

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102657647 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201210100743. 7

(22) 申请日 2012. 04. 06

(71) 申请人 澳门大学

地址 澳门函仔徐日昇寅公马路

申请人 北京大学

(72) 发明人 王一涛 李润涛 李颖博 陈美婉

葛泽梅 闫旭

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 王会龙

(51) Int. Cl.

A61K 31/4406 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

A61P 17/06 (2006. 01)

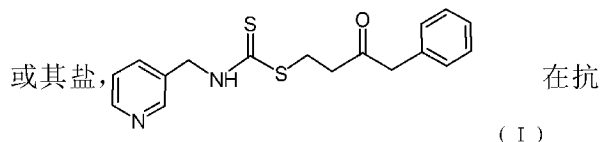
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 9 页

(54) 发明名称

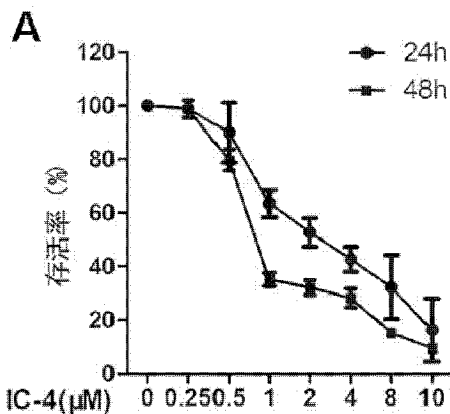
IC-4 在抗血管新生中的应用

(57) 摘要

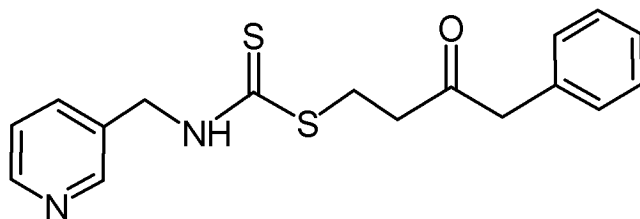
本发明公开了具有式 (I) 结构的化合物 IC-4



血管新生中的应用。另外, 本发明还公开了具有式 (I) 结构的化合物 IC-4 或其盐在制备抗血管新生剂中的应用。本发明对 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用的研究, 是建立在对 IC-4 或其盐在抑制生长因子诱导的内皮细胞生长、抑制小管生成、抑制内皮细胞迁移和抑制内皮细胞转移的研究基础上, 结合对斑马鱼胚胎血管生成抑制作用的整体实验而得以构建的科学、合理的研究体系。



1. 一种具有式 (I) 结构的化合物 IC-4 或其盐,



(I)

在抗血管新生中的应用。

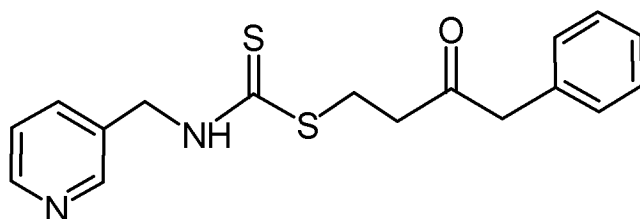
2. 根据权利要求 1 所述的化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,其特征在於:表现为在抑制生长因子诱导的内皮细胞生长中的应用,所述生长因子包括血清、内皮细胞生长因子及表皮生长因子。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,其特征在於:表现为在抑制小管生成中的应用。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,其特征在於:表现为在抑制内皮细胞迁移和抑制内皮细胞转移中应用。

5. 根据权利要求 1 所述的化合物 IC-4 或其盐,在抑制斑马鱼胚胎血管的生成中的应用。

6. 一种具有式 (I) 结构的化合物 IC-4 或其盐,



(I)

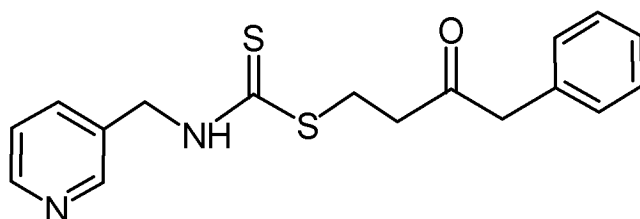
在制备抗血管新生剂中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的化合物 IC-4 或其盐在制备抗血管新生剂中的应用,其特征在於:是在制备由生长因子诱导的内皮细胞生长抑制剂中的应用,所述生长因子包括血清、内皮细胞生长因子及表皮生长因子。

8. 根据权利要求 6 所述的化合物 IC-4 或其盐在制备抗血管新生剂中的应用,其特征在於:是在制备小管生成抑制剂中的应用。

9. 根据权利要求 6 所述的化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,其特征在於:是在制备内皮细胞迁移抑制剂和内皮细胞转移抑制剂中应用。

10. 一种抗血管新生剂,其特征在於:抗血管新生剂中含有式 (I) 结构的化合物或其盐。



(I)

IC-4 在抗血管新生中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化合物及其盐的用途,尤其涉及 IC-4 及其盐在抗血管新生中的应用。

背景技术

[0002] 血管新生指在原毛细血管和 / 或微静脉基础上通过血管内皮细胞增殖、迁移、粘附和血管管腔形成等方式,形成具有功能的新血管的过程;该过程包含了血管内皮细胞与周围细胞外基质间的相互作用,主要受血管新生促进因子和血管新生抑制因子的调控。研究发现,多种生长因子如血管内皮细胞生长因子、血管生成素 2 和碱性成纤维细胞生长因子,及表皮生长因子等都可以通过不同的途径调节血管新生。生理状态下,血管新生仅在胚胎发育、创伤修复、女性月经时短暂开放,其余时段则处于关闭状态,从而使血管的生长与退化维持在动态的平衡状态。失去调控的血管新生广泛参与多种病理过程,如风湿性关节炎、视网膜病变、牛皮癣和动脉粥样硬化的发生发展。因此,对血管新生及相关血管新生抑制剂的研究具有重大的药理和临床实践意义。

