

(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
2014 年 11 月 13 日 (13.11.2014)

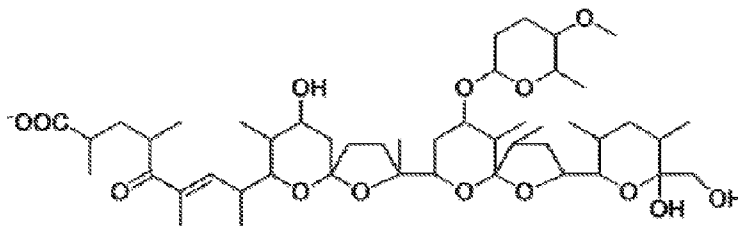
WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/180304 A 1

- (51) 国际分类号：
A61K 31/35 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号：PCT/CN20 14/076888
- (22) 国际申请日：2014 年 5 月 6 日 (06.05.2014)
- (25) 申报语言：中文
- (26) 公布语言：中文
- (30) 优先权：
2013 10163640.X 2013 年 5 月 7 日 (07.05.2013) CN
2013 10298008.6 2013 年 7 月 16 日 (16.07.2013) CN
- (71) 申请人：武汉臻智生物科技有限公司 (WUHAN J1 BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市东湖开发区高新大道 666 号武汉生物技术研究院研发楼 B5 栋 Hubei 430075 (CN)。
- (72) 发明人：刘天罡 (LIU, Tiangang); 中国湖北省武汉市东湖开发区高新大道 666 号武汉生物技术研究院研发楼 B5 栋 Hubei 430075 (CN)。
- (74) 代理人：北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROP-ERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室 Beijing 100084 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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)。
- 本国际公布：
- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) Title: USE OF JI-001 COMPOUND AS AN ANTI-CANCER DRUG

(54) 发明名称 JI-001 化合物作为抗癌药物的用途



(57) Abstract: Provided in the present invention is the use of a JI-001 compound as an anti-cancer drug, including the use of the compound shown in formula I or pharmaceutical acceptable salts thereof in the preparation of a drug for inhibiting the proliferation of tumour cells.

(57) 摘要: 提供了 JI-001 化合物作为抗癌药物的用途, 其中, 式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途, 所述药物用于抑制肿瘤细胞的增殖。



W 2014/180304 1

J1-001 化合物作为抗癌药物的用途

优先权信息

本申请请求 2013 年 5 月 7 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为
 5 2013 10163640.X 的专利申请，以及 2013 年 7 月 16 日向中国国家知识产权局提交的、
 专利申请号为 2013 10298008.6 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并
 入此处。

技术领域

10 本发明涉及生物医药领域，具体涉及 J1-001 化合物作为抗癌药物的用途。

背景技术

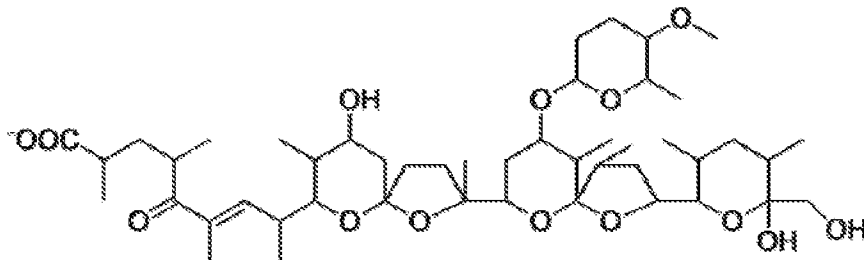
目前，癌症已经成为导致人类死亡的主要原因之一。临床多采用化疗、放射疗法及
 生物免疫治疗等方法来杀死肿瘤细胞，但无法从根本上治愈肿瘤，多数是因为肿瘤细胞
 15 的耐药性严重影响临床化疗效果（据美国癌症协会估计，90% 以上的肿瘤患者死于不同
 程度的肿瘤细胞耐药性），且由于肿瘤干细胞的存在，使得大多数癌症患者容易复发癌
 症或肿瘤细胞发生迁移。因此，寻找到一种高效低毒的、耐药肿瘤细胞敏感、可抑制肿
 瘤干细胞增殖的药物，对癌症的治疗具有十分积极的作用。

20 发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术问题之一或至少提供一种有用的商业
 选择。

为此，本发明的目的在于提出 J1-001 化合物在制备药物中的用途，所述 J1-001 化
 合物用于抑制肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞增殖进而可以用于治疗癌症。

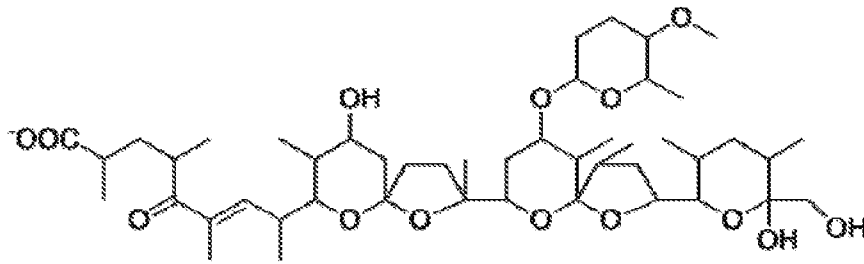
25 本发明是基于发明人的下列发现而完成的：式 I 所示化合物



式 I

或其药学上可以接受的盐（在本文中将式 I 所示化合物及其药学上可以接受的盐统
 称为 J1-001 化合物）可单独用于抑制恶性肿瘤细胞、耐药性恶性肿瘤细胞和/或肿瘤干
 30 细胞的增殖。

在本发明的第一方面，本发明提出了式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐在制备
 药物中的用途，所述药物用于抑制肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增殖，



