

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019年4月18日 (18.04.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/071875 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/12 (2006.01) *A61K 47/34* (2017.01)
A61K 9/19 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/073572

(22) 国际申请日: 2018年1月22日 (22.01.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710947402.6 2017年10月12日 (12.10.2017) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成都市人民南路三段17号, Sichuan 610041 (CN)。

(72) 发明人: 谭宁华 (TAN, Ninghua); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。 陈俐娟 (CHEN, Lijuan); 中国四川省成都市人民南路三段17号, Sichuan 610041 (CN)。 宋立华 (SONG, Lihua); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。 杨建洪 (YANG, Jianhong); 中国四川省成都市人民南路三段17号, Sichuan 610041 (CN)。 汪哲 (WANG, Zhe); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。

(74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市中山东路198号龙台国际大厦1912室, Jiangsu 210005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

(54) Title: CELL AUTOPHAGY INHIBITOR AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 细胞自噬抑制剂及其制备方法与应用

(57) Abstract: A cell autophagy inhibitor containing a Rubiaceae-type cyclic peptide as an active ingredient, the cyclic peptide being RA-V or RA-XII. The autophagy inhibitor is used to inhibit KRAS mutations, particularly KRAS-dependent tumor cell protective autophagy, and promote tumor cell apoptosis. The inhibitor is preferably a nanomicelle injection, and is applicable to the preparation of medicaments for treating and preventing KRAS-related cancer, including colon cancer, rectal cancer, lung cancer, and pancreatic cancer.

(57) 摘要: 一种以茜草科类型环肽作为有效成分的细胞自噬抑制剂, 所述环肽是RA-V或RA-XII。所述自噬抑制剂用于抑制KRAS突变, 尤其是KRAS依赖的肿瘤细胞保护性自噬, 促进肿瘤细胞凋亡。所述抑制剂优选为纳米胶束注射剂, 可应用于制备治疗和预防KRAS相关癌症的药物, 所述癌症包括结肠癌、直肠癌、肺癌和胰腺癌。



WO 2019/071875 A1

细胞自噬抑制剂及其制备方法与应用

技术领域

本发明属于医药技术，具体涉及以茜草科类型环肽作为有效成分的细胞自噬抑制剂，及其制备方法与应用。

技术背景

KRAS 基因是细胞内信号传导途径中的“下游区”的一种信号传导蛋白，对细胞的生长存活和分化等具有重要的影响。正常生理情况下，在细胞受到外界刺激后激活 EGFR 等信号通路，野生型的 KRAS 被活性 EGFR 等酪氨酸激酶磷酸化后短暂活化，活化后的 KRAS 可以激活信号通路下游的信号蛋白，而后 KRAS 迅速失活，KRAS 激活/失活效应是受控的。突变型 KRAS 蛋白导致蛋白功能异常，在无 EGFR 活化信号刺激下仍处于激活状态，其功能状态不可控，导致肿瘤细胞持续增殖等，如 KRAS 突变型的 HCT116 细胞。KRAS 突变型又分为 KRAS 依赖型如 H441、H358 细胞及非依赖型如 A549、H460 细胞，其中 KRAS 依赖型的肿瘤细胞生长存活完全依赖于 KRAS 基因。在多种人类癌症中，KRAS 基因在人类恶性肿瘤中包括结肠癌、直肠癌、肺癌和胰腺癌频发突变，使得相关癌症难以治疗。针对 KRAS 基因激活突变进行靶向药物治疗，成为医药工作者的极佳选择，遗憾的是迄今为止临床上仍无有效治疗 KRAS 基因突变肿瘤的药物策略。近些年来，通过全基因组 RNAi 筛选，国际领先课题组已发现了多个与癌基因 KRAS 具有协同致死关系的基因，TAK1 就是其中之一，抑制 TAK1 的活性可诱导 KRAS 依赖的细胞凋亡，TAK1 的活性对维持 KRAS 依赖的细胞生存很重要，故应用 TAK1 抑制剂能选择性抑制 KRAS 依赖的肿瘤细胞生存，为 KRAS 依赖肿瘤细胞提供新的靶向治疗策略。

细胞自噬是一种细胞分解代谢过程，在细胞的生长、分化、体内平衡和营养缺乏的条件下细胞存活发挥着重要的作用，是一种机体重要的自我保护和防御机制。细胞自噬具体指细胞内的双层膜结构将部分细胞质、受损的蛋白质以及衰老或损伤的细胞器如线粒体、高尔基体、内质网等包裹形成自噬小体，递送至溶酶体，并与之融合形成自噬溶酶体，通过蛋白质水解酶水解内容物进行消化降解，以满足细胞自身的代谢及更新。KRAS 依赖的肿瘤细胞具有较高的基底自噬，饥饿及肿瘤发生条件下，较高的基底自噬对肿瘤细胞的生存所必须。在 KRAS 依赖的肿瘤细胞中，激活 TAK1 从而激活 TAK-AMPK 信号通路增强肿瘤细胞的基底自噬，保护细胞免受 TRAIL 诱导的细胞死亡。

聚合物胶束是纳米体系研究的重要内容之一，已成为近年来的研究热点。聚

合物胶束包括两个部分，载药的疏水核心和亲水性外壳。两亲性嵌段聚合物包括疏水段和亲水段，在水溶液中浓度超过临界胶束浓度，疏水段相互靠近，形成疏水核心，亲水段面向外侧形成亲水性外壳，自发地形成胶束，疏水性药物通过疏水作用或者共价结合的方式被包在疏水核心，因此聚合物胶束作为水难溶性药物载体，在传递药物过程中显示出巨大的优势和潜力。聚合物胶束能够传递各种类型的药物，包括低分子量的抗癌药、显影剂、蛋白质、质粒 DNA、逆转录 DNA 等，当前亦有较多的抗肿瘤候选药物正在以该种剂型进行临床实验，如阿霉素、紫杉醇，这些研究证明胶束作为纳米给药系统具有很好的使用价值，为开发胶束纳米给药系统药物的研发提供了坚实的实践基础。

