



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104780925 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201380053224. 2

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 10. 17

(30) 优先权数据

12188789. 7 2012. 10. 17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/071779 2013. 10. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/060548 DE 2014. 04. 24

(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 余明伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/7042(2006. 01)

A61K 47/40(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页 附图9页

(54) 发明名称

用于治疗多发性骨髓瘤的花青素络合物

(57) 摘要

本发明涉及一种飞燕草素和磺烷基醚-β-环糊精的络合物,用作药物,尤其是用于治疗多发性骨髓瘤。

1. 一种飞燕草素和磺烷基醚- β -环糊精的络合物,用作药物。
2. 根据权利要求1所述的络合物,用于治疗多发性骨髓瘤。
3. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的络合物,其特征在于,所述磺烷基醚- β -环糊精为磺丁基醚- β -环糊精。
4. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的络合物,其特征在于,所述环糊精的磺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。
5. 一种用途如权利要求2-4中任一项所述的络合物,其特征在于,所述多发性骨髓瘤选自自由一期多发性骨髓瘤、二期多发性骨髓瘤、三期多发性骨髓瘤、非症状性多发性骨髓瘤、症状性多发性骨髓瘤、新诊断的骨髓瘤、响应性多发性骨髓瘤、稳定的多发性肿瘤、进行性多发性骨髓瘤、复发性多发性骨髓瘤,以及难治性多发性骨髓瘤所构成的组。
6. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的络合物,其进一步包括至少一个治疗剂的有效剂量,所述至少一个治疗剂选自自由硼替佐米、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所构成的组。
7. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的络合物,用于治疗接受放射治疗和/或干细胞移植或者为此而做准备的对象所患的多发性骨髓瘤。
8. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的络合物,进一步包括一药学上可接受的载体。
9. 一种用途如上述权利要求中任一项所述的络合物,在一选自由口服、非肠道途径(包括皮下注射、肌肉注射和静脉注射)、眼部给药、肺部给药以及鼻腔粘膜给药所构成的组的方式进行给药的制剂形式中。
10. 一种用途如权利要求9所述的络合物,其特征在于,所述口服用药方式为片剂或胶囊。
11. 一种用途如权利要求9所述的络合物,其特征在于,所述非肠道途径用药方式为溶液、悬浮液或分散剂。
12. 一种用途如权利要求9所述的络合物,其特征在于,所述眼部给药、肺部给药或者鼻腔粘膜给药方式为喷剂、溶液、悬浮液或分散剂。

用于治疗多发性骨髓瘤的花青素络合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用作治疗癌症药物的一种花青素和磺烷基醚- β -环糊精的络合物以及包括花青素或其盐类的组合物。

背景技术

[0002] 花青素是一种具有抗氧化特性的细胞色素,存在于大多数高等陆地植物中。花青素不含糖(糖苷配基),并且与含糖的花色素类(糖苷)具有紧密的关系,二者均属于花色素类。

[0003] 多发性骨髓瘤是由浆细胞退化而来的。浆细胞是免疫系统中生产用于抵抗疾病和感染之抗体的细胞。这种细胞通过血液循环输送,尤其被输送至骨髓,在该部位积聚,并在健康的组织中造成永久性的损伤,其症状表现为骨折、钙水平升高(高血钙症)甚至肾衰竭。造成骨骼损伤的原因在于骨髓瘤细胞的迅速增生,以及破骨细胞激活因子 IL-6 的释放,而所述破骨细胞激活因子 IL-6 激活了负责骨质吸收的成骨细胞,从而导致骨质损伤的结果,进而造成骨折。由于骨髓中骨髓瘤细胞排挤正常细胞,因此正常血细胞,尤其是白细胞和红细胞的产生也受到了影响,从而提高了感染风险,并可能导致贫血。而血小板数的下降也导致凝血的退化。相关患者在疾病确诊后 6 个月的平均寿命预期差,即便可以通过大剂量的化疗和自体干细胞移植来延长数年。因此,急需替代方案和有效的药剂与治疗方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种用于治疗多发性骨髓瘤的有效药物。

[0005] 通过一种根据权利要求 1-2 所述的,花青素和磺烷基醚- β -环糊精的络合物达成上述目的。附属权利要求中公开了本发明的有利实施方式。

[0006] 下面首先对本发明中所用的术语进行说明。

[0007] 本发明的络合物或本发明的组合物用于治疗患有或多发性骨髓瘤的对象或个体。“对象”一词包含活体动物和人。“包括至少一花青素的组合物”一词包含不含其他组分的单一花青素。这种治疗的目的在于至少部分地杀死或中和骨髓瘤细胞。本发明中的“中和”和“杀死”指至少部分地破坏或分解骨髓瘤细胞,或使其失活,或阻止其增殖。“多发性骨髓瘤”是一种浆细胞癌症。多发性骨髓瘤的阶段可以利用国际分期系统(International Staging System, ISS) 来确定。ISS 基于针对 β_2 -微球蛋白(β_2 -M) 和白蛋白的验血结果,而相比其他检测因素,这两项数据结合起来确保了对于多发性骨髓瘤最高的预后可靠性。根据针对骨髓瘤的 ISS,确定不同阶段的诊断标准为:一期: β_2 -M<3.5mg/dL 且白蛋白 $\geq$ 3.5g/dL,二期: β_2 -M<3.5mg/dL 或 β_2 -M 3.5-5.5mg/dL 且白蛋白<3.5g/dL,三期: β_2 -M>5.5mg/dL。多发性骨髓瘤的阶段通常被划分为不同的骨髓瘤类别之一。多发性骨髓瘤可以为非症状性或症状性。对于症状性骨髓瘤患者,器官和组织无明显的影响和症状。骨髓瘤对器官或组织造成的影响包括高血钙症、肾功能受影响、贫血和骨质损伤。非症状性骨髓瘤包括冒烟型多发性骨髓瘤(Smoldering Multiple Myeloma, SMM) 和多发性骨髓瘤的一期阶段。

SMM 的特征在于单克隆蛋白和骨髓中的浆细胞小幅增加。惰性骨髓瘤 (Indolent Multiple Myeloma, IMM) 的特征在于少量的单克隆蛋白,以及骨髓中的浆细胞增加。患有多发性骨髓瘤的患者还以其病情状况为特征。所述病情状况基于患者是否已接受治疗,以及在是的情况下,治疗效果如何的问题来确定。在本发明中,重新或反复被诊断出疾病的患者指患有骨髓瘤且已接受治疗的个体。已接受治疗的患者分为以下几种类别:响应性疾病 (responsive disease):指对治疗做出相应响应 (M 蛋白水平降低至少 50%) 的骨髓瘤;稳定性疾病 (stable disease):指对治疗无响应 (即 M 蛋白水平的降低未达到 50%),但同时也未进一步发展 (即无恶化) 的骨髓瘤;进行性疾病 (progressive disease):指处于恶化中的活跃骨髓瘤,即 M 蛋白水平上升,对器官和组织的影响加重。在多数情况下,下述的复发疾病和/或难治性疾病也可以归入进行性疾病中。复发疾病 (relapsed disease):指起初对治疗做出响应,但随后重新回到发展阶段的骨髓瘤。难治性疾病 (refractory disease):指对首次治疗未做出响应的骨髓瘤,以及不再对后续治疗做出响应的复发骨髓瘤。而后者也可以称作复发疾病。

