



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103315985 A

(43) 申请公布日 2013.09.25

(21) 申请号 201310186265.0

(22) 申请日 2013.05.16

(71) 申请人 南京市鼓楼医院

地址 210008 江苏省南京市鼓楼区中山路  
321 号

(72) 发明人 丁义涛 王忠夏 曹胤 江春平  
李尔广 张广

(74) 专利代理机构 江苏银创律师事务所 32242  
代理人 何震花

(51) Int. Cl.

A61K 31/137(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

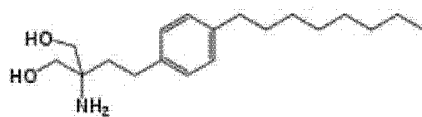
(54) 发明名称

Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的  
应用

(57) 摘要

本发明公开了 Fingolimod (代号 FTY720) 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用, 属于药物新用途技术领域。本发明通过建立人肝癌细胞裸鼠原位移植瘤模型, 成瘤后随机分为对照组及 Fingolimod 治疗组, 2 周后处死, 记录肿瘤大小及肝内转移情况, 发现 Fingolimod 能够在肝癌原位移植瘤模型中可以抑制肝癌的增长并减少肝内转移。因此, Fingolimod 可以用于制备抑制肝癌肝内转移的药物, 具有良好的开发应用前景。本发明涉及 Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的用途属于首次公开。

1. Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用, 所述化合物 Fingolimod 结构如式(I)所示:



式(I)。

## Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化合物 Fingolimod 的新用途,尤其涉及 Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用。

### 技术背景

[0002] Fingolimod (代号 Fingolimod),作为一种可以抑制淋巴细胞归巢的免疫抑制剂,已被美国 FDA 批准其作为口服药用于治疗多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS),以减少复发和延迟残疾进展。作用机制是 Fingolimod 在体内磷酸化,成为 S1P 的类似物,通过竞争性的与 S1PR1 结合从而抑制 S1P 的作用,发挥其免疫抑制和免疫调控功能。

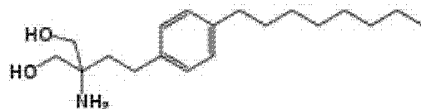
[0003] 在肝癌的发生发展过程中,往往会发生肝内转移,从而实现逃避免疫、放化疗和利于自身的生长,肝癌肝内转移成为肝癌有效治疗和预后的一个重要障碍,因此能够找到一个对肝癌肝内转移具有抑制作用的化合物,具有重要的应用价值。我们的研究首次发现 Fingolimod 可以抑制肝癌肝内转移,因此 Fingolimod 可以用于制备抑制肝癌肝内转移药物。

### 发明内容

[0004] 本发明提供化合物 Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用。

[0005] 本发明采用如下技术方案:Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用,Fingolimod 的结构式如式(I)所示:

[0006]



[0007] 式(I)

[0008] 本发明通过建立人肝癌细胞裸鼠原位移植瘤模型,成瘤后随机分为对照组及 Fingolimod 治疗组,2 周后处死,记录肿瘤大小及肝内转移情况,发现 Fingolimod 能够在肝癌原位移植瘤模型中可以抑制肝癌的增长并减少肝内转移。因此,Fingolimod 可以用于制备抑制肝癌肝内转移的药物,具有良好的开发应用前景。

[0009] 本发明涉及 Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物的用途属于首次公开,具备突出的实质性特点,同时用于肝癌的防治显然具有显著的进步。

[0010] 以下通过实施例对本发明作进一步详细的说明,但本发明的保护范围不受具体实施例的任何限制,而是由权利要求加以限定。

### 附图说明

[0011] 图 1 是裸鼠人肝癌细胞原位移植瘤模型的建立过程。

- [0012] A 麻醉固定 ;B 纵行开腹 ;C 暴露肝脏 ;D 注射成瘤 ;E 连续缝合。
- [0013] 图 2 是 Fingolimod 对肝脏原位移植瘤的影响,图 A :对照组。
- [0014] 图 3 是 Fingolimod 对肝脏原位移植瘤的影响,图 B :Fingolimod 治疗组。
- [0015] 图 4 Fingolimod 治疗组与对照组有明显统计学差异。
- [0016] 将治疗组与对照组肿瘤体积进行统计学分析 :两组之间有明显统计学差异 (P=0.006)。