茜草科类型环肽 (Rubiaceae-type cyclopeptides, RAs) 为茜草科植物所特有，普遍存在于茜草属植物中，是一类双环均环六肽类化合物，主要由一个 D-型 α -丙氨酸、一个 L-型 α -丙氨酸、三个 L-型 N 取代 α -酪氨酸和一个其他 L-型编码的 α -氨基酸以肽链相连形成的环六肽，六个氨基酸缩合成十八元环，其中两个邻位的酪氨酸之间的苯环经氧桥连接形成一个具有较大张力的十四元环。RAs 因其新颖的双环结构和显著的体内外抗肿瘤活性而备受关注。我们前期研究表明，RAs 能抑制 TAK1 的激酶活性 (中国发明专利号: CN201410445325.0)。现有技术中未见有茜草科类型环肽抑制 KRAS 突变，尤其是 KRAS 依赖的肿瘤细胞保护性自噬促进其凋亡、及其纳米胶束注射剂作为抗肿瘤药物的制备方法及其应用。

发明内容

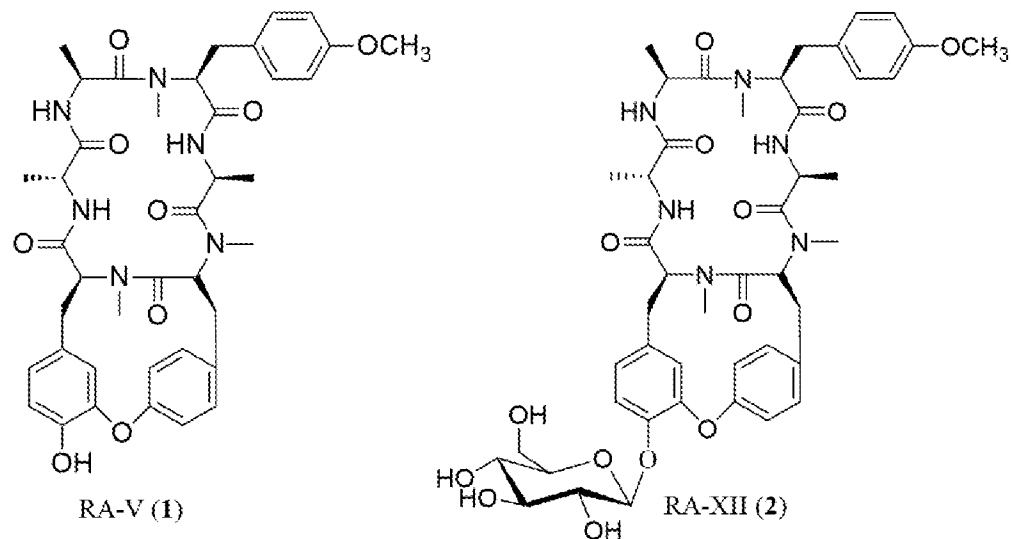
针对现有技术的空白，本发明的目的在于提供一种以茜草科类型环肽化合物为有效成分的细胞自噬抑制剂，特别是抑制 KRAS 突变，尤其是 KRAS 依赖的肿瘤细胞保护性自噬、促进肿瘤细胞凋亡，本发明还提供了上述茜草科类型环肽化合物的纳米胶束注射剂及其制备方法与应用。

技术方案：本发明所述的细胞自噬抑制剂，其有效成分为茜草科类型环肽。

进一步的，所述抑制剂特别适用于抑制 KRAS 突变，尤其是 KRAS 依赖的肿瘤细胞保护性自噬，诱导肿瘤细胞凋亡。

具体的，本申请以 KRAS 依赖的肿瘤细胞为对象，用 RAs 处理培养的肿瘤细胞，采用 Western blot 方法检测自噬相关蛋白，GFP-LC3 转染检测自噬泡形成，并检测细胞死亡的程度，证实所述的化合物抑制细胞保护性自噬；以 KRAS 依赖的肿瘤细胞为对象，用 RAs 处理培养的肿瘤细胞，采用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白，PI/Annexin V 双染检测凋亡细胞比例，证实所述的化合物诱导细胞凋亡。选择 KRAS 突变的 HCT116 移植瘤模型及 KRAS 依赖的 H441 移植瘤模型评价 RAs 体内抗肿瘤活性。

进一步的, 所述茜草科类型环肽为如下结构式所示的 RA-V(1)或 RA-XII(2)。



所述抑制剂可以为任何药物治疗学上可接受的剂型, 其使用剂量为任何药物治疗学上可接受的剂量。

所述抑制剂优选为纳米胶束注射剂。所述纳米胶束注射剂的制备方法是, 以茜草科类型环肽为有效成分, 以嵌段共聚物为载体, 形成嵌段共聚物胶束, 这样可以明显提高有效成分的溶解度和生物利用度, 改善其药物代谢动力学的性质, 提高了疗效。其中, 所述嵌段共聚物载体材料优选为 mPEG2000-PDLLA2000 两亲性嵌段共聚物。

具体的, 所述纳米胶束注射剂的制备方法包括以下步骤: 将有效成分和 mPEG2000-PDLLA2000 嵌段共聚物共溶于有机溶剂中, 振摇使其充分溶解混合均匀, 真空旋蒸除去有机溶剂, 得混合药膜, 然后加入注射用水, 振荡充分溶解药膜, 得胶束溶液; 微孔滤膜过滤除菌, 冷冻干燥, 无菌条件下分装, 制得纳米胶束注射剂。

