



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114702515 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202210402646.7

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.18

审查员 吕嘉敏

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114702515 A

(43) 申请公布日 2022.07.05

(73) 专利权人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72) 发明人 邹滔滔 罗韵丽

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

专利代理师 薛建强

(51) Int. Cl.

C07F 1/12 (2006.01)

A61K 41/00 (2020.01)

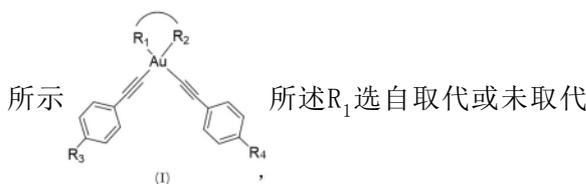
权利要求书2页 说明书15页 附图8页

(54) 发明名称

一种金(III)配合物及其在癌症光治疗中的应用

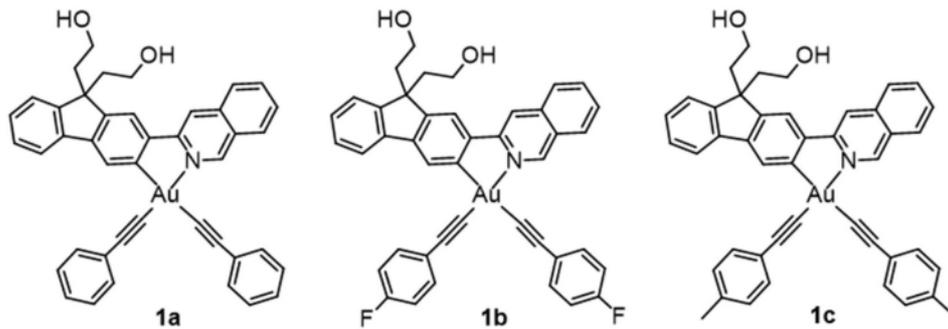
(57) 摘要

本发明公开了一种金(III)配合物及其在癌症光治疗中的应用。所述配合物的结构如式(I)



的苯基、取代或未取代的苄基、取代或未取代的联苯基的一种;所述R₂选自吡啶基、异喹啉基、喹啉基中的一种;所述R₃和R₄分别独立地选自氢、卤素、C₁₋₄烷基或C₁₋₄卤代烷基中的一种。本发明中的配合物具有光活化性能,在420nm的光照下,可以与NCA迅速反应,光照后对人黑色素瘤细胞的TrxR酶具有较高的抑制作用,对多种癌细胞表现出了较高的毒性,在465nm光照下对A375人黑色素瘤细胞荷瘤小时的肿瘤生长具有很好的抑制作用,可以应用于抗癌药物。

1. 一种金(III)配合物,其特征在于,所述配合物具有式1a~1c中的结构之一:



2. 权利要求1所述的金(III)配合物的制备方法,其特征在于,所述金(III)配合物由以下步骤制得:

S1 .化合物1和2-溴乙醇、氢氧化钾混合后溶于二甲基亚砜溶剂中,在50~70℃下反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物2;

S2 .在氮气氛围下,化合物2和双联频哪醇基二硼烷、醋酸钾、1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯混合后溶于1,4-二氧六环溶剂中,在100~105℃下回流反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物3;

S3 .在氮气氛围下,化合物3和3-溴异喹啉、二氯二(三苯基磷)合钯、 Cs_2CO_3 混合后溶于甲苯中,在108~115℃回流反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物4;

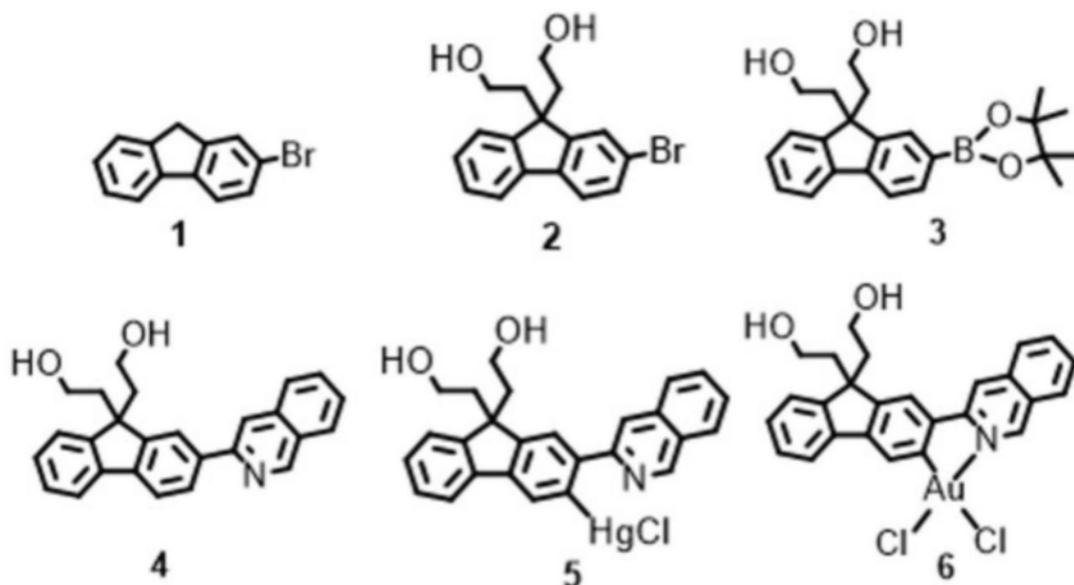
S4 .在氮气氛围下,化合物4和醋酸汞混合后溶于无水乙醇中,在80~90℃回流反应后加入氯化锂,在80~90℃下回流反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物5;

S5 .化合物5和氯金酸钾混合后溶于乙腈中,在90~95℃回流反应后用冰乙腈、水洗涤固体,得到化合物6;

S6 .在氮气氛围下,化合物6和苯乙炔或其取代物、碘化亚铜、三乙胺混合后溶于二氯甲烷中,室温反应后洗涤纯化得到所述金(III)配合物;

S6中苯乙炔的取代物为对氟苯乙炔或对甲基苯乙炔;

其中,化合物1~6的结构式如下式所示:



3. 一种细胞增殖抑制剂,其特征在于,所述细胞增殖抑制剂中含有权利要求1所述的金(III)配合物;所述细胞为癌细胞,所述癌细胞为黑色素瘤细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞或肺癌细胞。

4. 权利要求1所述的金(III)配合物在制备用于癌症光治疗的药物中的应用;所述癌症为黑色素瘤、结肠癌、肝癌或肺癌。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述用于癌症光治疗的药物是经过波长200nm~800nm的光照射活化后发挥作用。

一种金(III)配合物及其在癌症光治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药化工技术领域,具体涉及了一种金(III)配合物及其在癌症光治疗中的应用。

背景技术

[0002] 光动力疗法(PDT)是用光敏药物和激光活化治疗肿瘤疾病的一种新方法。用特定波长照射肿瘤部位,能使选择性聚集在肿瘤组织的光敏药物活化,引发光化学反应破坏肿瘤。PDT因其高的时空选择性和低的全身毒性而成为一种有吸引力的肿瘤治疗方法。PDT的疗效通常依赖于局部氧的浓度和扩散。然而,许多实体肿瘤的低氧特性限制了光动力疗法的治疗效果。

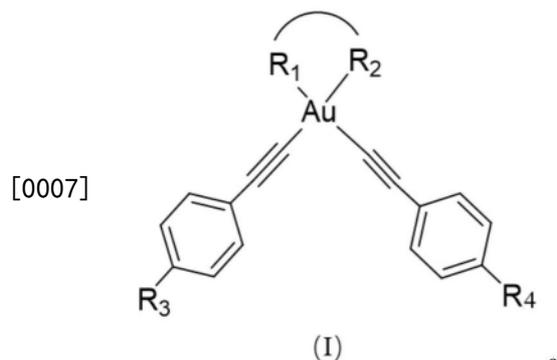
[0003] 一些关于金诺芬的研究发现,金(III)和金(I)配合物的抗癌机理主要是金与硫氧还蛋白氧化还原酶(Thioredoxin reductase, TrxR)中的硫醇(半胱氨酸)或硒醇(硒代半胱氨酸)共价结合。但由于金类化合物会脱靶结合非肿瘤硫醇化合物(例如血清白蛋白或谷胱甘肽等),因此,大大降低了金(III)和金(I)配合物的效率和选择性。

[0004] 因此,开发一种能在乏氧条件下选择性抑制肿瘤部位的含硫醇/硒醇的靶标蛋白的药物有很重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种金(III)配合物及其在癌症光治疗中的应用,本发明中的金(III)配合物具有光活化性能,在420nm的光照下,可以与N-乙酰半胱氨酸(NAC)迅速反应,且在光照下,本发明中的金(III)配合物在常氧条件下和乏氧条件下均可以与NCA发生反应;本发明中的金(III)配合物经过420nm的光照后对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶显示出了较高的抑制作用,对A375人黑色素瘤细胞、A549人肺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞和HepG-2人肝癌细胞同样表现出了较好的抑制作用,对A375人黑色素瘤细胞荷瘤小时的肿瘤生长具有很好的抑制作用,因此,本发明中的金(III)配合物可以作为抗癌药物。

[0006] 本发明的第一个方面,提供了一种金(III)配合物,所述配合物的结构如式(I)所示:



[0008] 根据本发明第一方面的内容,在本发明的一些实施方式中,所述金(III)配合物在乏氧条件下和常氧条件下均具有选择性光激活的特性。

[0009] 在本发明的一些优选实施方式中,所述 R_1 选自取代或未取代的苯基、取代或未取代的苄基、取代或未取代的联苯基的一种。

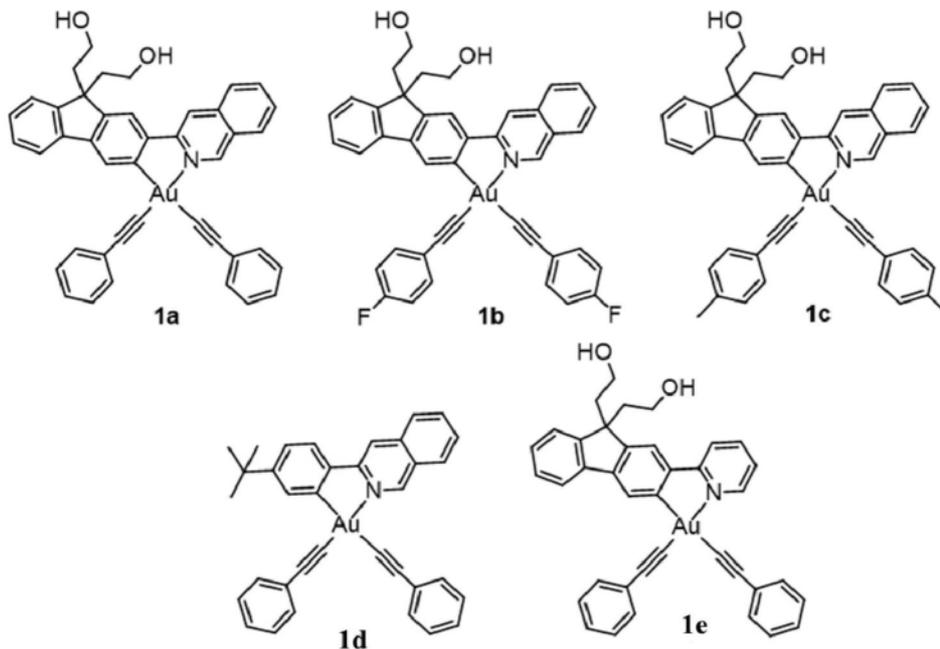
[0010] 在本发明的一些优选实施方式中,所述 R_2 选自吡啶基、异喹啉基、喹啉基中的一种。

[0011] 在本发明的一些优选实施方式中,所述 R_3 和 R_4 分别独立地选自氢、卤素、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 卤代烷基中的一种。

[0012] 在本发明的一些更优选实施方式中,所述 R_1 为乙醇基取代的苄基。

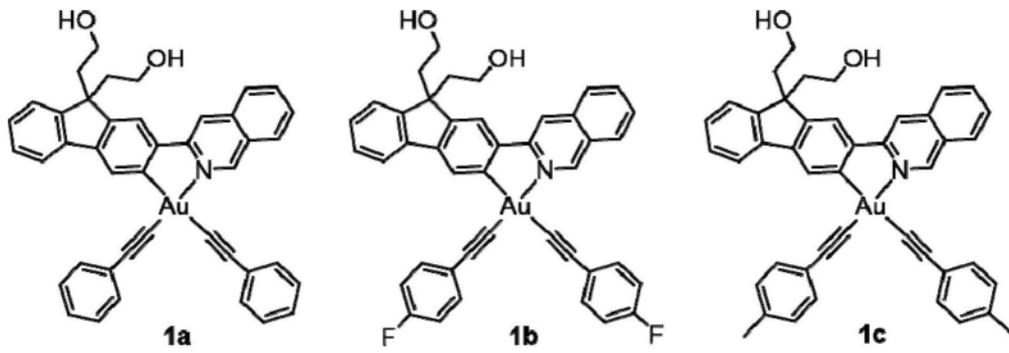
[0013] 在本发明的一些更优选实施方式中,所述 R_2 为异喹啉基。

[0014] 在本发明的一些更优选实施方式中,所述金(III)配合物具有1a~1e中的结构之一:



[0015]

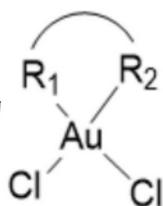
[0016] 在本发明的一些更优选实施方式中,所述金(III)配合物具有1a~1c中的结构之一:



[0017]

[0018] 本发明的第二方面,提供了一种本发明第一方面所述的金(III)配合物的制备方

法,所述金(III)配合物是由化合物



进行转金属反应后制得。

[0019] 根据本发明第二方面的内容,在本发明的一些实施方式中,所述金(III)配合物由以下步骤制得:

[0020] S1. 化合物1和2-溴乙醇、氢氧化钾混合后溶于二甲基亚砜(DMSO)溶剂中,在50~70℃下反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物2;

[0021] S2. 在氮气氛围下,化合物2和双联频哪醇基二硼烷、醋酸钾、1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯($\text{PdCl}_2(\text{dppf})$)混合后溶于1,4-二氧六环溶剂中,在100~105℃下回流反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物3;

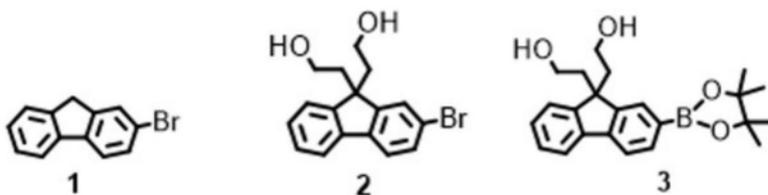
[0022] S3. 在氮气氛围下,化合物3和3-溴异喹啉、二氯二(三苯基磷)合钯($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$)、 Cs_2CO_3 混合后溶于甲苯中,在108~115℃回流反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物4;

[0023] S4. 在氮气氛围下,化合物4和醋酸汞混合后溶于无水乙醇中,在80~90℃回流反应后加入氯化锂,在80~90℃下回流反应后用乙酸乙酯萃取并收集有机相,纯化后得到化合物5;

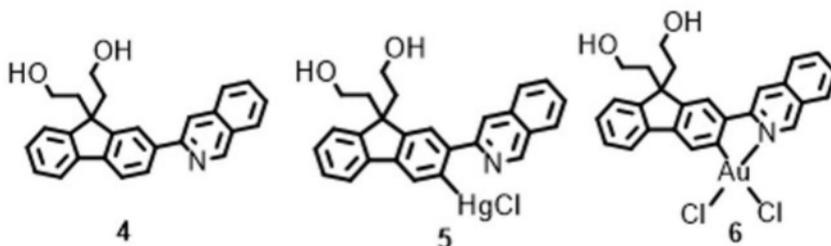
[0024] S5. 化合物5和氯金酸钾混合后溶于乙腈中,在90~95℃回流反应后用冰乙腈、水洗涤固体,得到化合物6;

[0025] S6. 在氮气氛围下,化合物6和苯乙炔或其取代物、碘化亚铜、三乙胺混合后溶于二氯甲烷中,室温反应后洗涤纯化得到所述金(III)配合物;

[0026] 其中,化合物1~6的结构式如下式所示:



[0027]

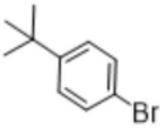


[0028] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S6中所述苯乙炔取代物为对氟苯乙炔或对甲基苯乙炔中的一种。

[0029] 在本发明的一些优选实施方式中,当步骤S6中使用的是苯乙炔时,所制备的配合物具有1a的结构。

[0030] 在本发明的一些优选实施方式中,当步骤S6中使用的是对氟苯乙炔时,所制备的配合物具有1b的结构。

[0031] 在本发明的一些优选实施方式中,当步骤S6中使用的是对甲基苯乙炔时,所制备的配合物具有1c的结构。

[0032] 在本发明的一些优选实施方式中,当步骤S2中的化合物2替换为  时,所制备的配合物具有1d的结构。

[0033] 在本发明的一些优选实施方式中,当步骤S3中的3-溴异喹啉换替换为2-溴吡啶时,所制备的配合物具有1e的结构。

[0034] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S1~S4中用乙酸乙酯萃取的次数为3~5次。

[0035] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S1中反应的时间为24~48h。

[0036] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S2中反应的时间为2~5h。

[0037] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S3中反应的时间为24~48h。

[0038] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S4中反应的时间为24~48h。

[0039] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S4中加入氯化锂后反应的时间为0.5~2h。

[0040] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S5中反应的时间为24~48h。

[0041] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S5中分别用冰乙腈、水各洗涤固体两次。

[0042] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S6中在室温下反应的时间为0.5~2h。

[0043] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤S1~S6中所用到的纯化均采用柱层析纯化法。

[0044] 本发明的第三方面,提供了一种细胞增殖抑制剂,所述细胞增殖抑制剂中含有本发明第一方面所述的金(III)配合物。

[0045] 根据本发明第三方面的内容,在本发明的一些实施方式中,所述细胞为癌细胞。

[0046] 在本发明的一些优选实施方式中,所述癌细胞包括黑色素瘤细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞或肺癌细胞。

[0047] 本发明的第四方面,提供了一种本发明第一方面所述的金(III)配合物在制备用于癌症光治疗药物中的应用。

[0048] 根据本发明第四方面的内容,在本发明的一些实施方式中,所述用于癌症光治疗药物是经过光照后发挥作用。

[0049] 在本发明的一些优选实施方式中,所述用于癌症光治疗药物是经过波长200nm~800nm的光照射活化后发挥作用。

[0050] 在本发明的一些更优选实施方式中,所述用于癌症光治疗药物是经过波长300nm~600nm的光照射活化后发挥作用。

[0051] 在本发明的一些更优选实施方式中,所述用于癌症光治疗药物是经过波长300nm~450nm的光照射活化后发挥作用。

[0052] 在本发明的一些优选实施方式中,所述癌症包括黑色素瘤、结肠癌、肝癌或肺癌。

[0053] 本发明中的金(III)配合物在黑暗的条件下不与NAC发生反应,但是在光照下可以与NAC迅速发生反应,生成有硫氧还蛋白还原酶抑制活性的金(I)化合物,从而对肿瘤的生长起到了抑制的作用。此外,在光照条件下,无论是在常氧还是乏氧条件下,本发明中的金

(III) 配合物都具有较好的光活化性能,且在乏氧条件下能更快与NCA发生光还原反应。此外,无论是在常氧还是乏氧条件下,光照后本发明中的金(III)配合物对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶的活性具有显著的抑制作用,且对A375人黑色素瘤细胞、A549人肺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞和HepG-2人肝癌细胞具有较好的抑制作用。

[0054] 本发明的有益效果是:

[0055] (1) 本发明中的金(III)配合物具有光活化性能,在黑暗条件下不与NAC发生反应,在420nm的光照下,可以与NCA迅速反应,生成有硫氧还蛋白还原酶抑制活性的金(I)化合物,其具有抗肿瘤的效果。且在光照下,本发明中的金(III)配合物在常氧条件下和乏氧条件下均可以与NCA发生反应,有效解决了在实体肿瘤中氧含量较低的问题,可以在肿瘤组织中选择性激活,并杀死癌细胞。

[0056] (2) 无论是在常氧条件还是在乏氧条件下,本发明中的金(III)配合物经过420nm的光照后对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶显示出了较好的抑制作用;此外,本发明中的金(III)配合物对A375人黑色素瘤细胞、A549人肺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞和HepG-2人肝癌细胞同样表现出了较高的毒性,对A375人黑色素瘤细胞、A549人肺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞和HepG-2人肝癌细胞具有较好的抑制作用。

