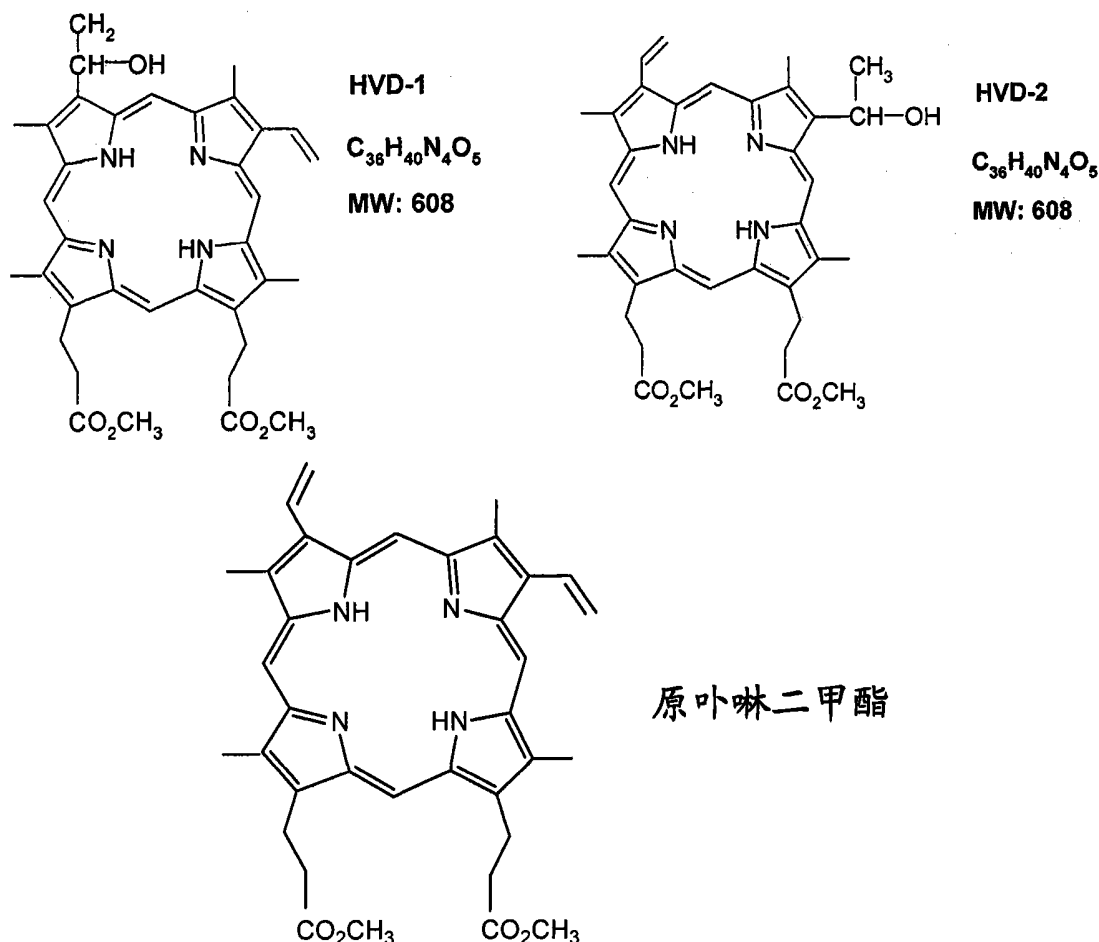
[0121] 实施例 1

[0122] 以醚键结合的卟啉二聚体盐的制备

[0123] 一. 2-(1-羟乙基)-4-乙烯基次卟啉二甲酯(2-(1-hydroxyethyl)-4-vinyl-deuteroporphyrin dimethyl ester,HVD-1)和 4-(1-羟乙基)-2-乙烯基次卟啉二甲酯(4-(1-hydroxyethyl)-2-vinyldeuteroporphyrin dimethyl ester,HVD-2)的制备和分离精制

[0124] 1. 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次卟啉二甲酯(2(4)-(1-hydroxyethyl)-4(2)-vinyl-deuteroporphyrin dimethyl ester,HVD-M)的制备

[0125]



[0126] 盐酸 500ml, 加原叶啉二甲酯 (其 HPLC 图谱如图 1 所示) 100g, 搅拌使全部溶解, 在 25℃ 水浴上搅拌反应 6 小时, 均速加入 20% 氢氧化钠溶液 2800ml, 溶液的 pH 值应为 13。静置反应 1 小时, 加醋酸 500ml, pH 4-5, 再反应 30 分钟, 抽滤, 滤渣用水洗涤后, 抽干, 置于干燥器中干燥, 得棕色固体 95g。

[0127] 将上述棕色固体 95g, 加 5% 硫酸甲醇溶液 1000ml, 在室温搅拌反应 30 分钟后, 加  $(NH_4)_2CO_3$  中和至 pH 7, 减压浓缩, 浓缩液用二氯甲烷提取, 提取液用适量水洗, 加无水硫酸钠脱水后, 过滤, 减压回收二氯甲烷得原叶啉衍生物二甲酯。

[0128] 原叶啉衍生物二甲酯加适量丙酮溶解, 加层析用硅胶 300g 拌匀, 挥去丙酮, 将此硅胶干粉均匀地加到已准备好的硅胶色谱柱 (1600g 硅胶, 200-400 目, 预先加 0.2% 甲醇二氯甲烷溶液平衡) 的柱顶。然后加 0.2% 甲醇二氯甲烷溶液进行层析, 按 200ml/份收集流份, 同时用 HPLC 检测 (见实施例 2) 每一流份中 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次叶啉二甲酯的总百分含量, 低于 90% 纯度的 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次叶啉二甲酯可用异丙醇、丙酮进行精制。2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次叶啉二甲酯的 HPLC 如图 2 所示。

[0129] 2. HVD-1 和 HVD-2 的分离精制

[0130] 称取 1000g 硅胶 (细度 160-200 目) 加适量二氯甲烷搅拌均匀, 装入直径为 60mm 的玻璃层析柱。另称取 50g 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次叶啉二甲酯, 加适量二氯甲烷溶解, 湿法上样, 用二氯甲烷作流动相, 收集流分并用 TLC 和 HPLC 检测, 可分别得到:

[0131] 2-(1-羟乙基)-4-乙烯基次叶啉二甲酯 (HVD-1):  $^1H$ NMR ( $\delta$ , ppm): 10.23, 10.09 (each s, 1H, 2meso H); 9.89 (s, 2H, 2meso H); 8.27 (m, 1H,  $CH=CH_2$ ); 6.35, 6.19 (each

d, 1H, CH = CH<sub>2</sub>) ; 6. 18 (q, 1H, CH(OH)CH<sub>3</sub>) ; 4. 30 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 3. 67 (s, 6H, 2CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 3. 58, 3. 49 (each s, 3H, 2CH<sub>3</sub>) ; 3. 51 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>) ; 3. 22 (t, 4H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2. 08 (d, 3H, CH(OH)CH<sub>3</sub>). HRMS : C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 计算值 : 609. 3136 (M+1), 实测值 : 609. 3163 (M+1)。以上数据与文献报道一致。

[0132] 4-(1-羟乙基)-2-乙烯基次卟啉二甲酯 (HVD-2) : <sup>1</sup>HNMR (δ, ppm) : 10. 21, 10. 04, 9. 96, 9. 94 (each s, 1H, meso H) ; 8. 21 (m, 1H, CH = CH<sub>2</sub>) ; 6. 36, 6. 18 (each d, 1H, CH = CH<sub>2</sub>) ; 6. 23 (q, 1H, CH(OH)CH<sub>3</sub>) ; 4. 36 (m, 2H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 3. 68 (s, 9H, 2CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 和 1CH<sub>3</sub>) ; 3. 56, 3. 53, 3. 45 (each s, 3H, 3CH<sub>3</sub>) ; 3. 25 (t, 4H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2. 10 (d, 3H, CH(OH)CH<sub>3</sub>). HRMS : C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 计算值 : 609. 3136 (M+1), 实测值 : 609. 3112 (M+1)。以上数据与文献报道一致。

