

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710008507.1

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/409 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 101234203A

[22] 申请日 2007.1.30

[21] 申请号 200710008507.1

[71] 申请人 中国科学院福建物质结构研究所
地址 350002 福建省福州市杨桥西路 155 号

[72] 发明人 黄明东 陈锦灿 袁 彩 石小莉
叶晓明

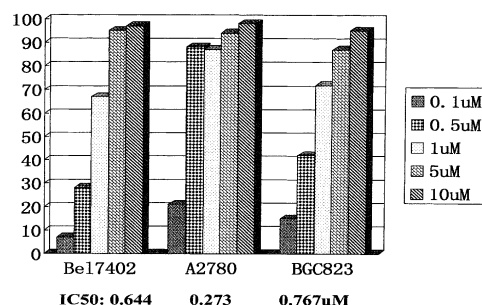
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

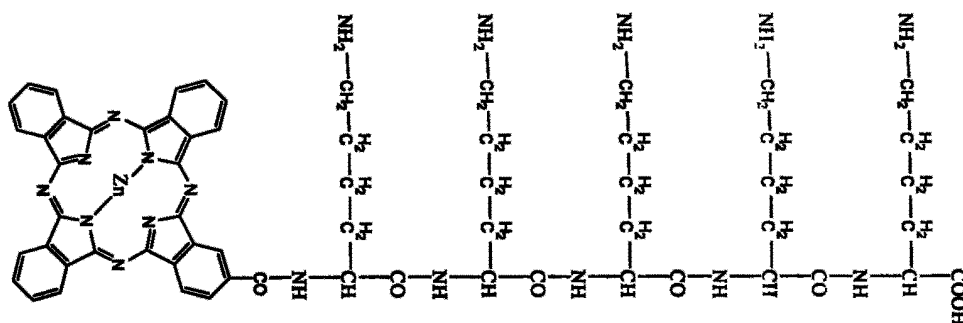
用于抗肿瘤治疗的新型医用光敏剂及其制备方法

[57] 摘要

用于抗肿瘤治疗的新型医用光敏剂及其制备方法，涉及一种新型医用光敏剂及其制备方法。该光敏剂的主要制备方法是，利用多肽固相合成的方法在常温下先将 β -单羧基取代酞菁锌的羧基基团活化，并添加偶联剂使活化物与连接在树脂上的多肽序列(如：5 个赖氨酸序列)耦合，最后将耦合上的样品从树脂上剥离下来。该光敏剂的制备方法快速简单，生成的化合物结构单一，且对肿瘤细胞具有选择性。因此将其作为光动力治疗肿瘤的药物将有巨大的应用前景。



- 1、 用于抗肿瘤治疗的新型医用光敏剂，其特征在于：它是由 β -单羧基取代酞菁锌的羧基基团上引入多肽或氨基酸作为靶向标记物而得到。
- 2、 根据权利要求1所述的新型医用光敏剂，其特征在于：该医用光敏剂表达式为 β -ZnPc-5K，其结构式为：



- 3、 一种权利要求1的新型医用光敏剂的制备方法，其特征在于：采用固相多肽合成的方法，将 β -单羧基取代酞菁锌与偶联在树脂上的多肽进行连接。
- 4、 权利要求1或2所述的新型医用光敏剂作为制备抗肿瘤光动力治疗药物的应用。

用于抗肿瘤治疗的新型医用光敏剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种新型医用光敏剂及其制备方法，该种光敏剂可作为药物用于肿瘤的光动力治疗。

背景技术

世界卫生组织日前发表的一份研究报告称，癌症状况将日益严重，全球 52 亿人口中癌症患者约有 2600 万人，今后 20 年新增患者人数将由目前的每年 1200 万增加到 1800 万，因癌症而死亡的人数也将由每年 700 万增至 1100 万。癌症也是我国居民死亡的主要原因之一，2005 年我国居民每死亡 5 人中，即有 1 人死于癌症。

光动力学疗法（photodynamic therapy, PDT）是近 20 年发展起来的一种新的治疗恶性肿瘤的方法。它与手术、化疗和放疗等三大传统的治疗肿瘤手段相比，具有许多优点和特点：对肿瘤有相对的选择特异性，能定向地消灭原发和复发肿瘤，很少损伤正常组织，毒副作用小；不影响其他治疗，可与化疗和放疗同时进行，且具一定的协同作用，可重复治疗；可借以缩小手术的范围和改善手术的预后；对各种癌症都有疗效，抗癌谱较广等。

