



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102725298 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201080049811. 0

代理人 孔青 李进

(22) 申请日 2010. 10. 27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07F 1/12 (2006. 01)

61/255668 2009. 10. 28 US

A61K 31/28 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2010/001706 2010. 10. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02011/050575 EN 2011. 05. 05

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 支志明 汪玉 辛伟贤 周熙文

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

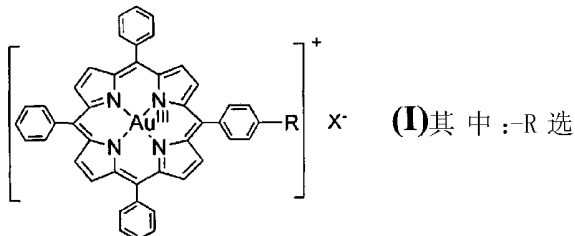
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 8 页

(54) 发明名称

作为组蛋白脱乙酰酶抑制剂的羟基取代的金(III)卟啉络合物

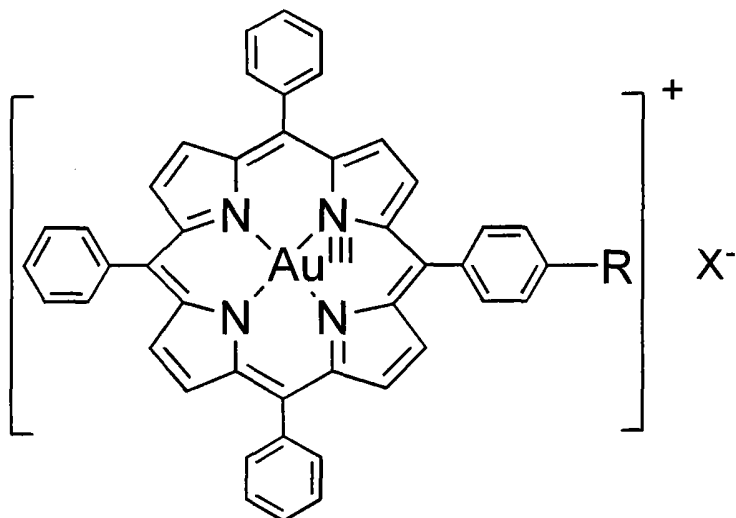
(57) 摘要

一种通过抑制组蛋白脱乙酰酶的活性来治疗癌症的方法,所述方法包括给需要这类治疗的人施用包含治疗上有效量的金(III)络合物或其药学上可接受的盐的组合物,所述金(III)络合物具有以下结构式(I):



CN 102725298 A 自 -OH、-CH₂OH、C₂H₄OH、-C₃H₆OH 或 -C₄H₈OH; 和 -X 独立地为药学上可接受的反荷离子。

1. 具有以下结构式的金 (III) 络合物或其药学上可接受的盐在制备用于通过抑制组蛋白脱乙酰酶的活性来治疗癌症的药物中的用途：



其中：

-R 选自 -OH、-CH₂OH、C₂H₄OH、-C₃H₆OH 或 -C₄H₈OH；和

-X 独立地为药学上可接受的反荷离子。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述金 (III) 络合物在癌细胞中诱导凋亡。

3. 根据权利要求 1 的用途，其中所述癌症包括下列的一种或多种：子宫颈上皮样癌、肝细胞癌、白血病、鼻咽癌、乳腺癌、黑素瘤和肺癌。

4. 根据权利要求 1 的用途，其中 R 为 -OH。

5. 根据权利要求 1 的用途，其中 R 为 -CH₂OH。

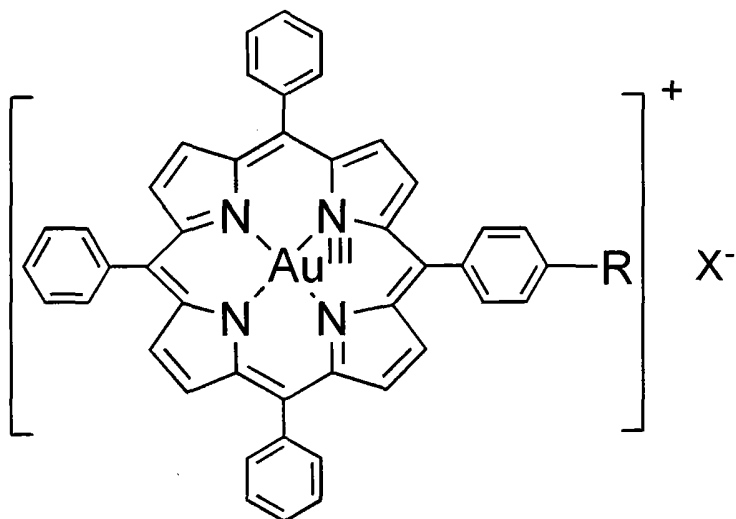
6. 根据权利要求 1 的用途，其中 R 为 -C₂H₄OH。

7. 根据权利要求 1 的用途，其中 R 为 -C₃H₆OH。

8. 根据权利要求 1 的用途，其中 R 为 -C₄H₈OH。

9. 根据权利要求 1 的用途，其中所述金 (III) 络合物通过与组蛋白脱乙酰酶结合来抑制组蛋白脱乙酰酶。

10. 一种金 (III) 络合物，所述络合物包含以下结构式：



其中 R 选自 -OH、-CH₂OH、C₂H₄OH、-C₃H₆OH 或 -C₄H₈OH, X 独立地为药学上可接受的反荷离子。

11. 权利要求 10 的金 (III) 络合物, 其中所述金 (III) 络合物为药学上可接受的盐。

12. 权利要求 10 的金 (III) 络合物, 其中 R 为 OH。

13. 权利要求 10 的金 (III) 络合物, 其中 R 为 CH₂OH。

14. 权利要求 10 的金 (III) 络合物, 其中 R 为 C₂H₄OH。

15. 权利要求 10 的金 (III) 络合物, 其中 R 为 C₃H₆OH。

16. 权利要求 10 的金 (III) 络合物, 其中 R 为 C₄H₈OH。

17. 一种制备权利要求 10 的金 (III) 络合物的方法, 所述方法包括: 使金化合物与羟苯基 - 三苯基卟啉化合物反应。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述羟苯基 - 三苯基卟啉化合物包括下列的一种或多种: 5-羟苯基 -10, 15, 20-三苯基卟啉; 5-(羟甲基) 苯基 -10, 15, 20-三苯基卟啉; 5-(羟乙基) 苯基 -10, 15-20-三苯基卟啉; 5-(正-羟丙基) 苯基 -10, 15-20-三苯基卟啉; 以及 5-(正-羟丁基) 苯基 -10, 15, 20-三苯基卟啉。

19. 权利要求 17 的方法, 其中所述金化合物在 30°C -100°C 温度下与羟苯基 - 三苯基卟啉化合物反应。

作为组蛋白脱乙酰酶抑制剂的羟基取代的金(III)卟啉络合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护提交于 2009 年 10 月 28 日的临时申请系列第 61/255,668 号的优先权,所述申请通过引用结合于本文中。

技术领域

[0003] 本文描述了作为组蛋白脱乙酰酶抑制剂的金属(III)络合物、包含有用的所述金属(III)络合物的药物组合物以及使用这类组合物治疗癌症的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 尽管多种化学治疗剂(例如顺铂及其衍生物)可有效地治愈患有各种不同类型癌症的患者,但抗药性和毒副作用的出现危害了临床成功[B. Storda 等, *Cancer Treat. Rev.* 2007, 33, 688]。乳腺癌代表了最常见诊断的女性恶性肿瘤和全世界妇女死亡的第二大主要原因。包括外科手术、放射疗法、化学疗法和内分泌疗法的治疗在早期有效。对于复发性和转移性乳腺癌而言,可用的治疗选择有限,且大多数情况下,化学疗法成为唯一选择。常用诸如顺铂及其衍生物、多柔比星、氟尿嘧啶和单克隆抗体曲妥珠单抗等的化学治疗剂,且通常以组合化学疗法的形式给予。然而,这些药剂的效果并非万能,并且大部分患者产生抗性。此外,常遇到副作用,包括诱导危及生命的毒性。因此,对于开发具有更小副作用的新型备选化学治疗剂而言有迫切要求。

[0006] 数千年前已认识到金属金和金盐的治疗价值,其在药物中的合理使用开始于 20 世纪 20 年代早期。近几十年来,已报道多种金属(III)络合物表现出对广谱肿瘤细胞的细胞毒性。然而,它们在生理条件下的不稳定性限制了其治疗使用[C. F. Shaw, *Chem. Rev.* 1999, 99, 2589]。在设计生理学稳定的抗癌金属(III)络合物中,Chen 和同事使用强烈整合的卟啉根合配基(porphyrinato ligand)来稳定金属(III)离子[C.-M. Chen 等, *Chem. Commun.* 2003, 1718 ;R. W. -Y. Sun 等, *Coord. Chem. Rev.* 2009, 253, 1682]。发现这些金属(III)卟啉络合物对一组细胞系表现出有前景的体外和体内抗癌活性,所述细胞系包括肝细胞癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤和结肠癌。然而,因为这些络合物中缺乏亲水取代基,包括(羟基),所以这些络合物在水溶液中难溶。

[0007] 除了金属(III)卟啉络合物之外,Wheelhouse 等[美国专利第 6,087,493 号;此后“Wheelhouse”]亦公开了使用含有吡啶基或喹啉基醛衍生物的卟啉化合物和金属卟啉络合物来抑制端粒末端转移酶活性并因此抑制癌细胞增殖。Wheelhouse 还公开了不含吡啶基或喹啉基醛的卟啉对抑制端粒末端转移酶无活性。

