(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106924253 A
(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201511007202.X
(22)申请日 2015.12.30
(71)申请人 复旦大学
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号
(72)发明人 余龙 朱恒锐
(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事务所(普通合伙) 31268
代理人 吴桂琴
(51)Int.Cl.
A61K 31/4375(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 31/475(2006.01)
A61K 31/704(2006.01)
A61K 31/337(2006.01)
A61K 31/513(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

8-丙二氰小檗碱在制备抗肿瘤药物增敏剂中的应用

(57)摘要

本发明属于细胞生物学和医药领域,涉及8-丙二氰小檗碱在制备抗肿瘤药物增敏剂中的应用。8-丙二氰小檗碱是天然产物,具有逆转肿瘤细胞多药耐药的作用,可以作为肿瘤多药耐药的逆转剂;8-丙二氰小檗碱还具有增加肿瘤多药耐药细胞对抗肿瘤药物敏感性的作用,可以作为化疗增敏剂使用。本发明还提供了抗肿瘤药物和8-丙二氰小檗碱联合使用的药物组合物抑制肿瘤多药耐药细胞增殖的方法。本发明中的小分子化合物8-丙二氰小檗碱作为新的抗肿瘤药物或者其辅助成分进行开发,抑瘤效果明显,绿色环保,将为治疗和治愈肿瘤提供了一种新的途径和手段。

CN 106924253 A

1.8-丙二氰小檗碱在制备抗肿瘤药物增敏剂中的应用。

2.如权利要求1所述的应用，其特征在于，8-丙二氰小檗碱是肿瘤多药耐药逆转剂。

3.如权利要求1所述的应用，其特征在于，所述的肿瘤包括口腔癌、鼻咽癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、宫颈癌、结肠癌或胰腺癌。

4.如权利要求1所述的应用，其特征在于，所述的抗肿瘤药物是长春新碱、柔红霉素、紫杉醇或者5-氟尿嘧啶。

5.一种抗肿瘤药物组合物，其特征在于，所述的抗肿瘤药物组合物的有效成分是抗肿瘤药物和8-丙二氰小檗碱。

6.如权利要求5所述的抗肿瘤药物组合物，其特征在于，所述的抗肿瘤药物是细胞周期特异性药物或者细胞周期非特异性药物。

7.如权利要求5所述的抗肿瘤药物组合物，其特征在于，所述的抗肿瘤药物是长春新碱、柔红霉素、紫杉醇或者5-氟尿嘧啶。

8.一种抑制体外肿瘤细胞生长增殖的方法，其特征在于，在肿瘤细胞的培养基中加入8-丙二氰小檗碱和抗肿瘤药物。

9.如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述的肿瘤包括口腔癌、乳腺癌、鼻咽癌、肝癌、肺癌、宫颈癌或者胰腺癌。

10.如权利要求8所述的方法，其特征在于，先加入8-丙二氰小檗碱，然后加入抗肿瘤药物。

8-丙二氰小檗碱在制备抗肿瘤药物增敏剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学和医药领域，具体而言，本发明涉及8-丙二氰小檗碱的新用途。本发明还涉及相应的药物组合物及其应用方法。

背景技术

[0002] 肿瘤是机体在各种致癌因素作用下，局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致其克隆性异常增生而形成的异常病变。我国的肿瘤病例数相当庞大，有资料显示占全世界病例数的55%。

[0003] 良性肿瘤对机体的影响较小，主要表现为局部压迫和阻塞症状。恶性肿瘤由于分化不成熟、生长较快，浸润破坏器官的结构和功能，并可发生转移，因而对机体影响严重。恶性肿瘤除可引起与上述良性肿瘤相似的局部压迫和阻塞症状外，还可有发热、顽固性疼痛，晚期可出现严重消瘦、乏力、贫血和全身衰竭的状态。

[0004] 中医认为，癌症的起因首先是人体内阴阳平衡，组织细胞在不同的致癌因素长期作用下，细胞突变而引起的。其实癌组织也是人体的一部分，只有在人本阴阳平衡失调，五行生克乘侮发生变化的前提下，人体的免疫监控系统才会对其失去监控，任其发展。中草药能够以调理气血、调整阴阳平衡、维持正常生命体征而保命；以培补正气、产生抗体，清理"毒源"而治本。因而，中草药提取物成为治疗肿瘤一个重要方向。

