



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102764259 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201110112769. 9

(22) 申请日 2011. 05. 03

(71) 申请人 中国科学院动物研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路 1 号院
5 号

申请人 中国科学院昆明植物研究所

(72) 发明人 周光飏 程永现 马亮 吕青
刘姿

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280

代理人 郭广迅

(51) Int. Cl.

A61K 31/4741 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 35/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

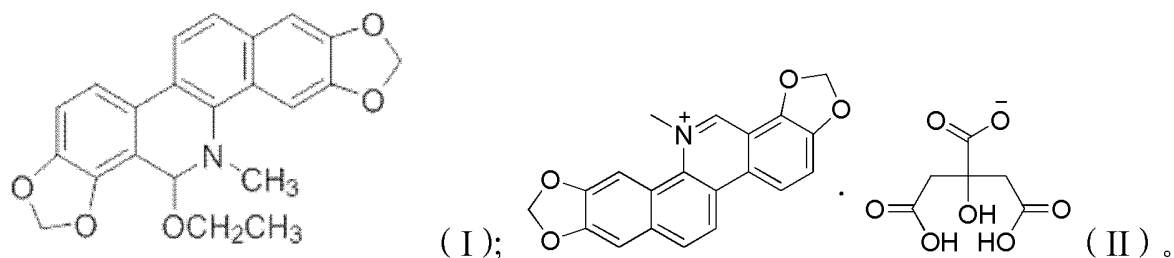
血根碱类化合物在制备防治癌症的药物中的
用途和药物组合物

(57) 摘要

本发明提供乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱在制备预防和 / 或治疗癌症的药物中的用途。乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱作为能够有效下调 CIP2A 蛋白并抑制癌细胞增殖的化合物, 具有潜在的毒副作用小、显著抑制癌细胞增殖、广谱抗癌、来源广泛以及成本低等优点, 在临床上具有广泛的抗癌应用前景。

1. 乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱在制备预防和 / 或治疗癌症的药物中的用途。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述乙氧基血根碱的结构式为 (I), 所述枸橼酸血根碱的结构式为 (II):



3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述乙氧基血根碱的药学上可接受的盐选自枸橼酸盐、盐酸盐、硫酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐中的一种或多种。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 其中, 所述癌症选自肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增殖性疾病和淋巴瘤中的一种或多种, 优选为肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌和结肠癌中的一种或多种。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的用途, 其中, 所述式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或式 (II) 化合物抑制选自肺癌细胞系、肝癌细胞系、胃癌细胞系、结肠癌细胞系和乳腺癌细胞系中的一种或多种细胞系的增殖。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的用途, 所述式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或式 (II) 化合物下调选自肺癌细胞系、肝癌细胞系、胃癌细胞系、结肠癌细胞系和乳腺癌细胞系中的一种或多种细胞系中的 CIP2A 蛋白。

7. 一种抗癌药物组合物, 其含有治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或者式 (II) 化合物, 以及药学上可接受的载体。

8. 根据权利要求 7 所述的抗癌药物组合物, 其中, 该抗癌药物组合物为固体制剂、液体制剂或肠溶制剂。

血根碱类化合物在制备防治癌症的药物中的用途和药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中草药活性成分在制备预防和 / 或治疗癌症的药物中的用途以及含有该活性成分的药物组合物。具体涉及血根碱类化合物或其盐在制备预防和治疗癌症的药物中的用途以及含有血根碱类化合物或其盐的药物组合物。

背景技术

[0002] 癌症目前已成为全球范围内的主要死亡原因,全世界约有 1/8 的人口死亡率由癌症引起,超出艾滋病、结核病以及疟疾三者死亡人数的总和。据统计,2004 年,癌症死亡人数达 740 万(约占所有死亡人数的 13%)。估计 2007 年全世界约有 1200 万癌症新发病例,癌症死亡人数约有 760 万(平均每天死亡人数达 20000 个)。预计全世界癌症死亡率还会继续增加,到 2030 年,将会有 1200 万人死于癌症。在中国,癌症同样也是危害居民健康的主要杀手。据估计,中国每年癌症发病人数约 260 万,死亡 180 万,过去 30 年中国癌症死亡率增加了 80%,成为中国城市和农村居民的第一位死因,给经济和社会的发展带来严重的不良影响。

