

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480010509.9

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 24 日

[11] 公开号 CN 1777413A

[22] 申请日 2004.4.23

[21] 申请号 200480010509.9

[30] 优先权

[32] 2003.4.23 [33] JP [31] 118581/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/006038 2004.4.23

[87] 国际公布 WO2004/093858 日 2004.11.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.19

[71] 申请人 卫材株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 尾崎岩太 张 浩 水田敏彦
山本匡介

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 9 页

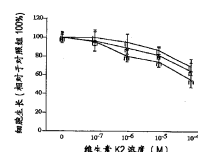
[54] 发明名称

MMP 表达抑制剂

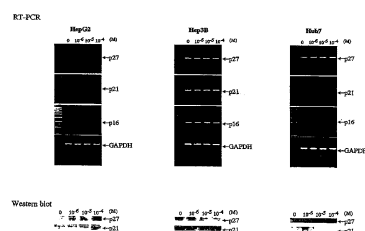
[57] 摘要

细胞外基质分解酶(MMP)是受精卵在反复进行细胞分裂、同时生成并分化组织时表达的酶,与癌的浸润、转移关系密切,对于癌的浸润、转移,癌细胞周围和血管基底膜的细胞外基质的分解是必要的过程。通过抑制 MMP 的表达能抑制癌的浸润、转移,但抑制 MMP 表达的高安全性药物还没有被开发。本发明提供抑制癌细胞引起的 MMP 表达的制剂。

维生素 K2 对 HCC 细胞增殖 (48 小时后) 的效果



维生素 K2 对依赖于细胞周期蛋白的癌 (cdk) 抑制剂 (p27, p21, p16) 表达的效果



1、一种MMP表达抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

5 2、如权利要求1所述的MMP表达抑制剂，其中所述MMP选自MMP-1、MMP-3、MMP-7或MMP-14。

3、一种uPA表达抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

4、一种癌的转移、浸润抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

5、如权利要求4所述的癌的转移、浸润抑制剂，其中所述癌是肝癌。

6、一种AP-1活性抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

7、一种Ets-1表达抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

8、一种癌治疗的预后改善剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

9、一种癌细胞转移抑制方法，该方法包括为抑制MMP的表达而给予有效量的四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物的步骤。

10、一种CDK抑制剂p16、p21或p27的表达促进剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

MMP 表达抑制剂

5 技术领域

本发明涉及一种药物，其特征在于，抑制癌细胞引起的细胞外基质分解酶（MMP: matrix metalloproteinase）的表达。

背景技术

- 10 细胞外基质（也称ECM: extracellular matrix）是固定、粘附构成多细胞生物体的各细胞的不溶性成分的总称。已知细胞外基质通过与细胞结合而影响细胞的增殖、分化，作为细胞外基质的主要物质，有胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白等。已知细胞外基质可被称为细胞外基质分解酶（MMP: matrix metalloproteinase，以下称为“MMP”）的酶分解。
- 15 MMP是受精卵在反复进行细胞分裂、同时生成并分化组织时表达的酶，与癌的浸润、转移关系密切，对于癌的浸润、转移，癌细胞周围和血管基底膜的细胞外基质的分解是必要的过程。

发明内容

- 20 所以，通过抑制MMP的表达能抑制癌的浸润、转移，但抑制MMP表达的高安全性药物还没有被开发出来，人们期待着这种药物的出现。

本申请的发明人意外发现四烯甲萘醌（menatetrenone，维生素K-II）抑制MMP的表达。本发明的目的是提供具有抑制MMP表达、抑制癌细胞增殖效果的高安全性药物。

- 25 本发明提供（1）一种MMP表达抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分；（2）如权利要求1所述的MMP表达抑制剂，其中所述MMP选自MMP-1、MMP-3、MMP-7或MMP-14；（3）一种uPA表达抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分；（4）一种癌的转移、

- 浸润抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分；（5）如权利要求4所述的癌的转移、浸润抑制剂，其中所述癌是肝癌；（6）一种AP-1的活性抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分；（7）一种Ets-1表达抑制剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分；（8）一种癌治疗的预后改善剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分；（9）一种癌细胞转移的抑制方法，该方法包括为抑制MMP的表达而给予有效量的四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物的步骤；
- （10）一种CDK抑制剂p16、p21或p27的表达促进剂，其含有四烯甲萘醌或其药理学上允许的盐或这些化合物的水合物作为有效成分。

附图说明

图1(a)是表示四烯甲萘醌的添加量与各种肝癌细胞增殖的关系的曲线图。

图1(b)是表示利用RT-PCR法研究四烯甲萘醌的添加量与各种肝癌细胞中CDK抑制剂表达的关系的实验结果图。

图1(c)是表示利用Western blot法研究四烯甲萘醌的添加量与各种肝癌细胞中CDK抑制剂表达的关系的实验结果图。

图2是表示向各种肝癌细胞中添加四烯甲萘醌时的细胞周期图。

图3是表示向肝癌细胞中添加四烯甲萘醌时，对各种肝癌细胞浸润的抑制结果图。

图4是表示利用RT-PCR法研究各种肝癌细胞中添加四烯甲萘醌时各种浸润相关因子表达的实验结果图。

图5是表示利用Western blot法研究各种肝癌细胞中添加四烯甲萘醌时各种浸润相关因子表达的实验结果图。

图6是表示利用凝胶移位试验法研究添加四烯甲萘醌时转录因子活化的实验结果图。

图7是表示利用RT-PCR法研究肝癌细胞中添加四烯甲萘醌时，对各

种MMP启动子活性的影响的实验结果图。

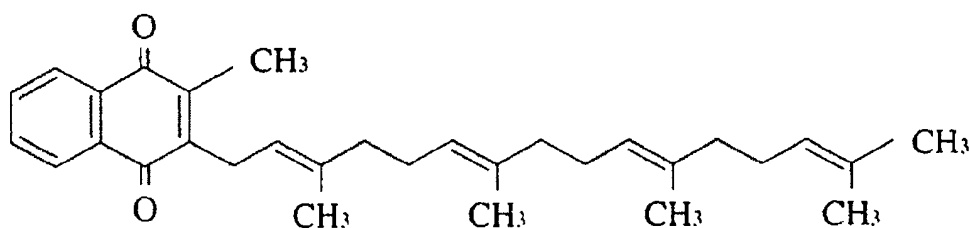
图8是表示利用RT-PCR法研究四烯甲萘醌对TPA诱导的与癌的浸润、转移相关的基因表达的影响的实验结果图。