[0005] 8-丙二氰小檗碱是天然产物，生物利用度高、性质比较稳定，具有临床使用价值。随着人们对其的化学和生物学研究的深入，其分子作用机制将逐步明确，这将进一步推动此类化合物的化学结构修饰和构效关系研究，并有助于提高其药用价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供8-丙二氰小檗碱的新的药物用途。

[0007] 本发明的目的是提供一种抗肿瘤药物增敏剂。

[0008] 一方面，本发明提供了8-丙二氰小檗碱在制备抗肿瘤药物增敏剂中的应用。其中，8-丙二氰小檗碱的英文全称为8-berberinylidenmal onitril，其结构如图1所示。

[0009] 所述的肿瘤包括口腔癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、宫颈癌、结肠癌或胰腺癌。

[0010] 所述的抗肿瘤药物是长春新碱、柔红霉素、紫杉醇或者5-氟尿嘧啶。

[0011] 8-丙二氰小檗碱可以作为肿瘤多药耐药逆转剂。

[0012] 另一方面，本发明提供了一种抗肿瘤药物组合物，所述的抗肿瘤药物组合物的有效成分是抗肿瘤药物和8-丙二氰小檗碱。

[0013] 所述的抗肿瘤药物是细胞周期特异性药物或者细胞周期非特异性药物。

[0014] 所述的抗肿瘤药物是长春新碱、柔红霉素、紫杉醇或者5-氟尿嘧啶。

[0015] 本发明还提供了一种抑制体外肿瘤细胞生长增殖的方法，即在肿瘤细胞的培养基中加入8-丙二氰小檗碱和抗肿瘤药物。

[0016] 其中，加入8-丙二氰小檗碱的终浓度为1-100 μ mol/L。

[0017] 所述的肿瘤包括口腔癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、宫颈癌或者胰腺癌。

[0018] 实施上述方法时，先加入8-丙二氰小檗碱，然后加入抗肿瘤药物。也可以同时加入8-丙二氰小檗碱和抗肿瘤药物。

[0019] 本发明提供了8-丙二氰小檗碱的新用途，即其在制备抗肿瘤药物增敏剂中的应用。8-丙二氰小檗碱是天然产物，具有逆转肿瘤细胞多药耐药的作用，可以作为肿瘤多药耐药的逆转剂；8-丙二氰小檗碱还具有增加肿瘤多药耐药细胞对抗肿瘤药物敏感性的作用，可以作为化疗增敏剂使用。本发明中的小分子化合物8-丙二氰小檗碱作为新的抗肿瘤药物或者其辅助成分进行开发，抑瘤效果明显，绿色环保，将为治疗和治愈肿瘤提供了一种新的途径和手段。

附图说明

[0020] 图1为8-丙二氰小檗碱的结构。

具体实施方式

[0021] 本发明提供了一种抗肿瘤药物，所述的抗肿瘤药物的活性成分是8-丙二氰小檗碱。所述的肿瘤可以是肝癌细胞、胃癌细胞、宫颈癌细胞或者血癌细胞。

[0022] 本发明的小分子化合物可以采用各种常规的制备方法制备。例如，采用人工化学合成的方法。

[0023] 利用本发明小分子化合物，通过各种常规筛选方法，可筛选出与8-丙二氰小檗碱发生相互作用的物质，如受体、抑制剂或拮抗剂等。

[0024] 本发明及其抑制剂、拮抗剂等，在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8， pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：肌内、腹膜内、皮下、皮内、或局部给药。

[0025] 以本发明的8-丙二氰小檗碱为例，可以将其与合适的药学上可接受的载体联用。这类药物组合物含有治疗有效量的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的8-丙二氰小檗碱可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外，本发明的8-丙二氰小檗碱 还可与其他治疗剂一起使用。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