[0003] 癌症是一类发病机制异常复杂且又种类繁多的疾病。概括起来,癌症基本上都具备相似的特征:无限生长以及扩散能力。究其病因,癌症主要由内、外两方面因素引起。外部因素包括物理、化学以及生物等致癌物(如吸烟、化学物质、辐射、病原体感染等);内部因素可分为遗传突变、激素水平、免疫状况以及代谢途径紊乱等。其中,一种或多种内外因素相互作用,随着时间的推移而导致癌症的发生。目前癌症的治疗方法主要包括外科手术、放射、化疗、激素疗法以及免疫治疗等,并取得了一定疗效。但是,总体上看,当前的癌症治疗效果还很不理想,因此开发新的治疗方案应用于临床具有重要意义。

[0004] 攻克癌症离不开高效的治疗方法,治疗方法的获得显然离不开理论和技术创新,但二者的提升归根结底还是离不开对癌症发病机制的透彻了解。随着在癌症的分子以及细胞生物学方面的研究不断深入,越来越多的功能异常且与癌症发生密切相关的分子相继被发现,这些分子通常是一些癌基因或肿瘤抑制基因,且许多都在癌症的发病以及发展过程中起着重要作用。肿瘤细胞中癌基因常发生突变或过表达,从而使得基因组成性激活或高表达一些在正常细胞中不表达或表达量很低的癌蛋白;抑癌基因与癌基因相反,突变、表观遗传学改变、与抑制蛋白相结合等作用通常导致其基因产物表达量减少或活性降低等。癌基因或抑癌基因功能异常在生理水平起着相似的作用:通过促进细胞增殖或抑制凋亡及周期阻滞等增加肿瘤细胞数,进而导致肿瘤的发生。因此,发现对肿瘤发生、发展起关键作用的基因(如癌基因以及抑癌基因等)及其调控通路,并且寻找对该基因产物具有调控作用的化合物,对癌症的机理研究以及治疗都具有积极意义。在此基础上,靶向治疗应运而生。靶向治疗主要是以一些在肿瘤细胞内功能异常的分子为作用靶点,将药物、抗体等有效成分靶向作用于癌细胞及相关成分,使其能够更加特异性地作用于肿瘤细胞并减少对正常细胞的细胞毒作用,进而达到癌症治疗目的。因此,总体上说,靶向治疗具有高效,低毒等特

点,因而越来越受到人们的重视,成为全世界癌症治疗的研究热点。

[0005] 不难理解,靶向治疗首先要确定合适的靶点,然后才能进行有针对性的治疗。因此,靶点分子的确定具有重要意义,它是分子靶向治疗的理论和实践基础。迄今为止,已发现一些比较理想的治疗靶点并将针对这些靶点的靶向治疗药物用于临床。其中,比较有代表性的是针对突变激酶为靶点的相关抑制剂的研究,如以表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 为靶点的酪氨酸激酶抑制剂 (例如 Gefitinib、Erlotinib 等) 用于非小细胞肺癌的治疗以及以 BCR-ABL 和 C-KIT 等酪氨酸激酶为靶点的激酶抑制剂 (Imatinib) 用于慢性粒细胞性白血病和胃肠道基质细胞瘤的治疗等,它们取得了令人鼓舞的效果。然而,虽然目前在癌症的靶向治疗方面已取得了一系列进展,但还是难以避免存在一些问题,这主要表现在以下几个方面:首先,目前的靶向治疗只在一小部分癌症中显示出疗效;其次,多数分子靶向药物的临床有效率很低;再者就是很多靶向药物还存在一些毒副作用,与预期的治疗效果相差较大,极大的限制了这些药物的应用。这些问题的出现除了与药物本身有关以外,很大程度上与靶点的选择是分不开的,若缺乏对靶点生物学功能的透彻了解,将会导致选择的药物治疗靶标不合理,进而使得靶向药物在临床上的使用不理想。因此,寻找新的更理想的药物治疗靶点迫在眉睫,这不仅有利于更深入了解癌症的发病机理,重要的是能给癌症患者带来新的希望。

