



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104936601 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201380064614. X

A61K 47/40(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 28

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

102012222777. 6 2012. 12. 11 DE

13150909. 3 2013. 01. 11 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/074991 2013. 11. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/090586 DE 2014. 06. 19

(71) 申请人 赛博尔泰克股份公司

地址 德国维尔茨堡县尼克劳斯特博 18 号

(72) 发明人 诺伯特·若维尔 延斯·布若斯凯特

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 郭婧婧 程玲

(51) Int. Cl.

A61K 31/7042(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书16页 附图21页

(54) 发明名称

用于对抗黑色素瘤细胞的飞燕草素

(57) 摘要

本发明涉及一种组合物,包括:由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精构成的络合物和/或飞燕草素或其盐类作为第一组分;和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 作为第二组分,用于治疗恶性黑色素瘤。

1. 一种组合物,包括:
作为第一组分的
- 由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精构成的络合物和/或,
- 飞燕草素或其盐类;和
作为第二组分的
- 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL)
用于治疗恶性黑色素瘤。
2. 一种用途如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,络合物中的硫代烷基醚- β -环糊精是硫代丁基醚- β -环糊精。
3. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,在所述络合物中,所述环糊精与硫代烷基醚基团取代度为 3 至 8,优选为 4 至 8,更加优选为 5 至 8,进一步更优选则为 6 至 7。
4. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含治疗有效量的飞燕草素或其盐类或由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精构成的络合物。
5. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的复合物,其特征在于,所述组合物包括至少另一治疗活性物质。
6. 一种用途如权利要求 6 所述的组合物,其特征在于,所述治疗活性物质选自由以下构成的组
细胞抑制剂,
干扰素,优选为 α -和/或 β -干扰素,更优选为 α -2a 和/或 α -2-b 干扰素,以及
肿瘤疫苗。
7. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,进一步包括一或多个治疗助剂和/或添加剂,其优选选自由经制药学认可的载体、填充剂、矫味剂和稳定剂所构成的组。
8. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其制剂方式用于以某个选自由口服、直肠给药、非肠道途径,包括腹膜内给药、皮肤给药、皮下注射、肌肉注射和静脉注射、眼部给药、肺部给药或者鼻腔粘膜给药所构成组的方式,进行给药。
9. 一种用途如权利要求 8 所述的组合物,其特征在于,所述给药方式选自由片剂、胶囊、悬浮液、喷剂、溶液、霜剂、膏剂、洗剂、胶剂和油膏所构成的组。
10. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述飞燕草素或其盐类和/或由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精构成的络合物在盖伦制剂中用于以受控和/或延时的方式释放飞燕草素。
11. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述恶性黑色素瘤治疗的对象接受过、正在接受或正准备接受选自由
外科摘除黑色素瘤细胞或受恶性黑色素瘤侵入的组织,
放射治疗,
免疫治疗,
化疗以及
干扰素治疗
所构成组的治疗。

12. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述第一组分和第二组分为药物组分。

13. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,所述第一组分和第二组分为同时给药。

用于对抗黑色素瘤细胞的飞燕草素

技术领域

- [0001] 本发明涉及用于治疗恶性黑色素瘤的组合物,其包括作为第一组分的
- [0002] - 由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精构成的络合物和 / 或
- [0003] - 飞燕草素或其盐类,以及
- [0004] 作为进一步组分的
- [0005] - 优选为肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL)。

背景技术

[0006] 恶性黑色素瘤亦称“黑色皮肤癌”,是一种色素细胞,即所谓的黑素细胞的恶性突变。这种癌症在早期就开始倾向于通过血液和淋巴循环系统扩散转移瘤。所述恶性黑色素瘤是可以治愈的,但前提是早期诊断并接受治疗。

[0007] 除了放射治疗外,最重要的治疗方法是外科摘除肿瘤,尽管采用干扰素的单药治疗也用于治疗恶性黑色素瘤。同样公知的还有疫苗治疗,即使用肿瘤疫苗借助肿瘤疫苗接种进行主动免疫治疗,以刺激自体防御,从而有针对性地对抗癌症细胞。在此过程中,通过所用药的疫苗,如此地向防御细胞呈现肿瘤的特征(如所述肿瘤细胞生产的蛋白分子或者肿瘤细胞的细胞碎片),从而使所述防御细胞将这些特征识别为异物,并攻击具有这些特征的自体细胞。

[0008] 除了疫苗治疗外,化疗,即使用损伤或抑制(细胞抑制剂)肿瘤细胞的化学物质进行药物治疗的做法同样在实践中具有重要性。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种有效的药物,作为现有技术中公知的恶性黑色素瘤治疗方案的替代或补充。

[0010] 本发明用以达成上述目的的解决方案为独立权利要求中所述的组合物和用途,其中从属权利要求中公开了本发明的有利实施方式。本发明的示例 6-12,尤其是 9-11(其中 TRAIL 作为进一步组分使用)中的有关本发明的组合物对黑色素瘤细胞和非癌症细胞以及细胞活力的作用的体外实验结果,证实了用以达成该目的的解决方案。

[0011] 首先对本发明中所用的部分术语进行说明。

[0012] 本发明的络合物或本发明的组合物用于治疗患有恶性黑色素瘤的对象或个体。“对象”一词包含活体动物和人。这种治疗的目的在于至少部分地杀死或中和肿瘤细胞。本发明中的“中和”和“杀死”指至少部分地破坏或溶解肿瘤细胞,或使其失活,或阻止其繁殖。

[0013] 本发明涉及治疗患有恶性黑色素瘤的对象的方法,其中对所述对象使用了具有疗效剂量的本发明的组合物。其中尤其有利的是,一方面使用有效成分对抗黑色素瘤细胞,另一方面还可以使非癌症细胞的活力和增殖不受影响。

[0014] 在本发明中,“治疗”一词指部分或完全达到下述结果:部分或彻底减轻病症;改善至少一种临床症状或与疾病相关的指标;延缓、抑制或防止病情进一步发展;或者部分或

彻底延缓、抑制或防止疾病爆发或发展。待治疗的对象为人或动物,优选为哺乳动物。兽医治疗除了家畜或野生动物(如羊、猫、马、牛、猪)外,还包括实验室动物(如大鼠、小鼠、荷兰猪、猴子)的治疗。

[0015] “包括由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精构成的络合物和/或飞燕草素或其盐类的组合物”一词包含作为单一制剂的组合物,即不含其他治疗活性成分。作为替代方案,所述组合物可以包括至少另一治疗活性物质。本发明的组合物可以单独给药或与至少另一种治疗物质联用,以减轻恶性黑色素瘤的一种或多种症状。本发明的组合物可以同时与其他治疗物质进行给药,其中所述其他治疗物质可以是相同组合物的一部分或采用其他组合物。作为替代方案,可以在使用其他治疗物质之前或之后使用本发明的组合物。本发明的组合物可以通过与所述其他治疗物质相同或不同的给药方式进行给药。

[0016] 所述另一治疗有效成分优选为一种肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand-TRAIL)。根据本发明的另一种优选实施方式,所述另一治疗有效成分选自由细胞抑制剂、干扰素(优选为 α -和/或 β -干扰素,更优选为 α -2a和 α -2b干扰素),以及肿瘤疫苗所构成的组。后者可以结合TRAIL并与之联用。

[0017] 尤其当其他器官中已形成转移瘤时,可以对单个转移瘤进行化疗和免疫治疗的组合以及放射治疗,以达到使肿瘤萎缩的目的。

[0018] 在化疗中通常使用抑制健康和恶性细胞生长并刺激免疫系统的干扰素,尤其是白细胞(白血球)形成的IFN- α 以及结缔组织细胞(纤维母细胞)形成的IFN- β 。在癌症治疗中通常使用通过基因技术获得的纯干扰素,例如在德国被批准用于癌症治疗的 α -2a干扰素(Roferon®)和 α -2b干扰素(IntronA®)。

[0019] 免疫治疗的最初理念是通过放射治疗使自体的肿瘤细胞失去分裂能力,提高对免疫系统的刺激,优选混合某种病毒注射入皮肤,以吸引防御细胞并有针对性地以这些肿瘤细胞为目标激活防御细胞,然而这种理念的应用已经越来越少。目前使用的是肿瘤细胞所生产的蛋白分子,而不是整个肿瘤细胞或细胞碎片,对从血祖细胞中培育的细胞在体外加载所述蛋白分子,并以如此装配的方式输入回患者体内,从而将其作为需要对抗的对象呈现给防御细胞。作为替代方案,向肿瘤细胞中注入防御细胞的引诱或激活物质的基因也可以实现相同的结果。

[0020] 在实践中具有重要性的还有开头所述的针对癌症细胞进行的化疗,在化疗中使用各种能够以不同方式抑制肿瘤生长的药物,其中这些化疗治疗剂通常称为“细胞抑制剂”。细胞抑制剂是通过人工合成制造的或是自然存在的细胞毒素的衍生物,所述细胞毒素触发肿瘤细胞的程序化细胞死亡(细胞凋亡)。本发明中可以应用的化疗治疗剂的例子包括硼替佐米(万珂®、Millennium)、美法仑、强的松、长春新碱、卡莫司汀、环磷酰胺、地塞米松、萨力多胺、阿霉素、顺氯氨铂、依托泊苷和阿糖胞苷。

[0021] 除了本发明的药物用药外,还可以使用放射治疗作为补充。除了使用放射性药物,即所谓的“放射药剂”外,所述放射治疗优选局限于局部使用。即优选的电磁射线和粒子射线在此情况下的作用局限于被照射的区域,并通过电离和构成自由基和打断肿瘤细胞的DNA而损伤肿瘤细胞,尤其是细胞核中的DNA。为了保护肿瘤周围的健康组织,可以使用屏

蔽板。

[0022] 本发明的有效成分以单药治疗的方式或结合 TRAIL 或其他例如选自由细胞抑制剂、干扰素和肿瘤疫苗所构成组的治疗活性物质联用的用药也可以作为所谓的局部治疗来进行,例如通过有针对性的注射(如借助导管)注入身体部位、体腔或者肿瘤部位或肿瘤所在器官的血管中。可以以局部灌注的方式对相关区域或器官进行渗透,其中在完成其他循环的情况下,使所述药物流经所述区域(如臂部和腿部)或器官,然后直接重复通过,而不进入身体的其他部位。

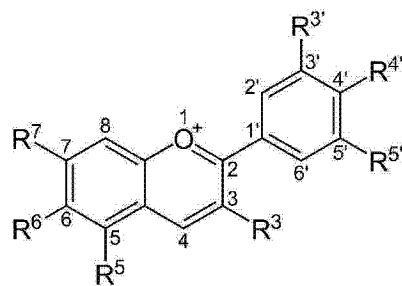
[0023] 本发明的组合物优选作为药物组合物制备和给药。“药物组合物”一词包括一或多种有效成分和一或多种作为所述有效成分载体的惰性成分。所述药物组合物使本发明的络合物或本发明的组合物能通过口服、直肠给药、肠胃外给药、包括腹膜内给药、皮肤给药、皮下注射、肌肉注射和静脉注射、眼部给药、肺部给药或者鼻腔粘膜给药的方式进行给药。非肠道途径给药方式例如可以为片剂、胶囊、溶液、悬浮液或分散体。眼部给药、肺部给药或者鼻腔粘膜给药方式例如可以为喷剂、溶液、霜剂、膏剂、洗剂、胶剂、油膏、悬浮液或分散体。现有技术中已公开了相应的制剂和给药技术,例如可参见《雷明顿的制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (Mack Publishing Co, Easton Pa.)。本发明的组合物和络合物例如可以通过药学上可接受的载体(如生理盐水)以静脉注射的方式进行给药。所述注射可采用水溶液,优选为生理上可接受的适合于注射剂的缓冲液(如 Hanks 液、林格液或缓冲生理盐水)。肠胃外给药(包括皮下、肌肉、静脉和腹腔给药)同样可以采用水溶液,或者油溶液或固体制剂。药物组合物中有效成分的含量可因具体情况而异,通常为给药单位的 2 至 60% (重量百分比) 之间。有效成分含量的选择应达到有效剂量。根据本发明的一种优选实施方式,飞燕草素或其盐类和 / 或所述由飞燕草素和硫代烷基醚- β -环糊精所构成的络合物在盖伦制剂中用于以受控和 / 或延时的方式释放飞燕草素。

[0024] “盐”或“制药学上可接受的盐”指本发明的化合物在制药学上可接受的盐,且所述盐能在给药后释放在制药学上有效的成分或其活性代谢物。本发明的组合物和络合物的盐可以使用无机或有机酸和碱制成。

[0025] 可以使用“纯净形式”或“经纯化”的飞燕草素花青素,即不需要的成分已被去除。

[0026] “花青素”具有下图所示的基本结构:

[0027]



[0028] 本化学式中的取代基选自由氢、羟基团和甲氧基团构成的组。

[0029] 能够与飞燕草素花青素按照本发明进行络合的环糊精是由以 α -1,4 糖苷键结合的葡萄糖分子所构成的环状低聚糖。 β -环糊精具有七个葡萄糖单元。在硫代烷基醚- β -环糊精中,硫代烷基醇中葡萄糖单元的羟基团被醚化。在本发明中, β -环糊精的 21 个羟基团中通常只有一部分被醚化。相关专业人员均熟悉硫代烷基醚环糊精的生产,例

如在 US 5,134,127 或 WO 2009/134347A2 中进行了相关说明。

[0030] 在现有技术中,硫代烷基醚基团被在环糊精中用于提高亲水性和水溶性。硫代烷基醚基团有助于显著提高由花青素和经相应取代生成的 β -环糊精所构成络合物的稳定性,从而大大改善了对氧化尤其敏感的花青素的耐储存性和可制备性。本发明的络合物可以制备成耐储存的水溶液或固体,具体如下所述。

[0031] 在本发明中,尤其有利的是将有效成分飞燕草素与硫代烷基醚- β -环糊精,优选为硫代丁基醚- β -环糊精(SBE- β -CD)或硫代乙基醚- β -环糊精进行络合,如此能显著提高所述有效成分的溶解性和稳定性。在此在不限本发明保护范围的前提下尝试对此进行解释:这是因为带负电荷的硫代乙基单元或硫代丁基单元和带正电荷的飞燕草素花青素发生静电相互作用,并且在烷基集团之中,丁基基团和乙基基团有最佳的长度,从而能在空间上实现相应的相互作用。在此需要说明的是,就任意一种有效成分,例如飞燕草素能够通过硫代烷基醚- β -环糊精的络合提高溶解性和稳定性这一论断尚未达成普遍接受的统一意见。例如参阅 Ueda 等人《硫代丁基醚- β -环糊精作为数种药物溶解/稳定剂的评估》,《Drug Development and Industrial Pharmacy》,249(9),863-867(1988)中的表 1,其中比较了各种有效成分单独,以及与硫代丁基醚- β -环糊精和 β -环糊精的络合物的溶解度。从其中所示的溶解度数值(SBE7- β -CD VS β -CD)中可以看出,对于三分之一的被调查的有效成分,与硫代丁基醚- β -环糊精的络合产生了反作用,即由有效成分和硫代丁基醚- β -环糊精所构成络合物的溶解度远小于与 β -环糊精的络合物。

