



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111803489 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 202010661777.8

审查员 万光

(22) 申请日 2020.07.10

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111803489 A

(43) 申请公布日 2020.10.23

(73) 专利权人 温州医科大学附属第一医院

地址 325000 浙江省温州市瓯海区南白象

(72) 发明人 苏志鹏 蔡霖 吴泽睿 卢江龙

王成德 李群 许允求

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有

限公司 33100

代理人 徐飞虎 徐关寿

(51) Int.Cl.

A61K 31/365 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书12页 附图6页

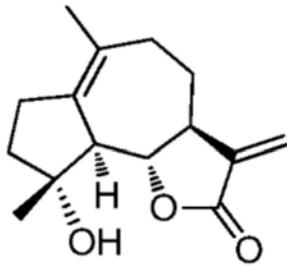
(54) 发明名称

含笑内酯及其衍生物在垂体腺瘤治疗中的应用

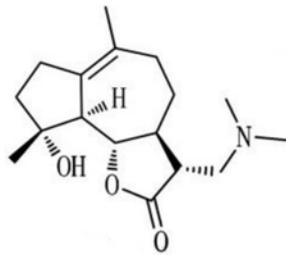
(57) 摘要

本发明涉及含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐在制备用于治疗垂体腺瘤药物中的用途,具体机制主要是含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐通过促进细胞凋亡及自噬相关蛋白的表达,诱导细胞出现凋亡及自噬性死亡,达到对垂体腺瘤如泌乳素腺瘤、临床无功能垂体腺瘤和生长激素腺瘤等的抑制作用。

1. 含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐作为单一活性成分在制备用于治疗垂体腺瘤的药物中的用途,其中含笑内酯或其衍生物为



(I) 或



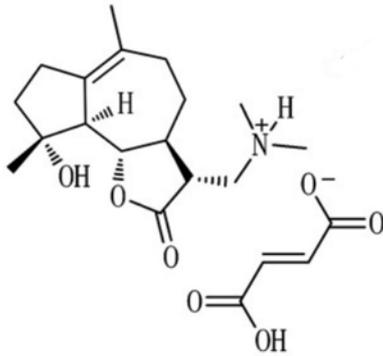
(II)

所示;其中,式(I)所示的化合物

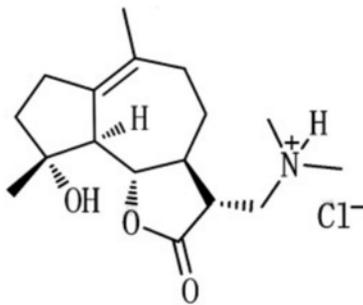
为含笑内酯(MCL),而式(II)所示的化合物为含笑内酯(MCL)二甲氨基迈克尔加成化合物DMAMCL。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,其中所述的含笑内酯或其衍生物为盐酸盐、硫酸盐、溴酸盐、富马酸盐、醋酸盐或柠檬酸盐。

3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的含笑内酯或其衍生物为盐酸盐或富马酸盐化合物,其结构式如下所示:



(V);



(VI)。

4. 根据权利要求3所述的用途,其特征在于,其中所述的含笑内酯衍生物DMAMCL富马酸盐(式V)可在正常生理环境下缓慢而稳定的释放DMAMCL(式II),DMAMCL进一步释放药物活性成分MCL(式I)。

5. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,其中所述的垂体腺瘤为泌乳素腺瘤,临床无功能垂体腺瘤或生长激素腺瘤。

6. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,其中所述的含笑内酯或其衍生物、或其药

学上可接受的盐为式(I)、式(II)、式(V)、式(VI)所示的化合物或其任意的组合。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的用途,其特征在於,所述的含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐对于泌乳素腺瘤具有良好的抑制作用。

8. 根据权利要求7所述的用途,其特征在於,所述的含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐对于耐受多巴胺受体激动剂治疗的泌乳素腺瘤或是对多巴胺受体激动剂敏感的泌乳素腺瘤都具有良好的抑制作用。

9. 根据权利要求7所述的用途,其特征在於,其中,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐为式(I)、式(II)、式(V)所示的化合物或其任意的组合。

10. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,其中式(I)的含笑内酯的通过如下的方法制备,该方法包括在适当的有机溶剂中使小白菊内酯在适当的酸催化剂的催化下制备得到含笑内酯。

11. 根据权利要求10所述的用途,其特征在於,所述的制备含笑内酯的方法包括如下步骤:称取适量小白菊内酯和酸催化剂,加入适当的有机溶剂,搅拌反应0.5~48小时,将反应液倾入适量冰水中,萃取,洗涤,干燥,减压浓缩得含笑内酯。

12. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,所述药物为药物组合物,其包含治疗有效量的含笑内酯或其衍生物及其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体或赋形剂。

13. 根据权利要求12所述的用途,其特征在於,所述药物组合物含有0.1%-99%的含笑内酯或其衍生物及其药学上可接受的盐,其余为药学上可接受的、对人和动物无毒和惰性的可药用载体和/或赋形剂。

14. 根据权利要求13所述的用途,其特征在於,所述药物组合物含有0.5%-90%、1%-80%或5%-50%的含笑内酯或其衍生物及其药学上可接受的盐。

15. 根据权利要求12-14任一项所述的用途,其特征在於,所述的药物组合物制备成胶囊剂,片剂,粉剂,粒剂,糖浆剂型形式口服给药,或通过注射,软膏,栓剂非肠胃给药。

16. 根据权利要求15所述的用途,其特征在於,所述的药物组合物通过粘合剂,赋形剂,稳定剂,崩解剂,矫味剂或润滑剂以普通方法生成,或制备为控释给药剂型、缓释给药剂型、各种微粒给药系统。

17. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐每天给药总剂量为1至1000mg。

18. 根据权利要求17所述的用途,其特征在於,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐每天给药总剂量为5至500mg。

19. 根据权利要求17-18任一项所述的用途,其特征在於,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐为单剂量或者为分剂量形式给药。

20. 根据权利要求19所述的用途,其特征在於,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐给药形式为每日二次或三次。

21. 根据权利要求19所述的用途,其特征在於,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐给药形式为静脉注射,每天分一至三次给药0.1至100mg。

22. 根据权利要求21所述的用途,其特征在於,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐给药形式为静脉注射,每天分一至三次给药0.5至50mg的剂量。

23. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,将治疗有效量的含笑内酯或其衍生物、或

其药学上可接受的盐给予需要治疗的受试者,所述的受试者为人类或非人哺乳动物。

24. 根据权利要求23所述的用途,其特征在于,所述的非人哺乳动物为非人灵长类、绵羊、犬、猫、牛和马。

含笑内酯及其衍生物在垂体腺瘤治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物领域,具体涉及含笑内酯及其衍生物在治疗垂体腺瘤中的新应用。

背景技术

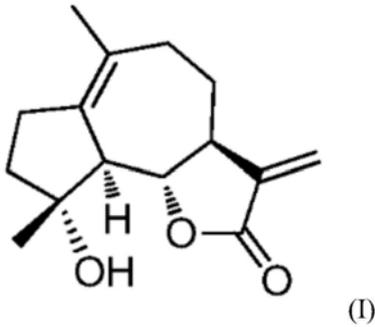
[0002] 垂体腺瘤的人群年发病率高达7.5~15/10万人,占颅内原发肿瘤的 16.7%,其中泌乳素腺瘤是最常见的功能性垂体腺瘤,约占所有垂体腺瘤的 40%~66%。根据目前我国13亿人口计算,年新增泌乳素腺瘤病例数大约为 6~12万人。事实上,随着内分泌诊断及神经影像学技术的发展,垂体泌乳素腺瘤病例数可能还会高于上述数据。垂体泌乳素腺瘤的临床表现主要是内分泌紊乱所致的男性阳痿/性功能减退、女性的闭经泌乳/不孕不育,以及肿瘤增大所形成的占位效应,压迫邻近结构所致的视觉障碍和垂体功能低下等症状,严重危及患者的生命安全以及生活质量。

[0003] 目前,泌乳素腺瘤首选多巴胺受体激动剂(Dopamine agonists,DA)治疗,包括溴隐亭(Bromocriptine,BRC)和卡麦角林(Cabergoline,CAB),主要通过和肿瘤细胞表面的多巴胺2型受体(Dopamine receptor type 2, D2R)相结合,激活下游凋亡信号通路并减少泌乳素分泌,最终达到抑制肿瘤生长的作用。而肿瘤细胞D2R的表达缺失则成为禁锢DA疗效的重要因素。临床随访工作表明DA能使75%-90%的泌乳素腺瘤患者血清泌乳素下降至正常水平并且使肿瘤体积明显缩小,但临床上仍有10%-25%患者对DA 治疗无效,即便是手术或立体定向放射治疗,血液中泌乳素的控制仍然不理想,称之为耐药病例。因此,如何为该部分DA耐药病例提供新型、有效而安全的治疗方案,成为目前治疗泌乳素腺瘤亟待解决的热点问题。目前垂体泌乳素细胞腺瘤治疗中涉及中草药的研究,仍然是空白。

[0004] 天然产物对于新药的发现与设计、合成具有重要的意义,也是生物活性物质和创新药物的重要来源,已批准上市的药物例如紫杉醇(Taxol)、多西他赛(Docetaxel)、长春瑞滨(Vinorelbine)、羟基喜树碱(camptothecin)、青蒿素(Artemisinin)等都是天然产物的衍生物或其类似物。天然产物作为药物来源开发的优越性在于:传统治疗肿瘤的化疗药物均存在耐药问题,而天然产物在抗癌药物发现中具有独特作用,从中有可能筛选出高效低毒杀灭肿瘤细胞的先导化合物,从而开发出治疗恶性肿瘤的新型药物,减轻患者痛苦和改善患者生活质量。

[0005] 含笑内酯(别名:乌心石内酯;MCL,Micheliolide),是一种从木兰科含笑属黄兰(*Michelia champaca*)和中国台湾含笑(*Michelia compressa*)根皮中提取分离的愈创木烷型倍半萜内酯类中药单体。在传统中医药理中主要适用于消炎镇痛,治疗发热、偏头痛以及类风湿性关节炎等疾病。含笑内酯的化学结构式为:

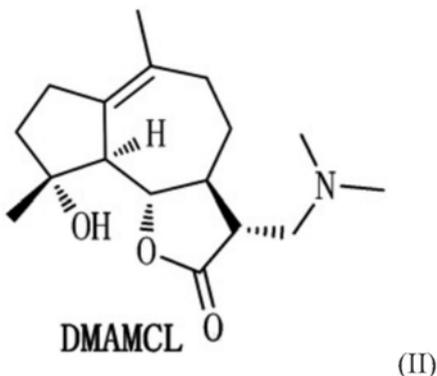
[0006]



[0007] 前期发现含笑内酯及其衍生物用于治疗如下癌症：白血病、乳腺癌、前列腺癌，肝癌、食道癌、胃癌、口腔癌、何杰金淋巴瘤、胰腺癌、直肠结肠癌、子宫颈癌、非何杰金淋巴瘤、神经胶质瘤、黑色素瘤、膀胱癌、卵巢癌、甲状腺癌、前列腺癌和卡波西肉瘤，并已申请专利（申请号：201010153701.0；201010153685.5等）。现有制备含笑内酯的方法主要通过化学合成，中国专利申请号201010153685.5公开了一种含笑内酯的制备方法，以小白菊内酯为原料，在适当有机溶剂中，在Lewis酸催化下重排得到含笑内酯，产率达60%以上。CN201711285215.2则公开新一类含笑内酯衍生物及其在制备抗肿瘤和免疫治疗方面药物的用途。