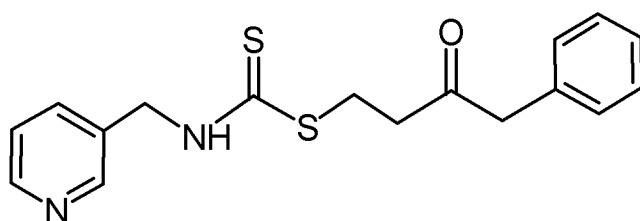
[0003] 中国专利(专利号 CN101899011A,公开日 2010 年 12 月 01 日)、中国专利(专利号 CN200410054686.9,公开日 2004 年 07 月 27 日)和中国专利(专利号 CN01118399.3,公开日 2001 年 05 月 29 日)都公开了氨基二硫代甲酸酯类化合物,并且公开了该类化合物在制备抗肿瘤药物中的作用。但是现有技术中并未公开关于氨基二硫代甲酸酯类化合物是否具有抗血管新生作用的任何研究资料,因此无从知道是否存在具有抗血管新生作用氨基二硫代甲酸酯类化合物,更无从知道氨基二硫代甲酸酯类化合物中的哪些具体化合物具有抗血管新生作用。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题在于揭示了 IC-4 及其盐在抗血管新生中的应用;同时,本发明所要解决的问题还在于揭示了 IC-4 及其盐在制备抗血管新生剂中的应用。

[0005] 为了解决以上技术问题,一方面,本发明揭示了一种具有式 (I) 结构的化合物 IC-4 或其盐,

[0006]



(I)

[0007] 在抗血管新生中的应用。

[0008] 具体而言,化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,表现为在抑制生长因子诱导的内皮细胞生长中的应用,所述生长因子包括血清、内皮细胞生长因子及表皮生长因子。

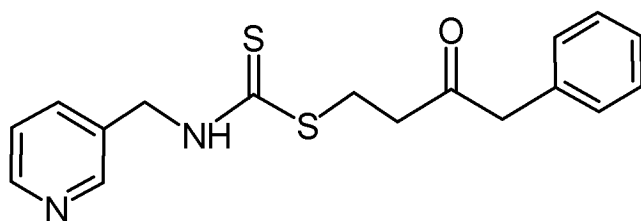
[0009] 另外,化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,也表现为在抑制小管生成中的应用。

[0010] 同时,化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,也表现为在抑制内皮细胞迁移和抑制内皮细胞转移中应用。

[0011] 优选地,本发明揭示了化合物 IC-4 或其盐,在抑制斑马鱼胚胎血管的生成中的应用。

[0012] 另一方面,本发明揭示了一种具有式 (I) 结构的化合物 IC-4 或其盐,

[0013]



(I)

[0014] 在制备抗血管新生剂中的应用。

[0015] 优选地,化合物 IC-4 或其盐在制备抗血管新生剂中的应用,是在制备由生长因子诱导的内皮细胞生长抑制剂中的应用,所述生长因子包括血清、内皮细胞生长因子及表皮生长因子。

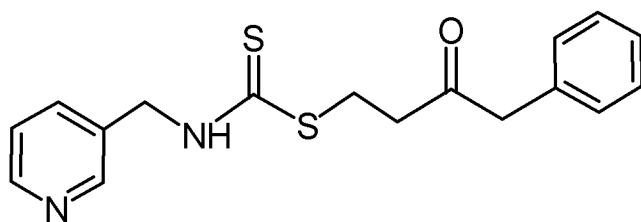
[0016] 优选地,化合物 IC-4 或其盐在制备抗血管新生剂中的应用,是在制备小管生成抑制剂中的应用。

[0017] 优选地,化合物 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用,是在制备内皮细胞迁移抑制剂和内皮细胞转移抑制剂中应用。

[0018] 优选地,本发明揭示了化合物 IC-4 或其盐,在制备斑马鱼胚胎血管生成抑制剂中的应用。

[0019] 再则,本发明还公开了一种抗血管新生剂,抗血管新生剂中含有式 (I) 结构的化合物或其盐。

[0020]



(I)

[0021] 从新血管的形成机制和血管新生的调控机制来看,血管内皮细胞生长、小管生成、内皮细胞迁移和内皮细胞转移均对血管新生具有积极的作用,其中血管内皮细胞生长受到包括血清、内皮细胞生长因子及表皮生长因子等多种生长因子的诱导调控作用,因此,本发明对 IC-4 或其盐在抗血管新生中的应用的研究,是建立在对 IC-4 或其盐在抑制生长因子诱导的内皮细胞生长、抑制小管生成、抑制内皮细胞迁移和抑制内皮细胞转移的研究基础上,结合对斑马鱼胚胎血管生成抑制作用的整体实验而得以构建的科学、合理的研究体系。

[0022] 结合上述技术方案和原理说明,在本发明的具体实施方式中通过 XTT 试验,证明 IC-4 能够抑制生长因子诱导的内皮细胞生长;通过划痕实验,证明 IC-4 对内皮细胞迁移

具有明显的抑制作用；通过 Transwell 小室迁移实验，表明 IC-4 对内皮细胞转移具有明显的抑制作用；通过内皮细胞管状形成实验，确定 IC-4 对小管生成具有强烈的抑制作用；另外，通过斑马鱼血管发育体内试验，证明 IC-4 对斑马鱼胚胎血管的生成具有明显的抑制效果。当然，作为本领域内的常用手段，采用含 IC-4 的盐类或者 IC-4 药用盐替代 IC-4 也具有抗血管新生的作用，并能够适用于制备抗血管新生剂。