图9是表示利用Western blot法研究四烯甲萘醌对TPA诱导的与癌的
5 浸润、转移相关的蛋白质表达的影响的实验结果图。

具体实施方式

下面对本发明的实施方式进行说明。以下的实施方式是为了说明本
发明的示例，本发明并不只限于该实施方式。只要不脱离本发明的宗
10 旨，可以以各种方式实施。

四烯甲萘醌的化学名为2-甲基-3-四异戊烯基-1,4-萘醌(2-methyl-3-tetraprenyl-1,4-naphthoquinone)。结构式如下。



四烯甲萘醌是黄色结晶或油状物质，无嗅无味，见光易分解。几乎
15 不溶于水。四烯甲萘醌也称为维生素K-II，其药理作用是在凝血因子
(prothrombin、VII、IX、X)的蛋白质合成过程中，参与谷氨酸残基转
变成具有生理活性的γ-羧基谷氨酸时的羧基化反应，促进肝中正常凝
血酶原等的合成，激活生物体的止血机能，发挥生理上的止血作用。

在本发明中，作为“药理学上允许的盐”，例如，可以举出与无机酸
20 形成的盐、与有机酸形成的盐、与无机碱形成的盐、与有机碱形成的盐、
与酸性或碱性氨基酸形成的盐等。相对1分子该化合物，酸、碱以0.1~5
分子的适宜比形成盐。

作为与无机酸形成的盐的优选例，例如，可以举出与盐酸、氢溴酸、
硫酸、硝酸、磷酸等形成的盐；作为与有机酸形成的盐的优选例，例如，
25 可以举出与醋酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、
硬脂酸、苯甲酸、甲磺酸、对甲苯磺酸等形成的盐。

作为与无机碱形成的盐的优选例，例如，可以举出钠盐、钾盐等碱金属盐，钙盐、镁盐等碱土金属盐，铝盐、铵盐等。另外，作为与有机碱形成的盐的优选例，例如，可以举出与二乙胺、二乙醇胺、葡甲胺、N,N-二苄基乙二胺等形成的盐。

- 5 作为与酸性氨基酸形成的盐的优选例，例如，可以举出与天冬氨酸、谷氨酸等形成的盐；作为与碱性氨基酸形成的盐的优选例，例如，可以举出与精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸等形成的盐。

作为本发明的药物有效成分的四烯甲萘醌，可以是无水物，也可以形成水合物。另外，四烯甲萘醌不只限定以结晶多型存在，也可以是单一的结晶型，也可以是多种晶型的混合物。而且，本发明的四烯甲萘醌在生物体内分解产生的代谢物也包含在本发明的权利要求范围内。

本发明中使用的四烯甲萘醌可以利用已经公知的方法制备，作为代表例，可以利用特开昭49-55650号公报中公开的方法容易地制备，除此以外，还可以从合成制造商处容易地购得。另外，四烯甲萘醌还可以作为15 胶囊剂、注射剂等制剂购入。本发明中的药物可以直接使用四烯甲萘醌，或配合已经公知的药学上允许的载体等（例如，赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、矫味矫嗅剂、稳定剂、乳化剂、吸收促进剂、表面活性剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂等）、通常用作药物制剂原料的成分，利用常规方法制成制剂。根据需要，还可以配合维生素类、20 氨基酸等成分。作为制剂的剂型，可以举出片剂、散剂、细粒剂、颗粒剂、胶囊剂、糖浆剂、栓剂、注射剂、软膏剂、敷剂等。

另外，在本发明中，对四烯甲萘醌的给药形式没有特别限定，优选经口给药。四烯甲萘醌的胶囊剂可以以商品名Kaytwo胶囊剂（卫材株式会社制）、Glakay胶囊剂（卫材株式会社制）获得，糖浆剂可以以商品名25 Kaytwo糖浆（卫材株式会社制）获得，注射剂可以以商品名KaytwoN注射剂（卫材株式会社制）获得。

四烯甲萘醌的优选给药量为1~500mg/日，优选10~200mg/日，更优选30~135mg/日。

如上所述，MMP是指基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase），

例如, 已知有MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、MMP-7、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14等, 在本说明书中, 并不特别限定于此, 其含义代表全部MMP。

另外, 所谓uPA (尿激酶纤溶酶激活物, urokinase plasminogen activator) 是纤溶酶激活物 (PA) 中的一种, 是一种除了参与纤溶反应外, 还参与癌的浸润、转移的酶。

实施例

下面为表明本发明的有利效果, 列举了实施例、参考例, 仅用作示例, 本发明在任何情况下都不限定于下面的具体例。本领域普通技术人员可以适当变更以下实施例中记载的条件来实施本发明, 所述变更包含在本申请权利要求的范围内。

本发明人为研究四烯甲萘醌对癌细胞的(1)增殖和(2)浸润、转移产生怎样的影响, 进行了以下试验。

(四烯甲萘醌对癌细胞增殖的抑制作用的研究)

向肝癌细胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLE中添加四烯甲萘醌, 使浓度分别为0M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M, 经48小时后, 利用WST试验进行细胞增殖的研究。结果如图1(a)所示。由图1(a)可知, 添加了四烯甲萘醌的任一个细胞与未添加四烯甲萘醌的对照肝癌细胞相比, 其增殖被浓度依赖性地抑制。