[0008] 在本发明中,我们关注作为组蛋白脱乙酰酶抑制剂的羟基取代的金属(III)卟啉络合物的应用。设计这些络合物来封阻组蛋白脱乙酰酶的活性位点并因此抑制其活性。

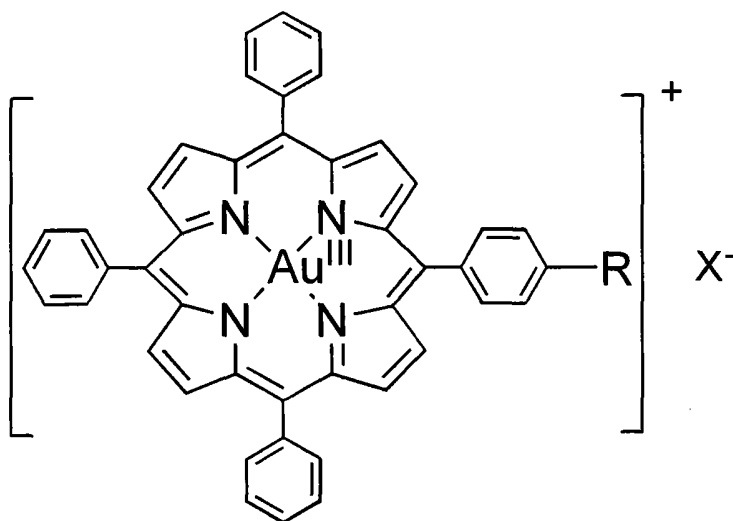
[0009] 发明概述

[0010] 下文呈现了本发明的简化概述以提供对本发明某些方面的基本理解。此概述不是本发明的广泛综述。意图此概述既不确定本发明的关键或重要要素,也不描述本发明的范

围。相反,此概述的唯一目的是以简化形式呈现本发明的某些概念,作为呈现于下文中的更详细描述的前言。

[0011] (1). 本文描述了通过抑制组蛋白脱乙酰酶的活性来治疗癌症的方法,包括给需要这类治疗的人施用包含治疗上有效量的金(III)络合物或其药学上可接受盐的组合物,所述金(III)络合物具有以下结构式

[0012]



[0013] 其中:

[0014] -R 选自 -OH、-CH₂OH、C₂H₄OH、-C₃H₆OH 或 -C₄H₈OH;

[0015] -X 独立地为药学上可接受的反荷离子。

[0016] (2). 根据(1)的方法,其中所述金(III)络合物在癌细胞中诱导凋亡。

[0017] (3). 根据(1)的方法,其中所述癌症包括下列的一种或多种:子宫上皮样癌(cervical epithelioid carcinoma)、肝细胞癌、白血病、鼻咽癌、乳腺癌、黑素瘤和肺癌。

[0018] (4). 根据(1)的方法,其中 R 为 -OH。

[0019] (5). 根据(1)的方法,其中 R 为 -CH₂OH。

[0020] (6). 根据(1)的方法,其中 R 为 -C₂H₄OH。

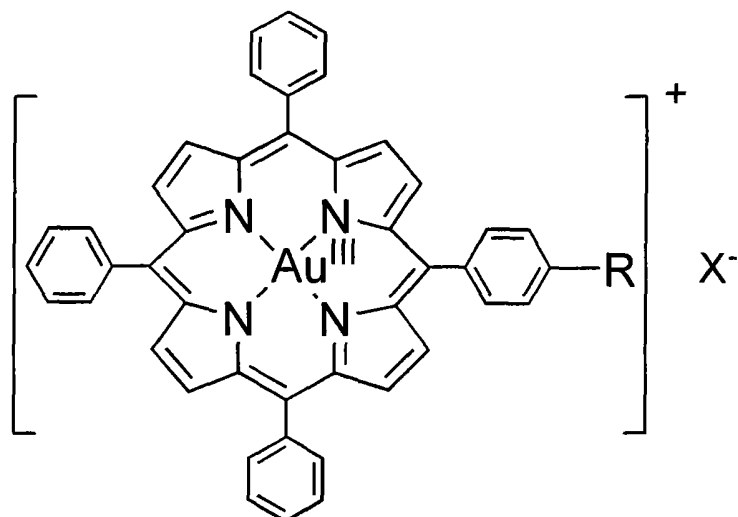
[0021] (7). 根据(1)的方法,其中 R 为 -C₃H₆OH。

[0022] (8). 根据(1)的方法,其中 R 为 -C₄H₈OH。

[0023] (9). 根据(1)的方法,其中所述金(III)络合物通过与组蛋白脱乙酰酶结合来抑制组蛋白脱乙酰酶。

[0024] (10). 一种金(III)络合物,其包含以下结构式:

[0025]



[0026] 其中 R 选自 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 C_2H_4OH 、 $-C_3H_6OH$ 或 $-C_4H_8OH$ ，X 独立地为药学上可接受的反荷离子。

[0027] (11). 根据 (10) 的金 (III) 络合物，其中所述金 (III) 络合物为药学上可接受的盐。

[0028] (12). 根据 (10) 的金 (III) 络合物，其中 R 为 OH 。

[0029] (13). 根据 (10) 的金 (III) 络合物，其中 R 为 CH_2OH 。

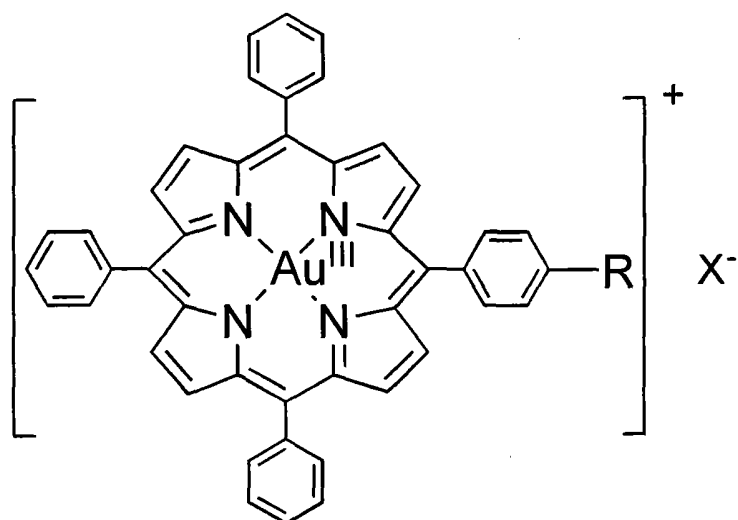
[0030] (14). 根据 (10) 的金 (III) 络合物，其中 R 为 C_2H_4OH 。

[0031] (15). 根据 (10) 的金 (III) 络合物，其中 R 为 C_3H_6OH 。

[0032] (16). 根据 (10) 的金 (III) 络合物，其中 R 为 C_4H_8OH 。

[0033] (17). 具有以下结构式的金 (III) 络合物或其药学上可接受的盐在制备用于通过抑制组蛋白脱乙酰酶的活性来治疗癌症的药物中的用途：

[0034]



[0035] 其中：

[0036] $-R$ 选自 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 C_2H_4OH 、 $-C_3H_6OH$ 或 $-C_4H_8OH$ ；和

[0037] $-X$ 独立地为药学上可接受的反荷离子。

[0038] (18). 根据 (17) 的用途，其中所述金 (III) 络合物在癌细胞中诱导凋亡。

[0039] (19). 根据 (17) 的用途，其中所述癌症包括下列的一种或多种：子宫颈上皮样癌、

肝细胞癌、白血病、鼻咽癌、乳腺癌、黑素瘤和肺癌。

[0040] (20). 根据 (17) 的用途, 其中 R 为 -OH。

[0041] (21). 根据 (17) 的用途, 其中 R 为 -CH₂OH。

[0042] (22). 根据 (17) 的用途, 其中 R 为 -C₂H₄OH。

[0043] (23). 根据 (17) 的用途, 其中 R 为 -C₃H₆OH。

[0044] (24). 根据 (17) 的用途, 其中 R 为 -C₄H₈OH。

[0045] (25). 根据 (17) 的用途, 其中所述金 (III) 络合物通过与组蛋白脱乙酰酶结合来抑制组蛋白脱乙酰酶。

[0046] (26). 一种制备根据 (10) 的金 (III) 络合物的方法, 包括: 使金化合物与羟苯基 - 三苯基卟啉化合物反应。

[0047] (27). 根据 (26) 的方法, 其中所述羟苯基 - 三苯基卟啉化合物包括下列的一种或多种: 5-羟苯基 -10, 15, 20-三苯基卟啉; 5-(羟甲基) 苯基 -10, 15, 20-三苯基卟啉; 5-(羟乙基) 苯基 -10, 15-20-三苯基卟啉; 5-(正-羟丙基) 苯基 -10, 15-20-三苯基卟啉; 以及 5-(正-羟丁基) 苯基 -10, 15, 20-三苯基卟啉。