[0032] 优选地,所述环糊精与硫代烷基醚基团取代度为 3 至 8,更优选为 4 至 8,更加优选为 5 至 8,进一步更优选则为 6 至 7。具有在 6 至 7 之间的平均取代度的合适的环糊精,例如在上述的 WO 2009/134347A2 中进行了说明,并且在市面上以 Captisol® 的商品名出售。同样可以使用的还有取代度为 4 至 5 之间,例如为 4.2 的相应环糊精。

[0033] 本发明中以纯化、盐、或络合形式使用的花青素为飞燕草素。其化学结构如上图的化学式所示,而取代模式如下所述:

[0034]

	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
飞燕草素	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH

[0035] 本发明的主题还包括一种用作治疗恶性黑色素瘤药物的本发明的组合物的水溶液。

[0036] 本发明的络合物以及相应的水溶液的制备包含以下步骤:

[0037] a) 制备硫代烷基醚- β -环糊精的水溶液,

[0038] b) 加入飞燕草素花青素并混合以制备络合物。

[0039] 在步骤 a) 中,优选制备重量百分比为 5 至 10% 的所用环糊精的水溶液。在本发明中尤其优选的是,在加入飞燕草素期间或之后,或者优选在其之前,将水溶液的 pH 值调整为 7 或以下,优选为 6 或以下,更优选为 5 或以下,进一步更优选为 4 至 5 之间。实践表明,在此 pH 值情况下能够提高所述络合物在水溶液中的浓度。

[0040] 作为氯化物计算的飞燕草素浓度优选至少为 0.5mg/ml,更优选至少为 1.0mg/ml,

更优选至少为 1.5mg/ml, 进一步更优选至少为 2.0mg/ml。在一种优选的实施方式中, 尤其在 pH 值为 4 至 5 之间的水溶液中可以达到所述尤其优选的、至少为 2.0mg/ml 的浓度范围。

[0041] 在制备过程中, 可以通过搅拌来对水溶液的成分进行混合, 优选的混合时间为 2 至 20 小时。优选在避光条件下进行操作, 以避免由光线导致的氧化。

[0042] 本发明的另一个主题是一种用于治疗恶性黑色素瘤药物的固体, 所述固体在本发明中可通过从上述的本发明的水溶液中去溶剂来获得。所述去除操作优选通过冷冻干燥法 (Lyophilisation) 来进行。本发明的药物水溶液和药物固体均具有较强的耐储存性。

附图说明

[0043] 下面借助附图, 对本发明的实施例进一步进行说明, 但本发明不限于所述的实施例。

[0044] 图 1 示出了使用飞燕草素-SBE- β -CD 处理 (b) 和未经处理 (a) 的人体黑色素瘤细胞株 A-375 细胞的柱状图;

[0045] 图 2a 示出了低细胞融合度情况下借助亚 G1 峰值法测得的由飞燕草素-SBE- β -CD 和氯化飞燕草素诱发的依赖于剂量的细胞凋亡对比对照组的 SBE- β -CD、DMSO 以及未经处理的 A-375 细胞;

[0046] 图 2b 示出了高细胞融合度情况下借助亚 G1 峰值法测得的由飞燕草素-SBE- β -CD 诱发的依赖于剂量的细胞凋亡对比氯化飞燕草素以及对照组的 SBE- β -CD、DMSO 及未经处理的 A-375 细胞;

[0047] 图 3a 示出了低细胞融合度情况下借助亚 WST-1 分析法测得的飞燕草素-SBE- β -CD 和氯化飞燕草素依赖于剂量的细胞活力作用对比对照组的 SBE- β -CD、DMSO 以及未经处理的 A-375 细胞;

[0048] 图 3b 示出了高细胞融合度情况下借助亚 WST-1 分析法测得的飞燕草素-SBE- β -CD 依赖于剂量的细胞活力作用对比氯化飞燕草素以及对照组的 SBE- β -CD、DMSO 及未经处理的 A-375 细胞;

[0049] 图 4 示出了未经处理和使用飞燕草素-SBE- β -CD、氯化飞燕草素以及 SBE- β -CD 处理的 A-375 细胞的显微图片;

[0050] 图 5 示出了借助 xCELLLigence 系统, 在高细胞融合度情况下使用飞燕草素-SBE- β -CD 处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖 (实时细胞监控) 对比未经处理的细胞;

[0051] 图 6 示出了借助 xCELLLigence 系统, 在低细胞融合度情况下使用飞燕草素-SBE- β -CD 处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖 (实时细胞监控) 对比未经处理的细胞;

[0052] 图 7 示出了借助 xCELLLigence 系统, 在高细胞融合度情况下使用氯化飞燕草素处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖 (实时细胞监控) 对比未经处理的细胞;

[0053] 图 8 示出了借助 xCELLLigence 系统, 在低细胞融合度情况下使用氯化飞燕草素处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖 (实时细胞监控) 对比未经处理的细胞;

[0054] 图 9 示出了借助 xCELLLigence 系统, 在高细胞融合度情况下使用 SBE- β -CD 处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖 (实时细胞监控) 对比未经处理的细胞;

[0055] 图 10 示出了借助 xCELLLigence 系统,在低细胞融合度情况下使用 SBE- β -CD 处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖(实时细胞监控)对比未经处理的细胞;

[0056] 图 11a 示出了低细胞融合度情况下借助亚 G1 峰值法测得的由飞燕草素-SBE- β -CD 结合和不结合 TRAIL 联用所诱发的细胞凋亡对比对照组(未经处理以及仅使用 TRAIL 处理的细胞);

[0057] 图 11b 示出了高细胞融合度情况下借助亚 G1 峰值法测得的由飞燕草素-SBE- β -CD 结合和不结合 TRAIL 联用所诱发的细胞凋亡对比对照组(未经处理以及仅使用 TRAIL 处理、使用 SBE- β -CD 处理的细胞);

[0058] 图 12a 示出了低细胞融合度情况下借助亚 WST-1 分析法测得的飞燕草素-SBE- β -CD 结合 TRAIL 联用的细胞活力作用对比单用飞燕草素-SBE- β -CD 以及对照组(未经处理以及仅使用 TRAIL 处理的细胞);

[0059] 图 12b 示出了高细胞融合度情况下借助亚 WST-1 分析法测得的飞燕草素-SBE- β -CD 结合 TRAIL 联用的细胞活力作用对比单用飞燕草素-SBE- β -CD 以及对照组(未经处理以及仅使用 TRAIL 处理、使用 SBE- β -CD 处理的细胞);

[0060] 图 13 示出了未经处理、仅使用 TRAIL 处理、仅使用飞燕草素-SBE- β -CD,以及使用飞燕草素 SBE- β -CD 和 TRAIL 处理的 A-375 细胞的显微图片;

[0061] 图 14 示出了借助 xCELLLigence 系统,在高细胞融合度情况下使用 TRAIL、飞燕草素-SBE- β -CD、TRAIL 结合飞燕草素-SBE- β -CD 处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖(实时细胞监控)对比未经处理的细胞;

[0062] 图 15 示出了借助 xCELLLigence 系统,在高细胞融合度情况下使用 TRAIL、氯化飞燕草素、TRAIL 结合氯化飞燕草素处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖(实时细胞监控)对比未经处理的细胞;

[0063] 图 16 示出了借助 xCELLLigence 系统,在高细胞融合度情况下使用 TRAIL(0.02 μ g/ml)、飞燕草素-SBE- β -CD(30 μ g/ml)、TRAIL(0.02 μ g/ml)结合飞燕草素-SBE- β -CD(30 μ g/ml)处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖(实时细胞监控)对比未经处理的细胞;

[0064] 图 17 示出了借助 xCELLLigence 系统,在高细胞融合度情况下使用 TRAIL(0.02 μ g/ml)、SBE- β -CD(1000 μ g/ml)、TRAIL(0.02 μ g/ml)结合 SBE- β -CD(1000 μ g/ml)处理的 A-375 细胞的细胞数量和细胞增殖(实时细胞监控)对比未经处理的细胞;

[0065] 图 18 示出了在使用 ATP 荧光分析的情况下,氯化飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 络合物在 0.1 μ M、3.2 μ M 和 100 μ M 浓度下对于内皮细胞活力的作用对比不含有效成分的对照培养基;

[0066] 图 19 示出了在使用 ATP 荧光分析的情况下,氯化飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 络合物在 0.1 μ M、3.2 μ M 和 100 μ M 浓度下对于人体纤维母细胞活力的作用对比不含有效成分的对照培养基。

具体实施方式

[0067] 示例

[0068] 一、制备由飞燕草素和环糊精构成的络合物

[0069] 1. 所用材料：

[0070] 使用的环糊精如下所示：

[0071]

α -CD	标识号 :CYL-2322
β -CD	标识号 :CYL-3190
γ -CD	标识号 :CYL-2323
(2-羟丙基)- β -CD	标识号 :L-043/07
硫代丁基醚- β -CD	标识号 :47K010111

[0072] 氯化飞燕草素从 Extrasynthese 公司购得。

[0073] 2. 飞燕草素含量的确定

[0074] 采用反相高效液相色谱法 (HPLC) 来确定含有飞燕草素的组合物中氯化飞燕草素的含量。其中使用的试剂如下所述：

[0075] 纯净水

[0076] 色层分析用甲醇

[0077] 甲酸, p. a.

[0078] 1M 盐酸, 用作滴定液。

[0079] 使用 Waters X Bridge™C18, 35 μ l, 150mm x 4.6mm 作为色谱柱。

[0080] 流动相如下所示：

[0081] 通道 A : 水 950ml、甲醇 50ml, 甲酸 10ml

[0082] 通道 B : 水 50ml, 甲醇 950ml, 甲酸 10ml

[0083] 所采用的梯度设计如下所示：

[0084]

时间 [分]	通道 B 百分比
0	0
5	0
25	60
30	100

[0085] 停止时间 : 35 分

[0086] 追加时间 (posttime) : 8 分

[0087] 流速 : 1ml/ 分

[0088] 注射量 : 20 μ l

[0089] 色谱柱温度 : 30°C +/- 2°C

[0090] 紫外可见光谱探测器 :530 μm (分析用) 和 275 μm (杂质检测用)

[0091] 积分器 :面积

[0092] 溶液和样品准备 :

[0093] 稀释液 1 :由 100mL 甲醇和 2.6mL M HCl 构成的混合物

[0094] 稀释液 2 :由 100mL 40%甲醇和 2.6mL 1M HCl 构成的混合物

[0095] 校准液 :飞燕草素标准溶液的制备方法是,称取 10mg 氯化飞燕草素,放入一只 10mL 烧瓶中,使用稀释液 1 溶解。溶解后,使用稀释液 2 稀释大约 10 倍,以达到大约 0.1mg/mL 的浓度。

[0096] 对照用校准液以相同的方式进行配制。所述校准液立即使用 HPLC 进行分析,因为溶液中的氯化飞燕草素不稳定。

[0097] 试验溶液的制备 :

[0098] 为了确定根据本发明制备的固体(制备方法见下文)的飞燕草素含量,称取约 50mg 的这种组合物放入 10mL 烧瓶中。随后使用稀释液 2 进行溶解,并用相同的稀释液 2 继续溶解,直至达到大约 0.1mg/mL 的飞燕草素浓度。

[0099] 样品中的飞燕草素含量借助 Agilent ChemStation 软件进行计算并使用上述的外部标准进行校准。

[0100] 示例 1 :飞燕草素与 SBE- β -CD 的络合

[0101] 本示例对飞燕草素与不同环糊精的络合以及所述络合物在水溶液中的溶解性进行了研究。

[0102] 首先制备重量百分比为 10% 的各环糊精的中性水溶液。对于 β -CD,由于其溶解性较低,因而所选的浓度仅为 2% 重量百分比。

[0103] 将 5mL 的各环糊精水溶液和纯水倒入玻璃烧瓶中。随后追加少许氯化飞燕草素。对于 α -, β - 和 γ - 环糊精溶液的所需追加量为 10mg,对于 HPBCD(2-羟丙基- β -环糊精)和 SBE- β -CD 溶液为 15mg。

[0104] 在 30°C 的避光条件下搅拌所述悬浮液 20 小时。随后使用孔径 0.22 μm 的膜滤器进行过滤。

[0105] 下面的表中列出了可以达到的溶解度 :

[0106]

环糊精	环糊精浓度	氯化飞燕草素
—	0	0.07mg/ml
α -CD	10%	0.14mg/ml
β -CD	2%	0.05mg/ml
γ -CD	10%	0.21mg/ml
HPBCD	10%	0.19mg/ml
SBE- β -CD	10%	0.66mg/ml

[0107] 从上表可以看出,对于 SBE- β -CD 来说,络合以及由此导致的溶解度的提高作用远高于其他环糊精。

[0108] 示例 2 :pH 值的影响

[0109] 本示例就 pH 值对飞燕草素-SBE- β -CD 在水溶液中的溶解度影响进行了研究。按照示例 1 的说明制备 SBE- β -CD 的水溶液,然后使用 1M HCl 将该溶液调整为表 2 中所述的酸性 pH 值。随后,按照示例 1 的说明加入氯化飞燕草素并继续操作,唯一的不同之处在于将搅拌时间减少为 2.5 小时。试验结果如下面的表所列:

[0110]

pH	氯化飞燕草素
6.0	0.60mg/ml
4.8	2.12mg/ml
4.1	2.03mg/ml

[0111] 从上表可以看出,当 pH 值在 4 与 5 之间时,经络合的氯化飞燕草素相比在中性 pH 值下时提高了大约 2 倍。

[0112] 示例 3 :本发明的固体的制备

[0113] 在本示例中制备了的本发明络合物的固体形式。为了进行比较,还制备了固体形式的飞燕草素/HPBCD 络合物以及飞燕草素/淀粉制剂。

[0114] 示例 3.1 :飞燕草素/SBE- β -CD

[0115] 把 5g 的 SBE- β -CD 溶解在 40mL 的蒸馏水中形成澄清溶液。使用 1M HCl 将溶液的 pH 值调整至 4.8。随后加入 0.11g 的氯化飞燕草素并在 27℃ 的避光条件下搅拌 2 小时。使用孔径为 0.45 μ m 的硝化纤维膜滤器对所述均匀的液体进行真空过滤。溶液随后进行冷冻并在 -48℃ 和约 10.3Pa (77mTorr) 的压强下冷冻干燥。所述冻干物被磨粉,然后通过网孔 0.3mm 的筛网进行过筛。

[0116] 示例 3.2 :飞燕草素/HPBCD

[0117] 按照与示例 3.1 所述相同的方式进行操作,然而在过滤时有很大一部分物质被滤出,说明可溶性比示例 3.1 中采用 SBE- β -CD 的情况低得多。

[0118] 示例 3.3 :飞燕草素/淀粉制剂

[0119] 将 5g 淀粉悬浮在 40mL 蒸馏水中,获得白色的悬浮液。使用 1M HCl 将溶液的 pH 值调整至 4.6。随后加入 0.11g 的氯化飞燕草素并在 27℃ 的避光条件下搅拌 2 小时。如示例 3.1 中所述,对获得的均匀液体进行冷冻干燥、磨粉和过筛。

[0120] 示例 3.1 为本发明的内容,而示例 3.2 和 3.3 为对比示例。

[0121] 示例 4 :稳定性试验

[0122] 在以下条件下储存根据示例 3.1 至 3.3 所述的固体:

[0123] - 室温下在螺帽盖的棕色玻璃容器中放置 8 天,

[0124] - 随后室温下在避光的氧气环境下放置在玻璃容器中 22 天。

[0125] 上述储存的后 22 天在容量 20mL 的玻璃小瓶中进行。将上述已放置 8 天的样品各 250mg 装入使用橡胶塞密封的玻璃小瓶中。通过两根注射针对玻璃小瓶的上部空腔注入纯

氧。然后放入避光的环境中储存。

[0126] 使用上述的 HPLC 方法来确定所述固体的飞燕草素含量（作为氯化飞燕草素计算并以重量%为单位）。结果如下面的表所示：

[0127]

	放置时间[天]				
	起始值	2	8	19	30
示例 3.1	1.69	1.52	1.55	1.40	0.93
示例 3.2	1.30	1.20	1.14	1.03	0.68
示例 3.3	1.60	1.59	1.56	1.53	1.15

[0128] 结果显示,根据本发明可以制备即便在纯氧环境中都具有较高稳定性和耐储存性的飞燕草素络合物。所述络合物此外还易于溶解在水溶液,尤其是弱酸性水溶液中,从而根据本发明能通过多种方式制备飞燕草素。本发明固体的稳定性与含有淀粉的制剂（示例 3.3）相似,但该对比示例无法在水溶液中配制。

[0129] 示例 5 :水溶液中的稳定性试验

[0130] 使用与上文所述类似的反相 HPLC 方法来确定含有飞燕草素的溶液中的氯化飞燕草素的含量。其中所用的试剂如下所述：

[0131] 纯净水

[0132] 色层分析用甲醇

[0133] 甲酸, p. a.