[0026] 实验方法：

1.细胞复苏

1）从液氮罐中取出冻存管，直接投入37℃温水中，并不时摇动令其尽快融化。

[0027] 2）从37℃水浴中取出冻存管，用吸管吸出细胞悬液，注入离心管并加入10倍以上培养液，混合后低速离心，弃上清，再重复用培养液洗一次。

[0028] 3）用培养液适当稀释后，接种培养瓶，放在37℃培养箱静置培养，次日更换培养液，继续培养。培养至一定浓度时进行传代。MCF-7细胞培养在含10% 胎牛血清的RPMI 1640培养基中，KB和KB/VCR细胞培养在含有10% 胎牛血清、2mM谷氨酰胺和1mM丙酮酸钠的MEM培养基中，MCF-7/ADR细胞培养在含有10% 胎牛血清、0.01mg/ml胰岛素和1mM丙酮酸钠的MEM培养基中。培养基中含100U/ml 青霉素和100μg/ml链霉素。

[0029] 2.细胞传代培养

每天观察细胞生长的情况，当细胞在培养瓶中长至约90%汇合时传代，约每隔2-4天传代一次。一瓶传代成三瓶，或一个25 cm^2传代于一个75 cm^2 的培养瓶中。方法：

1）用1×磷酸缓冲液洗涤细胞一次。

[0030] 2）加入2-3ml胰酶消化液消化，置于37℃培养箱中数分钟。用手拍打细胞培养瓶，使细胞分离。

[0031] 3）用含10-15%的Gibico胎牛血清的合适培养基终止胰酶消化。将细胞分装于新的培养瓶中，继续培养。

[0032] 悬浮细胞传代时，直接收集于离心管中离心，弃旧培养基。一般一瓶传代成三瓶的比例分装于新的培养瓶中，加入新鲜培养基继续培养。

[0033] 3.细胞冻存

1）取培养至对数生长期的细胞胰蛋白酶消化，收集于离心管中并计数，离心。

[0034] 2）弃除胰蛋白酶及旧的培养液，加入配置好的冻存培养液（含10% DMSO，40% DMEM和50% Gibico胎牛血清），冻存液中细胞的最终浓度为0.5- 1×10^7/ml。用吸管轻轻吹打使细胞均匀，然后分装入无菌冻存管中，每管加1 -1.5ml。

[0035] 3）将冻存管放入冻存盒置-80℃速冻，5小时后移入液氮罐中保存。

[0036] 4. 实验材料

药物准备：

8-丙二氰小檗碱溶于DMSO（二甲基亚砜），配制成100mM或50mM的母液备用。

[0037] 长春新碱（VCR）和阿霉素（ADR）购自罗氏化学公司，纯度都大于99%。

[0038] 细胞来源：

人口腔癌细胞株KB及其耐药细胞株KB/VCR由中科院药物所提供，人乳腺癌细胞株MCF-7及其耐药细胞株MCF-7/ADR购自南京凯基生物公司。

[0039] 试剂盒：

CCK-8试剂盒购自同仁公司。

[0040] CCK-8实验

KB和KB/VCR细胞以及MCF-7和MCF-7/ADR细胞都按照3500/孔的密度接种到96孔板中，24 h后不同浓度的ADR，VCR，8-丙二氰小檗碱以及VCR和8-丙二氰小檗碱一起用含10%胎牛血清的α-MEM配好后被加到各个孔中。培养48 h后，弃去培养液，每孔加入90 μL 不含血清的培养基和10 μL CCK-8试剂。37℃反应2 h后，酶标仪读取450 nm波长的吸光值（OD450）。通过计算得到用药组相对于对照组的细胞增殖比率。空白组为不加细胞只加培养基，对照组为加入与药物同体积的DMSO，细胞存活率=（实验组OD450-空白组OD450）/（对照组OD450-空白组OD450）。通过IC_{50}值再计算耐药倍数（Resistance Fold，RF）。

[0041] RF =耐药细胞株的 IC_{50} 值/亲本细胞株的 IC_{50} 值。每个浓度设 3个重复孔，实

验重复 3 次。

[0042] 所有耐药细胞系在生长抑制实验之前在无药物培养基中生长3天。每个数值是3个独立实验结果，IC_{50}以“均值±标准差”形式表示。VCR，长春新碱；ADR，柔红霉素；RF，耐药倍数。