[0057] (3) 此外,本发明中的金(III)配合物在465nm光照下对A375人黑色素瘤细胞荷瘤小时的肿瘤生长具有很好的抑制作用,可以应用于抗癌药物中。

附图说明

[0058] 图1为在黑暗条件下配合物1a、1d、1e与NAC混合后静置前(0h)和静置后(24h)的液相色谱检测结果;

[0059] 图2为420nm光照下,不同光照时间后配合物1a与NAC混合后的液相色谱检测结果;

[0060] 图3为21%O₂的条件下,420nm光照不同时间后配合物1a与NAC在DMSO中的紫外吸收光谱;

[0061] 图4为5%O₂的条件下,420nm光照不同时间后配合物1a与NAC在DMSO中的紫外吸收光谱;

[0062] 图5为1%O₂的条件下,420nm光照不同时间后配合物1a与NAC在DMSO中的紫外吸收光谱;

[0063] 图6为小于0.1%O₂的条件下,420nm光照不同时间后配合物1a与NAC在DMSO中的紫外吸收光谱;

[0064] 图7为随着光照时间的增加,在不同的O₂浓度下,配合物1a与NAC在DMSO中混合后的紫外吸收光谱在356nm处的峰强变化;

[0065] 图8为随着光照时间的增加,在不同的O₂浓度下,配合物1a与NAC在DMSO中混合后的紫外吸收光谱在329nm处的峰强变化;

[0066] 图9为对照组、给药组、光照组和给药光照组小鼠的肿瘤测量情况;

[0067] 图10为给药后第16天后对照组、给药组、光照组和给药光照组的小鼠肿瘤的重量统计图;

[0068] 图11为给药后对照组、给药组、光照组和给药光照组中的小鼠肿瘤的体积统计图;

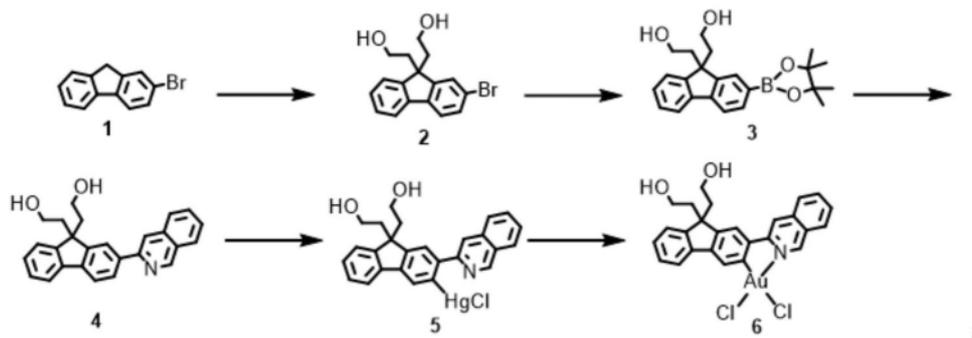
[0069] 图12为给药后对照组、给药组、光照组和给药光照组的小鼠的体重统计图。

具体实施方式

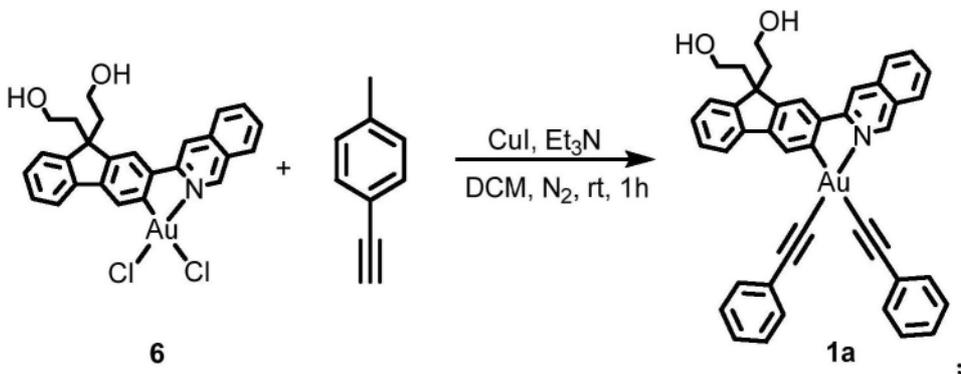
[0070] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0071] 实施例1

[0072] 以配合物1a为例,配合物1a的制备过程如下:



[0073]



[0074] 配合物1a的具体制备步骤为:

[0075] (1) 将化合物1 (20mmol, 4.9g) 和2-溴乙醇 (44mmol, 5.5g)、氢氧化钾 (200mmol, 11.2g) 混合后溶于无水DMSO溶剂 (30mL) 中,在60℃下加热反应24h;然后冷却至室温,用乙酸乙酯萃取三次,并收集有机相,采用柱层析纯化得到化合物2;

[0076] (2) 在氮气氛围下,将化合物2 (7.4mmol, 2.46g) 和双联频哪醇基二硼烷 (11.1mmol, 2.8g)、醋酸钾 (22.2mmol, 2.1g)、PdCl₂ (dppf) (0.22mmol, 0.16g) 混合后溶于1,4-二氧六环溶剂 (50mL) 中,103℃加热回流反应3h,待反应结束后,冷却至室温,用乙酸乙酯萃取三次,并收集有机相,采用柱层析纯化得到化合物3;

[0077] (3) 在氮气氛围下,化合物3 (5.76mmol, 2.19g) 和3-溴异喹啉 (4.8mmol, 1g)、Pd (PPh₃)₂Cl₂ (0.096mmol, 0.076g)、Cs₂CO₃ (14.4mmol, 4.68g) 混合后溶于甲苯 (50mL) 中,110℃加热回流反应24h,然后冷却至室温,用乙酸乙酯萃取三次,并收集有机相,采用柱层析纯化得到化合物4;

[0078] (4) 在氮气氛围下,化合物4 (5.56mmol, 2.12g) 和醋酸汞 (6.67mmol, 2.12g) 混合后溶于无水乙醇 (20mL) 中,85℃加热回流反应24h,然后冷却至室温后加入氯化锂 (55.6mmol, 2.3g),在85℃温度下加热回流1小时,冷却至室温,用乙酸乙酯萃取三次,并收集有机相,采用柱层析纯化得到化合物5;

[0079] (5) 化合物5 (1.5mmol, 0.93g) 和氯金酸钾 (1.5mmol, 0.62g) 混合后溶于乙腈 (30mL) 中, 92℃ 加热回流反应24h, 然后冷却至室温, 分别用冰乙腈、水各洗涤固体两次, 风干后得到化合物6;

[0080] (6) 在氮气氛围下, 将化合物6 (0.15mmol, 0.1g) 和苯乙炔 (0.33mmol, 33mg)、碘化亚铜 (CuI) (0.012mmol, 2.3mg)、三乙胺 (Et₃N) (0.0045mmol, 0.45mg) 混合后溶于二氯甲烷 (DCM) (10mL) 中, 在室温条件下反应1小时, 使用旋转蒸发器除去溶剂, 将所得残余物在硅胶柱上进行柱层析纯化后得到纯的配合物1a。

[0081] 实施例2

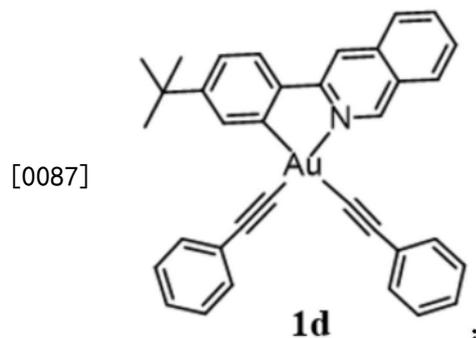
[0082] 实施例2中配合物1b的制备过程参照配合物1a的制备过程, 区别在于配合物1b的制备过程中, 步骤(6)中使用对氟苯乙炔替换苯乙炔。

[0083] 实施例3

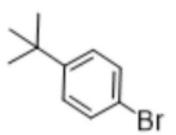
[0084] 实施例3中配合物1c的制备过程参照配合物1a的制备过程, 区别在于配合物1c的制备过程中, 步骤(6)中使用对甲基苯乙炔替换苯乙炔。

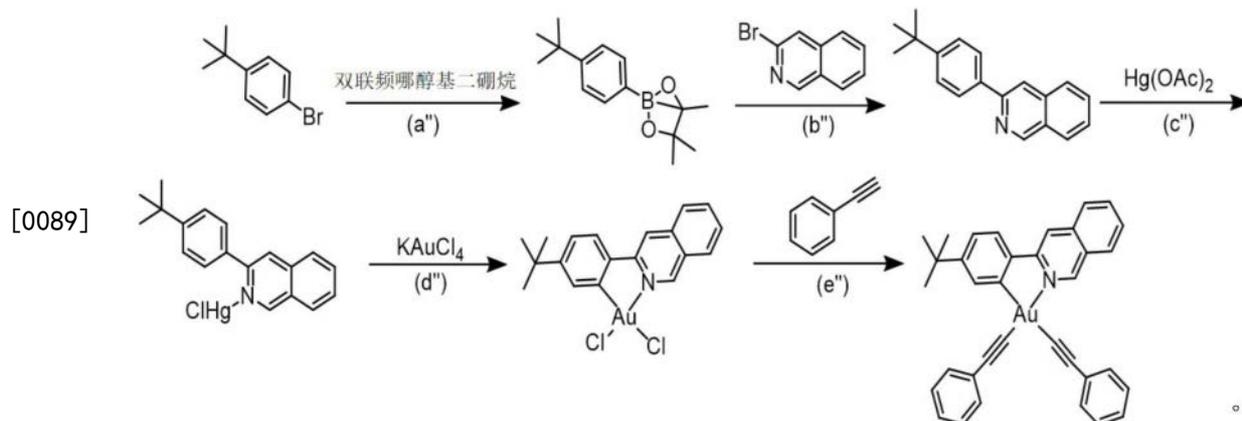
[0085] 实施例4

[0086] 实施例4中的配合物1d具有以下结构:



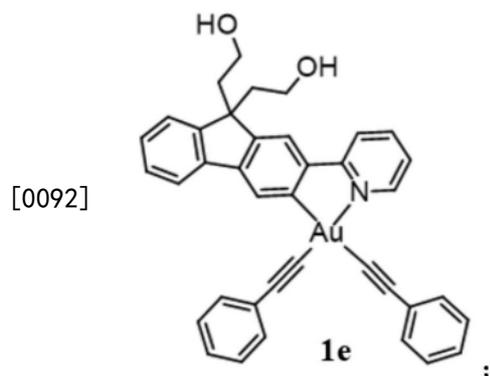
[0088] 实施例4中的配合物1d的制备步骤同实施例1, 区别在于将实施例1中步骤(2)中的