[0133] HVD-1 的 HPLC 保留时间 : 29 分钟, 纯度 : 94% ; HVD-2 的 HPLC 保留时间 : 31 分钟, 纯度 : 96%。HVD-1 和 HVD-2 的 HPLC 图谱分别如图 3 和图 4 所示。

[0134] 二. 以醚键结合的卟啉二聚体甲酯的制备

[0135] 1. 以醚键结合的卟啉二聚体甲酯混合物 (DVDME-M) 的制备

[0136] 5g 2(4)-(1-羟乙基)-4(2)-乙烯基次卟啉二甲酯溶于 300ml 无水二氯甲烷, 加溴化氢气体饱和的二氯甲烷溶液 100ml, 摇匀后, 立即加塞密闭放置于暗处进行聚合反应。可采用加水方法终止反应, 分出二氯甲烷溶液, 用水洗涤, 加无水硫酸钠脱水, 减压回收二氯甲烷, 反应产物采用硅胶色谱柱进行分离精制。

[0137] 称取 200-300 目的硅胶, 用量是待分离样品量的 50 倍, 用丙酮-二氯甲烷 (1 : 60) 洗脱可先后得到以醚键结合的卟啉二聚体甲酯的三个异构体的混合物。DVDME-M 的 HPLC 图谱如图 5 所示。

[0138] 2. 二 [1-[6,7-二丙酸甲酯-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚 (DVDME-1) 的制备

[0139] 5g 2-(1-羟乙基)-4-乙烯基次卟啉二甲酯溶于 300ml 无水二氯甲烷, 加溴化氢气体饱和的二氯甲烷溶液 100ml, 摇匀后, 立即加塞密闭放置于暗处进行聚合反应。可采用加水方法终止反应, 分出二氯甲烷溶液, 用水洗涤, 加无水硫酸钠脱水, 减压回收二氯甲烷, 反应产物采用硅胶色谱柱进行分离精制。

[0140] 称取 200-300 目的硅胶, 用量是待分离样品的 50 倍, 用丙酮-二氯甲烷 (1 : 60) 洗脱可得二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙烯基-2-吡吩]乙基]醚 (DVDME-1)。经 UV、<sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR、MS 和 HRMS 检测, 数据与文献上报到的光谱数据相符。HPLC 保留时间 : 62 分钟, 纯度 : 98%。DVDME-1 的 HPLC 图谱如图 6 所示。

[0141] 3. 二 [1-[6,7-二丙酸甲酯-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚 (DVDME-2) 的制备

[0142] 5g 4-(1-羟乙基)-2-乙烯基次卟啉二甲酯溶于 300ml 无水二氯甲烷, 加溴化氢气体饱和的二氯甲烷溶液 100ml, 摇匀后, 立即加塞密闭放置于暗处进行聚合反应。可采用加水方法终止反应, 分出二氯甲烷溶液, 用水洗涤, 加无水硫酸钠脱水, 减压回收二氯甲烷, 反应产物采用硅胶色谱柱进行分离精制。

[0143] 称取 200-300 目的硅胶, 用量是待分离样品的 50 倍, 用丙酮-二氯甲烷 (1 : 60) 洗脱可得二 [1-[6,7-二丙酸甲酯-1,3,5,8-四甲基-2-乙烯基-4-吡吩]乙基]醚 (DVDME-2)。经 UV、<sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR、MS 和 HRMS 检测, 数据与文献上报到的光谱数据相符。HPLC

保留时间 :64 分钟,纯度 :94%。DVDME-2 的 HPLC 图谱如图 7 所示。

[0144] 三. 以醚键结合的卟啉二聚体钠盐的制备

[0145] 1. 以醚键结合的卟啉二聚体钠盐混合物 (DVDMS-M) 的制备

[0146] 5g 以醚键结合的卟啉二聚体甲酯混合物加 600ml 四氢呋喃使全部溶解,加 400ml 0.1mol/L 氢氧化钠水溶液,充分摇匀,避光放置过夜,减压蒸去四氢呋喃水溶液。将干燥的反应产物装入回流洗脱器中,加适量无水乙醇回流洗脱以除去剩余的氢氧化钠及其它杂质。得精制的以醚键结合的卟啉二聚体钠盐混合物。HPLC 检测结果共有三个吸收峰,它们的 HPLC 保留时间分别为 36、43、46 分钟。DVDMS-M 的 HPLC 图谱如图 8 所示。

[0147] 2. 二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙烯基 -2-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-1) 的制备

[0148] 50mg 二 [1-[6,7-二丙酸甲酯 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙烯基 -2-吡吩]乙基]醚加 6ml 四氢呋喃使全部溶解,加 4ml 0.1mol/L 氢氧化钠水溶液,充分摇匀,在 60℃ 油浴上避光加热回流 6 小时,减压蒸去四氢呋喃水溶液。将干燥的反应产物装入回流洗脱器中,加适量无水乙醇回流洗脱以除去剩余的氢氧化钠及其它杂质。得精制的目的化合物 DVDMS-1。HPLC 保留时间 :36 分钟,纯度 :98%。DVDMS-1 的 HPLC 图谱如图 9 所示。

[0149] 冷 喷 雾 MS  $m/z$  :1253.17  $[M+Na]^+$ , 1209.20  $[M+2H-Na]^+$ , 1187.22  $[M+3H-2Na]^+$ , 1165.26  $[M+4H-3Na]^+$ , 1143.28  $[M+5H-4Na]^+$ 。

[0150] HR-ESI-MS 在  $m/z$  1253.44211 给出准分子离子峰  $[M+Na]^+$ , 对应于分子式  $C_{68}H_{66}N_8O_9Na_4+Na$  (计算值 1253.44412), 不饱和度为 37.5。

[0151] Accutof CS 冷喷雾质谱仪 ;CSI 离子源 ;喷雾温度 :室温 ;脱溶剂温度 :250℃ ;溶剂为  $H_2O$  ;浓度 :40ng/ul。DVDMS-1 的冷喷雾 MS 图谱如图 10 所示。

[0152] 合成反应及冷喷雾 MS 和 HR-ESI-MS 的分析结果均证明 DVDMS-1 的化学结构为二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -4-乙烯基 -2-吡吩]乙基]醚。3. 二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙烯基 -4-吡吩]乙基]醚 (DVDMS-2) 的制备

[0153] 50mg 二 [1-[6,7-二丙酸甲酯 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙烯基 -4-吡吩]乙基]醚加 6ml 四氢呋喃使全部溶解,加 4ml 0.1mol/L 氢氧化钠水溶液,充分摇匀,在 80℃ 油浴上避光加热回流 8 小时,减压蒸去四氢呋喃水溶液。将干燥的反应产物装入回流洗脱器中,加适量无水乙醇回流洗脱以除去剩余的氢氧化钠及其它杂质。得精制的目的化合物 DVDMS-2。HPLC 保留时间 :43 分钟,纯度 :98%。DVDMS-2 的 HPLC 图谱如图 11 所示。

[0154] 冷 喷 雾 MS  $m/z$  :1253.18  $[M+Na]^+$ , 1231.21  $[M+H]^+$ , 1209.22  $[M+2H-Na]^+$ , 1187.24  $[M+3H-2Na]^+$ , 1165.27  $[M+4H-3Na]^+$ , 1143.29  $[M+5H-4Na]^+$ 。

[0155] HR-ESI-MS 在  $m/z$  1253.44147 给出准分子离子峰  $[M+Na]^+$ , 对应于分子式  $C_{68}H_{66}N_8O_9Na_4+Na$  (计算值 1253.44412), 不饱和度为 37.5。

[0156] Accutof CS 冷喷雾质谱仪 ;CSI 离子源 ;喷雾温度 :室温 ;脱溶剂温度 :250℃ ;溶剂为甲醇 ;浓度 :40ng/ul。DVDMS-2 的冷喷雾 MS 图谱如图 12 所示。