[0134] 1M 盐酸,用作滴定液。

[0135] 使用 Waters X Bridge™ C18, 35 μ l, 150mm x 4.6mm 作为色谱柱。

[0136] 流动相如下所示：

[0137] 通道 A :水 770ml, 甲醇 230ml, 甲酸 10ml

[0138] 通道 B :水 50ml, 甲醇 950ml, 甲酸 10ml

[0139] 所采用的梯度设计如下所示：

[0140]

时间 [分]	通道 B 百分比
0	0
5	0
25	20
30	100

[0141] 停止时间 :25 分

[0142] 追加时间 (posttime) :8 分

[0143] 流速 :1ml/ 分

[0144] 注射量 :20 μ l

[0145] 色谱柱温度 :30℃ +/-2℃

[0146] 紫外可见光谱探测器 :530 μm (分析用) 和 275 μm (杂质检测用)

[0147] 积分器 :面积

[0148] 溶液和样品准备 :

[0149] 稀释液 1 :由 100mL 甲醇和 2.6mL 1M HCl 构成的混合物

[0150] 稀释液 2 :由 100mL 50%甲醇和 2.6mL 1M HCl 构成的混合物

[0151] 校准液 :飞燕草素标准溶液的制备方法是,称取 10mg 氯化飞燕草素,放入一只 10mL 烧瓶中,使用稀释液 1 溶解。溶解后,使用稀释液 2 稀释大约 10 倍,以达到大约 0.1mg/mL 的浓度。

[0152] 对照用校准液以相同的方式进行配制。所述校准液立即使用 HPLC 进行分析,因为溶液中的氯化飞燕草素不稳定。

[0153] 试验溶液的制备 :

[0154] 为了确定本发明水溶液的飞燕草素含量,将示例 3.1 (本发明) 的飞燕草素 / SBE- β -CD 和飞燕草素 (对比示例) 溶解在 0.9% 的 NaCl 溶液中,直至达到 1.584mg/mL (本发明示例) 和 0.0216mg/mL (对比示例) 的初始浓度 (对于飞燕草素而言)。所述溶液在室温下配制,随后在密封的玻璃小瓶内在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的避光条件下存放。

[0155] 经过 1、2、3 和 4 小时后分别对飞燕草素的含量进行测定。下表列出了以上述初始浓度百分比显示的所测含量。

[0156]

时间 [小时]	未络合的飞燕草素	飞燕草素 /SBE- β -CD
0	100%	100%
1	8.3%	80.7%
2	6.5%	74.5%
3	5.6%	64.7%
4	5.1%	62.8%

[0157] 样品中的飞燕草素含量借助 Agilent ChemStation 软件进行计算并使用上述的外部标准进行校准。

[0158] 二、飞燕草素和飞燕草素 -SBE- β -CD 对黑色素瘤细胞的作用

[0159] 试验细胞株

[0160] 在下述的体外实验中,对由飞燕草素和硫代丁基醚 - β -环糊精所构成的络合物 (下称飞燕草素 -SBE- β -CD) 和飞燕草素对作为示例使用的人体黑色素瘤细胞株 A-375 [ATTC 目录号 CRL-1619 ;Bruggen J., Sorg C. (1983) 人体恶性黑色素瘤细胞株与其采用单克隆抗体处理的变体亚株的表型差异的检测,《cancer immunology immunotherapy》15:200-205] 的作用进行了调查。

[0161] 所述细胞株在 37 摄氏度、5% CO₂ 的条件下,在加入 10% 的 FCS (胎牛血清) 和抗生素的 DMEM (德国卡尔斯鲁厄 Gibco 血清 Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 中培养。

[0162] 示例 6

[0163] (借助亚 G1 峰值法的细胞凋亡诱导测量)

[0164] 在根据示例 6 的试验中,借助亚 G1 峰值法(在专业文献中也称作“尼科莱蒂方法”),就所研究物质对试验细胞株的细胞凋亡诱导作用进行了调查。[Riccardi C. Nicoletti I. (2006) 通过碘化丙啶染色和流式细胞计数的细胞凋亡分析。《Nat. Protoc》1:1458-1461]

[0165] 所述方法基于凋亡细胞相比活性细胞 DNA 含量较低的原理。凋亡的一个特征是 DNA 被核酸内切酶分裂成较短的 DNA 片段,从而提高了凋亡细胞中相对活性细胞的低分子 DNA 的含量,而高分子 DNA 的比例则降低。在诱发细胞膜溶解(细胞透化)的情况下,低分子 DNA 片段从凋亡的细胞中逸出。如果使用碘化丙啶(PI),一种嵌入 DNA 的染色剂对细胞进行染色,则凋亡细胞所发出的荧光弱于活性细胞,且通过流式细胞计数所确定的 DNA 含量在凋亡细胞核的情况下显示为更宽、荧光较弱的亚二倍体峰(亚 G1 峰),能够很容易地与具有二倍体 DNA 含量的健康细胞的狭窄 DNA 双峰区分开来。图 1 所示的柱状图 a 和 b 中示出了其中的一个例子。柱状图 a 示出了未经处理且使用 PI 染色的细胞。碘化丙啶已嵌入 DNA 中并以两条狭窄的峰的形式发出荧光,其中 G1 阶段(左峰)的细胞 DNA 含量为单倍,而 G2 阶段(右峰)的细胞 DNA 含量为双倍。位于左峰前方的亚 G1 峰则几乎缺失。相比之下,柱状图 b 示出了较宽的亚 G1 峰,这表示的是经过 24 小时飞燕草素-SBE- β -CD 处理的凋亡细胞核的比例。

[0166] 为了执行按照示例 6 的亚 G1 峰值法,分别使用 10-3000 μ g 飞燕草素-SBE- β -CD/mL 细胞悬浮液和 15-120 μ M 净化的氯化飞燕草素/mL 细胞悬浮液培养所述细胞 24 小时,其中使用络合对象 SBE- β -CD 及 DMSO 处理的细胞,以及未经处理的细胞用作对照。对于每次单独实验(对照、飞燕草素-SBE- β -CD、SBE- β -CD、氯化飞燕草素),在孔穴板上的三个 3mL 孔穴中放入所述细胞。然后借助胰蛋白酶法收获细胞,使用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,并使用含有 0.1% 柠檬酸钠、0.1% Triton X-100 和 PI(40 μ g/ml;德国陶夫基尔兴 Sigma-Aldrich 牌)培养 1 小时,随后借助流式细胞计数器测量并评估细胞核的 DNA 含量(FACSCalibur 和 CellQuest 软件;海德堡 Becton Dickinson 公司)。从三个测量值中计算出平均值,其中对照组细胞的测量值作为 T 试验的参考基准。

[0167] 已知在凋亡测量过程中可能出现较低速率的自发凋亡(后台凋亡),其中这种效应尤其发生在细胞已经达到生长水平高点,并存在营养成分和氧气不足的情况下。为了将此情况纳入考虑范围,测量对象选择为位于指数增长阶段的细胞,其中在较低(低细胞融合度)和较高细胞密度(高细胞融合度)两种情况下均进行试验,结果如图 2a(低细胞融合度)和 2b(高细胞融合度)所示。

[0168] 试验结果

[0169] - 净化的氯化飞燕草素显示出依赖于剂量的细胞凋亡诱导作用(参见图 2a 中的 120 μ M 剂量下的数据);

[0170] - 飞燕草素-SBE- β -CD 络合物显示出强得多的细胞凋亡诱导作用(参见图 2a 中 1000 μ g/ml 和 2b 中 3000 μ g/ml 剂量下的数据);

[0171] - 而络合对象 SBE- β -CD 以及 DMSO 无作用,与未经处理的对照组细胞相似。

[0172] 示例 7

[0173] (细胞活性试验)

[0174] 在根据示例 7 的试验中,借助罗氏诊断公司的 WST-1 分析试剂(水溶性四唑),就所研究物质对试验细胞株细胞活性的作用进行了量化。WST-1 分析用于证明细胞中完整的呼吸链,其中具有完整的线粒体琥珀酸-四唑-脱氢酶系统的活性细胞会使淡红色的四唑盐 WST-1 试剂(4-[3-(4-碘苯)-2-(4-硝基苯)-2H-5-四唑]-1,3-苯二磺酸盐)在酶的作用下转化为深红色的甲臜。这种颜色变化可以在分光光度计中以光度测定的方式进行测量和评估。

[0175] 为了执行根据示例 7 的 WST-1 分析,采用与示例 6 类似的方法,分别使用 10-3000 μg 飞燕草素-SBE- β -CD/mL 细胞悬浮液和 15-120 μM 净化的氯化飞燕草素/mL 细胞悬浮液培养所述细胞 24 小时,其中使用络合对象 SBE- β -CD 及 DMSO 处理的细胞,以及未经处理的细胞用作对照。在 WST-1 分析中,例如在 Plotz 等人 (2012),不含 BH3 的蛋白 Bcl-xAK 所显示的 Bcl-2 蛋白独立于 BH3 域的相互调节作用,《公共科学图书馆》,第 7 卷,第 4 期,e34549 中所详述的一样,通过使用钙黄绿素 (4 μM ;德国法拉克福 e Bioscience 公司)在不含血清的生长培养基中在 37°C 下培养 60 分钟并使用 PBS 进行冲洗进行钙黄绿素 AM 的染色,然后借助流式细胞计数法(参见示例 5)进行细胞活性测量,以区分经过钙黄绿素染色的(活性)细胞和未经染色的(死亡)细胞。

[0176] 与示例 6 相似,在较低(低细胞融合度)和较高细胞密度(高细胞融合度)两种情况下均进行示例 7 的试验,结果如图 3a(低细胞融合度)和 3b(高细胞融合度)所示。

[0177] 试验结果

[0178] -净化的氯化飞燕草素显示出在低细胞融合度情况下,随着剂量的增加,活性细胞数量减少(参见图 3a);

[0179] -飞燕草素-SBE- β -CD 络合物导致细胞活性显著下降(参见图 3a 中 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 3b 中 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量下的数据);

[0180] -而络合对象 SBE- β -CD 以及 DMSO 无作用,与未经处理的对照组细胞相似。

[0181] 在 24 小时处理的显微观察中所观察到的细胞形态也体现了细胞凋亡诱导(示例 6)以外的活性细胞减少作用,所述细胞在较高浓度的氯化飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 情况下收缩并/或溶解,如图 4 中的显微图片所示。

[0182] 示例 8

[0183] [连续实时细胞监控(Real-Time Cell Analysis-RTCA)]

[0184] 借助 xCELLlignce 系统(德国曼海姆罗氏诊断公司),以实时的方式记录类似示例 6 和 7 的有效成分调查情况下的细胞数量和细胞增殖情况。xCELLlignce 系统是一种微电子生物传感系统,用于基于细胞、不含标记的分析,能够实时提供动态细胞数据。xCELLlignce 系统的培养板在每个凹槽的底部均配有微电极,以测量电阻抗的变化。阻抗的定量变化与细胞接触下方电极的次数和强度相关联。

[0185] 与高凋亡率(示例 6)以及细胞活性下降(示例 7)一致,飞燕草素-SBE- β -CD 还显示出细胞增殖的完全中断(参见图 5 和 6),尤其在图 5 中 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度以上时显示出尤其强的反增殖作用,而图 6 中 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度以上时完全阻止细胞增殖。

[0186] 在 60-120 μM 浓度的氯化飞燕草素情况下以显示出同等强度的反增殖作用(参见图 7 和 8),而未经处理的细胞以及 DMSO 对照组则几乎无变化,和预期一样(参见图 7-10),

即上述的反增殖作用明确地归因于所研究的有效成分飞燕草素-SBE- β -CD 和氯化飞燕草素。

[0187] 三、飞燕草素以及飞燕草素-SBE- β -CD 络合物结合 TRAIL 联用对黑色素瘤细胞的作用

[0188] 试验细胞株和所用方法

[0189] 试验中所用的细胞株和方法与前述的第二章节相同。

[0190] 示例 9

[0191] (借助亚 G1 峰值法的细胞凋亡诱导测量)

[0192] 在按照示例 9 的试验中,借助亚 G1 峰值法对飞燕草素-SBE- β -CD 络合物结合促进凋亡的配体 TRAIL 联用的作用进行了调查,其中所述细胞株 A-375 对所述 TRAIL 配体仅具有中等的凋亡敏感性。为了执行根据示例 9 的亚 G1 峰值法,分别使用 30-1000 μ g 飞燕草素-SBE- β -CD/mL 细胞悬浮液结合以及不结合 0.02 μ g TRAIL/mL 细胞悬浮液培养所述细胞 24 小时,其中使用络合对象 SBE- β -CD 处理的细胞,以及未经处理的细胞用作对照。在较低(低细胞融合度)和较高细胞密度(高细胞融合度)两种情况下均进行所述试验,结果如图 11a(低细胞融合度)和 11b(高细胞融合度)所示。

[0193] 试验结果

[0194] - 飞燕草素-SBE- β -CD 结合 TRAIL 联用时,细胞凋亡诱发作用相比所有浓度情况下单用飞燕草素-SBE- β -CD 得到了提高;

[0195] - 在飞燕草素-SBE- β -CD 浓度较高的情况下,飞燕草素-SBE- β -CD 结合 TRAIL 的细胞凋亡诱导作用相比单用 TRAIL 同样有了显著的提高;

[0196] - 而络合对象 SBE- β -CD 与对照水平相同。

[0197] 示例 10

[0198] (细胞活性试验)