在本发明中, 所述胶束是胶体分散系中的一种, 属于缔合胶体, 是两亲性嵌段聚合物在溶液中的浓度超过某一临界值后, 其分子或离子自动缔合成的胶体大小的聚集体纳米微粒, 用于药物的增溶, 也可作为给药系统的载体, 提高稳定性, 增强疗效, 降低毒性。本发明所述的聚合物胶束制剂, 能够明显提高有效成分的水溶性, 利用聚合物胶束对于肿瘤血管的渗透性和滞留效应 (EPR 效应), 使得纳米胶束被动靶向而浓集于肿瘤组织, 以提高抗肿瘤治疗效果, 降低药物毒副作用。

制备所得纳米胶束注射剂粒径为 10-100 nm。

其中, 制备所得纳米胶束注射剂的载药量, 即有效成分占 mPEG2000-PDLLA2000 两嵌段共聚物的重量百分含量, 为 1-10%。

上述抑制剂用于制备治疗与预防能够受益于细胞自噬抑制的疾病的药物上的

应用，也在本发明的保护范围内。所述应用包括但不限于抑制肿瘤细胞保护性自噬的受益于的疾病上的应用。

本发明的抑制剂还可与其它药物一起使用以提供联合疗法，其中，其它药物可以和上述抑制剂组成组合物制剂或者可以作为单独的组合物提供，用于同时或不同时给药。

其中，上述茜草科类型环肽 RAs 的制备方法参考中国发明专利 CN 201410445325.0。

有益效果：本发明所述的细胞自噬抑制剂可以有效抑制细胞自噬，其有效成分茜草科类型环肽来源广泛，提取工艺成熟，其剂型和用药方式多样化，可以应用于 KRAS 相关癌症的治疗和预防，具有广泛的临床应用前景。

附图说明

图 1 为茜草科类型环肽 RA-V(1)抑制 KRAS 依赖的肿瘤细胞保护性自噬，其中，(1)：RA-V(1)抑制 KRAS 依赖肺癌细胞 H441 和 H358 的增殖；(2)：RA-V(1)抑制 KRAS 依赖肺癌细胞 H441 和 H358 的 GFP-LC3 自噬小体的形成；(3)：RA-V(1)抑制 KRAS 依赖肺癌细胞自噬相关蛋白的表达；

图 2 为茜草科类型环肽 RA-V(1)诱导 KRAS 依赖的肿瘤细胞凋亡，其中，(1)：Annxin-V/PI 染色检测发现 RA-V(1)促进 KRAS 依赖肺癌细胞凋亡；(2)：Western blot 检测发现 RA-V(1)诱导 KRAS 依赖肺癌细胞凋亡；

图 3 为茜草科类型环肽 RA-V(1)纳米胶束的表征，其中，(1)：胶束粒径；(2)：释药曲线；

图 4 为茜草科类型环肽 RA-V(1)和 RA-XII(2)纳米胶束注射剂体内抗肿瘤试验，其中，(1)：RA-V(1)对 KRAS 依赖的肺癌细胞具有更好的实体瘤抑制效果；(2)：RA-V(1)在 KRAS 突变的 HCT116 模型上的抗肿瘤效果；(3)：RA-XII(2)在 KRAS 突变的 HCT116 模型上的抗肿瘤效果。

具体实施方式

下面结合附图，用具体实施例来进一步说明本发明的实质性内容，但并不以此来限定本发明。根据本发明的实质对本发明进行的改进都属于本发明的范围。

所述茜草科类型环肽 RA-V(1)和 RA-XII(2)的制备参考专利 CN 201410445325.0。

实施例 1

RA-V(1)抑制 KRAS 依赖的肿瘤细胞保护性自噬：

采用 MTT 法测定细胞活力。含 10%的 FBS 培养基培养过夜的非 KRAS 依赖的 A549 和 H460 及 KRAS 依赖的 H441 和 H358 细胞系，加入胰酶消化，形成细

胞悬浮液，按照合适浓度接种在 96 孔板上，100 μl /孔，在 CO_2 培养箱中培养 24 小时至细胞完全贴壁，加入终浓度为 0, 50, 100, 200 nM RA-V (1)，作用 24 h 后，每孔加 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml 用 PBS 配制， $\text{pH}=7.4$)，继续孵育 4 h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μl DMSO，振荡 10 min，使结晶物充分融解。选择 490 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值，记录结果，以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

将含 10% FBS 培养基培养过夜的 KRAS 依赖的 H441 和 H358 细胞按照合适的密度种植于 24 孔板，24 h 后加入 0, 50, 100, 200 nM RA-V(1)，作用 24 h 后收集细胞，Western blot 实验检测自噬相关蛋白 LC3、Atg7 及 Beclin1 表达水平。

将含 10% FBS 培养基培养过夜的 KRAS 依赖的 H441 和 H358 细胞按照合适的密度种植于 24 孔板，转染 GFP-LC3 质粒，24 h 后加入 RA-V(1)，作用 24 h 后采用荧光显微镜观察 GFP-LC3 定位情况，定量计算自噬细胞数。

试验结果见图 1，结果显示，RA-V(1)抑制 KRAS 依赖肺癌细胞生存，LC3-II、Atg7 及 Beclin1 随着 RA-V(1)的浓度增加而减少，RA-V(1)处理的细胞相对于空白组 GFP-LC3 明显减少，证实 RA-V(1)明显抑制 H441 和 H358 的保护性自噬。

实施例 2

RA-V(1)明显诱导 KRAS 依赖肿瘤细胞凋亡：

将含 10% FBS 培养基培养过夜的非 KRAS 依赖的 A549 和 H460 及 KRAS 依赖的 H441 和 H358 细胞系，加入胰酶消化，形成细胞悬浮液，按照合适浓度接种在 6 孔板上，24 h 后加入 RA-V(1)，处理 24 h，胰酶消化，于室温 2000 rpm 离心 5~10 min，收集细胞；用预冷 $1\times\text{PBS}$ ($4\text{ }^\circ\text{C}$) 重悬细胞一次，2000 rpm 离心 5~10 min，洗涤细胞；加入 300 μL 的 $1\times\text{Binding Buffer}$ 悬浮细胞；加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后，避光，室温孵育 15 min；上机前 5 min 再加入 5 μL 的 PI 染色，流式细胞仪检测细胞。