[0157] 合成反应及冷喷雾 MS 和 HR-ESI-MS 的分析结果均证明 DVDMS-2 的化学结构为二 [1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙烯基 -4-吡吩]乙基]醚。4. 1-[6,7-二丙酸钠 -1,3,5,8-四甲基 -2-乙烯基 -4-吡吩]乙基 1-[6',7'-二丙酸钠 -1',3',5',8'-四甲基 -4-乙烯基 -2-吡吩]乙基醚 (DVDMS-3) 的制备

[0158] 反相硅胶 C18 10g 用甲醇浸泡过夜,湿法装柱,用甲醇-水 (40 : 60) 平衡。取以醚键结合的卟啉二聚体钠盐混合物 100mg,用水溶解,湿法上样,用流动相甲醇-水 (40 : 60) 洗脱。利用重力自然流出,流速 2-3ml/min。每 100ml 为一流分, HPLC 检查,分别收集 DVDMS-1、DVDMS-2、DVDMS-3 的流分。取 DVDMS-3 流分再进行反复柱层析,可得到精制的目的化合物 DVDMS-3。HPLC 保留时间 :46 分钟,纯度 :95%。DVDMS-3 的 HPLC 图谱如图 13 所示。

[0159] 冷 喷 雾 MS  $m/z$  :1253. 19 $[M+Na]^+$ , 1231. 22 $[M+H]^+$ , 1209. 23 $[M+2H-Na]^+$ , 1143. 29 $[M+5H-4Na]^+$ 。

[0160] HR-ESI-MS 在  $m/z$  1253. 44573 给出准分子离子峰  $[M+Na]^+$ , 对应于分子式  $C_{68}H_{66}N_8O_9Na_4+Na$  (计算值 1253. 44412), 不饱和度为 37. 5。

[0161] Accutof CS 冷喷雾质谱仪 ;CSI 离子源 ;喷雾温度 :室温 ;脱溶剂温度 :250℃ ;溶剂为甲醇 ;浓度 :40ng/ul。DVDMS-3 的冷喷雾 MS 图谱如图 14 所示。

[0162] 冷喷雾 MS 和 HR-ESI-MS 的分析结果证明 DVDMS-3 的化学结构为 1-[6,7- 二丙酸钠 -1,3,5,8- 四甲基 -2- 乙烯基 -4- 吡吩 ] 乙基 1-[6',7' - 二丙酸钠 -1',3',5',8' - 四甲基 -4- 乙烯基 -2- 吡吩 ] 乙基醚。

[0163] 四 . 以醚键结合的卟啉二聚体钾盐的制备

[0164] 用与以上钠盐类似的制备方法用氢氧化钾水溶液代替氢氧化钠水溶液可制备以下化合物,分子式  $C_{68}H_{66}N_8O_9K_4$ ,  $[M+K]^+$ 1333. 9851 二 [1-[6,7- 二丙酸钾 -1,3,5,8- 四甲基 -4- 乙烯基 -2- 吡吩 ] 乙基 ] 醚,二 [1-[6,7- 二丙酸钾 -1,3,5,8- 四甲基 -2- 乙烯基 -4- 吡吩 ] 乙基 ] 醚,和 1-[6,7- 二丙酸钾 -1,3,5,8- 四甲基 -2- 乙烯基 -4- 吡吩 ] 乙基 1-[6',7' - 二丙酸钾 -1',3',5',8' - 四甲基 -4- 乙烯基 -2- 吡吩 ] 乙基醚。

[0165] 五 . 以醚键结合的卟啉二聚体铵盐的制备

[0166] 用与以上钠盐类似的制备方法用氢氧化铵水溶液代替氢氧化钠水溶液可制备以下化合物,分子式  $C_{68}H_{66}N_8O_9(NH_4)_4$ ,  $[M+NH_4]^+$ 1228. 6881 二 [1-[6,7- 二丙酸铵 -1,3,5,8- 四甲基 -4- 乙烯基 -2- 吡吩 ] 乙基 ] 醚,二 [1-[6,7- 二丙酸铵 -1,3,5,8- 四甲基 -2- 乙烯基 -4- 吡吩 ] 乙基 ] 醚,和 1-[6,7- 二丙酸铵 -1,3,5,8- 四甲基 -2- 乙烯基 -4- 吡吩 ] 乙基 1-[6',7' - 二丙酸铵 -1',3',5',8' - 四甲基 -4- 乙烯基 -2- 吡吩 ] 乙基醚。

[0167] 实施例 2

[0168] 卟啉衍生物的 HPLC 检测

[0169] 关于卟啉衍生物的 HPLC 检测文献上已有许多报道,但迄今为止,尚未见到能全面检测多种卟啉衍生物的方法,特别是对二聚体衍生物的检测。为此,我们对色谱柱的选择、流动相的组成、流速以及柱温等进行了全面的研究,总结出比较满意的 HPLC 检测方法,可用于卟啉单分子衍生物和二聚体衍生物的检测。

[0170] 1. 仪器 :Agilent 1200 Series

[0171] 2. 色谱柱 :日本资生堂 SHISEIDO Capcell  $C_{18}$ MG 4. 6mmX150mmX5  $\mu$  m

[0172] 3. 检测波长 :400nm

[0173] 4. 色谱柱温度 :30℃

[0174] 5. 流速 :1. 0mL/min

[0175] 6. 样品 :取样品配制成约 1mg/ml 的甲醇溶液,进样前先用 0. 45  $\mu$  m 尼龙微孔滤膜

过滤

[0176] 7. 进样量 : 约 20  $\mu$  L

[0177] 8. 流动相 : 甲醇和 1% 醋酸水溶液

[0178]

时间 (分)	A : 1% 醋酸水溶液 (%)	B : 甲醇 (%)
0.0	30.0	70.0
30.0	10.0	90.0
45.0	10.0	90.0
60.0	0.0	100.0
70.0	0.0	100.0
70.5	30.0	70.0
100.5	30.0	70.0

[0179] (最后 30 分钟是平衡色谱柱, 为进下一样品做准备)

[0180] 本发明中的 HPLC 图谱和数据均是用本实施例所述的色谱条件得到的。

[0181] 实施例 3

[0182] 光敏剂的光动力活性试验

[0183] 1. 材料和方法

[0184] 活体肿瘤光动力灭活实验选择 4 周龄 KM 小鼠, 在右侧臀部接种 S180 瘤株, 待肿瘤生长到直径约 6mm 时取用, 经尾静脉注射光敏剂药液, 24h 后实施肿瘤光照。

[0185] 活体皮肤光毒性反应测试选择 4 周龄 KM 小鼠, 臀部脱毛, 经尾静脉注射光敏剂药液, 24h 后实施脱毛区皮肤光照。

[0186] 光照设备为美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的医用 DIOMED630PDT 治疗仪, 激光波长  $630 \pm 3\text{nm}$ , 经末端带微透镜光纤输出激光。进行肿瘤光敏化灭活实验时, 让激光垂直投照在肿瘤上, 光斑直径 15mm, 完全覆盖肿瘤, 光功率密度  $200\text{mW}/\text{cm}^2$ 。进行皮肤光毒性反应测试时, 让激光垂直投照在脱毛区皮肤上, 光斑直径 10mm, 光功率密度  $200\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

