



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103880929 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201410133237. 7

C07K 1/16(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 04. 03

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号
申请人 香港中文大学中医中药研究所

(72) 发明人 谭宁华 刘碧珊 汪哲 赵思蒙
余嘉莉 梁恺颖 陈小强 冯国培
梁秉中

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

C07K 7/64(2006. 01)

C07K 9/00(2006. 01)

A61K 38/12(2006. 01)

A61K 38/14(2006. 01)

A61P 35/04(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

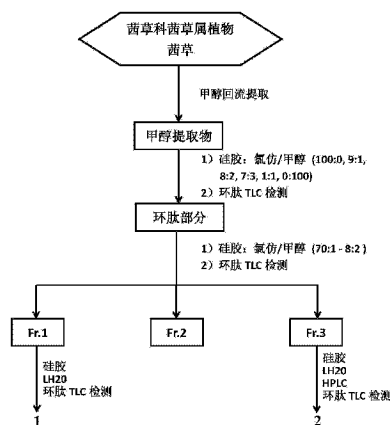
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

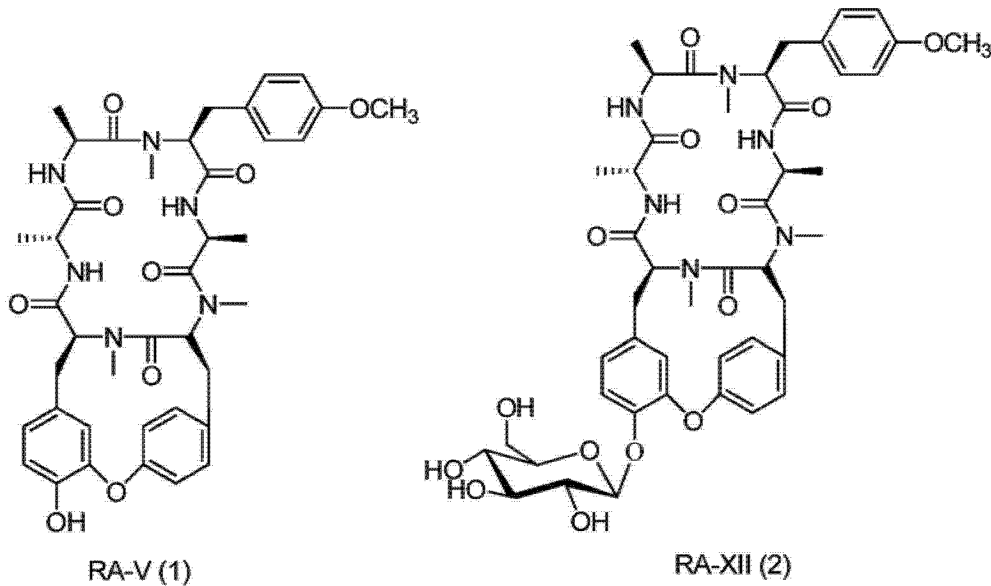
茜草科类型环肽用作为肿瘤转移抑制剂和其
制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供用茜草科类型环肽化合物
RA - V(1) 及其配糖体 RA - XII(2) 作为肿瘤转移
抑制剂,以其为活性成分的药物组合物,此类化合
物的制备方法及其在制备抗肿瘤转移药物中的应
用。本发明的方法能快捷分离得到环肽,样品损失
少,成本较低,操作方便,可控性和重现性好,溶剂
可以反复回收利用,适用于工业生产。



1. 以下述结构式所示的茜草科类型环肽 RA -V(1) 和 RA -XII(2) 或其药理学上容许的盐为有效成分的肿瘤转移抑制剂,



2. 用权利要求 1 中的茜草科植物中的茜草科类型环肽 RA -V(1) 和 RA -XII(2) 作为肿瘤转移抑制剂。

3. 抗肿瘤转移的药物组合物,其中含有治疗有效量的权利要求 1 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐和药学上可接受的载体。

4. 权利要求 1 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备肿瘤转移抑制剂中的应用。

5. 权利要求 1 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

6. 制备权利要求 1 所述的茜草科类型环肽化合物的方法,取茜草属植物的根茎,经干燥、粉碎后,通过甲醇回流充分提取,得甲醇浸膏;结合环肽的 TLC 检测方法,利用硅胶、Sephadex LH - 20 和 HPLC 等各种分离材料和技术进行分离纯化,即得到茜草科类型环肽。