[0008] 本发明还涉及用于治疗患有多发性骨髓瘤的对象的方法,其中所述对象被给予了具有疗效剂量的本发明的络合物或本发明的组合物。可以对所有上述所有阶段、类别或病情状况的多发性骨髓瘤进行治疗。本发明的络合物或本发明的组合物可以单独给药,或结合至少另一用于减轻多发性骨髓瘤的一种或多种症状的治疗剂联用。本发明的络合物或本发明的组合物可以与其他治疗剂同时给药,所述其他治疗剂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,可以在给予其他治疗剂之前或之后给予本发明的络合物或本发明的组合物。本发明的络合物或本发明的组合物可以通过与所述其他治疗剂相同或不同的用药方式进行给药。所述治疗剂可以是化疗剂、支持性治疗剂,或两者的结合。“化疗剂”是一种对于癌细胞具有毒性的药剂。本发明中可以应用的化疗剂例如包括硼替佐米 (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。在本发明一种具体优选的实施方式中,本发明的络合物或本发明的组合物被结合硼替佐米 (万珂®) 一起使用。在本发明另一种优选的实施方式中,本发明的络合物或本发明的组合物被结合美法仑一起使用。“支持性治疗剂”是用于减轻多发性骨髓瘤的症状和并发症的药剂。支持性治疗剂的示例有二膦酸盐、生长因子、抗生素、利尿剂和止痛剂。抗生素的示例包括含硫药物、青霉素 (如青霉素 G、对羟苄基青霉素、2-青霉素 F、N-青霉素 K、苯氧甲基青霉素、苯氧乙基青霉素、甲氧苄青霉素、苯唑西林、邻氯青霉素、双氯青、氟氯西林、萘夫西林、氨苄西林、阿莫西林、环青霉素、羧苄西林、替卡西林、哌拉西林、阿诺西林、美洛西林、美西林、阿姆地诺西林)、头孢菌素及其衍生物 (如头孢噻吩、吡硫头孢菌素、头孢氰甲、先锋霉素 V、头孢氨苄、头孢拉定 (cephandine)、头孢羟氨苄、头孢孟多、头孢呋辛、头孢雷特、头孢西丁、头孢替坦、头孢克洛、头孢噻肟、头孢唑肟、头孢曲松、头孢他啶、拉氧头孢、头孢哌酮、头孢克肟、头孢布坦和头孢罗齐)、恶喹酸、氨氟哌酸、替马沙星、萘啶酸、吡咯米酸、环丙沙星、西诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、罗索沙星、氧氟沙星、依诺沙星、吡呢酸、舒巴坦、克拉维酸、 β -溴代青霉烷酸、 β -氯代青霉烷酸、6-乙酰基亚甲基-青霉烷酸、头孢噁唑、舒他西林、美西林和舒巴坦的水合甲醛酯、他唑巴坦、氨曲南、磺酰胺菌素 (sulfazethin)、异磺酰胺菌素 (isosulfazethin)、诺卡菌素、m-羧基苯基-苯基乙酰氨基甲基磷酸酯、氯四环素、氧四环素、四环素、地美环素、多西环素、

甲烯土霉素和二甲胺四环素。二磷酸酯的示例包括：羟乙膦酸盐 (Didronel)、帕米膦酸盐 (Aredia)、阿伦膦酸盐 (Fosamax)、利塞膦酸盐 (Actonel)、唑来膦酸盐 (Zometa) 和伊班膦酸盐 (Boniva)。利尿剂的示例包括噻嗪衍生物, 例如氨氯吡脒、氯噻嗪、二氢氯噻、甲基氯噻嗪和氯噻酮。生长因子的示例包括粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、多重集落刺激因子、红细胞生成素、血小板生成素、制瘤素 M 和白介素。止痛剂的示例包括阿片 (如吗啡)、COX-2 抑制剂 (如罗非昔布、伐地昔布和塞来昔布)、水杨酸盐 (如阿司匹林、三水杨酸胆碱镁、双水杨酸酯、二氟苯水杨酸 (dirunisal) 和水杨酸钠)、丙酸衍生物 (如非诺洛芬钙、异丁苯丙酸、酮洛芬、甲氧萘丙酸和甲氧萘丙酸钠)、吲哚乙酸衍生物 (如吲哚美辛、舒林酸 (sulfindac)、依托度 (etodalac) 和托美汀)、芬那酸 (如甲灭酸和甲氯芬那酸)、苯并噻嗪衍生物或昔康类 (如美洛昔康或吡罗昔康) 或者吡啶乙酸 (pyrrolactic acid) (如酮咯酸)。

[0009] 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、抑制或防止疾病发病或发展。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。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,被采用本发明的络合物或本发明的组合物以及其他治疗剂(如有)进行治疗的所述对象接受了放射治疗并且/或者为干细胞治疗进行了准备。本发明的络合物或本发明的组合物可在诱导治疗过程中使用,优选可结合其他备选治疗剂联用,从而在干细胞移植前减轻肿瘤负荷,也可以在干细胞移植中和/或干细胞移植后使用。

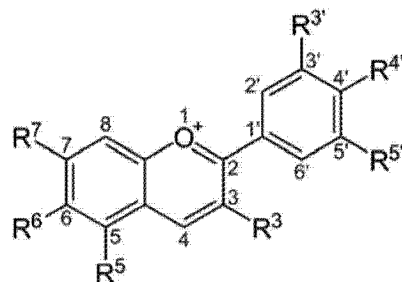
[0011] 本发明的络合物或本发明的组合物优选作为药物组合物提供和给药。“药物组合物”一词指一种或多种有效成分和一种或多种作为所述一种或多种有效成分载体的惰性成分。所述药物组合物使本发明的络合物或本发明的组合物能通过口服、肠胃外给药,包括皮下注射、肌肉注射和静脉注射)、眼部给药、肺部给药或者鼻腔粘膜给药的方式进行给药。非肠道途径用药方式例如可以为溶液、悬浮液或分散剂。眼部给药、肺部给药或者鼻腔粘膜给药方式例如可以为喷剂、溶液、悬浮液或分散剂。现有技术中已公开了相应的制剂和给药技术,例如可参见《雷明顿的制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (Mack 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缓冲液(如 Hanks 液、林格液或缓冲生理盐水)形式的制剂。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。

[0012] “盐”或“生理上可接受的盐”指本发明的化合物在制药学上可接受的盐,且所述盐能在用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。

[0013] 可以使用“纯净形式”或“经纯化”的花青素,即不需要的成分已被去除。

[0014] “花青素”具有下图所示的基本结构:

[0015]



[0016] 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。

[0017] 能够与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。在磺烷基醚- β -环糊精中,磺烷基醇中的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磺烷基醚环糊精的生产,例如在 US 5,134,127 或 WO 2009/134347 A2 中进行了相关说明。

[0018] 在现有技术中,磺烷基醚基团被在环糊精中用于提高亲水性和水溶解度。磺烷基醚基团有助于显著提高花青素和相应取代的 β -环糊精的络合物的稳定性,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。

[0019] 在本发明中,尤其有利的是与磺丁基醚- β -环糊精 (SEB- β -CD) 进行络合。对此,一种可能的不限定本发明保护范围的解释是,带正电荷的磺丁基醚单元和带正电荷的花青素发生静电相互作用,并且在烷基醚集团之中,丁基醚基团有最佳的长度,从而实现适当的空间相互作用。

[0020] 优选地,所述环糊精的磺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。取代度在 6 至 7 之间的适合的磺丁基醚- β -环糊精例如在上述的 WO 2009/134347 A2 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。

[0021] 本发明中以纯净形式、盐类形式或络合形式使用的花青素优选选自由 Aurantinidin、矢车菊素、飞燕草素、Europinidin、Luteolinidin、天竺葵素、锦葵色素、芍药素、矮牵牛素和 Rosinidin 构成的组。其化学结构如上图的化学式 I 所示,而取代模式如下所述:

[0022]

	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
Aurantidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
矢车菊素	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
飞燕草素	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidin	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH

Luteolinidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
天竺葵素	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
锦葵色素	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
芍药素	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
矮牵牛素	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

[0023] 本发明中尤其优选的是飞燕草素。

[0024] 本发明还涉及一种用作药物,尤其是用于治疗多发性骨髓瘤的本发明的组合物或本发明的络合物的水溶液。

[0025] 本发明的络合物以及相应的水溶液的制备包含以下步骤:

[0026] a) 制备磺烷基醚- β -环糊精的水溶液,

[0027] b) 加入花青素并混合以制备络合物。

[0028] 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,在加入花青素(优选为飞燕草素)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。

[0029] 以氯化物计算的花青素浓度优选至少为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优选的、至少为2.0mg/ml的浓度范围。

[0030] 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。

[0031] 本发明还涉及一种用作药物,尤其是用于治疗多发性骨髓瘤的固体,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除溶剂来获得。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好的耐储存性。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图所示实例对本发明进行详细说明,但本发明不限于上述实例。

[0033] 一、制备飞燕草素和环糊精的络合物

[0034] 1. 所用材料:

[0035] 使用的环糊精如下所示:

[0036]

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
磺丁基醚- β -CD	标识号 :47K010111

[0037] 氯化飞燕草素从 Extrasynthese 公司购得。

[0038] 2. 飞燕草素含量的确定

[0039] 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。为此,如下试剂被使用:

[0040] 纯净水

[0041] 色层分析用甲醇

[0042] 甲酸, p. a.

[0043] 1M 盐酸,用作滴定液。

[0044] 使用 Waters X Bridge™ C18, 35 μ l, 150mm x 4.6mm 作为色谱柱。

[0045] 流动相如下所示:

[0046] A 相:水 950ml、甲醇 50ml, 甲酸 10ml

[0047] B 相:水 50ml, 甲醇 950ml, 甲酸 10ml

[0048] 所采用的梯度设计如下所示:

[0049]

时间 [分]	B 相百分比
0	0
5	0
25	60
30	100

[0050] 停止时间 :35 分

[0051] 追加时间 (posttime) :8 分

[0052] 流速 :1ml/ 分

[0053] 进样量 :20 μ l

[0054] 色谱柱温度 :30°C +/-2°C

[0055] 紫外可见光谱探测器 :530 μ m (分析用) 和 275 μ m (杂质检测用)

[0056] 积分器 :面积

[0057] 溶液和样品准备:

[0058] 稀释液 1 :由 100mL 甲醇和 2.6mL 1M HCL 构成的混合物

[0059] 稀释液 2 :由 100mL 40% 甲醇和 2.6mL 1M HCL 构成的混合物

[0060] 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。

[0061] 对照用校对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。

[0062] 试验溶液的制造:

[0063] 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 继续稀释,直至达到大约 0.1mg/mL 的飞燕草素浓度。

[0064] 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。

[0065] 示例 1:飞燕草素与 SBE- β -CD 的络合

[0066] 本示例对飞燕草素与不同环糊精的络合以及络合物在水溶液中的溶解性进行了研究。

[0067] 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。

[0068] 将 5mL 的各环糊精水溶液倒入玻璃烧瓶中并加入纯水。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。

[0069] 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 μ m 的膜滤器进行过滤。

[0070] 下面的表 1 中列出了可以达到的溶解度:

[0071]

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

[0072] 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。

[0073] 示例 2:pH 值的影响

[0074] 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 的说明制造 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限于 2.5 小时。试验结果如下面的表 2 所列:

[0075]

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

[0076] 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的溶解度相比在中性 pH 值下时提高了大约 3 倍。

[0077] 示例 3:本发明的固体的制备

[0078] 在本实施例中制备了形式为固体的本发明的络合物。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。

[0079] 示例 3.1:飞燕草素 /SBE- β -CD

[0080] 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。

[0081] 示例 3.2:飞燕草素 /HPBCD

[0082] 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,说明相比于示例 3.1 中采用 SBE- β -CD 的情况,增容作用明显欠佳。

[0083] 示例 3.3:飞燕草素 / 淀粉制剂

[0084] 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、固体磨粉和过筛。

[0085] 示例 3.1 为本发明的内容,而示例 3.2 和 3.3 为对比示例。

[0086] 示例 4:稳定性试验

[0087] 在以下条件下储存根据示例 3.1 至 3.3 所述的固体:

[0088] - 室温下在螺帽盖的棕色玻璃容器中放置 8 天,

[0089] - 随后室温下在避光的氧气环境下放置在玻璃容器中 22 天。

[0090] 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,使用纯氧净化玻璃小瓶的上部空腔。然后放入避光的环境中储存。

[0091] 使用上述的 HPLC 方法来确定所述固体的飞燕草素含量(以氯化飞燕草素计算并以重量%为单位)。结果如下面的表 3 所示:

[0092]

	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

[0093] 结果显示,根据本发明能够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。

[0094] 示例 5:水溶液中的稳定性试验

[0095] 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。如下试剂被使用:

[0096] 纯净水

[0097] 色层分析用甲醇

[0098] 甲酸, p. a.