[0048] (28). 根据 (26) 的方法, 其中所述金化合物在 30°C -100°C 温度下与羟苯基 - 三苯基卟啉化合物反应。

[0049] 附图简述

[0050] 图 1 显示羟基取代的金 (III) 卟啉络合物金 -2a 至金 -2e 的化学结构。

[0051] 图 2 显示金 -2a 在 MDA-MB-231 细胞中的诱导凋亡特性。

[0052] 图 3 显示金 -2a 对裸小鼠中肿瘤生长的抑制特性。

[0053] 图 4 显示金 -2a 治疗差异地调节 Wnt 途径中信号分子的表达。

[0054] 图 5 显示金 -2a 抑制 I 类组蛋白脱乙酰酶活性。

[0055] 图 6 显示金 -2a 在 Wnt 信号分子的启动子区调节组蛋白 H4 的乙酰化状态。

[0056] 图 7 显示金 -2a 差异地调节 I 类 HDAC 与五种 Wnt 信号分子的启动子区的缔合。

[0057] 图 8 显示不同 HDAC8-HDACi 复合体的分子图示。

[0058] 发明详述

[0059] 本文描述了可用作抗肿瘤剂和可用于药物组合物的羟基取代的金 (III) [或 Au(III) 或 Au^{III}] 卟啉络合物的用途, 以及所述羟基取代的金 (III) 卟啉络合物用于抗击癌症的用途。所述药物组合物包含有效诱导癌细胞死亡的量的不同的合成羟基取代的金 (III) 卟啉络合物。所述羟基取代的金 (III) 卟啉络合物也提供抑制受癌症所累的人中的肿瘤细胞生长的方法, 其包括给这类人施用有效抑制肿瘤细胞生长的量的羟基取代的金 (III) 卟啉络合物。本文报道的证据表明, 金 (III) 化合物通过与铂药物 (例如顺铂) 实质上不同的机制来发挥其抗增殖活性。具体地, 本文报道的数据指出, 金 (III) 络合物与组蛋白脱乙酰酶结合并与其形成复合体。

[0060] 先前我们已报道了一系列金 (III) 内消旋 - 四芳基卟啉络合物。其中, 金 -1a 络合物 ([Au^{III}(TPP)]Cl) 显示了对包括来源于鼻咽癌和肝细胞癌的那些在内的一组人癌细胞的某些抗增殖活性。此处, 我们报道具有羟基取代的新型金 (III) 卟啉 (图 1 所示的金 -2a 至金 -2e)。这些新型化合物在水溶性和稳定性方面显示了惊人的改进。此外, 金 -2a 的功效在抑制人乳腺癌细胞的体外和体内生长方面出乎意料地有效。相比之下, 先前的金 -1a

络合物在亚致死浓度下不显示抑制乳腺肿瘤生长。

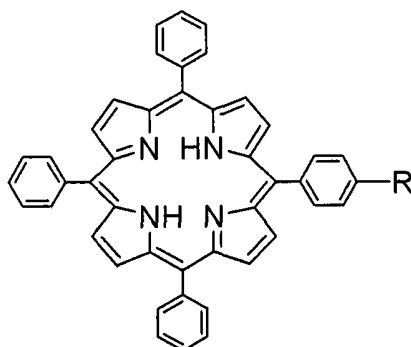
[0061] 关于抗癌机制,本文显示的有力证据表明,羟基取代基的引入赋予金-2a 通过调节组蛋白脱乙酰酶活性来选择性地抑制 Wnt/ β -联蛋白信号传导的能力。如计算实验所示,与未取代的金-1a 相比,金-2a 对组蛋白脱乙酰酶显示出更高的结合亲和力。值得注意的是,金-2a 不显示任何对端粒末端转移酶抑制的活性,已报道所述端粒末端转移酶为一系列卟啉和金属卟啉络合物的靶标 [美国专利第 6,087,493 号;此后“Wheelhouse”]。因此,此处报道的金(III)络合物通过出乎意料的分子机制起效从而达到非常高程度的抗肿瘤功效。

[0062] 应当理解的是,在一个实施方案中,羟基取代的卟啉分子和金(III)中心不形成中性络合物。例如,金(III)上的净正电荷可大于羟基取代的卟啉分子的绝对净负电荷。在这些实施方案中,可存在与金(III)络合物配位的反荷阴离子用于电荷中和。相应地,本文所用的短语“药学上可接受的盐”包括由带电荷的金(III)络合物和反荷阴离子形成的盐。

[0063] 本文所用的术语“组蛋白脱乙酰酶”为从组蛋白上的 ϵ -N-乙酰赖氨酸氨基酸除去乙酰基的一类酶。组蛋白脱乙酰酶蛋白也被称为赖氨酸脱乙酰酶,以更精确地描述功能而不是靶标。

[0064] 本文所用的术语“羟基取代的卟啉分子”是指具有以下化学结构的分子:

[0065]



[0066] 其中,

[0067] R 选自 -OH、-CH₂OH、C₂H₄OH、-C₃H₆OH 或 -C₄H₈OH。换言之, R 为含羟基的基团,其包括具有 1-5 个碳原子的烷氧基。在另一个实施方案中, R 为含羟基的基团,其包括羟基和具有 1-4 个碳原子的烷氧基。

[0068] 本文所用的短语“反荷阴离子”是指与带正电荷的金(III)络合物缔合的离子。反荷阴离子的非限制性实例包括卤素(例如氟离子、氯离子、溴离子和碘离子)、硫酸根、磷酸根、三氟甲磺酸根、醋酸根、硝酸根、高氯酸根、乙酰丙酮酸根、六氟乙酰丙酮酸根和六氟磷酸根。

[0069] 本文所用的术语“羟基取代的金(III)卟啉络合物”是指与任何羟基取代的卟啉分子结合的金(III)金属的络合物。所述羟基取代的金(III)卟啉络合物的结构可作为单个分子或聚集分子存在。

[0070] 本文所用的短语“药学上可接受的载体”意为以下载体成分的载体组合,所述载体成分经联邦管理机构或州政府批准,或者列于美国药典或其它公认药典之中,用于动物、哺乳动物和更特别地人中。药学上可接受载体的非限制性实例包括液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油。当静脉内施用本发明的化合物时,水为常用溶媒。盐溶液

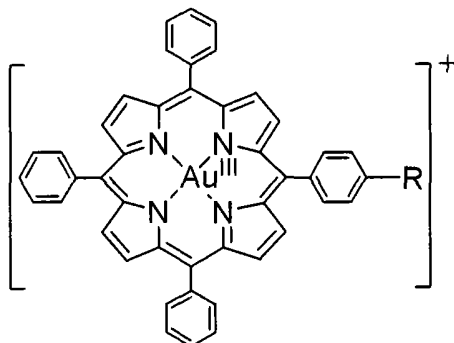
以及水性葡萄糖和甘油溶液也可作为液体溶媒,特别是用于可注射的溶液。

[0071] 如上所述,本发明涉及可用于诱导癌细胞死亡的组合物。

[0072] 如上所述,术语“癌症”是指但不限于乳腺癌、宫颈上皮样癌、肝细胞癌、白血病、鼻咽癌、黑素瘤和肺癌。

[0073] 在一个实施方案中,本发明涉及诱导癌细胞的癌细胞死亡(包括但不限于凋亡)的方法,包括给受应答形式癌症所累的患者施用包含有效量的一种或多种羟基取代的金(III)卟啉络合物的组合物。所述羟基取代的金(III)卟啉络合物可用以下结构式或其药学上可接受的盐表示:

[0074]



[0075] 其中 R 如上所述。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明涉及诱导癌细胞死亡的方法,包括给有需要的患者施用包含有效量的羟基取代的金(III)卟啉络合物或其药学上可接受盐的组合物,其中 R 为 OH(金-2a)。

[0077] 在另一个实施方案中,本发明涉及诱导癌细胞死亡的方法,包括给有需要的患者施用包含有效量的羟基的取代金(III)卟啉络合物或其药学上可接受盐的组合物,其中 R 为 CH₂OH(金-2b)。

[0078] 在另一个实施方案中,本发明涉及诱导癌细胞死亡的方法,包括给有需要的患者施用包含有效量的羟基取代的金(III)卟啉络合物或其药学上可接受盐的组合物,其中 R 为 C₂H₄OH(金-2c)。

[0079] 在另一个实施方案中,本发明涉及诱导癌细胞死亡的方法,包括给有需要的患者施用包含有效量的羟基取代的金(III)卟啉络合物或其药学上可接受盐的组合物,其中 R 为 C₃H₆OH(金-2d)。

[0080] 在另一个实施方案中,本发明涉及诱导癌细胞死亡的方法,包括给有需要的患者施用包含有效量的羟基取代的金(III)卟啉络合物或其药学上可接受盐的组合物,其中 R 为 C₄H₈OH(金-2e)。

[0081] 图 1 显示可用于本发明中的羟基取代的金(III)卟啉络合物的说明性实例。

[0082] 一般地,所述羟基取代的金(III)卟啉络合物通过在适宜条件下使金化合物与羟苯基-三苯基卟啉化合物反应来制备。金化合物的实例包括氯金酸钾、氯金酸钠等。羟苯基-三苯基卟啉化合物的实例包括 5-羟苯基-10,15,20-三苯基卟啉、5-(羟甲基)苯基-10,15,20-三苯基卟啉、5-(羟乙基)苯基-10,15-20-三苯基卟啉、5-(正-羟丙基)苯基-10,15-20-三苯基卟啉、5-(正-羟丁基)苯基-10,15,20-三苯基卟啉等。在一个实施方案中,所述反应在酸性条件下高温例如 30°C-100°C 下进行。在另一个实施方案中,所

