



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107698632 B

(45)授权公告日 2020.04.07

(21)申请号 201710944733.4

C07H 1/00(2006.01)

(22)申请日 2017.10.12

A61K 31/7034(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107698632 A

(56)对比文件

US 2017143845 A1,2017.05.25,

CN 106389359 A,2017.02.15,

Abdessamad El Alaoui,等.New Taxol

(paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and PMT strategies in cancer

chemotherapy.《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2006,第14卷第5012-5019页.

(43)申请公布日 2018.02.16

(73)专利权人 杭州医学院

地址 310000 浙江省杭州市滨江高教园区滨文路481号

审查员 严彤

(72)发明人 杜文婷 谢妙红 邵静静 杜绍能

张乾 金俏柔

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11371

代理人 吴开磊

(51)Int.Cl.

C07H 15/203(2006.01)

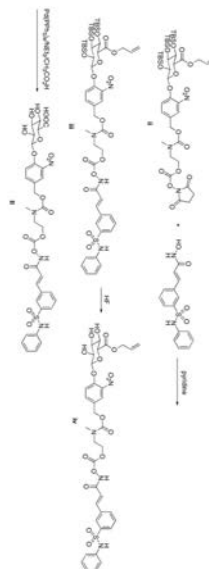
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

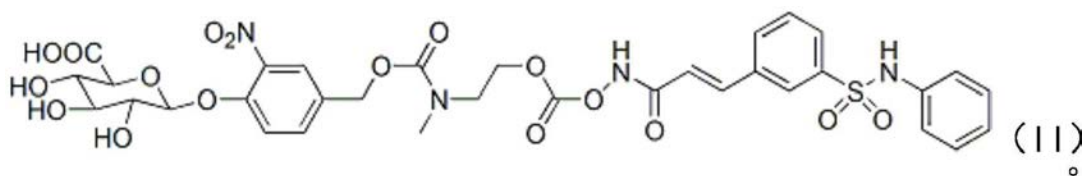
一种基于乙酸的贝利司他衍生物及其制备方法和应用

(57)摘要

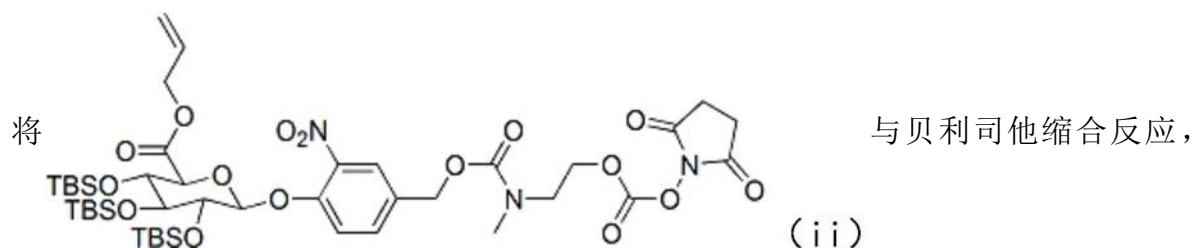
本发明提供了一种基于乙酸的贝利司他衍生物及其制备方法和应用。本发明所提供的基于乙酸的贝利司他衍生物以具有肿瘤抑制活性的贝利司他为母体药物,并通过水溶性取代基以改善贝利司他的溶解性,从而使得所得贝利司他衍生物具有良好的水溶性,并能够有效解决贝利司他所带来的副作用,同时还能够进一步用于制备肿瘤治疗药物。同时,本发明制备方法制备流程少、操作步骤简便,适于规模化生产等。



1. 一种基于乙酸的贝利司他衍生物,其特征在于,所述基于乙酸的贝利司他衍生物结构如下:



2. 权利要求1所述的基于乙酸的贝利司他衍生物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括如下步骤:



然后脱除保护基团,即得到所述的贝利司他衍生物。

3. 权利要求1所述的基于乙酸的贝利司他衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为皮肤T细胞淋巴瘤。
5. 包含权利要求1所述的基于乙酸的贝利司他衍生物的药物或药物组合物。

## 一种基于乙酸的贝利司他衍生物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗肿瘤药物领域,具体而言,涉及一种基于乙酸的贝利司他衍生物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 贝利司他(BELEODAQ®)属于羟肟酸类组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)。由于组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的过度表达或异常调控会使得组蛋白过度去乙酰化,进而使得染色质被重塑为抑制转录的构型,引起相应基因表达下降,导致癌变的产生。因此,对HDAC的抑制作用被认为是具有发展前景的抗癌药物靶标。贝利司他可以直接作用于基因异常表达这一环节,从而抑制和纠正肿瘤细胞过度增殖、异常分化,针对常见的耐药问题,还可以与其他作用机制的药物联合用药。贝利司他能有效抑制结肠癌、肺癌、卵巢癌、骨髓瘤等实体瘤细胞的增殖,对白血病和淋巴瘤等血液系统的恶性肿瘤也有治疗作用。