光动力学治疗（Photodynamic Therapy, PDT）的原理是光敏剂或其代谢产物能选择性聚集于靶组织（肿瘤组织），在适当波长光的激发下产生光动力反应破坏靶细胞的化学物质。光敏剂分子接受光照，吸收光子的能量，在靶细胞内发生光化学反应，产生的活性氧（reactive oxygen species, ROS）具有细胞毒作用，能高效地氧化生物分子，最后诱导肿瘤细胞坏死。该方法已成功地应用于膀胱癌、食管癌、支气管癌、口腔癌、皮肤癌、鼻咽癌、肋膜间皮瘤、肝

癌、喉癌、乳腺癌、以及脑癌等肿瘤的治疗。现在，PDT 在治疗非肿瘤疾病方面也得到了广泛的重视，在不久的将来可能成为治疗皮肤病、老年失明、冠心病、艾滋病、自体免疫系统疾病等顽疾的有效手段。

综上所述，在杀伤肿瘤细胞的过程中，光敏剂作为能量的载体和反应的桥梁起着决定性的作用。

国际上最早批准临床使用的光敏剂 photofrin 与国内目前临床上使用的血卟啉注射液（由重庆市华鼎现代生物制药有限责任公司生产），两者均为卟啉类衍生物（hematoporphyrin derivative, HpD），可称之为第一代光敏剂，其共同缺点是摩尔消光系数相对较小，对肿瘤进行 PDT 治疗时，所需的药剂量、光剂量较大，光照射时间长，带来的皮肤光毒性大、皮肤灼伤较严重和病人在注射药物后避光时间较长（长至一个月）等副作用。

金属酞菁类光敏剂属于第二代光敏剂中的一种，与第一代血卟啉类光敏剂 HpD 相比在更长的可见光区（670nm—850nm）有更强的吸收，因而所用的光对人体组织的穿透性更大，且摩尔消光系数较 HpD 高出 10-50 倍，因此进行 PDT 治疗时，只需要 0.2-0.5mg/kg 的小剂量就能达到较为理想的药效。另外金属酞菁类光敏剂对于波长 400-600nm 的光没有强吸收，故皮肤光敏反应要比卟啉小得多。但是第二代光敏剂均有一个共同的显著缺点，即光敏剂对肿瘤组织的选择性与其在肿瘤组织上的富集能力相对有限。

本项发明我们在第二代光敏剂的基础上发展了第三代新型医用光敏剂—— β -单羧基取代酞菁锌-五聚赖氨酸耦合物（ β -ZnPc-5K），它在细胞水平上对肿瘤的抑制显著，是所有酞菁类光敏剂中最好的之一。由于化合物中含有靶向标记物——聚赖氨酸，因而该光敏剂对恶性细胞具有良好的靶向性和选择性，且光毒性小。

发明内容

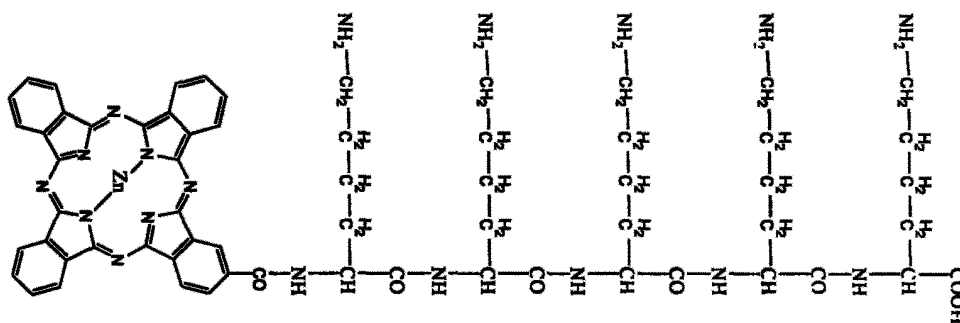
本项发明主要针对金属酞菁类第二代光敏剂所存在的选择性、吸收性相对较弱的缺陷，提供一种具有良好靶向作用的、抑制肿瘤效果明显的新型医用光敏剂。