[0199] 在按照示例 9 的试验中,采用与示例 7 类似的方式对试验细胞株的细胞活性进行了调查,但区别在于使用飞燕草素-SBE- β -CD 络合物与 TRAIL 的组合来对所述细胞进行处理。

[0200] 为了执行所述分析,采用与示例 7 类似的方法,分别使用 30-1000 μ g 飞燕草素-SBE- β -CD/mL 细胞悬浮液结合以及不结合 0.02 μ g/mL 的 TRAIL/mL 细胞悬浮液培养所述细胞 24 小时,其中使用络合对象 SBE- β -CD 处理的细胞,以及未经处理的细胞用作对照。

[0201] 与示例 9 类似,在示例 10 中同样在较低(低细胞融合度)和较高细胞密度(高细胞融合度)两种情况下均进行所述试验,结果如图 12a(低细胞融合度)和 12b(高细胞融合度)所示。

[0202] 试验结果

[0203] - 飞燕草素-SBE- β -CD 结合 TRAIL 联用时,细胞活性相比所有浓度情况下单用飞燕草素-SBE- β -CD 有所降低;

[0204] - 在飞燕草素-SBE- β -CD 浓度较高的情况下,飞燕草素-SBE- β -CD 结合 TRAIL 的细胞凋亡诱导作用相比单用 TRAIL 同样有所降低;

[0205] - 而络合对象 SBE- β -CD 与对照水平相同。

[0206] 在 24 小时处理的显微观察中所观察到的细胞形态也体现了细胞凋亡诱导(示例

9) 以外的活性细胞减少作用,所述细胞在额外使用 TRAIL 结合飞燕草素-SBE- β -CD 情况下发生更强的收缩和 / 或溶解,如图 13 中的显微图片所示。

[0207] 示例 11

[0208] [连续实时细胞监控 (Real-Time Cell Analysis - RTCA)]

[0209] 借助 xCELLigence 系统 (德国曼海姆罗氏诊断公司),以实时的方式记录类似示例 9 和 10 的有效成分调查情况下以及氯化飞燕草素单用和结合 TRAIL 联用情况下的细胞数量和细胞增殖情况。

[0210] 与相比单用飞燕草素-SBE- β -CD 是更高的细胞凋亡速率 (示例 9) 和更多的细胞活力下降 (示例 10) 一致,飞燕草素-SBE- β -CD 在结合 TRAIL 联用的情况下,显示出对细胞增殖的更强的协同阻止作用 (参见图 14)。氯化飞燕草素结合 TRAIL 联用时同样可以达到相比单用 TRAIL 和飞燕草素时更强的细胞增殖阻止作用 (参见图 15)。未观测到 SBE- β -CD 对 TRAIL 敏感性的增强作用 (参见图 16 和 17),即上述的反增殖作用的增强明确地归因于飞燕草素-SBE- β -CD 与 TRAIL 的组合中所研究的有效成分飞燕草素。

[0211] 四、细胞毒性调查 - 飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 络合物对细胞活性的作用

[0212] 示例 12

[0213] (飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 络合物对人体纤维母细胞和内皮细胞活性的作用)

[0214] 所用细胞

[0215] 所用细胞为来自人体捐献皮肤的自分离初生纤维母细胞和微血管内皮细胞。

[0216] 为了分离纤维母细胞,将组织的细胞群组通过一小时的胰蛋白酶 EDTA 溶液培养进行松弛处理。向皮肤加入阻止培养基,以结束细胞的脱离反应。随后将皮肤块再次在 PBS 旋转两次,从而获得纤维母细胞悬浮液。所获得的纤维母细胞在 4℃ 下一每分钟 200 转的速度进行 5 分钟的离心处理,量化后进行使用。

[0217] 借助对于专业人员而言公知的 Hewett 和 Murray (1993) 标准方法 [Hewett P. W. 和 Murray J. C. (1993) 使用 Dynabeads 包被单克隆 PECAM-1 抗体对人体微血管内皮细胞进行免疫磁性净化:分离、培养和特征化。《体外细胞生物学》:823-830] 来获取人体真皮微血管内皮细胞。

[0218] 所用测量方法

[0219] 在按照示例 12 的试验中,借助 ATP 荧光分析就所研究物质对人体纤维母细胞和内皮细胞的作用进行了调查,其中所述 ATP 荧光分析对于专业人员而言是公知的,出于完整性的考虑在下面进行简短的总结。

[0220] 细胞死亡,例如由于细胞毒性物质的作用所导致的细胞死亡后,由于 ATP 酶导致的降解,细胞内部的 ATP 含量显著下降。因而在阻止内生 ATP 酶的情况下,可以将通过细胞溶解释放的 ATP 含量作为活性细胞数量的指标。为了进行量化,将所释放的 ATP 与由荧光素酶所催化的反应相关联,其中在所述反应中,在存在 Mg^{2+} 的情况下,荧光素酶发生依赖于 ATP 的氧化反应,氧化产物为氧化荧光素、二氧化碳、AMP、无机磷,并发出光线。对于 ATP 含量相关联的发光量进行测量,从而能以可量化的方式间接推导出所调查细胞的活性。以 RLU (相对光单位),一种独立的、反映样品中 ATP 量的单位进行测量。ATP 确定所用的工具和装置对于专业人员是公知的,例如瑞典哈宁 Biothema AB 公司的 ATP 试验工具,以及德国

比肯菲尔德 STRATEC Biomedical Systems AG 公司的便携式光度计 Lumino®。为了确定细胞内的 ATP, 通常使用移液枪将 50 μ l 待试验的样品移入玻璃小管中, 加入 50 μ l 的细胞溶解提取试剂 B/S 和 400 μ l ATP-HS 试剂, 混合后, 将封闭的玻璃管放入光度计中, 以自动测量和评估发光量。

[0221] 在所述有效成分处理和应用 ATP 荧光分析前, 分别将人体纤维母细胞和内皮细胞连同 DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 放在 96 孔微滴定板上 (5000 细胞 / 孔穴) 并培养 3 天。在保温箱中完成了细胞的着床和生长阶段后, 以 1-4 天 (内皮细胞) 和 4 小时、24 小时、48 小时和 96 小时 (纤维母细胞) 的时间间隔进行物质处理, 为此, 分别在 3 个孔穴中加入溶解在 400 μ l DMEM 培养基中不同浓度 (0.1 μ M; 3.2 μ M; 100 μ M) 的有效成分氯化飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 络合物。使用不含处理物质的培养基所培养的细胞作为标准对照。3 小时, 将处理物质取出, 随后使用 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行冲洗。借助如示例 7 中所述的 WST-1- 分析试剂进行最终测量。

[0222] ATP 荧光分析的试验结果如图 18 (内皮细胞) 和 19 (纤维母细胞) 所示, 总结如下:

[0223] - 氯化飞燕草素和飞燕草素-SBE- β -CD 在所调查的有效成分浓度 (0.1 - 100 μ M) 下, 未显示出对人体纤维母细胞和内皮细胞的显著细胞毒性作用。

[0224] 由此产生了一类新的尤其适合用于癌症治疗的有效成分: 所研究的有效成分氯化飞燕草素以及飞燕草素-SBE- β -CD 一方面对于癌症细胞 (黑色素瘤细胞) 具有所需的反增殖效果 (示例 6-11), 而另一方面, 如示例 12 所示, 在治疗有效成分浓度下, 避免了对于非癌症细胞可能存在的负面细胞毒性副作用。