式 1。

需要说明的是，肿瘤干细胞通过自我更新和无限增殖维持着肿瘤细胞群的生命力；肿瘤干细胞的运动和迁徙能力又使肿瘤细胞的转移成为可能；肿瘤干细胞可以长时间处于休眠状态并具有多种耐药分子而对杀伤肿瘤细胞的外界理化因素不敏感，因此肿瘤往往在常规肿瘤治疗方法消灭大部分普通肿瘤细胞后一段时间复发。由此，需要研发出可抑制肿瘤干细胞增殖的药物。而根据本发明的实施例，发明人发现，式 1 所示化合物或其药学上可接受的盐可单独用于抑制肿瘤干细胞的增殖。发明人意外发现，将乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞与 J1-001 化合物尤其是 J1-001 钠盐在体外混合培养。利用 MTT 比色法，计算 J1-001 钠盐对肿瘤干细胞增殖的抑制率及 IC_{50} （半数抑制率），发明人发现，J1-001 钠盐对乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞有抑制作用。由此，可以得出 J1-001 钠盐在此条件下肿瘤干细胞尤其是对乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞有较好的抑制作用。

根据本发明的实施例，发明人发现，式 1 所示化合物或其药学上可接受的盐可单独用于抑制恶性肿瘤细胞和耐药性恶性肿瘤细胞的增殖。发明人意外发现通过将 J1-001 化合物与恶性肿瘤细胞、耐药性恶性肿瘤细胞混合培养，J1-001 化合物可以有效抑制恶性肿瘤细胞、耐药性恶性肿瘤细胞增殖。由此，式 1 所示化合物或其药学上可接受的盐可用于治疗恶性肿瘤细胞、耐药性恶性肿瘤细胞，从而为治疗这类疾病提供了一种新的药物。

这里所使用的术语“药学上可接受的盐”意指药物化学领域常用的盐形式，即实质上是无毒的并且能提供所需药代动力学特性、可口服、吸收、分布、代谢或排泄作用的盐形式。根据本发明的实施例，该“药学上可接受的盐”可以为常见的酸加成盐或碱加成盐，例如钾盐或钠盐。

根据本发明上述实施例，本发明还可以具有如下附加的技术特征：

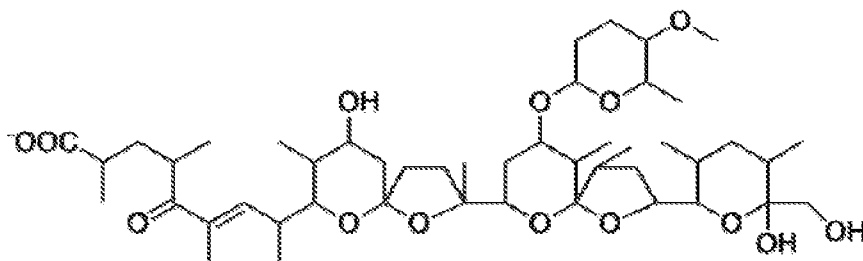
根据本发明的实施例，所述肿瘤细胞为恶性肿瘤细胞和耐药性恶性肿瘤细胞。根据本发明的实施例，所述恶性肿瘤细胞为选自乳腺癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞、胃癌细胞及卵巢癌细胞至少一种。发明人通过研究 J1-001 化合物的用途，意外发现其能够抑制恶性肿瘤细胞的增殖，因此对其进一步研究发现，其对乳腺癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞、胃癌细胞及卵巢癌细胞的增殖均具有抑制作用。根据本发明的具体实施例，发明人将 MCF-7（人乳腺癌细胞）、Bel-7402（人肝癌细胞）、HepG2（人肝癌细胞）、NCI-H460（人肺癌细胞）、SGC-7901（人胃癌细胞）及 HO-8910（人卵巢癌细胞）分别与 J1-001 化合物尤其是其钠盐在体外混合培养。利用 MTT 比色法，计算 J1-001 化合物对肿瘤细胞增殖的抑制率及 IC_{50} （半数抑制率），发明人发现，J1-001 化合物对 MCF-7、Bel-7402、

HepG2、NCI-H460、SGC-7901 及 HO-8910 有不同程度的抑制作用，由此可以得出 J1-001 化合物对以上肿瘤细胞均有较好的抑制作用。发明人通过对实施例结果分析还惊奇地发现，J1-001 化合物对卵巢癌细胞的增殖抑制作用明显强于紫杉醇，由此，进一步说明了 J1-001 化合物在此条件下用于治疗恶性肿瘤药物的优越性。

5 根据本发明的实施例，所述耐药性恶性肿瘤细胞为选自 Bel-7402 肝癌耐药细胞和 MCF-7/TAX 乳腺癌耐药细胞。发明人通过研究 J1-001 化合物的用途，意外发现其能够抑制耐药性恶性肿瘤细胞的增殖。根据本发明的具体实施例，发明人将 Bel-7402/5-Fu (人肝癌耐药细胞) 或 MCF-7/TAX (乳腺癌耐药细胞) 与 J1-001 化合物尤其是 J1-001 钠盐在体外混合培养。利用 MTT 比色法，计算 J1-001 钠盐对肿瘤细胞增殖的抑制率及 IC_{50} (半数抑制率)，发明人发现，J1-001 钠盐对人肝癌耐药细胞和人乳腺癌耐药细胞有抑制作用。由此，可以得出 J1-001 钠盐在此条件下对耐药性恶性肿瘤细胞有较好的抑制作用。

15 根据本发明的实施例，所述肿瘤干细胞为选自 MCF-7 (CD24- CD44⁺) 乳腺癌干细胞。发明人通过研究 J1-001 化合物的用途，意外发现其能够抑制肿瘤干细胞的增殖。根据本发明的具体实施例，发明人将 MCF-7 (CD24—CD44⁺) 乳腺癌干细胞与 J1-001 化合物尤其是 J1-001 钠盐在体外混合培养。利用 MTT 比色法，计算 J1-001 钠盐对肿瘤细胞增殖的抑制率及 IC_{50} (半数抑制率)，发明人发现，J1-001 钠盐对 MCF-7 (CD24—CD44⁺) 乳腺癌干细胞有抑制作用。由此，可以得出 J1-001 钠盐在此条件下对乳腺癌干细胞细胞有较好的抑制作用。