将含 10 % FBS 培养基培养过夜的非 KRAS 依赖的 A549 和 H460、KRAS 依赖的 H441 和 H358 细胞按照合适的密度种植于 24 孔板，作用 24 h 后收集细胞，Western blot 实验检测凋亡相关蛋白 BCL-2, BCL-XL 及 Capsase3 表达水平。

试验结果见图 2，结果显示，PI/Annexin V 双染检测凋亡表明 RA-V(1)明显诱导 H358 和 H441 细胞凋亡，对 H460 和 A549 无明显影响。检测相关凋亡蛋白 Capsase3，以及凋亡抑制蛋白 BCL-2, BCL-XL 的表达，同样证明 RA-V 明显诱导 H358 和 H441 细胞凋亡，对 H460 和 A549 无明显影响。

实施例 3

mPEG200-PDLLA2000 胶束的制备方法：

(1) 溶解：按照 mPEG2000-PDLLA2000 和 RA-V(1)重量比 30-10:1 制备载药纳米胶束，按照表 1 精密称取 mPEG2000-PDLLA2000 和 RA-V(1)，将其混溶于含 100 mL 二氯甲烷的梨形瓶中，不断震荡，至药物和材料溶解后，再加入 25 mL 的甲醇，不断震荡，至药物和材料溶解完全，约 5 分钟后得到澄清溶液。

(2) 蒸除溶剂：将梨形瓶置于旋转蒸发仪上，真空旋蒸，转速为 100 转/分，控制温度为 60 °C，除有机溶剂，待其除尽后，将温度降为 40 °C，继续真空旋蒸 3 小时，以除去残留的有机溶剂，得到透明凝胶状的 RA-V(1) 和 mPEG2000-PDLLA2000 混合药膜。

(3) 再溶解：加入 60 °C 预热的含 0.9%氯化钠注射用水 25 mL，快速震荡，充分溶解凝胶状药膜，得到 1 mg/mL 的 RA-V(1)纳米胶束溶液。

(4) 过滤除菌：将 RA-V(1)纳米胶束溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤以除菌。

(5) 分装，冷冻干燥，制得 RA-V(1)纳米胶束冻干粉。

(6) 轧盖，得到成品 RA-V(1)纳米胶束注射剂。

实施例 4

RA-V(1)纳米胶束的表征：

(1) RA-V 胶束的粒径测试：将实施例 3 制备的胶束溶液用水稀释 50 倍，用马尔文粒度仪测胶束的粒径，其结果如表 1：

表 1 胶束粒径的检测

实施例	粒径/nm	PDI
RA-V (1): mPEG200-PDLLA2000=1:10	25.6 ± 0.8	0.28 ± 0.02
RA-V (1): mPEG200-PDLLA2000=1:20	22.9 ± 0.4	0.18 ± 0.02
RA-V (1): mPEG200-PDLLA2000=1:30	19.9 ± 0.2	0.16 ± 0.02

根据图 3 的表征可见，胶束的粒径一般在 10-100 nm，本发明制备的胶束粒径均在范围内，说明本发明的工艺可行。

(2) 包封率检测：将实施例 3 制备的注射用纳米胶束用 1 mL 水溶解，取 50 μL 溶液加入 950 μL 乙腈，震荡混匀，离心 3 分钟，取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，HPLC 检测 RA-V(1)的含量，从而计算出共聚物和 RA-V(1)制备的包封率以评价其增溶效果。其结果如下：

表 2 载药胶束的包封率实验结果

实施例	EE(%)
RA-V (1): mPEG200-PDLLA2000=1:10	90.8 ± 0.6

RA-V (1): mPEG200-PDLLA2000=1:20 91.1 ± 0.9

RA-V (1): mPEG200-PDLLA2000=1:30 96.1 ± 0.8

纳米胶束含量检测结果显示, 本发明中共聚物对 RA-V(1)的载药能力很强, 90%以上的 RA-V(1)被制成纳米胶束, 充分体现该发明方法的增溶效果。

(3) 纳米胶束对 RA-V(1)的体外释放能力的检测: 将实施例 3 制备的 RA-V(1) 纳米胶束或等量的 RA-V(1)粉末置于透析袋中进行透析, 透析介质为 0.5% SDS 的 PBS 溶液, 于各个时间点取出 1 mL 透析液, 并补充 1 mL 透析液, 用 HPLC 检测 RA-V(1)含量。将各次换液时测得的 RA-V(1)含量累加, 并以时间作图, 即可得到胶束对 RA-V(1)的释药曲线见图 3。结果显示 RA-V(1)纳米胶束释放达到 89%, 说明实施例 3 制备的 RA-V(1)纳米胶束释放性能良好。

实施例 5

(1) RA-V(1)纳米胶束注射剂对人肺癌移植瘤的体内抑瘤作用

将人肺癌细胞 KRAS 依赖的 H441 和 KRAS 非依赖的 H460 用生理盐水稀释成 1×10^7 个/mL, 取 100 μ L 该细胞悬浮液接种于 BABL/c 裸鼠左侧腋窝皮下, 生长 7 天, 形成荷瘤小鼠模型。取接种生长良好的荷瘤小鼠, 随机分组, 取实施例 3 制备的 RA-V 纳米胶束注射剂通过尾静脉给药, 隔天给药一次, 给药 14 天后处死所用动物, 剥瘤称重, 计算抑瘤率, 统计处理。抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。试验结果见图 4, 结果表明 RA-V(1) 的 2.5 mg/kg 在 KRAS 非依赖的 H460 模型上没效, 而在 KRAS 依赖的 H441 模型上有效, 抑瘤率 50.4%。

