



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107898775 A

(43)申请公布日 2018.04.13

(21)申请号 201711042012.0

(22)申请日 2017.10.24

(71)申请人 李翀

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所

(72)发明人 李翀 李书成

(74)专利代理机构 北京创遇知识产权代理有限公司 11577

代理人 武媛 吕学文

(51)Int.Cl.

A61K 31/136(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

A61P 13/10(2006.01)

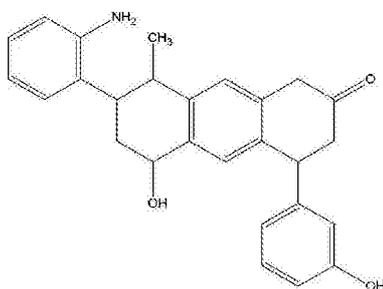
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

iBC2化合物在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用

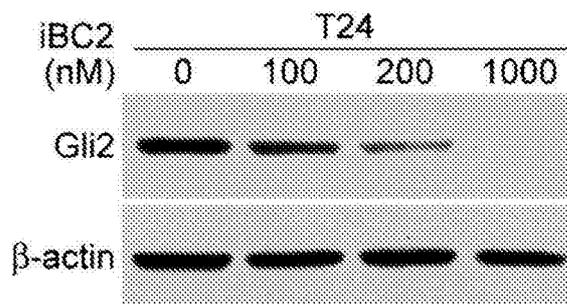
(57)摘要

本发明公开了一种如下式I所示的iBC2化合物在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用,式I:

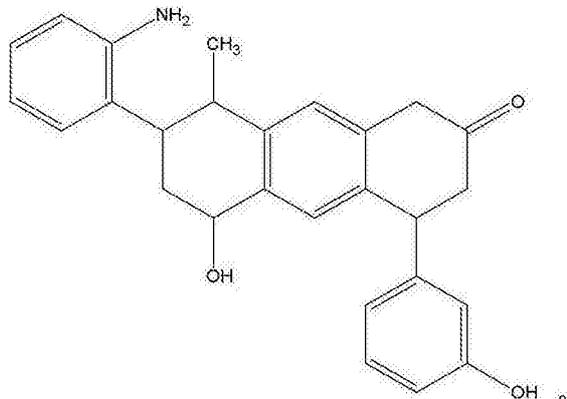


本发明的iBC2化

合物能够显著抑制膀胱癌肿瘤细胞的增殖、迁移和粘附,显著下调膀胱癌细胞Gli2的表达并促进膀胱癌细胞凋亡,其可作为有效的膀胱癌治疗的有效药物成分。



1. 一种如下式I所示的iBC2化合物在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用,式I:



2. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述治疗包括抑制膀胱癌干细胞的增殖。

3. 根据权利要求2所述的应用,其中,所述药物包括治疗有效量的如式I所示的化合物和药学上可接受的载体。

4. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述药物为口服制剂、注射剂、透皮制剂或者皮下埋制剂。

5. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述iBC2化合物是从链霉菌中分离得到的。

6. 根据权利要求5所述的应用,其中,所述链霉菌为票霉素链霉菌杭州湾变种,拉丁文名称为*Streptomyces piomogeuus* var. *hangzhouwanensis*,菌种保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No. 4029,保藏日期2010年7月20日。

7. 根据权利要求6所述的应用,其中,所述iBC2化合物的制备方法包括以下步骤:

步骤A: 培养所述链霉菌菌种得到发酵液,滤除菌丝体,获得发酵滤液;

步骤B: 将所述发酵滤液用乙酸乙酯提取,并减压浓缩;

步骤C: 将减压浓缩后的滤液上硅胶H湿柱,并通过1:1的2醋酸乙酯-二氯乙烷混合液洗脱,收集洗脱液,并减压浓缩获得浓缩液;