20 由此，在本发明的第二方面，本发明提出了式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途，所述药物用于治疗癌症



式 I。

根据本发明的实施例，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

25 根据本发明的实施例，所述癌症为选自乳腺癌、肝癌、肺癌、胃癌及卵巢癌至少一种。

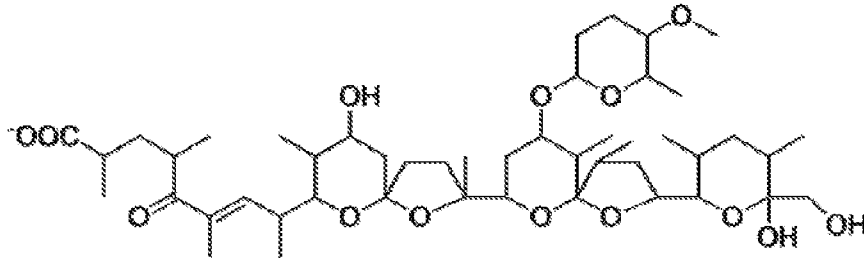
30 目前式 I 或其药学上可接受的盐在制备抗癌药物中的用途在世界范围内未见文献报道。根据本发明的具体实施例，发明人意外地发现式 I 或其药学上可接受的盐具有抑制恶性肿瘤细胞和耐药性恶性肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增殖的作用，进一步地，发明人发现，将式 I 或其药学上可接受的盐用于作为治疗抗癌药物中的活性成分制备抗癌药物，发现其抗癌效果显著。由此说明式 I 或其药学上可接受的盐可以作为治疗癌症药物的活性成分。根据本发明的一个实施例，上述包含有式 I 或其药学上可接受的盐的

44

癌药物可以用于治疗或者预防乳腺癌、肝癌、肺癌、胃癌及卵巢癌。由此本发明提供了式 I 或其药学上可接受的盐的新用途，从而为治疗癌症方面提供了一类新的抗癌药物。根据本发明的具体实施例，式 I 或其药学上可接受的盐可以作为抗癌药物中的活性成分，尤其对耐药性肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增殖具有显著抑制作用，因而能够从根本

5 基本上达到预防和治疗癌症的目的。

进一步，在本发明的第三方面，根据本发明的实施例，本发明提出了一种药物组合物，其包括：式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐（统称为 J1-001 化合物）；以及药学上可以接受的赋形剂，



式 I

10

如前所述，利用该药物组合物能够有效地抑制肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增殖，以及用于治疗癌症。

15

另外，根据本发明的实施例，该式 I 所示化合物可以通过化学合成或者生物合成例如通过微生物发酵的方法制备的。根据本发明的实施例，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

在这里所使用的术语“药学上可接受的赋形剂”可以包括任何药学上可以使用的常见赋形剂，例如包括但不限于粘合剂、填料、涂膜聚合物、增塑剂、助流剂、崩解剂、润滑剂等。

20

根据本发明的具体实施例，该药物组合物可以进一步包含少量辅助物质，例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液，所述辅助物质可以增强药物组合物的保存期限或效力。通过本发明的实施例，递送该药物组合物的方式不受任何限制，可以采用已知的各种递送系统，只要可以有效地施用 J1-001 化合物或 J1-001 化合物与其他药物的组合，用于预防、管理、治疗或改善病症或其一种或多种症状，例如癌症。

25

根据本发明的实施例，所述药物组合物可以呈经胃肠道给药剂型和非经肠道给药剂型。根据本发明的实施例，所述经胃肠道给药剂型为所述药物组合物经口服后进入胃肠道，在给药部位起局部作用或经吸收而发挥功效的制剂。根据本发明的实施例，所述非经胃肠道给药剂型为所述药物组合物除口服给药途径以外在给药部位起局部作用或被吸收后发挥功效的制剂。由此，可以进一步保证 J1-001 化合物或其药学上可接受的盐以多种形式作用于恶性肿瘤细胞、耐药性恶性肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞，以多种途

30 径提高治疗恶性肿瘤细胞、耐药性恶性肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的效果。

根据本发明的实施例，所述 J1-001 化合物是一种酸性酯溶性聚醚类抗生素，对革兰氏阳性、阴性细菌均有抑制作用；具有很强的抗球虫活性，现多用于防治蛋鸡和肉

的球虫病；同时，经毒性和三致试验结果表明该抗生素安全、无副作用。根据本发明的实施例，获得 J1-001 化合物的方式并不受特别限制，根据本发明的具体实施例，J1-001 化合物可以由含有编码合成该化合物的基因簇的微生物发酵生产，也可以由化学合成或化学半合成的方式生产得到。因此，利用 J1-001 化合物制备治疗恶性肿瘤细胞及耐药性恶性肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞具有很好工业实用性。另一方面，J1-001 化合物作为抗生素长期应用于鸡球虫防治，同时，该抗生素毒性和三致试验结果表明其安全、无副作用。因此，J1-001 化合物在制备药物用途上具有可操作性、适用性。由上所述，J1-001 化合物用于制备治疗恶性肿瘤药物具有很大市场发展前景。

另外，根据本发明的实施例，发明人意外发现，所述 J1-001 化合物对耐药性肿瘤细胞的抑制增殖作用明显强于紫杉醇。在现代医疗技术领域，已有的抗癌药物在一定时期内对癌症的治疗具有较好疗效，但由于治疗癌症周期往往较长，所以长期使用某一种抗癌药物容易产生耐药性。由此，需要研发出更多治疗癌症的药物，尤其是对已经产生耐药性的肿瘤细胞具有明显抑制作用的药物。发明人惊奇地发现，J1-001 化合物能有效抑制多种人类恶性肿瘤细胞，特别是耐药性肿瘤细胞，且其效果优于现有多种化疗药物。由此，进一步提高了 J1-001 化合物作为治疗恶性肿瘤药物的优越性。