化合物2替换为了  具体制备路线为:



[0090] 实施例5

[0091] 实施例5中的配合物1e具有以下结构:



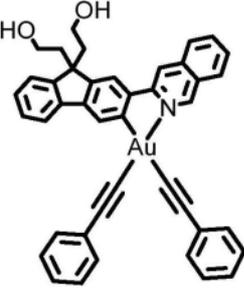
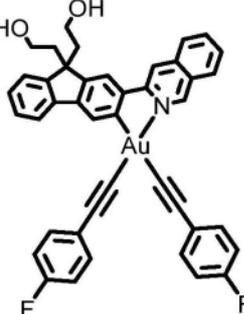
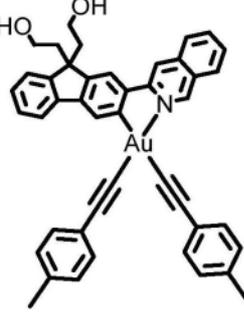
[0093] 配合物1e的制备步骤同实施例1,区别在于将实施例1中步骤(3)中的3-溴异喹啉替换为2-溴吡啶。

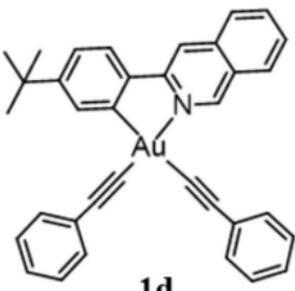
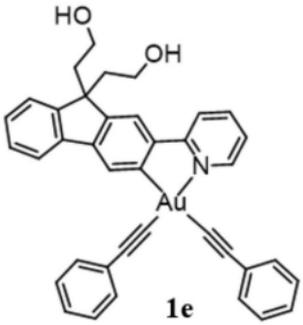
[0094] 表1实施例1~5中的配合物的结构和表征数据

[0095]

编号与结构	表征数据 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、元素分析
-------	---

[0096]

 <p style="text-align: center;">1a</p>	<p>$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.36 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.43 – 8.34 (m, 2H), 8.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.86 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.68 – 7.57 (m, 6H), 7.49 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.40 (dt, $J = 17.6, 7.6$ Hz, 6H), 4.19 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 2.76 (dd, $J = 10.7, 5.6$ Hz, 4H), 2.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H).</p> <p>$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 158.04, 155.88, 153.77, 150.67, 149.97, 145.19, 141.91, 139.73, 137.92, 135.66, 131.96, 131.76, 130.66, 129.68, 129.19, 128.96, 128.49, 128.12, 127.96, 127.67, 127.64, 126.24, 126.21, 126.00, 123.80, 120.07, 119.93, 119.85, 118.17, 104.04, 99.01, 83.28, 57.15, 51.71, 46.13, 42.67</p>
 <p style="text-align: center;">1b</p>	<p>$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.32 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.36 – 8.27 (m, 2H), 8.12 – 8.01 (m, 2H), 7.81 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.68 – 7.54 (m, 6H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 7.32 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.21 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.84 – 2.71 (m, 4H), 2.36 (dddd, $J = 23.3, 12.9, 9.7, 5.9$ Hz, 4H).</p> <p>$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 162.88, 162.60, 160.92, 160.65, 157.98, 155.94, 153.67, 150.65, 149.93, 145.14, 141.90, 139.71, 137.87, 135.60, 134.05, 133.99, 133.91, 133.84, 130.68, 129.58, 128.48, 127.94, 127.66, 127.60, 126.23, 123.75, 122.67, 122.64, 122.44, 122.42, 120.21, 119.79, 119.52, 118.12, 116.39, 116.21, 116.06, 115.89, 102.88, 97.82, 82.87, 60.22, 57.17, 51.69, 46.18, 42.66.</p> <p>$^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, DMSO-d_6) δ -112.33, -112.95</p>
 <p style="text-align: center;">1c</p>	<p>$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.35 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 8.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.06 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.63 – 7.57 (m, 2H), 7.51 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.29 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 4.32 – 4.13 (m, 2H), 2.78 (qt, $J = 10.1, 6.1$ Hz, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 10H).</p> <p>$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 158.04, 155.82, 153.93, 150.67, 149.90, 145.17, 141.87, 139.77, 137.89, 137.62, 137.05, 135.60, 131.85, 131.66, 130.61, 129.80, 129.65, 129.57, 128.48, 127.97, 127.63, 126.25, 123.80, 123.25,</p>

	123.05, 120.06, 119.80, 119.09, 118.10, 104.03, 98.92, 82.36, 57.16, 51.70, 42.68, 21.52, 21.49.	
 <p style="text-align: center;">1d</p>	¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 10.27 (s, 1H), 8.35 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.91 (dd, J = 7.9, 3.7 Hz, 2H), 7.82 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.66 – 7.55 (m, 5H), 7.34 (dt, J = 14.8, 7.7 Hz, 5H), 7.30 – 7.24 (m, 2H), 1.36 (s, 9H). ¹³ C NMR (126 MHz, CDCl ₃) δ 158.53, 155.61, 155.11, 153.78, 142.39, 137.52, 134.49, 132.8, 131.99, 129.67, 128.57, 128.16, 128.00, 127.36, 127.01, 126.26, 124.77, 123.54, 119.32, 116.17, 104.00, 98.87, 35.35, 31.30. Anal calcd for C ₃₅ H ₂₈ AuN: C, 63.74; H, 4.28; N, 2.12; found C, 62.87; H, 4.17; N, 2.00	
[0097]	 <p style="text-align: center;">1e</p>	¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9.61 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.46 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.84 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 14.1, 6.3 Hz, 4H), 7.60 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.54 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.49 – 7.42 (m, 5H), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 2.78 (d, J = 6.6 Hz, 4H), 2.47 – 2.31 (m, 4H). ¹³ C NMR (126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 166.36, 154.79, 150.94, 150.69, 149.80, 145.10, 143.33, 142.92, 139.55, 131.79, 129.19, 129.06, 128.95, 128.83, 128.06, 127.63, 126.14, 125.90, 125.49, 123.84, 121.99, 121.23, 120.26, 119.06, 103.99, 99.09, 83.20, 57.08, 51.79, 45.81, 42.45. Anal calcd for C ₃₈ H ₃₀ AuNO ₂ : C, 62.55; H, 4.14; N, 1.92; found C, 62.03; H, 4.33; N, 1.81

[0098] 测试例

[0099] 一、配合物与巯基的稳定性

[0100] 谷胱甘肽(GSH)是肿瘤细胞内最丰富的硫醇,其浓度在0.5-10mM之间,金配合物对细胞硫醇/硒醇具有较高的亲和力。环金属化(C[^]N)金(III)配合物([Au^{III}(C[^]N)L],C[^]N=2-苯基吡啶)是不稳定的,容易被细胞内的硫醇还原为金(I)。本发明实施例中的配合物1a~1e为具有较大共轭体系的金(III)配合物,较大的共轭体系有利于提高配合物的稳定性,且本发明实施例中配合物1a~1c和1e上的苄环上具有两个羟乙基,可以提高配合物1a~1c和1e的水溶性。

[0101] 分别测试了实施例1和实施例4~5中的配合物在黑暗条件下和光照条件下与巯基的反应情况,具体的测试过程为:分别将50μM的配合物1a、1d、1e与5mM的NAC在DMSO中混合,混合后在避光条件下放置24h,在避光放置24h后,经420nm光照,从光照开始,分别光照至30s、60s、90s和120s,并采用液相色谱检测进行跟踪测试。

[0102] 黑暗条件下的液相色谱测试结果如图1所示。图1为在黑暗条件下配合物1a、1d、1e

与NAC混合后静置前(0h)和静置后(24h)的液相色谱检测结果,其中,图1a为配合物1a与NAC混合后静置前(0h)和静置后(24h)的液相色谱图,图1b为配合物1d与NAC混合后静置前(0h)和静置后(24h)的液相色谱图,图1c为配合物1e与NAC混合后静置前(0h)和静置后(24h)的液相色谱图。从图1中可以看出,在黑暗条件下,配合物1a、1d、1e与NAC混合后静置24h的液相色谱图中没有出现特别明显的新物质的峰,尤其是配合物1a与NAC混合后静置24h的液相色谱图中几乎没有新物质的峰产生。进一步对图1中的液相色谱图的峰面积进行积分得出配合物1a、1d、1e与NAC混合静置后的剩余量,其中,静置24h后实施例1中配合物1a的剩余量为92.1%,实施例4~5中的配合物的剩余量依次为73.1%和77.9%,相比较而言,配合物1d、1e在黑暗条件下的稳定性要差于配合物1a。

[0103] 配合物1a在420nm光照条件下的液相色谱测试结果如图2所示。图2为420nm光照下,不同光照时间后配合物1a与NAC混合后的液相色谱检测结果。从图2中可知,配合物1a与NCA的光反应非常迅速,光照30s时,即有新的物质出现,至光照2min时,配合物1a消耗完全,全部参与了反应,并生成了芴-异喹啉(FIQ)配体以及苯乙炔(PA)和NAC的加合物(PA-NAC)。

[0104] 由图1和图2可知,配合物1a与NCA在黑暗条件下不会发生明显反应,经过420nm光照后,配合物1a与NCA开始发生化学反应,且反应迅速,至光照2min时,配合物1a消耗完全,并生成了FIQ和PA-NAC。由此说明,配合物1a的光反应活性高,反应迅速,具有光活化性能,经过光照后,配合物1a可以与巯基发生反应,生成有硫氧还蛋白还原酶抑制活性的金(I)化合物。

[0105] 二、配合物与巯基在不同 O_2 浓度下的反应

[0106] 以配合物1a为例,分别测试了配合物1a与巯基在不同 O_2 浓度下420nm光照的光反应情况,具体的测试步骤为:将20 μ M的配合物1a与2mM的NAC在DMSO中混合,混合后分别在不同的 O_2 浓度(21% O_2 、5% O_2 、1% O_2 、<0.1% O_2)下进行420nm光照,并测定光照后的紫外吸收光谱,不同 O_2 浓度下测定的紫外吸收光谱的结果如图3~6所示。从图3~6中可以看出,不同的 O_2 浓度下用420nm光照时,随着光照射时间的增加,在紫外吸收光谱中检测到的356nm处的吸收峰的峰强逐渐降低,在329nm处检测到的吸收峰的强度逐渐增加,其中,356nm处的峰为配合物1a的峰,329nm处的峰为配体(FIQ)的峰。以上结果表明,在不同的 O_2 浓度和420nm光照条件下,随着光照时间的增加,配合物1a最终均可以与NAC发生反应并生成配体(FIQ)。