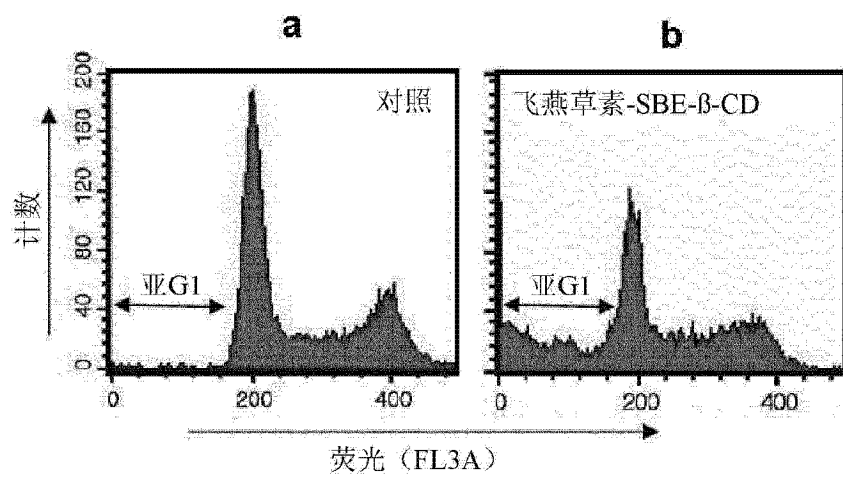


图 1

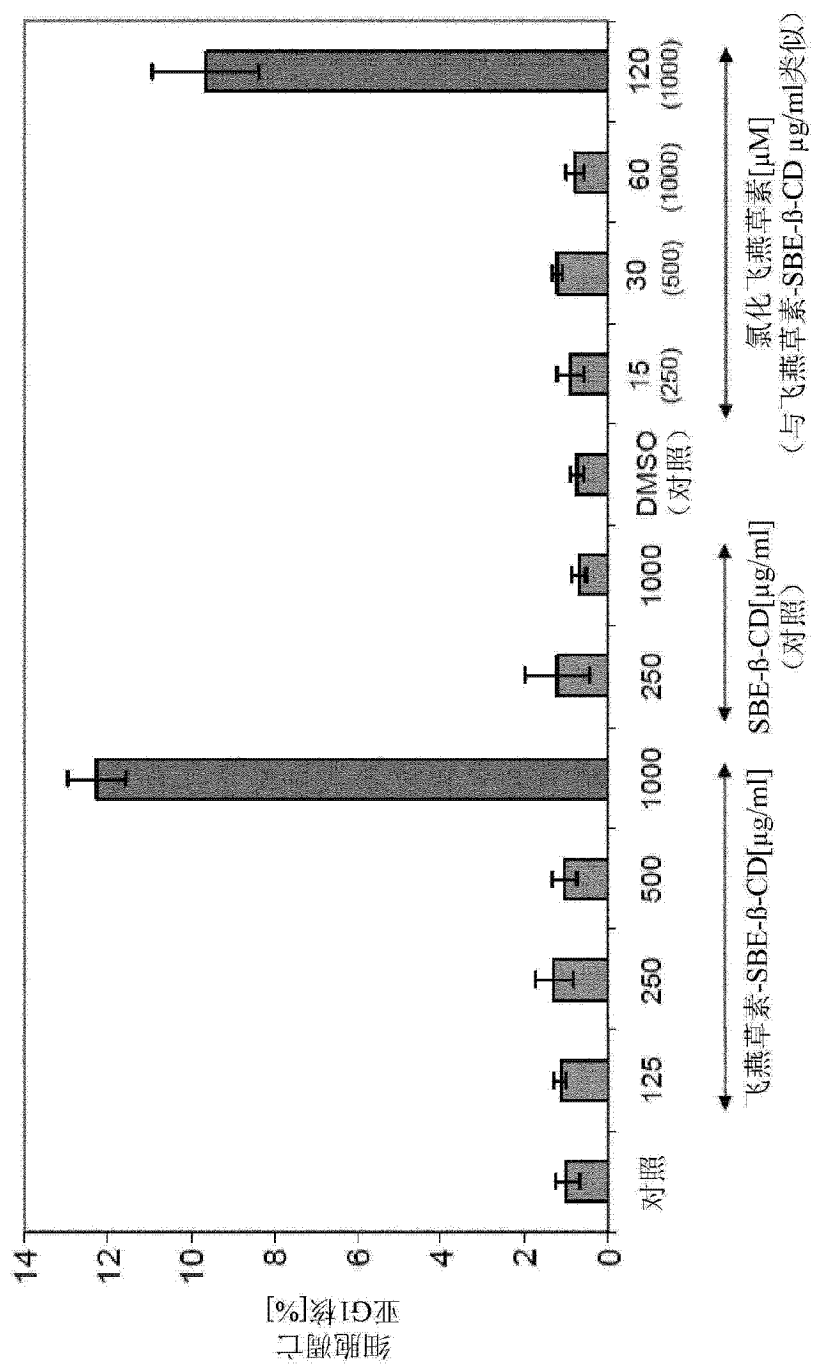


图 2a

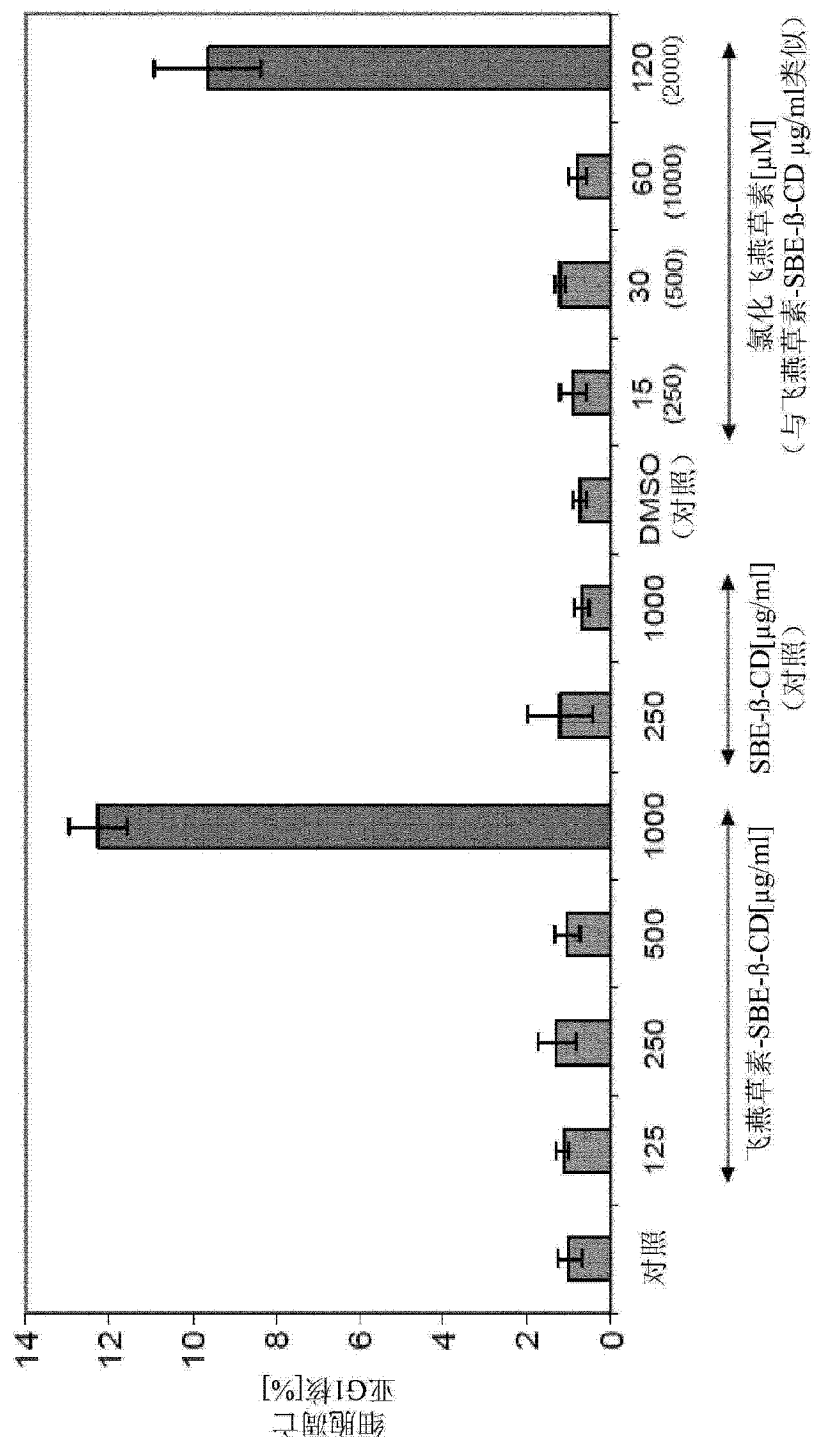


图 2b

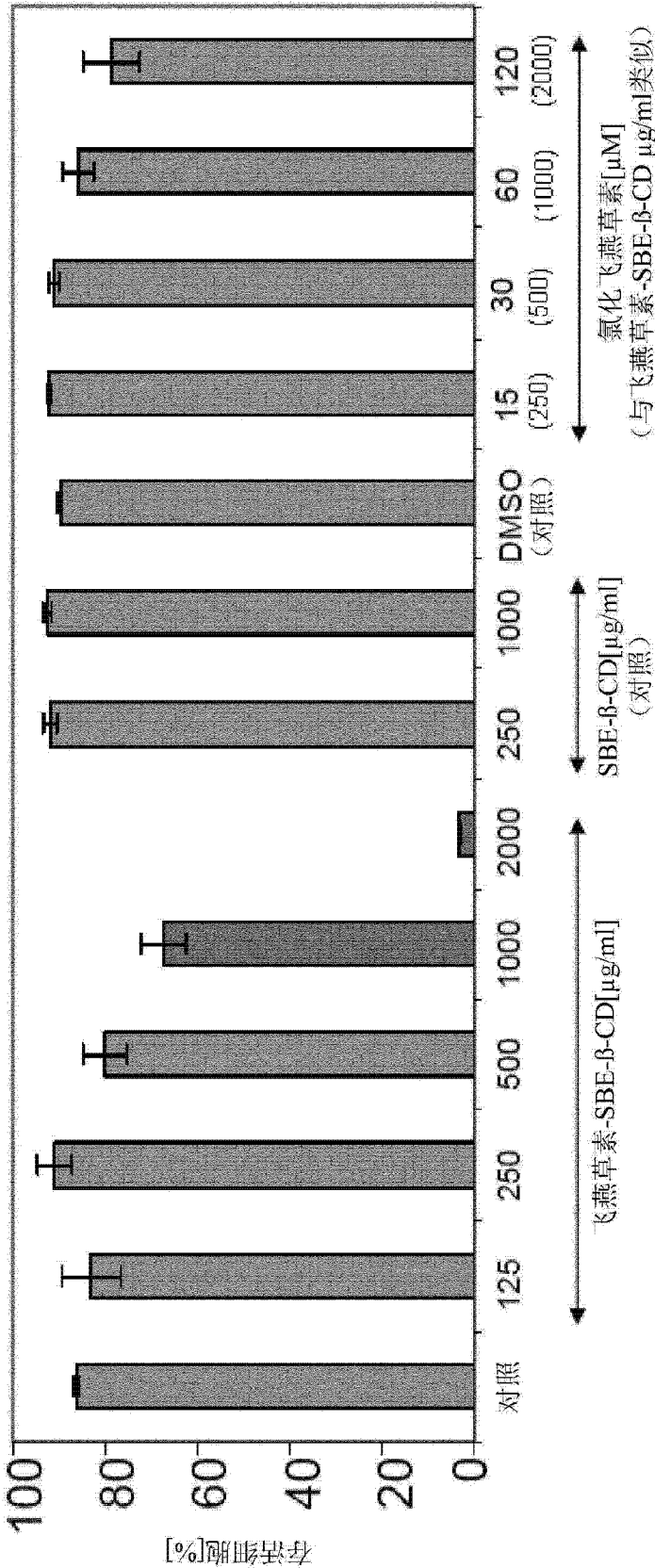


图 3a

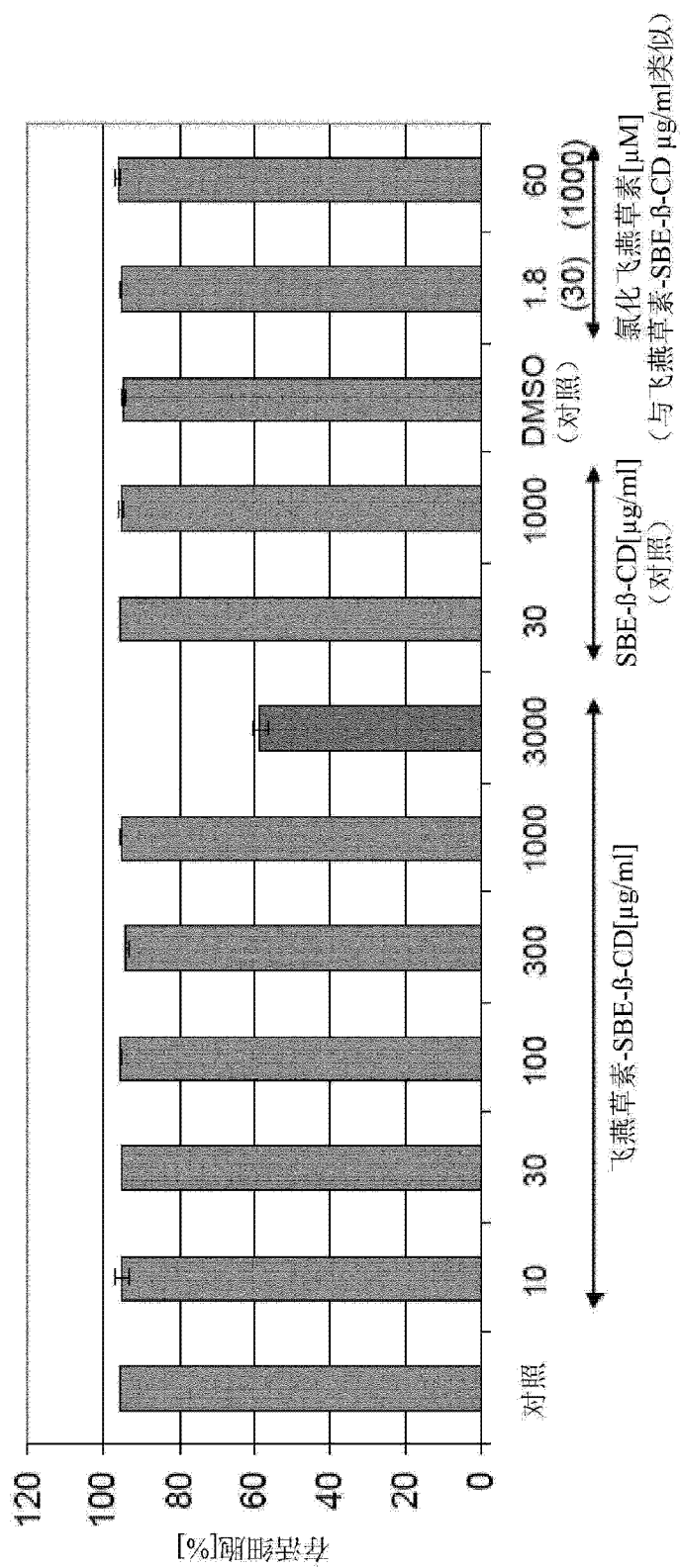


图 3b

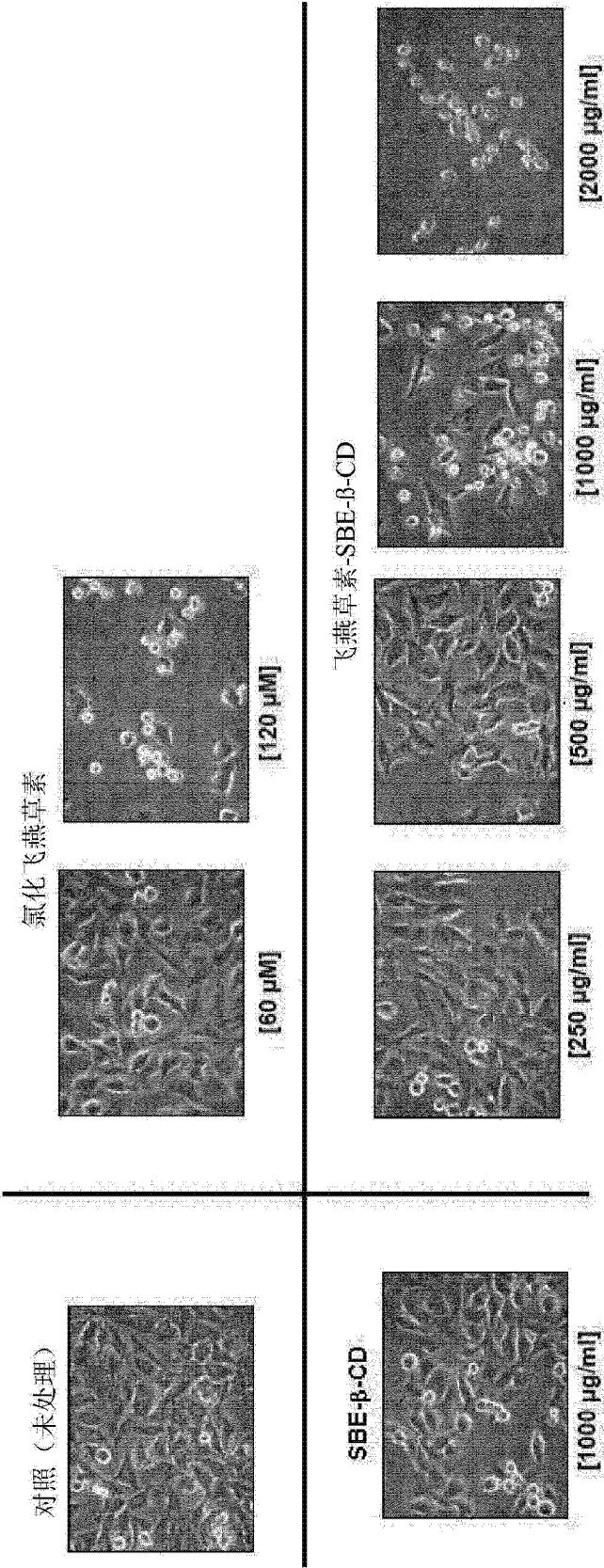