另外，根据本发明的实施例，发明人惊奇地发现，J1-001 化合物可以抑制肿瘤干细胞的增殖，并且，其效果优于现有的多种化疗药物，例如：J1-001 化合物对肿瘤干细胞的抑制增殖作用明显强于阿霉素，即 J1-001 化合物作为治疗恶性肿瘤药物的优越性显著。

另外，根据本发明的实施例，施用所制备的药物的手段也不受特别限制，例如肠胃外施用（例如，皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下），硬膜外施用，瘤内施用和粘膜施用（例如，鼻内和经口途径）。在具体实施方案中，本发明的药物可以通过肌内、静脉内、瘤内、经口、鼻内、肺、或皮下施用。J1-001 化合物可以通过任何方便的途径施用，例如通过输注或单次快速静脉注射，通过经由上皮或粘膜皮肤衬里（例如，口腔粘膜、直肠和肠粘膜等）吸收，通过抗体蛋白特异性治疗等，且可以连同其他生物学活性剂一起施用。根据本发明的实施例，J1-001 化合物的施用可以是全身或局部的施用。

在具体实施方案中，可能需要使本发明的治疗剂局部施用在需要治疗的区域；这可以通过例如但不限于局部输注、注射、或通过植入物来完成，所述植入物为多孔或无孔材料，包括膜和基质，例如硅橡胶膜、聚合物、纤维基质（例如，Tissuel®）、或胶原基质。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

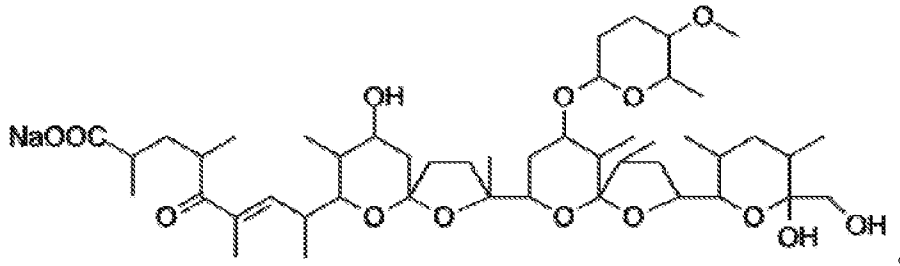
附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 显示了在 J1-001 钠盐作用下各种细胞株 IC_{50} 的检测结果；
 图 2 显示了 J1-001 钠盐对小鼠体内肿瘤作用的结果；以及
 图 3 显示了 J1-001 钠盐对小鼠体内乳腺癌肿瘤细胞作用的结果。

5 发明详细描述

下面参考具体实施例，对本发明进行描述，需要说明的是，这些实施例仅仅是描述性的，而不以任何方式限制本发明。并且在下列的实施例中采用的 J1-001 钠盐具有下列结构式



10 实施例 1: J1-001 钠盐与紫杉醇对 HO-8910 细胞增殖的抑制作用

分别取对数生长期的 HO-8910 (卵巢癌细胞)，采用 0.25%-EDTA 胰蛋白酶消化后制成浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液。将该细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 200 μ L；空白组为每孔加入 200 μ L 不含细胞的培养基的组。将上述接种了细胞的 96 孔细胞培养板放入细胞培养箱中孵育过夜，使细胞贴壁。样品 J1-001 钠盐和现有抗癌药物紫杉醇分别用 DMSO 溶解，配制为 100mmol/L 的储存液，然后使用前用相应培养基稀释成不同浓度 (DMSO 终浓度小于 0.1%) 的样品溶液。在不同的实验组中分别加入 200 μ L 不同浓度的样品溶液 (0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L) 或紫杉醇溶液 (0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L)；对照组为往贴壁细胞中加入 200 μ L 培养基的组；空白组为无细胞只加 200 μ L 培养基的组。然后将此加过不同浓度药物溶液 (0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L 样品溶液或紫杉醇溶液) 的 96 孔细胞培养板在细胞培养箱中培养 48 小时后，在取出的上述 96 孔细胞培养板的每个孔中加入 20 μ L 0.5mg/mL 的噻唑蓝 (MTT)，然后继续放入细胞培养箱中培养。2 小时后，将与 MTT 共同孵育的 96 孔细胞培养板在高速离心机中以 2000 rpm 离心 10 分钟。离心后，去除 96 孔细胞培养板上清液，然后通过向每孔加 200 μ L 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解在 96 孔板底部生成的甲臞蓝色结晶。该加过 DMSO 的 96 孔细胞培养板在平板振荡器上振荡 5 分钟后，利用酶联免疫检测仪，在 570 nm 波长下检测 OD 值 (参比波长为 490 nm)，计算抑制率及 IC_{50} (半数抑制率)。

$$\text{抑制率 \%} = \frac{(A - A_0)}{(A - A_1)} \times 100\%$$

式中：A 代表对照组的 OD 值； A_0 代表样品组的 OD 值； A_1 代表空白组的 OD 值。

表 1. J1-001 钠盐，紫杉醇 HO-8910 的 IC_{50} 值

受试物	对 HO-8910 的 IC_{50} (μ mol/L)
-----	--------------------------------------

J1-001 钠盐	1.43
紫杉醇	7.41

由表 1 所示的结果可知，与紫杉醇相比，J1-001 钠盐对 HO-8910 细胞体外增殖均有更显著的抑制作用，其对 HO-8910 细胞株的 IC_{50} 值较紫杉醇降低了 5.18 倍。说明 J1-001 钠盐对 HO-8910 肿瘤细胞增殖有较强的抑制作用，其抑制作用明显强于紫杉醇的抑制作用。