[0107] 图7和图8为在不同 O_2 浓度下,随着光照时间的增加,356nm(配合物1a的吸收)处和329nm(FIQ配体的吸收)处的峰的峰强变化情况,从图中可以看出,当 O_2 <0.1%时,光照20s后配合物1a即可与NAC反应完全,且配合物1a与NAC的反应速度随 O_2 浓度的增加而降低,表明配合物1a与NAC的光反应速率受 O_2 浓度的影响很大,在乏氧条件下配合物1a能更快与NCA发生光还原反应。

[0108] 三、配合物对人黑色素瘤细胞的硫氧还蛋白还原酶(TrxR)的抑制活性测试

[0109] 本发明实施例中所测试的细胞为A375人黑色素瘤细胞,按照本领域的常规技术手段进行培养。

[0110] 以配合物1a为例,分别在常氧条件和乏氧条件下(O_2 <0.1%)测试配合物1a对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶的抑制活性,根据TrxR活性检测试剂盒(Solarbio)的使用说明,使用分光光度法测定A375人黑色素瘤细胞内TrxR的抑制活性。

[0111] 具体的测试过程如下:将A375人黑色素瘤细胞以 2×10^5 个/孔的接种密度接种在6

孔板中,并孵育24小时。将溶解在10mM的DMSO溶液中的待测配合物1a和金诺芬(Auranofin)分别用DMEM培养基连续稀释并添加到各孔中(每孔1mL的DMEM培养基,最终DMSO浓度 $\leq 1\%$)。对于常氧组:加入配合物1a的A375人黑色素瘤细胞孵育12小时后,经420nm ($11\text{mW}/\text{cm}^2$)光照5min;对于乏氧组:加入配合物1a的A375人黑色素瘤细胞孵育11小时后,将6孔板放入产气乏氧袋中并放置1h,使 O_2 的浓度 $<0.1\%$,再经420nm ($11\text{mW}/\text{cm}^2$)光照5min。对于常氧组和乏氧组,在光照结束后立即用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤细胞3次,然后将100 μL 的试剂一(取自硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测试剂盒(Solarbio))添加到常氧组和乏氧组的细胞中,在冰上进行细胞裂解5min,收集细胞裂解液,并在冰上超声裂解液3min,超声结束后,在4 $^\circ\text{C}$ 和15000rpm的条件下离心5min,并吸取上清液于离心管中,然后按照TrxR活性检测试剂盒中说明书的操作要求加入试剂四(取自硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测试剂盒(Solarbio)),在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育30min后分别加入试剂二和试剂三(取自硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测试剂盒(Solarbio)),加入试剂二和试剂三后立即测定A375人黑色素瘤细胞内TrxR的抑制活性。其中,Auranofin为阳性对照样品。

[0112] 对于阳性对照组,将待测配合物1a换为金诺芬(Auranofin)即可。

[0113] 黑暗条件下的测试与上述操作步骤相同,区别在于未进行光照。

[0114] 表2为配合物1a对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶的抑制活性情况统计表。从表2中可以看出,在黑暗条件下,25 μM 的配合物1a对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶的活性并没有显示出抑制作用。但是在光照5min后(乏氧条件和常氧条件),配合物1a则显示出了对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶的有效抑制作用,且其抑制的效果接近最有效的TrxR抑制剂金诺芬。

[0115] 表2配合物1a对A375人黑色素瘤细胞的TrxR酶的抑制活性

实验组别	IC ₅₀ [μM]
配合物 1a (常氧条件, 黑暗条件)	>25
配合物 1a (常氧条件, 420 nm 光照)	3.90 \pm 1.09
配合物 1a (乏氧条件, 420 nm 光照)	3.10 \pm 0.62-
阳性对照 (Auranofin) (常氧条件, 黑暗条件)	2.97 \pm 0.50

[0117] 四、配合物1a-1c对多种癌细胞的抑制活性测试

[0118] 本发明实施例中所测试的细胞为A375人黑色素瘤细胞、A549人肺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞和HepG-2人肝癌细胞。

[0119] 本发明实施例中所测试的A375人黑色素瘤细胞、A549人肺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞和HepG-2人肝癌细胞按照本领域的常规技术手段培养。

[0120] 具体测试过程包括以下步骤:

[0121] (1) 种细胞

[0122] 弃原培养液,用2mL的PBS清洗细胞三遍,1mL的胰酶消化30s,加2mL的DMEM完全培养基终止消化,将细胞转移至离心管中,并在1000rpm的转速下离心3min,弃上清,加2mL的DMEM完全培养基吹打10次混匀,取10 μL 的细胞悬液到细胞计数板中,计数;将上述细胞悬浮

液接种于96孔板中,接种的密度为5000个/孔,每种配合物3个复孔,计算需要的细胞量与细胞孔量,通过细胞计数计算所需细胞悬液的量,将上述DMEM完全培养基依据所需的细胞数稀释后,向每孔加入100 μ L稀释后的DMEM完全培养基,吸打混匀,利用排枪种细胞,并置于培养箱中37 $^{\circ}$ C培养24h,做好标记。

[0123] (2) 加药

[0124] 实验分为加药组、空白对照组和阳性对照组。将步骤(1)中的96孔板中各孔中的培养液吸出,将配合物1a~1c的母液用DMEM完全培养基稀释并混合均匀,稀释后的终浓度分别为0、0.390625、0.78125、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50 μ M;加药组中利用排枪(使用其中3个孔)向96孔板中每孔吸取100 μ L稀释液,倾斜96孔板,向标记好的相应的3个孔中加入稀释液(防止戳伤细胞),每个浓度稀释液依次加入,加入后吹吸3次左右混匀,各个配合物依次类推,做好标记,左右前后轻晃3次,放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的培养箱中。

[0125] 空白对照组和加药组的区别在于,空白对照组中将步骤(2)中的96孔板中的各孔中的培养液吸出后加入100 μ L的DMEM培养基。

[0126] 阳性对照组和加药组的区别在于,阳性对照组中将步骤(2)中的96孔板中的各孔中的培养液吸出后加入100 μ L经DMEM完全培养基稀释的Auranofin母液。

[0127] (3) 光照

[0128] 其中,常氧光照的步骤为:加药组、空白对照组和阳性对照组中的细胞在CO₂培养箱中培养4小时后将上述需要光照的细胞置于细胞光毒仪上进行光照,光照条件为365nm光照5min或420nm光照5min,光照之后放回CO₂培养箱继续培养;

[0129] 其中,乏氧光照的步骤为:加药组、空白对照组和阳性对照组中的细胞在CO₂培养箱中培养3小时后将需要光照的两组细胞在350mL的厌氧产气袋(购自广州艾莎生物科技有限公司)中放置1小时以创造O₂<0.1%的环境,再将其置于细胞光毒仪上进行光照,光照条件为365nm光照5min或420nm光照5min,光照之后将96孔板从厌氧产气袋中取出,放回CO₂培养箱继续培养;

[0130] 不需要光照的加药组、空白对照组和阳性对照组则在黑暗条件下置于CO₂培养箱培养。

[0131] (4) 噻唑蓝(MTT)比色法测试

[0132] 作用于细胞48h后,用排枪向96孔板中每孔加入20 μ L的MTT溶液(将MTT溶解液PBS中,其中,MTT的浓度为5mg/mL);在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时,孵育结束后,去除MTT溶液,利用排枪向96孔板中的每孔中各加130 μ L的DMSO,置于水平摇床中摇动10min,待甲瓚充分溶解后,用酶标仪在490nm波长下检测吸光度,按要求计算细胞在各浓度药物下存活率,作散点图,得到对癌细胞增殖的IC₅₀结果,所得结果如表3和表4所示,其中,Auranofin(金诺芬)为阳性对照样品。

[0133] 表3在常氧条件下配合物1a-1c对多种癌细胞的抑制活性统计表

	癌细胞种类	配合物编号	不同条件下的 IC ₅₀ 值 (μM)		
			黑暗条件下	365 nm-5 min	420 nm-5 min
[0134]	A375 人黑色素瘤细胞	1a	> 100	0.39±0.18	0.47±0.03
		1b	> 100	1.16±0.13	2.0±0.07
		1c	76.8±0.50	2.66±0.22	3.11±0.06
		Auranofin	0.95±0.35	0.22±0.01	1.22±0.61
[0135]	A549 人肺癌细胞	1a	> 100	1.30±0.05	1.23±0.08
		1b	> 100	5.0±0.41	2.74±0.21
		1c	> 100	17.1±0.52	8.8±1.20
		Auranofin	4.14±0.10	4.2±0.08	4.2±0.20
	HCT116 人结肠癌细胞	1a	> 100	0.47±0.19	0.65±0.31
		1b	> 100	1.44±0.37	2.2±0.41
		1c	51.2±0.11	3.10±0.60	8.7±2.30
		Auranofin	0.65±0.09	0.68±0.20	0.61±0.10
	HepG-2 人肝癌细胞	1a	> 100	0.60±0.30	0.90±0.27
		1b	> 100	1.50±0.21	3.80±0.30
		1c	96.8±0.95	4.80±0.50	5.71±0.80
		Auranofin	2.23±0.15	1.22±0.87	1.60±0.11

[0136] 表4在乏氧 ($O_2 < 0.1\%$) 条件下配合物1a-1c对A375人黑色素瘤细胞的抑制活性统计表

配合物	IC ₅₀ [μM]	
	365 nm-5 min	420 nm-5 min
1a	0.39 ± 0.08	2.07±0.09
1b	1.26±0.05	5.74±0.10
1c	4.10±0.11	10.8±0.15
Auranofin	2.2±0.10	0.99±0.08

[0138] 在所有情况下,空白对照组在光照条件下和黑暗条件下均未显示出明显的细胞毒性。

[0139] 由表3可知,在常氧条件下,配合物1a和1b在黑暗条件下对A375人黑色素瘤细胞、HCT116人结肠癌细胞、A549人肺癌细胞和HepG-2人肝癌细胞的IC₅₀值均大于100μM,表明配合物1a和1b在黑暗条件下对癌细胞的毒性很低,相比较而言,在黑暗条件下,配合物1c对A375人黑色素瘤细胞、HCT116人结肠癌细胞以及HepG-2人肝癌细胞的IC₅₀值均小于100μM,表明,在黑暗条件下,配合物1c对癌细胞的毒性相对较高。