(细胞周期调节基因表达的研究)

为了研究细胞增殖抑制机理, 着眼于参与细胞周期进行的基因的表达, 利用RT-PCR法和Western blot法解析作为CDK抑制剂的p21、p27、p16的表达量因四烯甲萘醌的添加而发生怎样的变化, 上述CDK抑制剂具有阻碍使细胞周期进行的Cyclin dependent kinase (CDK) 的作用。

(RT-PCR法)

在本试验中, 向肝癌细胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLE中添加四烯甲萘醌, 使浓度分别为0M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M, 经48小时后收集RNA, 用1 μ g总RNA进行RT-PCR, 研究p21、p27、p16的表达。进行以G

APDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 为对照的RT-PCR。结果如图1(b)所示。

(Western blot法)

在本试验中, 向肝癌细胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLE中添加四
5 烯甲萘醌, 使浓度分别为0M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M后, 从以上细胞中
分别提取蛋白质, 利用SDS-PAGE电泳后, 印迹 (blot) 在PVP膜上, 与
抗p21、p27抗体一同孵育, 利用ECL法研究p21、p27的蛋白质表达。结
果如图1(c)所示。

由图1(b)、图1(c)可知, 在HepG2细胞中, 可以观察到p27和p21的m
10 RNA随四烯甲萘醌的添加浓度依赖性地增加。在Hep3B细胞中, 可见p2
1和p16的轻度增加, 但未观察到p27的变化。在Huh7细胞中, 未观察到
上述蛋白的表达。

(细胞周期的研究)

对于四烯甲萘醌对癌细胞的细胞周期的影响, 利用流式细胞仪 (FA
15 CS) 解析添加了四烯甲萘醌的肝癌细胞的DNA量分布。在本试验中, 向
肝癌细胞株HepG2、Huh7、Hep3B、HLE中添加四烯甲萘醌, 使浓度分
别为0M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M, 经48小时后, 利用FACS观察细胞周期
的变化。结果如图2所示。由图2可知, 由于四烯甲萘醌的添加, 任一个
细胞中均可观察到G1期细胞的比率随浓度依赖性地增加, G2期细胞减
20 少。这暗示在肝癌细胞的细胞周期中, 四烯甲萘醌抑制由G1期进入S期
的过程, 认为四烯甲萘醌通过诱导G1停滞, 从而抑制肝癌细胞的增殖。

(对癌细胞的浸润、转移的研究)

为了研究四烯甲萘醌具有的抑制癌细胞的浸润、转移的作用, 向肝
癌细胞 (HepG2) 中添加四烯甲萘醌, 使浓度为0M、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M后, 测定癌细胞进入基质凝胶 (matrigel) 内的浸润能力。在本试验
25 中, 在双室的上室涂布基质凝胶, 在其上使癌细胞扩散, 并添加四烯甲
萘醌。在下室扩散NIH3T3细胞作为饲养细胞 (feeder)。24小时后在显微
镜下观察通过基质凝胶移动至上室下表面的细胞数。结果如图3所示。
由图3可知, 四烯甲萘醌的添加浓度越大, 移动至上室下表面的细胞数

越少。根据该结果可知四烯甲萜醌浓度依赖性地抑制癌细胞进入基质凝胶内的浸润能力。

利用下述试验研究四烯甲萜醌对MMP表达的影响,所述试验为:(1)RT-PCR试验,(2)Western blot试验,(3)凝胶移位试验,(4)MMP基因启动子活性试验,以及(5)TPA诱导时的基因表达试验。

(RT-PCR法)

为研究MMP的表达,利用RT-PCR法进行试验。在本试验中,研究向各种肝癌细胞(HepG2、Hep3B、Huh7)中添加四烯甲萜醌的情况下各种MMP(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-14(MT1-MMP))、影响MMP表达的转录因子Ets-1以及作为细胞外基质受体的 β 1整联蛋白的表达。结果如图4所示。由图4可知,由肝癌细胞表达的MMP种类部分不同,但由于添加四烯甲萜醌,使得MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-14的mRNA表达被浓度依赖性地抑制。而且,转录因子Ets-1的表达也被浓度依赖性地抑制, β 1整联蛋白和GAPDH的mRNA的表达未见变化。

(Western blot法)

为研究MMP的表达,利用Western blot法进行试验。在本试验中,研究向各种肝癌细胞(HepG2、Hep3B、Huh7)中添加四烯甲萜醌的情况下MMP-1和MMP-3的蛋白表达。结果如图5所示。由图5可知,由于添加四烯甲萜醌,使得MMP-1和MMP-3的蛋白表达被抑制。

(凝胶移位试验)

已知MMP与其启动子区域同样地具有与转录因子AP-1、Ets-1、Tcf/Lef等的结合位点,对MMP的表达进行调节。利用凝胶移位试验,研究调节MMP表达的转录因子AP-1、Tcf/Lef的结合活性是否因添加四烯甲萜醌而发生变化。在本试验中,向肝癌细胞HepG2中添加四烯甲萜醌,24小时后提取核蛋白,使其与用 32 P标记的具有AP-1、Tcf/Lef的结合位点的双链DNA反应,然后进行凝胶移位试验。结果如图6所示。由图6可知,四烯甲萜醌并未改变Tcf/Lef的结合活性,但浓度依赖性地抑制了AP-1的结合活性。与未标记的过量AP-1探针结合时,带(band)随浓度依赖性

地减弱(图中“10X”、“100X”),与变异AP-1探针结合时,带未发生变化(图中“M”)。另外,利用抗c-fos抗体能观察到带的减弱、转移(图中“S”)。根据以上的结果可知四烯甲萘醌特异性抑制AP-1的结合。

(MMP基因启动子活性试验)