[0187] 2. 光敏化强度评估标准

[0188] 2.1 活体肿瘤光动力灭活实验中光敏化强度评估标准

[0189] ++++ 光照后 48h, 所有肿瘤原先隆起的外表均趋于平整甚至下陷, 整个光照区几乎完全被覆黑褐色干痂, 未见肿瘤残留迹象。

[0190] +++ 光照后 48h, 所有肿瘤原先隆起的外表均趋于平整甚至下陷, 被覆黑褐色干痂, 肿瘤外光照区内的皮肤呈灰黄色, 未见肿瘤残留迹象。

[0191] ++ 光照后 48h, 直径小于 8mm 的肿瘤原先隆起的外表趋于平整, 被覆小块黑褐色干

痂,直径大于 8mm 的肿瘤仅有中心区下陷并形成黑褐色干痂,周边微隆起,外缘仍显红润,可见肿瘤残留迹象,肿瘤外光照区内的皮肤呈暗红色。

[0192] +光照后 48h,多数肿瘤未能完全灭活,直径大于 8mm 的肿瘤残留更明显,仅在中心区略有下陷,边缘仍隆起且潮红,肿瘤外光照区内的皮肤略微发红。

[0193] -光照后 48h,肿瘤仍继续生长,与单纯肿瘤组比较未见差异。

[0194] 2.2 活体皮肤光毒性反应测试中皮肤损伤程度的评估标准:

[0195] ++++光照后 48h,光照区内的皮肤呈黑褐色。

[0196] +++光照后 48h,光照区内的皮肤呈灰黄色。

[0197] ++光照后 48h,光照区内的皮肤呈暗红色。

[0198] +光照后 48h,光照区内的皮肤略显潮红。

[0199] -光照后 48h,光照区内的皮肤与光照区外的皮肤比较未见差异。

[0200] 3. 肿瘤光动力灭活效果

[0201] 试验结果如表 1-3 所示。

[0202] 表 1

[0203]

实验 编组	试样 名称	小鼠 只数	药剂量 (mg/kg)	光波长 (nm)	光剂量 (J/cm <sup>2</sup> )	光敏化 强度	PDT 后残留复发(只)		
							1 周	3 周	5 周
1	DVDMS-1	10	2	630	60	++++	0	(抑瘤率~100%)	
2	DVDMS-2	10	2	630	60	++++	0	(抑瘤率~100%)	
3	DVDMS-3	10	2	630	60	++++	0	(抑瘤率~100%)	
4	DVDMS-M	10	2	630	60	++++	0	(抑瘤率~100%)	
5	PHOTOFRIN	10	2	630	60	-	10	(抑瘤率~0%)	
6	喜泊分	10	2	630	60	-	10	(抑瘤率~0%)	
7	(单纯肿瘤)	10	-	-	-	-	10		

[0204] \* DVDMS-1-二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙基-2-吡吩]乙基]醚

[0205] DVDMS-2-二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙基-4-吡吩]乙基]醚

[0206] DVDMS-3-1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙基-4-吡吩]乙基-1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4'-乙基-2'-吡吩]乙基醚

[0207] DVDMS-M-三个异构体的混合物:二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-4-乙基-2-吡吩]乙基]醚;二 [1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙基-4-吡吩]乙基]醚和 1-[6,7-二丙酸钠-1,3,5,8-四甲基-2-乙基-4-吡吩]乙基-1-[6',7'-二丙酸钠-1',3',5',8'-四甲基-4'-乙基-2'-吡吩]乙基醚

[0208] PHOTOFRIN 批号 301A7-04;喜泊分批号 070401。

[0209] 表 1 中的结果显示, DVDMS-1、DVDMS-2、DVDMS-3 和 DVDMS-M 的抗肿瘤光动力活性十分接近,在 2mg/kg 剂量下均显示出强的肿瘤灭活效果,而在相同剂量下,同类光敏剂 PHOTOFRIN 和喜泊分均不产生肿瘤灭活效果。图 15 以照片的形式给出了更直观的结果。

[0210] 表 2

[0211]

实验 编组	试样 名称	小鼠 只数	药剂量 (mg/kg)	光波长 (nm)	光剂量 (J/cm <sup>2</sup> )	光敏化 强度	PDT 后残留复发(只)		
							1 周	3 周	5 周
8	DVDMS-M	10	2	630	60	++++	0	0	0
9	PHOTOFRIN	10	20	630	60	++++	0	0	2
10	喜泊分	10	20	630	60	++++	0	2	3

[0212] \* PHOTOFRIN 批号 301A7-04 ;喜泊分批号 070401。

[0213] 表 2 中的结果显示,剂量为 2mg/kg 的 DVDMS-M 比剂量为 20mg/kg 的 PHOTOFRIN 和喜泊分肿瘤灭活效果更佳。图 16 以照片的形式给出了更直观的结果。

[0214] 表 3

[0215]

实验 编组	试样 名称	小鼠 只数	药剂量 (mg/kg)	光波长 (nm)	光剂量 (J/cm <sup>2</sup> )	光敏化 强度	PDT 后残留复发(只)		
							1 周	3 周	5 周
11	HP	10	20	630	60	+	10	(抑瘤率~0%)	
12	HVD-1	10	20	630	60	-	10	(抑瘤率~0%)	
13	HVD-2	10	20	630	60	+	10	(抑瘤率~0%)	
14	HVD-M	10	20	630	60	-	10	(抑瘤率~0%)	
15	PP	10	20	630	60	-	10	(抑瘤率~0%)	
16	(单纯肿瘤)	10	-	-	-	-	10		

[0216] 注 :HP 是血卟啉,HVD-M 是 HVD-1 和 HVD-2 的混合物,PP 是原卟啉

[0217] 表 3 中的结果显示,PHOTOFRIN 或喜泊分的主要成分 HP、HVD-1、HVD-2、HVD-M、PP 活性很低或无活性。

[0218] 4. 皮肤光毒性反应测试

[0219] 皮肤光毒性反应测试的结果(见表 4)显示,在肿瘤有效灭活剂量使用条件下,DVDMS-M 对皮肤的光毒性明显小于喜泊分。即当光照时机随着给药后时间的加长,DVDMS-M 组相对于喜泊分组,光照所导致的皮肤损伤迅速变轻,这同时意味着 DVDMS-M 的运用,将仅需要较短的避光周期。

[0220] 表 4

[0221]

小鼠 编号	试样名称	药剂量 (mg/kg)	光波长 (nm)	光剂量		光照时机 给药后(h)	皮肤损伤 程度
				(mW/cm <sup>2</sup> )	(J/cm <sup>2</sup> )		
1	DVDMS-M	2	630	200	60	24	++++
2	DVDMS-M	2	630	200	60	48	++
3	DVDMS-M	2	630	200	60	72	+
4	DVDMS-M	2	630	200	60	96	-
5	喜泊分	20	630	200	60	24	++++
6	喜泊分	20	630	200	60	48	++++
7	喜泊分	20	630	200	60	72	+++
8	喜泊分	20	630	200	60	96	+++

[0222] \*喜泊分批号 070401。



[0223] \*\*两种试样的药剂量和光剂量设计,同为肿瘤有效灭活剂量(见表2),即荷瘤小鼠给药后24h实施光照,均可实现10mm直径肿瘤++++级反应强度。

[0224] 5. DVDME-2 和 DVDMS-2 的肿瘤光动力灭活效果比较

[0225] 为了解以醚键结合的卟啉二聚体甲酯和以醚键结合的卟啉二聚体钠盐对活体肿瘤的光动力灭活效果,选用 DVDME-2 和 DVDMS-2 二个样品进行了对比试验。结果(见表5)显示,以醚键结合的卟啉二聚体钠盐 DVDMS-2 对活体肿瘤的光动力灭活作用明显强于其对应的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯 DVDME-2。

[0226] 表5

[0227]	实验 编组	试样 名称	小鼠 只数	药剂量 (mg/kg)	光波长 (nm)	光剂量 (J/cm <sup>2</sup> )	光敏化 强度
	1	DVDME-2	6	2	630	60	++
	2	DVDMS-2	6	2	630	60	++++