本项发明第二个目的在于公开这种新型医用光敏剂的制备方法，该发明以 β -单羧基取代酞菁锌-五聚赖氨酸耦合物（ β -ZnPc-5K）的制备为例。

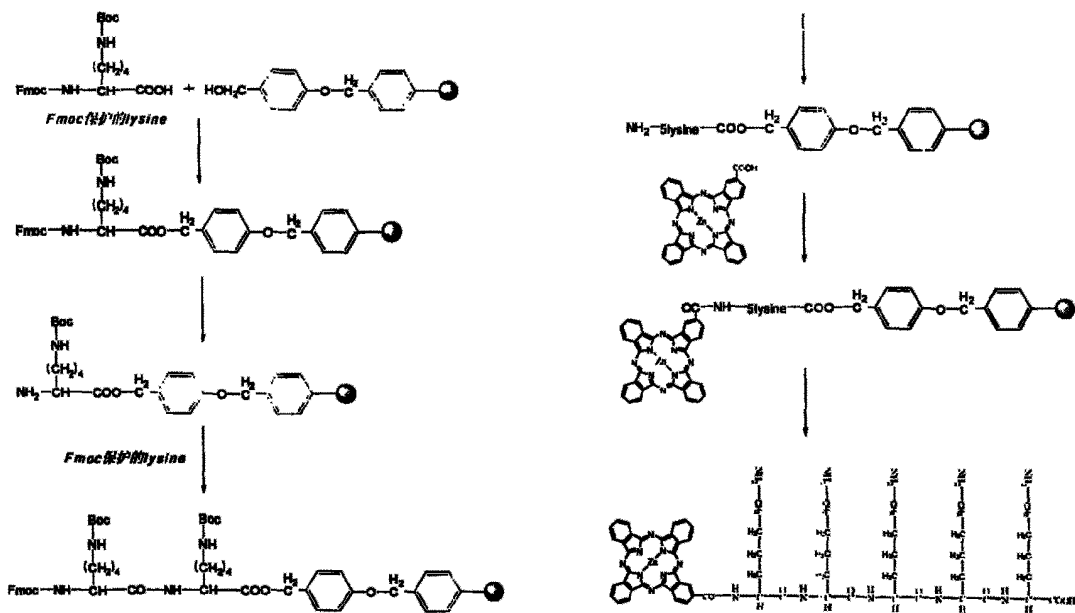
本项发明第三个目的在于提供这种新型医用光敏剂在光动力治疗方面的应用。

本发明技术方案如下：

- 1、用于抗肿瘤治疗的新型医用光敏剂，它是由 β -单羧基取代酞菁锌的羧基基团上引入多肽或氨基酸作为靶向标记物而得到。
- 2、根据项 1 所述的新型医用光敏剂，该医用光敏剂表达式为 β -ZnPc-5K，其结构式为：



- 3、一种项 1 的新型医用光敏剂的制备方法，采用固相多肽合成的方法，将 β -单羧基取代酞菁锌与偶联在树脂上的多肽进行连接。



4、 项 1 或 2 所述的新型医用光敏剂作为制备抗肿瘤光动力治疗药物的应用。

这种新型医用光敏剂 β -ZnPc-5K 在光动力治疗中的应用，其特别之处在于：光敏剂上含有靶向标记物——聚赖氨酸。带有正电荷的聚赖氨酸，能够降低了金属酞菁光敏剂的聚集，提高其有效浓度。另外，与正常细胞相比，肿瘤细胞表面通常带有较多负电荷，因而，本项发明的光敏剂中带有正电荷的聚赖氨酸能够使光敏剂富集在肿瘤细胞表面，这种选择性使本光敏剂带来的光毒性较小。

本发明的优点是：制备简单，化合物结构明确，不存在异构体，聚集较小，对肿瘤细胞选择性高且光敏化能力强等特点，作为光敏剂应用于肿瘤的临床治疗具有显著的价值和巨大的优势。

