

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/404

A61P 9/10

A61P 43/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510057006.3

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1686115A

[22] 申请日 2005.4.6

[21] 申请号 200510057006.3

[71] 申请人 黄 晶

地址 400010 重庆市渝中区临江路 76 号

[72] 发明人 黄 晶 江永红 邓昌明 张俊霞

胡怀东 李进嵩 袁侨英

[74] 专利代理机构 重庆市恒信专利代理有限公司

代理人 刘小红

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 吲哚-3-甲醇及其二聚体在制备防治增殖性血管疾病药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及的是吲哚-3-甲醇或/和其二聚体 3, 3'-二吲哚甲烷在制备用于防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄的药物中的应用。所述吲哚-3-甲醇及其二聚体 3, 3'-二吲哚甲烷的一般治疗剂量的安全性得到动物实验和临床试验的广泛认同, 主要用于肿瘤预防、调节激素平衡、促进机体解毒等方面。作为食品添加剂吲哚-3-甲醇已通过美国 FDA 认证。3, 3'-二吲哚甲烷是吲哚-3-甲醇在胃内的主要代谢产物, 故使用该吲哚-3-甲醇或/和其二聚体 3, 3'-二吲哚甲烷对病患者几乎无副作用, 安全性高。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 吡啶-3-甲醇或/和其二聚体 3, 3'-二吡啶甲烷在制备用于防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄的药物中的应用。

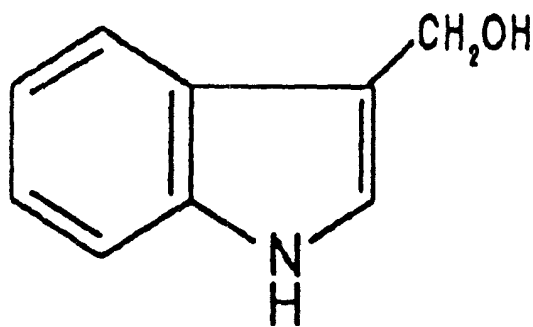
吲哚-3-甲醇及其二聚体在制备防治增殖性血管疾病药物中的应用

技术领域

本发明涉及一种已知食物中所含的化学物质吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol, I3C)及其在胃内的主要代谢产物3,3'-二吲哚甲烷(3,3'-Diindolylmethane, DIM)作为制备防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄的药物中的应用。

背景技术

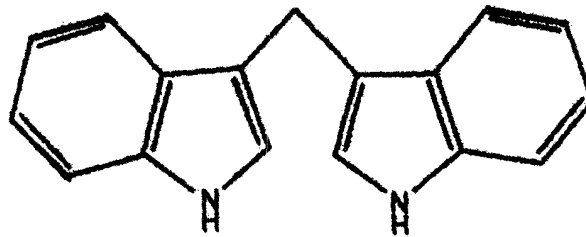
A. 吲哚-3-甲醇(I3C)是存在于十字花科(如花椰菜、卷心菜、萝卜等)及其他的芸苔科和芸苔属蔬菜中的一种天然活性成分,由葡糖芸苔素水解产生,是异硫氰酸盐代谢产物(Food Chem Toxicol, 1984, 22(12): 977~982),易于化学合成,分子量 147,分子式如下:



(I)

吲哚-3-甲醇(I3C)在胃酸环境中发生一系列缩合反应,产生二聚体3,3'-二吲哚甲烷(DIM)、三聚体、四聚体等低聚物,其中DIM为主要代谢产物。药代动力学研究发现口服I3C后,I3C主要存在于肝脏中,I3C在血浆和组织中清除

速率较快;而其二聚体(DIM)在服用I3C 24小时后在肝脏中仍可检测到,且不同时间检测到的DIM在组织的浓度与血浆浓度相似。已知I3C及其主要酸性缩合物DIM均具有抗肿瘤发生等生物学活性。其二聚体(DIM)分子量 246,分子式如下:



(II)

B. 经过大量的分子水平、细胞水平、活体动物实验, I3C 其二聚体(DIM)已进入临床试验,主要用于一些肿瘤的预防和治疗,目前已有市售的 I3C 产品。

I3C 的部分药理作用按 life extension 公司产品说明如下:

- 帮助调控雌激素代谢
- 一定程度上抑制细胞异常增殖并促进细胞凋亡
- 促进第一相和第二相的解毒作用
- 保护机体抵抗一些常见的致癌毒素如二氧杂芑 (dioxin) 损害
- 修复 p21 抑制基因
- 提供抗氧化保护

最近发表的一些临床研究结果表明 I3C 能够明显减轻、控制,甚至逆转肿瘤的发生发展。在活检证实的 CIN 病人中,使用 I3C 200-400mg 口服约 50%的病人病检结果减轻,而使用安慰剂者无一例减轻(Gynecologic Oncology 2000, 78(2):123 - 129)。利用 I3C 处理复发性呼吸道乳头状瘤,39 例复发性呼吸道乳头状瘤病人外科切除术后给予 I3C 处理,剂量 200mg

每日两次口服，三分之二的病人肿瘤得到控制或减轻(J Voice 2004, 18(2):248-253)。在绝经后的早期乳腺癌患者给予 DIM 108mg/d, 可使尿中 2-羟雌酮增加 (Nutr Cancer. 2004;50(2):161-167)。

C. I3C 使用的安全性问题: 作为源于天然的食物补充剂, 绝大多数研究表明使用是安全的 (Altern Med Rev 2003, 8(2):156-170 ; Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994, 3(7):591-595)。虽然早年的一些动物模型研究表明, 在使用致癌物质诱导的动物肿瘤模型中, I3C 可促进结肠 (Cancer Lett 1987, 35 (1):71 - 77)、肝脏 (Cancer Lett 1997, 118 (1): 87 - 94; Carcinogenesis 1999, 20 (3):453-458) 等肿瘤发生或增长; 应用黄曲霉菌毒素 B₁ 后再应用 I3C 可促进肝癌发生 (J Natl Cancer Inst 1987, 78(5): 931 - 934.), 但应用 I3C 预处理则明显抑制黄曲霉菌毒素 B₁ 诱导的肝癌。应用 I3C 进行动物毒性实验, 以 50 mg/kg/day (10 倍于人类服用剂量) 喂养 3~12 月, 结果动物体重, 肝功能 (ALT, AST, total protein, albumin, calcium, glucose, BUN, globulins, GGT, cholesterol, amylase 淀粉酶, bilirubin 胆红素, creatinine 肌苷), 肝组织病理检查, 骨密度均没有变化 (Toxicological Sciences 2003, 74(1):10-21)。最近发表的几项临床研究则表明, 每日使用 300-400mg I3C 能够取得良好的生物学效应, 较短期 (4 周) 和长期 (平均 4.8 年) 用于肿瘤的预防和治疗, 没有发现与 I3C 相关的急性及长期应用副作用, 证实 I3C 的安全性, 并可以长期应用。美国 FDA 通过 I3C 作为天然的补充剂, 已有市场销售的胶囊剂。

D. 十字花科蔬菜 (如花椰菜、卷心菜) 中的活性成分 3-吲哚甲基芸苔葡萄糖硫苷可在一些内源性的酶作用下水解为吲哚衍生物, 其中最重要的化合物为吲哚-3-甲醇。已有在分子、细胞及活体动物大量的实验证明 I3C 及其二聚体 (DIM) 具有抗细胞增殖、抑制某些酶的活性, 保护机体免于损伤