[0099] 1M 盐酸,用作滴定液。

[0100] 使用 Waters X Bridge™ C18, 35 μ l, 150mm x 4.6mm 作为色谱柱。

[0101] 流动相如下所示:

[0102] A 相:水 770ml、甲醇 230ml,甲酸 10ml

[0103] B 相:水 50ml,甲醇 950ml,甲酸 10ml

[0104] 所采用的梯度设计如下所示:

[0105]

时间[分]	B 相百分比
0	0
5	0
25	20
30	100

[0106] 停止时间:25 分

[0107] 追加时间(posttime):8 分

[0108] 流速:1ml/分

[0109] 进样量:20 μ l

[0110] 色谱柱温度:30°C +/-2°C

[0111] 紫外可见光谱探测器:530 μ m(分析用)和 275 μ m(杂质检测用)

[0112] 积分器:面积

[0113] 溶液和样品准备:

[0114] 稀释液 1:由 100mL 甲醇和 2.6mL 1M HCL 构成的混合物

[0115] 稀释液 2 :由 100mL 50%甲醇和 2.6mL 1M HCL 构成的混合物

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 试验溶液的制备 :

[0119] 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(本发明实施例)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°C 的避光条件下存放。

[0120] 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。

[0121]

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%

[0122] 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。

[0123] 二、花青素飞燕草素和飞燕草素 -BE- β -CD 络合物对骨髓瘤细胞在体外的作用

[0124] 1. 试验细胞株和试验结构

[0125] 通过下述在体外试验中进行的 BLI(生物发光成像)测量与 FACS(荧光激活细胞分选)分析,就所述飞燕草素 + 磺丁基醚- β -环糊精络合物(下称飞燕草素 +SBEB CD)以及飞燕草素对老鼠骨髓瘤细胞株 MOPC-315(ATTC 分类号 TIB-23)的作用进行了研究。所用方法(BLI 测量和 FACS 分析)对于专业人员而言已在专利和专业文献,例如 FACS 基本专利 DE 1815352C1 中予以公开。

[0126] 2. BLI 测量

[0127] BLI 测量的结果如图 1 至 11 所示,其中给出了有关治疗后存活的细胞数量的信息。

[0128] 在第一试验中对飞燕草素 +SBEB CD 和 SBEB CD 的作用进行了研究。首先将含有处于对数生长期的细胞的 100 μ l RPMI-1640 细胞培养基放在 24 孔聚苯乙烯细胞培养皿中的(4000 细胞 / 孔)。使用无菌的 RPMI-1640 作为对照。然后按照图 3(每个测量一式三份)的事先设计好的稀释阵列加入溶解在 100 μ l RPMI-1640 中的飞燕草素 +SBEB CD 和 SBEB CD,

将细胞培养皿在 37℃ 下培养 48 小时,然后使用纯的 RPMI-1640(即不含飞燕草素 +SBEB CD 或 SBEB CD 的新鲜培养基)更换培养基,并重新在 37℃ 下培养 48 小时,观察结果如图 1(飞燕草素 +SBEB CD)、2(SBEB CD)和 5(对照)所示。

[0129] 培养皿孔穴中存活细胞的数量与 BLI 测量过程中每个孔穴所测到的发射光子数量相关联,具体如 BLI 图 1、2 和 5 中相应的颜色(红色=强信号/少量发射光子;蓝色=强信号/大量发射光子)所示。如图 1 所示,随着飞燕草素 +SBEB CD 剂量强度增加,毒性随之增强,直至完全杀死所有细胞,而如图 2 所示,SBEB CD 即使在高剂量情况下依然毒性甚微(鉴于相邻的同浓度孔穴,图 2 最后一列中用“X”标记的孔穴作为明显的试验失误而被排除)。图 6 以相对对照组(图 5:纯介质)百分比的形式对图 1(飞燕草素 +SBEB CD)和 2(SBEB CD)所示的实验结果图进行了汇总。

[0130] 采用相同的试验结构对飞燕草素的作用进行研究。为此,首先同样地将含有处于对数生长期的细胞的 100 μ l RPMI-1640 细胞培养基放在 24 孔聚苯乙烯细胞培养皿中(4000 细胞/孔)。然后按照图 9(每个测量一式三份)的浓度加入 100 μ l 溶解的氯化飞燕草素(溶解在 10% DMSO 和 90% H₂O 中),将细胞培养皿在 37℃ 下培养 48 小时,然后使用纯的 RPMI-1640(即不含飞燕草素的新鲜培养基)更换培养基,并重新在 37℃ 下培养 48 小时,观察结果如图 8(飞燕草素)和 10(对照:无菌的 RPMI-1640)所示。为了检查 DMSO 对细胞的作用,增加了两组对照并一起进行了分析(图 8 和 9 的最后一行孔穴分别加入了 100 μ l “高浓度 DMSO”(100 μ g/ml DMSO)和 100 μ l “低浓度 DMSO”(50 μ g/ml DMSO))。图 11 以相对对照组(图 10:纯介质)百分比的形式对图 8(氯化飞燕草素)所示的实验结果图进行了汇总。

[0131] 3. FACS 分析

[0132] 图 12(飞燕草素 +SBEB CD)、13(SBEB CD)、14(氯化飞燕草素)、15(飞燕草素 +SBEB CD 和 SBEB CD 相对于对照组)以及 16(氯化飞燕草素、“高浓度 DMSO”和“低浓度 DMSO”分别相对于对照组)以汇总的方式示出了 FACS 分析的结果,其中给出了死亡细胞数量的信息,且所述细胞事先使用碘化丙啶进行了染色。

[0133] BLI 测量和 FACS 分析的试验结果可总结如下:

[0134] - 飞燕草素 +SBEB CD 和飞燕草素(氯化飞燕草素)在体外杀死人类骨髓瘤细胞。

[0135] - 这种作用随剂量而增强,其中在较高剂量的情况下几乎所有细胞均被杀死。

飞燕草素+SBEB CD

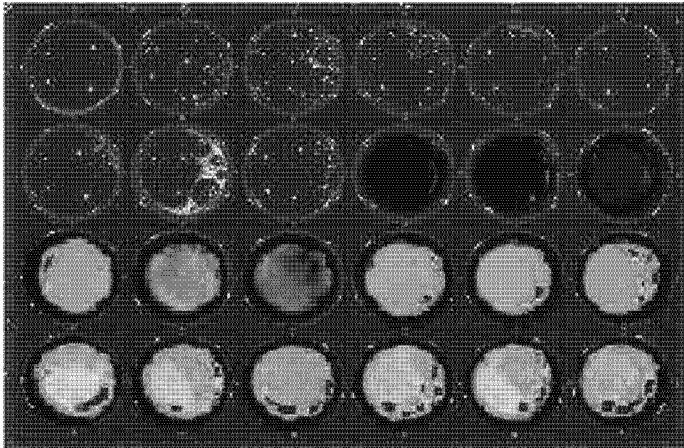


图 1

SBEB CD

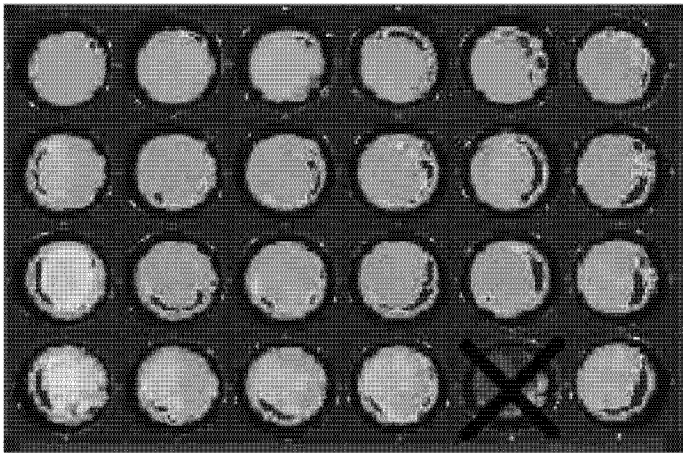


图 2

飞燕草素+SBEB CD（图1）和SBEB CD（图2）
的孔穴浓度分配图，单位：mg/ml

5	5	5	2,5	2,5	2,5
1,25	1,25	1,25	0,5	0,5	0,5
0,25	0,25	0,25	0,1	0,1	0,1
0,05	0,05	0,05	0,005	0,005	0,005