[0228] 注: DVDME-2 样品无法直接溶解于水,须先以少量二甲亚砜预溶,再用含1%吐温20的5%葡萄糖注射液稀释。

[0229] 表5中的结果显示,本发明的 DVDMS-2 的肿瘤光动力灭活作用明显强于其对应的以醚键结合的卟啉二聚体甲酯。

[0230] 实施例4

[0231] 以醚键结合的卟啉二聚体钠盐注射用冻干剂的制备

[0232] 称取一定量的以醚键结合的卟啉二聚体钠盐原料,置于避光玻璃容器中,加注射用水溶解,使浓度为5mg/ml。经不锈钢滤菌过滤器加压过滤,先通过孔径0.45μm预滤膜,再通过孔径0.2μm灭菌膜。在无菌操作间将溶液定量分装于10ml玻璃安瓶中,分装量为2ml或1ml,经冷冻干燥机于-20℃真空冷冻干燥制成注射用冻干剂。



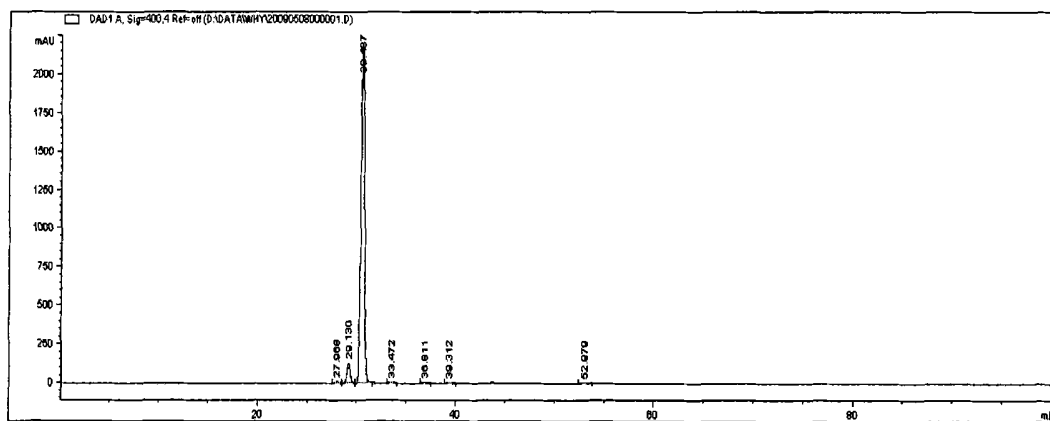


图 4

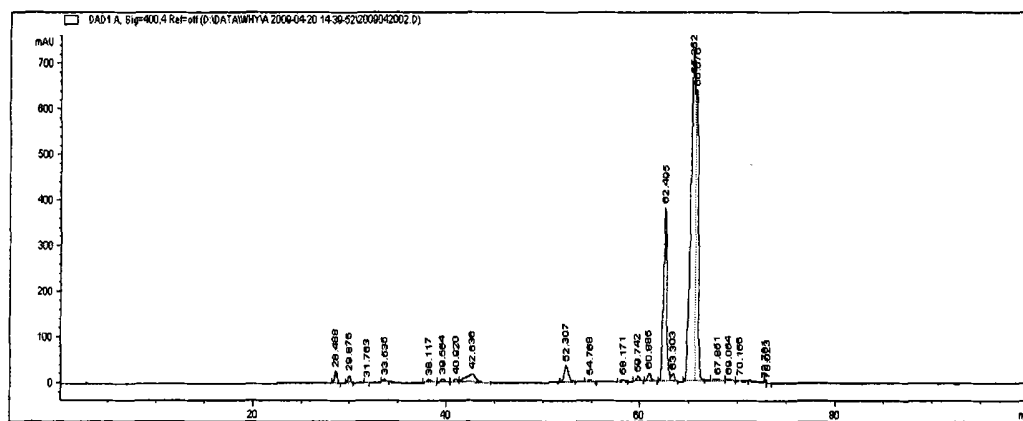


图 5

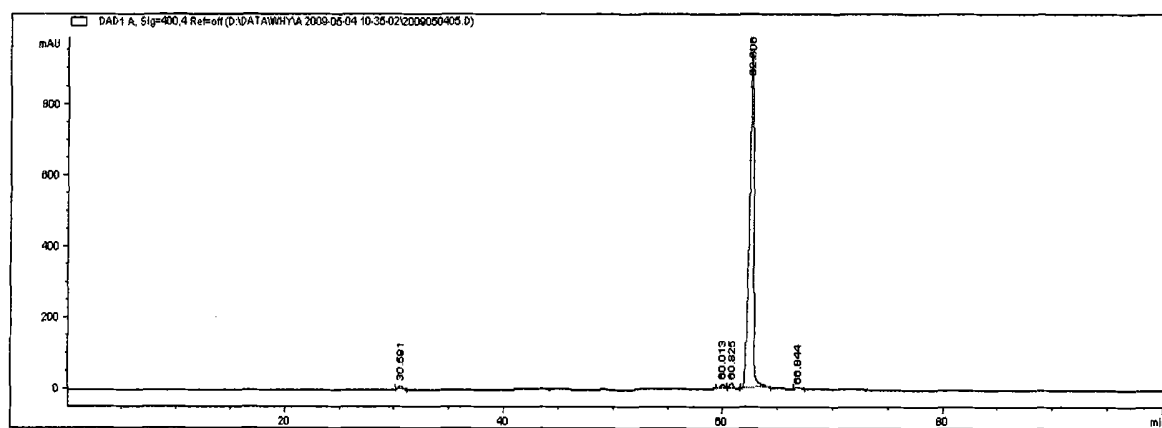


图 6

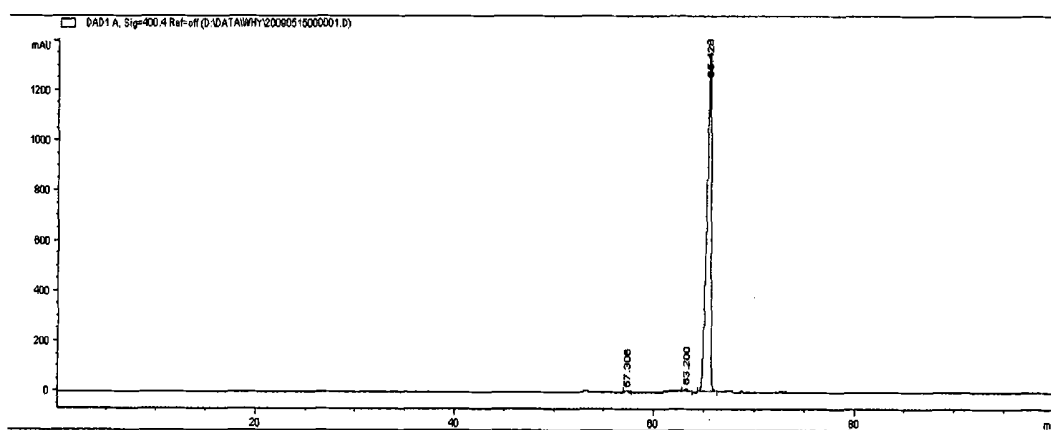


图 7

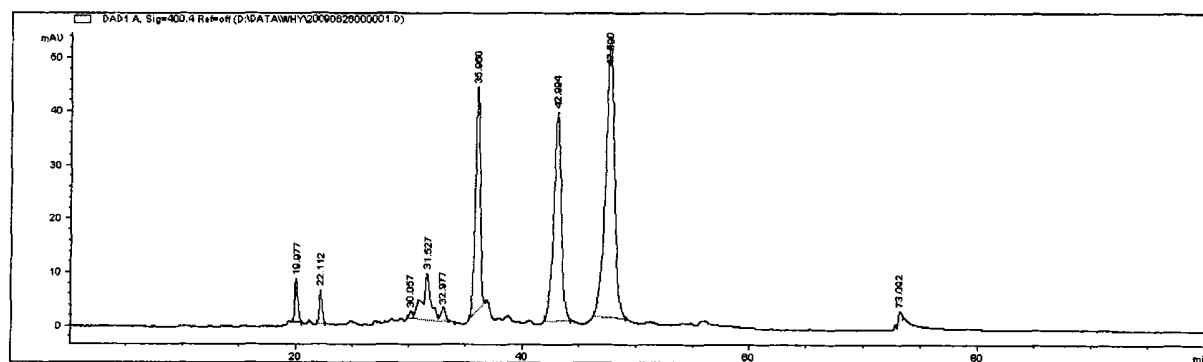


图 8

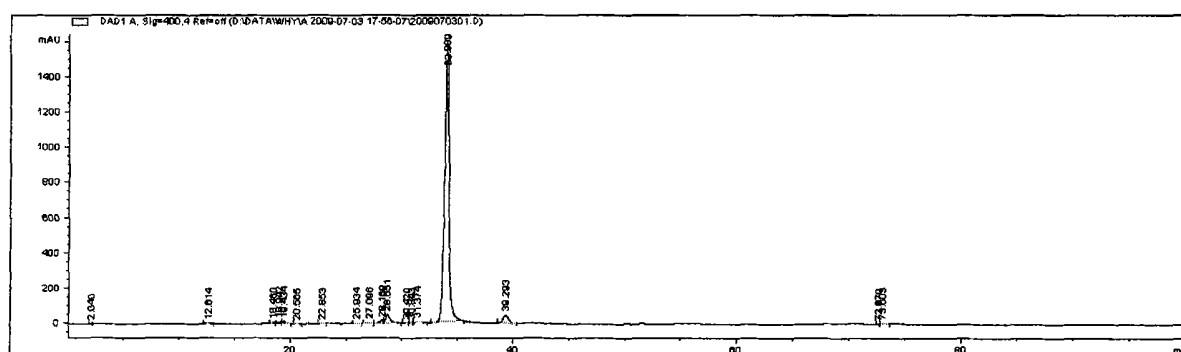


图 9

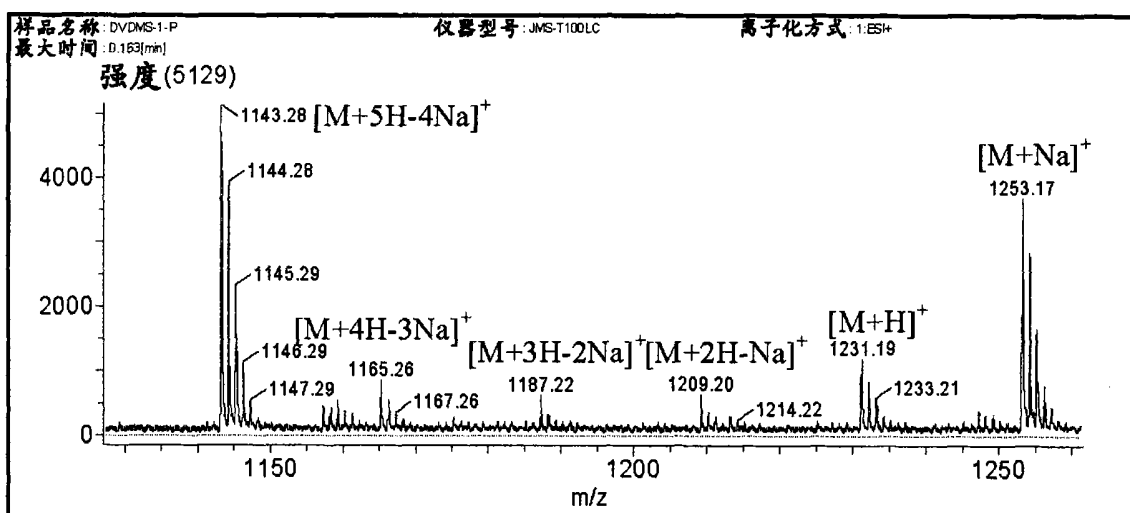
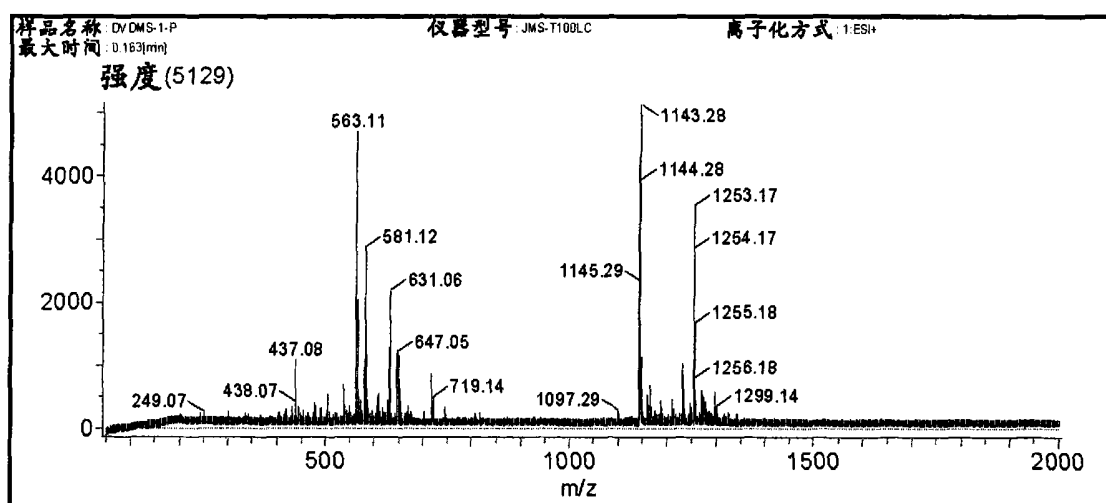