步骤D: 将所述浓缩液经甲醇溶解后,上硅胶H干柱,并通过1:8乙酸乙酯-二氯乙烷混合液洗脱,收集洗脱液,将所述洗脱液减压浓缩,即得到iBC2化合物浓缩液。

8. 根据权利要求7所述的应用,其中,所述步骤D中,所述iBC2化合物经液相色谱纯化得到,其纯化条件为浓缩液经过甲醇-磷酸盐缓冲液洗脱,流速1.0m/min,检测波长为241nm,柱温30℃,上样量为20ul。

9. 根据权利要求7所述的应用,其中,所述步骤A中,所述链霉菌的培养温度为24~33℃,培养的pH值为5~9,培养时间为30~120小时。

iBC2化合物在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物制备技术领域,具体涉及一种iBC2在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用。

背景技术

[0002] 越来越多的证据表明肿瘤干细胞会促进膀胱癌的进展。膀胱癌是一种高度异质性的肿瘤,70%的病人表现为浅表性膀胱癌,而30%的病人则表现为肌层浸润性膀胱癌。浅表性膀胱癌一般是非致死性的,但是易于治疗后复发,并且会进展为浸润性的膀胱癌。浸润性的膀胱癌是致死率高的转移性膀胱癌。在人的原发性膀胱癌中,已经鉴定出膀胱癌干细胞的存在,并且膀胱癌干细胞是浸润性膀胱癌发生、发展、复发和转移的关键。肿瘤干细胞表现出干细胞自我更新和分化的特性,而这些特性也是肿瘤干细胞能够起始和维持肿瘤生长的原因。静息状态的肿瘤干细胞能够逃避细胞死亡,能够抵抗治疗干预并存活下来,最终会导致肿瘤的复发,靶向膀胱癌干细胞可能会达到彻底根除膀胱癌的目的。

[0003] Hedgehog (SHH) 信号通路是调控肿瘤干细胞自我更新的关键信号通路。SHH信号通路以空间位置、时间顺序和浓度依赖的方式调控胚胎发育过程中靶细胞的增殖、迁移和分化。SHH配体结合Ptch1 (Patched) 启动该信号通路的活化;Ptch1组成性的抑制Smo (Smoothened) 的活性;SHH配体结合Ptch之后,Ptch对Smo的抑制被解除,三个转录因子Gli被调节。Gli1是一个转录激活子,而Gli3是一个转录抑制子,而Gli2既可以激活,也可以抑制基因的表达,这取决于转录后和翻译后的修饰形式。激活基因表达和抑制基因表达形式的Glis之间的平衡,导致下游靶基因的表达,比如Ptch1,Gli1和Jag2。在膀胱癌中,Smo的突变以及Gli的持续性激活都被报道过。当收到损伤时,表达sonic hedgehog (SHH) 的膀胱基底细胞,包括膀胱干细胞,均能够分化产生尿道上皮的各种细胞。并且肌层浸润性膀胱癌无一例外的起源于尿道上皮中这些表达SHH的干细胞。因此,SHH信号通路提供了一种靶向膀胱癌干细胞的潜在靶标。

[0004] 在临床治疗癌症患者时,SHH的抑制剂在多种肿瘤的治疗中发挥了积极的作用。SHH抑制剂不仅通过阻断肿瘤细胞内在的信号途径,而且会通过阻断基质细胞外在的信号途径来减少肿瘤增长。

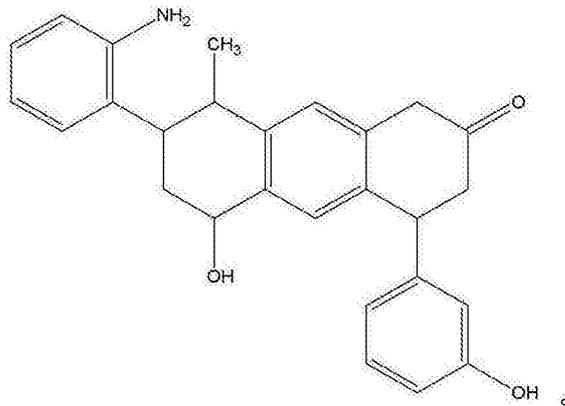
[0005] 大多数SHH抑制剂是靶向SMO的,为了克服对SMO靶向药物的抗性,发展针对SMO下游分子的抑制剂,比如Gli的抑制剂,是非常有必要的。目前,并未发现有针对Gli的抑制剂,因而,研发制备一种针对Gli抑制剂,用于制备预防和治疗膀胱癌药物,是亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种iBC2化合物在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用,用以解决现有技术中没有有效的预防和治疗膀胱癌药物的缺陷。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供一种如下式I所示的iBC2化合物在制备预防和治疗膀胱癌药物中的应用,式I:

[0008]



[0009] 本发明的一个实施例中,其中,所述治疗包括抑制膀胱癌干细胞的增殖。

[0010] 本发明的一个实施例中,其中,所述药物包括治疗有效量的如式I所示的化合物和药学上可接受的载体。

[0011] 本发明的一个实施例中,其中,所述药物为口服制剂、注射剂、透皮制剂或者皮下埋制剂。

[0012] 本发明的一个实施例中,其中,所述iBC2化合物是从链霉菌中分离得到的。

[0013] 本发明的一个实施例中,其中,所述链霉菌为票霉素链霉菌杭州湾变种,拉丁文名称为*Streptomyces piomogeuus* var. *hangzhouwanensis*,菌种保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No. 4029,保藏日期2010年7月20日。

[0014] 本发明的一个实施例中,其中,所述iBC2化合物的制备方法包括以下步骤:

[0015] 步骤A:培养所述链霉菌菌种得到发酵液,滤除菌丝体,获得发酵滤液;

[0016] 步骤B:将所述发酵滤液用乙酸乙酯提取,并减压浓缩;

[0017] 步骤C:将减压浓缩后的滤液上硅胶H湿柱,并通过1:的2醋酸乙酯-二氯乙烷混合液洗脱,收集洗脱液,并减压浓缩获得浓缩液;

[0018] 步骤D:将所述浓缩液经甲醇溶解后,上硅胶H干柱,并通过1:8乙酸乙酯-二氯乙烷混合液洗脱,收集洗脱液,将所述洗脱液减压浓缩,即得到iBC2化合物浓缩液。

[0019] 本发明的一个实施例中,其中,所述步骤D中,所述iBC2化合物经液相色谱纯化得到,其纯化条件为浓缩液经过甲醇-磷酸盐缓冲液洗脱,流速1.0m/min,检测波长为241nm,柱温30℃,上样量为20u1。

[0020] 本发明的一个实施例中,其中,所述步骤A中,所述链霉菌的培养温度为24~33℃,培养的pH值为5~9,培养时间为30~120小时。

[0021] 本发明具有如下优点:

[0022] 本发明的iBC2化合物能够显著抑制膀胱癌肿瘤细胞的增殖、迁移和粘附,显著下调膀胱癌细胞G1i2的表达并促进膀胱癌细胞凋亡,其可作为有效的膀胱癌治疗的有效药物成分。

附图说明

[0023] 图1为本发明的iBC2化合物分子结构图。

[0024] 图2为本发明的纯化iBC2化合物的色谱图。

[0025] 图3为本发明的iBC2化合物抑制转录因子G1i2的表达Western blot结果图。

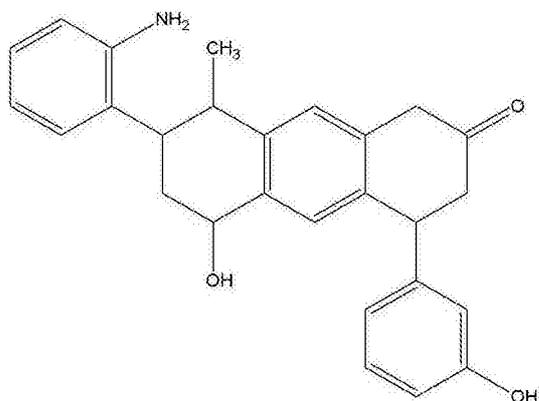
[0026] 图4为本发明的加入本发明的iBC2化合物和不加iBC2化合物的培养基中,膀胱癌细胞T24增殖量对比图。