述反应在将温度从 50℃ -90℃ 的高温下进行。

实施例

[0083] 实施例 1:金 (III) 络合物的制备和表征

[0084] 一般而言,羟基取代的金 (III) 卟啉络合物 (图 1) 的合成使用标准 Schlenk 技术在氮气环境下进行 [C. -M. Che 等, Chem. Commun. 2003, 1718], 其通过引用结合于本文中。对于合成金 -2a, 将 $K[AuCl_4]$ (0.508mmol) 和醋酸钠 (2.538mmol) 在醋酸 (20mL) 中加热至 80℃ 达 15 分钟。逐滴加入含 5-羟苯基-10,15,20-三苯基卟啉 (0.406mmol) 的醋酸 (10mL) 溶液。在回流下加热混合物 2h。通过真空去除溶剂之后,将残余物溶于 CH_2Cl_2 (40mL)。将 CH_2Cl_2 溶液用水 ($2 \times 40mL$) 洗涤两次以去除任何未反应的 $KAuCl_4$ 和醋酸钠,并浓缩至约 3mL。在中性 90-氧化铝填充柱上用 CH_2Cl_2 作为洗脱液对其进行色谱分离,以去除未反应的 5-羟苯基-10,15,20-三苯基卟啉,随后使用 $CH_2Cl_2/MeOH(99:1, v/v)$ 混合物洗脱金 (III) 络合物。溶剂蒸发后获得红紫色固体,从 $CH_2Cl_2/$ 二乙醚 (1:1, v/v) 混合物中再结晶所述络合物。在 DPX-400Bruker FT-NMR 分光计上用相对于四甲基硅烷的化学位移 (ppm) 记录 1H NMR 光谱。在 Perkin-Elmer Lambda 900 紫外-可见光分光光度计上记录吸收光谱。使用 3-硝基苄醇 (NBA) 作为基质在 Finnigan MAT95 质谱仪上记录质谱 (FAB)。由北京中国科学院化学研究所进行元素分析。以 77% 的产率获得金 -2a。 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 9.44(d, J = 5.2Hz, 2H), 9.30-9.25(m, 6H), 8.23(d, J = 6.3Hz, 6H), 7.93-7.79(m, 11H), 7.32(d, J = 8.4Hz, 2H)$ 。紫外-可见光 (DMSO) $\lambda_{max}/nm(\log \epsilon): 414(5.35), 526(4.30)$ 。FAB-MS m/z 826 [M^+]; $C_{44}H_{28}N_4OClAu$ 的元素分析计算值 (%): C, 61.37; H, 3.28; N, 6.51。实测值: C, 61.54; H, 3.17; N, 6.46。

[0085] 对于合成金 -2b, 将 $K[AuCl_4]$ (0.508mmol) 和醋酸钠 (2.538mmol) 在醋酸 (20mL) 中加热至 80℃ 达 15 分钟。逐滴加入含 5-(羟甲基) 苯基-10,15,20-三苯基卟啉 (0.406mmol) 溶于醋酸 (10mL) 溶液。在回流下加热混合物 2h。通过真空去除溶剂之后,将残余物溶于 CH_2Cl_2 (40mL)。将 CH_2Cl_2 溶液用水 ($2 \times 40mL$) 洗涤两次以去除任何未反应的 $KAuCl_4$ 和醋酸钠,并浓缩至约 3mL。在中性 90-氧化铝填充柱上用 CH_2Cl_2 作为洗脱液对其进行色谱分离,以去除未反应的卟啉,随后使用 $CH_2Cl_2/MeOH(99:1, v/v)$ 混合物洗脱金 (III) 络合物。溶剂蒸发后获得红紫色固体,从 $CH_2Cl_2/$ 二乙醚 (1:1, v/v) 混合物中再结晶所述络合物。

[0086] 对于合成金 -2c, 将 $K[AuCl_4]$ (0.508mmol) 和醋酸钠 (2.538mmol) 在醋酸 (20mL) 中加热至 80℃ 达 15 分钟。逐滴加入含 5-(羟乙基) 苯基-10,15,20-三苯基卟啉 (0.406mmol) 的醋酸 (10mL) 溶液。在回流下加热混合物 2h。通过真空去除溶剂之后,将残余物溶于 CH_2Cl_2 (40mL)。将 CH_2Cl_2 溶液用水 ($2 \times 40mL$) 洗涤两次以去除任何未反应的 $KAuCl_4$ 和醋酸钠,并浓缩至约 3mL。在中性 90-氧化铝填充柱上用 CH_2Cl_2 作为洗脱液对其进行色谱分离,以去除未反应的卟啉,随后使用 $CH_2Cl_2/MeOH(99:1, v/v)$ 混合物洗脱金 (III) 络合物。溶剂蒸发后获得红紫色固体,从 $CH_2Cl_2/$ 二乙醚 (1:1, v/v) 混合物中再结晶所述络合物。

[0087] 对于合成金 -2d, 将 $K[AuCl_4]$ (0.508mmol) 和醋酸钠 (2.538mmol) 在醋酸 (20mL) 中加热至 80℃ 达 15 分钟。逐滴加入含 5-(正-羟丙基) 苯基-10,15-20-三苯基卟啉 (0.406mmol) 的醋酸 (10mL) 溶液。在回流下加热混合物 2h。通过真空去除溶剂之后,将残余物溶于 CH_2Cl_2 (40mL)。将 CH_2Cl_2 溶液用水 ($2 \times 40mL$) 洗涤两次以去除任何未反应的 $KAuCl_4$

和醋酸钠,并浓缩至约 3mL。在中性 90-氧化铝填充柱上用 CH_2Cl_2 作为洗脱液对其进行色谱分离,以去除未反应的卟啉,随后使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(99 : 1, v/v)$ 混合物洗脱金(III)络合物。溶剂蒸发后获得红紫色固体,从 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{二乙醚}(1 : 1, v/v)$ 混合物中再结晶所述络合物。

[0088] 对于合成金-2e,将 $\text{K}[\text{AuCl}_4]$ (0.508mmol) 和醋酸钠 (2.538mmol) 在醋酸 (20mL) 中加热至 80°C 达 15 分钟。逐滴加入含 5-(正-羟丁基)苯基-10,15-20-三苯基卟啉 (0.406mmol) 的醋酸 (10mL) 溶液。在回流下加热混合物 2h。通过真空去除溶剂之后,将残余物溶于 CH_2Cl_2 (40mL)。将 CH_2Cl_2 溶液用水 ($2 \times 40\text{mL}$) 洗涤两次以去除任何未反应的 KAuCl_4 和醋酸钠,并浓缩至约 3mL。在中性 90-氧化铝填充柱上用 CH_2Cl_2 作为洗脱液对其进行色谱分离,以去除未反应的卟啉,随后使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(99 : 1, v/v)$ 混合物洗脱金(III)络合物。溶剂蒸发后获得红紫色固体,从 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{二乙醚}(1 : 1, v/v)$ 混合物中再结晶所述络合物。

[0089] 实施例 2:金(III)络合物对人癌细胞产生有效的抗增殖活性

[0090] 使用具有不同基因表达谱和致癌表型的五种类型的人乳腺癌细胞(包括 BT474、MCF-7、T47D、MDA-MB-231 和 SKBR3,其通过引用结合于本文中)评价金-2a 的细胞毒性。结晶紫测定表明,金-2a 分别以 $0.49 \pm 0.17 \mu\text{M}$ 、 $0.08 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 、 $0.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.007 \pm 0.002 \mu\text{M}$ 和 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 的平均 IC_{50} 值抑制全部五种类型细胞的生长 (0.5% FBS 条件,24h 处理;表 1)。高浓度血清的存在不影响药物的效力。相比之下,顺铂的 IC_{50} 值为金-2a 的约 100-3000 倍。当药物暴露时间延长至 48h 时,观察到类似结果。应当注意的是,所有条件下,金-2a 在 MDA-MB-231 细胞中的 IC_{50} 值均比在其它四种类型细胞中低 1-2log。另一方面,金-2a 对非癌性成纤维细胞的效力为对乳腺癌细胞的效力的 1/10-1/600, IC_{50} 为 $4.17 \pm 1.67 \mu\text{M}$ 。亦测试了另一种金(III)卟啉络合物 ($[\text{Au}^{\text{III}}(\text{TPP})]\text{Cl}$, 金-1a) 在 MDA-MB-231 细胞中的抗增殖活性。生长抑制曲线的非线性回归分析显示,金-1a 的效力为金-2a 的约 1/1000。MDA-MB-231 细胞的凋亡通过测定 DNA 断裂来评价。结果显示,金-2a 以剂量依赖和时间依赖的方式显著地增加 DNA 断裂(图 2A)。TUNEL 分析证实,金-2a 处理增加了凋亡细胞的数量(图 2B)。

[0091] 图 2 显示 MDA-MB-231 细胞中金-2a 的诱导凋亡特性。A,将 MDA-MB-231 细胞用 [^3H]-胸苷标记并用金-2a ($0.1 \mu\text{M}$ 或 $1 \mu\text{M}$) 孵育不同时间。如方法中所述测定断裂的 DNA。B,将用或未用金-2a 处理的 MDA-MB-231 细胞进行 TUNEL,以评估凋亡细胞的数量。显示相差和荧光代表性图像二者。C,对于每个样品,在八个随机区域中计算 TUNEL 阳性细胞的数量并取平均值。*,相对于溶媒对照 $P < 0.05$, $n = 5$ 。

[0092] 金-2b、金-2c、金-2d 和金-2e 的抗增殖活性测试通过对金-2a 所述的相同测试来进行。发现金-2b、金-2c、金-2d 和金-2e 对 MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} 值分别为 $0.2 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、 $0.16 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、 $0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 和 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 。

[0093] 除乳腺癌之外,亦确定了金-2a 对人子宫颈上皮样癌 (HeLa)、肝细胞癌 (HepG2)、白血病 (HL-60)、鼻咽癌 (SUNE1)、黑素瘤 (B16) 和肺癌的细胞毒性;发现相应的 IC_{50} 值分别为 $0.08 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.21 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、 $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、 $0.31 \pm 0.09 \mu\text{M}$ 和 $0.22 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 。