性增殖从而表现出抗癌活性；已有很多实验及临床研究表明，I3C 及其二聚体(DIM)通过抑制 AKt 和 NF-kB 活性抑制细胞增殖并促进其凋亡(Nutr Cancer. 2004 , 48(1):84-94; Cancer Res. 2005 Jan 1;65(1):364-71); 抑制直肠癌细胞株增殖，且呈剂量依赖关系(corectal Disease 2002, 4(3): 205 - 207); 诱导 G₁期细胞停滞，下调 CDK6 基因表达，并刺激干扰素 γ 受体 1 基因表达，刺激 $p21^{Waf1/Cip1}$ 表达，增强乳腺癌细胞中干扰素活性(Carcinogenesis 2004, 25(7):1119-1128 ; Carcinogenesis. 2002 Aug;23(8):1297-305); 抑制前列腺 LNCaP 肿瘤细胞增殖，调控细胞周期，使 G₁期细胞静止(Cancer 2003, 98(11):2511-2520)。因此，已有临床实验证明作为食物成分的 I3C，能够安全有效地防止恶性肿瘤的发生。

E. 增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、介入治疗后血管再狭窄等是当今世界威胁人类健康的常见疾病，为导致人口死亡的主要原因之一，因此，防治增殖性血管疾病成为近年研究的热点。人们使用血管紧张素转换酶抑制剂、试用皮质激素等口服药物未能取得满意疗效，目前，尚无任何经临床实践证实能有效预防增殖性血管疾病的口服药物；在支架上涂布肝素、皮质激素、碳化硅等方法也未取得满意效果；晚近临床开始应用的药物涂层支架，主要由医用 316L 不锈钢经过激光雕刻而成，药物（如雷帕霉素、紫衫醇等）渗入非侵蚀性聚合物中，5 μ m 厚的药物-聚合物基质再涂布于支架表面，即为快速释放型支架（FR），它在植入后 15 天内几乎完全洗脱，如在聚合物基质表面再涂一层药物释放聚合物，作为弥散屏障，即成为缓慢释放型支架（SR），它可使药物释放时间延长至 28 天以上。合适的表面涂层材料对药物支架的应用十分重要，作为支架表面涂层材料要求其无毒，与人体有良好的相容性和一定的机械性，降解周期为 60d 到 90d 之间，如目前采用的多聚乳酸、多聚羟基乙酸、聚甲基丙烯酸丁酯等；虽然药物涂层支架在临床上取得了较好的效果，但仍存在着支架内血栓形成、血管脆

弱、血管瘤形成、远期效果不明朗、对不宜进行支架植入的部位治疗困难、药物支架价格昂贵等问题。

目前尚未见国内外有将 I3C 及其二聚体(DIM)用于抗血管平滑肌细胞增殖而防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄的实验及临床研究报告。

发明目的

本发明的目的是给出吡啶-3-甲醇及其二聚体在药学上的新用途,即将吡啶-3-甲醇或/和其二聚体通过口服给药(或局部给药)的方式,用于防治增殖性血管疾病,如用于不能进行介入手术的动脉粥样硬化患者的治疗;或用于经皮动脉球囊成形术和支架植入术后,降低血管介入治疗后新生内膜和动脉中层的厚度,预防血管再狭窄,进一步改善介入治疗的临床效果,降低血管介入治疗的费用等。

研究发现,血管平滑肌细胞的异常增殖是增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管(如冠状动脉、脑动脉、肾动脉等)介入治疗后再狭窄的重要原因,因此,抑制血管平滑肌细胞过度增殖是防治增殖性血管疾病的主要靶点。I3C 及其二聚体(DIM)可通过影响细胞信号传递、调节细胞周期、诱导细胞凋亡,影响酶的活性等方式对异常增殖细胞进行抑制,而对胰腺、乳腺等非肿瘤细胞则没有明显的抑制作用,表明其作用有肿瘤细胞的特异性(Nutr Cancer 2003, 45(1):101-112)。增殖性血管疾病有大量的原癌基因激活(J Virol 1999, 73(9):7745-7751),一定程度、一定阶段类似于肿瘤细胞生长,所以使用 I3C 及其二聚体(DIM)可望对过度增殖的血管平滑肌细胞产生一定程度的抑制。