5 实施例 2: J1-001 钠盐对体外各种细胞株增殖的抑制作用

实验方法同实施例 1，所不同的是，所选的细胞株为 MCF-7(人乳腺癌细胞)、Bel-7402(人肝癌细胞)、HepG2(人肝癌细胞)、NCI-H460(人肺癌细胞)、SGC-7901(人胃癌细胞)和 HO-8910(人卵巢癌细胞)。

10 由图 1 所示的结果可知，J1-001 钠盐对 MCF-8、Bel-7402、HepG2、NCI-H460、SGC-7901 及 HO-8910 细胞体外增殖有不同程度的抑制作用，其中，MCF-7 对 J1-001 钠盐最为敏感，表现为最低 IC_{50} 值。由此可知，J1-001 钠盐对以上肿瘤细胞的增殖均有较好的抑制作用。

实施例 3: J1-001 钠盐对体外耐药肿瘤细胞增殖的抑制作用

15 实验方法同实施例 1，所不同的是，所选细胞为 Bel-7402(人肝癌细胞); Bel-7402/5-Fu(人肝癌耐药细胞)。

表 2. J1-001 钠盐、紫杉醇与阿霉素对 Bel-7402 及 Bel-7402/5-Fu 的 IC_{50} 值

受试物	对 Bel-7402 的 IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	对 Bel-7402/5-Fu 的 IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
J1-001 钠盐	6.12	6.93
紫杉醇	2.08	146
阿霉素	25.46	184

20 由表 2 所示的实验结果可知，J1-001 钠盐对耐药 Bel-7402/5-Fu 与非耐药肿瘤细胞株 Bel-7402 的细胞增殖均有较好抑制作用，对非耐药肿瘤细胞株 Bel-7402 的抑制细胞增殖的活性与紫杉醇的抑制癌细胞增殖的活性相近，并且优于阿霉素的抑制癌细胞增殖的活性；值得一提的是，J1-001 钠盐对耐药 Bel-7402/5-Fu 肿瘤细胞株株表现为最低的 IC_{50} 值。紫杉醇、阿霉素对耐 5-Fu 的 Bel-7402 肝癌细胞株的抗瘤活性显著下降。由此，以上实验提示 J1-001 在抗肿瘤耐药性方面有独特的优势，是一个有开发前景的潜在药物。

25 实施例 4: J1-001 钠盐体内抗肿瘤作用

37°C 迅速解冻冻存的 HepG2 一支，加 RPMI1640 培养液 10mL，1000rmin⁻¹ 离心洗涤 2 次，加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37°C，5%CO₂ 的培养箱中培养，间日更换细胞培养液，细胞长至 70%-80% 满度时传代，培养 1 周后，收集细胞悬液，1000rmin⁻¹ 离心 5 min，用无血清培养液调节细胞为每 1mL 含 1×10^7 个，备用。5 周龄左右的 BABL/c 裸

鼠，3天后于腋窝皮下接种 HepG2 细胞每只 0.2mL (每 1mL 含 2×10^7 个 HepG2 细胞)。待瘤块长至一定大小后，处死荷瘤裸鼠。无菌条件下取出荷瘤鼠瘤块，接种，体内传 3 代，取瘤组织于无菌 PBS 中剪碎成 $1-3\text{mm}^3$ 小块采用插块法接种，于 30 只 6 周龄左右的裸鼠腋窝皮下接种 0.2mL，观察接种情况。肿瘤体积长至 100mm^3 左右时筛选出瘤质均一的裸鼠随机分为 2 组，分别为模型组、J1-001 组，每组 6 只，另设空白组。21 天疗程，空白、模型组给予相应体积的稀释液。每 4 天给药 1 次，共 5 次。给药时观察裸鼠的活动及死亡情况，同时测量瘤体大小，用游标卡尺测量瘤体的长径 a 及短径 b(mm)，动物死亡后取肿瘤称重。以下是具体分组及给药情况：

- 空白组：腹腔给药 (i.p.) 0.2mL/10g 稀释用液
 - 10 模型组：腹腔给药 (i.p.) 0.2mL/10g 稀释用液
 - J1-001 组：腹腔给药 (i.p.) 0.2mL/10g 0.05mg/mL 剂量为 1mg/kg
- 给药第 20 天后取血后处死动物 (取血后静置分离血清)，剥离各组瘤块并称重，摆放后拍照记录。

抑瘤率 (%) = (模型组肿瘤体积 - 实验组肿瘤体积) / 模型组肿瘤体积 $\times 100\%$ ；

15 结果：模型组、J1-001 组各死亡 2 只，同时从图 2 结果可知：经 J1-001 治疗后动物体内的肿瘤大小明显小于模型组肿瘤，经计算得到其抑瘤率为 50% 左右。该结果证明 J1-001 能够抑制体内肿瘤增长。

实施例 5 J1-001 钠盐与紫杉醇对乳腺癌 MCF-7 及其耐药株细胞增殖的抑制作用

20 37°C 迅速解冻冻存的 MCF-7 (人乳腺癌细胞)、MCF-7/TAX (人乳腺癌耐药细胞) 一支，加 1640 培养液 5mL， $1000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心洗涤 2 次，加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液， 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养，间日更换细胞培养液，细胞长至 70%-80% 满度时传代，培养 1 周后，收集细胞悬液， $1000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，用 1640 培养液调节细胞为每 1ml 含 50000 个，备用。将 MCF-7、MCF-7/TAX 细胞悬液接种于 96 孔板内，每孔 $100\mu\text{L}$ ，

25 于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。24h 后，每孔加入相应受试药物，于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。24h 后，每孔加入含 CCK-8 试剂 $10\mu\text{L}$ 培养液，于 450 nm 测定吸光度。

按以下公式计算抑制率：

$$\text{抑制率} = [(A_2 - A_3) - (A_1 - A_3)] / (A_2 - A_3) \times 100\%$$

其中：

- 30 A 1---受试药吸光度，
- A 2---模型组吸光度，
- A 3---空白组吸光度。

表 3. J1-001 钠盐、紫杉醇对 MCF-7、MCF-7/TAX 的 IC_{50} 值

受试物	对 MCF-7 的 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	对 MCF-7/TAX 的 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
-----	--	--