## 具体实施方式

- [0017] 本发明所涉及化合物 Fingolimod 购买自 R&D 公司。
- [0018] 以下通过实施例对本发明作进一步详细的说明,但本发明的保护范围不受具体实施例的任何限制,而是由权利要求加以限定。
- [0019] 实施例 1 :本发明所涉及化合物 Fingolimod 片剂的制备 :
- [0020] 取 20 克化合物 Fingolimod,加入制备片剂的常规辅料 180 克,混匀,常规压片机制成 1000 片。
- [0021] 实施例 2 :本发明所涉及化合物 Fingolimod 胶囊剂的制备 :
- [0022] 取 20 克化合物 Fingolimod,加入制备胶囊剂的常规辅料如淀粉 180 克,混匀,装胶囊制成 1000 片。
- [0023] 下面通过药效学实验来进一步说明其药物活性。
- [0024] 实验例 :建立人肝癌细胞裸鼠原位移植瘤模型,观察 Fingolimod 在肝癌原位移植瘤模型中对肝癌的抑制和对肝内转移的抑制情况。
- [0025] 一、材料与方法
- [0026] 1、材料
- [0027] 1.1 动物 Balb/c 裸鼠 12 只,雄性,体重 25g 左右(由鼓楼医院动物中心提供)
- [0028] 1.2 试剂
- [0029]

主要试剂	
高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶	Gibco 公司
DMSO、胎牛血清	Gibco 公司
Fingolimod	R&D 公司

- [0030] 1.3 细胞系
- [0031] 人肝癌细胞系 SMMC-7721 南京凯基生物科技发展有限公司,由本实验室焦洪波硕士以含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基培养后冻存于液氮中,人肝癌细胞系 Huh7 购买于湘雅医学院。
- [0032] 2. 实验方法
- [0033] 2.1 细胞复苏、培养、传代、计数
- [0034] 2.1.1 细胞复苏
- [0035] 1、从液氮罐中取出细胞冻存管,放在事先准备好的 37℃ 水浴恒温箱中尽快融化。
- [0036] 2、紫外灯照射超净台 20min,以滴管取出细胞悬液注入离心管中,滴加含 10% 胎牛

血清的高糖 DMEM 培养液到 10 ml,轻轻吹打。

[0037] 3、4℃下低速离心(1200 rpm) 5min,弃去上清。

[0038] 4、离心后的细胞沉淀以含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液轻轻吹打混匀重悬,在 37℃含 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 培养箱里培养,24h 后在超净台内弃去培养基,无菌 PBS 轻轻冲洗 2 次,重新加入含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养继续培养。

[0039] 2.1.2 细胞传代

[0040] 1、待培养瓶细胞密度达 90% 左右时弃去旧培养液,无菌 PBS 轻轻冲洗两次。

[0041] 2、加入适量 0.25% 胰酶溶液,润湿培养瓶后弃去多余胰酶,于培养箱放置 2~3min,在显微镜下观察,当原来贴壁的细胞逐渐散开趋于圆形时加入适量含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基终止消化,滴管轻轻吹打使贴壁细胞脱落,加入离心管内。

[0042] 3、4℃下低速离心(1200 rpm) 5min,弃去上清。

[0043] 4、加入适量 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基轻轻吹打重悬,分装到培养瓶中放入孵箱里继续培养。

[0044] 2.1.3 细胞计数

[0045] 1、酒精擦洗记数板和盖玻片后超净台内晾干。

[0046] 2、把盖玻片覆盖在计数板上,稍微移向一侧,露出记数板面少许。

[0047] 3、按照细胞传代步骤 1-3 步骤收集细胞沉淀。

[0048] 4、加入 3ml 高糖 DMEM,用滴管轻轻反复吹打混匀细胞液。

[0049] 5、取干净记数板,用滴管稍微吹打细胞悬液后,立即用 100ml 枪吸取 20ul 细胞悬液从盖片边缘沾少许细胞悬液,使之充满记数板和盖玻片间的间隙,无气泡。