本发明首次将 I3C 及其二聚体(DIM)引入制备治疗增殖性血管疾病的药物中,通过全身用药的方法可使损伤血管避免过度增生,使某些增殖性血管疾病的治疗可不需介入手术;而对以前放置支架的病变可能只需要行

球囊扩张术；此外本发明涉及的所述药物的使用非常方便，具有较低的治疗价格，可能对目前增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、介入治疗后血管再狭窄的治疗格局产生重要影响。

所述 I3C 及其二聚体(DIM)还是天然的食品添加剂，已通过 FDA 认证，剂量与用法和预防肿瘤相同，故安全性是其重要优势。

具体技术方式

A. 实施实验 1：细胞实验

目的：观察不同浓度的吲哚-3-甲醇 (Indole-3-caibinol I3C)对培养的血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和凋亡的影响，为利用 I3C 防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄 (restenosis RS) 提供基础实验依据。

方法：实验共分 8 个组，对照组 (无药组)：常规培养；DMSO 组：培养基中加入与药物组等体积的 DMSO；实验组：在各组加入 I3C 使培养液中终浓度分别为 25、50、100、200、400、800 μM (细胞克隆试验增加 10 μM 组)。用 MTT 比色法描述不同浓度 I3C 作用 VSMCs 120 小时的生长情况；通过平板克隆实验观察 I3C 作用 3 周对细胞增殖的影响；PCNA 细胞免疫化学法和 TUNEL 法 (400 倍光镜下) 分别用于检测 I3C 作用 72 小时后对 VSMCs 增殖和凋亡的影响。实验组与对照组比较用 Dunnett t 检验 (q' 检验)， $p < 0.05$ 为有显著性差异。

结果：

1. MTT 法测定 VSMCs 的生长曲线：各浓度的 I3C 对细胞的生长都产生了不同程度的抑制效应。加药 120 小时后，50 μM 组 O.D 值较对照组明显降低 (0.733 ± 0.029 vs 0.821 ± 0.014 $p < 0.05$)，而且 I3C 浓度越高，相应 O.D 值降低越显著 ($p < 0.01$)。同时 120 小时内 I3C 使 VSMCs 的生长曲线平坦，其中以 400 μM 组最明显。

2. 平板克隆实验: I3C 作用于 VSMCs 3 周可明显抑制细胞克隆的形成。25 μ M 组形成克隆比对照组少 (25 \pm 2, 69 \pm 1, 143 \pm 4 vs 35 \pm 1, 81 \pm 1, 173 \pm 2 p <0.05); I3C 浓度越高, 形成的克隆数就越少;

3. PCNA 阳性率的测定: I3C 作用 72 小时后, 50-400 μ M 组中 VSMCs 的 PCNA 阳性率与对照组比较出现明显降低: 75.3 \pm 2.5%, 46.5 \pm 3.3%, 37.6 \pm 1.8%, 25.2 \pm 2.3% vs 96.8 \pm 1.7%, (p <0.05 或 0.01)。

4. TUNEL 法发现 I3C 作用 72 小时后, 50-400 μ M 组 VSMCs 凋亡率较对照组显著增加 (24.7 \pm 3.3%, 40.5 \pm 1.5%, 61.6 \pm 2.1%, 80.5 \pm 2.3% vs 6.5 \pm 0.9%, p <0.05 或 0.01)。

5. DMSO 对 VSMCs 的生长动力学无明显影响, 800 μ M 时各试验中细胞 36h 内全部死亡。

结论:

在 72 小时的观察期内, 50-400 μ M 的 I3C 可显著抑制 VSMCs 的增殖并诱导其出现明显的凋亡; 而更低浓度 (25 μ M) 的 I3C 在较长 (3 周) 的观察期内, 可明显减少细胞克隆的形成。当浓度达到 800 μ M 时, I3C 对细胞有明显的毒性作用。本实验表明一定剂量范围的 I3C 对 VSMCs 生长有显著抑制且呈浓度依赖关系, 提示 I3C 是一种潜在的防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄的药物。