[0027] 图5为本发明的流式细胞仪测定的iBC2化合物促进肿瘤细胞的凋亡的示意图。

具体实施方式

[0028] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0029] 如图1所示式I所示的iBC2化合物的分子结构图,本发明的iBC2化合物用于制备预防和治疗膀胱癌药物,式I所示的iBC2化合物是从链霉菌中分离获得新型SHH信号通路抑制剂。



[0030]

式 I。

[0031] 具体的,iBC2化合物可抑制膀胱癌干细胞的增殖,用于治疗膀胱癌的药物包括治疗有效量的iBC2化合物化合物和药学上可接受的载体。治疗药物为口服制剂、注射剂、透皮制剂或者皮下埋制剂等。

[0032] 其中,iBC2化合物是从北京郊区采集的土壤中分离得到链霉菌中分离得到的,该链霉菌为票霉素链霉菌杭州湾变种,拉丁文名称为*Streptomyces pimogeous* var. *hangzhouwanensis*,菌种保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No.4029,保藏日期2010年7月20日。

[0033] 其中,iBC2化合物的制备方法包括以下步骤:

[0034] 步骤A:培养票霉素链霉菌杭州湾变种得到发酵液,滤除菌丝体,获得发酵滤液,该链霉菌的培养温度为24~33℃,培养的pH值为5~9,培养时间为30~120小时。

[0035] 步骤B:将发酵滤液用乙酸乙酯提取,并减压浓缩;

[0036] 步骤C:将减压浓缩后的滤液上硅胶H湿柱,并通过醋酸乙酯-二氯乙烷(1:2)混合液洗脱,收集洗脱液,并减压浓缩获得浓缩液;

[0037] 步骤D:将浓缩液经甲醇溶解后,上硅胶H干柱,并通过乙酸乙酯-二氯乙烷(1:8)混合液洗脱,收集洗脱液,将洗脱液减压浓缩,即得到iBC2化合物浓缩液。

[0038] 本发明的iBC2化合物采用Agilent Zorbax C18色谱柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:体积比为58:42的甲醇-磷酸盐缓冲液(1.36g磷酸二氢钾溶于1000ml水中,用浓磷酸调节pH值至3.0);流速:1.0m/min;检测波长:241nm;进样量:20μl;柱温:30℃。如图2所示,在色谱图中,仅仅出现iBC2化合物的单一峰,iBC2化合物的纯度>90%。

[0039] 试验例1

[0040] 本试验例中,在四组培养的膀胱癌细胞T24培养基,含10%胎牛血清,37℃,5%二氧化碳培养中,分别加入0nM、100nM、200nM、1000nM的iBC2化合物,继续孵育24小时后,将培养的四组膀胱癌细胞T24分别加入蛋白裂解液,提取总蛋白,蛋白提取方法(参见分子克隆实验指南(第三版),科学出版社)。将提取的四组蛋白分别用南京金斯瑞生物科技有限公司 ONE-HOUR Western™ Standard Kit试剂盒进行Western blot检测。如图3所示,本发明的Western blot结果显示,iBC2化合物能够显著抑制SHH信号通路关键转录因子Gli2的表达。

[0041] 试验例2

[0042] 在培养的膀胱癌细胞T24的培养基中,加入1uM的iBC2,采用东仁化学科技(上海)有限公司Cell Counting Kit-8试剂盒进行细胞增殖检测。如图4所示,当把iBC2化合物加入到膀胱癌细胞T24的培养基中,膀胱癌细胞T24的增殖受到了显著抑制。

[0043] 试验例3

[0044] 在四组培养的膀胱癌细胞T24的培养基中,分别加入0nM、100nM、200nM、500nM、1000nM的iBC2化合物,继续孵育24小时后,采用生工生物工程股份有限公司的Annexin V凋亡检测试剂盒进行细胞凋亡检测。如图5所示,本发明的流式细胞术结果显示,iBC2化合物促进了肿瘤细胞的凋亡,表现出剂量依赖效应。