图 10

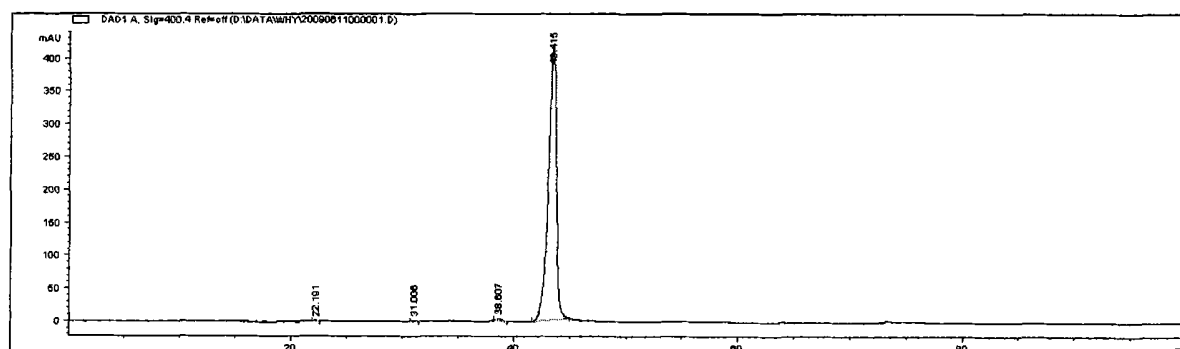


图 11

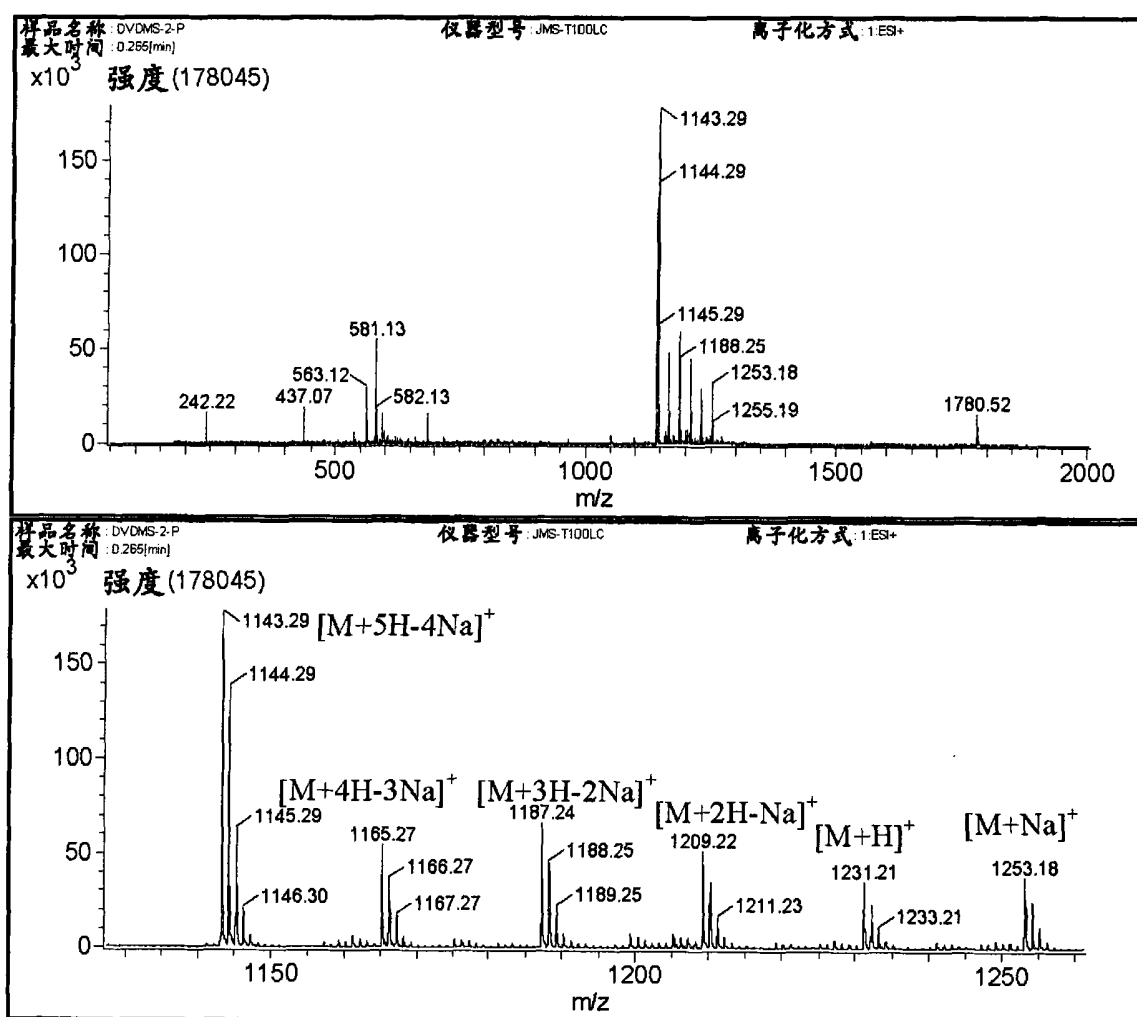


图 12

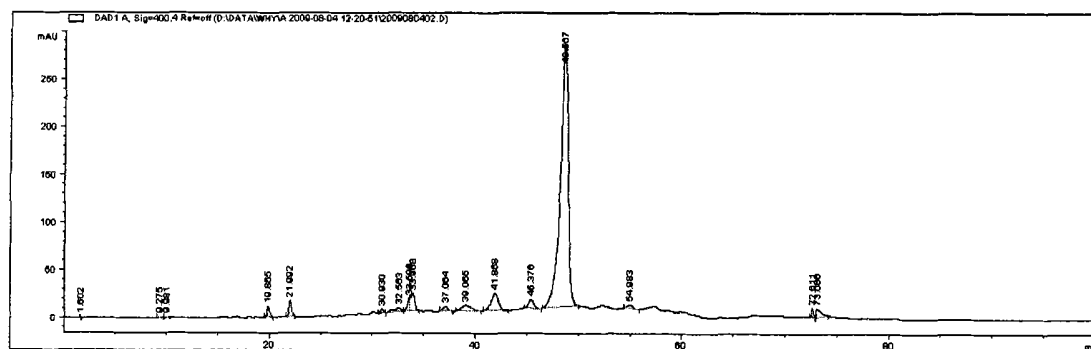


图 13

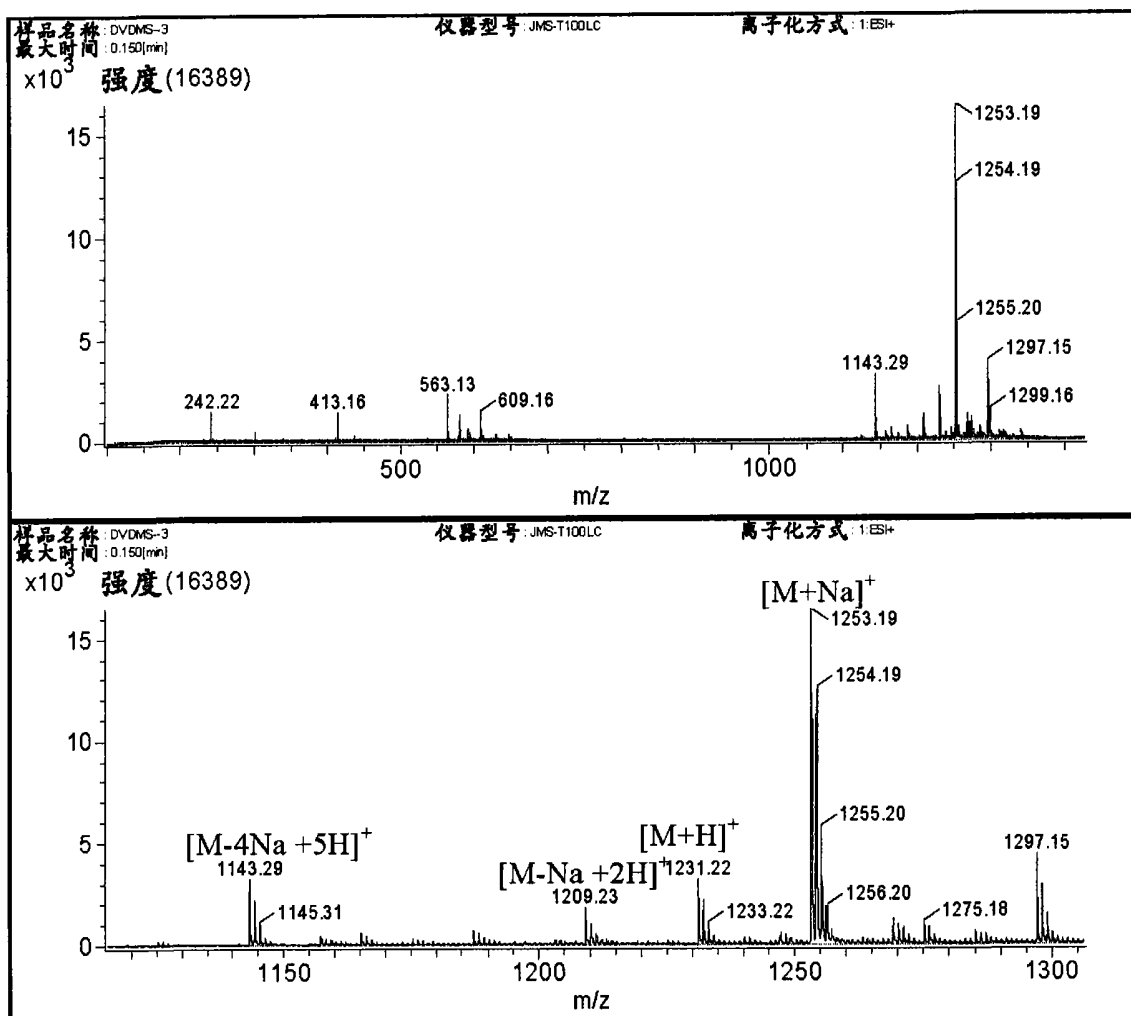


图 14

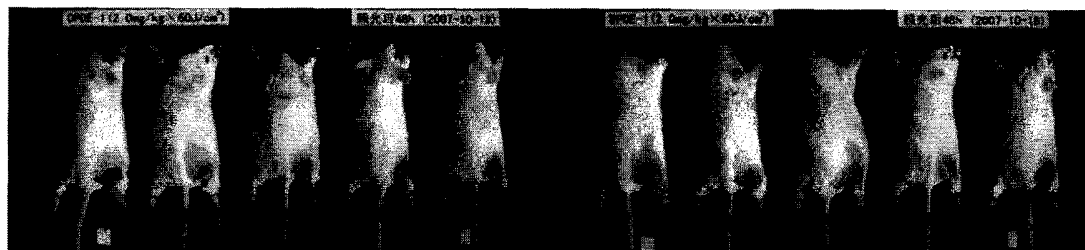
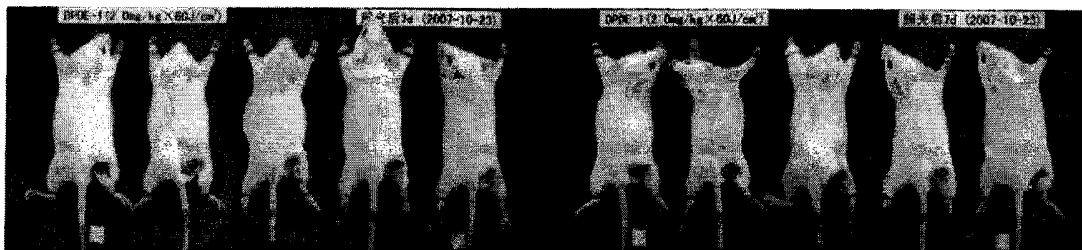