B. 实施实验 2: 动物实验

目的: 观察不同剂量的吲哚-3-甲醇 (Indole-3-carbinol) 对大鼠颈总动脉球囊扩张过后内膜增殖及平滑肌细胞凋亡的影响, 探讨 I3C 用于防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄 (restenosis RS) 的可能性。

方法: 35 只雄性 SD 大鼠, 体重 300 \pm 50g, 随机分为 2 组, 单纯球囊损伤组 (对照组, n =5), 球囊损伤+I3C 治疗组 (治疗组, n =30)。其中,

治疗组又分为 6 个亚组 (n=5), 在球囊损伤后灌胃给予 I3C, 剂量分别为 12.5mg/d, 25mg/d, 50 mg/d; 给药时间分别为 4 天, 7 天。喂养 2 周后取材, 然后分别进行 HE 染色及弹力纤维染色, 采用计算机图像分析系统分别检测新生内膜厚度 (H)、新生内膜面积 (NIA)、中膜面积 (MA)、内弹力板围绕面积 (IEM)、外弹力板围绕面积 (EEM) 并计算新生内膜面积/中膜面积 (NIA/MA)、管腔狭窄指数 (NIA/IEM)。PCNA 及 TUNEL 标记法 (400 倍光镜下) 分别检测增殖及凋亡细胞百分率的改变, 以观察 I3C 对血管平滑肌细胞增殖及凋亡的影响。

结果:

1. 病理形态学检测: 球囊扩张术后 2 周, 各组标本均见不同程度的平滑肌细胞增殖迁移。治疗组与对照组比较, 新生内膜厚度、新生内膜面积、NIA/MA 之比均有不同程度减少, 管腔狭窄程度有所减轻, 以 50mg/d, 7d 组最为明显 (73.628 ± 21.689 vs 92.455 ± 39.092 , 0.086 ± 0.018 vs 0.102 ± 0.033 , 0.539 ± 0.132 vs 0.605 ± 0.192 , $P > 0.05$); 与对照组比较给予小剂量 I3C (12.5mg/d, 4d) 治疗后新生内膜厚度、新生内膜面积、内膜/中膜面积比 (NIA/MA), 经统计学分析无显著差异 ($P > 0.05$), 而其它五组均有明显降低趋势, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2. PCNA 阳性率的测定: PCNA 阳性细胞率在对照组高于治疗组, 除 12.5mg/d, 4d 组外 ($P > 0.05$), 其余五组的 PCNA 阳性率与对照组比较出现明显降低 (37.9 ± 3.9), (35.9 ± 1.4), (34.0 ± 1.9), (27.6 ± 1.7), (21.5 ± 1.8) % vs (55.6 ± 1.9) %, $P < 0.01$ 。

3. TUNEL%: I3C 诱导 VSMCs 凋亡与药物剂量及作用时间呈依赖性。12.5mg/d, 4d 组细胞凋亡率 (24.6 ± 1.9) % 较对照组高 (23.4 ± 1.6) %, 但无显著差异 ($p > 0.05$), 其余各组与对照组比较均出现显著差异 ($P < 0.01$)。

结论:

I3C 能显著抑制血管内膜增生并呈明显的剂量依赖关系，可能与其抑制平滑肌细胞增殖并诱导其凋亡有关。本研究初步结果显示，口服适宜剂量的 I3C 在动物实验中可以预防再狭窄，提示口服 I3C 可能成为一种潜在的防治增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄手段。

C. 实施实验 3：人体实验

本方案的适应症：由于增殖性血管疾病如动脉粥样硬化的高发病率、血管介入治疗后较高的再狭窄率及 I3C 很少的副作用，本方案适用于无禁忌症的一般增殖性血管疾病如动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄病例，本方案的禁忌症有：