[0006] 蛋白磷酸酶 (protein phosphatase) 可根据其起催化亚基作用的氨基酸残基种类的不同,分为丝 / 苏氨酸蛋白磷酸酶、酪氨酸蛋白磷酸酶和双重底物蛋白磷酸酶。最近还发现一类组氨酸蛋白磷酸酶。磷酸酶的作用比较复杂,对细胞信号传导既有抑制作用,也有促进作用;既有抑癌基因的活性,也有原癌基因的能力。因此,磷酸酶活性的异常也可导致肿瘤的发生。PP2A 是一种蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶,其在哺乳动物细胞中参与多种信号的调节。它由异三聚体构成 (包括催化亚单位 PP2A/C, 结构亚单位 PP2A/A 以及调节亚单位 PP2A/B, 调节亚单位具有多种不同类型)。其中,AC 催化复合体单独就具备催化活性, B 亚单位决定复合体的亚细胞定位以及底物特异性。A 和 C 亚基在进化上保守且普遍表达,形成催化复合体 (PP2A/AC), 并且至少与三个家族的调节亚基以及肿瘤抗原相互作用。目前已证明 PP2A 的功能抑制对细胞转化过程至关重要。不仅如此,随着对 PP2A 功能研究的深入,随之还发现了一种内源性磷酸酶 PP2A 癌性抑制物 (cancerous inhibitor of PP2A, CIP2A)。

[0007] CIP2A (磷酸酶 PP2A 癌性抑制物) 最先是在肝癌病人中发现的一种自身抗原,其由 905 个氨基酸组成,分子量约为 90KDa,主要在细胞质中表达。当前的研究显示,CIP2A 蛋白在多种癌症病人癌组织中的表达量显著高于癌旁组织 (包括肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌以及头颈鳞细胞癌等),且具有促进癌细胞增殖和转化的作用。此外,在一些类型的胃癌病人中,CIP2A 阳性病人的生存期明显短于 CIP2A 阴性的病人等。种种现象提示 CIP2A 是一种在多种肿瘤中高表达且可能在肿瘤的发生以及发展过程中起着重要作用的癌蛋白。因此,CIP2A 有望成为一个理想的分子治疗靶点。然而,到目前为止,以 CIP2A 为靶点并寻找潜在的能作用于 CIP2A 的化合物用于癌症治疗还未见有价值的报道。因此,在癌症治疗中,寻找能参与 CIP2A 蛋白调节并使其下调的化合物,不仅有利于进一步阐明与 CIP2A 相关的作用通路,重要的是有望获得用于多种癌症治疗的广谱药物,具有重要的临床应用价值。

[0008] 从传统中草药中分离提取单体化合物是获得有效天然产物的一个重要来源,目前这些中草药的活性成分以及作用机制绝大部分还不清楚,因此确定这些活性成分的作用靶

点也具有十分重要的理论以及现实意义。目前世界各地越来越多的科学家都在参与这方面的研究。博落回为多年生草本植物,在我国作为一种中草药已具有悠久历史。早期研究显示,博落回的主要活性成分是生物碱,其含量在博落回果实中约占 5%,主要包括血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱、 α -别隐品碱、 β -别隐品碱等。博落回具有清热解毒和杀虫止痒之功效,临床上可用于治疗阴道炎、肺炎、皮肤病和肝炎等。此外,博落回在养殖生产中已作为兽药和生物农药被广泛使用,但由于博落回成分较复杂且有一定的毒性,导致博落回的应用受到一定限制。因此,弄清博落回生物碱各成分的功能具有重要意义。