- 5 下面,向肝癌细胞Huh7中导入MMP-1、MMP-3、MMP-7的启动子报道基因(promoter reporter gene),研究四烯甲萘醌对这些MMP启动子活性的影响。MMP-1、MMP-3、MMP-7的启动子-荧光素酶报道质粒(promoter-luciferase reporter plasmids)可以使用通过取代Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi
- 10 Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. Hepatol Res 2003; 27:288-300中报告的MMP启动子-CAT报道质粒的报道基因部分而制备的物质。使用脂质转染胺试剂(lipofectamine)向肝癌细胞Huh
- 15 7中导入各种MMP-荧光素酶质粒,然后以各种浓度添加四烯甲萘醌,48小时后收集细胞,测定荧光素酶活性,研究四烯甲萘醌对MMP-1、MMP-3、MMP-7基因的启动子活性的影响。

结果如图7所示。由图7可知,由于四烯甲萘醌的添加,使得Huh7细胞中的MMP-1、MMP-3、MMP-7的启动子活性被浓度依赖性地抑制。特别是MMP-1和MMP-7,活性降低接近50%。由此表明四烯甲萘醌对MMP的表达抑制是通过抑制这些基因启动子活性而实现的。

20

(TPA诱导时基因的表达试验)

- 已知表达被四烯甲萘醌抑制的MMP和Ets-1与uPA(尿激酶纤溶酶激活物, urokinase plasminogen activator)同样都是由12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)诱导的基因。为研究四烯甲萘醌是否抑制被TPA活化的基因的表达,向培养的肝癌细胞HepG2中添加TPA,使浓度为20nM,再向其中添加四烯甲萘醌,利用RT-PCR法和Western blot法研究由TPA诱导的上述基因的表达是否受到影响。结果如图8和图9所示。由图8可知,如果在肝癌细胞HepG2中添加20nM
- 25

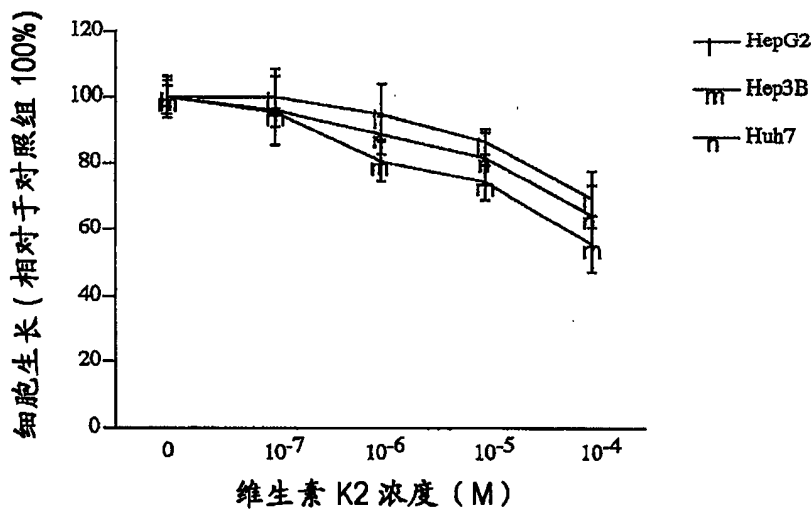
的TPA，则MMP-1、MMP-3、MMP-7和Ets-1、以及uPA的mRNA的表达增加。另一方面，作为uPA受体的uPAR和作为uPA抑制剂的PAI不受影响。如果向其中添加四烯甲萘醌，则由TPA诱导的MMP-1、MMP-3、MMP-7、Ets-1以及uPA的mRNA的表达被浓度依赖性地抑制。

- 5 而且，由图9可知，四烯甲萘醌也能够浓度依赖性地抑制MMP-1和MMP-3的蛋白质水平的表达。该结果表明，在肝癌细胞中，四烯甲萘醌抑制由TPA诱导的MMP、Ets-1以及uPA等参与浸润、转移的基因的表达。

产业上的可利用性

- 根据本发明，四烯甲萘醌能够抑制转录因子Ets-1的表达和AP-1的结合活性，抑制并防止作为分解细胞外基质的酶的MMP以及作为与MMP一同参与癌的浸润、转移的酶的uPA的表达，从而能抑制癌细胞的浸润、转移。
- 10

维生素 K2 对 HCC 细胞增殖 (48 小时后) 的效果



维生素 K2 对依赖于细胞周期蛋白的激酶 (cdk) 抑制剂 (p27、p21、p16) 表达的效果

图 1 (a)

RT-PCR

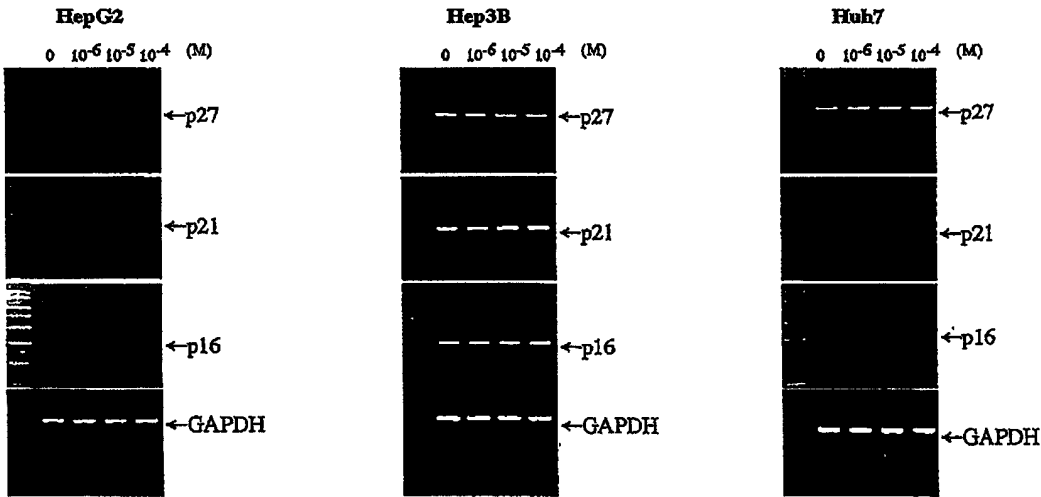


图 1 (b)