[0094] 表 1. 不同人乳腺癌细胞中金-2a 和顺铂的抗增殖活性

药物	处理时间 (小时)	条件	IC ₅₀ (μM)					
			BT474	MCF7	MDA-MB-231	SKBR3	T47D	
[0095] 金-2a	24	0.5% FBS	0.49 ± 0.17	0.08 ± 0.04	0.007 ± 0.002	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	
		10% FBS	0.39 ± 0.18	0.16 ± 0.08	0.003 ± 0.008	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.03	
	48	0.5% FBS	0.15 ± 0.07	0.07 ± 0.04	0.004 ± 0.001	0.07 ± 0.002	0.02 ± 0.01	
		10% FBS	0.12 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.001 ± 0.006	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	
	顺铂	24	0.5% FBS	49.0 ± 0.50	14.3 ± 1.46	7.37 ± 1.19	65.9 ± 25.5	66.5 ± 12.4
			10% FBS	45.1 ± 8.20	20.1 ± 4.92	21.0 ± 11.2	76.3 ± 33.8	99.4 ± 5.71
48		0.5% FBS	1.60 ± 0.53	10.1 ± 1.47	6.52 ± 0.48	33.9 ± 11.0	7.76 ± 5.54	
		10% FBS	2.89 ± 0.90	15.9 ± 2.33	18.4 ± 3.42	41.0 ± 7.91	6.69 ± 3.14	

[0096] 实施例 3:管内递送金-2a 有效地减少裸小鼠中乳腺 MDA-MB-231 肿瘤生长

[0097] 为了评价金-2a 的体内抗肿瘤作用,将 MDA-MB-231 细胞植入无胸腺裸小鼠中,以及对治疗测试不同的药物剂量。每两周一次腹膜内施用金-2a(1.5、3.0 和 6.0mg/kg) 直到五周剂量依赖地减少肿瘤生长。然而,尽管该动物良好地耐受治疗,但仍不能达到完全的肿瘤抑制。相反,通过管内注射来将金-2a(15mg/kg) 的两次推注施用进入肿瘤异种移植,导致 50% 的动物在初始植入后 2 周完全的肿瘤减退(图 3A)。大多数动物维持无肿瘤状态直到第 25 天,在该天观察到肿瘤复发。与金-2a 相比,管内递送相同剂量的顺铂以小得多的程度减少肿瘤生长的速率。值得注意的是,顺铂治疗组中约 40% 的动物在两次注射后死亡,而 PET 对照和金-2a 治疗组的动物在实验期间保持存活(图 3B)。经金-2a 和顺铂治疗的小鼠二者的体重均比 PET 对照组略低(图 3C)。金-2a 和顺铂组的平均肿瘤重量分别为 0.17g 和 0.42g,其与对照组相比减轻了 73% 和 34%(图 3D)。

[0098] 图 3 显示金-2a 对裸小鼠中肿瘤生长的抑制特性。如方法中所述将 MDA-MB-231 细胞接种到裸小鼠的乳房脂肪垫中。在第 7 天和第 11 天将金-2a、顺铂或 PET 对照局部地注入肿瘤部位。每两周一次监测肿瘤生长(A) 和体重(B)。C, 计算和绘制存活曲线的 Kaplan-Meier 估计值。D, 在实验最后,收集肿瘤并称重。# 和 *, 相对于 PET 对照 P < 0.05, n = 4-6。

[0099] 实施例 4:金-2a 通过转录调节使 MDA-MB-231 细胞中的 Wnt/β- 联蛋白信号传导钝化

[0100] Wnt/β- 联蛋白信号传导的异常激活在许多癌症疾病的形成中起关键作用。已

在大部分人乳腺肿瘤中观察到 β -联蛋白蛋白质的胞内积累。在 0.5% 和 10% FBS 两种培养条件下,金-2a 均早在处理后四小时降低 MDA-MB-231 细胞中 β -联蛋白的蛋白质水平。金-2a 亦显著地降低 β -联蛋白的核转录活性。与之相反,顺铂对 β -联蛋白的蛋白质水平和核活性均无影响。缺少 Wnt 信号时,糖原合酶激酶 3 β 将 β -联蛋白磷酸化,这促进随后的遍在蛋白化和蛋白酶体降解。然而,金-2a 处理未改变 β -联蛋白的相对磷酸化或遍在蛋白化水平,且对蛋白酶体活性无明显影响。此外,从金-2a 处理后六小时起观察到 Akt 和 GSK-3 β 的磷酸化减少,这迟于对 β -联蛋白蛋白水平的作用。为了说明金-2a 的细胞毒性机制和主要靶标,进行 ICP-MS 监测此络合物的胞内定位。结果表明,金-2a 迅速 (30min 之内) 进入 MDA-MB231 细胞的胞核并在拟核部分富集。

[0101] β -联蛋白胞内水平的下降可经由失去 Wnt 信号诱导的稳定而触发。事实上,我们的定量 PCR 分析显示,金-2a 处理时间依赖和剂量依赖地改变数种 Wnt 信号分子 (包括 WNT1、WNT5B、WIF1、WISP1 和 CTNNB1) 的 mRNA 表达 (图 4)。例如,金-2a 处理很大程度上阻断 WNT1 的表达,却极大地增加 WIF1 的 mRNA 水平。早在两小时观察到 WIF1 的显著增量调节 (超过 80 倍),且刺激作用在 24 小时疗程期间持续。WISP1 的 mRNA 水平在金-2a 处理后迅速降低到不可检测的水平。从处理六小时起观察到金-2a 对 CTNNB1 和 WNT5B 表达的显著影响。WNT1、WNT5B、WIF1 和 WISP1 的蛋白质表达也显示了类似的变化趋势 (图 4)。这些结果指出,金-2a 可能通过调节 Wnt/ β -联蛋白信号分子的基因转录来引发其抗增殖作用。

[0102] 图 4 显示金-2a 处理差异地调节 Wnt 途径中信号分子的表达。在血清饥饿 24 小时后,在正常培养基中用 0.1 或 1 μ M 金-2a 处理 MDA-MB-231 细胞。在不同的时间点收获细胞用于定量 RT-PCR 分析。将 WNT1、WISP1、WNT5B、WIF1 和 CTNNB1 的相对 mRNA 丰度对 18S rRNA 标准化并计算为与未处理细胞相比的倍数变化。# 和 *, 分别为 0.1 μ M 和 1 μ M 金-2a 处理相对于溶媒对照的 $P < 0.05$, $n = 3$ 。亦用特异性抗体进行蛋白质印迹以评估相同基因集合的相对蛋白质丰度。使用 β -肌动蛋白作为上样对照。

[0103] 实施例 5:金-2a 充当选择性 HDAC 抑制剂在涉及 Wnt/ β -联蛋白信号传导的基因的启动子区调节组蛋白乙酰化

[0104] 上述结果表明,金-2a 可选择性地增强 WIF1 和非典型 WNT5B 的基因表达,但抑制 WNT1、CTNNB1 和 WISP1 的基因表达。表观遗传调控 (例如 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化) 代表在癌症形成期间 Wnt 信号传导异常激活的重要机制。例如,可通过启动子甲基化使 WIF1 沉默。然而,甲基化特异性 PCR 和亚硫酸氢盐测序均显示,金-2a 处理未改变 WIF1 启动子近侧区的甲基化。另一方面,图 5 中的结果表明,金-2a 表现出对 HDAC (组蛋白脱乙酰酶) 酶活性的有效抑制作用,HDAC 为使染色质组蛋白脱乙酰基的动态转录调节剂。用金-2a 进行的体内处理引起 MDA-MB-231 细胞中 HDAC 活性的迅速下降 (图 5A)。通过将金-2a 与来源于未处理 MDA-MB-231 细胞的核提取物共孵育也可观察到所述抑制作用 (图 5B)。此外,HDAC 抑制与孵育时间成比例,且金-2a 的效力与曲古抑菌素 A (TSA) 的效力相当,曲古抑菌素 A 为多种 HDAC 的特异性抑制剂。为了测试金-2a 可否充当某些类型的 HDAC 的优先抑制剂,将单个 HDAC (HDAC1 至 HDAC9) 从 MDA-MB-231 细胞中免疫沉淀并与金-2a 孵育。应当注意的是,此络合物能够抑制所有 I 类 HDAC (包括 HDAC1、2、3 和 8) 的活性 (图 5C),但不抑制其它 HDAC 的活性。

[0105] 图 5 显示金 -2a 抑制 I 类组蛋白脱乙酰酶活性。A, 用不同剂量的金 -2a 处理 MDA-MB-231 细胞 2、4 和 6 小时。收集核裂解物并如方法中所述测定 HDAC 活性。计算 IC_{50} 并列于表中。B, 将 MDA-MB-231 细胞的核裂解物与金 -2a 孵育达不同的时间点并如上测定 HDAC 活性。计算 IC_{50} 并列于表中。C, 将 HDAC1、2、3 和 4 的免疫沉淀复合物与不同浓度的金 -2a 孵育一小时并在处理的最后测定 HDAC 活性。n = 4, 结果来自三个独立测定。

[0106] 为了进一步证实这些出乎意料的结果, 进行 ChIP-PCR 以定量在上述基因启动子区的乙酰化组蛋白 H4 水平。如图 6 中所示结果, 用金 -2a 进行的处理增强了乙酰化组蛋白 H4 与 WIF1 和 WNT5B 启动子的结合。与之相反, 在金 -2a 处理后在 WNT1 启动子观察到乙酰化组蛋白 H4 的减少。相比之下, TSA 对这三个基因无显著作用, 但其增强乙酰化组蛋白 H4 与雌激素受体 α (ESR1) 的启动子的结合。金 -2a 或 TSA 处理未显著改变乙酰化组蛋白 H4 与 β - 联蛋白基因 (CTNNB1) 和 WISP1 的启动子的结合。蛋白质印迹分析显示 TSA 显著诱导组蛋白 H4 乙酰化, 这早在处理后六小时发生 (图 6)。金 -2a 较小地影响总体组蛋白 H4 乙酰化。仅在处理后 24 小时观察到类似的乙酰化组蛋白 H4 水平。