[0003] 贝利司他在2014年作为复发性和难治性外周T细胞淋巴瘤的治疗药物被FDA批准上市。尽管在癌症治疗效果上受到了广泛的认可,但在实际应用和发展的过程中,贝利司他还是受到了低水溶性(0.14mg/mL)的限制。在规定的浓度或生理pH条件下,为维持体内药物浓度而配制的贝利司他冻干粉针剂在使用时会产生恶心、呕吐、乏力、发烧、贫血等不良反应,甚至还会导致包括肝衰竭、血小板减少、肌酸酐上升、胃肠道毒性、肺炎、肿瘤溶解综合征、多器官衰竭等严重的副作用(具体可参见:[www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/2062561b1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/2062561b1.pdf))。因此,改善贝利司他水溶性,减少不良反应,成为保证其抗肿瘤化学治疗得以继续的关键。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种基于乙酸的贝利司他衍生物,所述的乙酸的贝利司他衍生物具有良好的水溶性,在药用浓度条件下不会产生副作用。

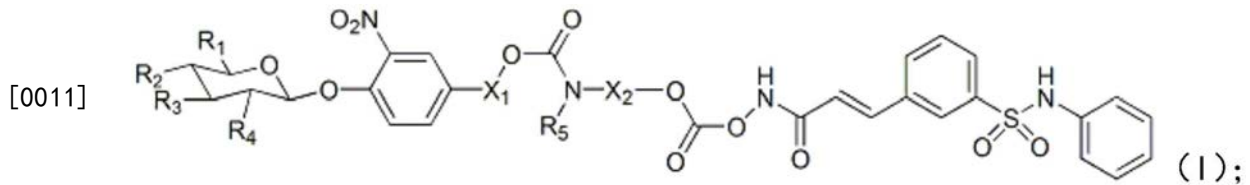
[0006] 本发明的第二目的在于提供一种所述的基于乙酸的贝利司他衍生物的制备方法,该方法具有制备流程少、操作步骤简便,适于规模化生产等优点。

[0007] 本发明的第三目的在于提供一种所述的基于乙酸的贝利司他衍生物在制备肿瘤治疗药物中的应用。

[0008] 本发明的第四个目的在于提供一种包含所述的基于乙酸的贝利司他衍生物的药物或药物组合物。

[0009] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0010] 一种基于乙酸的贝利司他衍生物,所述基于乙酸的贝利司他衍生物结构如下:

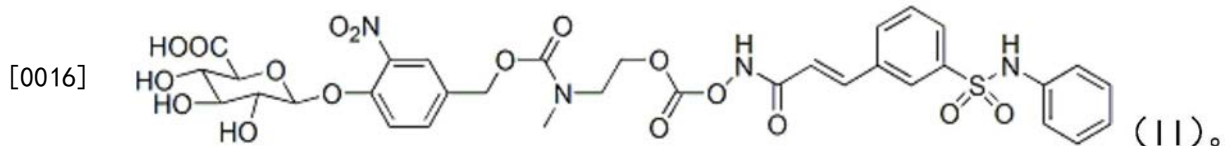


[0012] 其中,式(I)中, $R_1$ - $R_4$ 分别独立的为氢、羟基或者羧基,且 $R_1$ - $R_4$ 中至少有一个为羟基或羧基; $R_5$ 为氢,或者C1-C20的取代或未取代的烷基; $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C20的取代或未取代的亚烷基。

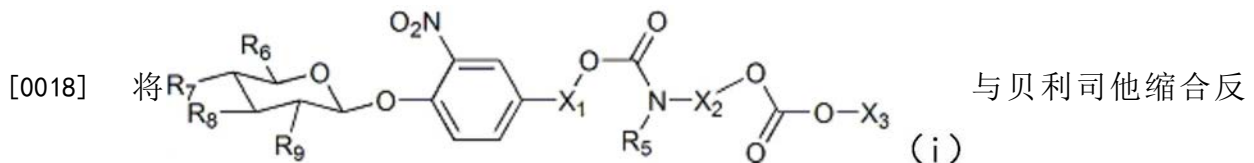
[0013] 优选的,本发明所述基于乙酸的贝利司他衍生物的式(I)中, $R_1$ - $R_4$ 分别独立的为羟基或羧基; $R_5$ 为氢,或者C1-C12的取代或未取代的烷基; $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C12的取代或未取代的亚烷基。

[0014] 优选的,本发明所述基于乙酸的贝利司他衍生物的式(I)中, $R_1$ - $R_4$ 中至少有一个羟基和一个羧基; $R_5$ 为C1-C6的取代或未取代的烷基; $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C6的取代或未取代的亚烷基。

[0015] 优选的,本发明所提供的基于乙酸的贝利司他衍生物的结构如下:



[0017] 同时,本发明还提供了所述的基于乙酸的贝利司他衍生物的制备方法,所述制备方法包括如下步骤:



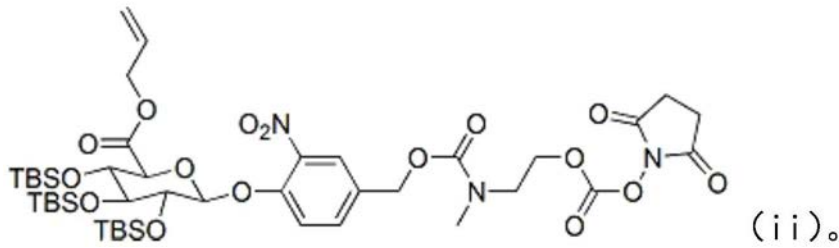
应,然后脱除保护基团,即得到所述的贝利司他衍生物;其中,式(i)中, $R_6$ - $R_9$ 分别独立的为氢、受保护的羟基或者受保护的羧基,且 $R_6$ - $R_9$ 中至少有一个为受保护的羟基或受保护的羧基; $R_5$ 为氢,或者C1-C20的取代或未取代的烷基; $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C20的取代或未取代的亚烷基; $X_3$ 为琥珀酰亚胺基。

[0019] 优选的,本发明所述基于乙酸的贝利司他衍生物的制备方法中,所述 $R_6$ - $R_9$ 分别独立的为受保护的羟基或者受保护的羧基; $R_5$ 为氢,或者C1-C12的取代或未取代的烷基; $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C12的取代或未取代的亚烷基; $X_3$ 为琥珀酰亚胺基。

[0020] 优选的,本发明所述基于乙酸的贝利司他衍生物的制备方法中,所述 $R_6$ - $R_9$ 分别独立的为受保护的羟基或者受保护的羧基,且 $R_6$ - $R_9$ 中至少有一个受保护的羟基和一个受保护的羧基; $R_5$ 为或者C1-C6的取代或未取代的烷基; $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C6的取代或未取代的亚烷基; $X_3$ 为琥珀酰亚胺基。

[0021] 优选的,本发明所述基于乙酸的贝利司他衍生物的制备方法中,所述式(i)结构具体如下:

[0022]



[0023] 同时,本发明还提供了所述的基于乙酸贝利司他衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用;优选的,所述肿瘤为皮肤T细胞淋巴瘤。

[0024] 进一步的,本发明也提供了包含所述的基于乙酸的贝利司他衍生物的药物或药物组合物。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0026] (1) 本发明中,以具有肿瘤抑制活性的贝利司他为母体药物,并通过水溶性取代基以改善贝利司他的溶解性,从而使得所得贝利司他衍生物具有良好的水溶性,且能够保持原药良好的肿瘤抑制活性;同时,本发明贝利司他衍生物的肿瘤抑制活性不会受到酶的影响,能够作为肿瘤治疗药物使用,并能够解决贝利司他由于水溶性差所导致的实际药用中所存在的副作用等问题;

[0027] (2) 本发明制备方法中,所用原料简便易得,而且反应流程步骤少,同时无需复杂的操作,也无需使用大型仪器设备,适于规模化生产,也能够有效控制药物成本,并降低患者的用药负担。

## 附图说明

[0028] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0029] 图1为本发明实施例反应流程示意图。

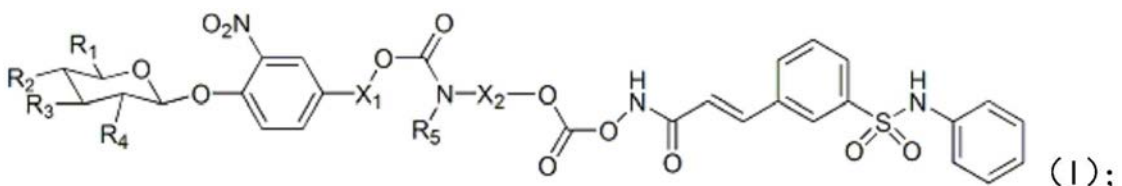
## 具体实施方式

[0030] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0031] 有鉴于贝利司他由于水溶性所导致的实际应用过程中的用药困难,本申请特提供了一种新型贝利司他衍生物,从而明显提高贝利司他的水溶性,使其应用更加便捷,并减少副作用的产生。

[0032] 具体的,本发明所提供的基于乙酸的贝利司他衍生物的结构如下:

[0033]



[0034] 而由如上式(I)的结构可知,本发明所提供的基于乙酸的贝利司他衍生物,是在贝

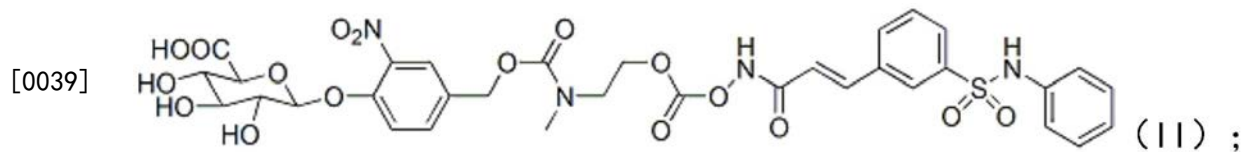
利司他母核的羟肟酸位置上,通过连接引入水溶性基团所得到的新型结构、基于乙酸的贝利司他化合物;