Western blot

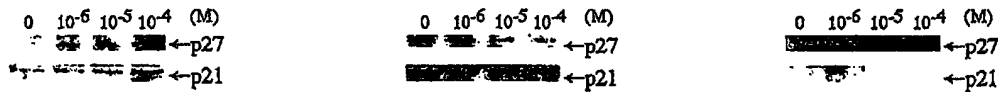


图 1 (c)

维生素 K2 通过 G1 停滞对 HCC 细胞增殖的抑制

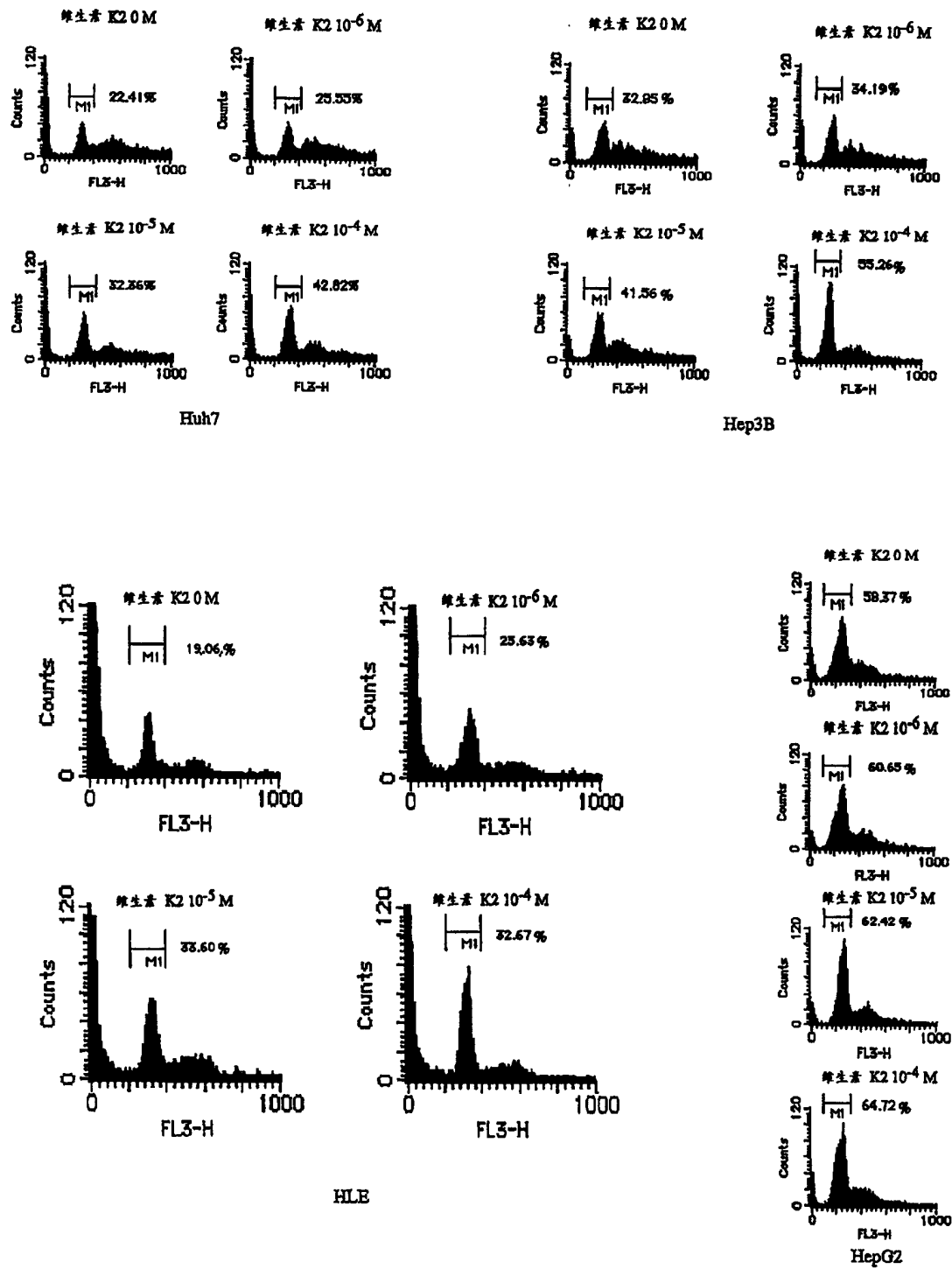


图 2

维生素 K2 浓度依赖性地抑制 HepG2 细胞的浸润性