7. 制备权利要求 1 所述的茜草科类型环肽化合物 RA -V(1) 和 RA -XII(2) 的方法,取茜草科植物茜草 (*Rubia cordifolia* L.) 的根茎,经干燥、粉碎后,利用甲醇热回流提取 3 次,每次时间为 3-4 小时,提取液经减压浓缩得甲醇浸膏;甲醇浸膏经硅胶柱层析,用氯仿 / 甲醇(100:0,9:1,8:2,7:3,1:1,0:100) 梯度洗脱,通过环肽 TLC 检测方法合并各馏分得总环肽部位;以下的每一步骤都须结合环肽 TLC 检测方法来进行分离纯化;总环肽部位经硅胶柱层析,用 70:1-8:2 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,根据环肽点的不同合并为三个组分 Fr. 1-Fr. 3;对 Fr. 1 组分经硅胶柱层析,用 7:3-0:1 石油醚 / 丙酮为洗脱剂分离得到三个亚组分 Fr. 1-1 - Fr. 1-3;其中 Fr. 1-3 亚组分经 Sephadex LH - 20 凝胶柱层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,所富集的含有环肽的部分再经硅胶柱层析,用 1:1 的石油醚 / 丙酮洗脱分离得到化合物 RA -V(1);Fr. 3 组分经硅胶柱层析,10:1-8:2 乙酸乙酯 / 甲醇进行梯度洗脱,合并得到四个亚组分 Fr. 4-1 - Fr. 4-4;Fr. 4-3 亚组分以 1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂直接经 Sephadex LH - 20 进行环肽富集;再经硅胶柱层析,95:5-0:1 氯仿 / 甲醇梯度洗脱,合

并得到三个亚组分 Fr. 4 - 3 - 1 - Fr. 4 - 3 - 3 ; 利用 HPLC 对 Fr. 4 - 3 - 3 亚组分进行分离, 即可得到化合物 RA - XII (2)。

茜草科类型环肽用作为肿瘤转移抑制剂和其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物技术领域,具体地,涉及一类茜草科类型环肽用作为肿瘤转移抑制剂,以其为有效成分的药物组合物,其制备方法及其在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

背景技术

[0002] 肿瘤是机体在各种致癌因素下,局部组织的细胞在基因水平上失去了对其生长的正常调控,导致细胞异常增生而形成的新生物。一般将肿瘤分为良性和恶性两大类。恶性肿瘤包括癌和肉瘤,是严重威胁人类生命健康的主要疾病之一。据世界卫生组织公布的统计数据,我国恶性肿瘤的发病率为 299.12/10 万,城市高于农村;死亡率为 184.67/10 万,农村高于城市;但无论城市还是农村,恶性肿瘤都是人类死亡的主要原因之一。因此,抗癌药物的研究已成为本世纪新药研发的重要方向。

[0003] 肿瘤转移是恶性肿瘤的最本质的生物学行为,表现为肿瘤细胞从原发部位迁徙至新的场所并克隆性增生的过程,是一个高选择的系列事件动态变化的阶梯式生物过程,主要包括以下几个步骤:①原发瘤扩张性生长;②肿瘤细胞黏附,降解肿瘤细胞周围基底膜;③穿透血管进入循环系统,随血液到达靶部位并黏附外渗进入组织实质;④肿瘤细胞在继发位点存活和生长,形成转移灶。大多数癌症患者死于转移性癌而非原发性癌。据统计,恶性肿瘤患者初次诊断时转移率达 60%,临床上 80-90% 肿瘤患者因肿瘤发生转移而死,肿瘤转移已成为引起癌症患者死亡的首要因素。目前,虽有一些抗肿瘤转移药物在临床上应用,如阿瓦斯汀、恩度等,但毒副作用大、易产生耐药等问题而导致治疗效率降低;因此,开发抗肿瘤转移药物具有极为重要的现实意义。

[0004] 现有技术中未见有茜草科类型环肽作为肿瘤转移抑制剂的报道。

[0005] 茜草科类型环肽的分离纯化较为困难,具有一定的特点,主要是因为茜草属的植物富含蒽醌类色素且极性分布范围广,很难得到纯度较高的环肽类成分。在现有技术中,从茜草属植物中分离环肽类成分已公开发表若干种方法,这些方法普遍存在样品损失量大,溶剂成本高、可控性和重复性差等缺点,如 Lee, J. E 等报道,用甲醇提取茜草科茜草的根后,得甲醇浸膏,加水混悬后用氯仿萃取,氯仿部分依次用硅胶、氧化铝、氨丙基键和硅胶色谱柱层析得到环肽富集部分,重结晶富集环肽,再结合各种手段对结晶或母液进行分离纯化,得到一系列环肽,包括大量和微量环肽 [Lee, J. E. et al. Structures of cytotoxic bicyclic hexapeptides, RA - XIX, - XX, - XXI, and - XXII, from *Rubia cordifolia* L. Tetrahedron., 2008, 64, 4117 - 4125], 其缺点在于样品损失量大,过程过于复杂,分离成本高且重结晶技术可控性和重现性不好。

发明内容:

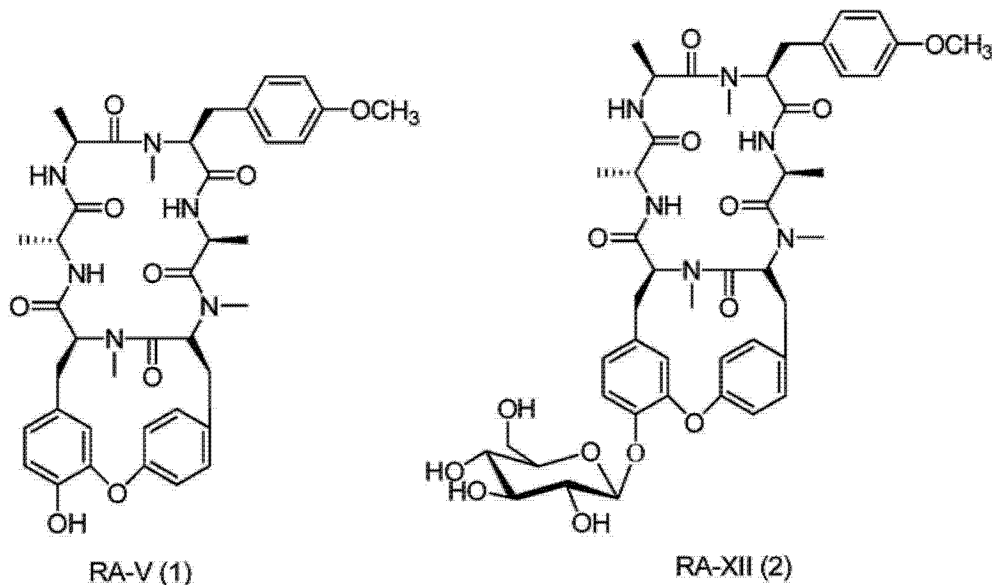
[0006] 针对现有技术存在的上述不足之处,本发明的目的在于提供一类茜草科类型环肽化合物;提供制备该类化合物的方法,该方法能快捷分离得到环肽,样品损失少,成本较低,

操作方便,可控性和重现性好,溶剂可以反复回收利用,也适用于工业生产;本发明的目的还在于提供以茜草科类型环肽化合物为有效成分的药物组合物;该类化合物及其组合物在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0008] 以下述结构式所示的茜草科类型环肽 RA - V(1) 和 RA - XII(2) 或其药理学上容许的盐为有效成分的肿瘤转移抑制剂,

[0009]



[0010] 用茜草科植物中的茜草科类型环肽 RA - V(1) 和 RA - XII(2) 作为肿瘤转移抑制剂。

[0011] 抗肿瘤转移的药物组合物,其中含有治疗有效量的所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐和药学上可接受的载体。

[0012] 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备肿瘤转移抑制剂中的应用。

[0013] 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

[0014] 制备所述的茜草科类型环肽化合物的方法,取茜草属植物的根茎,经干燥、粉碎后,通过甲醇回流充分提取,得甲醇浸膏;结合环肽的 TLC 检测方法,利用硅胶、Sephadex LH - 20 和 HPLC 等各种分离材料和技术进行分离纯化,即得到茜草科类型环肽。

[0015] 更具体地制备所述的茜草科类型环肽化合物 RA - V(1) 和 RA - XII(2) 的方法为,取茜草科植物茜草 (*Rubia cordifolia* L.) 的根茎,经干燥、粉碎后,利用甲醇热回流提取 3 次,每次时间为 3-4 小时,提取液经减压浓缩得甲醇浸膏;甲醇浸膏经硅胶柱层析,用氯仿 / 甲醇(100:0,9:1,8:2,7:3,1:1,0:100) 梯度洗脱,通过环肽 TLC 检测方法合并各馏分得总环肽部位;以下的每一步骤都须结合环肽 TLC 检测方法来进行分离纯化;总环肽部位经硅胶柱层析,用 70:1-8:2 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,根据环肽点的不同合并为三个组分 Fr. 1-Fr. 3;对 Fr. 1 组分经硅胶柱层析,用 7:3-0:1 石油醚 / 丙酮为洗脱剂分离得到三个亚组分 Fr. 1 - 1 - Fr. 1 - 3;其中 Fr. 1-3 亚组分经 Sephadex LH - 20 凝胶柱层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,所富集的含有环肽的部分再经硅胶柱层析,用 1:1 的石油醚 / 丙酮洗脱分离得到化合物 RA - V(1);Fr. 3 组分经硅胶柱层析,10:1-8:2 乙酸乙酯 / 甲醇进行梯度洗脱,

合并得到四个亚组分 Fr. 4 - 1 - Fr. 4 - 4 ;Fr. 4 - 3 亚组分以 1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂直接经 Sephadex LH - 20 进行环肽富集 ;再经硅胶柱层析,95:5-0:1 氯仿 / 甲醇梯度洗脱,合并得到三个亚组分 Fr. 4 - 3 - 1 - Fr. 4 - 3 - 3 ;利用 HPLC 对 Fr. 4 - 3 - 3 亚组分进行分离,即可得到化合物 RA - XII (2)。