[0045] 由试验例1至试验例3可知,本发明的iBC2化合物能够显著地阻断Gli2的激活,显著地下调SHH信号通路中Gli2的表达,而SHH信号通路对膀胱癌等多种肿瘤的生长发挥非常重要的作用,信号通路拮抗剂在临床试验中已经被证实Hedgehog信号通路对很多肿瘤来说都是一个真正的抗肿瘤靶点。iBC2化合物破坏膀胱癌干细胞的自我更新能力从而抑制膀胱癌肿瘤发生。本发明中iBC2能显著抑制膀胱癌肿瘤细胞的增殖、迁移和粘附,显著下调膀胱癌细胞Gli2的表达并促进膀胱癌细胞凋亡。iBC2化合物作为一个潜在的膀胱癌的治疗药物,iBC2化合物是一个新型SHH信号通路的抑制剂。iBC2通过靶向SHH很大程度上阻止膀胱癌的复发、药物抵抗,iBC2化合物可以被用于治疗对SMO抑制剂产生抗性的肿瘤。

[0046] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

[0047] 参考文献

[0048] 1. Shin, K., et al., Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nat Cell Biol*, 2014. 16 (5): p. 469-78.

[0049] 2. Chan, K.S., et al., Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106 (33): p. 14016-21.

[0050] 3. Ho, P.L., A. Kurtova, and K.S. Chan, Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nat Rev Urol*, 2012. 9 (10): p. 583-94.

[0051] 4. Dinney, C.P., et al., Focus on bladder cancer. *Cancer Cell*, 2004. 6 (2): p. 111-6.

- [0052] 5.Kaufman,D.S.,W.U.Shipley,and A.S.Feldman,Bladder cancer.Lancet,2009.374(9685):p.239-49.
- [0053] 6.He,X.,et al.,Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma.Stem Cells,2009.27(7):p.1487-95.
- [0054] 7.Visvader,J.E.and G.J.Lindeman,Cancer stem cells:current status and evolving complexities.Cell Stem Cell,2012.10(6):p.717-28.
- [0055] 8.Kreso,A.,et al.,Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer.Science,2013.339(6119):p.543-548.
- [0056] 9.Majeti,R.,et al.,CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells.Cell,2009.138(2):p.286-299.
- [0057] 10.Todaro,M.,et al.,Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4.Cell Stem Cell,2007.1(4):p.389-402.
- [0058] 11.Bao,S.,et al.,Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.Nature,2006.444(7120):p.756-760.
- [0059] 12.Li,X.,et al.,Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy.Journal of the National Cancer Institute,2008.100(9):p.672-679.
- [0060] 13.Tehranchi,R.,et al.,Persistent malignant stem cells in del(5q) myelodysplasia in remission.New England Journal of Medicine,2010.363(11):p.1025-1037.
- [0061] 14.Kvinlaug,B.T.and B.J.Huntly,Targeting cancer stem cells.Expert Opin Ther Targets,2007.11(7):p.915-27.
- [0062] 15.Merchant,A.A.and W.Matsui,Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway.Clin Cancer Res,2010.16(12):p.3130-40.
- [0063] 16.Takebe,N.,et al.,Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch,and Hedgehog pathways.Nature reviews Clinical oncology,2011.8(2):p.97-106.
- [0064] 17.Varjosalo,M.and J.Taipale,Hedgehog:functions and mechanisms.Genes Dev,2008.22(18):p.2454-72.
- [0065] 18.Robbins,D.J.,D.L.Fei,and N.A.Riobo,The Hedgehog signal transduction network.Sci Signal,2012.5(246):p.re6.
- [0066] 19.Sasaki,H.,et al.,Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain:implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.Development,1999.126(17):p.3915-3924.
- [0067] 20.i Altaba,A.R.,C.Mas,and B.Stecca,The Gli code:an information nexus regulating cell fate,stemness and cancer.Trends in cell biology,2007.17(9):

p.438-447.

[0068] 21.Stecca,B.and A.R.i Altaba,Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals.Journal of molecular cell biology,2010.2(2):p.84-95.