[0043] 实施例1

Cell Lines	VCR		ADR	
	IC_{50} (nM)	RF	IC_{50} (nM)	RF
KB	8.5±0.8	81.9	26.2±2.7	94.4
KB/VCR	695.8±18.2		2473.8±7.2	
MCF-7	30.7±4.3	38.1	374.9±24.7	20.9
MCF-7/ADR	1168.5±49.8		7819.8±68.5	

实验结果：

KB/VCR和MCF-7/ADR是两种常用的多药耐药细胞株，在本实施例中，这两种细胞也表现出多药耐药的特性。如表1所示，KB/VCR细胞相对于KB细胞对VCR和ADR的耐药倍数分别为81.9倍和94.4倍，而MCF-7/ADR细胞跟MCF-7细胞相比对VCR和ADR的耐药倍数分别是38.1倍和20.9倍，显示实验所用耐药细胞具有多药耐药性，且MDR活性类似于文献报道的结果。

[0044] 8-丙二氰小檗碱对亲本细胞株KB和MCF-7的半数抑制浓度IC_{50}分别为69.1 μM和75.0μM，对耐药细胞株KB/VCR和MCF-7/ADR的IC_{50}分别为154.0μM和132.9μM，两者之间无显著性差别，多药耐药细胞株KB/VCR和MCF-7/ADR没有表现出对化合物8-丙二氰小檗碱的交叉耐药，说明8-丙二氰小檗碱可以逃脱耐药细胞的多药耐药性。8-丙二氰小檗碱在20 μM 以下的浓度下，对细胞生长无明显的抑制，高于100 μM的浓度下会抑制细胞的增殖。

[0045] 结论：8-丙二氰小檗碱能够克服耐药细胞株的多药耐药性，耐药细胞株对8-丙二氰小檗碱的敏感性基本相同。

[0046] 实施例2：CCK-8方法检测8-丙二氰小檗碱对肿瘤细胞多药耐药活性的逆转作用

KB/VCR，MCF-7/ADR细胞按照3500/孔的密度接种到96孔板中，24 h后不同浓度的VCR，以及不同浓度的VCR和8-丙二氰小檗碱一起用含10%胎牛血清的α-MEM配好后被加到各个孔中。培养48 h后，弃去培养液，同实施实例1中方法，用CCK-8试剂盒测耐药细胞株及其亲本细胞对VCR和VCR+8-丙二氰小檗碱的活性，绘成曲线。每个浓度设 3个重复孔，实验重复 3 次。

[0047] 实验结果：

MCF-7/ADR对ADR的耐药倍数为20.9倍。当加入20 μM的8-丙二氰小檗碱后，使ADR对耐药细胞MCF-7/ADR的敏感性增加了3.79倍。8-丙二氰小檗碱能够逆转肿瘤多药耐药细胞对化疗药物的耐药性。而这种效应在亲本细胞中表现并不明显。

[0048] 结论：

8-丙二氰小檗碱可以逆转肿瘤多药耐药细胞KB/VCR和MCF-7/ADR的耐药性，可以作为抗肿瘤药物的增敏剂，或者与抗肿瘤药物制成药物组合物。

[0049] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独

引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

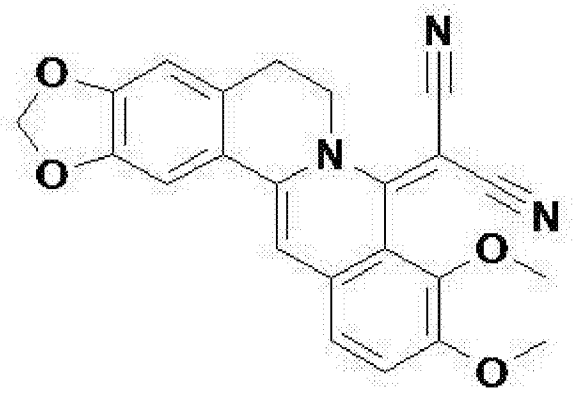


图1