[0008] 近年来，随着祖国中医药学的不断发展，含笑内酯(MCL)在癌症治疗中的作用逐渐显现。已有研究证实，MCL可通过抑制NF- κ B信号通路并调控细胞ROS水平来诱导肿瘤细胞凋亡，对急性骨髓性白血病、乳腺癌、黑色素瘤、肠癌以及胰腺癌等疾病具有显著的治疗作用。而随着医用化学技术的不断进步，MCL的二甲氨基迈克尔加成化合物(Dimethylamino Michael adduct of MCL, DMAMCL)具有比MCL更高的血浆药物动力学稳定性(其结构式如下所示)，更持久的药物释放作用时间以及更强的水溶性，使其具有更为广阔的应用前景。在中枢神经系统疾病当中，其可高效通过血脑屏障且对神经细胞毒副作用小，脑/血浆药物蓄积浓度比($C_{\text{brain}}/C_{\text{plasma}}$)是替莫唑胺(TMZ, Temozolomide)的4.5倍，可高效诱导胶质瘤细胞死亡，最终抑制肿瘤细胞生长，而被认为是恶性胶质瘤的潜在治疗药物。目前MCL已在中国(ID:2017L04073)及澳大利亚(ID:ACTRN12616000228482)进入临床I期实验。

[0009]



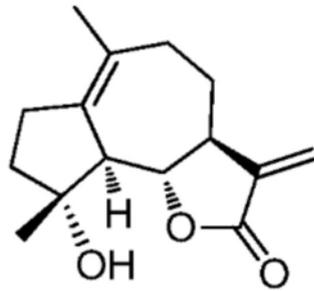
[0010] 目前含笑内酯(MCL)及其衍生物在中枢神经肿瘤中的治疗报道主要关注恶性胶质瘤细胞瘤，对于良性肿瘤垂体泌乳素腺瘤的治疗作用则尚无报道。

发明内容

[0011] 针对上述问题，发明人意外发现含笑内酯及其衍生物可以通过诱导细胞凋亡及自

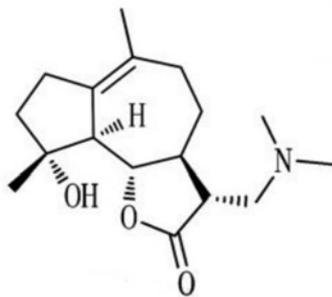
噬性死亡抑制垂体腺瘤,特别是对于垂体泌乳素腺瘤具有比较好的治疗作用。

[0012] 一方面,本发明涉及一种下列通式所示的含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐在制备用于治疗垂体腺瘤的药物中的用途,其中含笑内酯或其衍生物选自如下的化合物:

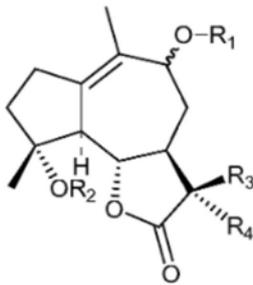


(I),

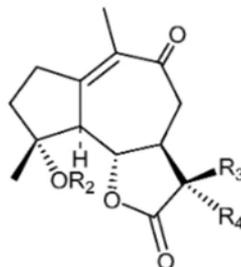
[0013]



(II),



(III),



(IV),

[0014] 其中:

[0015] R_1 为氢或 C_{1-8} 酰基,四氢吡咯甲酰基,四氢呋喃甲酰基,Ar- C_{1-4} 酰基, Ar-O- C_{1-4} 酰基,Ar-S- C_{1-4} 酰基,Y-N- C_{1-4} 酰基;其中 C_{1-8} 酰基优选自直链或支链烷酰基、烯酰基和炔酰基;

[0016] Ar为芳基或取代芳基;Y为杂环芳基或取代杂环芳基;Ar优选自苯基、苯甲酰基、萘基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、异恶唑基、异噻唑基、吡唑基、恶唑基、噻唑基、咪唑基、哒嗪基、吡嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、嘌呤基、苯并恶唑基、苯并噻唑基等;Y优选自尿嘧啶基、四氢异喹啉基、邻苯二甲酰亚胺基、萘二甲酰亚胺基。 R_2 为 C_{1-7} 酰基, C_{1-6} 烷基;其中, C_{1-7} 酰基优选自乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基,氯乙酰基,苯甲酰基等; C_{1-6} 烷基优选自于甲基,乙基,丙基,异丙基,丁基,异丁基,环戊基,环己基等;或者 $R_1=R_2$;

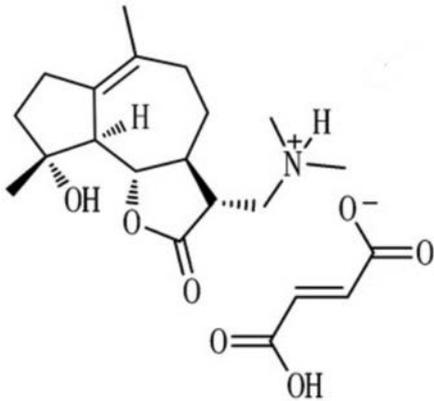
[0017] R_3 、 R_4 合并为双键,或者 R_3 为氢, R_4 为 $-CH_2NR_5R_6$,其中 R_5 和 R_6 分别为 C_{1-4} 烃基。