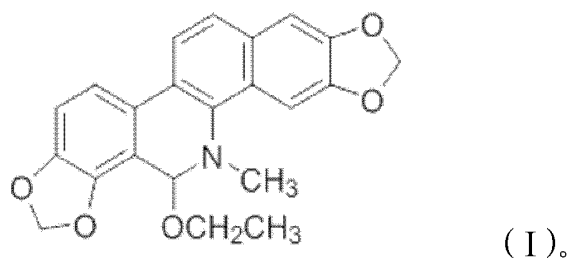
发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供能够预防和 / 或治疗癌症的中草药活性成分以及含有该活性成分的药物组合物,该中草药活性成分能够迅速下调多种癌细胞系中 CIP2A 蛋白的表达,从而显著抑制多种癌细胞系的增殖。

[0010] 本发明提供了乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱(即,血根碱类化合物)在制备预防和 / 或治疗癌症的药物中的用途。

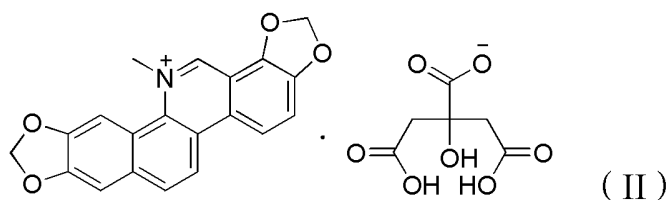
[0011] 根据本发明提供的用途,其中,所述乙氧基血根碱的结构式为式 (I) 所示:

[0012]



[0013] 其中,所述枸橼酸血根碱的结构式为式 (II) 所示:

[0014]



[0015] 根据本发明提供的用途,其中,式 (I) 所示化合物(即,乙氧基血根碱)的药学上可接受的盐可以选自枸橼酸盐、盐酸盐、硫酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐中的一种或多种。

[0016] 在上述用途中,癌症可以选自肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌、白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、骨髓增殖性疾病等实体瘤或血液系统恶性肿瘤和其它恶性肿瘤中的一种或多种,优选为肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌和结肠癌中的一种或多种。

[0017] 在上述用途中,乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱可以抑制选自肺癌细胞系、肝癌细胞系、胃癌细胞系、结肠癌细胞系和乳腺癌细胞系中的一种或多种细胞系的增殖。

[0018] 在上述用途中,乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱可以下调选自肺癌细胞系、肝癌细胞系、胃癌细胞系、结肠癌细胞系和乳腺癌细胞系中的一种或多种细

胞系中的 CIP2A 蛋白。

[0019] 在上述用途中,进一步优选地,乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱与其它抗癌药物联合使用。

[0020] 本发明在研究天然化合物的抗癌作用机制以及寻找靶向治疗化合物的过程中,发现天然的血根碱类化合物或其盐,例如乙氧基血根碱 (ethoxysanguinarine) 和枸橼酸血根碱 (sanguinarine citrate),能下调多种类型癌细胞中的 CIP2A 蛋白的表达。这些血根碱类化合物或其盐主要来自罂粟科植物——博落回的果实提取物。目前,关于博落回生物碱提取物乙氧基血根碱 (ethoxysanguinarine) 和枸橼酸血根碱 (sanguinarine citrate) 的功能研究还鲜有报道,更未有将其用于癌症的治疗以及作用机制和作用靶点的报道。因此,探索血根碱类化合物或其盐在多种癌症中的预防、治疗作用以及其参与调控的信号通路具有重要的理论以及应用价值。