[0023] 上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，而可依照说明书的内容予以实施，并且为了让本发明的上述和其他目的、特征和优点能够更明显易懂，以下结合优选实施例，并配合附图，详细说明如下。

附图说明

[0024] 图 1A-1D 是本发明实施例 1 中 IC-4 抑制内皮细胞的活性和生长实验的结果图；

[0025] 图 2A-2B 是本发明实施例 2 中 IC-4 抑制内皮细胞迁移实验的结果图；

[0026] 图 3A-3D 是本发明实施例 3 中 Transwell 小室迁移实验的结果图；

[0027] 图 4A-4D 是本发明实施例 4 中 IC-4 抑制内皮细胞小管形成实验的结果图；

[0028] 图 5A-5B 是本发明实施例 5 中 IC-4 抑制斑马鱼胚胎血管生成实验的结果图。

具体实施方式

[0029] 以下结合具体实施例对本发明进行进一步的描述。

[0030] 实施例 1

[0031] IC-4 抑制内皮细胞的活性和生长实验

[0032] 1、实验方法：

[0033] XTT 法：取 2-5 代人脐静脉内皮细胞，按 1×10^4 /孔细胞接种于 96 孔板上。培养过夜使细胞贴壁后，分别给予不同浓度 IC-4 和各种生长诱导物（包括 10% 胎牛血清 FBS，20ng/ml 内皮细胞生长因子 EGF 和 20ng/ml 表皮生长因子 EGF），并设置 0.1% DMSO 对照组和单独生长诱导物刺激组，每组设 6 个平行孔。细胞经培养 24h 或 48h 后，采用 Roche Cell Proliferation Kit II 与细胞共培养 4h 以形成水溶性的甲臞产物。用 Perkin Elmer Multilabel Counter 以 490nm 为检测波长和 690nm 为参比波长检测 OD 值。实验共进行 3 次，计算平均值，以 0.1% DMSO 组作为对照计算细胞活力的百分数。

[0034] 2、实验结果：

[0035] 如图 1A-1D 所示，IC-4 处理内皮细胞 24h 及 48h 均能剂量依赖性的抑制内皮细胞活力。同时，因为血管新生往往受到多种生长因子的调控，因此我们检测了 IC-4 对于在常见生长因子，包括血清 (Serum)，内皮细胞生长因子 (VEGF)，和表皮生长因子 (EGF) 诱导下内皮细胞增殖的影响。结果显示，这些生长因子均能够促进内皮细胞增殖，IC-4 可以显著抑制胎牛血清，内皮细胞生长因子，表皮生长因子诱导的细胞增殖。

[0036] 实施例 2

[0037] IC-4 抑制内皮细胞迁移实验

[0038] 1、实验方法：

[0039] 划痕实验：取 2-5 代人脐静脉内皮细胞，按 2×10^5 /孔细胞接种于 24 孔板上，待细胞 100% 融合后，对照组每孔加入 500 μ l 正常培养基，给药组每孔加入 500 μ l 含不同浓

度 IC-4 的培养基培养 24h。此实验中采用药物浓度下 IC-4 均未显示细胞毒性。用规格为 100 μ l 的 Tip 头于各孔中央划一直线。用 PBS 清洗一次后,每孔加入 500 μ l 培养基继续培养 10h。在划痕后 0h,6h 和 10h 于显微镜下观察并拍照。实验进行 3 次,每个浓度任意取 3 个视野对细胞迁移距离计算其平均值。结果以对照组迁移距离为对照,计算各个浓度给药组迁移距离百分数。并以 Student's t-test 进行统计, $P < 0.05$ 为显著性差异。

[0040] 2、实验结果:

[0041] 内皮细胞迁移是血管新生中的一个关键环节,采用划痕实验检测 IC-4 对内皮细胞迁移的作用。如图 2A-2B 所示,A 图为显微镜拍照图片;B 图为统计结果。划痕后,对照组细胞培养 10h 后几乎愈合。IC-4 能够剂量依赖的抑制内皮细胞的迁移剂量。与划痕后 6h 对照组相比有显著性差异 ($*P < 0.01$),与划痕后 10h 对照组相比有显著性差异 ($^{#}P < 0.001$)。

[0042] 实施例 3

[0043] IC-4 抑制内皮细胞转移实验

[0044] 1、实验方法:

[0045] Transwell 小室迁移实验:本实验采用 8 μ m 孔径的 Corning 24 孔 Transwell 小室进行实验。取 2-5 代人脐静脉内皮细胞,按 5×10^4 /孔细胞接种于 Transwell 小室聚碳酸酯膜上层,Transwell 小室上层以 100 μ l 0.1% DMSO 无血清培养基作为对照组,其他各孔以 100 μ l 含不同浓度药物的无血清培养基培养。Transwell 小室下层为含 1%血清和 20ng/ml 内皮细胞生长因子的培养基。待细胞迁移 6h 后,以 PBS 清洗,用棉签轻轻去除上层细胞,下层细胞用 1%多聚甲醛固定 15min,之后用 Hoechst 33342 染料染色并荧光显微镜观察并拍照。实验进行 3 次,每个浓度任取 3 个视野对迁移至下层的细胞计数并计算其平均值。结果以对照组迁移至下层的细胞数目为对照,计算各个浓度给药组迁移细胞的百分数。并以 Student's t-test 进行统计, $P < 0.05$ 为显著性差异。

[0046] 2、实验结果:

[0047] 图 3A-3D 所示,A 为对照组,B 为 0.25 μ M 给药组,C 为 0.5 μ M 给药组,D 为 1 μ M 给药组。Transwell 小室迁移法通过检测由小室上层迁移至下层的细胞数检测药物对内皮细胞三维迁移的作用。对迁移细胞进行染色拍照,结果显示,与对照组相比,IC-4 给药组迁移至小室下层的细胞数明显减少,表明 IC-4 具有抑制内皮细胞迁移的能力。

[0048] 实施例 4

[0049] IC-4 抑制内皮细胞的小管生成实验

[0050] 1、实验方法:

[0051] 内皮细胞管状形成实验:将 Matrigel 预先至于 4 $^{\circ}$ C 过夜,将 Matrigel 与 PBS 按 1:1 混合均匀,在 24 孔板中每孔加入 250 μ l 铺匀,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min 使其聚合。取 2-5 代人脐静脉内皮细胞,按 1×10^5 /孔细胞接种于此 24 孔板。以 0.1% DMSO 为对照组,给药组每孔为 500 μ l 含不同浓度 IC-4 的培养基培养 6-8h 使其形成管状。采用显微镜观察小管形成情况,每孔任意取 3 个视野计数小管形成结点数计算平均值。结果以对照组形成小管结点数对照,计算各个浓度给药组形成小管结点数百分数。并以 Student's t-test 进行统计, $P < 0.05$ 为显著性差异。

[0052] 2、实验结果:

[0053] 血管新生是在生理或者病理情况下,在原有血管基础上形成新的血管的过程,该过程主要分为血管内皮细胞增殖、迁移、管腔形成三个步骤。小管形成实验对 IC-4 对血管新生的另一重要环节的影响进行评价。如图 4A-4D 所示,图中 A 为对照组, B 为 $0.5 \mu\text{M}$ 给药组, C 为 $1 \mu\text{M}$ 给药组, D 为统计结果。对照组细胞在 Matrigel 上成网状相连,形成小管结构, IC-4 给药组形成的小管完整性和数目减少。对各组网状形成的节点数进行统计,给药组节点数与对照组相比有显著性减少 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

[0054] 实施例 5

[0055] 4IC-4 抑制斑马鱼胚胎血管生成实验

[0056] 1、实验方法:

[0057] 斑马鱼血管发育体内试验:取受精后 48h(post-fertilization) 的 Tg(fli1:EGFP) 转基因斑马鱼胚胎,随机分组,每组 10 个放入 24 孔板。以 0.1% DMSO 为对照组,给药组每孔为 $500 \mu\text{l}$ 含 $4 \mu\text{M}$ IC-4 的 MilliQ 水培养 30h。以 0.02% 三卡因麻醉将胚胎置于载玻片上,以荧光显微镜观察药物对斑马鱼胚胎节间血管(inter-segmental vessels, ISV) 形成的影响。

[0058] 2、实验结果:

[0059] Tg(fli1:EGFP) 转基因斑马鱼的内皮细胞能够表达绿色荧光蛋白,配合荧光显微镜可用于评价药物对血管新生的影响。在斑马鱼胚胎早期发育过程,血管形成模式主要出现在头部和躯干部位节间。本实验观察了药物对于胚胎节间血管(inter-segmental vessels, ISV) 形成的影响。如图 5A-5B 所示, A 为对照组, B 为 $4 \mu\text{M}$ 给药组。与对照组相比,给药组斑马鱼 ISV 的完整性降低。