[0018] 在本发明的另一实施方案中,本发明涉及如上所示的含笑内酯或其衍生物药学上可接受的盐在制备用于治疗垂体腺瘤的药物中的用途,其中所述的含笑内酯或其衍生物为

盐酸盐、硫酸盐、溴酸盐、富马酸盐、醋酸盐或柠檬酸盐等。

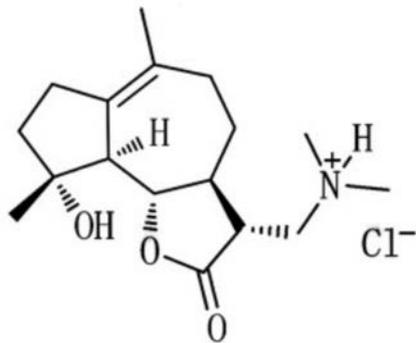
[0019] 在另一优选的实施方案中,含笑内酯或其衍生物成盐化合物中的含笑内酯或其衍生物的结构如式(I)或式(II)所示。其中,式(I)所示的化合物为含笑内酯(MCL),而式(II)所示的化合物为含笑内酯(MCL)二甲氨基迈克尔加成化合物DMAMCL。

[0020] 在另一更优选的实施方案中,所述用途中的含笑内酯或其衍生物为盐酸盐或富马酸盐化合物,其结构式如下所示:



(V);

[0021]



(VI);

[0022] 其中,DMAMCL的成盐化合物例如DMAMCL富马酸盐(式V)可在正常生理环境下缓慢而稳定的释放DMAMCL(式II),DMAMCL进一步释放药物活性成分MCL(式I)。

[0023] 在本发明的另一实施方案中,本发明公开了含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐在制备用于治疗垂体腺瘤的药物中的用途,其中所述的垂体腺瘤为泌乳素腺瘤,临床无功能垂体腺瘤,生长激素腺瘤等。

[0024] 在本发明另一优选的实施方案中,本发明公开了含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐在制备用于治疗垂体腺瘤的药物中的用途,其中所述的垂体腺瘤为泌乳素腺瘤,临床无功能垂体腺瘤,生长激素腺瘤等;所述的含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐选自式(I)、式(II)、式(V)、式(VI)所示的化合物或其任意的组合,或包含式(I)、式(II)、式(V)或式(VI)化合物的中药提取物。

[0025] 在本发明另一优选的实施方案中,发明人经大量实验意外发现,含笑内酯或其衍生物对于泌乳素腺瘤具有良好的抑制作用,无论是对于耐受DA治疗的泌乳素腺瘤还是对DA敏感的泌乳素腺瘤都具有良好的抑制作用。其中,含笑内酯或其衍生物优选为式(I)、式

(II)、式(V)所示的化合物或其任意的组合,或包含式(I)、式(II)或式(V)化合物的中药提取物。

[0026] 为了证实含笑内酯(MCL)或其衍生物在垂体腺瘤中的治疗作用,发明人根据既往垂体泌乳素细胞腺瘤耐药研究数据,选择认可度较高的MMQ细胞(高表达D2R,对DA治疗敏感)和GH3细胞(低/无表达D2R,通常耐受DA治疗)进行MCL药物干预。

[0027] 体外实验结果显示,MCL对两者皆具有很强的细胞抑制作用,且耐受DA治疗的GH3细胞株更为敏感。而对GH3细胞皮下成瘤的裸鼠采用DMAMCL药物口服治疗后发现,其可有效抑制肿瘤的生长(见图1)。GH3细胞的MCL药物半抑制浓度(IC_{50})为 $10\mu\text{M}$,MMQ细胞的MCL药物半抑制浓度(IC_{50})为 $20\mu\text{M}$,皆低于发明人以往研究中DA的治疗浓度(溴隐亭的 IC_{50} 为 $50\mu\text{M}$,卡麦角林的 IC_{50} 为 $25\mu\text{M}$)。

[0028] 在对MCL药物作用机制进行相应研究后发现,不同于以往依赖DA与D2R相结合,促使肿瘤细胞凋亡这一经典途径,MCL则主要通过诱导细胞凋亡(见图2)及自噬性细胞死亡(见图3)达到药物对泌乳素腺瘤的抑制作用,且这一作用在耐受DA治疗的GH3细胞株上更为明显。上述结果提示,MCL对泌乳素腺瘤,即便是对DA耐药的肿瘤细胞亦具有良好的抑制作用,其机制可能涉及MCL介导的细胞凋亡及自噬性死亡过程。

[0029] 发明人将药物处理前后的GH3和MMQ细胞株进行RNA测序检查,其结果提示,MCL可能是通过激活MAPK信号通路从而介导的肿瘤细胞的死亡。而抑制GH3和MMQ细胞中MAPK信号通路关键基因ERK、JNK及P38的磷酸化活性,则可有效逆转MCL的抑制作用(见图4)。为了进一步证实,MCL对垂体泌乳素腺瘤的抑制作用在动物活体中同样具有效果,发明人采用雌激素诱导的大鼠垂体泌乳素腺瘤模型进行药物干预治疗。其研究发现,MCL可有效抑制肿瘤组织的生长。较阴性对照组,药物处理可有效抑制肿瘤组织的体积及瘤体质量。此外,发明人对肿瘤组织样本进行蛋白检测后发现,MCL可有效激活肿瘤组织细胞中MAPK信号通路的表达,并通过细胞凋亡及自噬性死亡过程,抑制肿瘤的生长(见图5)。最后,为了进一步探究MCL对泌乳素腺瘤以外的其他类型垂体瘤是否同样具有抑制作用。发明人对经蝶内镜垂体肿瘤切除患者的部分瘤体组织进行原代培养(病人基本信息见表1),并予以MCL药物体外干预处理,结果显示8例人垂体瘤细胞组织(1例泌乳素腺瘤,6例临床无功能垂体腺瘤,1例生长激素腺瘤)中,6例肿瘤组织对MCL的治疗敏感,肿瘤组织活性受到明显抑制,仅两例临床无功能垂体腺瘤对MCL治疗无效(见图6)。