[0021] 本发明的研究显示,乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱能够用于癌症预防和 / 或治疗的作用机制在于下调 CIP2A 蛋白的表达。具体来说,CIP2A 蛋白在多种癌症病人(包括肝癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、乳腺癌以及结肠癌等)的癌组织中的表达量显著高于癌旁组织,且具有促进癌细胞增殖和转化的功能。本发明首次发现这类化合物,例如乙氧基血根碱和枸橼酸血根碱能够迅速下调多种癌细胞系(包括肺癌,结肠癌,胃癌,乳腺癌和肝癌)中 CIP2A 蛋白的表达,进而显著抑制多种癌细胞系(包括肺癌,结肠癌,胃癌,乳腺癌和肝癌在内的 12 种不同癌细胞系)的增殖。

[0022] 因此,本发明还提供了一种抗癌药物组合物,其含有治疗有效量的乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱,以及药学上可接受的载体。

[0023] 其中,该抗癌药物组合物可以为固体制剂、液体制剂或肠溶制剂。

[0024] 鉴于乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱能够显著下调 CIP2A 蛋白的表达且能够抑制多种类型癌细胞系的增殖,将其应用于癌症的预防和治疗将具有以下优点:

[0025] 1、已报道的研究结果显示 CIP2A 蛋白在绝大多数病人的正常组织中表达量非常低,但在对应的癌组织中高表达,且 CIP2A 蛋白在癌细胞增殖以及早期转化过程中起着重要作用。因此,CIP2A 可以说是一种肿瘤特异性蛋白,促进 CIP2A 蛋白的降解能够有效地减弱对正常组织的损害。

[0026] 2、目前已知 CIP2A 在肝癌、乳腺癌、头颈鳞细胞癌、结肠癌以及胃癌等病人的癌细胞以及癌组织中高表达,本发明发现乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱能够显著下调 CIP2A 蛋白的表达,因此具有潜在的广谱抗癌作用,有望克服目前的大部分靶向治疗药物只能在一小部分癌症中显示出疗效的缺陷。

[0027] 3、鉴于 CIP2A 蛋白在癌细胞增殖和转化过程中起着重要作用,因此乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱若与作用于其它癌症相关信号通路的活性化合物联合使用,将具有潜在的协同治疗癌症作用。

[0028] 4、乙氧基血根碱和枸橼酸血根碱属于血根碱衍生物,血根碱主要提取自中草药植物博落回,该植物在我国分布地域范围广,资源蕴藏量大,因此可开发资源量相当可观。将其开发为广谱癌症治疗药物,可有效降低癌症治疗成本,造福患者。

[0029] 5、针对作为中药植物博落回的主要活性成分的乙氧基血根碱或其药学上可接受

的盐或枸橼酸血根碱,深入研究其作用靶点,不仅有利于进一步阐明其抗癌作用机制,还有助于从分子水平系统阐明传统中草药成分的药理学,进而为促进中草药研究以及中医理论的研究与发展提供科学依据。

[0030] 总之,乙氧基血根碱或其药学上可接受的盐或枸橼酸血根碱作为能够有效下调 CIP2A 蛋白并抑制癌细胞增殖的化合物,具有潜在的毒副作用小、显著抑制癌细胞增殖、广谱抗癌、制备容易以及成本低廉等优点,在临床上具有广泛的抗癌应用前景。

附图说明

[0031] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中枸橼酸血根碱简称为 SC,乙氧基血根碱简称为 ESG:

[0032] 图 1 显示肺癌细胞系中 SC 和 ESG 下调 CIP2A 蛋白的作用;

[0033] 图 2 显示结肠癌细胞中 SC 和 ESG 下调 CIP2A 蛋白的作用;

[0034] 图 3 显示在胃癌细胞中 SC 和 ESG 下调 CIP2A 蛋白的作用;

[0035] 图 4 显示在乳腺癌细胞中 SC 和 ESG 下调 CIP2A 蛋白的作用;