[0016] 本发明对茜草科茜草属植物茜草进行系统的环肽化学成分研究,利用多种分离纯化手段,包括硅胶柱层析, Sephadex LH - 20 凝胶柱层析, 高效液相色谱等, 从中获得了一系列茜草科类型环肽。之后,对环肽 RA-V (1) 和 RA-XII (2) 在人源 (MDA-MB-231) 和鼠源 (4T1) 高侵袭性乳腺癌细胞株模型上检测细胞增殖、迁移及侵袭抑制活性,用明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶 (MMP) 抑制活性,以及用免疫印迹法检测 PI3K 及 FAK 信号通路分子表达,发现该类环肽为 PI3K 及 FAK 信号通路的抑制剂;还对环肽 RA - XII (2) 在荷瘤小鼠(乳腺癌细胞株,4T1) 上检测对肿瘤转移过程的影响,发现该类环肽为一类新型的肿瘤转移天然抑制剂。

[0017] 本发明的所述茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐,可以列举例如与盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸等无机酸,或者马来酸、富马酸、酒石酸、乳酸、柠檬酸、乙酸、甲磺酸、对 - 苯甲磺酸、己二酸、棕榈酸、单宁酸等有机酸,锂,钠、钾等碱金属,钙、镁等碱土金属,赖氨酸等碱性氨基酸成的盐。

[0018] 本发明所述的治疗肿瘤转移相关疾病的药物组合物,由茜草科类型环肽化合物与药学上可接受的载体制备的药物剂型包括片剂、胶囊、口服液、针剂、注射用冻干剂或粉针剂等。由于茜草科类型环肽可从茜草以及同属植物中提取分离,而片剂、胶囊、口服液、针剂、注射用冻干剂或粉针剂等药物剂型的制备也是本领域的常规知识。因此。由茜草科类型环肽化合物与相应载体制备的各种药物剂型也能够由本领域技术人员实现。

[0019] 上文中所述的药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体,例如:稀释剂、赋形剂如水等,填充剂如淀粉、蔗糖等;黏合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂如季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂黏土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和硬脂酸镁、以及聚乙二醇等。另外还可以在组合物中加入其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

[0020] 本发明化合物可以以组合物的形式通过口服、鼻吸入、直肠或肠胃外给药的方式施用于需要这种治疗的患者。用于口服时,可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂、胶囊等,制成液体制剂如水或油悬浮剂或其他液体制剂如糖浆、酞剂等;用于肠胃外给药时,可将其制成注射用的溶液、水或油性悬浮剂等。本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如使活性成分与一种或多种载体混合,然后将其制成所需的剂型。

[0021] 本发明的药物组合物优选含有重量比为 0.1% ~ 99.5% 的活性成分,最优选含有重量比为 0.5% ~ 95% 的活性成分。

[0022] 本发明化合物的施用量可根据用药途径、患者的年龄、体重、所治疗的疾病的类型和严重程度等变化,其日剂量可以是 0.01 ~ 10mg/kg 体重,优选 0.1 ~ 5mg/kg 体重。可以一次或多次施用。

[0023] 本发明茜草科类型环肽提取方法的优益性在于,首先提取分离思路具有新颖性,成功利用色谱层析技术最大限度的除去蒽醌色素,得到非常高纯度的茜草科类型环肽。概

括地说,甲醇浸膏直接经硅胶柱层析,无需萃取,既简化了分离过程,又减少了样品损失;通过正相硅胶柱层析可以简便的除去部分色素;利用 Sephadex LH-20 凝胶色谱,可分开一部分与环肽分子量相差很大的蒽醌类成分,同时快速富集环肽;利用高效液相色谱(HPLC)制备柱纯化技术,即可成功分离得到环肽。另外,本方法仅利用实验室或工业上常规的层析材料,包括正相硅胶、Sephadex LH-20 等。总之,本发明提取分离方法可控性和重现性好,样品损失少,成本较低,操作方便,可分离得到微量环肽,溶剂可以反复回收利用,也适用于工业生产。

附图说明:

[0024] 图 1 为本发明的茜草科类型环肽化合物的制备方法流程图;

[0025] 图 2 为本发明的茜草科类型环肽化合物体外抗肿瘤转移活性实验;

[0026] 图 3 为本发明的茜草科类型环肽化合物体内抗肿瘤转移活性试验。

具体实施方式:

[0027] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。根据本发明的实质对本发明进行的改进都属于本发明的范围。

[0028] 实施例 1:

[0029] 茜草科类型环肽化合物 RA-V(1) 和 RA-XII(2) 制备方法:

[0030] 取茜草的根茎 13kg,经干燥、粉碎后,甲醇回流提取 3 次(20L×3 次),时间为 4h、4h、3h,提取液经减压浓缩得甲醇浸膏 1.89kg。甲醇浸膏经硅胶柱层析,用氯仿/甲醇(100:0,9:1,8:2,7:3,1:1,0:100)梯度洗脱,通过环肽 TLC 检测方法合并各馏分得总环肽部位(94.5g);以下的每一步骤都须结合环肽 TLC 检测方法来进行分离纯化;总环肽部位经硅胶柱层析,用 70:1-8:2 的氯仿/甲醇梯度洗脱,根据环肽点的不同合并为三个组分 Fr.1-Fr.3;对 Fr.1(5g)组分经硅胶柱层析,用 7:3-0:1 石油醚/丙酮为洗脱剂分离得到三个亚组分 Fr.1-1-Fr.1-3;其中 Fr.1-3(1.2g)亚组分经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂,所富集的含有环肽的部分(154mg)再经硅胶柱层析,用 1:1 的石油醚/丙酮洗脱分离得到化合物 RA-V(1)(84mg);Fr.3(14g)组分经硅胶柱层析,10:1-8:2 乙酸乙酯/甲醇进行梯度洗脱,合并得到四个亚组分 Fr.4-1-Fr.4-4;Fr.4-3(3.3g)亚组分以 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂直接经 Sephadex LH-20 进行环肽富集;再经硅胶柱层析,95:5-0:1 氯仿/甲醇梯度洗脱,合并得到三个亚组分 Fr.4-3-1-Fr.4-3-3;Fr.4-3-3(594mg)亚组分经 ODS HPLC 制备柱纯化,30% 乙腈为洗脱剂,即得到化合物 RA-XII(2)(296mg)。

[0031] 实施例 2:

[0032] 本发明的茜草科类型环肽 RA-V(1)和 RA-XII(2)在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 或 4T1 细胞上用明胶酶谱法检测所有环肽对基质金属蛋白酶(MMP)的抑制活性,以及用免疫印迹法检测所有环肽对 PI3K 和 FAK 信号通路的抑制活性。实验原理、方法和结果如下:

[0033] 实验原理:基质金属蛋白酶(MMP)是由正常细胞和肿瘤细胞产生,能降解基底膜的水解酶。而肿瘤细胞的 MMP 常过表达并降解基底膜及细胞外基质,导致肿瘤的侵袭或转移。因此检测化合物能否下调 MMP 的活性水平,从而探讨其对肿瘤细胞侵袭或转移能力的

抑制作用。另外,PI3K 及 FAK 信号通路能调控与转移相关的下游分子的表达及作用。通过考察化合物对激活与非激活信号通路相关分子表达变化即可反映出化合物对信号通路的调控能力。

[0034] 实验方法:

[0035] (1) 明胶酶谱法检测:MDA - MB - 231 或 4T1 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 或 RPMI 培养液将细胞配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^5 个细胞接种到 24 孔板。细胞培养 24h 后,先加入待测化合物溶液 [环肽 RA - V(1) 浓度为 6.25 和 12.5nM;环肽 RA - XII(2) 浓度为 12.5 和 25nM],培养 48 或 72h。取经药物处理 48 或 72h 后各实验组的细胞上清为实验对象,上样于含 0.1% 明胶的 10%SDS - PAGE 进行电泳。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液中振荡洗脱 2 次,每次 1h。随后将凝胶置于孵育液中 37℃ 孵育 20h,孵育结束后,经考马斯亮蓝 (coomassie blue) 染色并脱色,显示出 MMP 为位于蓝色背景上的透明条带,采集图像 (ChemiDoc XRS+, Bio - Rad, USA) 并利用图像分析系统 Image J (NIH, USA) 分析活性条带灰度值。

[0036] (2) 免疫印迹法检测:MDA - MB - 231 或 4T1 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 或 RPMI 培养液将细胞配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^6 个细胞接种到 100mm 培养皿。细胞培养 24h 后,先加入待测化合物溶液 [环肽 RA - V(1) 浓度为 6.25 和 12.5nM;环肽 RA - XII(2) 浓度为 12.5 和 25nM],培养 8、16、24 或 48h。取经药物处理不同时间后,分别收集各组细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品,经 10%SDS - PAGE 分离后,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶室温封闭 2h;分别加入单克隆抗体 (mAb),4℃ 孵育过夜;TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 2h;ECL 显色剂显色,采集图像 (ChemiDoc XRS+, Bio - Rad, USA) 并利用图像分析系统 Image J (NIH, USA) 分析结果。

[0037] 实验结果见图 2。实验结果表明,环肽 RA - V(1) 和 RA - XII(2) 分别在 MDA - MB - 231 及 4T1 细胞中抑制 MMP - 9 的活性、并具有下调 PI3K 及 FAK 信号通路分子表达的活性。酶谱法检测结果显示,经处理 24h 后,6.25nM RA - V (1) 和 12.5nM RA - XII (2) 分别显著抑制 MDA - MB - 231 和 4T1 细胞的 MMP - 9 活性,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性,见图 2A 及 2B。免疫印迹法检测结果显示,不同浓度 RA - V (1) 处理 MDA - MB - 231 细胞 24h 后,随着 RA - V (1) 浓度的增加,对 FAK、磷酸化 PI3K 及 PI3K 蛋白表达的抑制作用越明显,见图 2C。用 100nM RA - XII (2) 处理 4T1 细胞 8、16、24 和 48h 后,结果显示,RA - XII (2) 在不同时间段对 PI3K 及 FAK 蛋白的表达均有抑制作用,见图 2D。其中 RA - V (1) 活性较强,在低剂量 6.25nM 亦能显示其抑制作用,以上结果表明,茜草科类型环肽为一类 PI3K 及 FAK 信号通路的天然抑制剂。