图 4

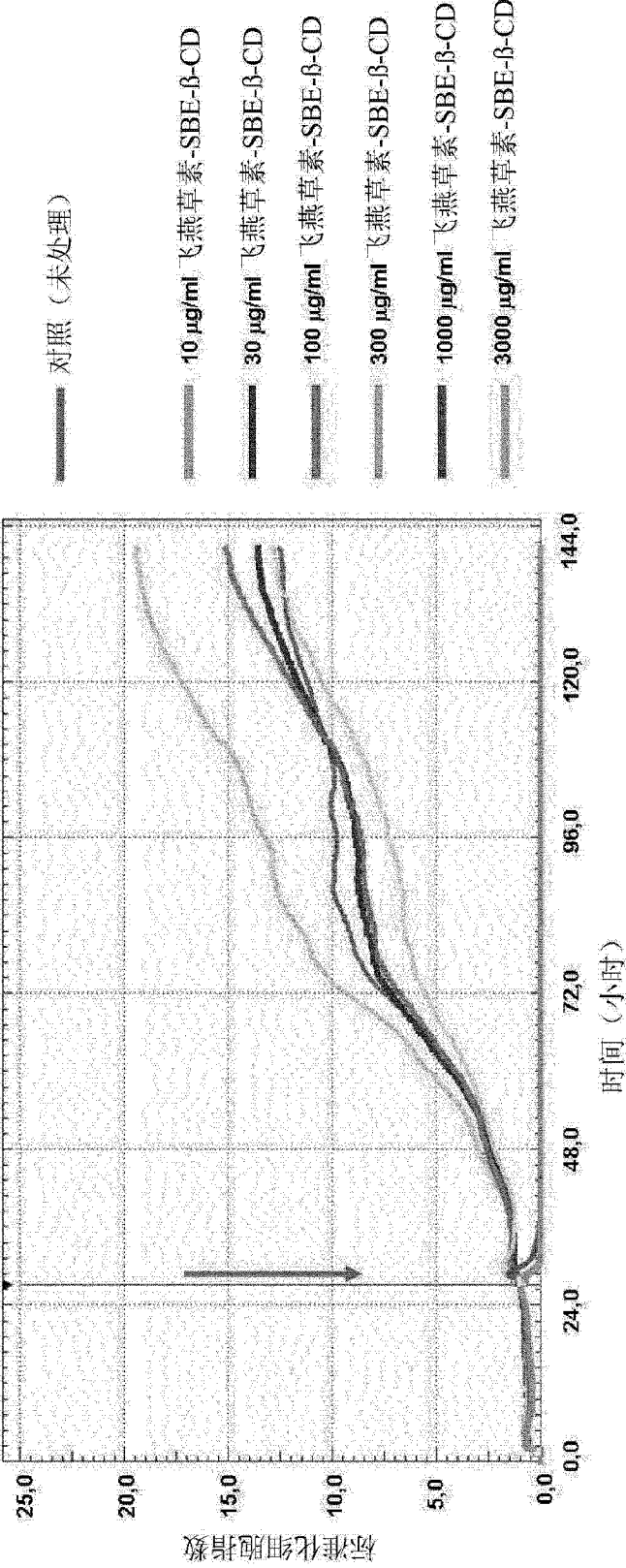


图 5

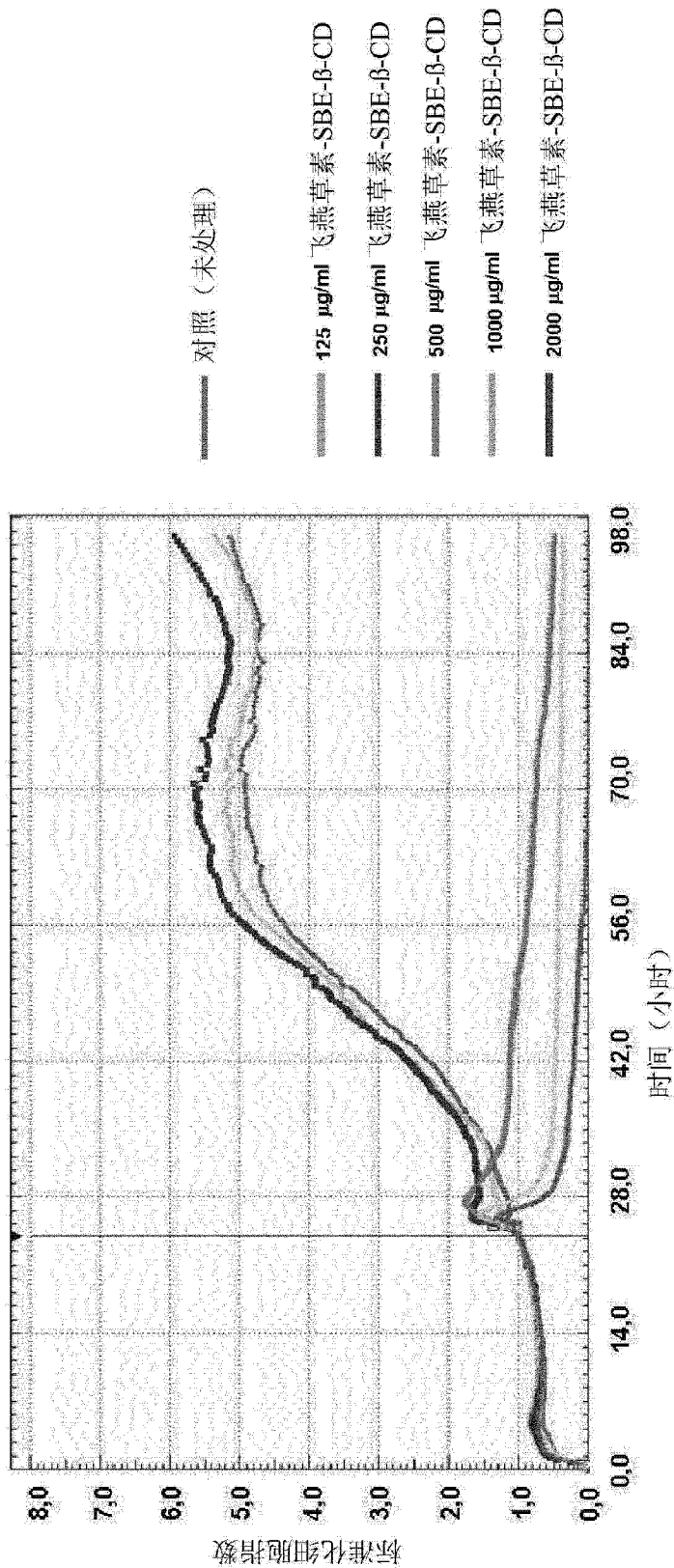


图 6

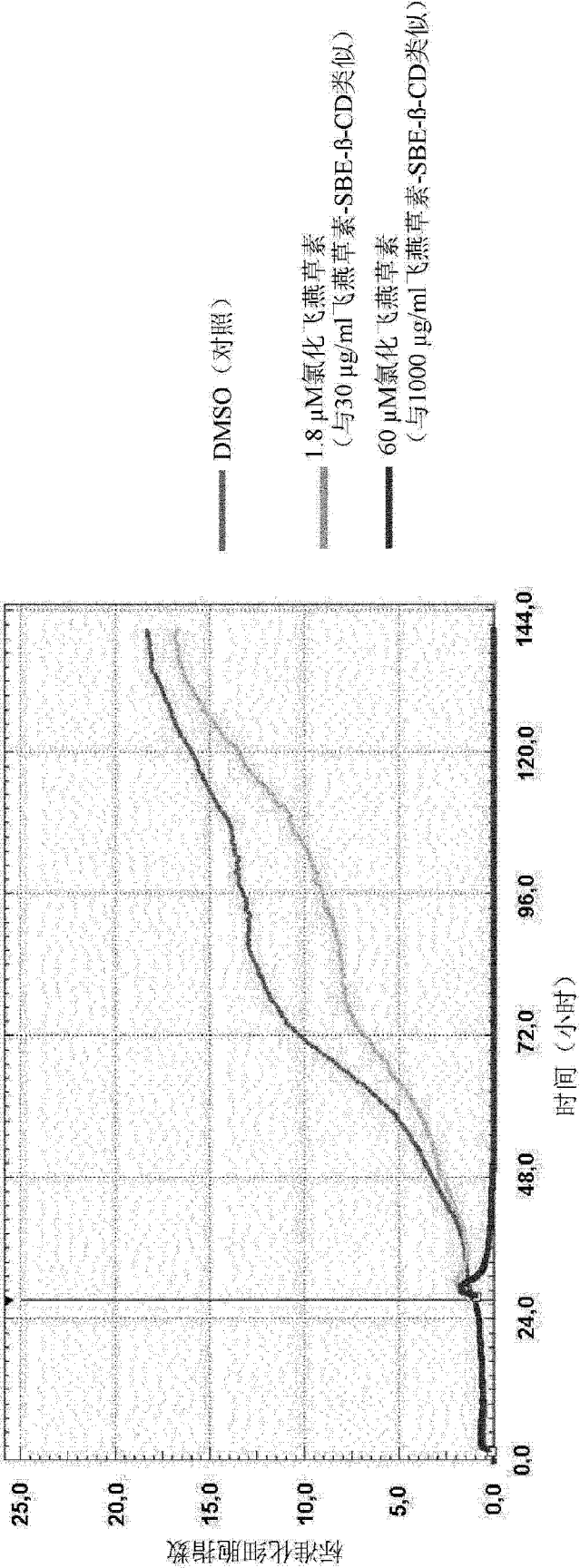


图 7

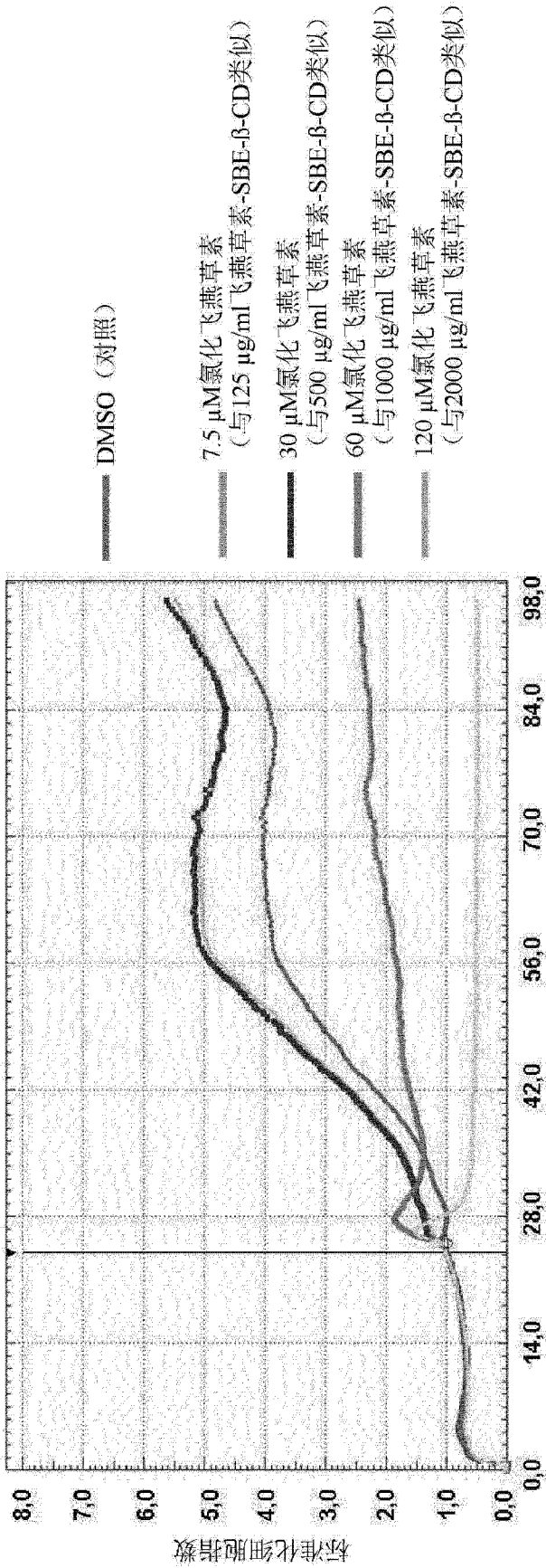


图 8

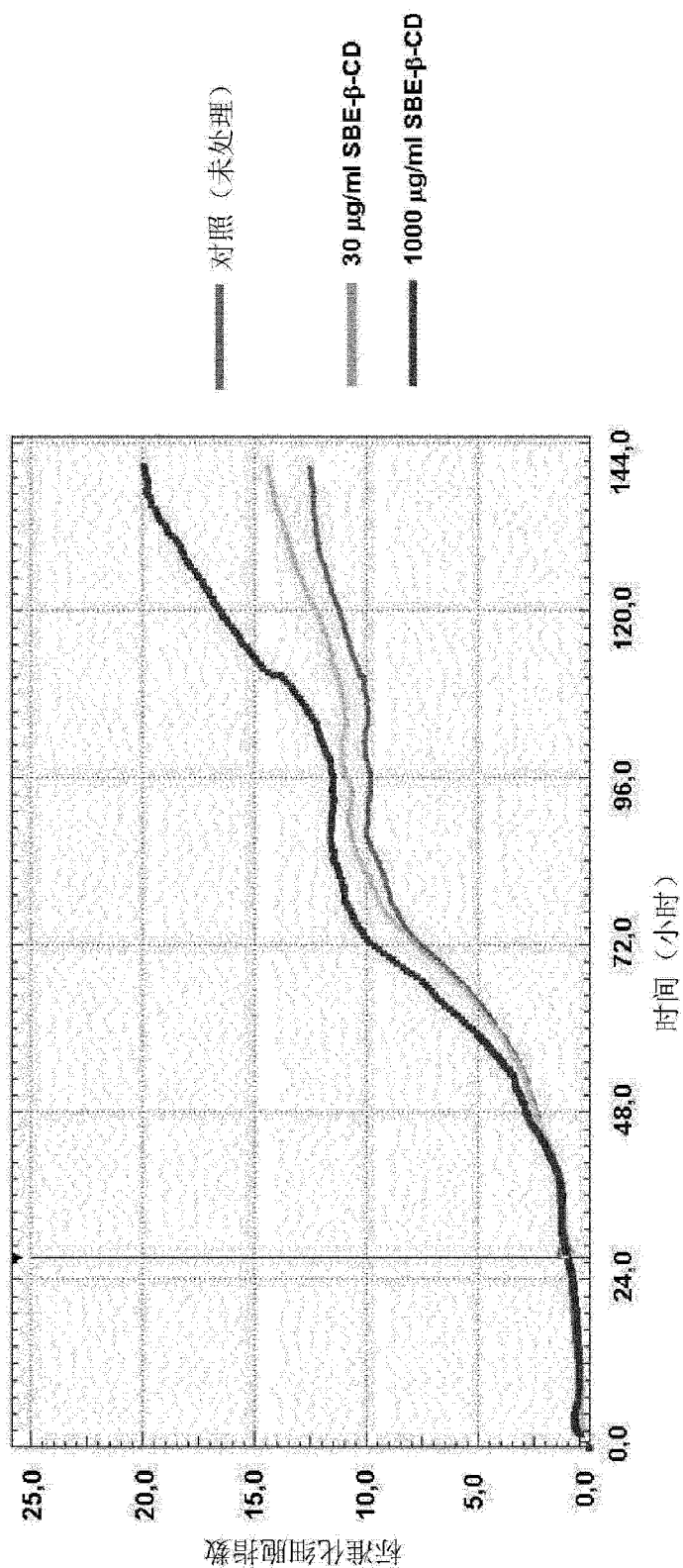


图 9

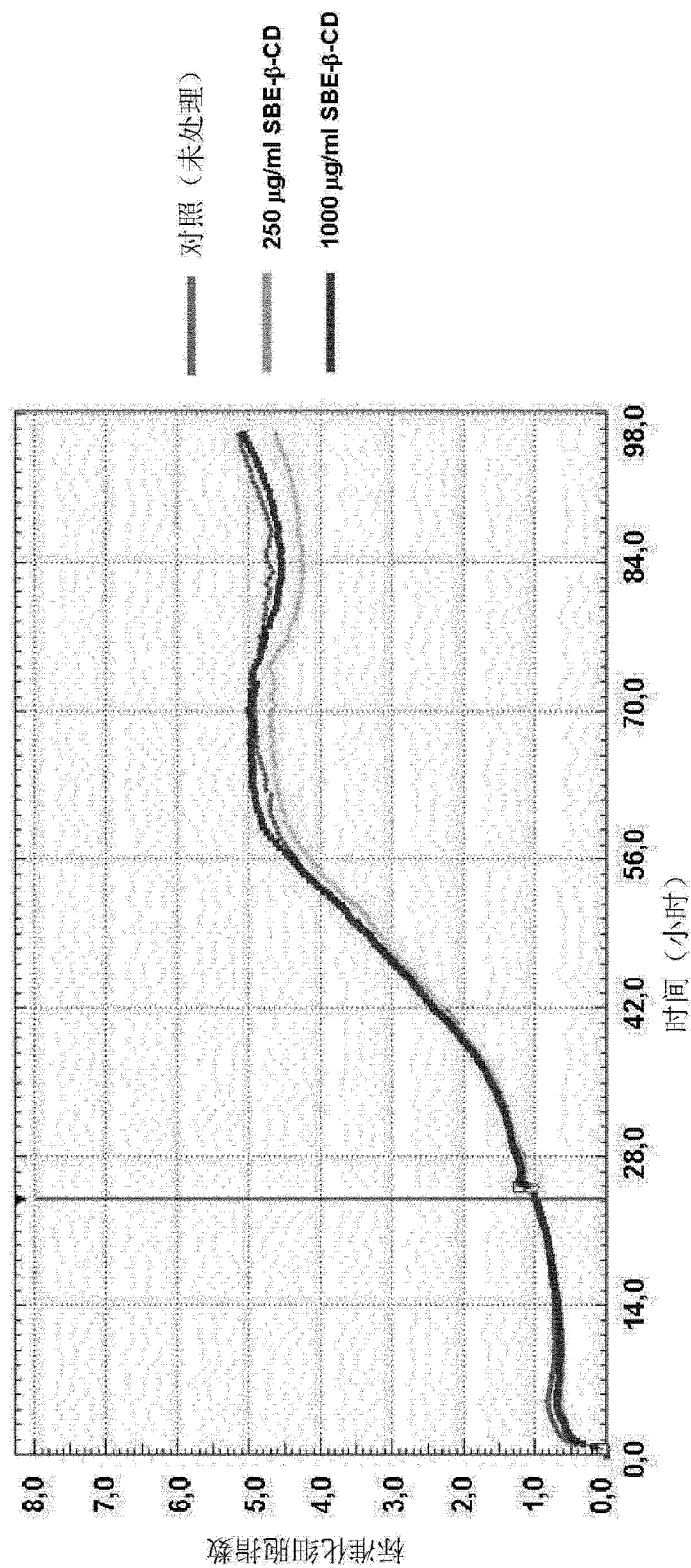