J1-001 钠盐	4.27	10.96
紫杉醇	42.16	3091

从表 3 结果可看出，J1-001 钠盐对 MCF-7、MCF-7/TAX 肿瘤株均有较强的抗瘤活性，且其 IC_{50} 值相近。相对于紫杉醇而言，J1-001 钠盐对 MCF-7 及 MCF-7/TAX 均表现为更低的 IC_{50} 。对 MCF-7 肿瘤细胞株，J1-001 钠盐的 IC_{50} 值与紫杉醇相差约 10 倍；对 MCF-7/TAX 肿瘤细胞株，其 IC_{50} 值与紫杉醇相差约 282 倍，提示 J1-001 钠盐在抗乳腺癌方面有独特的优势。

实施例 6 J1-001 钠盐体内抗乳腺癌肿瘤细胞作用

37°C 迅速解冻冻存的 MCF-7 一支，加 RPMI1640 培养液 10mL，1000r·min⁻¹ 离心洗涤 2 次，加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37°C，5%CO₂ 的培养箱中培养，间日更换细胞培养液，细胞长至 70%-80% 满度时传代，培养 1 周后，收集细胞悬液，1000r·min⁻¹ 离心 5 min，用无血清培养液调节细胞为每 1ml 含 1×10^7 个，备用。

5 周龄左右的 BABL/c 裸鼠，3 天后于腋窝皮下接种 MCF-7 细胞每只 0.2mL（每 1ml 含 2×10^7 个 MCF-7 细胞）。待瘤块长至一定大小后，处死荷瘤裸鼠。无菌条件下取出荷瘤鼠瘤块，接种，体内传 3 代，取瘤组织于无菌 PBS 中剪碎成 1-3mm³ 小块采用插块法接种，于 70 只 6 周龄左右的裸鼠腋窝皮下接种 0.2 mL，观察接种情况。

肿瘤体积长至 100 mm³ 左右时筛选出瘤质均一的裸鼠随机分为 5 组，分别为荷瘤生理盐水组、荷瘤紫杉醇组（10mg/kg）、荷瘤 J1-001 钠盐高剂量组（1mg/kg）、荷瘤 J1-001 钠盐低剂量组（0.5mg/kg），每组 6 只，另设空白组。21 天疗程，空白、模型组给予相应体积的稀释液。每 3 天给药 1 次，共 5 次，20 天后取血处理动物。以下是具体分组及给药情况：

空白组：腹腔给药（i.p.）0.2ml/10g 稀释用液，

模型组：腹腔给药（i.p.）0.2ml/10g 稀释用液，

紫杉醇组：腹腔给药（i.p.）0.2ml/10g 0.5mg/ml 剂量为 10mg/kg，

J1-001 钠盐高剂量组：腹腔给药（i.p.）0.2ml/10g 0.05mg/ml 剂量为 1mg/kg，

J1-001 钠盐低剂量组：腹腔给药（i.p.）0.2ml/10g 0.025mg/ml 剂量为 0.5mg/kg。

25 给药第 21 天，取血，分离血清备用。处死动物，取各组瘤块并称重，摆放后拍照记录。

试验结果：如图 3 所示，荷瘤模型组肿瘤体积较大，给药组肿瘤体积均有所减小，其中以紫杉醇和 J1-001 高剂量组作用明显。由表 4 可见，与模型组相比，各给药组瘤重均显著减小， $P < 0.05$ ，结果证明 J1-001 钠盐能够抑制体内乳腺癌细胞肿瘤增长。

表 4. J1-001 钠盐、紫杉醇对裸鼠肿瘤重量的影响

组别	测试数量(只)	剂量 (mg/kg)	平均瘤重 (g)
模型组	4	—	1.14±0.42
紫杉醇组	5	10	0.34±0.2

J1-001 钠盐高剂量组	4	1	0.35 ± 0.05
J1-001 钠盐低剂量组	5	0.5	0.40 ± 0.19

实施例 7 J1-001 钠盐对乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞增殖的抑制作用

取对数生长期的 MCF-7 细胞采用 0.25%-EDTA 胰蛋白酶消化后制成浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液，500 g 离心 10 min，将培养液更换为悬浮培养液，取 1 mL MCF-7 细胞悬液，接入 75 cm^2 的培养瓶中，再加入 9 mL 新鲜悬浮培养液，置培养箱中培养。待细胞增殖两天后，取瓶内细胞悬液 500 g 离心 10 min，以新鲜悬浮培养液重悬，反复吹打为单细胞悬液后计数，以 1×10^6 个/mL 细胞密度接种到新的培养瓶中。

通过流式细胞仪检测细胞表面分子标志 (CD24⁺和 CD44⁺) 来鉴定肿瘤干细胞亚群。根据 Al-Hajj 等的实验方法 (可参照 :Al-Hajj M 等, 致瘤性乳腺癌细胞的预鉴定 (Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells), Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100(7): 3983-8.，通过参照将其全文并入本文)，利用流式细胞仪检测细胞中 CD24—CD44⁺ 细胞的含量。MCF-7 细胞以悬浮培养液培养 7 周取细胞悬液以胰酶-EDTA 消化并机械吹打成单细胞悬液，调整细胞密度为 1×10^8 个/mL，分为细胞对照组 (Control)、CD24 单染组 (CD24)、CD44 单染组 (CD44) 及双染组 (TEST)，按下表分别加入相应抗体溶液进行标记，置 4℃ 避光 20 min 后用 PBS 液洗 2 遍，将细胞重悬后上流式细胞仪分选 CD24⁺CD44⁺ 表型的细胞。