(2) RA-V(1)纳米胶束注射剂对人结肠癌 KRAS 突变的 HCT116 裸鼠移植瘤的体内抑瘤作用:

将 HCT116 用无血清 McCoy's 5a 培养基稀释为 1×10^7 个/mL, 取 100 μ L 该细胞悬浮液接种于 BABL/c 裸鼠左侧腋窝皮下, 生长 7 天, 形成荷瘤小鼠模型。取接种生长良好的荷瘤小鼠, 随机分组, 取实施例 3 制备的 RA-V 纳米胶束注射剂通过尾静脉给药, 隔天给药一次, 给药 14 天后处死所用动物, 剥瘤称重, 计算抑瘤率, 统计处理。抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。试验结果见图 4, 结果表明 RA-V(1)的高和中剂量的抑瘤率为 66.67% 和 41.67%。

(3) RA-XII(2)纳米胶束注射剂对人结肠癌 KRAS 突变的 HCT116 裸鼠移植瘤的体内抑瘤作用:

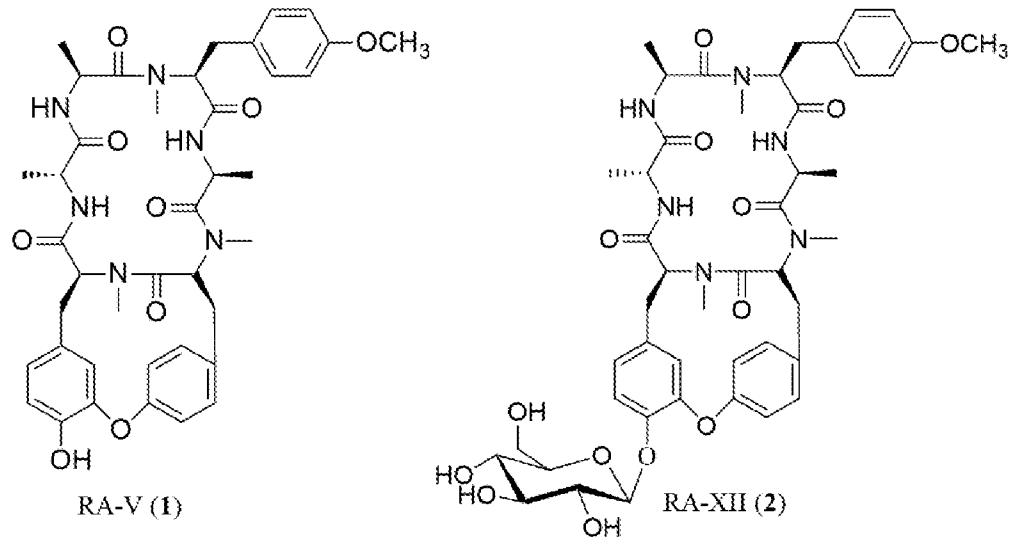
将 HCT116 用无血清 McCoy's 5a 培养基稀释为 1×10^7 个/mL, 取 100 μ L 该细

胞悬浮液接种于 BABL/c 裸鼠左侧腋窝皮下，生长 7 天，形成荷瘤小鼠模型。取接种生长良好的荷瘤小鼠，随机分组，RA-XII(2)注射剂通过尾静脉给药，隔天给药一次，给药 14 天后处死所用动物，剥瘤称重，计算抑瘤率，统计处理。抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤重-实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%。试验结果见图 4，结果表明 RA-XII(2)的高和中剂量的抑瘤率为 79.92%和 68.47%。