[0060] 以上所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

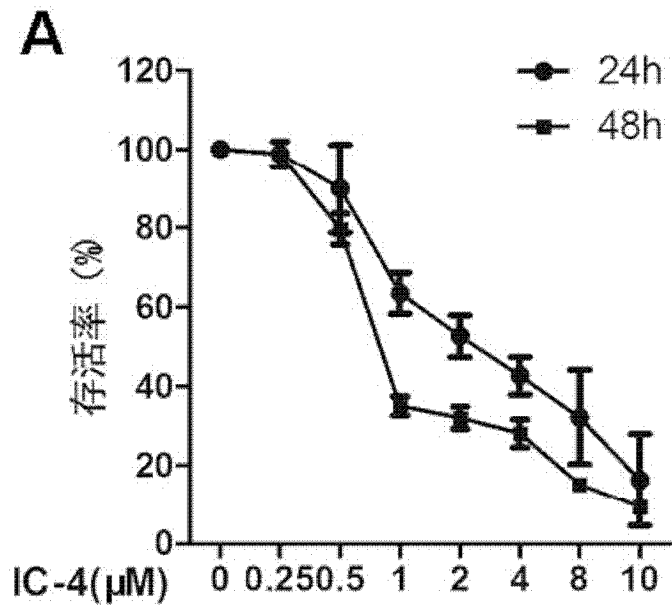


图 1A

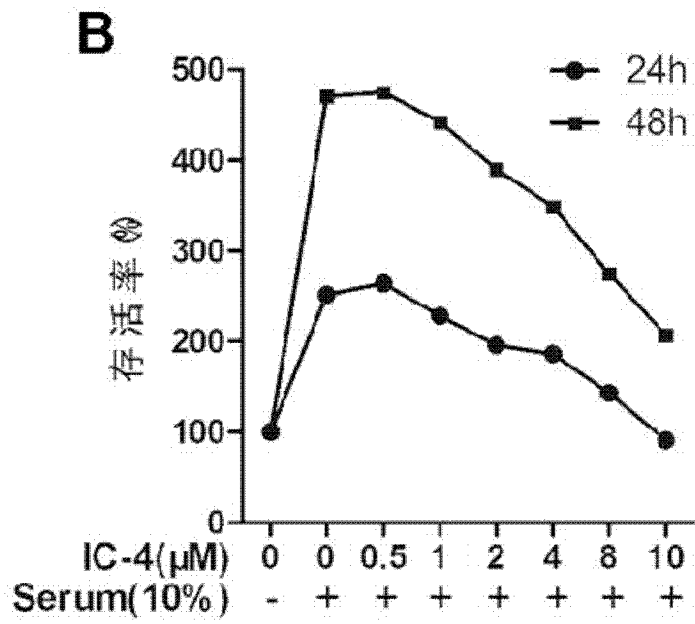


图 1B

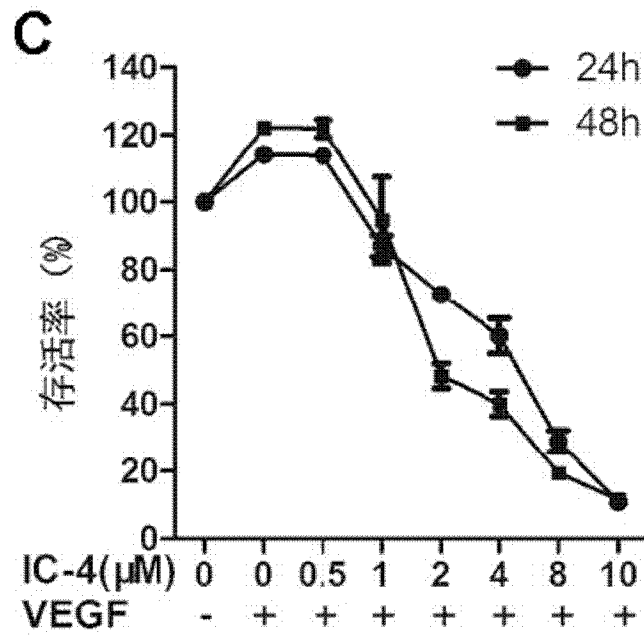


图 1C