将分选得到的 MCF-7 细胞 (CD24—CD44⁺) 500 g 离心 10 min，更换新鲜悬浮培养基，调整细胞密度为 5×10^4 个/mL；取对数生长期的 MCF-7 贴壁细胞采用 0.25%-EDTA 胰蛋白酶消化后制成浓度为 5×10^5 个/mL 的细胞悬液，将以上两种细胞悬液分别接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 200 μL。试验前将各孔细胞分为空白组、对照组及给药组，其中空白组为无细胞只加培养基的组，对照组为往细胞中加入培养基的组，而给药组为往细胞中加入不同浓度受试药物，试验中选择阿霉素作为已上市抗肿瘤药物的对照，见下表 5。

表 5. 各受试药物的梯度浓度配制

受试药物	配制浓度梯度 (μmol/L)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
J1-001 钠盐	0.08	0.16	0.32	0.63	1.25	2.5	5.0	10
阿霉素	1.25	2.5	5.0	10	20	40	80	160

将 96 孔细胞培养板在细胞培养箱中培养 48 小时后取出，每个孔中加入 20 μL 0.5mg/mL 的噻唑蓝 (MTT)，继续放入细胞培养箱中培养 2 小时，再将 96 孔细胞培养板在高速离心机中以 2000 rpm 离心 10 分钟。离心后，去除 96 孔细胞培养板中上清液，然后向每孔加 200 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解在 96 孔板底部生成的甲臞蓝色结晶，利用酶联免疫检测仪，在 570 nm 波长下检测 OD 值 (参比波长为 490 nm)，计算抑制率并得到 IC₅₀ (半数抑制率)，结果见表 6。

$$\text{抑制率 \%} = (A-A_0) / (A-A_1) \times 100\%$$

式中：A 代表对照组的 OD 值；A₀代表样品组的 OD 值；A₁代表空白组的 OD 值。

表 6 受试药物对 MCF-7 (CD24⁻CD44⁺) 细胞的 IC₅₀

受试药物	对 MCF-7 (CD24 ⁻ CD44 ⁺) 细胞的 IC ₅₀ (μmol/L)
J1-001 钠盐	5.2 ± 0.6
阿霉素	70.2 ± 8.4

由表 6 数据可知 J1-001 钠盐对乳腺癌细胞干细胞表现出更低 IC₅₀，说明 J1-001 对肿瘤
5 干细胞增殖有明显抑制作用。

工业实用性

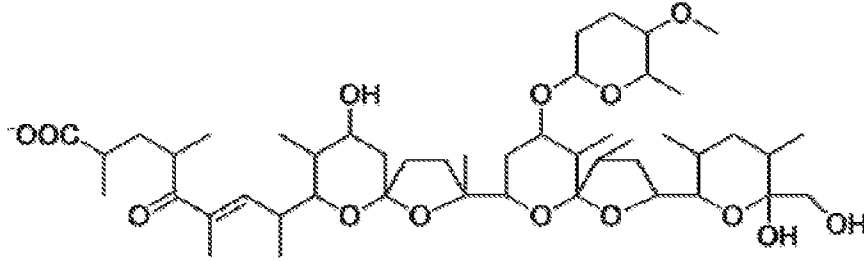
本发明的 J1-001 化合物作为抗癌药物的用途，具体为：式 I 所示化合物或其药学上可
接受的盐在制备药物中的用途，所述药物用于抑制肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增殖，即式
10 I 所示化合物或其药学上可接受的盐能够有效用于制备抑制肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增
殖的药物。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已
经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范
15 围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示
例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结
构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语
的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或
20 者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1、式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途，所述药物用于抑制肿瘤细胞和/或肿瘤干细胞的增殖



5

式 I。

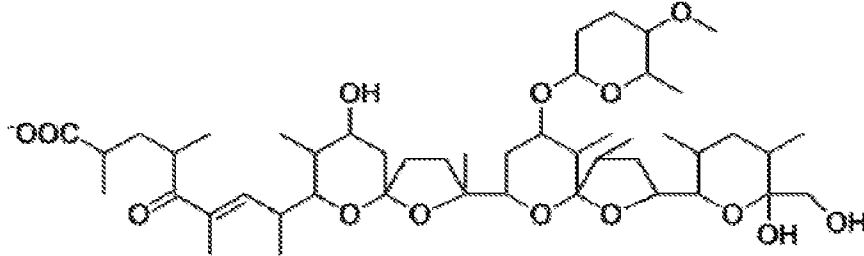
2、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述肿瘤细胞为恶性肿瘤细胞和耐药性恶性肿瘤细胞。

3、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

10

4、根据权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述恶性肿瘤细胞为选自乳腺癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞、胃癌细胞及卵巢癌细胞至少一种。

5、式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途，所述药物用于治疗癌症



15

式 I。

6、根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

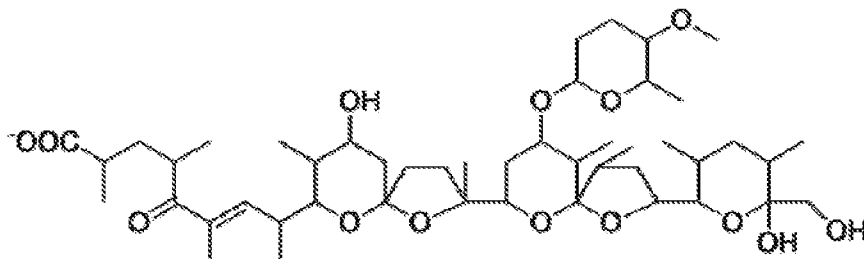
7、根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述癌症为选自乳腺癌、肝癌、肺癌、胃癌及卵巢癌的至少一种。

8、一种药物组合物，其特征在于，包括：

20

式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐；

以及药学上可以接受的赋形剂，



式 I ,

任选地,所述式 I 所示化合物是通过微生物发酵、化学合成或化学半合成制备的。

9、根据权利要求 8 所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物呈经胃肠道给药剂型和非经胃肠道给药剂型。