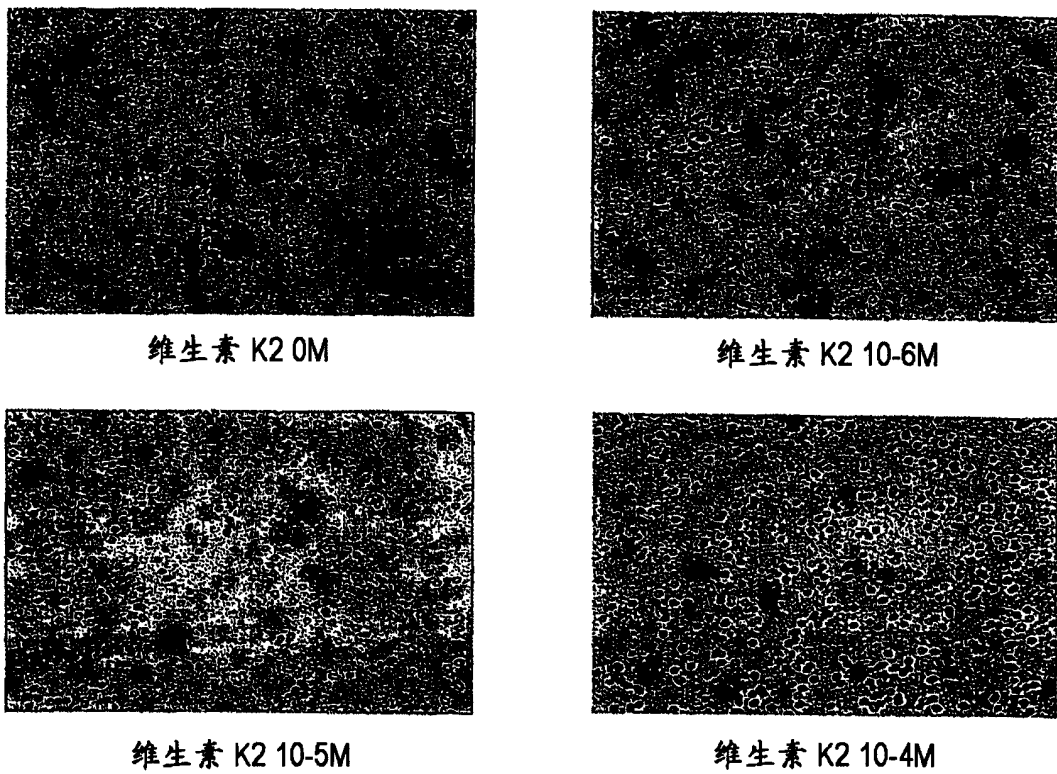


图 3

维生素 K2 对浸润相关因子的 mRNA 表达的效果

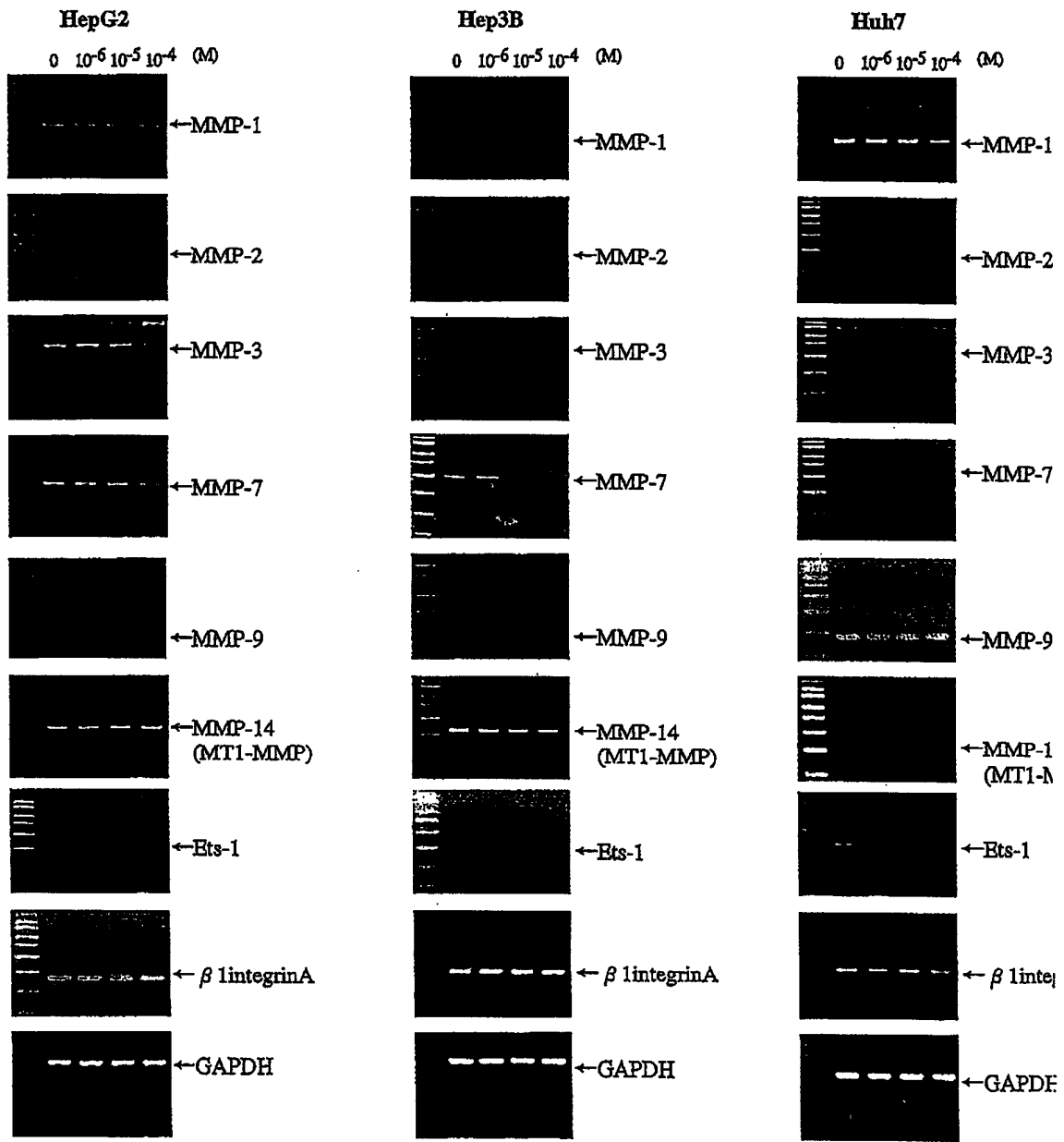


图 4

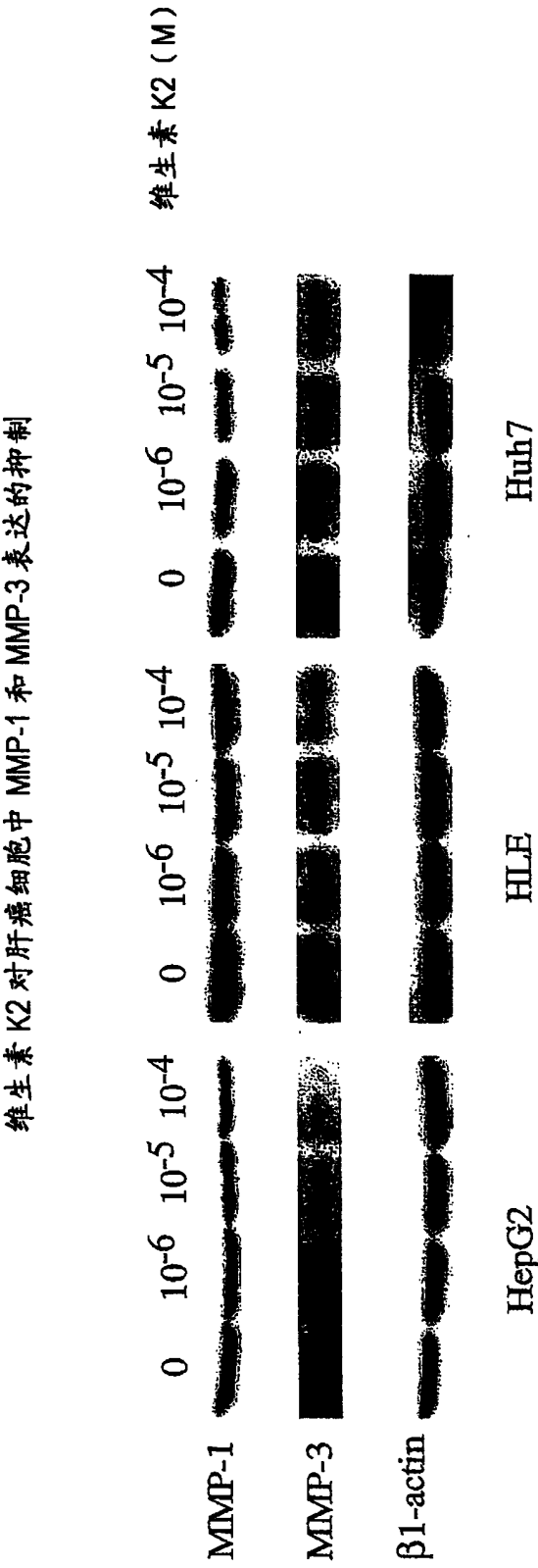