[0107] 图 6 显示金 -2a 在 Wnt 信号分子的启动子区调节组蛋白 H4 的乙酰化状态。用不同的药物处理 MDA-MB-231 细胞 24 小时。利用识别在赖氨酸 5、8、12 和 16 上乙酰化的组蛋白 H4 的抗体, 进行 ChIP-PCR 以分析 CTNNB1、WIF1、WNT5B、WNT1、WISP1 和 ESR1 启动子区的乙酰化组蛋白 H4 水平。直方图表示针对输入 DNA 进行标准化之后的实时 PCR 分析的定量结果。底部显示了代表性的琼脂糖凝胶图像。进行蛋白质印迹以分析用 TSA 或金 -2a 分别处理 6 和 24 小时的 MDA-MB-231 细胞中总体乙酰化组蛋白 H4 (Ace-H4) 水平。通过酰胺黑染色确证相等的蛋白质上样。*, 相对于溶媒对照的 $P < 0.01$, n = 3。

[0108] 在 I 类 HDAC 的四个成员之中, 尽管 HDAC2 存在于 ESR1 的启动子处, 但是在全部五种 Wnt 途径基因的启动子处均未能检测到 HDAC2。在这些基因的启动子区处, HDAC1、HDAC3 和 HDAC8 的丰度高度可变 (图 7)。与其它启动子相比, HDAC1 更大量地与 WNT5B 缔合。HDAC3 不与 WNT5B 启动子缔合。HDAC3 和 HDAC8 在 WIF1 启动子处的量比其它四种基因高得多。最高和最低的缔合可相差多达 10,000 倍。据此信息, 低于 10 的显著倍数增加可能没有生物学重要性。另一方面, 金 -2a 较大程度地引发对不同 HDAC 与 WIF1、WNT1、WNT5B 和 CTNNB1 启动子缔合的抑制作用。在用 $1 \mu M$ 金 -2a 处理的样品中, WIF1 和 WNT5B 启动子处的 HDAC1 分别显著地减少了 54 和 164 倍; WIF1、WNT1 和 CTNNB1 启动子处的 HDAC3 分别减量调节了 193、23 和 162 倍; 亦发现 HDAC8 与 WIF1 启动子的结合减量调节了约 300 倍。

[0109] 图 7 显示金 -2a 差异地调节 I 类 HDAC 与五种 Wnt 信号分子启动子区的缔合。在已用或未用指定浓度的药物化合物处理 24 小时的 MDA-MB-231 细胞中进行 ChIP-PCR。如方法中所述通过实时 PCR 分析来定量 HDAC1 (A)、HDAC3 (B) 和 HDAC8 (C) 的缔合。左图: 比较了与单个基因启动子区结合的每种 HDAC 的量, 并计算为相对于 WIF1 的倍数变化以反映它们的相对丰度。y 轴为对数刻度。右图: 定量了 HDAC1、HDAC3 或 HDAC8 与 WIF1、WNT1、WNT5B、CTNNB1 和 WISP1 启动子的缔合, 并相对于溶媒对照样品进行计算。*, $P < 0.01$, n = 3。注意到所有增加值均低于 10 倍, 在此处不考虑。

[0110] 为了了解金 -2a 如何与 I 类 HDAC 相互作用, 通过使用 ICM-Pro3.6-1 分子软件 (Molsoft, <http://www.molsoft.com>) 的柔性配体对接模块来进行对接研究。因为在 I 类 HDAC 之中仅可得到 HDAC8X- 射线晶体结构, 所以使用 HDAC8 与 TSA 的共复合体晶体结构

(PDB 代码:1T64) (<http://www.rcsb.org>) 用于分子对接。低能金-2a 构象的比较分析表明,金-2a 结合的优选位点在 HDAC8 的结合袋表面(图 8C-E),并具有强烈的结合相互作用(如 -9.67kcal/mol 的结合能所反映)。作为参照,已知 HDAC 抑制剂 TSA 的分子对接显示了 -10.28kcal/mol 的相互作用能(图 8A),当与 TSA 的共复合体 X-射线晶体结构(PDB 代码:1T64)的位置相比时,均方根偏差(RMSD)在 1.0 \AA 以内。此外,已报道 HDAC 抑制剂环四肽的分子对接显示了 -7.78kcal/mol 的相互作用能,且四肽中的长的无环链埋藏于 11 \AA 通道之内(图 8B)。不同于 TSA 和环四肽的结合模式,金-2a 的侧链不会埋藏于 11 \AA 通道之内,且金-2a 的最低能量结合状态(pose)通过以下来表征:卟啉环基序填充疏水袋并在 4 \AA 之内与氨基酸残基 Tyr100、Gly151、Phe152、His180、Pro273、Met274 紧密接触,以及金-2a 的 OH 基团指向 HDAC8 的 14 \AA 内腔(图 8E),这进而阻塞 HDAC8 14 \AA 内腔的出口。

[0111] 图 8 显示不同 HDAC8-HDACi 复合体的分子图示。将 TSA(A) 和金-2a(B) 的对接模型显示为 HDAC8 中的低能量状态(带状形式)。将两种药物均描绘为球棍模型(stick model)。

[0112] 就给定特征的任何数值或数值域而言,可将来自一个值域的数值或参数与来自同一特征的不同值域的另一数值或参数组合,以产生数值域。

[0113] 除非在工作实施例中或在另有说明的情况下,否则在说明书和权利要求中使用的涉及成分、反应条件等的量的所有数字、值和 / 或表达式,应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。

[0114] 尽管已联系某些实施方案解释本发明,但要理解的是,在阅读说明书后,其各种修改对本领域技术人员而言变为显而易见的。因此,要理解的是,意图本文公开的发明涵盖落入所附权利要求的范围之内的这类修改。