5 10、根据权利要求 8 所述的药物组合物,其特征在于,所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

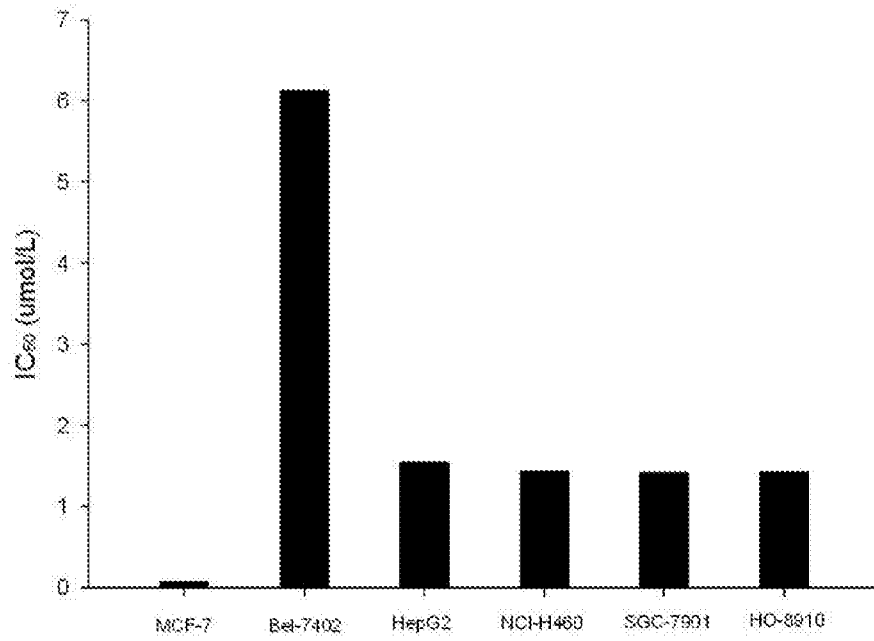


图 1

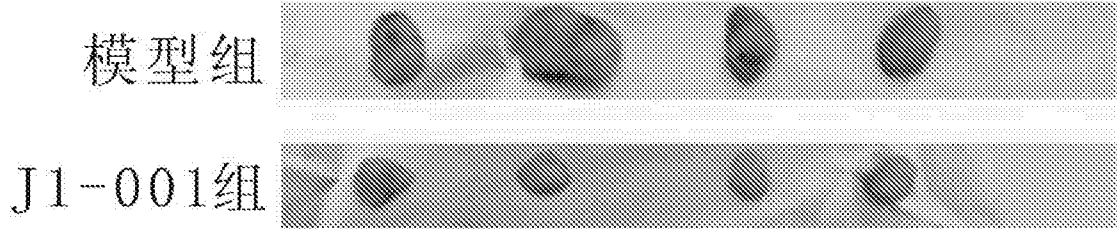


图 2

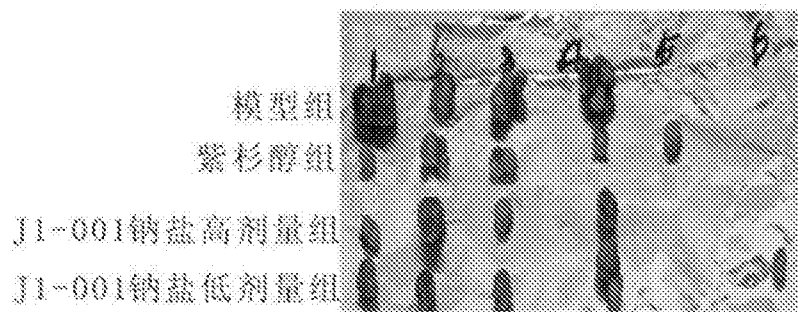


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/076888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/35 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 35/02 (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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA: DIANEMYCIN, NANCHANGMYCIN, NSC138320, JI-001, tumor, cancer, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 20 112 136 12 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.), 27 October 2011 (27.10.2011), the whole document, particularly claims 7-24, and description, paragraphs [0012], [0056], [0077], [0087], [0090], [0100]-[0109], [0111] and [0114]-[0117]	1-10

II Further documents are listed in the continuation of Box C. ¶4 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	
Date of the actual completion of the international search 29 July 2014 (29.07.2014)	Date of mailing of the international search report 08 August 2014 (08.08.2014)
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 Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XIAO, Ying Telephone No.: (86-10) 62089320

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/076888

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2011213612 A	27 October 2011	None	

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 31/35 (2006. 01) i; A61P 35/00 (2006. 01) i; A61P 35/02 (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>WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA: DIANEMYCIN, NANCHANGMYCIN, NSC138320, 南昌霉素, JI- 001 ,癌, 肿瘤, tumor, cancer 等</p>				
<p>C. 相关文件</p>				
<p>类型*</p>	<p>引用文件, 必要时, 指明相关段落</p>	<p>相关的权利要求</p>		
<p>X</p>	<p>JP 2011213612 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD) 2011年 10月 27日 (2011 - 10 - 27)</p> <p>全文, 尤其是权利要求 7-24, 说明书第 [0012]、[0056]、[0077]、[0087]、[0090]、[0100] - [0109]、[0111]、[0114] - [0117] 段</p>	<p>1—10</p>		
<p><input 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:</p> <table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="width:50%; border: none;"> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“V” 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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <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</p> </td> <td style="width:50%; border: none;"> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table>			<p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“V” 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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <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</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>
<p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“V” 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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <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</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>			
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p style="text-align: center;">2014 年 7 月 29 日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p style="text-align: center;">2014 年 8 月 08 日</p>			
<p>ISA/CN 的名称和邮寄地址</p> <p style="text-align: center;">中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10) 62019451</p>	<p>授权官员</p> <p style="text-align: center;">肖瑛</p> <p>电话号码 (86-10) 62089320</p>			

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/076888

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)
JP 201 1213612 A	201 1年 10月 27 0	无	