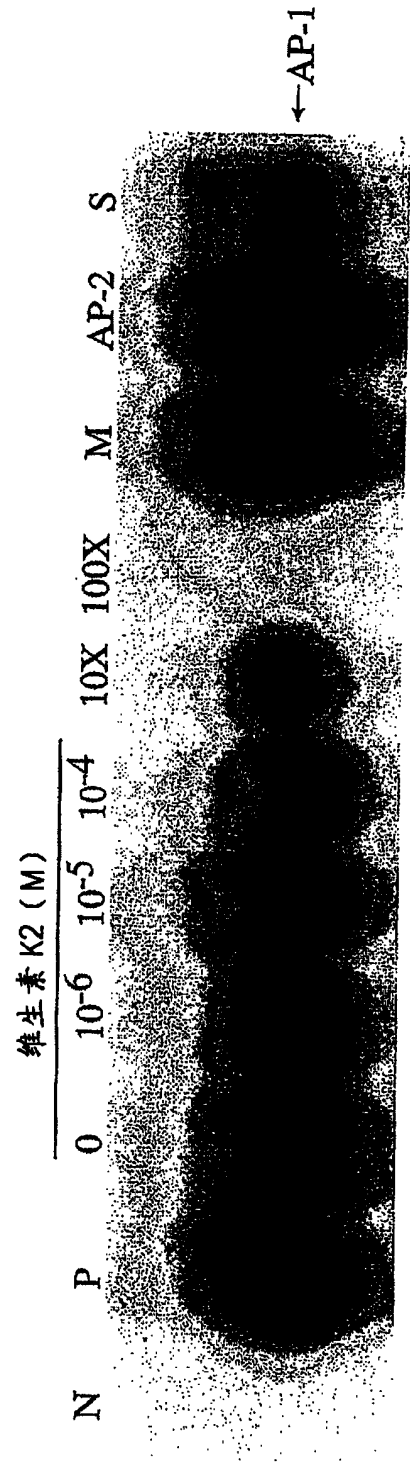


图 5

采用凝胶移位试验法得到的维生素 K2 对 AP-1 转录因子的效果



N: 阴性对照、无核提取物
P: 阳性对照、HeLa 细胞提取物
10X: 10 倍未标记 AP-1 竞争剂
100X: 100 倍未标记 AP-1 竞争剂
M: 低聚 AP-1 的变异体
S: 超级移位