图 10

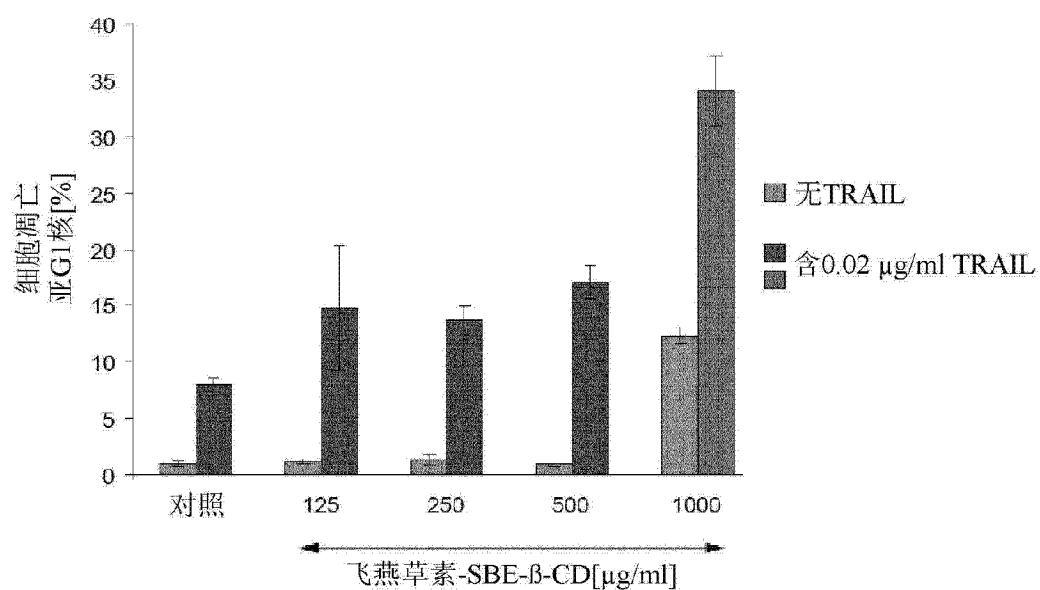


图 11a

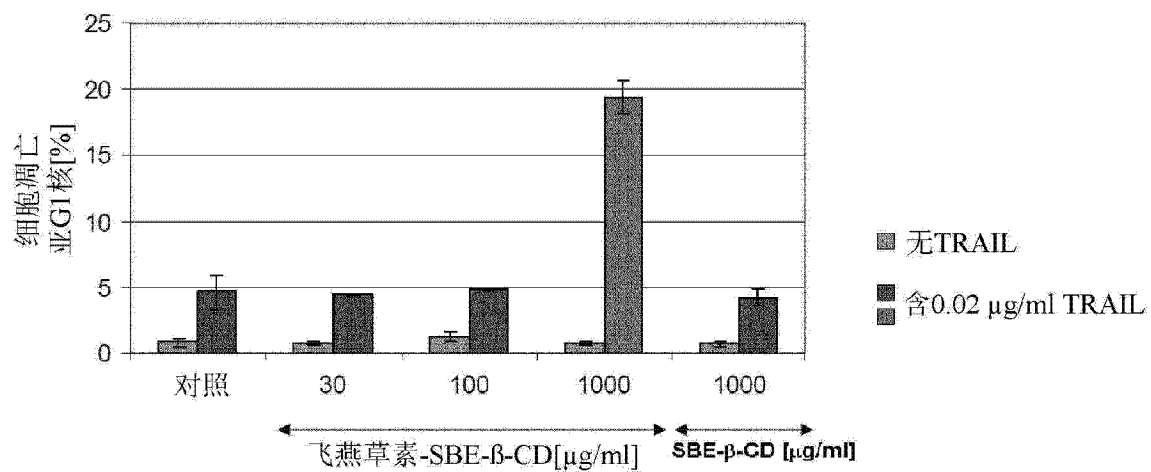


图 11b

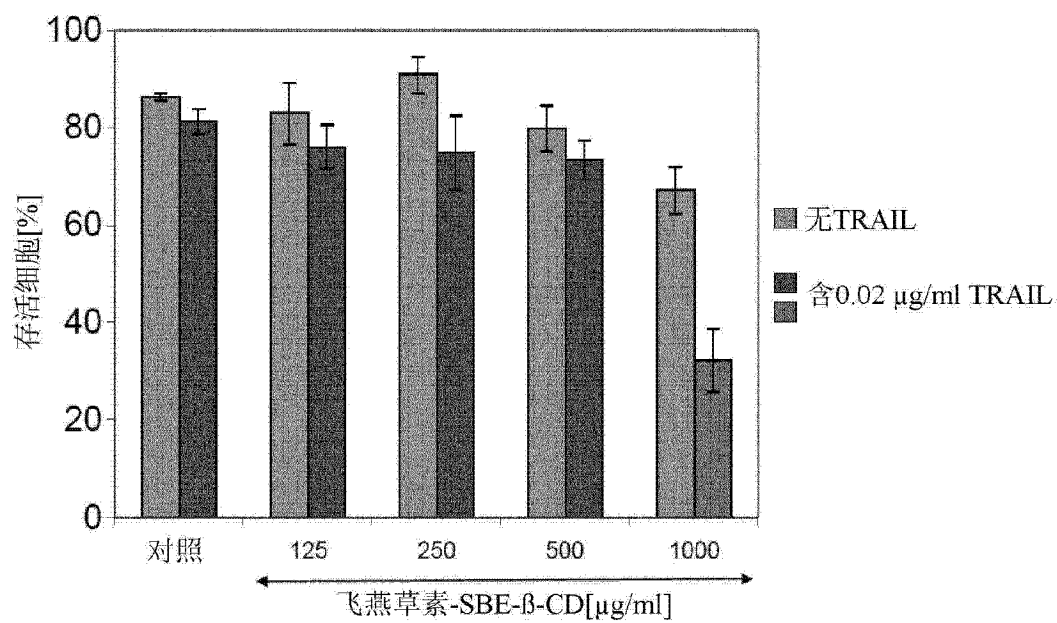


图 12a

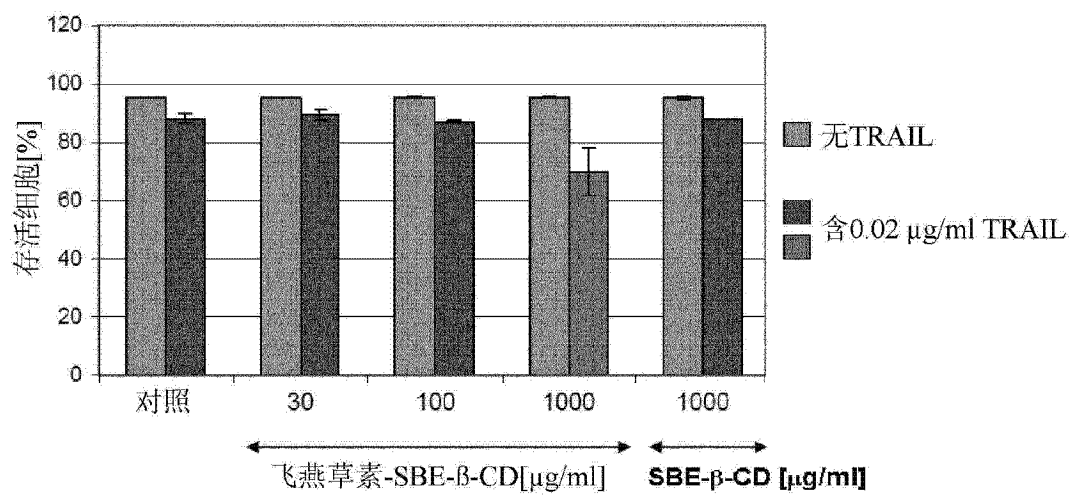


图 12b

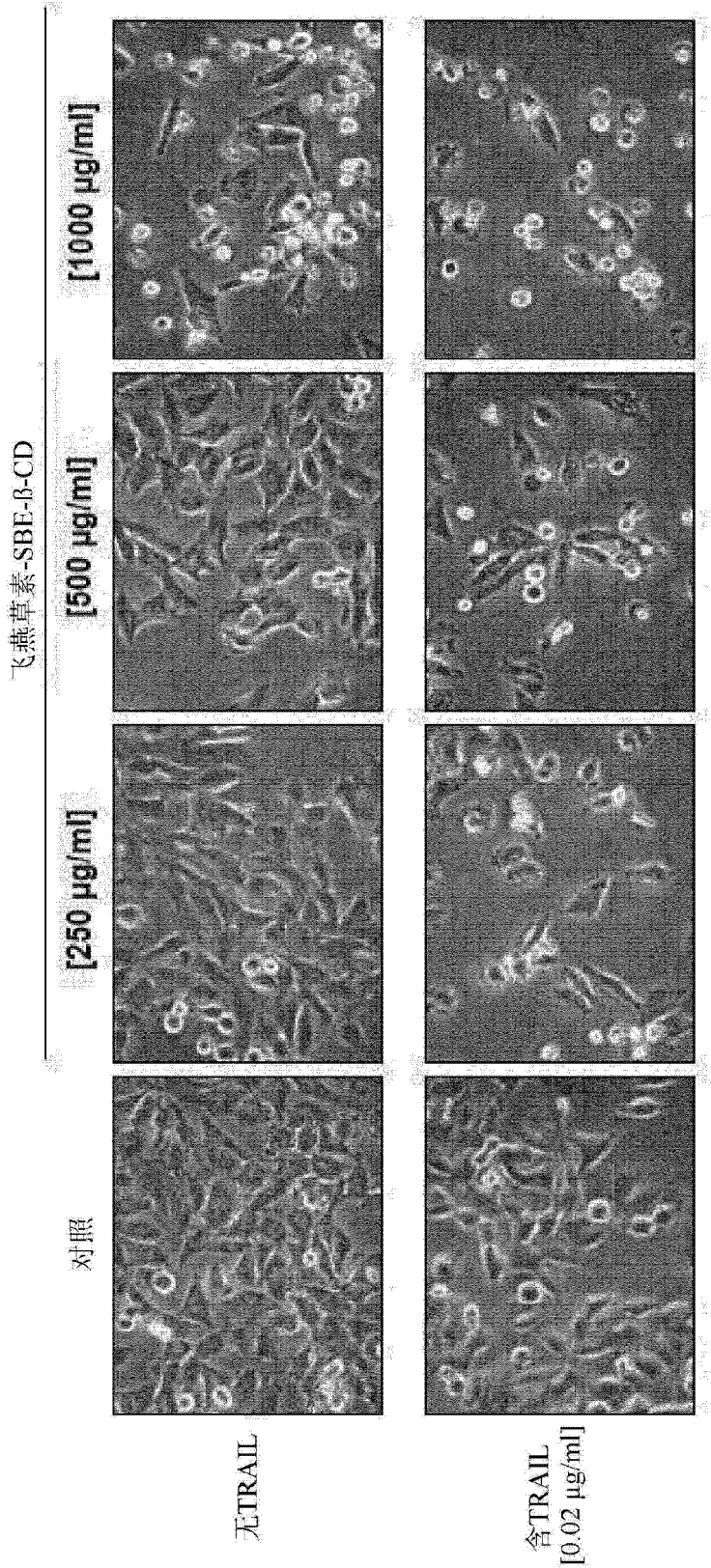


图 13