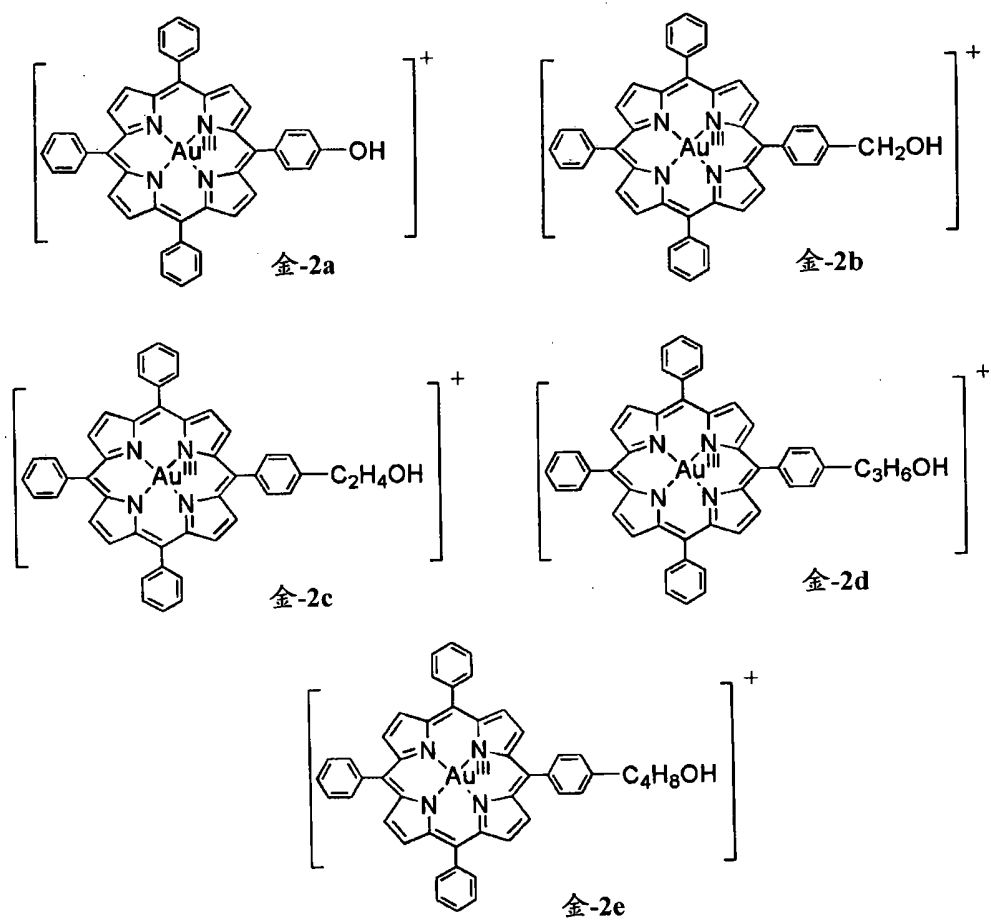


图 1

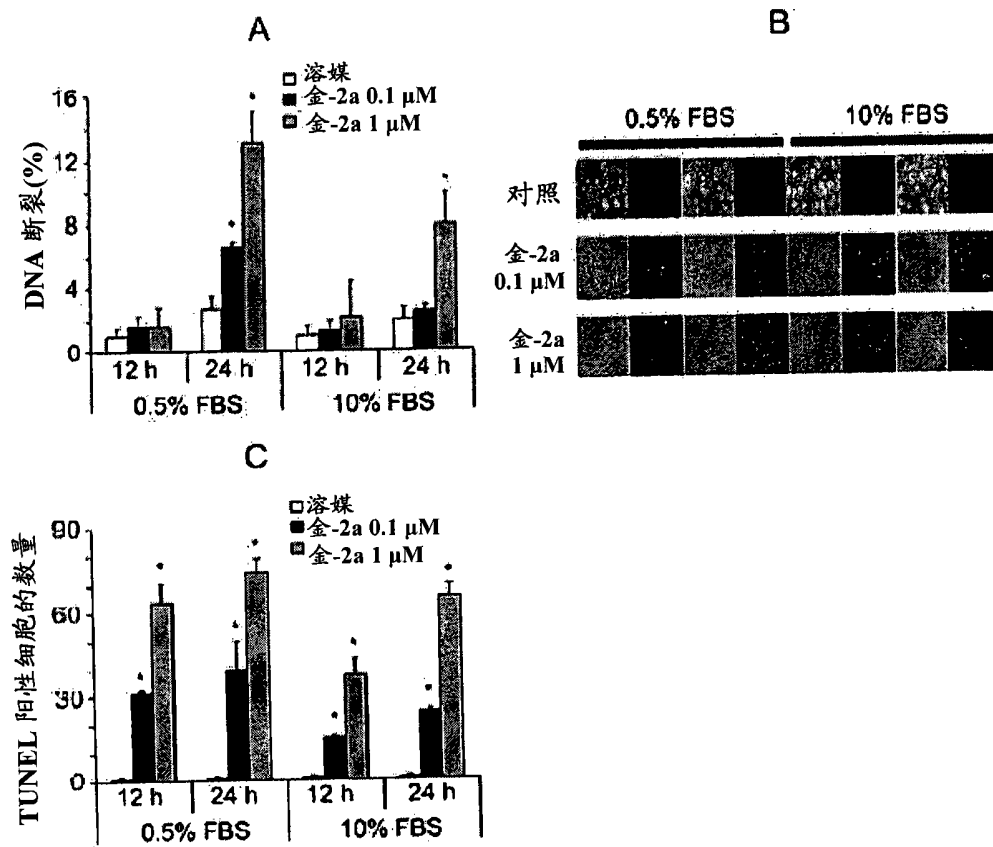


图 2

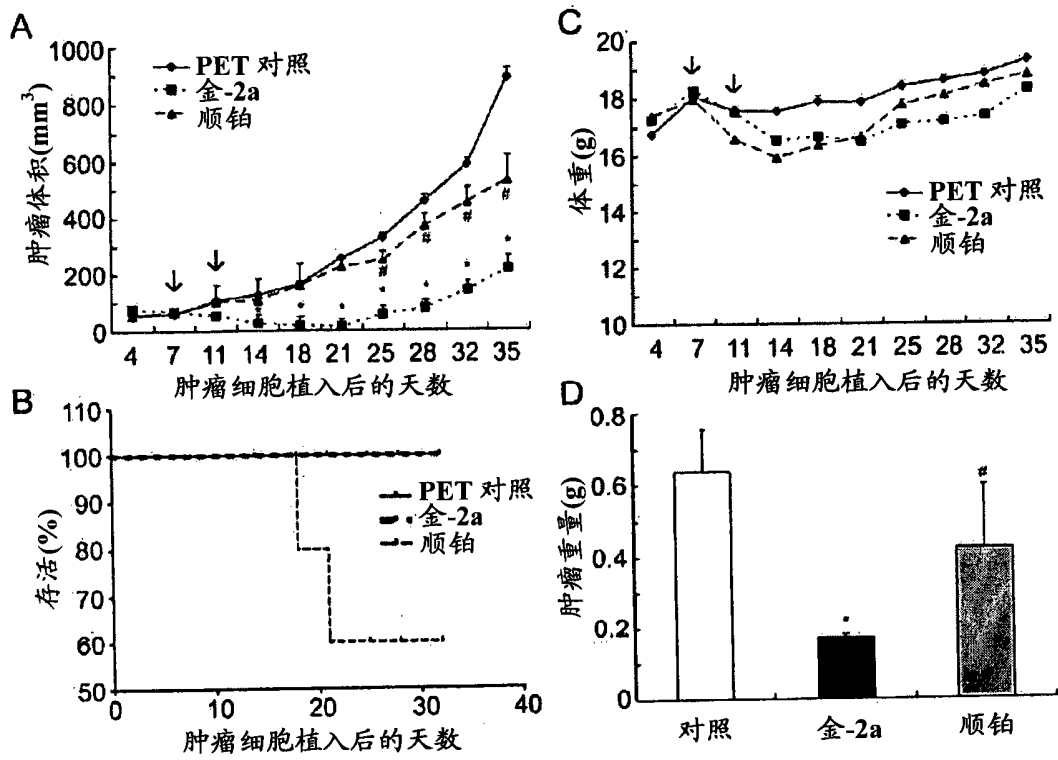


图 3

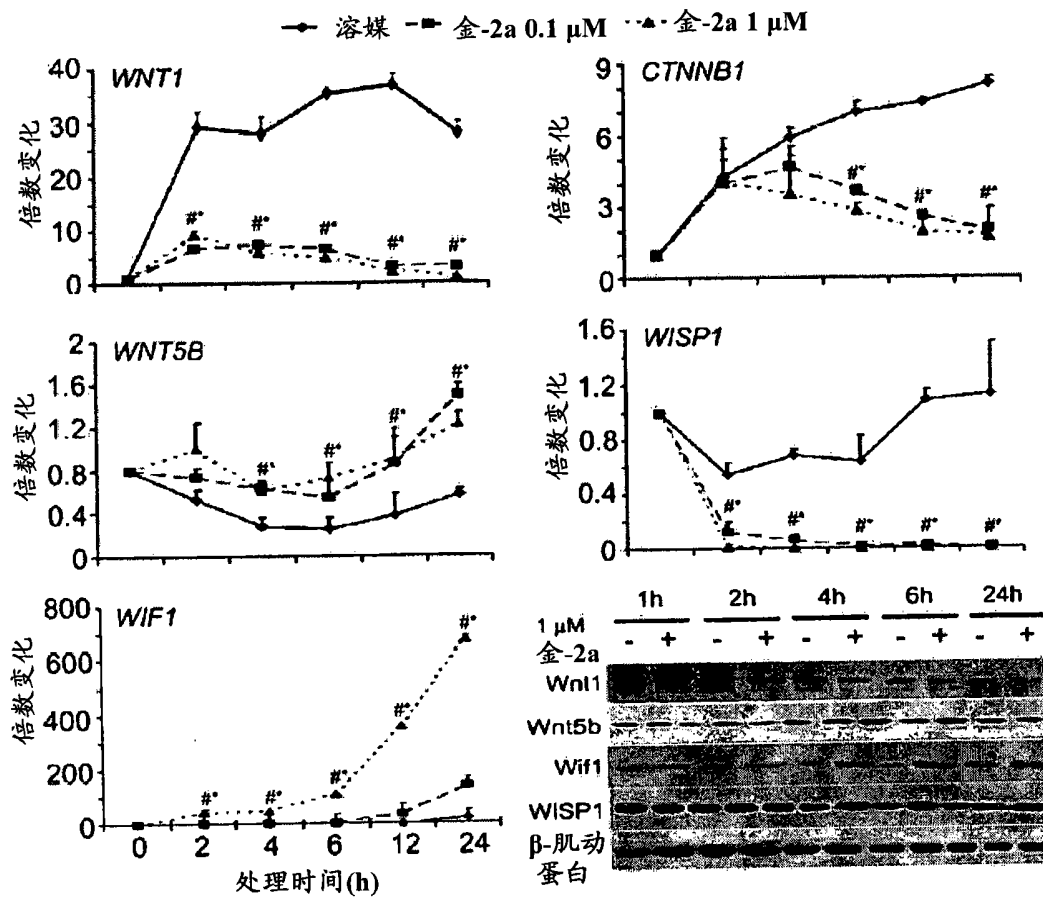


图 4