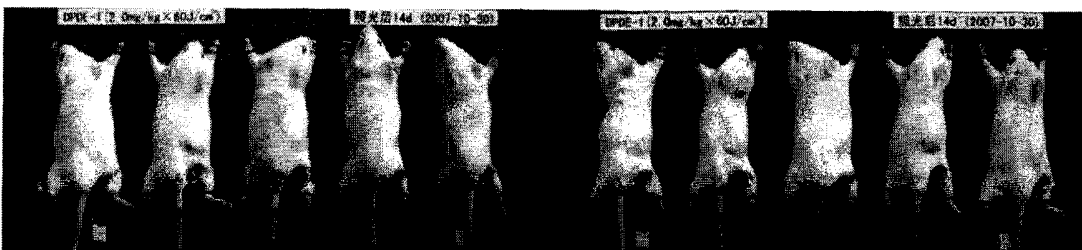
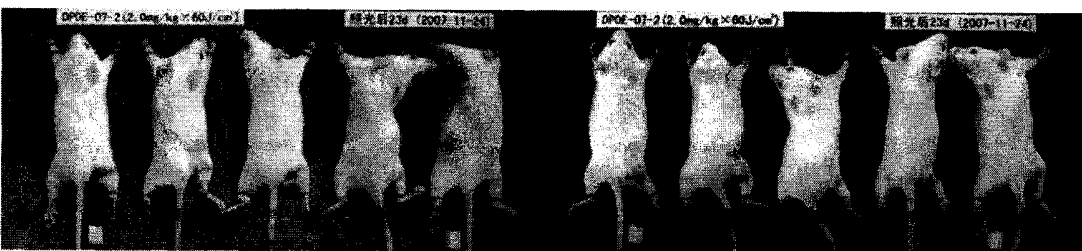
**【1】****【2】****【3】****【4】**

图 15



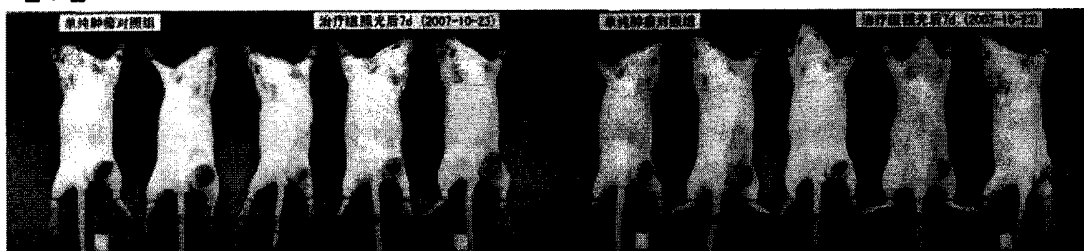
**【5】****【6】****【7】**

图 15(续)



图 16

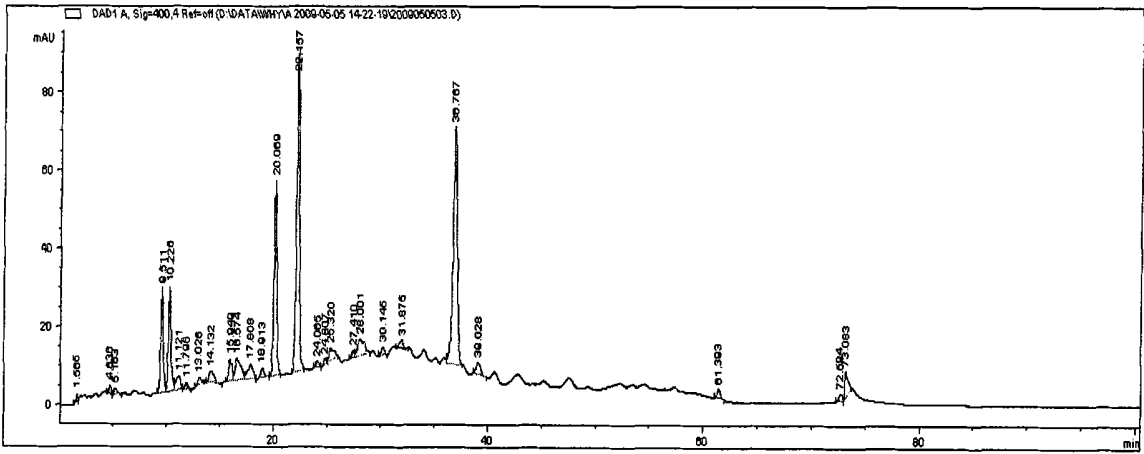


图 17

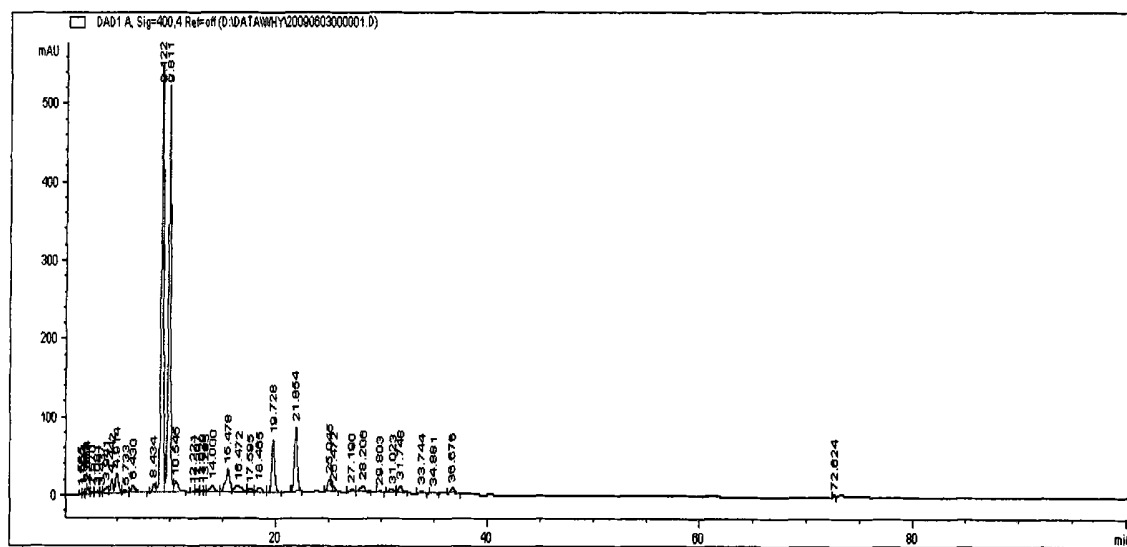


图 18