[0035] 其中,式(I)中, $R_1$ - $R_4$ 分别独立的为氢、羟基,或羧基,同时, $R_1$ - $R_4$ 中至少有一个羟基或羧基;优选的, $R_1$ - $R_4$ 分别独立的为羟基或羧基;更优选的, $R_1$ - $R_4$ 中至少有一个羟基和一个羧基,例如,可以 $R_1$ 为羧基、 $R_2$ - $R_4$ 为羟基;或者,可以 $R_4$ 为羧基、 $R_1$ - $R_3$ 为羟基;又或者,可以 $R_1$ 为羟基, $R_2$ - $R_4$ 为羧基;又或者, $R_4$ 为羟基, $R_1$ - $R_3$ 为羧基;又或者, $R_1$ 、 $R_4$ 为羧基、 $R_2$ 、 $R_3$ 为羟基;又或者, $R_1$ 、 $R_4$ 为羟基、 $R_2$ 、 $R_3$ 为羧基等;

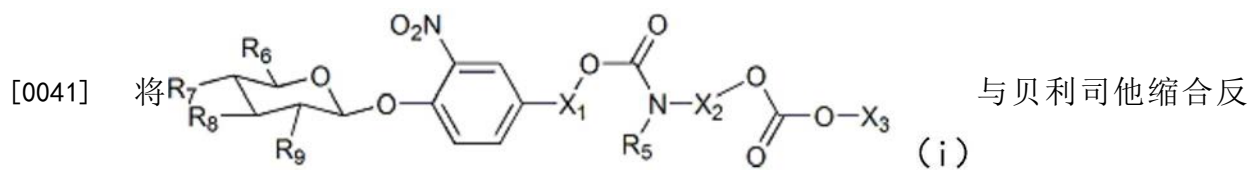
[0036]  $R_5$ 为氢、C1-C20的取代或未取代的烷基;优选的, $R_5$ 为氢、C1-C12的取代或未取代的烷基;更优选的, $R_5$ 为C1-C6的取代或未取代的烷基;进一步优选的, $R_5$ 为C1-C6的未取代的烷基,例如, $R_5$ 可以为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基等;

[0037]  $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C20的取代或未取代的亚烷基;优选的, $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C12的取代或未取代的亚烷基;更优选的, $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C6的取代或未取代的亚烷基;进一步优选的, $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C6的未取代的亚烷基,例如, $X_1$ 可以为亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚丁基、亚异丁基、亚戊基、亚异戊基、亚新戊基、亚己基等, $X_2$ 可以为亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚丁基、亚异丁基、亚戊基、亚异戊基、亚新戊基、亚己基等。

[0038] 更进一步优选的,本发明所提供的贝利司他衍生物结构如下:



[0040] 而由如上式(II)的结构也可以得知,本发明优选提供的贝利司他衍生物化合物,是一种以水溶性葡萄糖醛酸衍生物为取代基、并在贝利司他母环上的羟肟酸位置上进行取代连接所得的贝利司他衍生物,而且,该化合物的水溶性能够达到贝利司他的600多倍。同时,虽然该化合物结构上带有葡萄糖醛酸基团结构,但其肿瘤抑制活性并没有受到 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶的影响。进一步的,本发明贝利司他衍生物的制备方法可参考如下:



应,然后脱除保护基团,即得到所述的基于乙酸的贝利司他衍生物;

[0042] 其中,式(i)中, $R_6$ - $R_9$ 分别独立的为氢、受保护羟基,或受保护羧基,其中, $R_6$ - $R_9$ 中至少有一个受保护羟基或受保护羧基;优选的,式(i)中, $R_6$ - $R_9$ 分别独立的为受保护羟基或受保护羧基;更优选的,式(i)中, $R_6$ - $R_9$ 中至少有一个受保护羟基和一个受保护羧基,例如可以 $R_6$ 为受保护羧基、 $R_7$ - $R_9$ 为受保护羟基;或者,可以 $R_9$ 为受保护羧基、 $R_6$ - $R_8$ 为受保护羟基;又或者,可以 $R_6$ 为受保护羟基, $R_7$ - $R_9$ 为受保护羧基;又或者, $R_9$ 为受保护羟基, $R_6$ - $R_8$ 为受保护羧基;又或者, $R_6$ 、 $R_9$ 为受保护羧基、 $R_7$ 、 $R_8$ 为受保护羟基;又或者, $R_6$ 、 $R_9$ 为受保护羟基、 $R_7$ 、 $R_8$ 为受保护羧基等;

[0043] 如上所述受保护羟基为与保护基反应后的羟基,而羟基保护基可以为叔丁基二甲基硅基、乙酰基、苄基、新戊酰基等;同时,如上所述受保护的羧基为与保护基反应后的羧

基,而羧基保护基可以为苄基、烯丙基等;

[0044] 而当原料式(i)化合物中包含至少一个受保护羟基和至少一个受保护羧基时,在制备过程中,脱除保护基团的步骤则优选的按照两步进行,即,首先脱除羟基保护基,然后再脱除羧基保护基;