附图说明

1. 图 1 为 β -ZnPc-5K 的质谱图，其分子离子峰为 1263.1，理论值为 1262.8。
2. 图 2 为 β -ZnPc-5K 在不同浓度下对 3 种常见肿瘤细胞的抑制作用，其 50% 抑制率所用的药物浓度是同类酞菁光敏剂中用量较少的一种。

具体实施方式

详细实施方式我们以光敏剂 β -单羧基取代酞菁锌-五聚赖氨酸耦合物的合成为例。该种化合物均可采用以下实施例进行，只需改变连接的多肽的序列即可。

实施例一 β -单酰胺取代酞菁锌的合成

在带有回流装置和搅拌子的 500ml 三颈瓶中加入充分研细的偏苯三甲酸酐 2.40g (0.0125mol, Merck), 邻苯二甲酸酐 12.96g (0.08750mol), 无水醋酸锌 22.00g (0.1002mol), 尿素 60g (1mol), 钼酸铵 0.50g (0.4mmol), 氯化铵 2.00g (0.0374mol)。在油浴中加热至 170℃, 反应 4 小时。反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤数次, 再用纯水洗至中性, 得到 19g 固体。

实施例二 β -单羧基取代酞菁锌的合成

取 19.00g 例一所制备的 β -单酰胺取代酞菁锌于 500ml 的圆底烧瓶中, 加入 1M 的 KOH 200ml, 在 100℃下搅拌回流 24h。待反应结束后, 直接加入 36% 的浓盐酸, 调 PH 值为 2-3。抽滤。最后用纯水洗涤固体样品至中性。得到 2.45g 绿色固体。

选用 40cm 长, 内径为 3cm 的层析柱, 以 100 目的硅胶为吸附剂, DMF: 丙酮=3: 1 的混合溶剂为洗脱剂, 用 DMF: 丙酮=3: 1 的混合溶剂湿法装柱, 装柱的高度为 30cm。将上一步反应处理后的 2.45g 绿色固体溶于 24.5ml 的 DMF 中。每次上样量为 1ml, 柱子可反复使用多次。在洗脱过程中可以发现蓝绿色的酞菁样品分为两个部分, 收集第二部分 (后洗脱下来的)。将收集下来的样品旋转蒸发掉溶剂, 再将旋蒸后的样品按照上述的方法进行二次过柱分离, 如此反复三到四次即可除去无取代酞菁锌和 2-单酰胺取代酞菁锌, 分离得到纯度较高的 β -单羧基取代酞菁锌 310mg。纯化过程中收集的样品使用 HPLC 高效液相色谱跟踪分析。

实施例三 β -单羧基取代酞菁锌-五聚赖氨酸的合成

取 100ml 烧杯，加入实施例二中得到的 β -单羧基取代酞菁锌 7.59mg (0.0122mmol)，N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 5.03mg (0.0244mmol)，1-羟基苯并三唑 (Hobt) 3.30mg (0.0244mmol)，使用 4ml DMF+200ul 吡啶 (5%) 溶解上述样品，避光反应 30 分钟后加入树脂 12.10mg (0.0061mmol)，树脂上接有 5 个赖氨酸多肽序列，N 端暴露 (即 N 端为氨基)，树脂上多肽的结合量为 0.5mmol/g (该树脂可由标准的多肽固相合成法合成)，常温下搅拌反应 24 小时。反应完成后使用 DMF 洗涤树脂直至洗涤溶液无色，再使用甲醇洗涤数次。冷冻干燥。

取上步冷冻干燥后的样品放入 5ml 称量瓶中，加入 950ul TFA+50ul water，反应 3h 后，过滤，使用 TFA: water 为 95: 5 (v: v) 的溶液洗涤固体数次，收集所有的滤液及其洗涤液，加入无水乙醚使其析出沉淀，离心后弃去清液，冷冻干燥，得绿色固体 2.41mg。产率 15.64%。