[0140] 在光照条件(365nm或420nm)下,配合物1a、1b和1c对A375人黑色素瘤细胞、HCT116人结肠癌细胞、A549人肺癌细胞和HepG-2人肝癌细胞的毒性迅速增加,且配合物1a在光照

条件下对上述4种癌细胞表现出优异的抑制作用,光照后配合物1a对癌细胞的毒性要大于阳性对照组中的金诺芬。

[0141] 由表4可知,在乏氧条件下,经过光照后配合物1a-1c对A375人黑色素瘤细胞的毒性也显著增加。尤其是在365nm光照5min后,配合物1a对于A375人黑色素瘤细胞的 IC_{50} 值与常氧条件下365nm光照5min后配合物1a对于A375人黑色素瘤细胞的 IC_{50} 基本相同,且配合物1a对于A375人黑色素瘤细胞的 IC_{50} 值要低于金诺芬,表明在乏氧条件下,365nm光照5min后,配合物1a对A375人黑色素瘤细胞的活性的抑制作用要优于金诺芬。

[0142] 五、配合物对A375人黑色素瘤细胞荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用

[0143] 具体的实验过程如下:

[0144] (1)建立小鼠肿瘤模型

[0145] 将悬浮于PBS中的150万个A375人黑色素瘤细胞经皮下注射到5-7周龄的雌性BALB/Cannu(Nude)小鼠背侧,建立异种移植模型。当肿瘤体积达到约 $50mm^3$ (肿瘤接种后3-4天)时,将小鼠随机分为4组,分别为:对照组、给药组、光照组、给药光照组。

[0146] (2)给药治疗

[0147] 对照组每隔一天腹腔注射生理盐水(含5%吐温80)($100\mu L$ /只);给药组每隔一天腹腔注射 $3mg/kg$ 的配合物1a(将配合物1a溶于生理盐水,含5%吐温80)($100\mu L$ /只);光照组每隔一天腹腔注射 $100\mu L$ 的4%水合氯醛麻醉小鼠,并用465nm光照射小鼠肿瘤部位5min;给药光照组每隔一天腹腔注射 $3mg/kg$ 的配合物1a(将配合物1a溶于生理盐水,含5%吐温80)($100\mu L$ /只),给药4h后腹腔注射 $100\mu L$ 的4%水合氯醛麻醉小鼠,并用465nm光照射小鼠肿瘤部位5min。共进行7次给药,每隔一天测量肿瘤体积。

[0148] 当对照组小鼠的肿瘤体积(体积=(长 \times 宽²)/2)长到 $800mm^3$ 后,麻醉小鼠并脱颈椎处死小鼠。对照组、给药组(以配合物1a为例)、光照组和给药光照组小鼠的肿瘤测量情况如图9所示,从图9中可以看出,给药组和光照组对于肿瘤生长的抑制作用较小,而给药光照组中的肿瘤的生长受到了较大程度的抑制,以上结果表明,本发明实施例中的配合物1a在光照条件下对A375人黑色素瘤细胞荷瘤小鼠的肿瘤的生长具有很好的抑制作用,给药的第16天后肿瘤的抑制率最终达到92%。图10为给药第16天后对照组、给药组(以配合物1a为例)、光照组和给药光照组的小鼠肿瘤的重量统计图,图11为给药后对照组、给药组(以配合物1a为例)、光照组和给药光照组中的小鼠的肿瘤的体积统计图,从图10和图11中同样可以看出,本发明实施例中的配合物1a在光照条件下(465nm)对A375人黑色素瘤细胞荷瘤小鼠的肿瘤生长具有很好的抑制作用。

[0149] 图12为给药后对照组、给药组(以配合物1a为例)、光照组和给药光照组的小鼠的体重统计图,从图12中可以看出,在整个实验的过程中,各组中的小鼠的重量并没有发生明显的下降,且并未发生小鼠的死亡,表明本发明实施例的中配合物1a具有较高的安全性和较低的副作用。