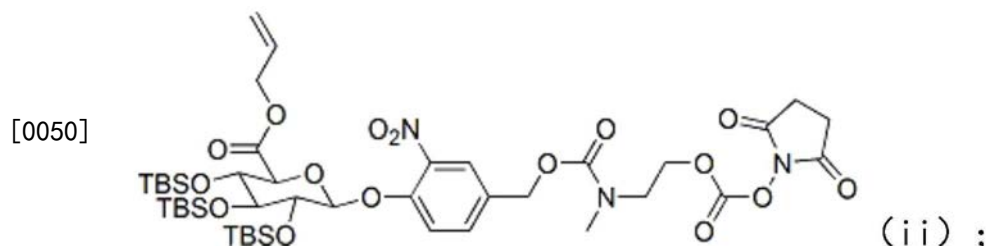
[0045]  $R_5$ 为氢、C1-C20的取代或未取代的烷基;优选的, $R_5$ 为氢、C1-C12的取代或未取代的烷基;更优选的, $R_5$ 为C1-C6的取代或未取代的烷基;进一步优选的, $R_5$ 为C1-C6的未取代的烷基,例如, $R_5$ 可以为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基等;

[0046]  $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C20的取代或未取代的亚烷基;优选的, $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C12的取代或未取代的亚烷基;更优选的, $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C6的取代或未取代的亚烷基;进一步优选的, $X_1$ 、 $X_2$ 分别独立的为C1-C6的未取代的亚烷基,例如, $X_1$ 可以为亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚丁基、亚异丁基、亚戊基、亚异戊基、亚新戊基、亚己基等, $X_2$ 可以为亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚丁基、亚异丁基、亚戊基、亚异戊基、亚新戊基、亚己基等;

[0047]  $X_3$ 为琥珀酰亚胺基;

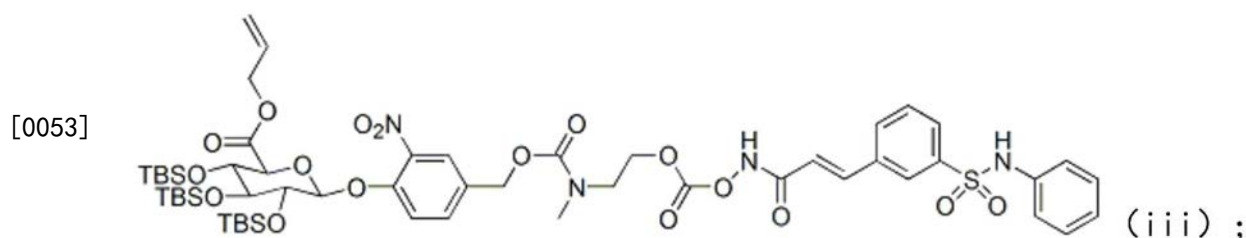
[0048] 同时,作为反应原料的式(i)化合物可购自原料供货商,或者也可以根据需要进行合成,其合成方法可参考现有技术(Alaoui A.E.等New Taxol (paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and PMT strategies in cancer chemotherapy.[J].Bioorg.Med.Chem.2006,14,5012-5019)。

[0049] 进一步优选的,本发明所述制备方法中,所用式(i)原料结构如下:



[0051] 而在以如上式(ii)化合物为原料进行反应时,本发明制备方法步骤可以具体参考如下:

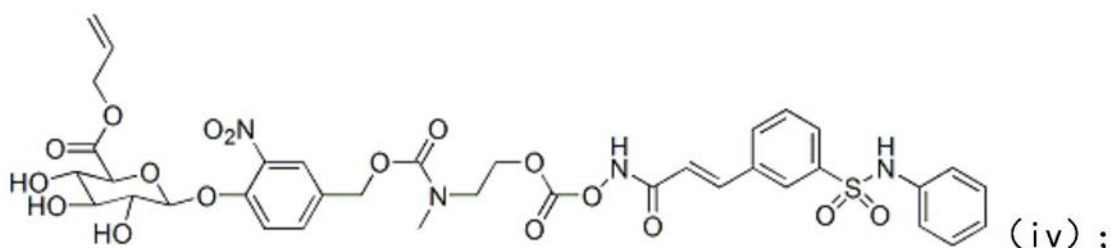
[0052] (a) 将贝利司他溶解后,加入式(ii)化合物,缩合反应,得到



[0054] 而优选的,此步骤中,是将贝利司他在0℃条件下溶解,所用溶剂优选为四氢呋喃和吡啶的混合溶液;然后,优选的升温至25℃后,加入式(ii)化合物进行缩合反应,并优选的在25℃保温条件下反应16h;