各类肿瘤患者

肝肾功能损害者

血液系统疾病患者

妊娠及哺乳妇女

接触强致癌剂人群

治疗方案用通过美国 FDA 认证的 Designed Nutritional Products, Inc 口服胶囊剂产品，200mg 每天两次，从实施介入治疗手术前两天开始，至术后四周结束。

局部治疗为使用载 I3C 多聚物双涂层支架：由医用 316L 不锈钢经过激光雕刻而成的支架表面包被 I3C-多聚乳酸基质，在聚合物基质表面再涂一层药物释放聚合物多聚羟基乙酸，作为弥散屏障，即成为缓慢释放型支架 (SR)。支架采用多聚乳酸/多聚羟基乙酸 (PLGA) 涂层包埋 I3C 药物剂量为 1mg (小剂量) 或 3mg (大剂量)，药物完全释放时间为 60-90 天。

本发明的优点

A. 作为一种食物活性成分，I3C 及其二聚体 (DIM) 在表现出诸多有益的生物学效应的同时，其一般治疗剂量的安全性得到动物实验和临床试验

的广泛认同，主要用于肿瘤预防、调节激素平衡、促进机体解毒等方面。作为食品添加剂 I3C 已通过美国 FDA 认证。I3C 在胃内的主要代谢产物为 DIM，故使用该药物及其二聚体(DIM)对病患者几乎无副作用，安全性高。

B. 申请者的系列实验研究首次表明，处于增殖状态的血管平滑肌细胞对 I3C 敏感，能显著抑制血管平滑肌细胞增殖，同时促进其凋亡；很低浓度（50uM）即可起作用，且药物效力呈明显的剂量依赖关系，抑制作用随用药剂量增加及时间延长而逐渐增高。对大鼠颈动脉损伤模型使用 I3C 的短期活体实验表明，每天使用 12.5mg I3C 灌胃 7 天即可非常有效地降低损伤血管新生内膜的厚度，降低血管内膜/中层比值，减轻管腔的狭窄程度，与对照组比较均有显著差异，且随剂量的增加差异越显著。申请者的初步动物实验研究表明 I3C 对血管损伤后内膜增殖有明显的抑制和独特的优势。由于 I3C 在胃内的主要代谢产物为 DIM，DIM 的血浆半衰期较 I3C 明显延长，且大量实验研究发现 I3C 及其二聚体(DIM)可通过许多共同的途径影响细胞信号传递、调节细胞周期、诱导细胞凋亡，影响酶的活性，从而对异常增殖细胞进行抑制，因此我们从细胞及动物实验的结果推测 DIM 可对过度增殖的血管平滑肌细胞产生一定程度的抑制，并促进其凋亡，两者合用也无疑可产生相同的药理作用。故本发明中的 I3C 及其二聚体(DIM)可望用于人类增殖性血管疾病治疗如动脉粥样硬化的治疗或在血管介入治疗后，减少新生内膜和动脉中层的增生，减少经皮球囊扩张术和支架植入术后有效血管腔径的丢失，最终减少血管介入治疗的再狭窄率，改善其临床预后，大大减少需要再血管化手术治疗的病例。

C. 于本方案对损伤血管修复的有益作用，可能将改进介入血管治疗的方式。由于再狭窄的减少，对于一些单纯病变，使用 I3C 及其二聚体(DIM)后，可只进行单纯球囊扩张治疗，而无须放置支架；对于一些较小血管的增殖性病变，原来既不适于单纯球囊扩张，也不适于支架植入的病变，可

考虑使用 I3C 及其二聚体 (DIM) 治疗。

D. 方案使用实施非常方便。只需使用胶囊剂口服即可，甚至像使用维生素丸一样方便，用药疗程短，只需一个月即可。

E. 使用本方案非常经济，整个疗程只需数十美元，比普通支架和药物支架植入等治疗方法有极强的价格优势。