[0150] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

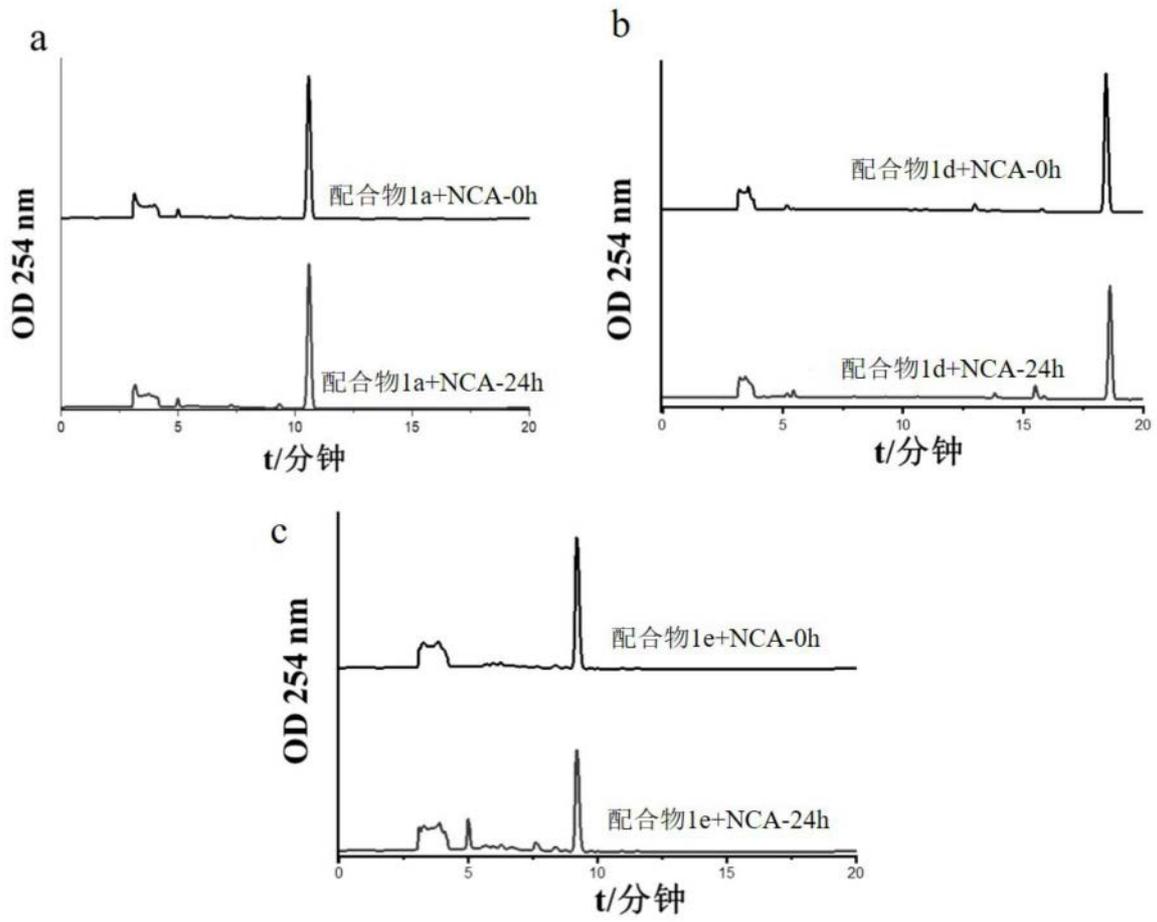


图1

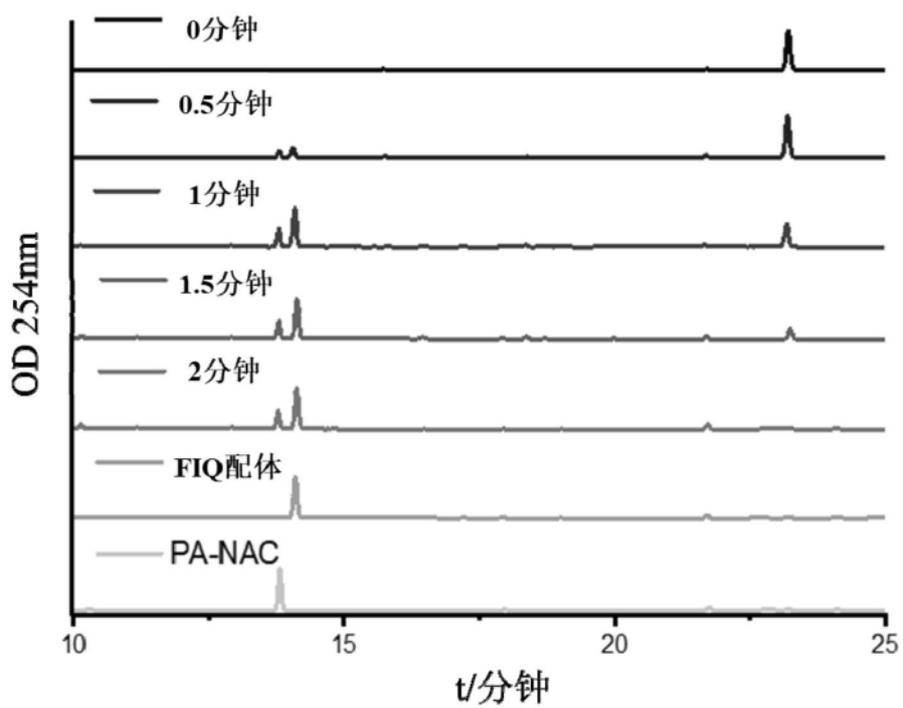


图2

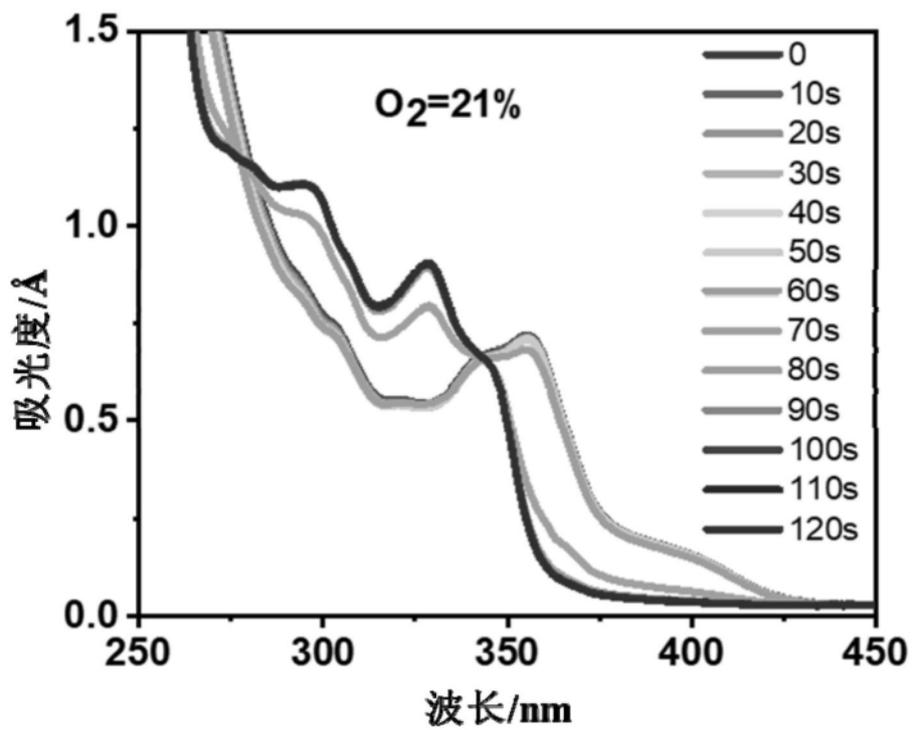


图3

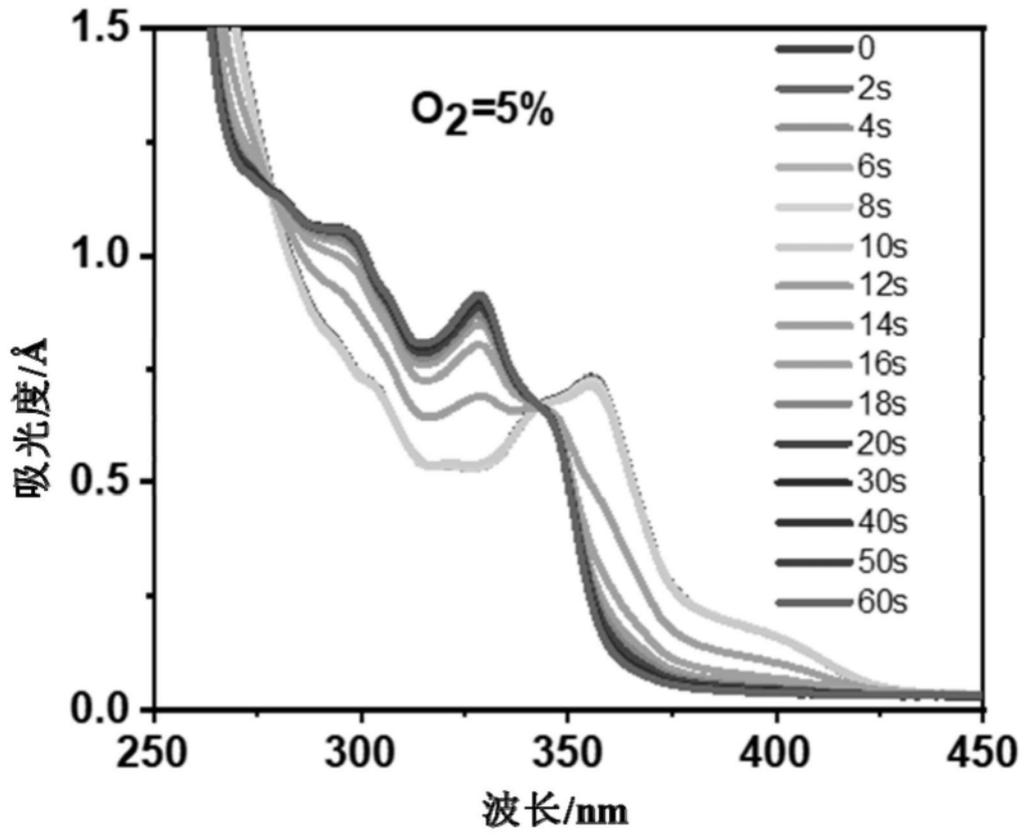


图4

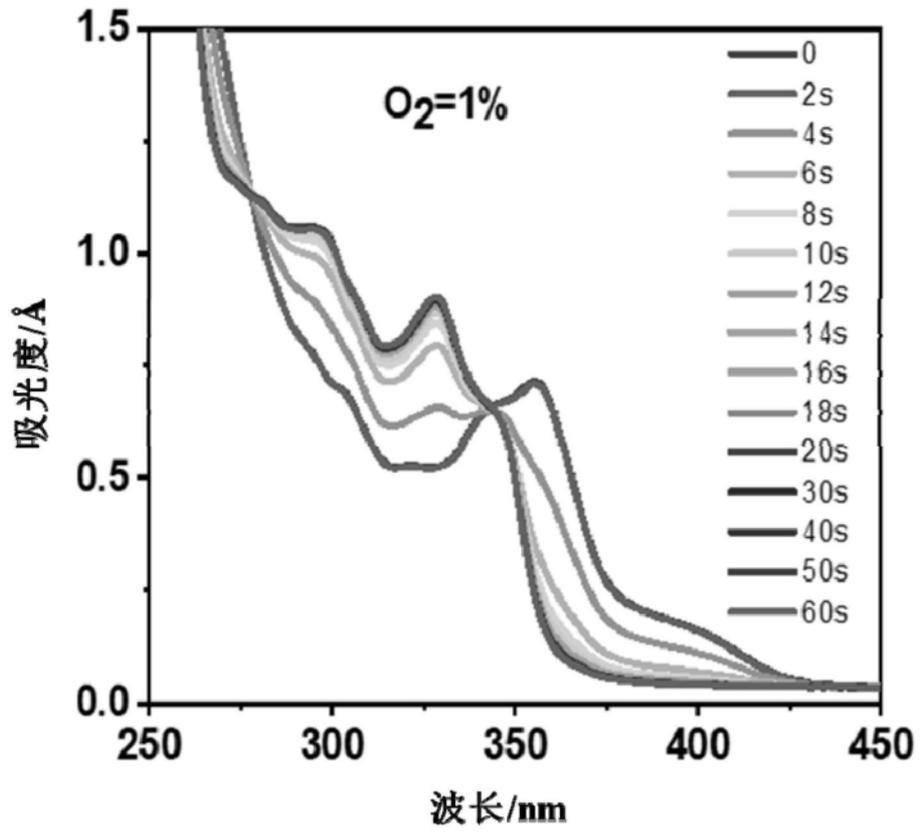