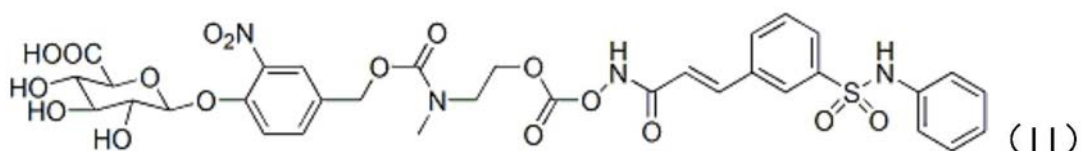
[0055] (b) 然后,是步骤(a)所得式(iii)化合物进行第一步脱保护反应,此步骤中,优选的是在0℃条件下,将式(iii)化合物与氟氢酸混合,然后,优选的升温至20℃,并反应2d,以脱除叔丁基二甲基硅基(TBS)保护基,得到如下式(iv)结构的中间体;

[0056]



[0057] (c) 最后,是将式 (iv) 化合物进行二次脱保护反应,即脱除式 (iv) 结构上的烯丙基羧基保护基,以得到如下式 (II) 所示的终产物;

[0058]



[0059] 优选的,此步骤中,是将式 (iv) 化合物溶解后,在三乙胺和乙酸存在、并在四三苯基磷钾的催化条件下进行的;

[0060] 优选的,所用溶剂为四氢呋喃;而反应优选的在气体保护,例如氩气保护条件下进行,反应的温度优选的控制室温,而反应的时间控制在半小时左右;

[0061] 如上的整体反应制备流程可参考如下图1。

[0062] 进一步的,由于本发明基于乙酸的贝利司他衍生物具有良好的水溶性,因而既可以将其进一步与助剂和/或辅料混合后,制成片剂服用,也可以将其溶于生理盐水或葡萄糖中注射使用;

[0063] 而在实际肿瘤治疗使用过程中,可以将本发明基于乙酸的贝利司他衍生物单独使用,或者将其与其他药物配合使用,并用于肿瘤的治疗。

[0064] 实施例1 0- {[N-甲基-N-4-(2,3,4-三-O-叔丁基二甲基硅基-6-烯丙基-β-D-吡喃葡萄糖醛酸-1-基)-3-硝基苄氧羰基]-2-氨基乙基}-甲酰基-贝利司他 (iii) 的制备

[0065] 将贝利司他 (469mg, 1.47mmol) 溶于四氢呋喃 6.4mL 中,并冷却体系至 0℃;之后缓慢滴加吡啶 1.6mL;混合物先在 25℃ 条件下搅拌 5 分钟,然后加入式 (ii) 化合物 (1.3g, 1.34mmol);反应液保持 25℃,搅拌 16 小时。

[0066] 然后加入 20mL 水稀释淬灭反应,用乙酸乙酯 (20mL × 2) 萃取;合并有机相,并用饱和食盐水 20mL 洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,以旋转蒸发仪浓缩。残渣制备层析 (石油醚:乙酸乙酯 = 3:1 to 1:1) 分离得到白色固体,即为如下中间体化合物 (iii) (1.035g, 65.9%)。

[0067] 对产物的表征:LCMS:1285 [M+TFA]<sup>-</sup>

[0068] 实施例2 0- {[N-甲基-N-4-(6-烯丙基-β-D-吡喃葡萄糖醛酸-1-基)-3-硝基苄氧羰基]-2-氨基乙基}-甲酰基-贝利司他 (iv) 的制备

[0069] 将化合物 iii (400mg, 0.34mmol) 溶于四氢呋喃 (20mL) 和乙腈 (20mL) 的混合溶剂中;

[0070] 将氢氟酸 (4.8mL, 40% in H<sub>2</sub>O) 溶于乙腈 (15.2mL) 制备成溶液,在 0℃ 条件下,将该溶液加入到含有化合物 iii 的溶液中;所得反应液在 20℃ 下搅拌 2 天。反应液浓缩至 8mL 左右,制备高效液相分离得如下白色固体 iv (130mg, 30.7%)。

[0071] 对产物的表征:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.39 (brs, 1H), 10.35 (brs, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.89-7.86 (m, 2H), 7.74 (d, J = 7.6Hz, 1H), 7.68-7.58 (m, 3H), 7.46 (d, J = 8.8Hz,



1H), 7.23 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.09 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.03 (t, J=7.6Hz, 1H), 6.60 (d, J=16.0Hz, 1H), 5.93-5.85 (m, 1H), 5.56-5.51 (m, 2H), 5.34-5.28 (m, 3H), 5.18 (d, J=10.8Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.61 (d, J=4.0Hz, 2H), 4.36 (t, J4.8Hz, 2H), 4.16 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.58-3.56 (m, 2H), 3.45-3.28 (m, 3H), 2.93-2.89 (m, 3H);

[0072] LCMS: 829 [M-H]<sup>+</sup>.