[0069] 22.Aboulkassim,T.O.,et al.,Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer.Oncogene,2003.22(19):p.2967-71.

[0070] 23.Fei,D.L.,et al.,Hedgehog signaling regulates bladder cancer growth and tumorigenicity.Cancer Res,2012.72(17):p.4449-58.

[0071] 24.Shin,K.,et al.,Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder.Nature,2011.472(7341):p.110-4.

[0072] 25.Ng,J.M.and T.Curran,The Hedgehog's tale:developing strategies for targeting cancer.Nat Rev Cancer,2011.11(7):p.493-501.

[0073] 26.Yauch,R.L.,et al.,A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer.Nature,2008.455(7211):p.406-410.

[0074] 27.Amakye,D.,Z.Jagani,and M.Dorsch,Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer.Nat Med,2013.19(11):p.1410-22.

[0075] 28.Kim,J.,et al.,Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothed antagonists.Cancer Cell,2013.23(1):p.23-34.

[0076] 29.Lauth,M.,et al.,Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists.Proceedings of the National Academy of Sciences,2007.104(20):p.8455-8460.

[0077] 30.Mechlin,C.W.,et al.,Gli2 expression and human bladder transitional carcinoma cell invasiveness.The Journal of urology,2010.184(1):p.344-351.

[0078] 31.de Lima Procópio,R.E.,et al.,Antibiotics produced by Streptomyces.The Brazilian Journal of infectious diseases,2012.16(5):p.466-471.

[0079] 32.Huang,Y.-C.,et al.,Targeting sonic hedgehog signaling by compounds and derivatives from natural products.Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,2013.2013.

[0080] 33.Kreso,A.and J.E.Dick,Evolution of the cancer stem cell model.Cell Stem Cell,2014.14(3):p.275-291.

[0081] 34.Rudin,C.M.,et al.,Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449.New England Journal of Medicine,2009.361(12):p.1173-1178.

[0082] 35.Shin,K.,et al.,Hedgehog Signaling Restrains Bladder Cancer Progression by Eliciting Stromal Production of Urothelial Differentiation Factors.Cancer Cell,2014.26(4):p.521-533.

[0083] 36.Li,C.,et al.,BCMab1,a monoclonal antibody against aberrantly glycosylated integrin alpha3beta1,has potent antitumor activity of bladder cancer in vivo.Clin Cancer Res,2014.20 (15) :p.4001-13.