[0030] 在本发明另一实施方案中,本发明提供了一种制备上式(I)的含笑内酯的方法,该方法包括在适当的有机溶剂中使小白菊内酯在适当的酸催化剂的催化下制备得到含笑内酯。优选的制备含笑内酯的方法包括如下步骤:称取适量小白菊内酯和酸催化剂,加入适当的有机溶剂,搅拌反应0.5~48小时,将反应液倾入适量冰水中,萃取,洗涤,干燥,减压浓缩得含笑内酯。具体工艺可参考中国专利申请201010153701.0和201010153685.5等。

[0031] 式(III、IV)所示的含笑内酯衍生物的制备方法可参考中国专利申请CN201711285215.2。

[0032] 式(V、VI)所示的含笑内酯衍生物盐的制备方法可参考文献Yinghong An et al, Micheliolide Derivative DMAMCL Inhibits Glioma Cell Growth In Vitro and In Vivo; PLoS One. 2015;10(2):e0116202。式(V)所示的含笑内酯衍生物DMAMCL富马酸盐的制备还可进一步参考CN201410071673.6。

[0033] 本发明还提供了一种包含上述含笑内酯或其衍生物的药物组合物,所述的药物组合物包括治疗有效量的含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0034] 含笑内酯或其衍生物及其药学上可接受的盐用作药物时,可以直接使用,或者以药物组合物形式使用。该药物组合物含有0.1%-99%,优选为0.5%-90%、1%-80%或5%-50%的含笑内酯或其衍生物及其药学上可接受的盐,其余为药学上可接受的、对人和动物无毒和惰性的可药用载体和/或赋形剂或其他抗癌药物联合应用。

[0035] 本发明的药物组合物可以制备成胶囊剂,片剂,粉剂,粒剂,糖浆或类似剂型形式口服给药,或通过注射,软膏,栓剂或类似剂型非肠胃给药。这些药物制剂可通过使用本领域熟知的辅助剂,如粘合剂,赋形剂,稳定剂,崩解剂,矫味剂,润滑剂等等以普通方法生成,也可以制备为控释给药剂型、缓释给药剂型、各种微粒给药系统。

[0036] 虽然剂量随症状和病人的年龄,疾病或失调的性质及严重性和给药的途径和方式而变,但对成年病人口服给药的情况来说,含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐正常给药为每天总剂量1至1000mg,优选为5至500mg,以为单剂量,或者为分剂量形式;例如每日二次或三次;对于静脉注射的情况,每天可以分一至三次给用0.1至100mg,优选为0.5至50mg的剂量。

[0037] 本发明提供了治疗疾病的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明所述的含笑内酯或其衍生物、或其药学上可接受的盐给予需要治疗的受试者。术语“受试者”包括人类和非人哺乳动物,诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、牛和马等,优选的受试者为人类患者。

附图说明

[0038] 附图1:含笑内酯(MCL)对于GH3及MMQ的活性抑制作用。其中:

[0039] (A) MCL药物浓度依赖性条件下干预GH3及MMQ细胞活性的CCK8实验结果。发明人发现,随着浓度不断增加,GH3及MMQ细胞活性受到明显抑制。GH3细胞株MCL干预后半抑制浓度(IC₅₀)约为10μM(A,左),而MMQ的半抑制浓度(IC₅₀)约为20μM(A,右),皆低于多巴胺受体激动剂(DA)的药物半抑制浓度(溴隐亭的IC₅₀为50μM,卡麦角林的IC₅₀为25μM)。

[0040] (B) MCL药物时间依赖性条件下干预GH3(B,左,10μM)及MMQ(B,右,20μM)细胞活性的CCK8实验结果。发明人发现,随着作用时间的不断增加,GH3及MMQ细胞活性受到明显抑制。

[0041] (C) MCL对GH3及MMQ细胞克隆形成率的抑制情况。取对数生长期细胞进行细胞计数后,接种500个细胞于6孔板中,培养14天后予以不同浓度MCL处理24小时,然后予以结晶紫染色拍照。

[0042] (D-F)对GH3细胞皮下成瘤的裸鼠采用DMAMCL(100mg/kg)药物口服治疗后发现,其可有效抑制裸鼠肿瘤的生长。***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05vs,Control group.

[0043] 附图2:含笑内酯(MCL)可诱导GH3及MMQ细胞凋亡。其中:

[0044] (A-B)通过流式凋亡检测后发现,MCL可显著诱导GH3及MMQ细胞出现早期及晚期凋亡。

[0045] (C-D)GH3及MMQ细胞经过MCL处理后(10μM及20μM),对细胞内凋亡相关蛋白进行Western blot检测后发现,凋亡相关蛋白表达随着MCL药物作用时间(C)或药物作用浓度

(D)的增加而改变。

[0046] 附图3:含笑内酯(MCL)可显著激活GH3及MMQ细胞自噬。其中:

[0047] (A-B)含笑内酯(MCL)在作用时间依赖性条件下(A)及药物浓度依赖性条件下(B),可以逐渐增强GH3及MMQ细胞自噬,促进自噬相关蛋白ATG7,P62和LC3-II的表达。

[0048] (C)MCL作用24小时后,细胞自噬相关蛋白LC3-II的荧光点强度明显增加。MCL可以诱导LC3-II荧光点征的形成,而在对照组内,LC3-II蛋白的红色荧光则呈现散在的胞浆内均匀分布。