权利要求书

1、一种细胞自噬抑制剂，其特征在于，其有效成分为茜草科类型环肽。

2、根据权利要求1所述的抑制剂，其特征在于，其有效成分为下述结构式所示的茜草科类型环肽 RA-V(1)或 RA-XII(2)。



3、根据权利要求1或2所述的抑制剂，其特征在于，其为纳米胶束注射剂。

4、根据权利要求3所述的抑制剂，其特征在于，所述纳米胶束注射剂以茜草科类型环肽为有效成分，以嵌段共聚物为载体制备形成。

5、根据权利要求4所述的抑制剂，其特征在于，所述载体为 mPEG2000-PDLLA2000 两亲性嵌段共聚物。

6、根据权利要求4所述的抑制剂，其特征在于，所述纳米胶束注射剂粒径为 10-100 nm。

7、根据权利要求4所述的抑制剂，其特征在于，所述纳米胶束注射剂载药量为 1-10%。

8、权利要求1-7中任一所述抑制剂用于制备治疗与预防 KRAS 相关癌症药物的应用。

9、根据权利要求8所述的应用，其特征在于，所述 KRAS 相关癌症包括结肠癌、直肠癌、肺癌和胰腺癌。

10、根据权利要求8所述的应用，其特征在于，所述抑制剂通过抑制 KRAS 突变，尤其是 KRAS 依赖的肿瘤细胞保护性自噬，诱导肿瘤细胞凋亡。

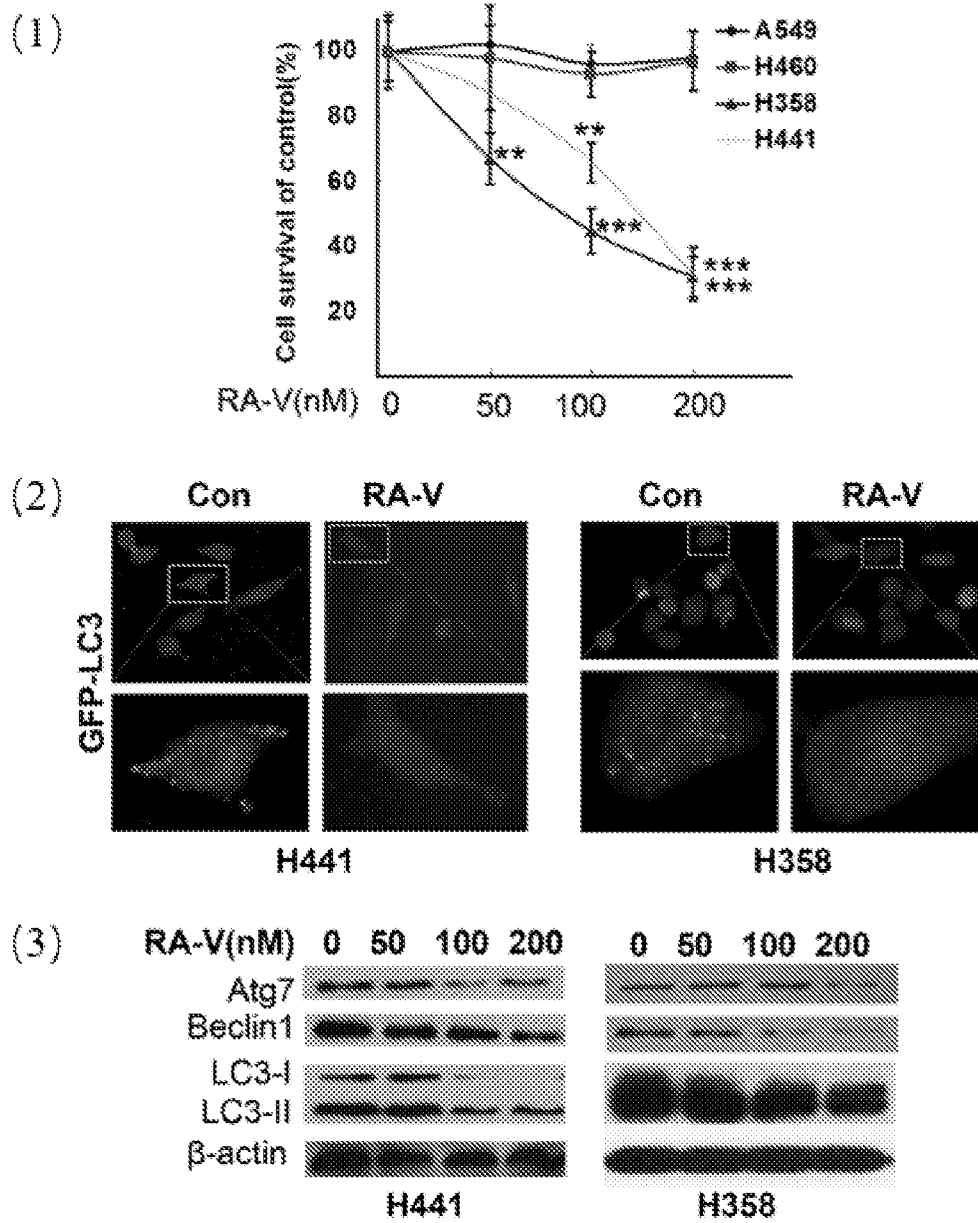


图 1

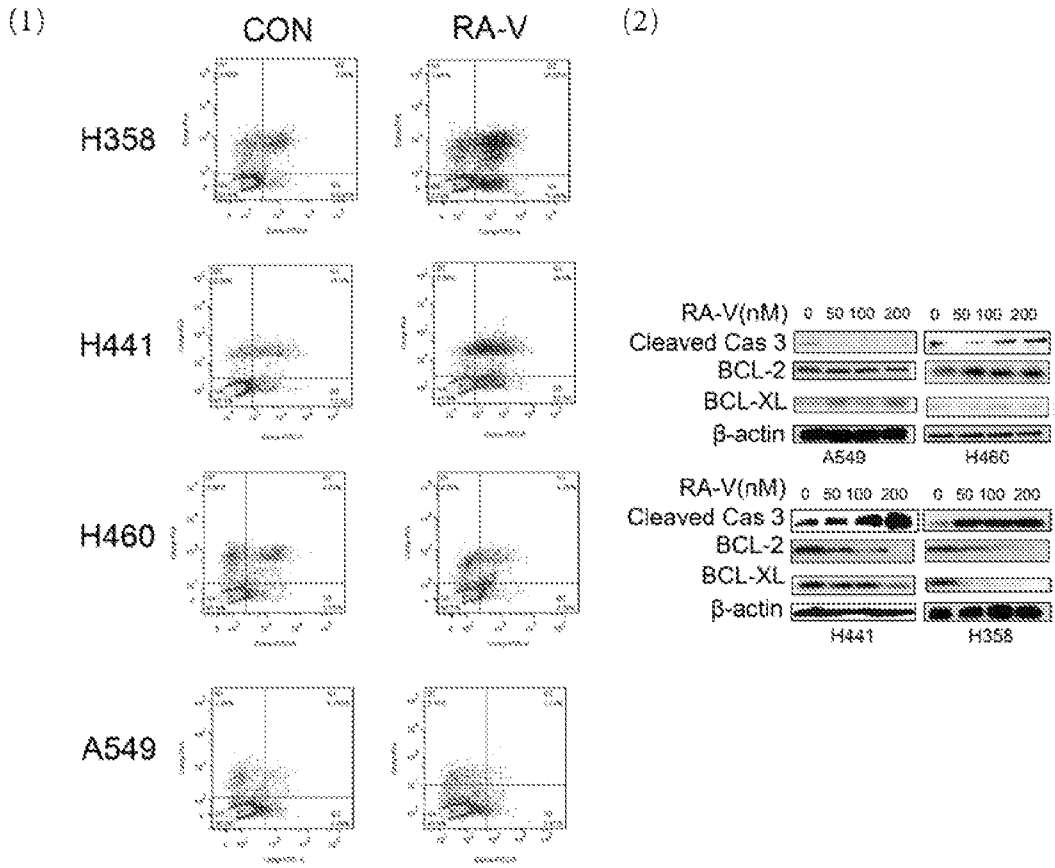


图 2

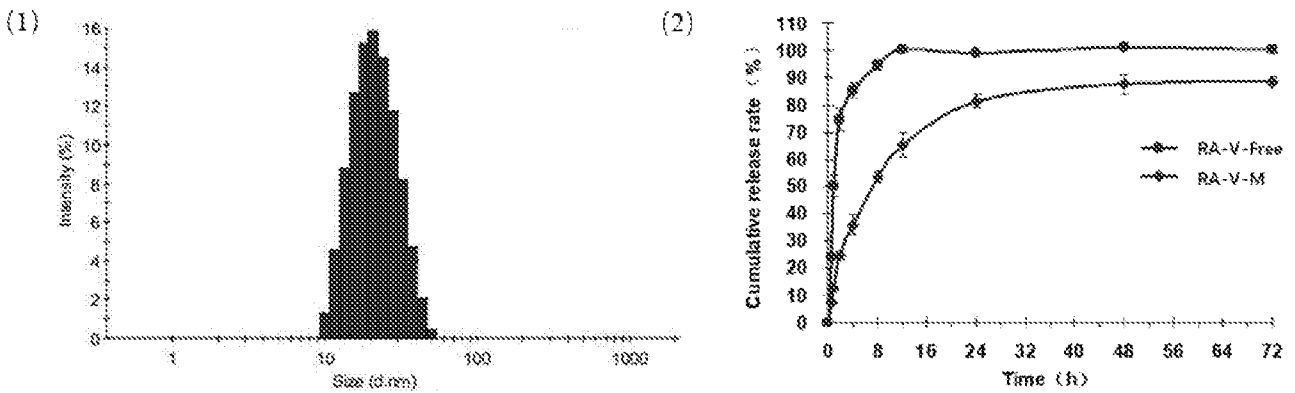