图5

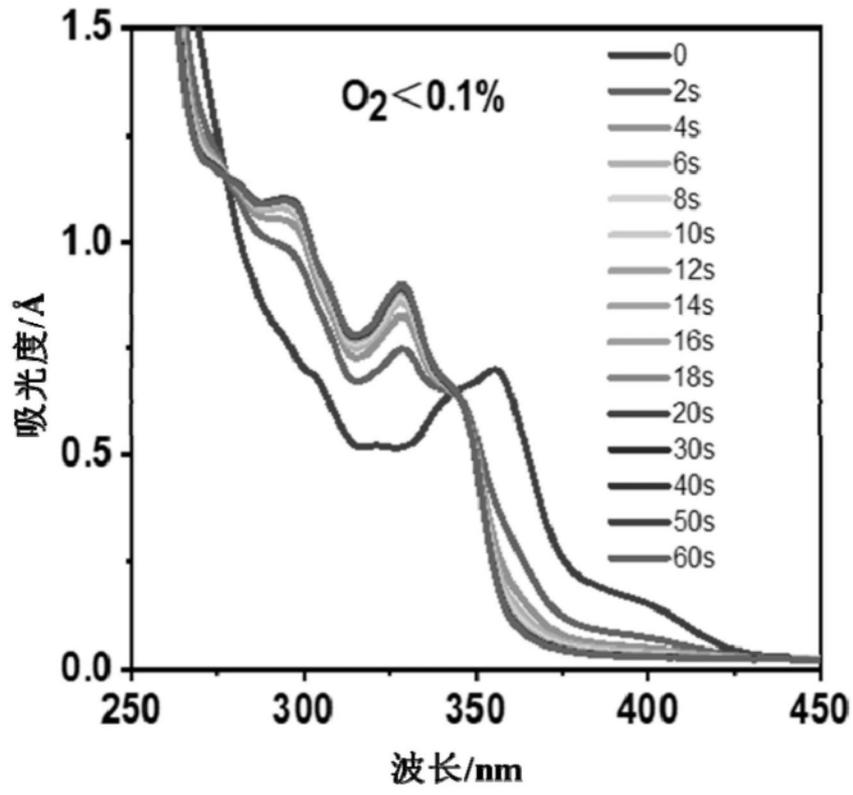


图6

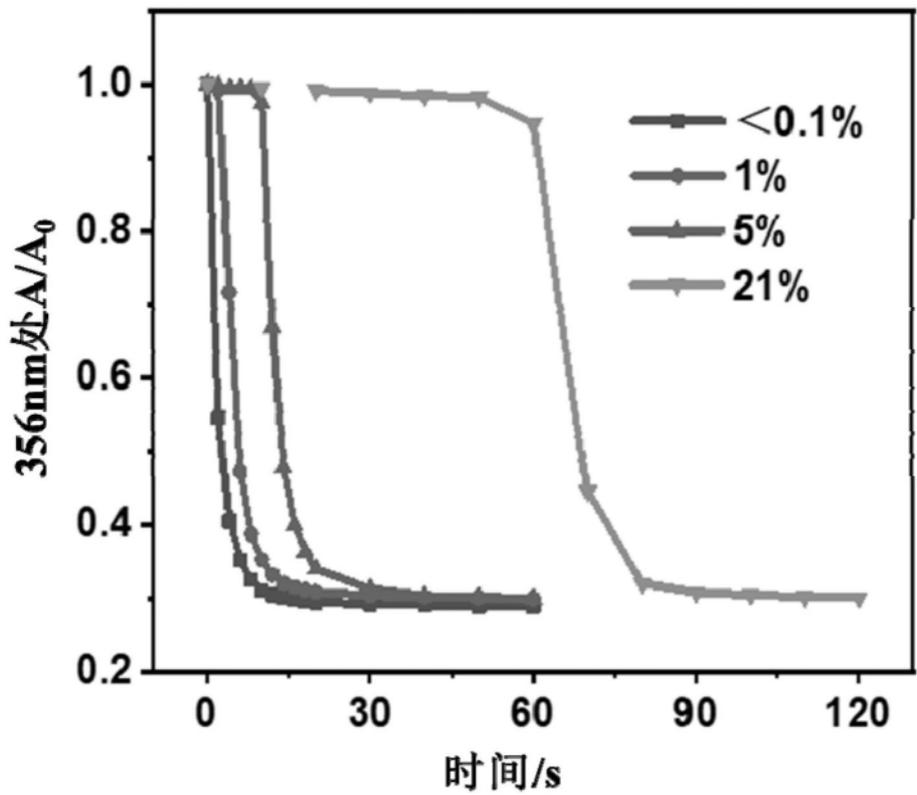


图7

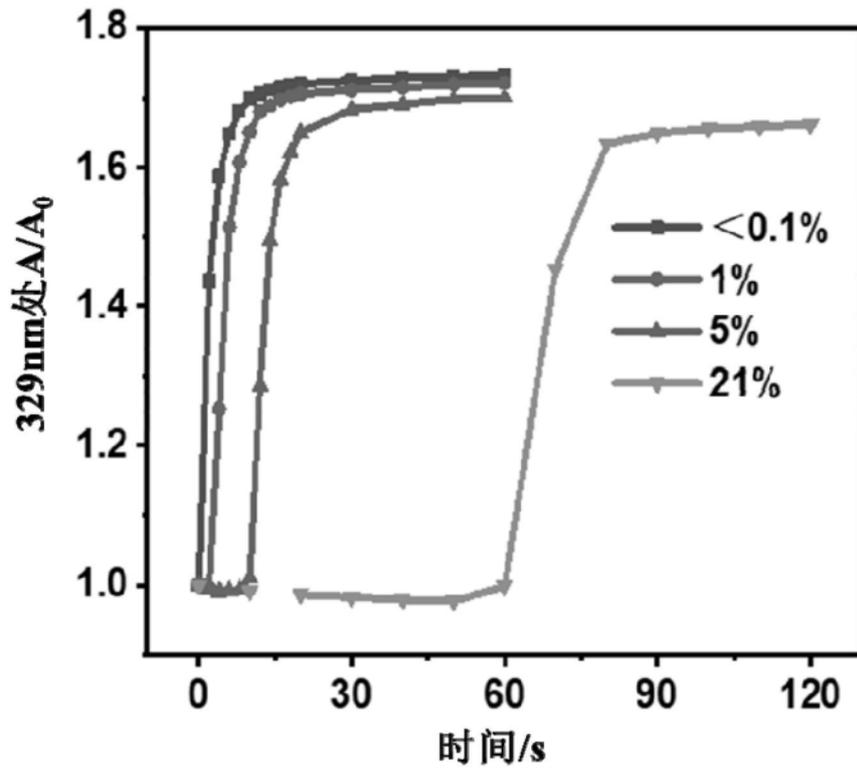


图8



图9

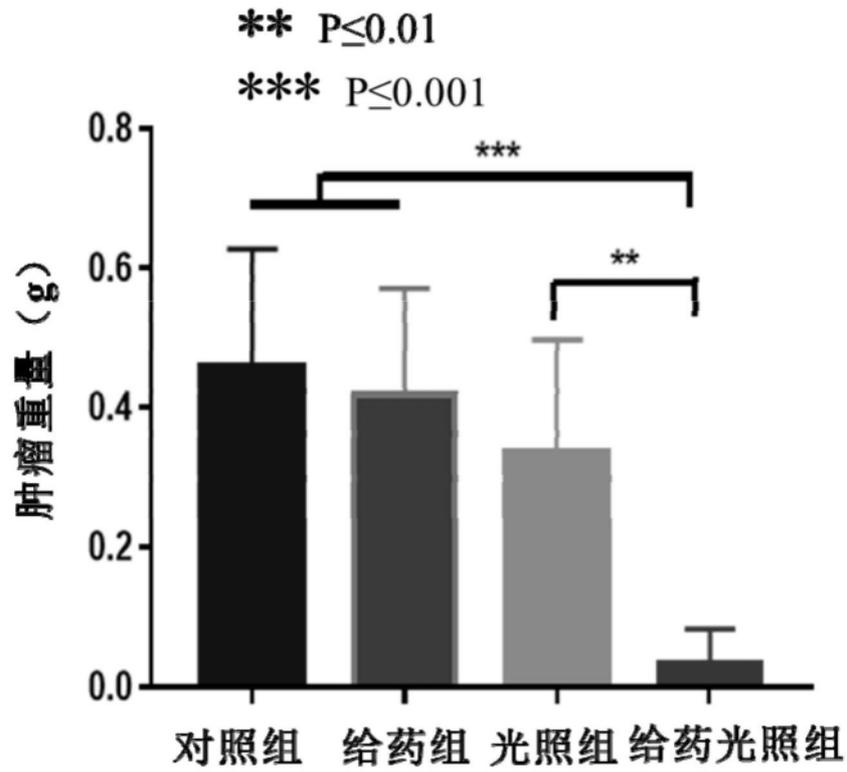


图10

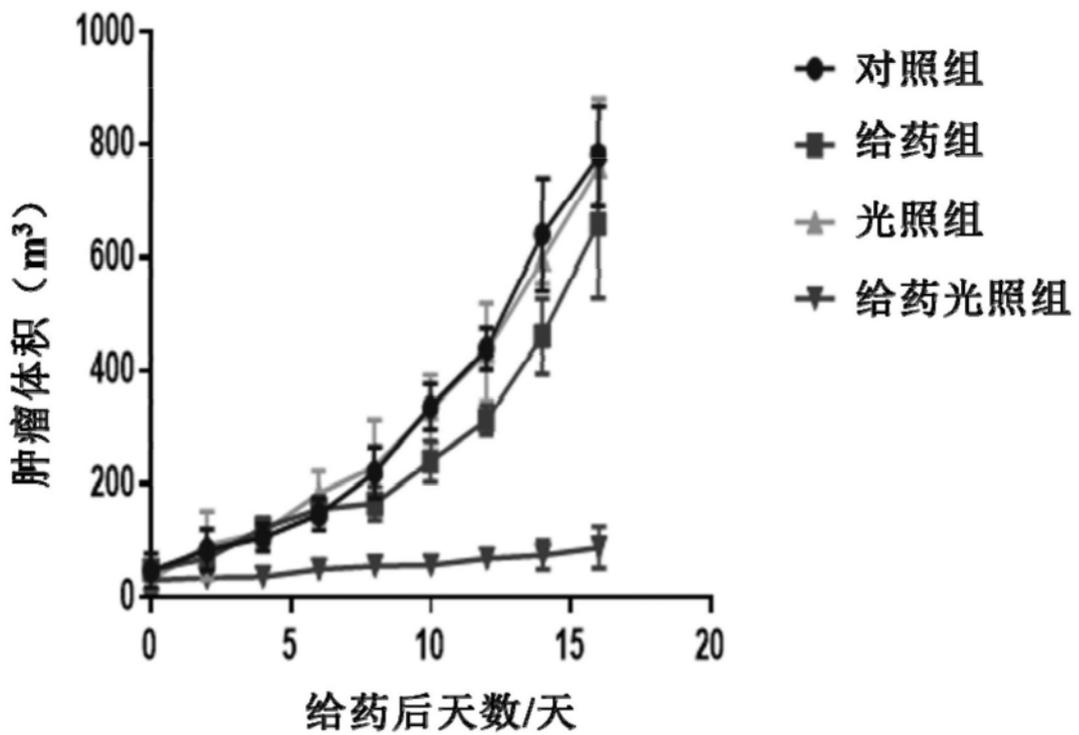


图11

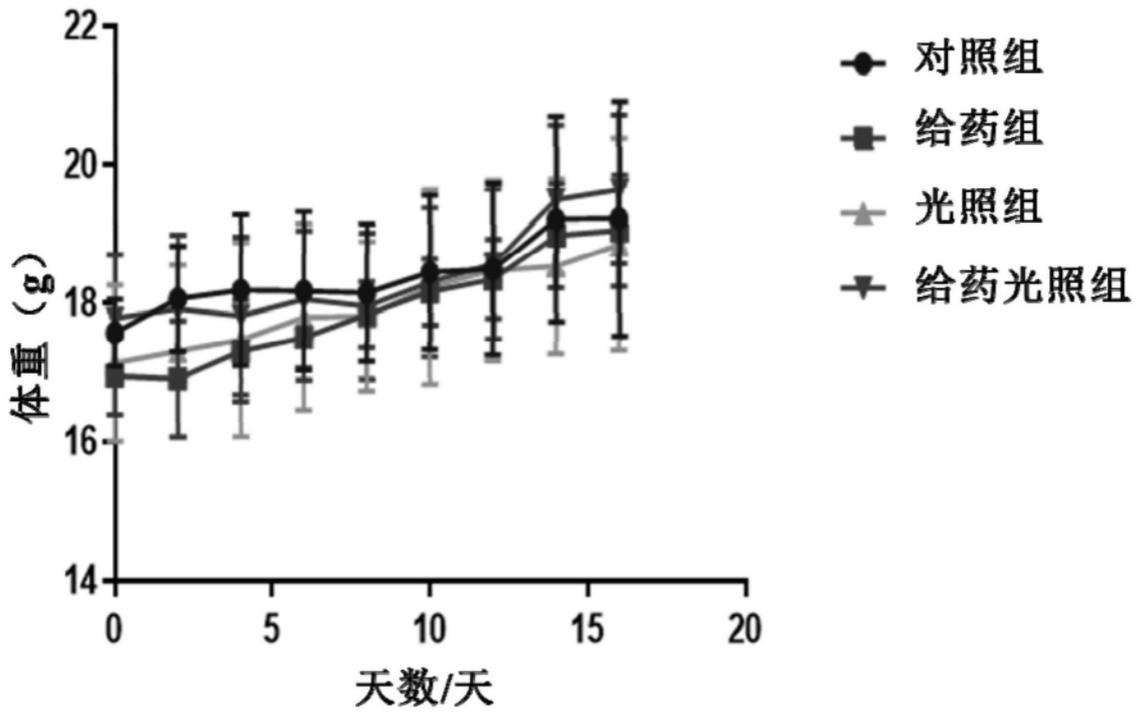


图12