[0050] 6、镜下观察,要求细胞均匀分布各处。计算四角大格的细胞数。压中线者只记左侧和上方者,右和下不计算在内。

[0051] 7、然后按下公式计算:细胞数 / 毫升 = 四角大格细胞个数 ÷ 4 × 10<sup>4</sup> × 稀释倍数。

[0052] 2.2 裸鼠人肝癌细胞原位移植瘤模型的建立

[0053] 1. 按第一部分方法培养并选取对数期 SMMC-7721 细胞,胰酶消化离心, PBS 重悬细胞使得细胞浓度为 1×10<sup>8</sup> 个 /ml 备用;

[0054] 2. 将氯胺酮与地西洋 1:1 混匀,肌肉注射麻醉裸鼠,待翻正反射消失后固定于手术台上,连接维持麻醉吸管,备皮,常规消毒。

[0055] 3. 于腹正中线剑突下作一长约 1cm 左右的纵行切口,暴露肝脏,轻挤双侧肋骨,挤出左肝叶,湿纱布垫于肝叶下方。

[0056] 4. 用 1ml 胰岛素注射器针头沿肝叶长轴方向与肝脏呈 45° 角斜刺入肝实质内,缓慢注入 SMMC-7721 细胞 40 μl,避免外溢。在注射时用棉棒将肝叶向上托起,约成 30° 角,可减少细胞悬液外溢。

[0057] 5. 缓慢退出针头,用无菌棉棒压迫 2~3min 防止出血及细胞悬液反流。

[0058] 6. 将肝脏轻柔回纳入腹腔,逐层缝合关腹(连续缝合)。

[0059] 7. 术后置于暖灯下复温,小鼠苏醒后保温 1~2h 后继续予 SPF 级环境中饲养,自由饮水进食。

[0060] 2.3 裸鼠人肝癌细胞原位移植瘤模型的治疗

[0061] 2.31 实验分组:原位移植瘤模型的建立一个多月后,随机将裸鼠分为两组:治疗组

腹腔注射 5mg/(kg·day)的Fingolimod 生理盐水溶液,对照组腹腔注射等量的 DMSO 对照,每天进行一次治疗,持续 14 天,观察裸鼠的活动情况。

[0062] 2.3.2 标本采集:14 天后,麻醉处死裸鼠并完整取下肝脏,游标卡尺测量肿瘤大小 后将每块肿瘤分为两块,一块以甲醛固定,常温保存,另一块则置于 RNAlater 中 4° 过夜,第二天置于液氮保存。

[0063] 二、实验结果

[0064] 1 裸鼠人肝癌细胞原位移植瘤模型的建立

[0065] 本实验建立原位移植瘤模型使用 12 只裸鼠,术后第 2 天死亡 1 只,解剖未发现肿瘤形成,成瘤率 92%。

[0066] 2 裸鼠人肝癌细胞原位移植瘤模型的治疗

[0067] 裸鼠人肝癌原位移植瘤模型建立后,随机分为两组 :Fingolimod 组及对照组。结果可以发现,所有裸鼠均已成瘤,另外 Fingolimod 以 5mg/(kg·day) 腹腔注射 14 天后,肿瘤组织出现坏死,且体积明显减小(表 1、图 2B),肿瘤大小较对照组有明显差异(图 3)。对照组发现 3 例肝内转移,Fingolimod 组未见肝内转移(图 2,表 2)。

[0068] 表 1 Fingolimod 组与对照组原位移植瘤大小

[0069]

对照组		Fingolimod	
肿瘤大小 (mm)	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )	肿瘤大小 (mm)	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )
8.9*6.5*4.0	115.70	3.8*3.3*3.0	18.81
5.0*4.3*3.5	37.63	2.8*2.7*1.9	7.18
8.1*4.5*3.3	60.14	3.8*2.6*1.9	9.39
8.0*5.0*3.9	78.00	4.0*2.7*2.0	10.80
9.0*5.1*4.4	100.98	3.1*2.0*1.4	4.34
		4.1*3.0*2.4	14.76