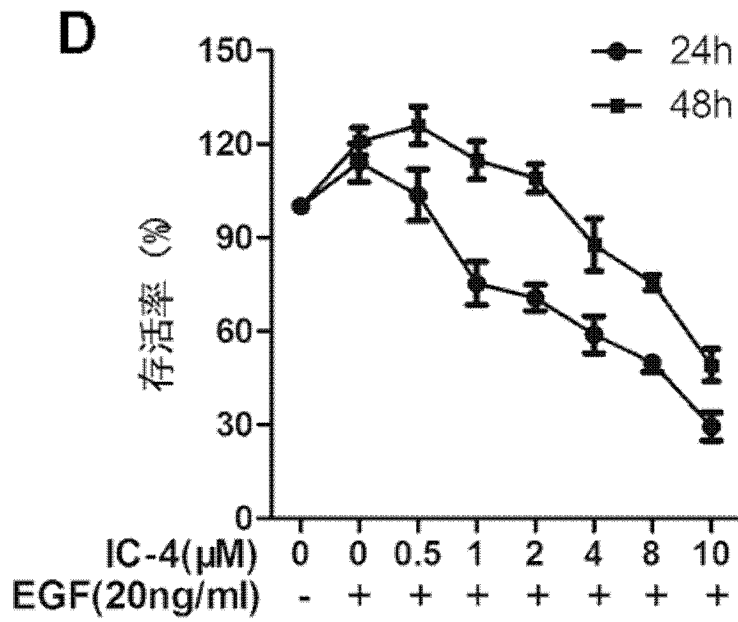


图 1D

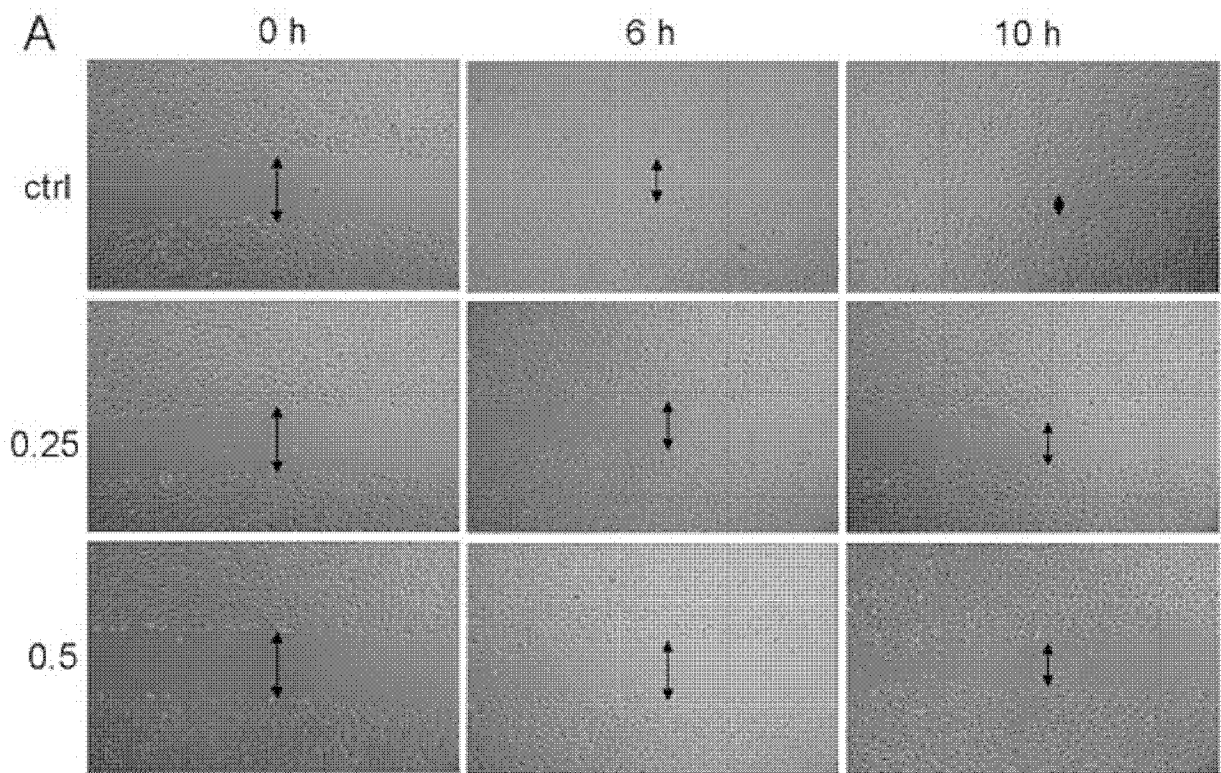


图 2A

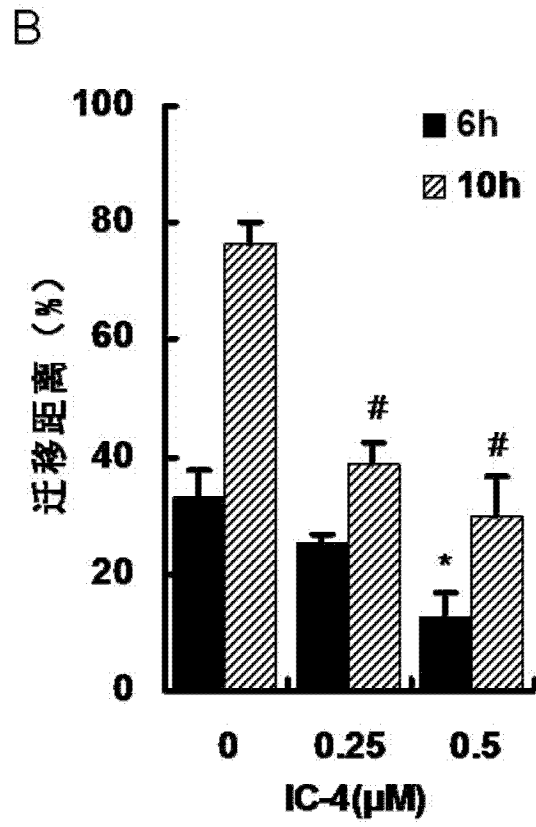


图 2B

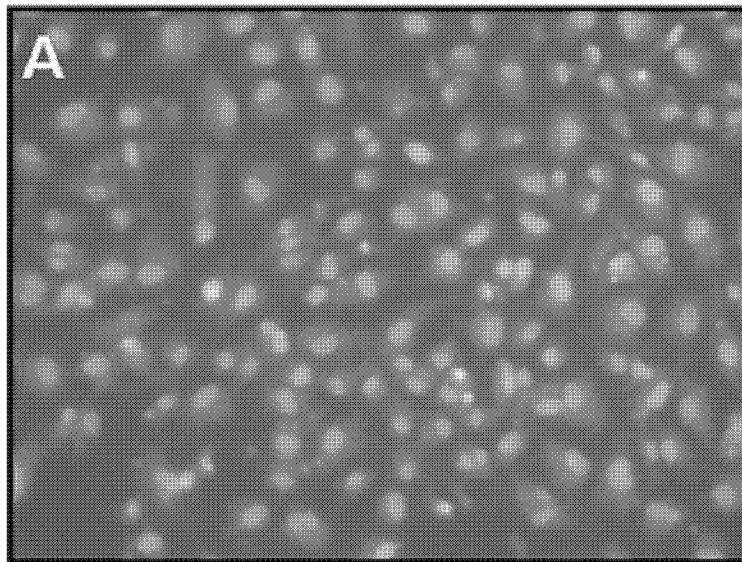


图 3A