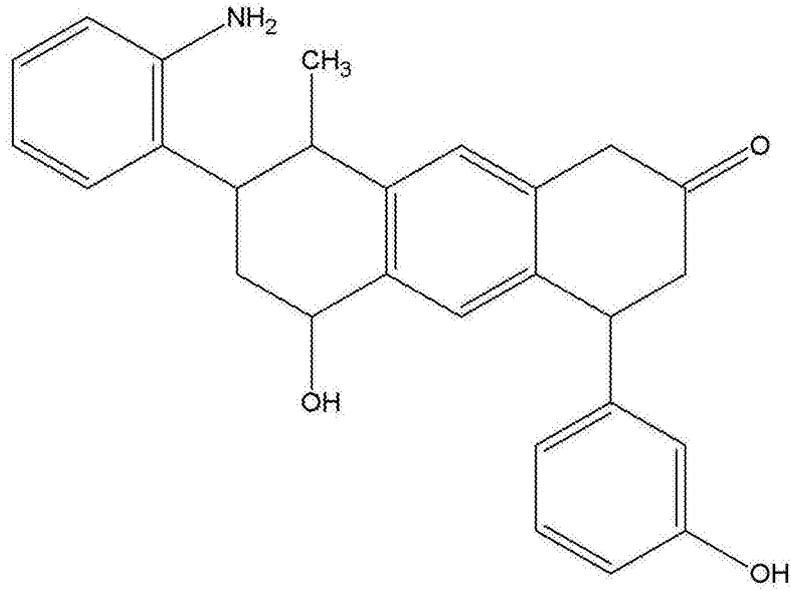


图1

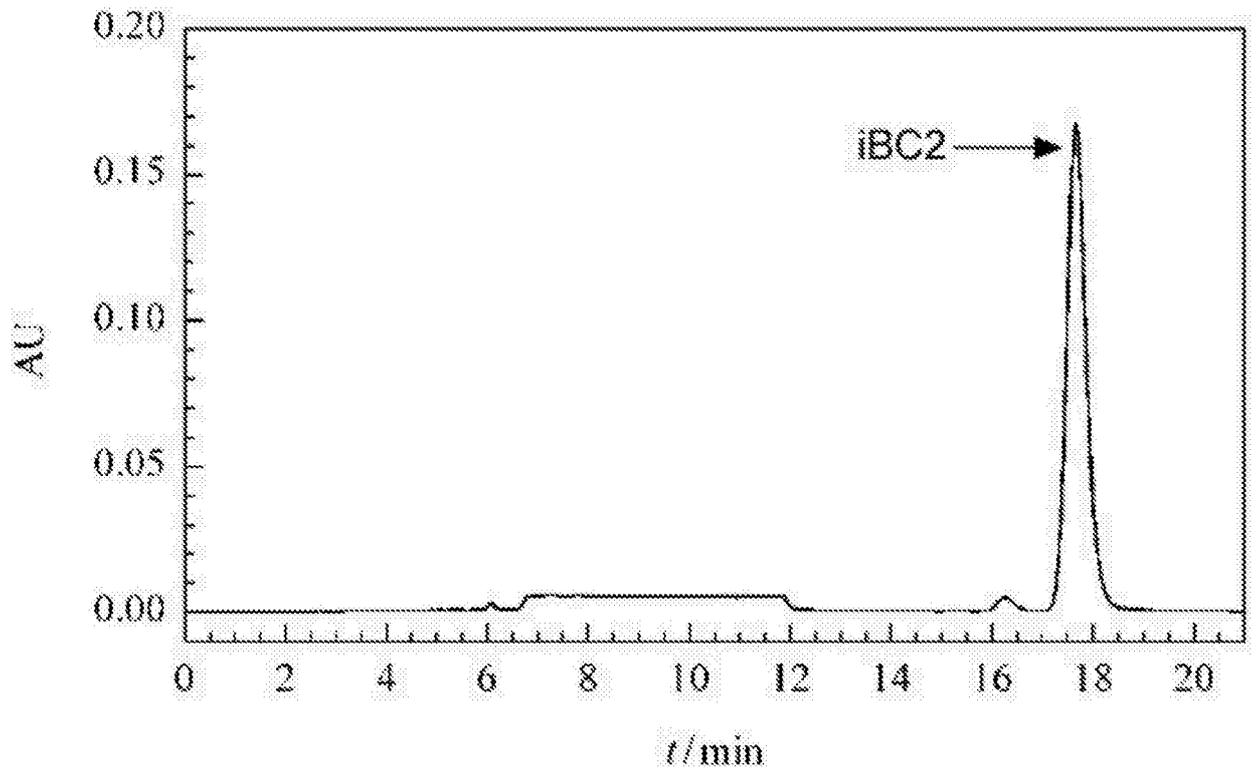


图2

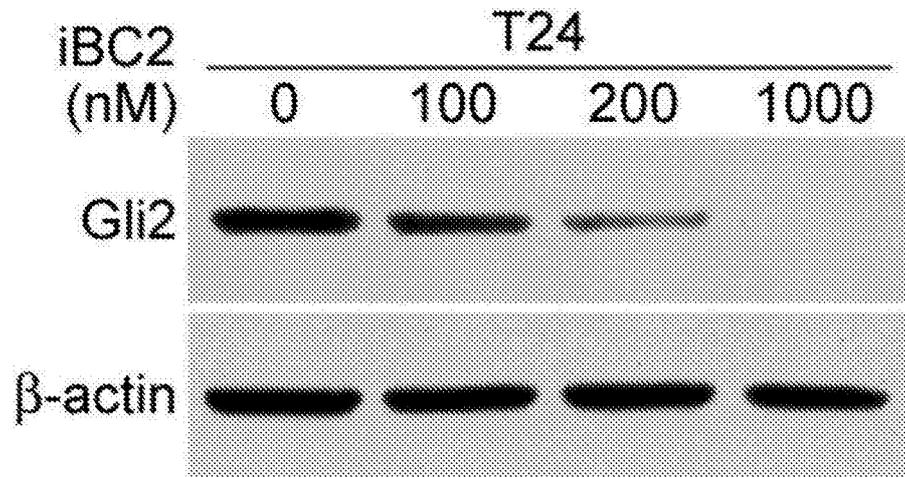