[0036] 图 5 显示在肝癌细胞中 SC 和 ESG 下调 CIP2A 蛋白的作用。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0038] 已有报道表明,CIP2A 在肝癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、乳腺癌以及结肠癌病人的癌组织中高表达,且对细胞的增殖和转化起到重要作用。因此,CIP2A 有可能作为一个预防和治疗癌症的潜在作用靶点。在此基础上,我们尝试寻找能引起 CIP2A 蛋白降解的化合物,结果发现源自植物博落回提取物中血根碱的两种衍生物(枸橼酸血根碱和乙氧基血根碱)能够以剂量依赖性的方式下调 CIP2A 蛋白,且此种作用不具有细胞类型特异性。此外,这两种化合物还能够抑制包括肺癌,结肠癌,胃癌,乳腺癌和肝癌在内的 12 种不同癌细胞系的增殖。具体的实施方案如下:

[0039] 实施例 1

[0040] 分别将各种类型的癌细胞系 A549、NCI-H1975、HCT-116、SGC-7901、MCF-7 和 HepG2 细胞按照一定的密度接种于 6 孔板,24 小时后待细胞融合度达到 70%~80% 左右,分别以不同浓度的 SC 和 ESG 处理 A549 细胞 (0、5、10 μ M)、NCI-H1975 细胞 (0、1、2.5 μ M)、HCT-116 细胞 (0、1、2.5 μ M)、SGC-7901 细胞 (0、1、2.5 μ M)、MCF-7 (0、2.5、5 μ M) 和 HepG2 细胞 (0、2.5、5 μ M) 处理,24 小时后用 1 \times SDS Loading Buffer 裂解细胞提取总蛋白,以同等量的蛋白进行 Western Blot 免疫印迹实验,分别用抗 CIP2A (Santa Cruz) 和抗 Actin (肌动蛋白) 抗体 (Sigma) 来进行免疫印迹,检测加药处理情况下它们表达的变化情况。结果如图 1-5 所示,在肺癌细胞 A549 和 NCI-H1975 (图 1),结肠癌细胞 HCT-116 (图 2),胃癌细胞 SGC7901 (图 3),乳腺癌细胞 MCF-7 (图 4) 以及肝癌细胞 HepG2 (图 5) 中,SC 和 ESG 两种化合物都能够剂量依耐性地下调 CIP2A 蛋白的表达。

[0041] 实施例 2

[0042] 分别将处于对数生长期的 12 种不同类型的癌细胞系 (A549、NCI-H1975、

NCI-H460、HCC827、SPC-A-1、Glc-82、L78、95D、HCT-116、SGC-7901、MCF-7 和 HepG2 细胞)接种于 96 孔板(每孔接种约 5000 个细胞,100 μ l 培养基),培养(37℃,5% CO₂ 培养箱)24 小时后用不同浓度梯度(1-10 μ M)的 SC 和 ESG 两种化合物分别处理这 12 种细胞。培养 44 小时后每孔加入 10 μ l 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)溶液(5mg/ml),继续培养 4 小时。终止反应后,吸掉培养基,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜,低速振荡充分溶解,然后用酶标仪测定 490nm 处的吸光值(OD490)。根据生长抑制率结果,计算出 SC、ESG 两种化合物对 12 种细胞半数抑制浓度(IC₅₀),具体 IC₅₀ 值见下页表 1,结果显示这两种化合物可抑制多种不同类型的癌细胞的增殖。

[0043] 实施例 3

[0044] 乙氧基血根碱或枸橼酸血根碱以及它们的可药用盐或溶剂化物,按常规法加注射用水,精滤,灌封灭菌后可制成注射液。

[0045] 实施例 4

[0046] 乙氧基血根碱或枸橼酸血根碱以及它们的可药用盐或溶剂化物,将其溶于无菌注射用水中,用无菌漏斗过滤,分装,低温冷冻干燥后无菌熔封即得粉针剂。

[0047] 实施例 5

[0048] 乙氧基血根碱或枸橼酸血根碱以及它们的可药用盐或溶剂化物,按常规法制成片剂,再按照常规工艺用肠溶包衣粉包衣即得肠溶片。

[0049] 实施例 6

[0050] 乙氧基血根碱或枸橼酸血根碱以及它们的可药用盐或溶剂化物,配以各种药用辅料可制成各种其它固体和液体制剂。

[0051] 表 1SC 和 ESG 两种化合物对各种癌细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)