图 3

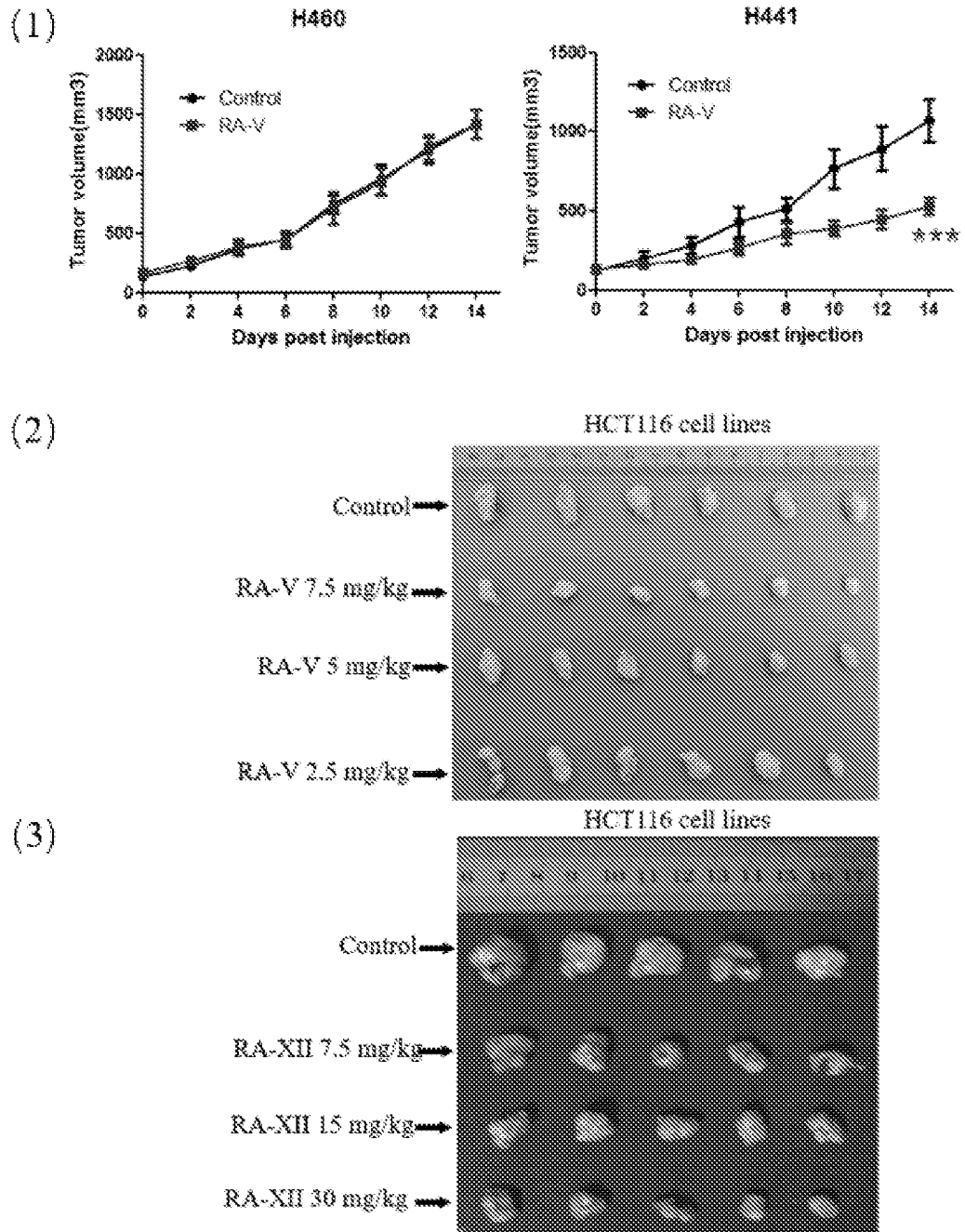


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/073572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/12(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61K 9/107(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; CNKI; STN; Pubmed; 茜草, 环肽, 环六肽, 胶束, 注射剂, 甲氧基聚乙二醇, 聚乳酸, 癌, 肿瘤, 结肠癌, 直肠癌, 肺癌, 胰腺癌, Rubiaceae, Rubia, Rubiae radix, cyclic peptide, cyclic hexapeptide, 64725-24-2, 186593-64-6, micelle, injection, mPEG-PDLLA, cancer, tumor, tumour, carcinoma, colon cancer, carcinoma of colon, rectum cancer, rectal cancer, rectal carcinoma, lung cancer, adenocarcinoma of pancreas, cancer of pancreas