图 3

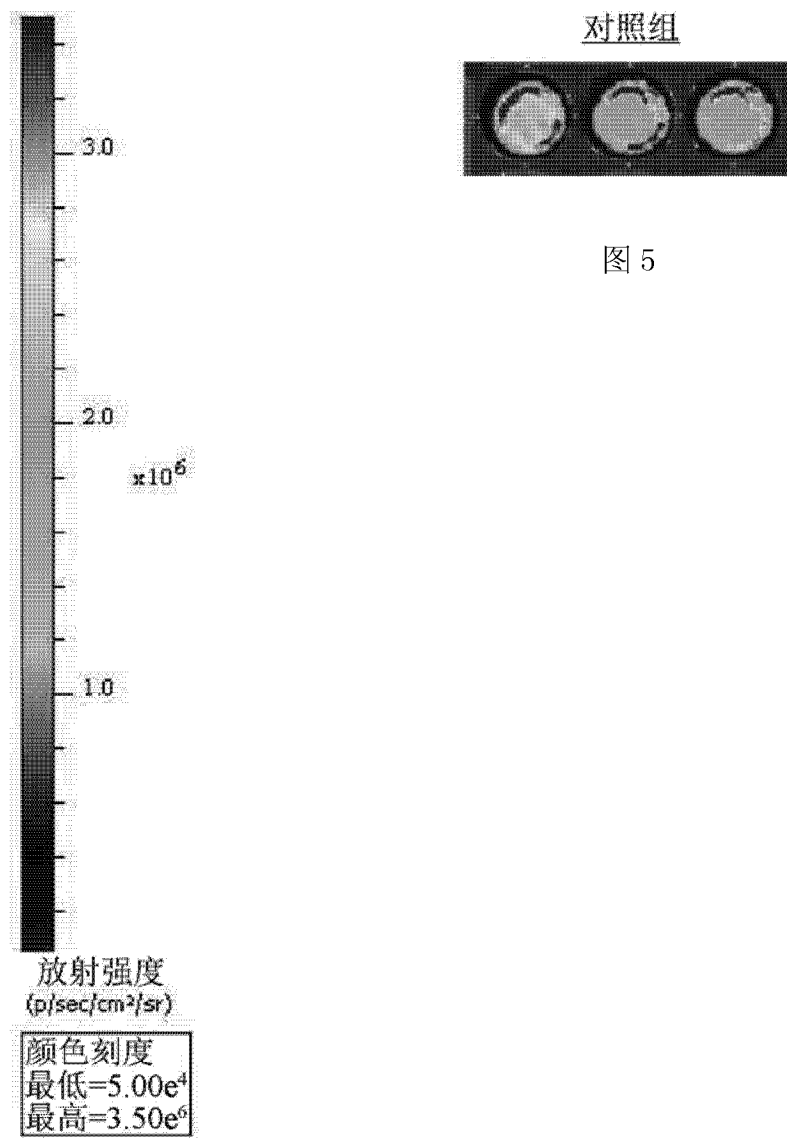


图 4

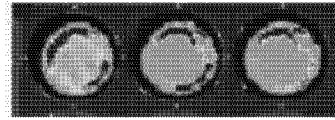
对照组

图 5

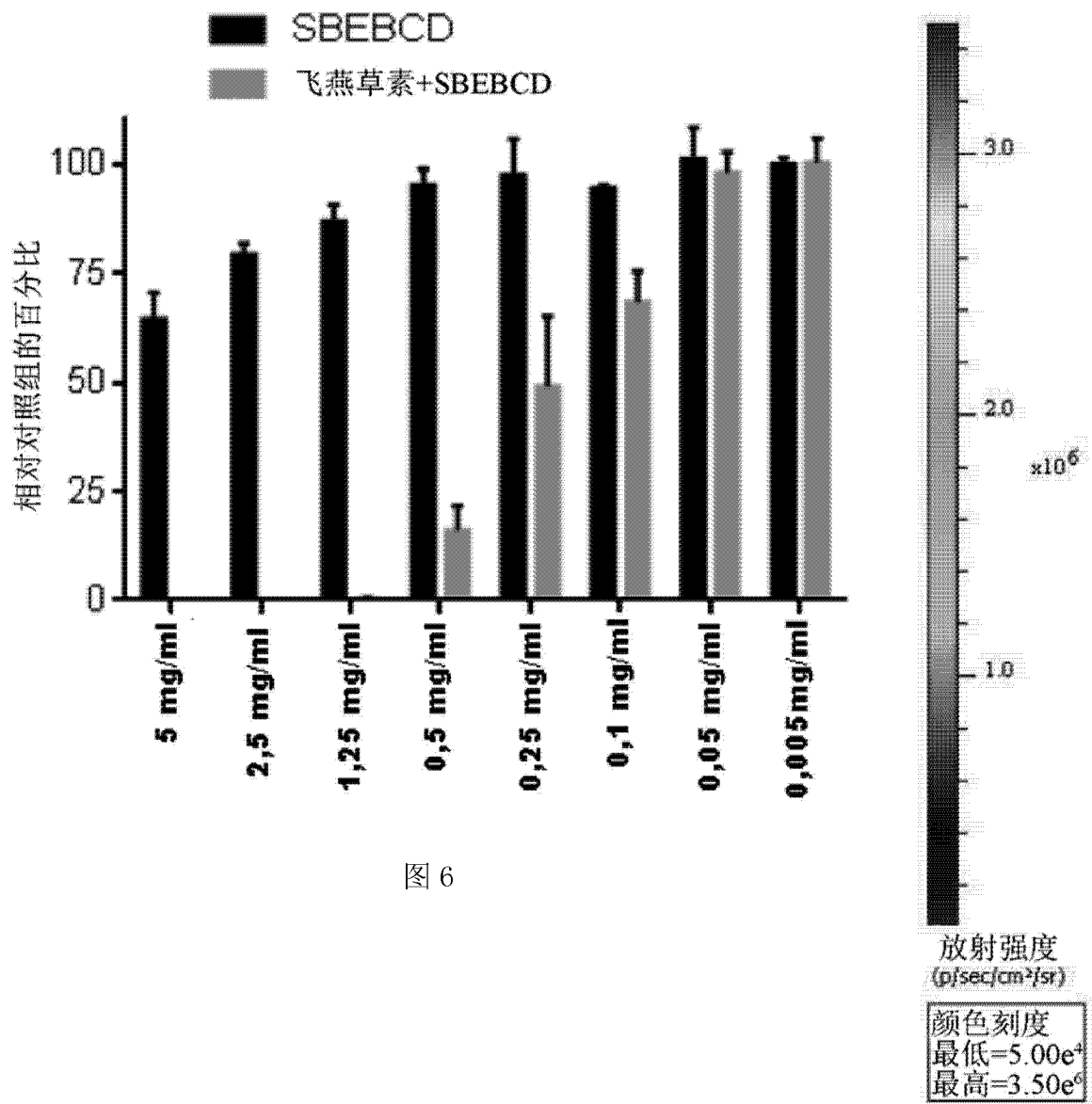


图 7

氯化飞燕草素

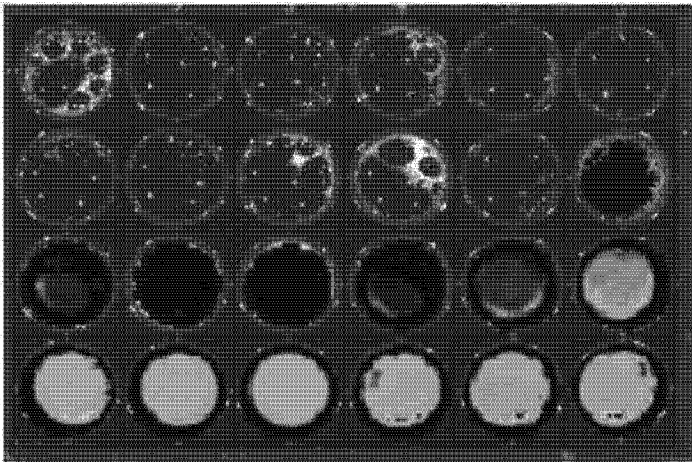


图 8

氯化飞燕草素（图8）的孔穴浓度分配图，单位：mg/ml

100	100	100	50	50	50
25	25	25	12,5	12,5	12,5
5	5	5	2,5	2,5	2,5
高浓度 DMSO	高浓度 DMSO	高浓度 DMSO	低浓度 DMSO	低浓度 DMSO	低浓度 DMSO

图 9

对照组

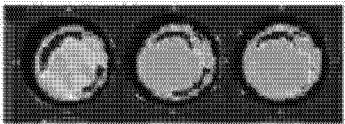


图 10

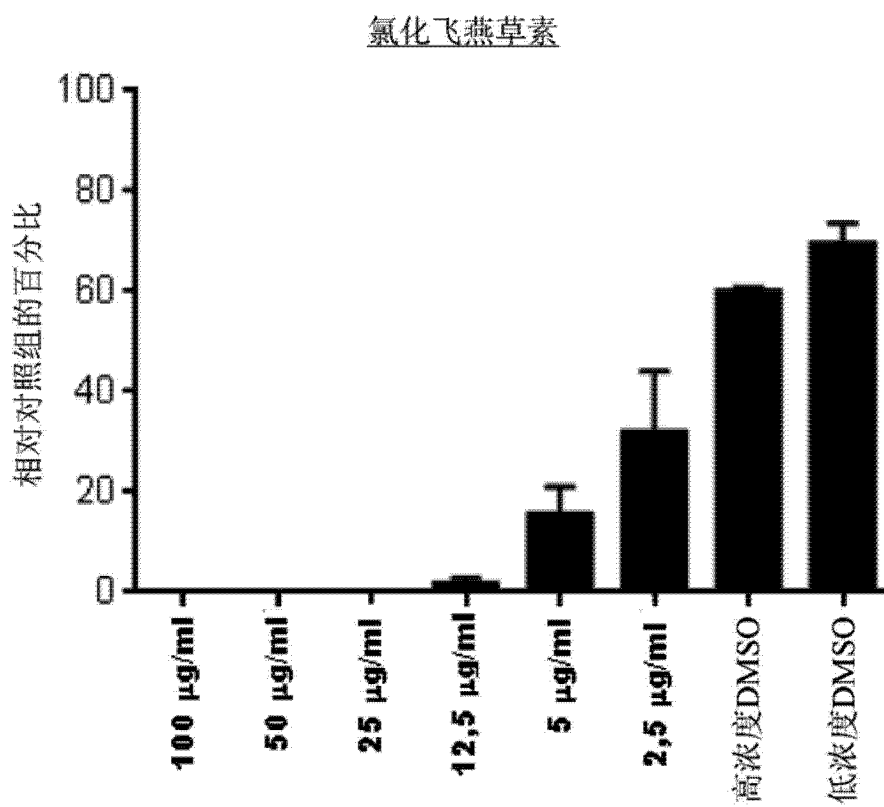
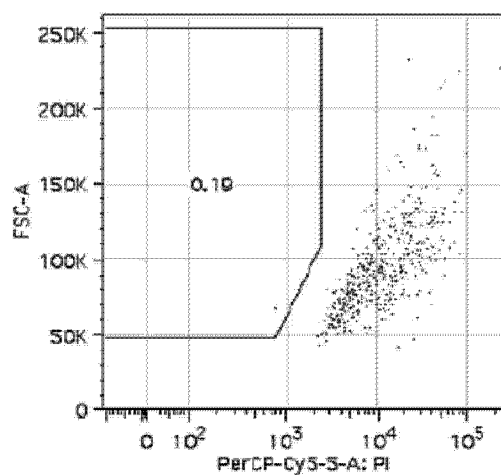
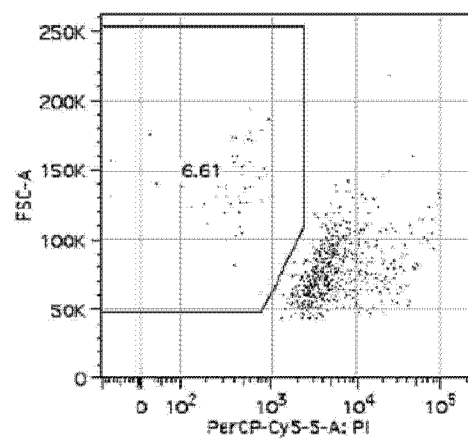