[0049] (D)透射电镜结果显示,MCL药物处理24小时后,GH3及MMQ细胞胞浆内自噬体以及自噬溶酶体较对照组明显增多。

[0050] 附图4:含笑内酯(MCL)可通过激活MAPK信号通路抑制肿瘤细胞生长。其中:

[0051] (A-B)RNA测序分析GH3及MMQ细胞经MCL药物处理前后,相关蛋白表达变化情况。基因热图(A)以及GO分析(B)结果显示,MCL药物处理前后,MAPK信号通路出现显著激活。

[0052] (C)为了进一步确认测序分析结果的可靠性,发明人对药物处理前后的GH3及MMQ细胞进行MAPK信号通路关键调控蛋白ERK,P38和JNK的Western blot检测,结果显示,MCL处理后,关键蛋白的磷酸化活性水平较处理前有显著提高。

[0053] (D-E)发明人采用ERK蛋白磷酸酶抑制剂抑制其磷酸化水平(D)后,MCL对GH3及MMQ细胞的药物抑制作用效果明显减弱(E)。

[0054] (F-G)发明人采用JNK蛋白磷酸酶抑制剂抑制其磷酸化水平(F)后,MCL对GH3及MMQ细胞的药物抑制作用效果明显减弱(G)。

[0055] (H-I)发明人采用P38蛋白磷酸酶抑制剂抑制其磷酸化水平(H)后,MCL对GH3及MMQ细胞的药物抑制作用效果明显减弱(I)。

[0056] 附图5:含笑内酯(MCL)可抑制雌激素诱导的大鼠垂体泌乳素腺瘤肿瘤组织生长。其中:

[0057] (A-B)雌二醇诱导6周后,对成熟的大鼠垂体泌乳素腺瘤模型进行DMAMCL(200mg/kg)药物干预2周。MRI检查结果显示(A),DMAMCL药物干预可显著抑制瘤体组织生长,肿瘤的体积(B,左)及质量(B,右)皆受到明显抑制。

[0058] (C)对瘤体组织进行免疫组化检测后发现,药物处理后的瘤体组织中,MAPK信号通路关键调控蛋白ERK,P38和JNK的磷酸化明显提高。

[0059] (D)对瘤体组织进行Western blot检测后发现,药物处理后的瘤体组织中,细胞凋亡及自噬性死亡相关蛋白表达明显改变。

[0060] 附图6:含笑内酯(MCL)可抑制其他肿瘤类型的垂体腺瘤生长。其中:

[0061] (A)8例人垂体腺瘤组织进行原代培养后予以MCL(20 μ M)药物处理24小时,CCK-8实验检测其细胞活性。结果显示8例原代肿瘤细胞中,6例细胞组织对MCL治疗敏感,2例临床无功能垂体腺瘤对MCL治疗无效。

[0062] (B-C)对8例人垂体腺瘤组织蛋白进行Western blot检测后发现(B),在MCL治疗有效的6例组织样本中,MAPK关键调控蛋白ERK、JNK、P38磷酸化显著增强,且自噬相关蛋白ATG7、P62及LC3-II蛋白表达明显升高。(C)对8例人垂体腺瘤组织样本免疫组化HE染色检测结果。NFPA,临床无功能垂体腺瘤;GH,生长激素腺瘤;PRL,泌乳素腺瘤。

具体实施方式

[0063] 实施例1含笑内酯(MCL)的制备

[0064] 以中国台湾含笑为原料,粉碎20-40目,加入萃取釜中,以无水甲醇为夹带剂,采用超临界CO₂萃取,收集萃取液,回收甲醇,得萃取物,用石油醚回流脱除脂溶性杂质,再将脱脂物用低碳醇热溶,加入活性炭回流脱色,脱色液回收溶剂至适量体积,经制备液相ODS RP-C18反相柱进行纯化,以甲醇和水的混合溶液进行洗脱,浓缩对应组分,石油醚-丙酮(2:1, V/V)重结晶,得MCL产品。所述超临界CO₂萃取条件为萃取温度为45-60℃,萃取压力为23-34MPa,分离釜I温度为40-50℃,压力为8-10MPa,分离釜II温度为35-40℃,压力为4-6MPa,萃取时间为2-6h。所述石油醚脱脂,加入2-5倍萃取物体积量的石油醚加热回流脱脂1-3次,离心,分离固液,得脱脂物。所述低碳醇为C1-C4醇,优选乙醇、甲醇或异丙醇。所述甲醇和水的混合溶液是指甲醇体积百分比为83%,水的体积百分比为17%的混合溶液。本实验中所用MCL药物为重结晶后溶入二甲基亚砜(DMSO),形成20mM原液分装后,储存于-80℃冰箱备用。

[0065] 实施例2含笑内酯衍生物(DMAMCL)的制备

[0066] 含笑内酯衍生物(DMAMCL)的制备方式:将Me₂NH·HCl(1.5g, 18mmol), K₂CO₃(5.0g, 36mmol)以及CH₂Cl₂(100ml)室温下进行混合并形成均质溶解液。然后将MCL(300mg, 1.2mmol)与均质溶解液混合,室温下混合搅拌3小时。将以上反应液使用CH₂Cl₂进行浓缩和重悬后,利用去离子水层析分离,将所得分离液采用Na₂SO₄滤干。将滤干后物质用CH₂Cl₂(5ml)溶解并予以延胡索酸酯(0.1N)处理,使溶液pH调整至4。最后用CH₂Cl₂(10ml)萃取水相,经冻干得到化合物DMAMCL。本实验中所用DMAMCL药物溶于去离子水中,形成400mg/ml原液分装后,储存于-80℃冰箱备用。