[0070] 表 2 Fingolimod 组与对照组肝内转移数目

[0071]

	对照组	Fingolimod
肝内转移数目	3	0
总数	5	6
肝内转移率	60%	0%

[0072] 由上述实施例表明,本发明公开了 Fingolimod (代号 Fingolimod) 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的应用,属于药物新用途技术领域。本发明通过建立人肝癌细胞裸鼠原位移植瘤模型,成瘤后随机分为对照组及 Fingolimod 治疗组,2 周后处死,记录肿瘤大小及肝内转移情况,发现 Fingolimod 能够在肝癌原位移植瘤模型中可以抑制肝癌的增长并减少肝内转移(由对照组 60% 的肝内转移率降到 0%)。因此,Fingolimod 可以用于制备抑制肝癌肝内转移的药物,具有良好的开发应用前景。本发明涉及 Fingolimod 在制备抑制肝癌肝内转移药物中的用途属于首次公开。

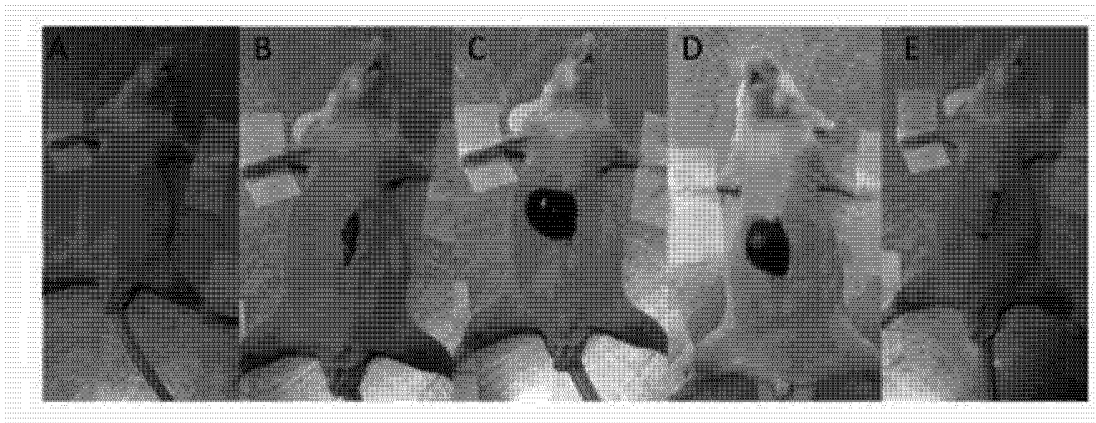


图 1

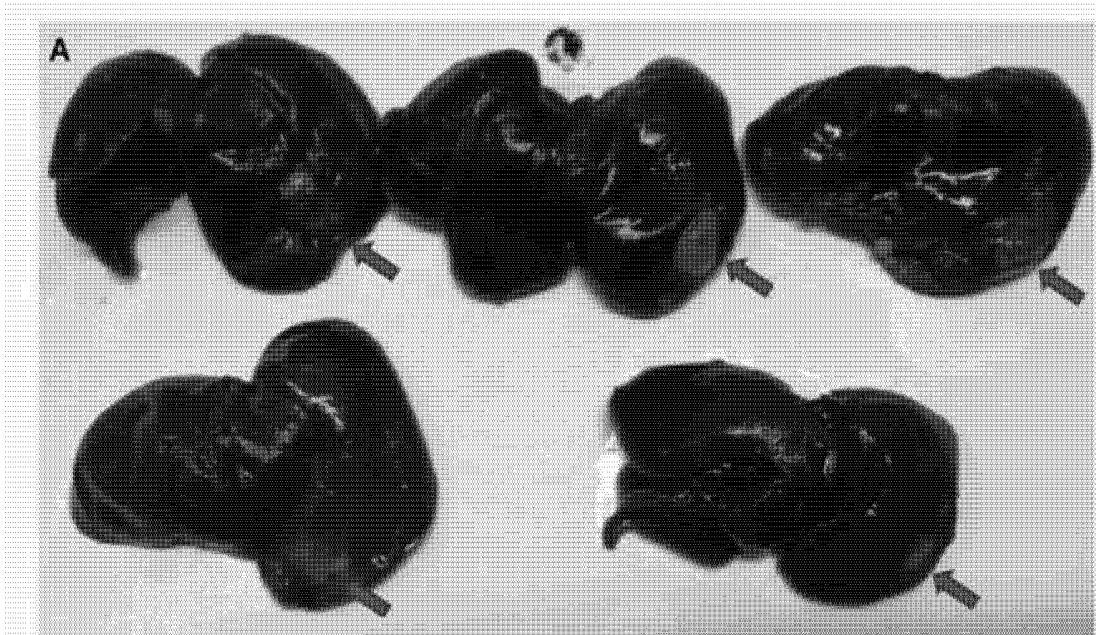


图 2



图 3

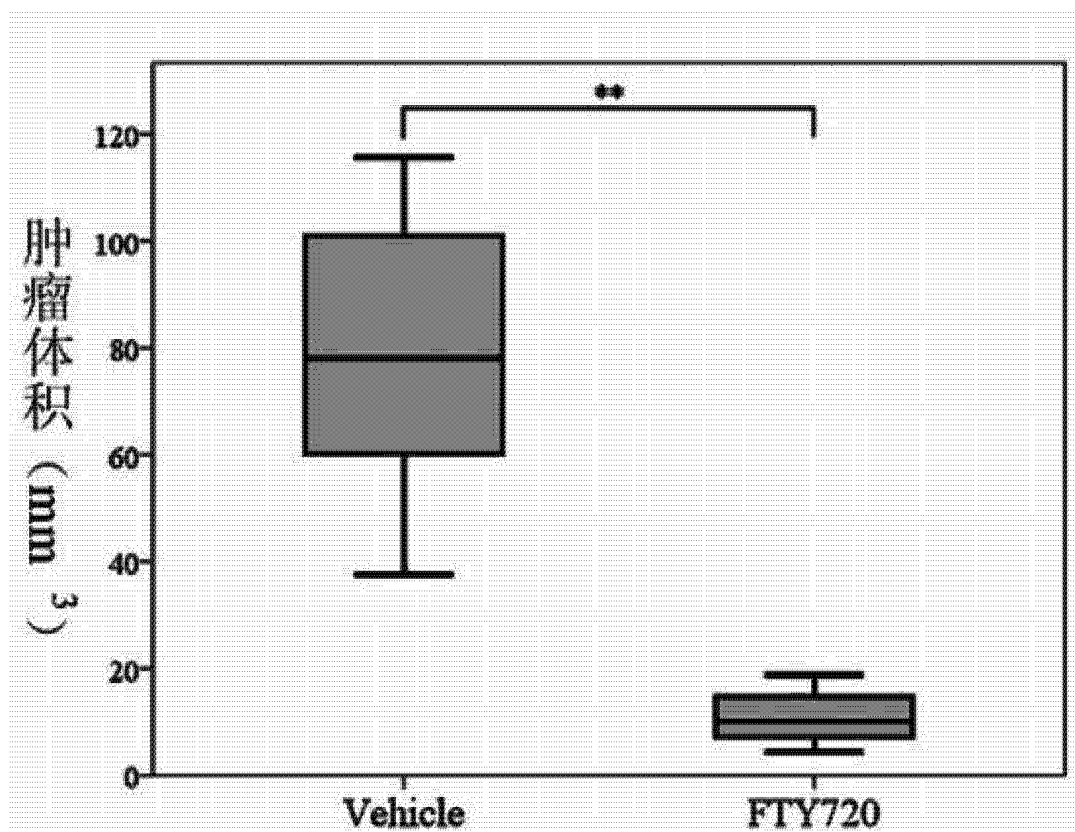


图 4