图 6

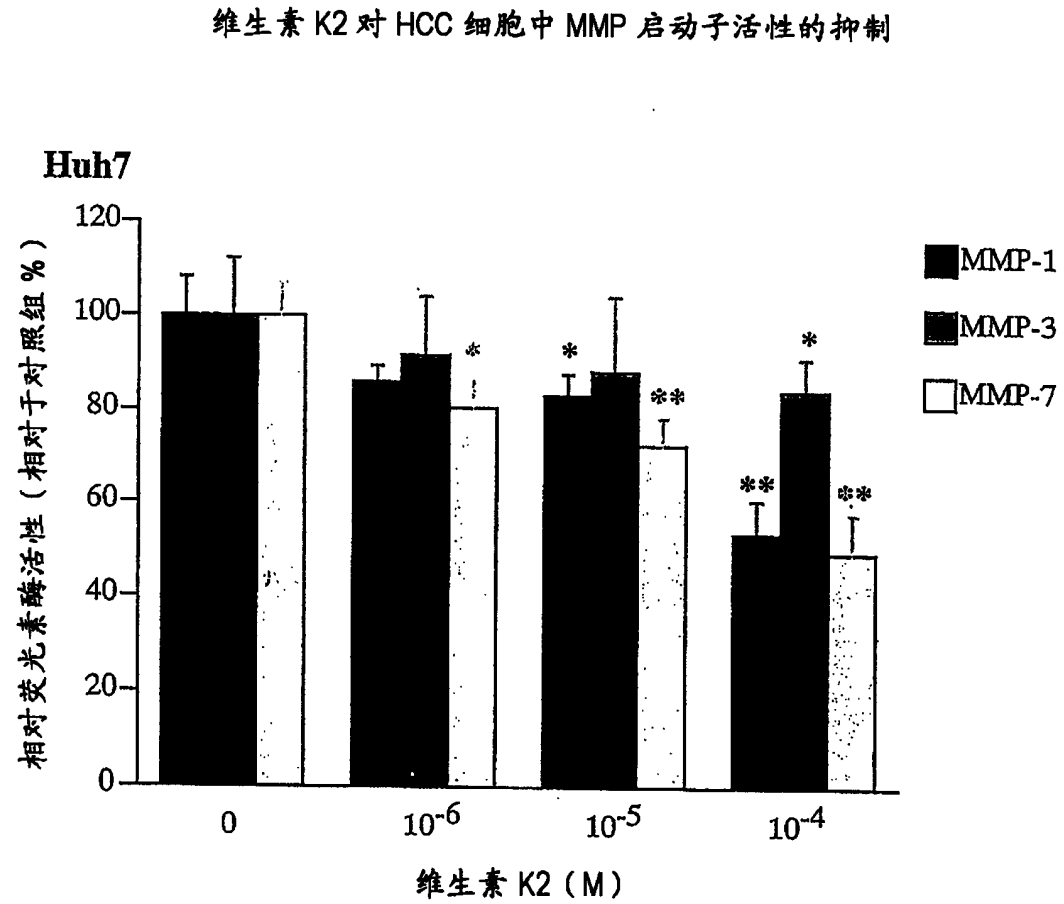


图 7

维生素 K2 对 HepG2 细胞中 TPA 诱导浸润相关基因表达的抑制

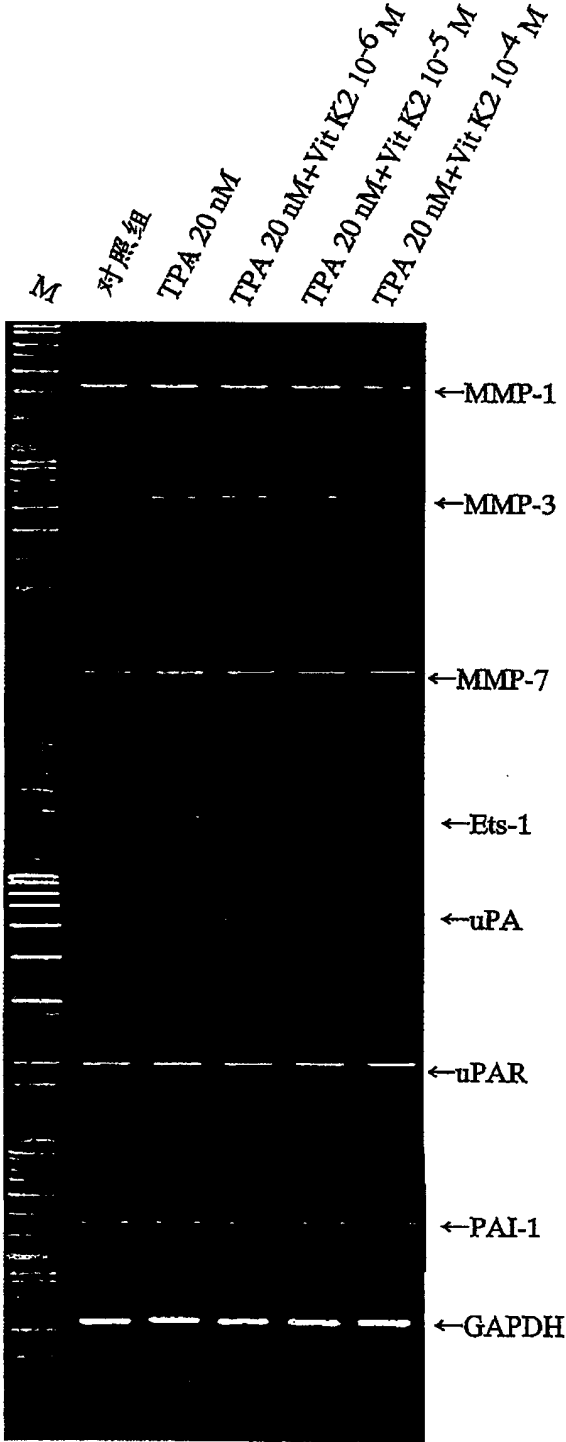


图 8

维生素 K2 对 HepG2 细胞中 TPA 诱导 MMP 表达的抑制

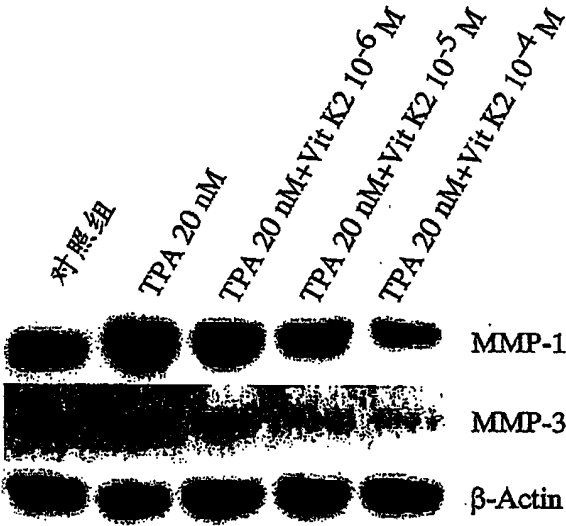


图 9