[0073] 实施例3 0- {[N-甲基-N-4-(β-D-吡喃葡萄糖醛酸-1-基)-3-硝基苄氧羰基]-2-氨基乙基}-甲酰基-贝利司他(II)的制备

[0074] 将化合物iv (183mg, 0.22mmol) 溶于10mL四氢呋喃中;

[0075] 将三乙胺95μL、乙酸10μL溶于四氢呋喃250μL中, 所得溶液加入到含化合物iv的四氢呋喃溶液中;

[0076] 通氩气约10分钟, 加入少许四三苯基磷钼, 室温下搅拌约30分钟至原料消失, 以旋转蒸发仪浓缩, 残渣制备层析(乙腈:水=20:1) 分离得到如下白色目标产物II (144mg, 83%)。

[0077] 对产物的表征:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ12.62 (brs, 1H), 10.43 (brs, 1H), 7.95-7.91 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.83-7.80 (m, 1H), 7.52-7.46 (m, 1H), 7.48 (d, J=16.0Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 7.08-7.05 (m, 1H), 6.95-6.92 (m, 5H), 6.89 (d, J=16.0Hz, 1H), 6.84-6.79 (m, 4H), 5.19-5.15 (m, 2H), 4.79 (m, 1H), 4.42 (t, J=4.8Hz, 2H), 4.04-3.97 (m, 2H), 3.78-3.73 (m, 2H), 3.43-3.38 (m, 2H), 2.82-2.79 (m, 3H).

[0078] <sup>13</sup>C NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ172.2, 161.4, 154.1, 153.6, 150.3, 141.2, 140.1, 138.6, 135.3, 135.0, 132.7, 130.7, 129.2, 128.6, 125.5, 123.1, 121.4, 118.4, 118.1, 117.8, 112.6, 110.7, 80.1, 73.9, 72.1, 72.3, 65.1, 64.0, 51.5, 36.2;

[0079] LCMS: 791 [M+H]<sup>+</sup>, 813 [M+Na]<sup>+</sup>.

[0080] 实施例4 贝利司他和基于乙酸的贝利司他衍生物水溶性实验

[0081] 将由本发明实施例所制备的基于乙酸的贝利司他衍生物II分别过量的溶于2个含水的微量离心管(eppendorf管)中, 每管各含1mL纯净水; 分别在25℃条件下涡旋20分钟, 再离心除去悬浮物(20000rpm, 15分钟), 最后用HPLC定量分析得到前药在水中的初始溶解度。

[0082] 试验结果如下表1所示:

[0083] 表1 贝利司他和本发明贝利司他衍生物II水溶性测试

待测试药物	贝利司他	贝利司他衍生物II
溶解度 (mg/mL)	0.14mg/ml	80-85mg/ml

[0085] 其中, 表1中, 贝利司他溶解度数据可参考现有技术:

[0086] [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/2062561b1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/2062561b1.pdf)。

[0087] 由表1的对照测试结果可知, 本发明贝利司他衍生的水溶性明显优于贝利司他, 其在水中的溶解度是贝利司他的600倍以上。

[0088] 实施例5 贝利司他衍生物II在有或无β-D-葡萄糖醛酸酶条件下, 对不同肿瘤细胞的体外抑制作用

[0089] 1、实验材料

[0090] 细胞株: HT-29、Hut-78;

[0091] 培养基: Hut-78采用含20%胎牛血清的IMDM培养基, HT-29采用含10%胎牛血清的

McCoy's 5A培养基;

[0092] 药物及配制:本发明贝利司他衍生物II,贝利司他(Vorinostat);

[0093] T细胞淋巴瘤细胞。

[0094] 2、实验方法

[0095] 使用胰酶将细胞从细胞培养盘上消化下,使用培养基重悬后测定细胞密度,将细胞稀释成每毫升含优化数量细胞的溶液,将调整密度后的细胞溶液以每孔50微升加入细胞实验板中,将铺好的细胞培养板放入孵箱,在37摄氏度,5%的CO<sub>2</sub>的湿润条件下孵育24小时。

[0096] 根据实验模板,准备200倍浓度的参照化合物和待测试化合物溶液,取2.5微升化合物溶液及2.5微升酶到245微升培养基中进行稀释。取50微升稀释后的化合物溶液加入前一天准备好的细胞培养板中,加入化合物的细胞培养板重新放回孵箱,在37摄氏度,5%的CO<sub>2</sub>的湿润条件下孵育72小时。

[0097] 检测试剂在实验前30分钟放置于室温进行平衡。细胞培养板每孔加入30微升检测试剂、摇板10分钟,诱导细胞裂解。10分钟后将细胞培养板在室温下孵育2分钟以稳定发光信号。使用Envision读板,读板时时间设定为0.5秒每孔。

[0098] 数据处理,使用XLfit软件。

[0099] %抑制率=(最大信号值-化合物信号值)/(最大信号值-最小信号值)×100。

[0100] 从二甲基亚砷处理72小时的细胞得到最大的信号值,从单独的培养基(细胞数为零)得到最小信号值。

[0101] 3、实验结果

[0102] 试验结果如下表2所示:

[0103] 表2不同条件下贝利司他和贝利司他衍生物II肿瘤抑制能力

细胞株	化合物	Data 1		Data 2		Data 3	
		无酶	有酶	无酶	有酶	无酶	有酶
		ABS IC50 (μM)					
[0104] HT-29	贝利司他	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
	贝利司他衍生	9.45	4.28	>10	>10	9.09	>10