[0038] 实施例 3:

[0039] 本发明的茜草科类型环肽 RA - XII (2) 在荷瘤小鼠 (乳腺癌细胞株,4T1) 上检测化合物对肿瘤转移过程中的影响。实验原理、方法和结果如下:

[0040] 实验原理:利用小鼠源乳腺癌细胞株 (4T1) 在原位同种移植于 Balb/c 小鼠体内,用以检测化合物对荷瘤小鼠在肿瘤转移过程中的影响。4T1 在注射部位形成始发灶,并自发产生高转移肿瘤,可转移到肺、肝、淋巴结和骨,可作为研究肿瘤转移的理想动物体内模型。

[0041] 实验方法:收集生长良好 4T1 细胞,调整浓度为 1×10^5 个细胞接种于 Balb/c 雌性小鼠右侧乳腺脂肪垫,建立原位乳腺癌模型,接种后 7 天,检查 4T1 肿瘤的生长情况,成功接

种的荷瘤小鼠随机分组,分别接受生理盐水或不同剂量的 RA - XII (2) 5mg/kg、10mg/kg 或 20mg/kg 尾静脉注射,每周两次,连续 3 周。每周检视肿瘤情况、纪录体重变化及动物的精神状态及行为的改变。实验完成时,将收取肿瘤、肺、肝。收取的器官经固定、切片、染色,检视肿瘤转移的情况。

[0042] 实验结果见图 3。实验结果表明,小鼠乳腺原位接种 4T1 细胞,4T1 细胞在小鼠乳腺脂肪垫成功形成原位乳腺肿瘤;RA - XII (2) 尾静脉注射治疗后,检测结果显示 5mg/kg、10mg/kg 或 20mg/kg 剂量均明显抑制小鼠 4T1 实体瘤的生长,原位肿瘤体积和重量明显降低,其中高剂量(20mg/kg)治疗组与对照组比较,差异最明显,有统计学意义($P < 0.01$),见图 3A。给予高剂量(20mg/kg)的小鼠乳腺癌肺转移明显减少($P < 0.05$),见图 3B。低剂量组小鼠乳腺癌肝转移亦有明显减少的趋势($P < 0.05$),见图 3C。以上结果表明,茜草科类型环肽为一类新型的肿瘤转移天然抑制剂。

[0043] 实施例 4:

[0044] 实施例 1 所得化合物 1, 2, 加入 4% 的硫酸乙醇溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成硫酸盐化合物 1, 2。

[0045] 实施例 5:

[0046] 实施例 1 所得化合物 1, 2, 加入 4% 的盐酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成盐酸盐化合物 1, 2。

[0047] 实施例 6:

[0048] 实施例 1 所得化合物 1, 2, 加入 4% 的酒石酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成酒石酸盐化合物 1, 2。

[0049] 实施例 7:

[0050] 实施例 1 所得化合物 1, 2, 加入 4% 的柠檬酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成柠檬酸盐化合物 1, 2。

[0051] 实施例 8:

[0052] 片剂: 实施例 1 所得化合物 1 和 2 或实施例 3 - 6 所得的盐 10mg, 乳糖 180mg, 淀粉 55mg, 硬脂酸镁 5mg。

[0053] 制备方法: 将化合物或其盐、乳糖和淀粉混和, 用水均匀湿润、把湿润后的混合物过筛并干燥, 再过筛, 加入硬脂酸镁, 然后将混合物压片, 每片重 250mg, 化合物含量为 10mg。

[0054] 实施例 9:

[0055] 安瓿剂: 实施例 1 所得化合物 1, 2 或实施例 3 - 6 所得的盐 2mg, 氯化钠 10mg。

[0056] 制备方法: 将化合物或其盐和氯化钠溶解于适量的注射用水中, 过滤所得溶液, 在无菌条件下装入安瓿瓶中。

[0057] 实施例 10:

[0058] 注射用冻干剂: 实施例 1 所得化合物 1, 2 或实施例 3 - 6 所得的盐 10mg, 碳酸氢钠 2mg, 甘露醇 252mg。

[0059] 制备方法: 将碳酸氢钠、甘露醇, 加注射用水溶解, 加活性炭吸附 30min 除热原, 过滤除去活性炭, 在滤液中加入化合物或其盐, 超声处理使溶解, 用 1N 盐酸调节 PH 为 5.0 - 7.0, 微孔滤膜滤过, 加注射用水, 分装, 冷冻干燥, 上塞, 轧盖, 即得。