[0067] 实施例3含笑内酯及其衍生物对泌乳素腺瘤的细胞抑制试验

[0068] 1) 取状态良好的对数生长期细胞,用PBS洗涤2-3次,用F12培养基在37℃、5%CO₂的条件下培养,培养基添加2.5%胎牛血清,15%马血清和100U/ml青霉素/链霉素。

[0069] 2) 以30万细胞/ml培养基的比例接种于培养板内,使用6孔板培养,每孔内培养基为3ml;

[0070] 3) 间隔一天后,将MCL原液从-80℃冰箱中取出,自然条件下溶解至液体状,确认无沉淀及悬浊物后,根据6孔板的每孔终体积为3ml进行计算,分别向GH3及MMQ细胞培养多个复孔中分别加入0μl、1.5μl、3μl及7.5μl的MCL原液(20mM),使GH3及MMQ细胞培养基中MCL终浓度为0μM、10μM、20μM及50μM。

[0071] 4) 期间不予以换液,处理细胞至24小时后进行细胞活性检测,确认GH3细胞的MCL药物半抑制浓度(IC₅₀)为10μM,MMQ细胞的MCL药物半抑制浓度(IC₅₀)为20μM。

[0072] 5) 再次取状态良好的对数生长期细胞,用PBS洗涤2-3次,用F12培养基在37℃、5%CO₂的条件下培养,培养基添加2.5%胎牛血清,15%马血清和100U/ml青霉素/链霉素。

[0073] 6) 以30万细胞/ml培养基的比例接种于培养板内,使用6孔板培养,每孔内培养基为3ml;

[0074] 7) 间隔一天后,将MCL原液从-80℃冰箱中取出,自然条件下溶解至液体状,确认无沉淀及悬浊物后,根据6孔板的每孔终体积为3ml进行计算,分别向GH3及MMQ细胞培养多个复孔中分别加入1.5μl及3μl的MCL原液(20mM),使GH3细胞培养基中MCL终浓度为10μM,使

MMQ细胞培养基中MCL终浓度为20 μ M。期间不予以换液,处理细胞0、12、24 及48小时后进行后续实验,观察MCL对细胞活性的抑制情况。

[0075] 实施例4含笑内酯及其衍生物对泌乳素腺瘤裸鼠皮下成瘤验证试验

[0076] 1) 从上海实验动物中心购买5周龄雌性BALB/c (nu/nu) 裸鼠,SPF级动物房适应性饲养一周,裸鼠未见明显异常及不适状态下,则可进行GH3 细胞皮下种植成瘤实验。

[0077] 2) 接种部位选择腰背部皮下,避开前肢,不触碰肌肉,一侧接种 1×10^7 GH3细胞,一只裸鼠接种一侧。用F12培养基,添加2.5%胎牛血清,15%马血清和100U/ml青霉素/链霉素重悬细胞。细胞浓度要求1ml内含有 1×10^8 细胞,接种前用75%的酒精对进针部位擦拭消毒。

[0078] 3) 一次性针头抽取细胞悬液,排去空气,从进针部位向前穿刺大约1cm,进行皮下注射。注射时,每次注射量大约为0.1ml,注射完毕后,缓慢退出针头,尽量避免漏液。注射过程中,细胞需一直置于冰上,使细胞处于比较低的代谢状态,并尽量在半小时内完成。

[0079] 4) 接种7-10天后便可看到肿块长起,进行游标卡尺检测,当肿瘤体积大部分接近50mm³时,将裸鼠随机均分为实验组及对照组。其中实验组裸鼠予以DMAMCL水溶液口饲,使用剂量要求为100mg/kg,每天服用一次。对照组仅口饲同等量去离子水。当对照组肿瘤组织生长至2000mm³则停止整个实验。脱臼法处死小鼠后,取出肿瘤,进行后续实验。

[0080] 实施例5含笑内酯及其衍生物对大鼠泌乳素腺瘤模型干预验证试验

[0081] 1) 从上海实验动物中心购买4周龄Fischer 344大鼠,SPF级动物房适应性饲养一周,未见明显异常及不适状态下,则可进行垂体泌乳素腺瘤诱导形成实验。

[0082] 2) 在4周龄Fischer 344大鼠皮下包埋1-cm硅橡胶胶囊,胶囊内含有 10mg的17 β -雌二醇激素,胶囊可缓慢释放雌二醇激素,从而诱导大鼠泌乳素腺瘤形成。

[0083] 3) 6周后,对大鼠进行MRI检查,进一步明确泌乳素腺瘤形成后,将大鼠随机均分为实验组及对照组。其中实验组裸鼠予以DMAMCL水溶液口饲,使用剂量要求为200mg/kg,每天服用一次。对照组仅口饲同等量去离子水。药物服用2周后,终止实验,模型样本予以MRI检查,检测肿瘤生长情况,处死小鼠后,取出肿瘤,进行后续实验。