	物II						
[0105]	贝利司他	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
	Hut-78 贝利司他衍生物II	1.66	2.35	1.55	1.86	1.33	1.73

[0106] 由如上表格的数据对比可知,贝利司他在HT-29和Hut-78两个细胞株上的IC<sub>50</sub>>10 μM,毒性不受β-D-葡萄糖醛酸酶的影响;

[0107] 同时,在无β-D-葡萄糖醛酸酶的情况下,贝利司他衍生物II在细胞株HT29上的IC<sub>50</sub>约为10 μM,在Hut-78上的IC<sub>50</sub>约为1.5 μM,两株细胞上的毒性差别较大;但在有β-D-葡萄糖醛酸酶存在下IC<sub>50</sub>几乎无变化。

[0108] 如上试验结果可能是由于贝利司他衍生物II无法通过β-D-葡萄糖醛酸酶水解作用而得到贝利司他所导致;也有可能是由于贝利司他衍生物II经β-D-葡萄糖醛酸酶水解所得产物,与贝利司他衍生物II的毒性一致的原因。

[0109] 而β-D-葡萄糖醛酸酶在肿瘤生成、肿瘤生长、浸润和转移中起到重要作用,尤其它能引起细胞外基质和细胞基底膜的降解,从而破坏癌细胞转移的屏障。通过抑制该酶的活性或消耗该酶,可抑制肿瘤细胞的转移,发挥抗肿瘤活性(相关文献可参见:(a) Parish, C.R.等.Heparanase:a key enzyme involved in cell invasion.[J].Biochim Biophys Acta,2001,1471,M99-M108. (b) Poon,I.K.H.等.Histidine-rich glycoprotein binds heparanase and regulates its enzymatic activity and cell surface interactions.[J].Int J Biochem Cell B.2010,42,1507-1516. (c) Ilan,N.等.Regulation,function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis.[J].Int J Biochem Cell B.2006,38,2018-2039. (d) Bosslet,K.等.Elucidation of the Mechanism Enabling Tumor Selective Prodrug Monotherapy.[J].Cancer Res.,1998,58,1195-1201.)。

[0110] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

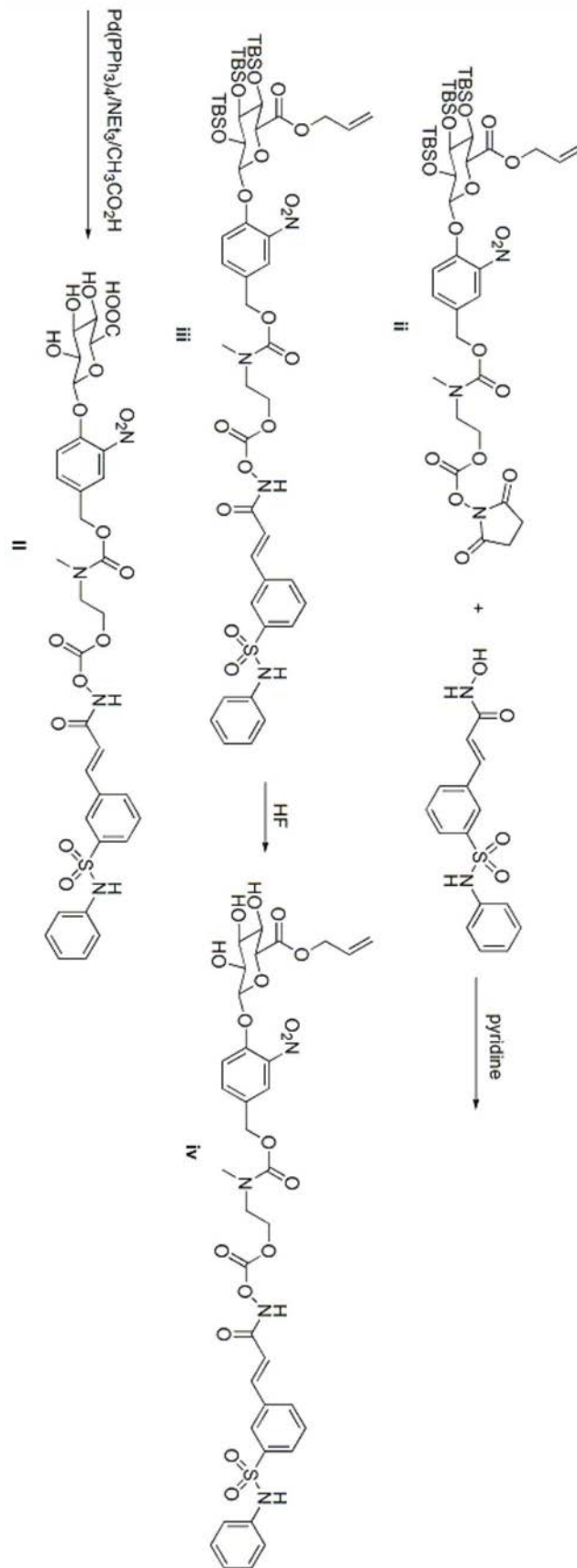


图1