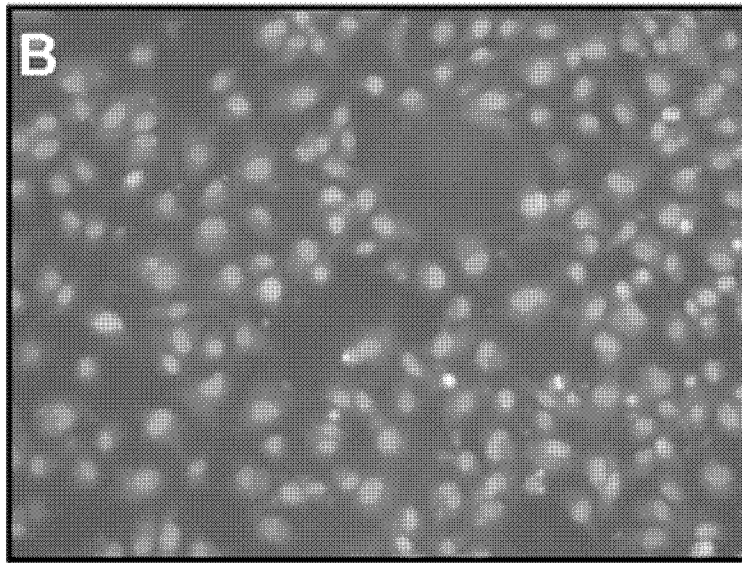


图 3B

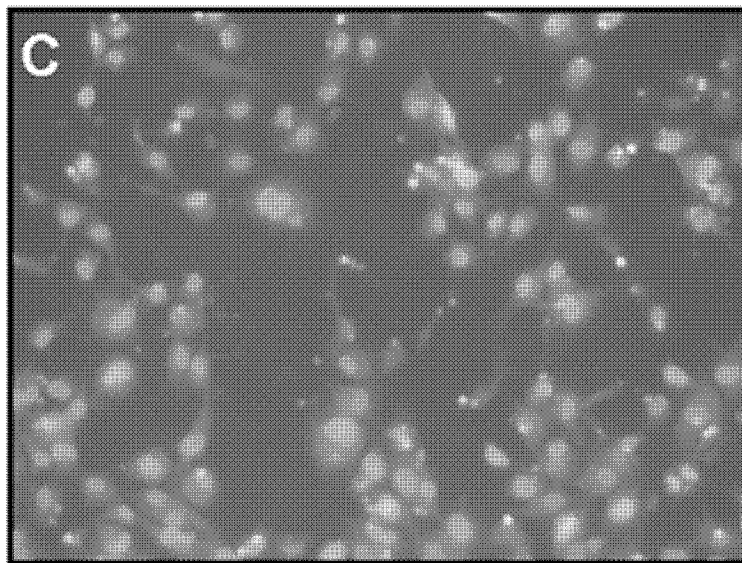


图 3C

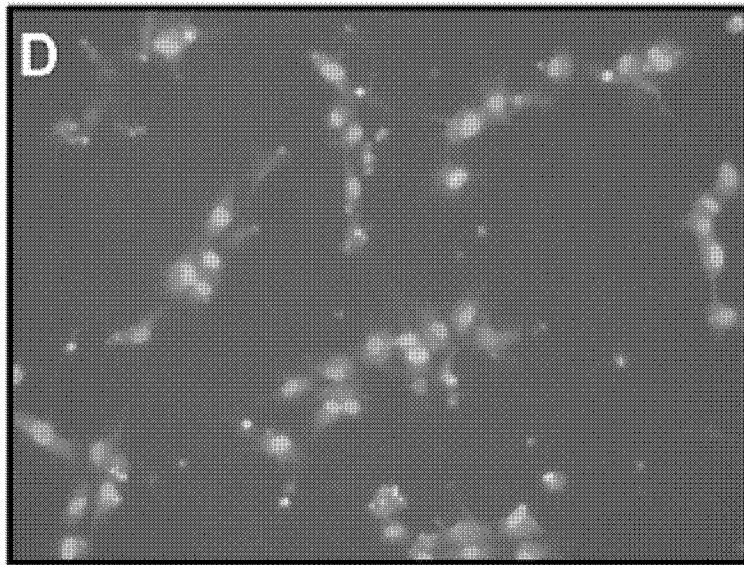


图 3D

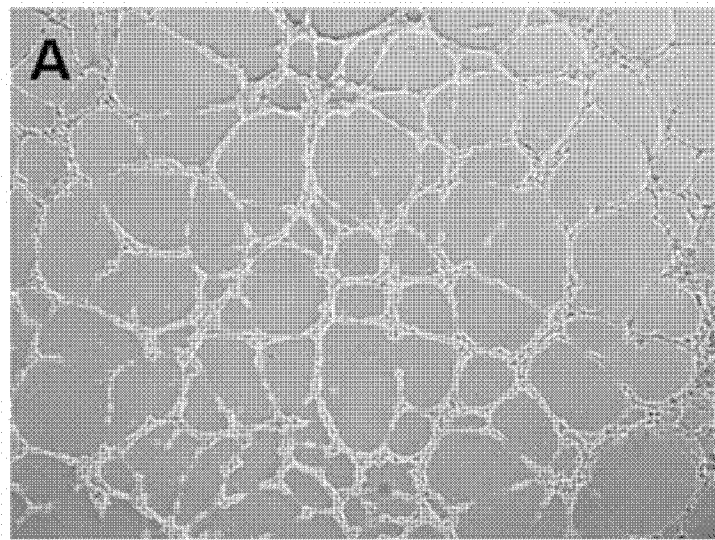


图 4A

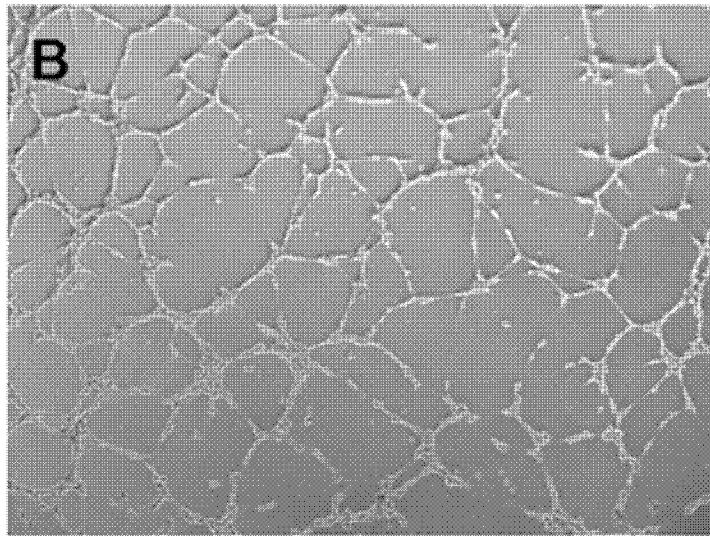