[0052]

细胞系	癌症类型	IC50 (μ M)	
		SC	ESG
A549	肺腺癌	3.18	2.74
NCI-H1975	肺腺癌	1.46	1.29
NCI-H460	大细胞肺癌	2.22	1.56
HCC827	肺腺癌	1.00	1.02
SPC-A-1	肺腺癌	1.46	1.10
Glc-82	肺腺癌	1.33	1.30
L78	肺鳞癌	1.46	1.00
95D	肺高转移大细胞肺癌	2.03	2.00
HCT-116	结肠癌	3.38	2.50
SGC-7901	胃癌	1.97	1.84
MCF-7	乳腺癌	4.45	4.09
HepG2	肝癌	3.40	3.56

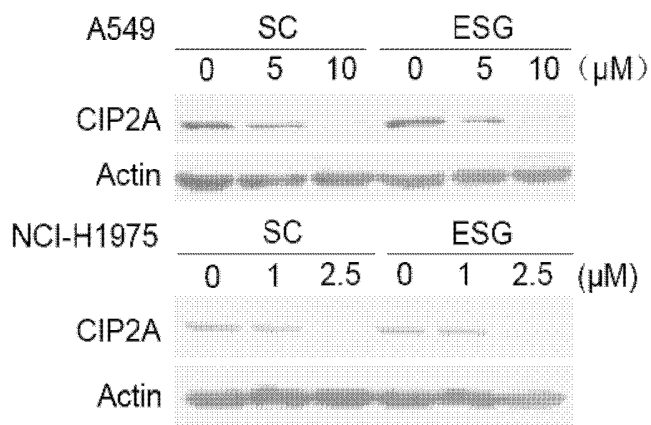


图 1

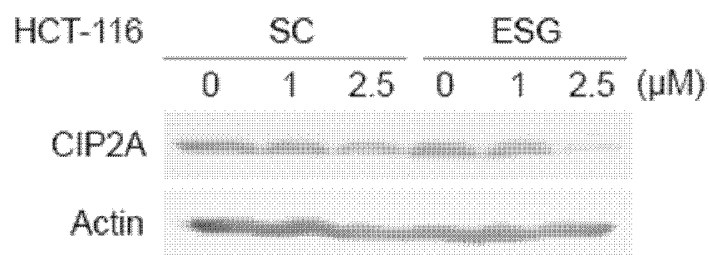


图 2

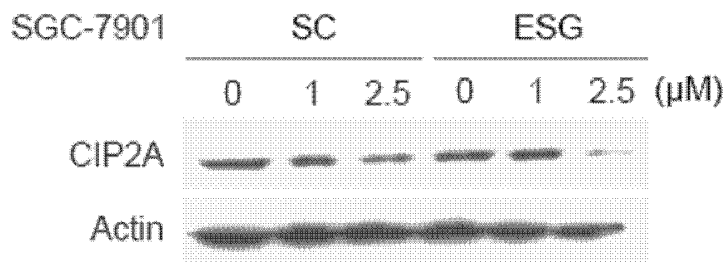


图 3



图 4

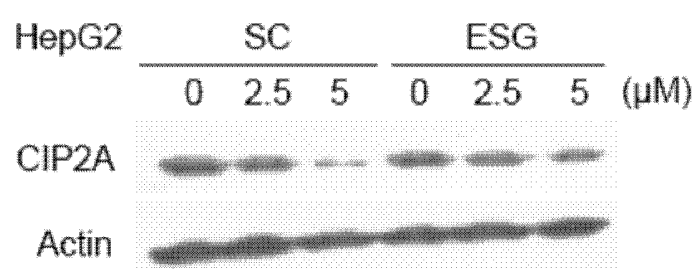


图 5