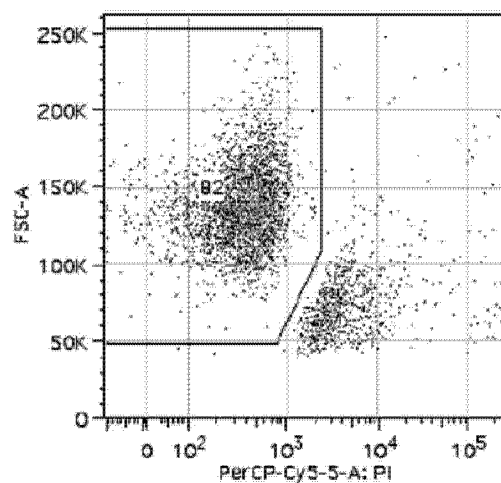
图 11



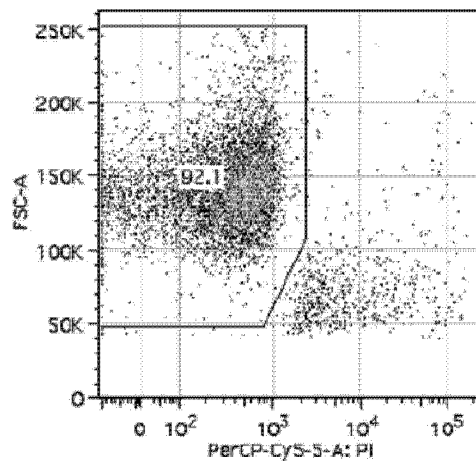
5 mg/ml 飞燕草素+SBEB CD



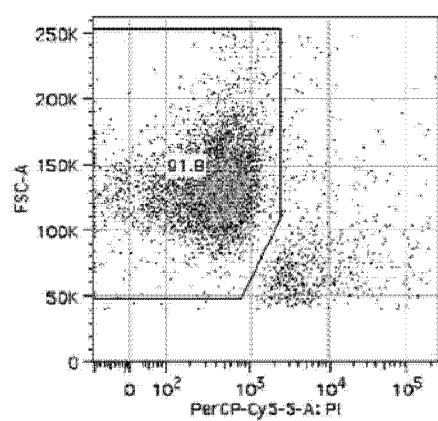
1.25 mg/ml 飞燕草素+SBEB CD



0.5 mg/ml 飞燕草素+SBEB CD