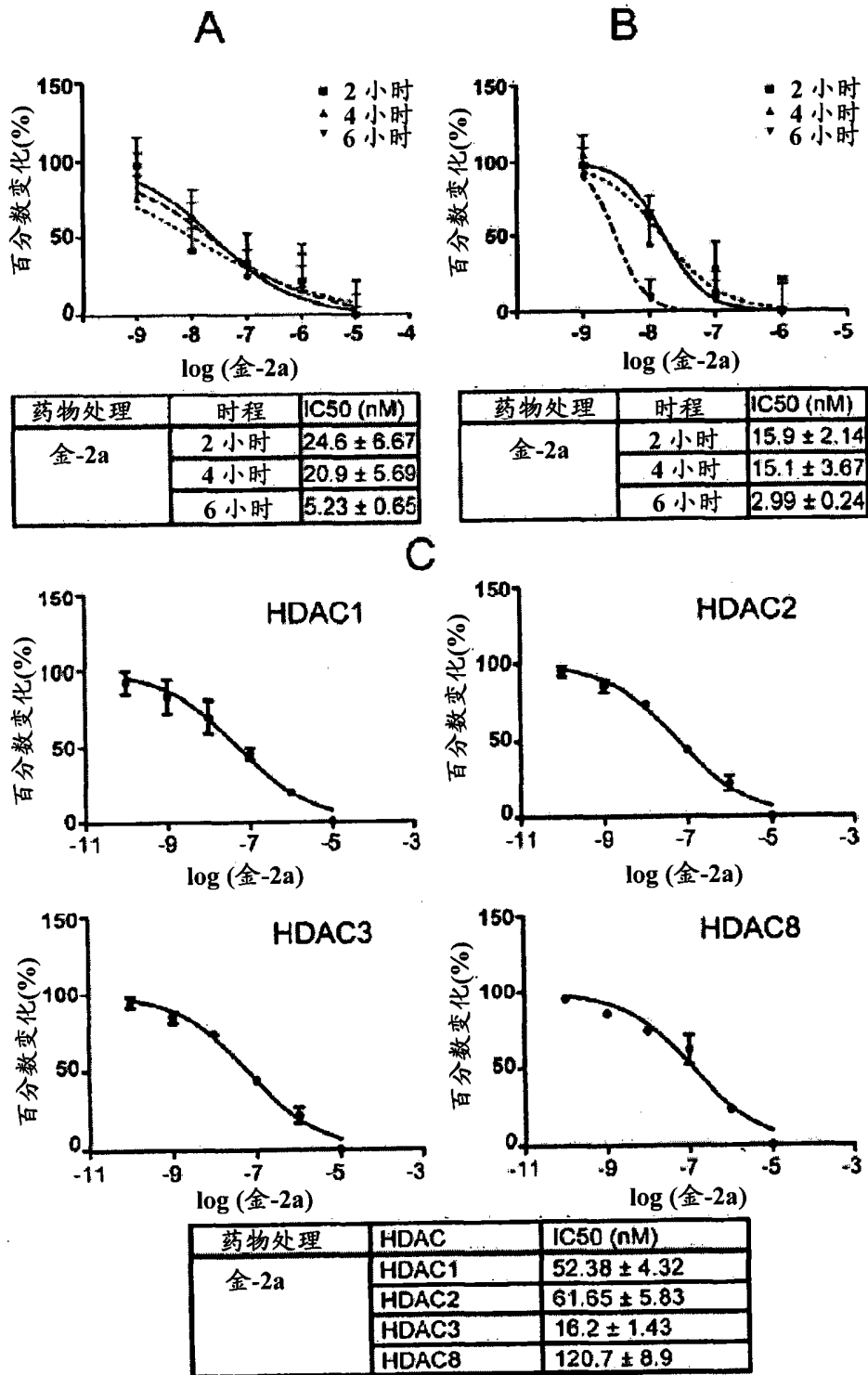


图 5

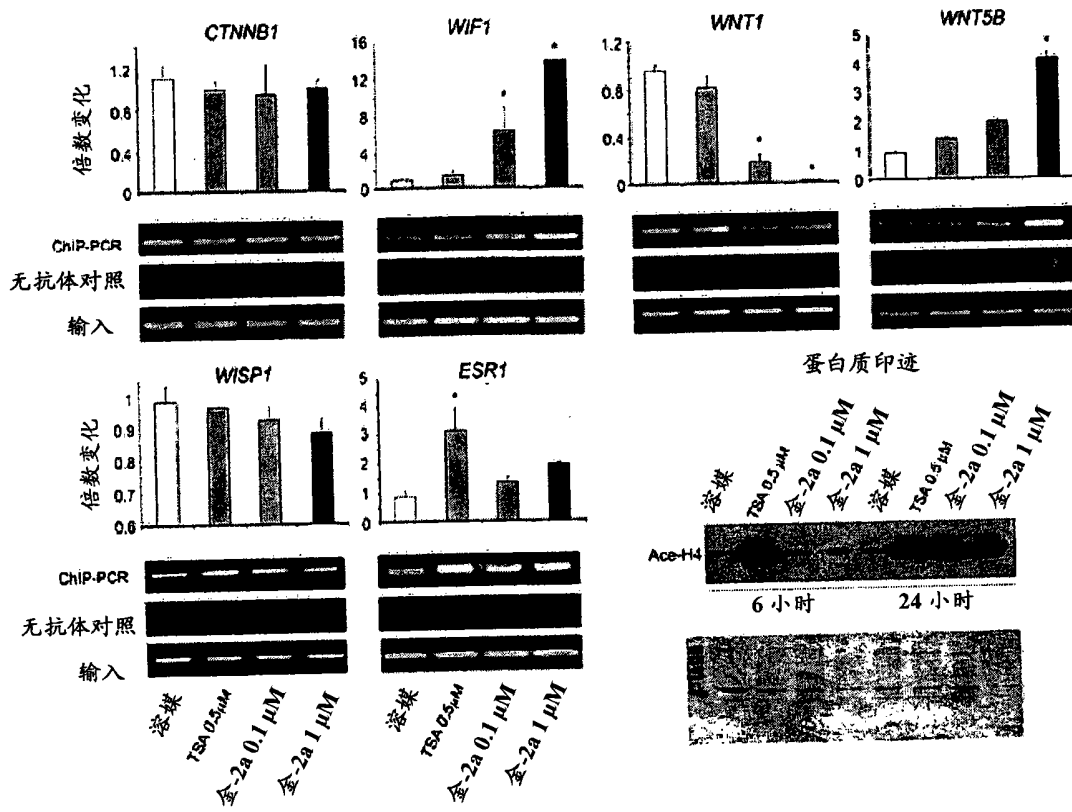


图 6

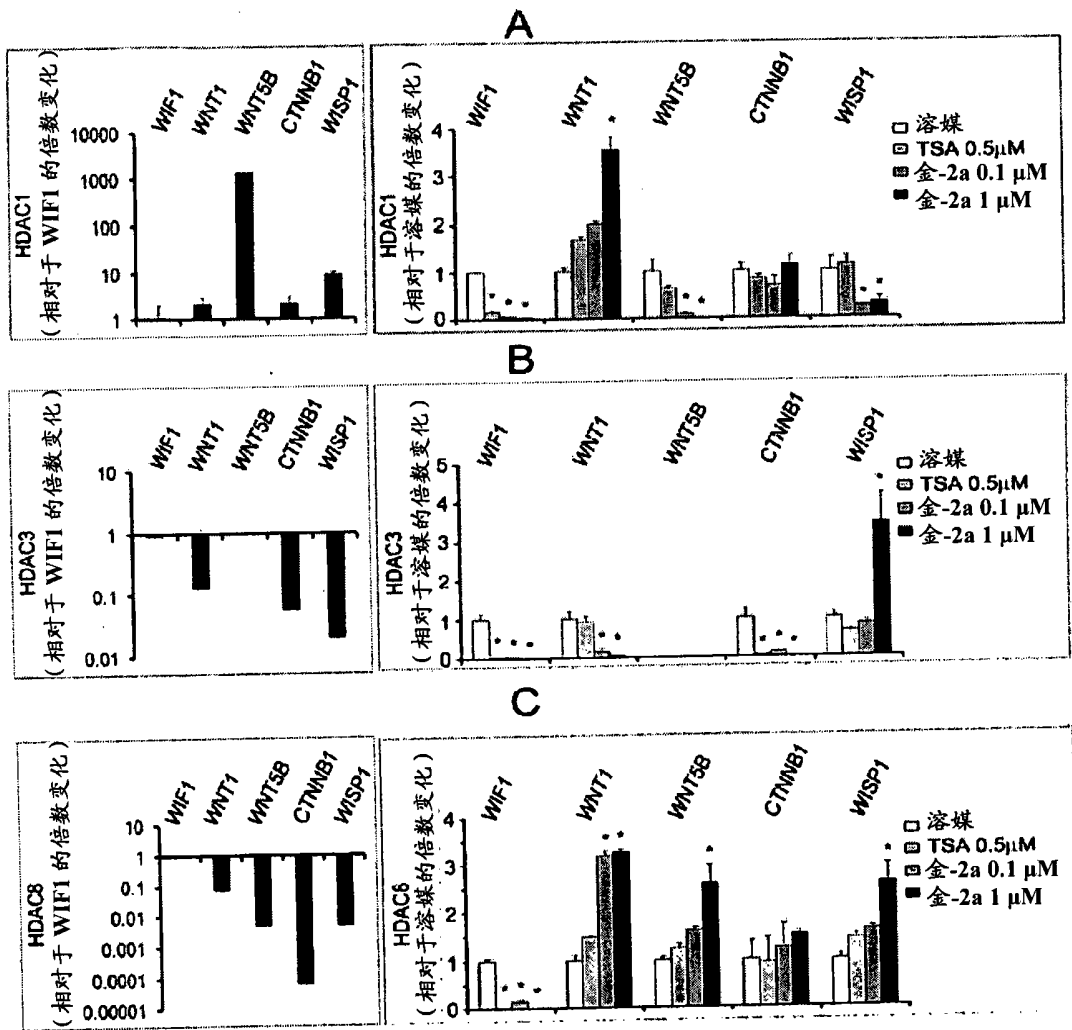


图 7

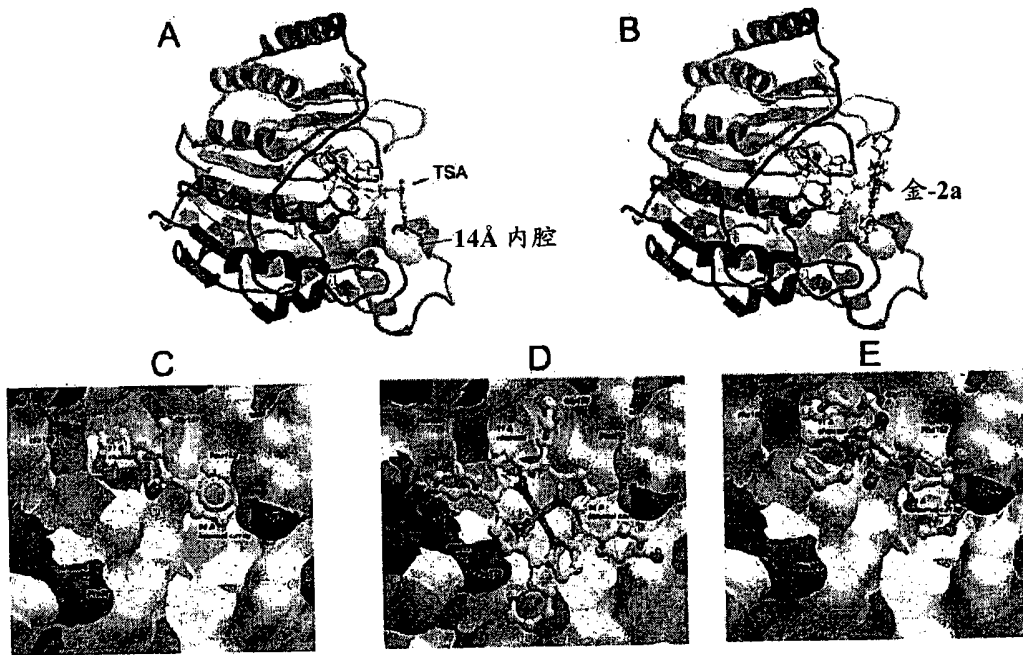


图 8