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107496901 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY; SICHUAN UNIVERSITY) 22 December 2017 (2017-12-22) see claims 1-10	1-10
X	ITOKAWA, H. et al. "Studys on the Antitumor Cyclic Hexapeptides Obtained from Rubiae Radix" <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , Vol. 31, No. (4), 30 April 1983 (1983-04-30), ISSN: 1347-5223, see page 1424, paragraphs 1-2 and page 1427, paragraph 2	1-2, 8-9
X	FAN, Junting et al. "Rubiyunnanins C-H, Cytotoxic Cyclic Hexapeptides from Rubia Yunnanensis Inhibiting Nitric Oxide Production and NF-κB Activation" <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , Vol. 18, No. (23), 31 October 2010 (2010-10-31), ISSN: 0968-0896, see table 4, and page 8230, left-hand column, paragraph 2 and right-hand column, paragraph 1	1-2, 8-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 July 2018

Date of mailing of the international search report

20 July 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/073572

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103877562 A (KUNMING INSTITUTE OF BOTANY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; KUNMING INSTITUTE OF ZOOLOGY, CAS) 25 June 2014 (2014-06-25) see claims 1-4, and embodiments 1-7 and 10	1-9
<hr/>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/073572

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	107496901	A	22 December 2017	None	
CN	103877562	A	25 June 2014	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/073572

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 38/12(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61K 9/107(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;DWPI;SIPOABS;VEN;CNTXT;EPTXT;USTXT;WOTXT;CNKI;STN;Pubmed: 茜草, 环肽, 环六肽, 胶束, 注射剂, 甲氧基聚乙二醇, 聚乳酸, 癌, 肿瘤, 结肠癌, 直肠癌, 肺癌, 胰腺癌, Rubiaceae, Rubia, Rubiae radix, cyclic peptide, cyclic hexapeptide, 64725-24-2, 186593-64-6, micelle, injection, mPEG-PDLLA, cancer, tumor, tumour, carcinoma, colon cancer, carcinoma of colon, rectum cancer, rectal cancer, rectal carcinoma, lung cancer, adenocarcinoma of pancreas, cancer of pancreas</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107496901 A (中国药科大学 四川大学) 2017年 12月 22日 (2017 - 12 - 22) 参见权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ITOKAWA, Hideji等. "Studys on the antitumor cyclic hexapeptides obtained from Rubiae radix" Chem. Pharm. Bull., 第31卷, 第4期, 1983年 4月 30日 (1983 - 04 - 30), ISSN: 1347-5223, 参见第1424页第1-2段, 第1427页第2段</td> <td>1-2, 8-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>FAN, Jun-Ting等. "Rubiunnanins C-H, cytotoxic cyclic hexapeptides from Rubia yunnanensis inhibiting nitric oxide production and NF-κB activation" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第18卷, 第23期, 2010年 10月 31日 (2010 - 10 - 31), ISSN: 0968-0896, 参见表4, 第8230页左栏第2段和右栏第1段</td> <td>1-2, 8-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 107496901 A (中国药科大学 四川大学) 2017年 12月 22日 (2017 - 12 - 22) 参见权利要求1-10	1-10	X	ITOKAWA, Hideji等. "Studys on the antitumor cyclic hexapeptides obtained from Rubiae radix" Chem. Pharm. Bull., 第31卷, 第4期, 1983年 4月 30日 (1983 - 04 - 30), ISSN: 1347-5223, 参见第1424页第1-2段, 第1427页第2段	1-2, 8-9	X	FAN, Jun-Ting等. "Rubiunnanins C-H, cytotoxic cyclic hexapeptides from Rubia yunnanensis inhibiting nitric oxide production and NF-κB activation" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第18卷, 第23期, 2010年 10月 31日 (2010 - 10 - 31), ISSN: 0968-0896, 参见表4, 第8230页左栏第2段和右栏第1段	1-2, 8-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
PX	CN 107496901 A (中国药科大学 四川大学) 2017年 12月 22日 (2017 - 12 - 22) 参见权利要求1-10	1-10												
X	ITOKAWA, Hideji等. "Studys on the antitumor cyclic hexapeptides obtained from Rubiae radix" Chem. Pharm. Bull., 第31卷, 第4期, 1983年 4月 30日 (1983 - 04 - 30), ISSN: 1347-5223, 参见第1424页第1-2段, 第1427页第2段	1-2, 8-9												
X	FAN, Jun-Ting等. "Rubiunnanins C-H, cytotoxic cyclic hexapeptides from Rubia yunnanensis inhibiting nitric oxide production and NF-κB activation" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第18卷, 第23期, 2010年 10月 31日 (2010 - 10 - 31), ISSN: 0968-0896, 参见表4, 第8230页左栏第2段和右栏第1段	1-2, 8-10												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>														
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期													
2018年 7月 2日	2018年 7月 20日													
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员													
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	陈蕾													
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411158													

C. 相关文件		
类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103877562 A (中国科学院昆明植物研究所 中国科学院昆明动物研究所) 2014年 6月 25日 (2014 - 06 - 25) 参见权利要求1-4, 实施例1-7、10	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/073572

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	107496901	A	2017年 12月 22日	无	
CN	103877562	A	2014年 6月 25日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)