实施例四 肿瘤细胞的体外光动力治疗实验

实验选取了具有代表性的 3 种肿瘤细胞：人肝癌细胞 Be17402、人卵巢癌细胞 A2780 及人胃癌细胞 BGC823。具体步骤如下：细胞用含 5% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液，在 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 条件下培养，0.25% 胰蛋白酶消化，每两天传代一次。实验时接种于 96 孔培养板，每孔 2×10^4 个细胞。12 小时后细胞贴壁生长，加药作用 2 小时，弃去药物，用完全培养液洗涤两次，照光量 72J/cm²，加上述培养液继续培养 24h。MTT 法测定贴壁细胞量：每孔加入 5ul MTT 试剂并继续培养 4 小时。吸出培养基，加入 200ul DMSO 溶解代谢后的固体颗粒，待完全溶解后用酶标仪在波长为 578nm 下检测其吸光度。附图 2 显示了 β -ZnPc-5K 在不同的浓度下对 3 种肿瘤细胞的抑制作用及其 IC₅₀ 值。

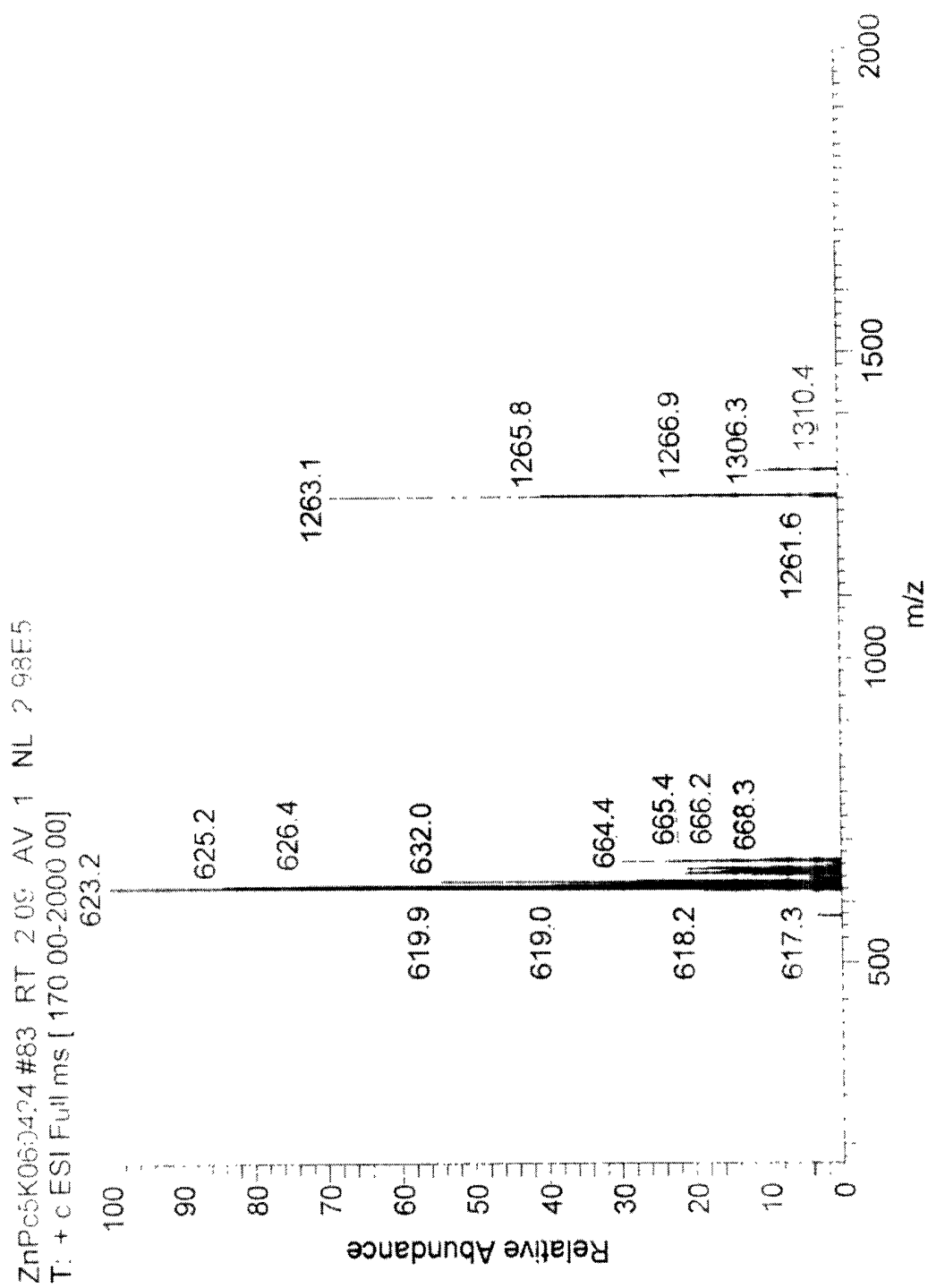


图 1

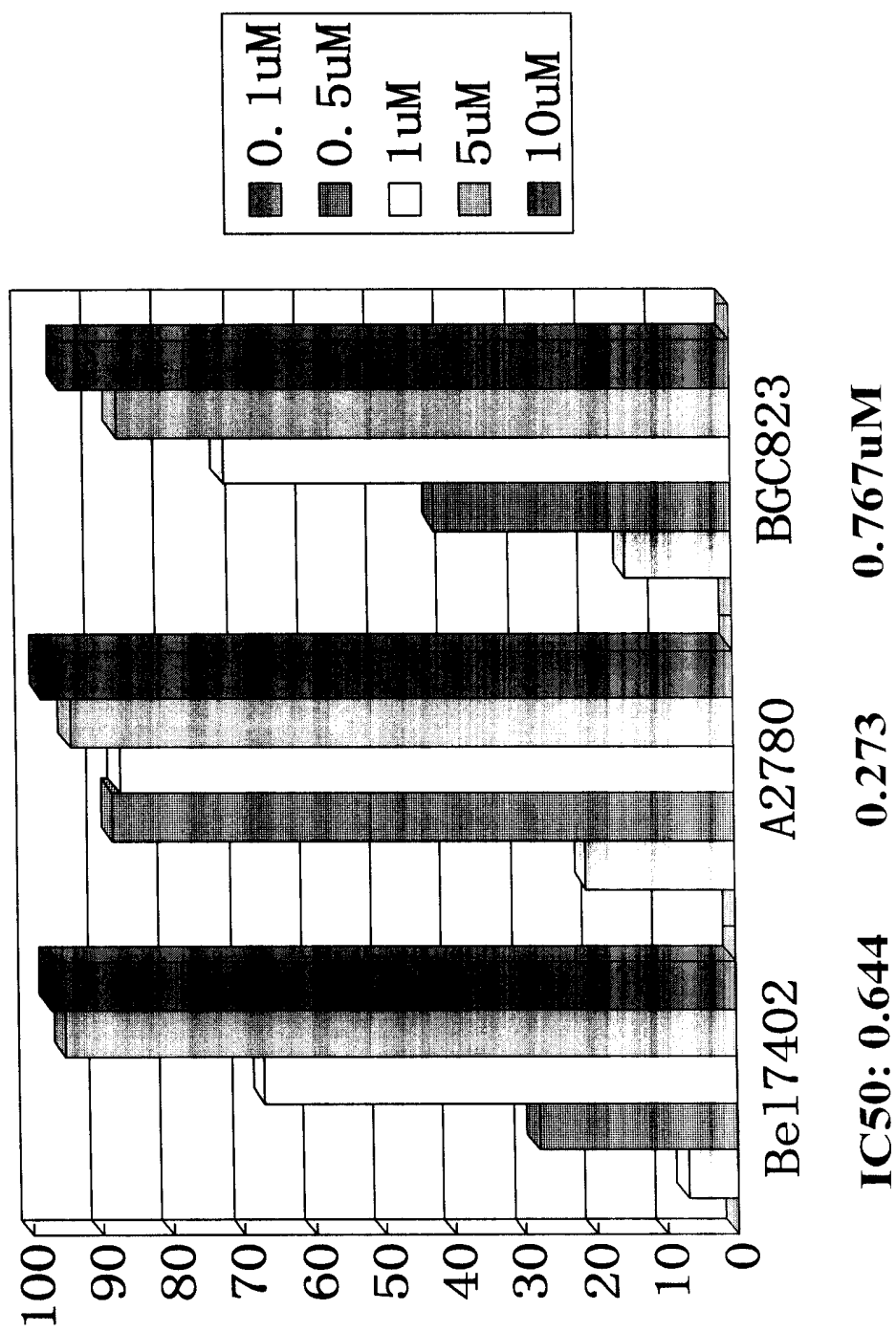


图2