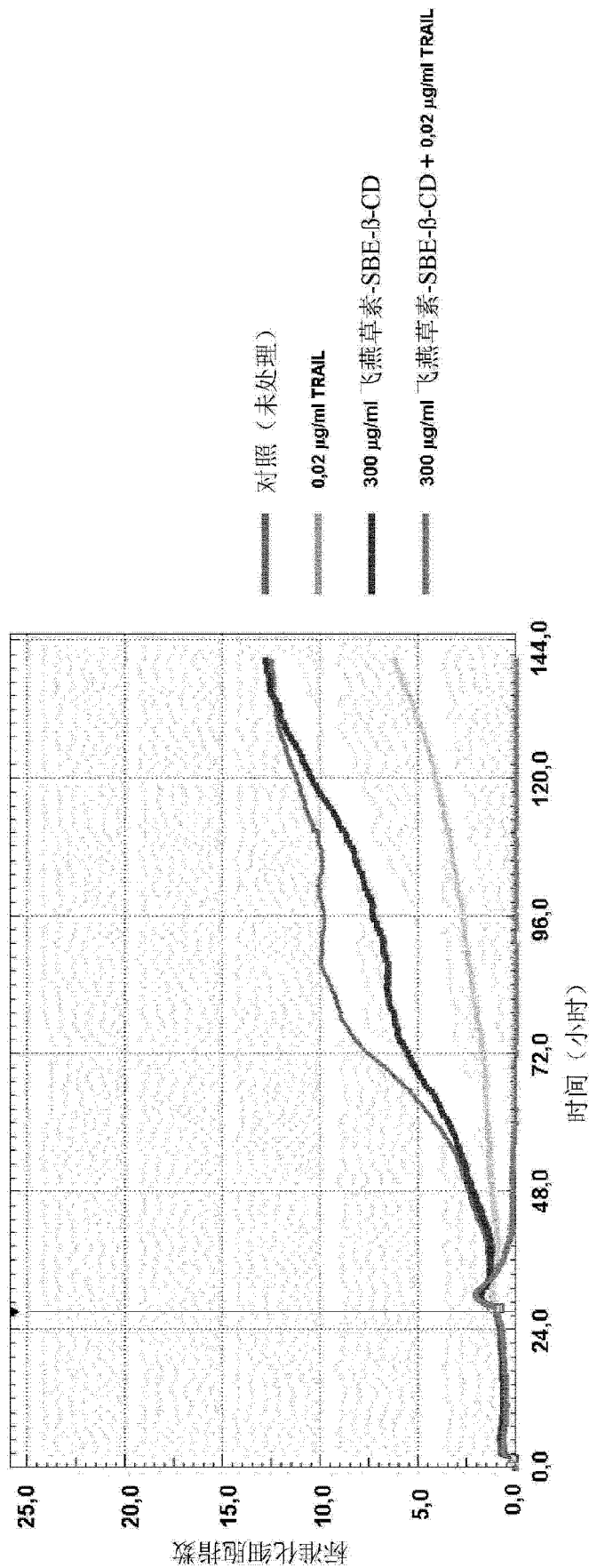


图 14

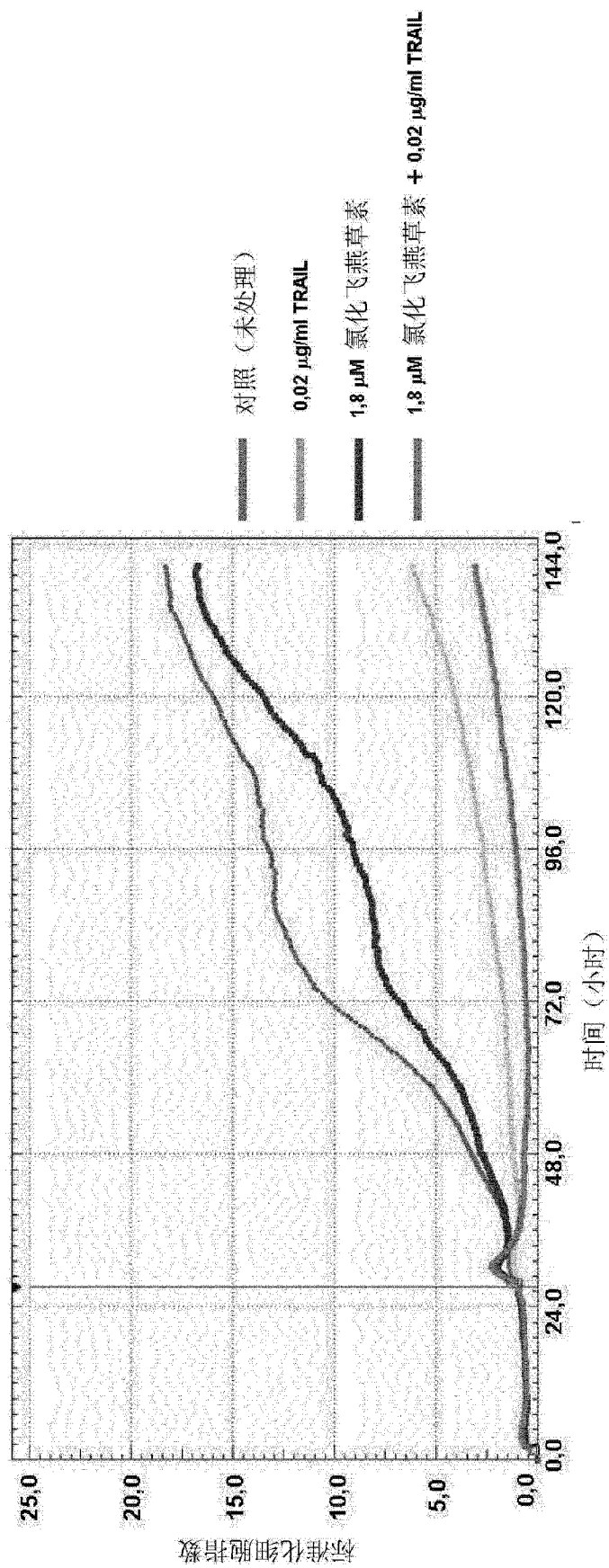


图 15

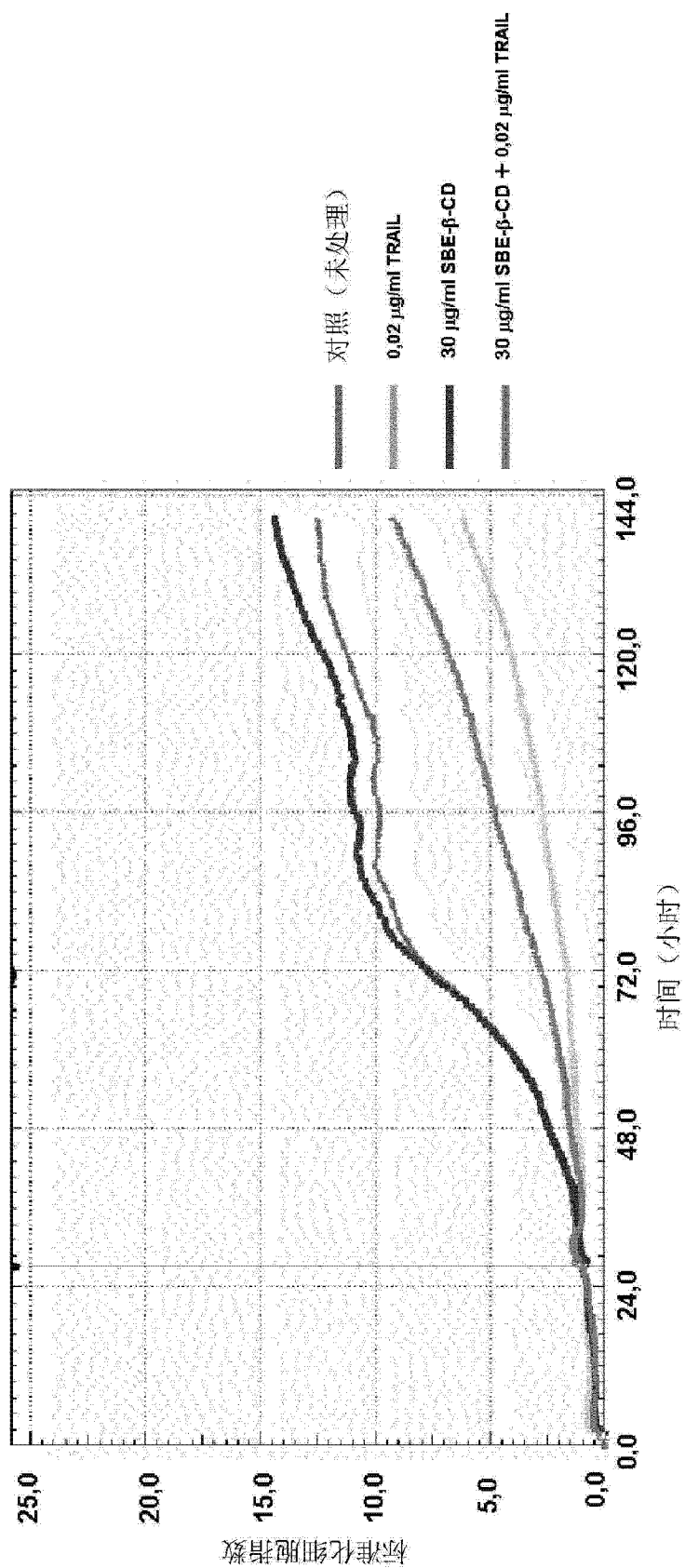


图 16

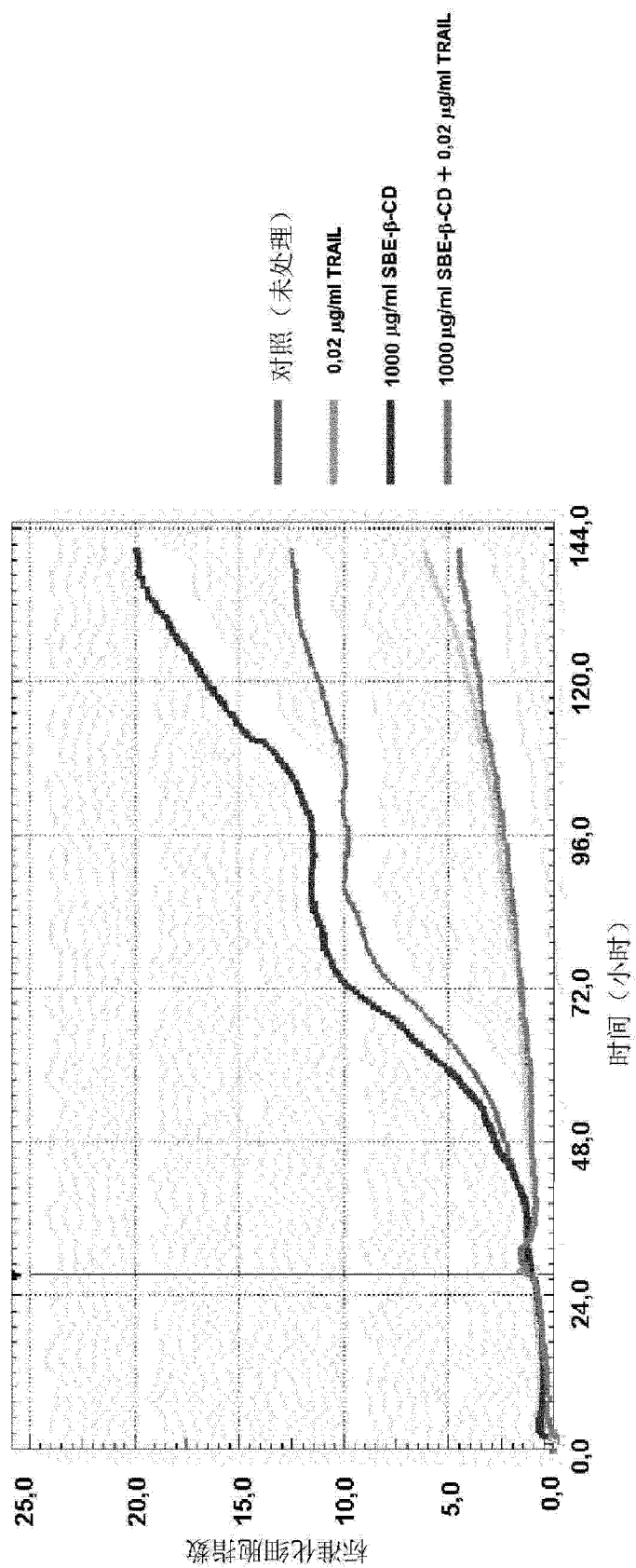


图 17

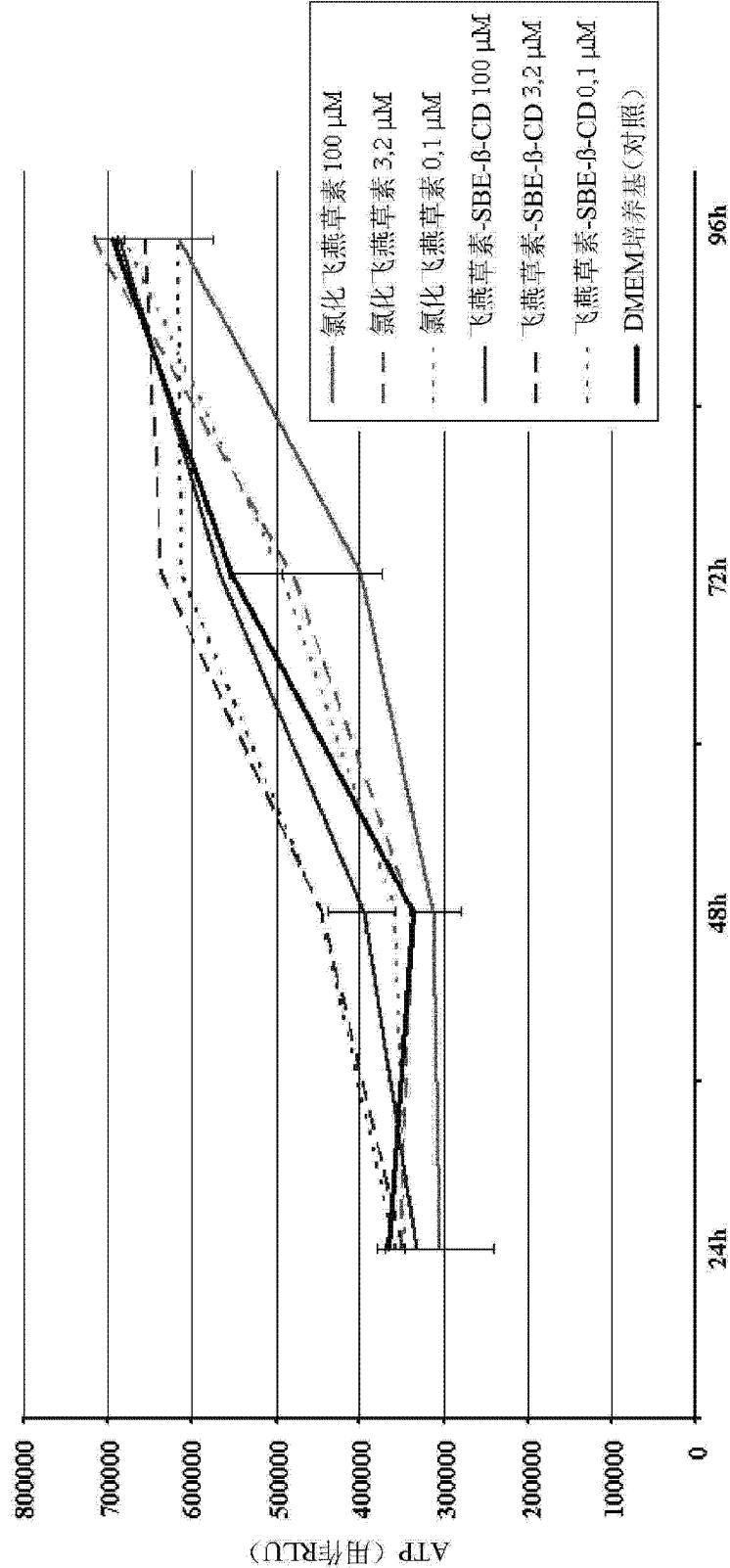


图 18

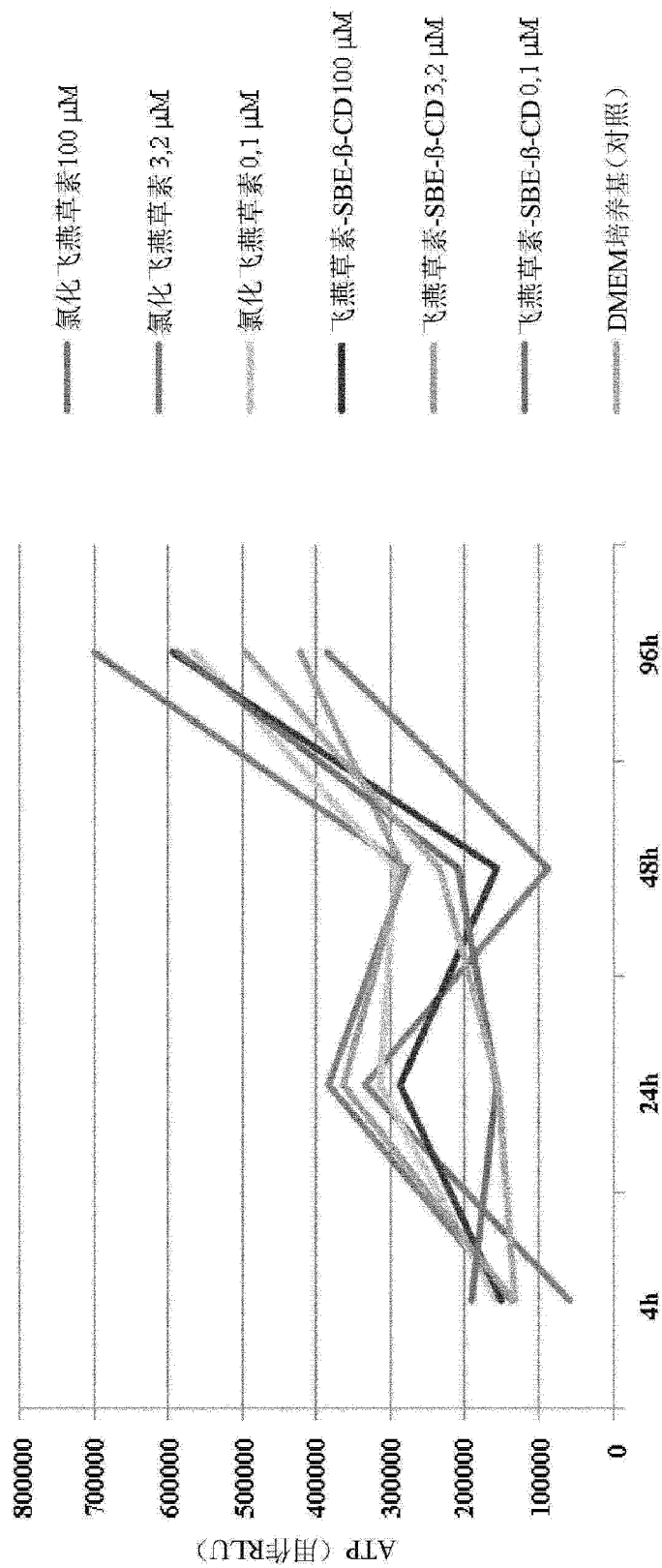


图 19