图3

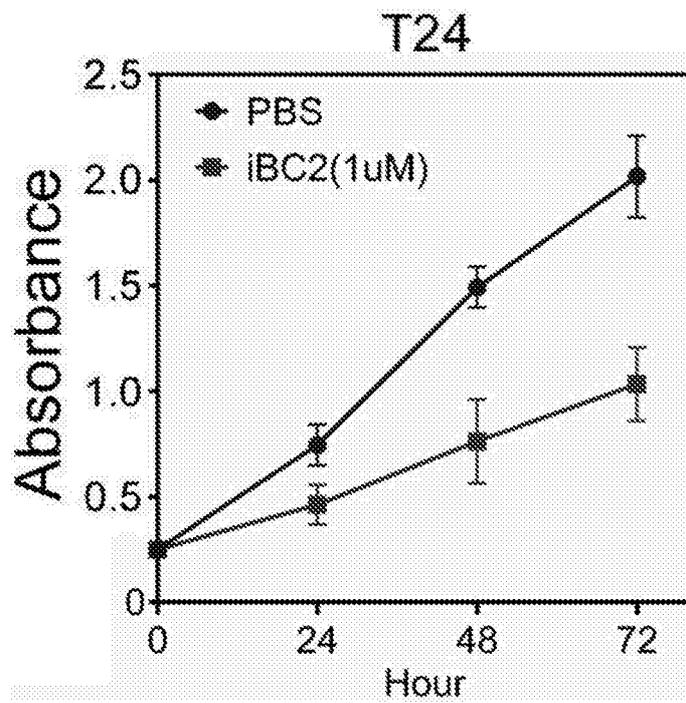


图4

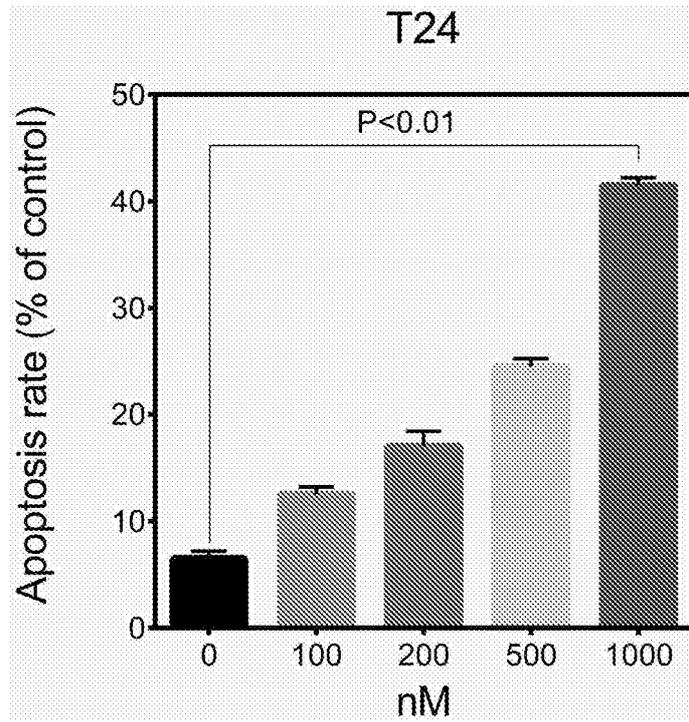


图5