0.005 mg/ml 飞燕草素+SBEB CD



对照组

图 12

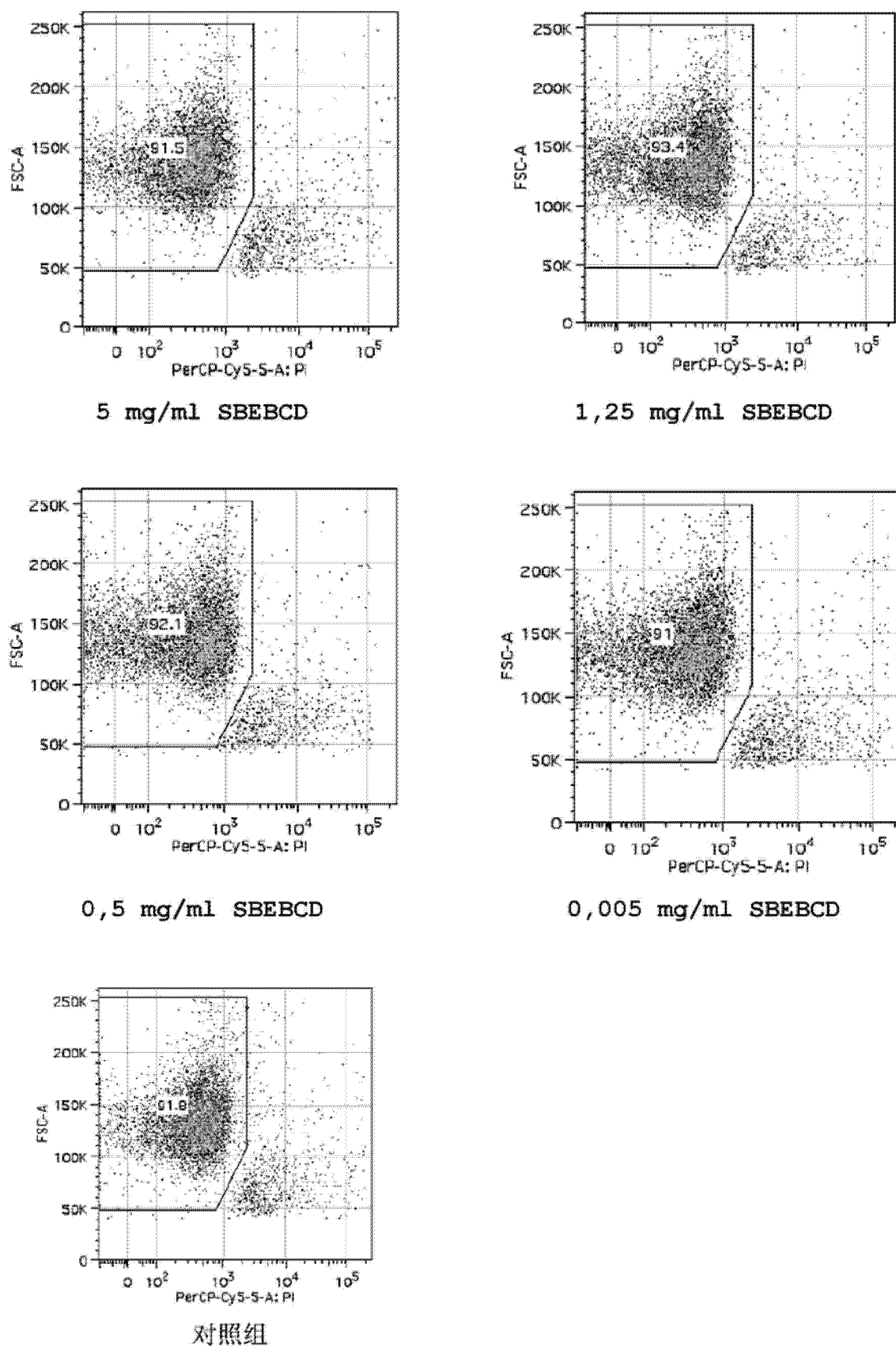


图 13

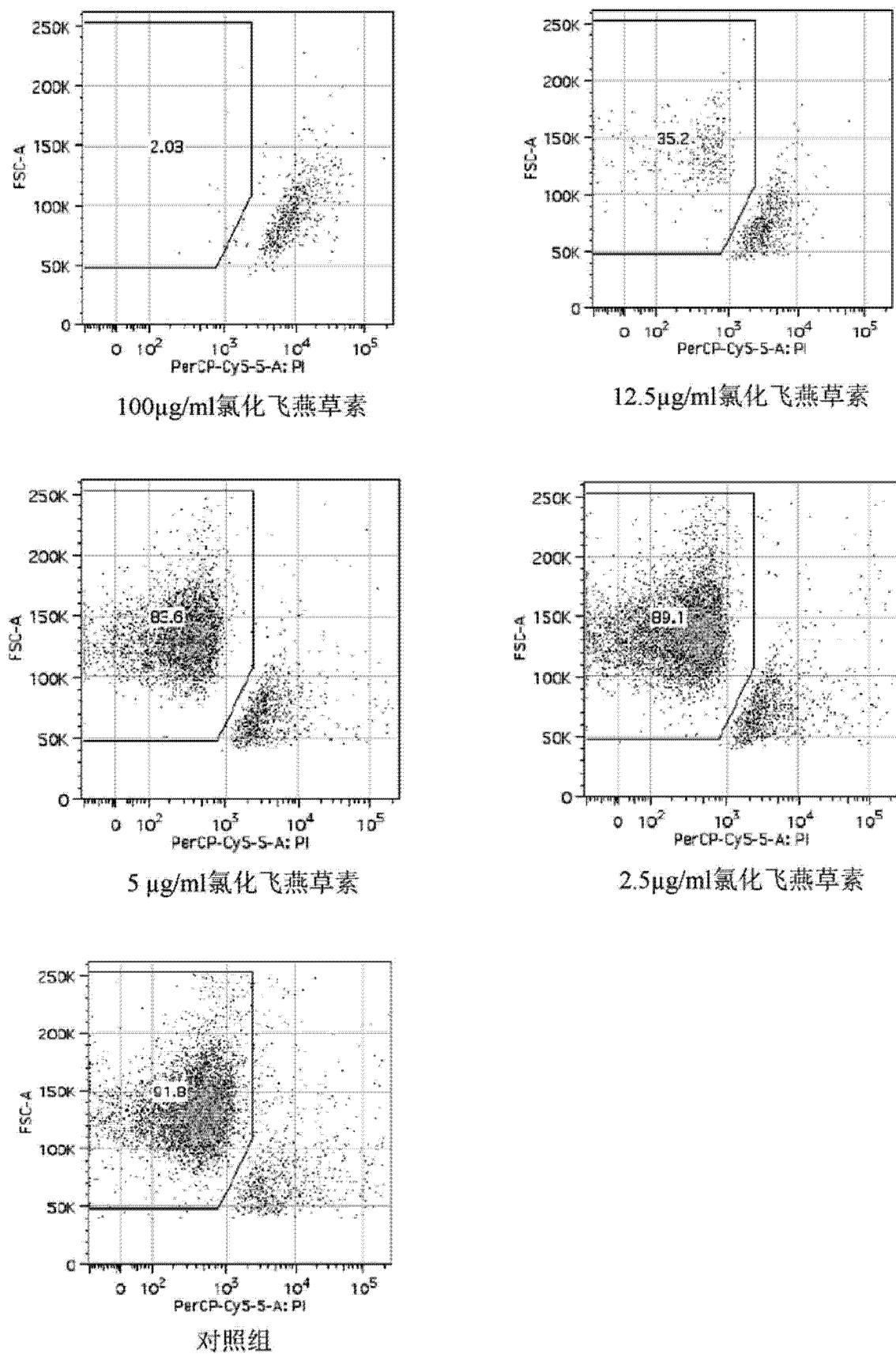


图 14

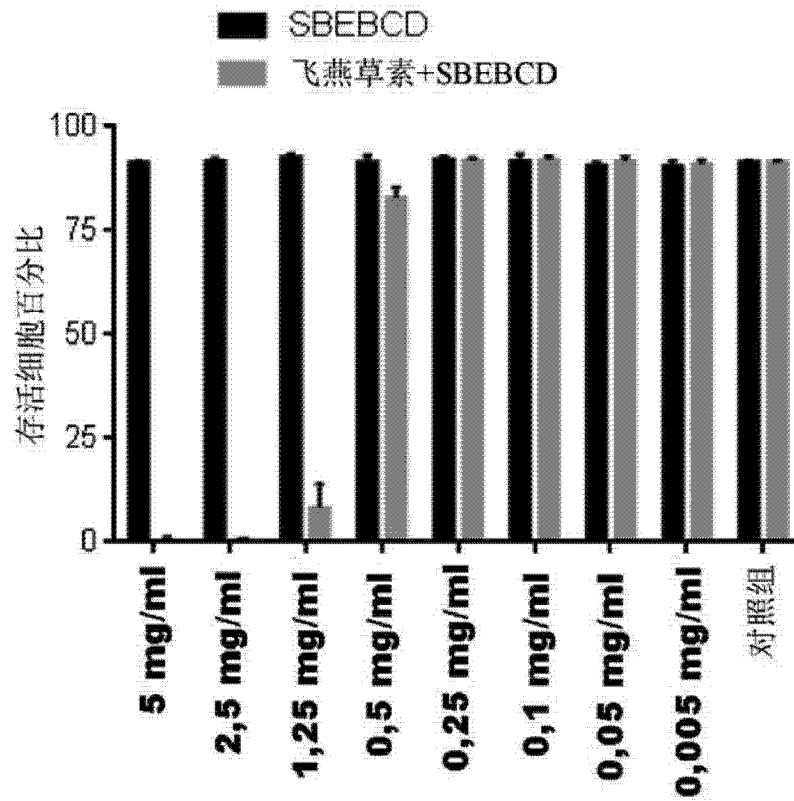


图 15

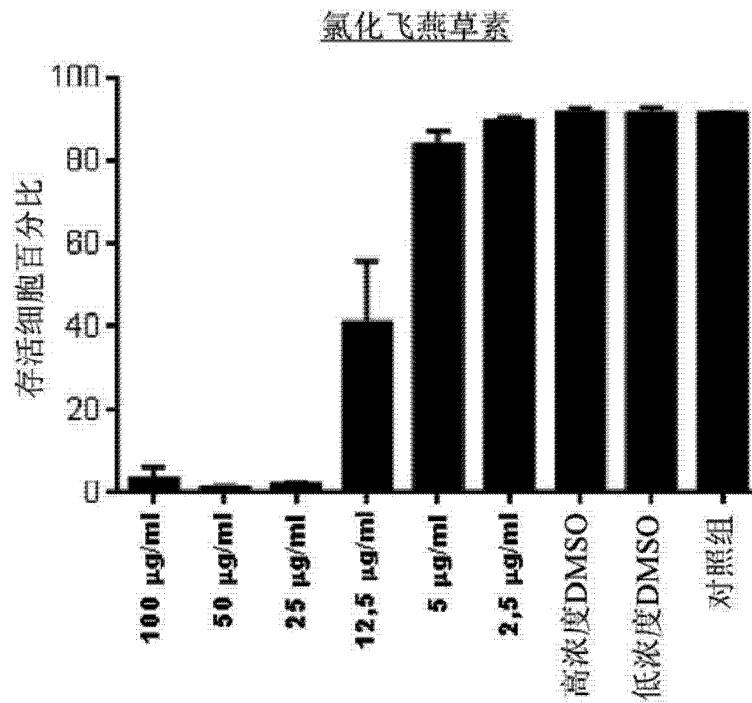


图 16