[0060] 实施例 11 :

[0061] 胶囊剂 : 实施例 1 所得化合物 1, 2 或实施例 3 -6 所得的盐 10mg, 乳糖 187mg, 硬脂酸镁 3mg。

[0062] 制备方法 : 将化合物或其盐与助溶剂混和, 过筛, 均匀混合, 把得到的混合物装入硬明胶胶囊, 每个胶囊重 200mg, 活性成分含量为 10mg。

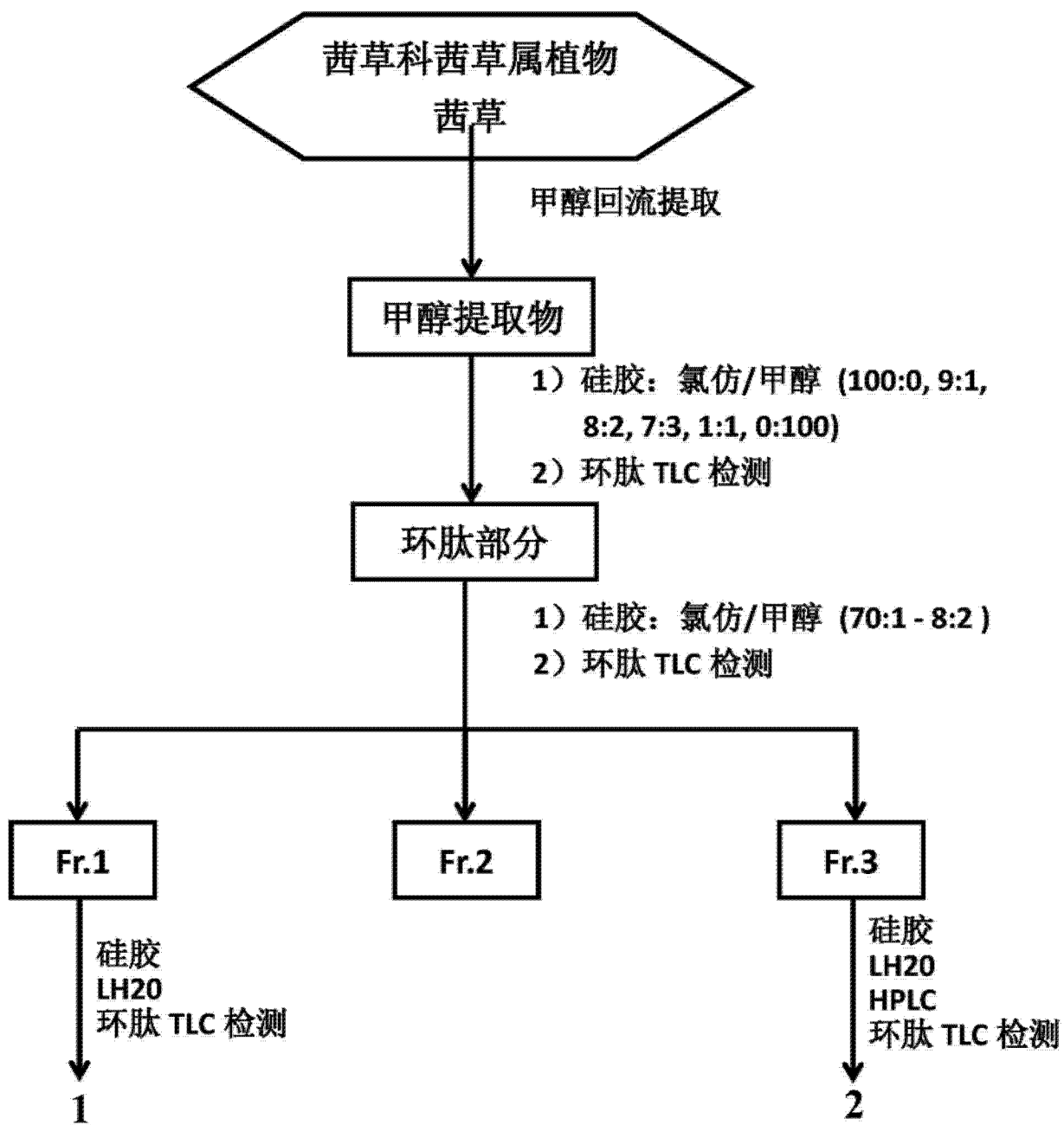


图 1

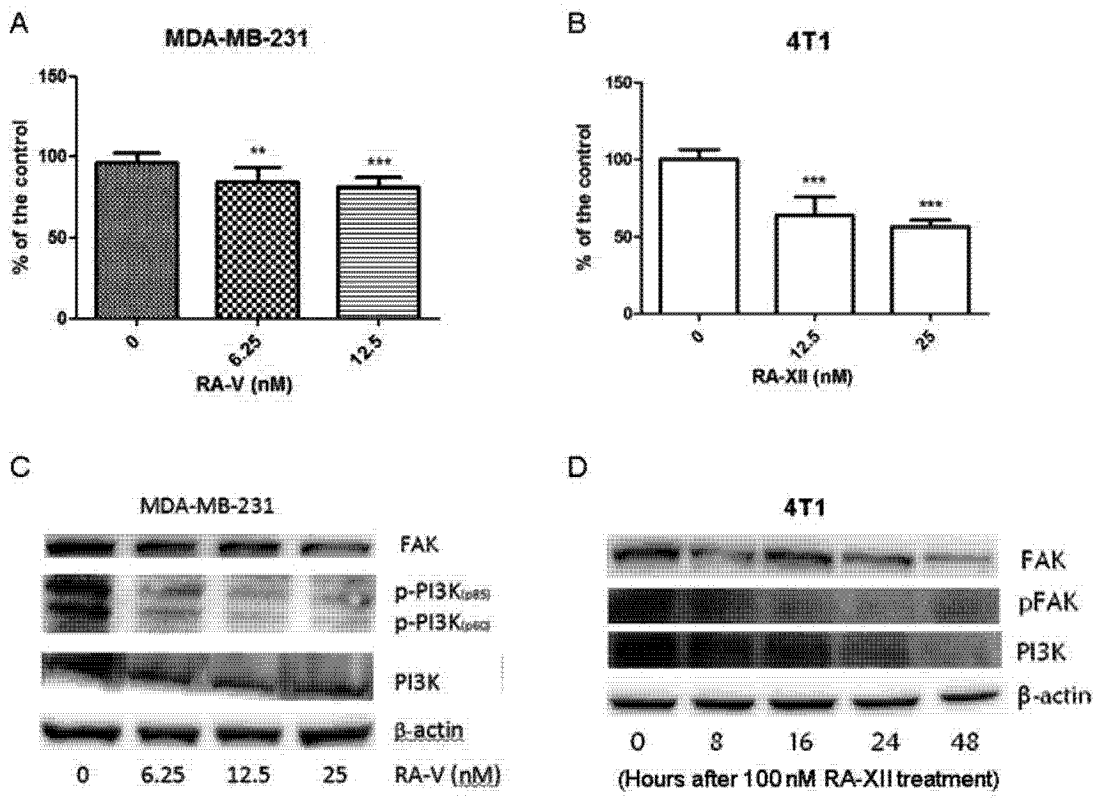


图 2

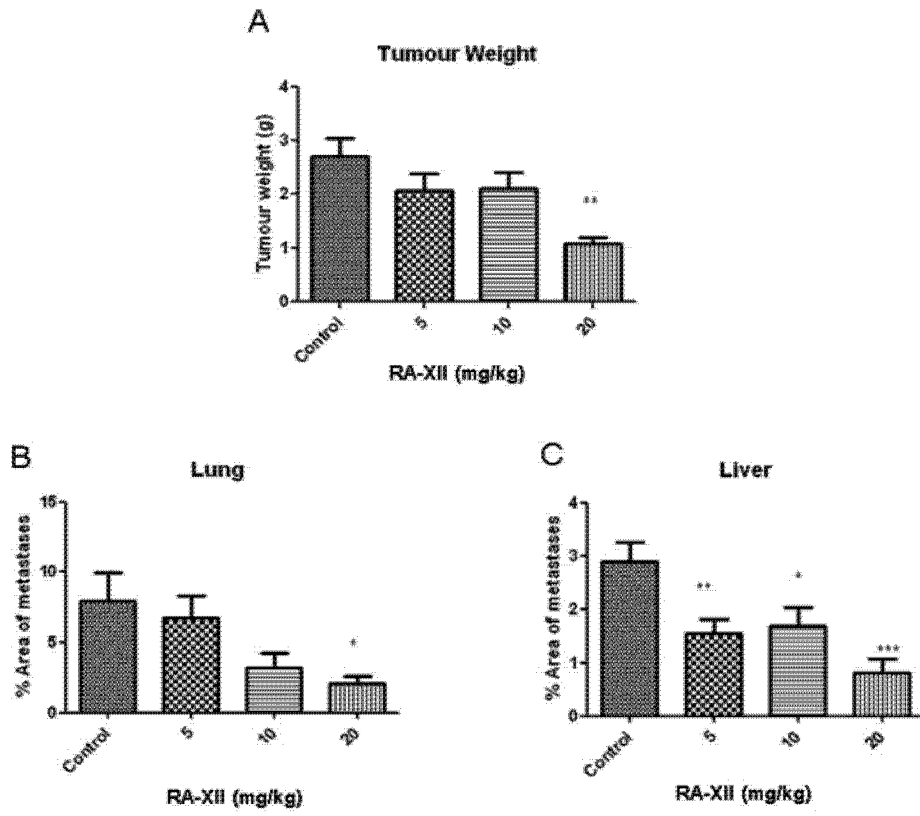


图 3