图 4B

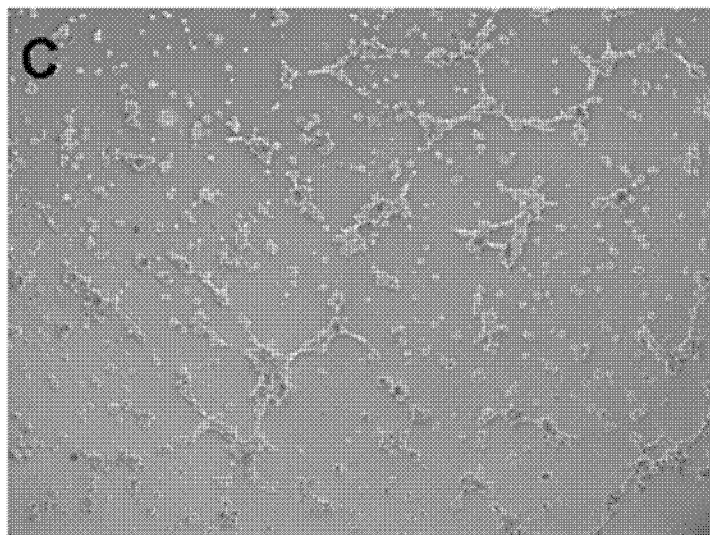


图 4C

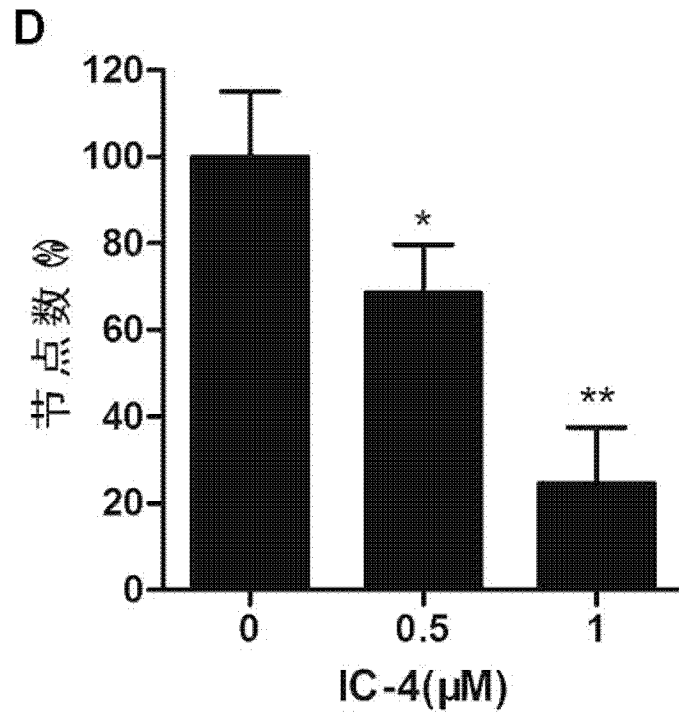


图 4D

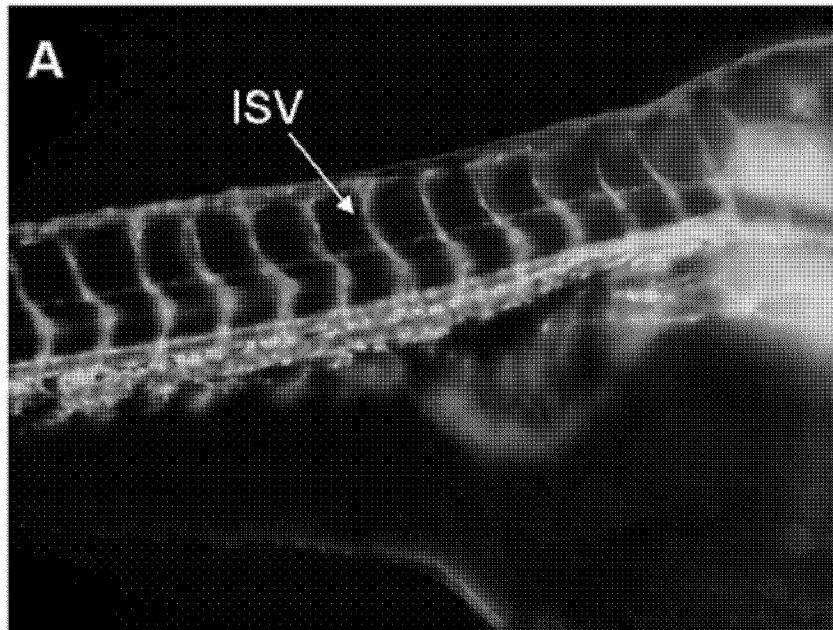


图 5A

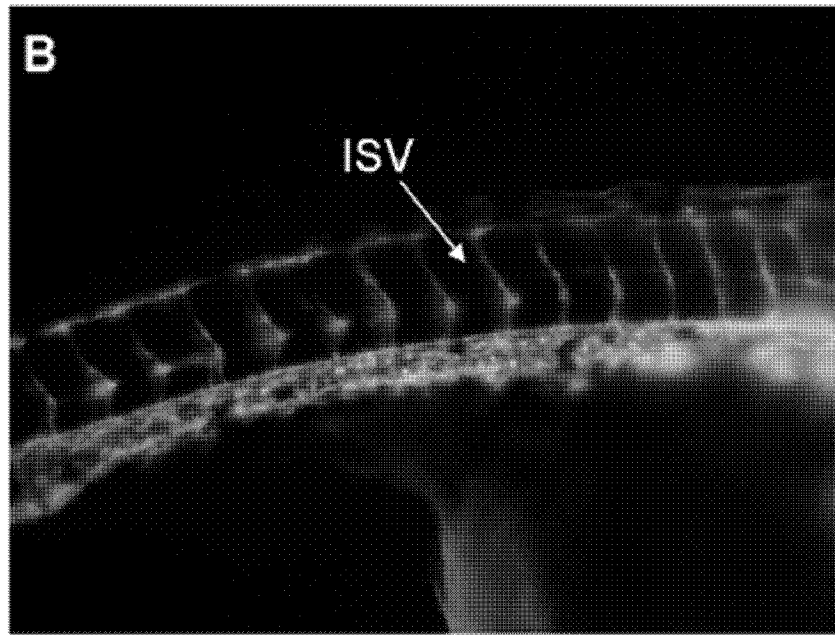


图 5B