[0084] 实施例6含笑内酯及其衍生物药物作用机制的阐述及技术效果证明

[0085] A、通过细胞活性检测发现,MCL及其衍生物对泌乳素腺瘤DA耐药细胞株GH3及敏感细胞株MMQ具有显著抑制作用。(图1A) MCL药物浓度依赖性条件下干预GH3及MMQ细胞活性的CCK8实验结果。发明人发现,随着浓度不断增加,GH3及MMQ细胞活性受到明显抑制。GH3细胞株MCL干预后半抑制浓度(IC₅₀) 约为10 μ M(A,左),而MMQ的半抑制浓度(IC₅₀) 约为20 μ M(A,右)。(图1B) MCL药物时间依赖性条件下干预GH3(B,左,10 μ M) 及MMQ(B,右,20 μ M) 细胞活性的CCK8实验结果。发明人发现,随着作用时间的不断增加,GH3及MMQ细胞活性受到明显抑制。(图1C) MCL对GH3及MMQ细胞克隆形成率的抑制情况。取对数生长期细胞进行细胞计数后,接种500个细胞于6孔板中,培养14 天后予以不同浓度MCL处理24小时,然后予以结晶紫染色拍照。发明人发现,随着浓度不断增加,GH3及MMQ细胞克隆形成情况受到明显抑制。而在体内裸鼠皮下种植成瘤实验中,服用DMAMCL实验组裸鼠皮下肿瘤体积及质量较对照组明显减小(图1D)。DMAMCL实验组裸鼠皮下肿瘤体积为 $154.83 \pm 68.90\text{mm}^3$,对照组裸鼠皮下肿瘤体积为 $517.44 \pm 217.60\text{mm}^3$ (n =6, P<0.001;图1E);DMAMCL实验组裸鼠皮下肿瘤质量为 $0.09 \pm 0.03\text{g}$,对照组裸鼠皮下肿瘤体积为 $0.33 \pm 0.17\text{g}$ (n=6, P=0.012;图1F)

[0086] B、流式细胞凋亡及蛋白检测结果提示,MCL可促进凋亡相关蛋白表达,诱导细胞出现凋亡。(图2A和2B)采用流式细胞凋亡鉴定法,对GH3及MMQ细胞进行MCL处理0、12、24及48小时后进行流式检测,结果如图2A所示,结果显示MCL可显著诱导GH3(图2A)及MMQ(图2B)细胞出现早期及晚期细胞凋亡。(图2C和2D)提取MCL处理后GH3及MMQ细胞蛋白进行Western blot检测,提取处理后细胞蛋白,加入PMSF终浓度为1mmol/L的4℃预冷细胞裂解液中。冰上孵育30分钟后,4℃,10000g,离心15分钟,取上清进行BCA蛋白定量,100℃加热15分钟使蛋白变性。配制12%的分离胶和5%的浓缩胶,取30-40ug蛋白样本于点样孔中,电压80V,电泳30分钟后电压120V,电泳60分钟使蛋白分离。在170mA恒流下湿转120分钟,使蛋白转移至0.22um的PVDF膜,取出膜放入5%的脱脂牛奶中,室温封闭90分钟。移去脱脂牛奶,TBST洗涤三次。将膜放入用5%BSA配制好的一抗稀释液中,4℃孵育过夜。移去一抗,TBST洗涤三次后加入1:2000稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育60分钟,洗涤数次,将膜放入ECL发光液中,在LAS-4000成像仪中显色成像。其结果如图2C和2D所示,凋亡相关蛋白表达随着MCL药物作用时间(图2C)或药物作用浓度(图2D)的增加而产生改变。

[0087] C、通过透射电镜及蛋白检测后发现,MCL可促进自噬相关蛋白表达并诱导自噬体形成,介导肿瘤细胞自噬性死亡,达到对泌乳素腺瘤的抑制作用。(图3A和3B)提取MCL处理后GH3及MMQ细胞蛋白进行Western blot检测,其结果如图3A和3B所示,自噬相关蛋白表达随着MCL药物作用时间(图3A)或药物作用浓度(图3B)的增加而升高。(图3C)对MCL处理后细胞进行自噬相关蛋白LC3-II的表达检测。将处理后肿瘤细胞球贴附于涂有25ug/ml多聚赖氨酸包被的盖玻片上,继续培养2h,用4%多聚甲醛固定15min,PBS液冲洗3次,每次5min;0.1%Triton穿孔3次,每次5min,PBS漂洗2次,每次5min,10%山羊血清封闭30min;加入兔抗鼠LC3-II IgG(1:1000)4℃过夜,PBS液冲洗3次,每次5min;加入PE标记羊抗兔IgG室温孵育2h,PBS液冲洗3次,每次5min,甘油封片后在荧光显微镜下观察。结果如图3C所示,MCL作用24小时后,细胞自噬相关蛋白LC3-II的荧光点强度明显增加。MCL可以诱导LC3-II荧光点征的形成,而在对照组内,LC3-II蛋白的红色荧光则呈现散在的胞浆内均匀分布。(图3D)对MCL处理后细胞进行透射电镜检测自噬体形成情况。细胞微球用2.5%戊二醛在0.1M磷酸缓冲液中固定过夜,在室温下用1%四氧化锇(PH 7.4)后固定2h。然后在分级乙醇系列中脱水,使用Spurr树脂渗透包被样品。然后在60℃下聚合48h,用LKB-i切片机切成60nm厚的切片,用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色,最后采用电镜进行观察。其结果显示,MCL药物处理24小时后,GH3及MMQ细胞胞浆内自噬体以及自噬溶酶体较对照组明显增多。

[0088] D、为进一步探索MCL通过细胞凋亡及自噬性死亡抑制垂体泌乳素腺瘤的上游机制,对MCL处理前后的GH3及MMQ细胞株进行RNA测序分析。将差异大于1.2倍以上,且P值小于0.05作为基因纳入标准。聚类分析图提示MCL可显著改变GH3及MMQ细胞内mRNA的表达情况(图4A)。GO富集分析结果显示MCL主要通过激活MAPK信号通路,从而进一步发挥其肿瘤抑制作用(图4B)。为进一步评估RNA测序的可重复性,对药物处理前后的GH3及MMQ细胞进行MAPK信号通路关键调控蛋白ERK,P38和JNK的Western blot检测,结果显示,MCL处理后,关键蛋白的磷酸化活性水平较处理前有显著提高(图4C)。采用ERK蛋白磷酸酶抑制剂抑制其磷酸化水平(图4D)后,MCL对GH3及MMQ细胞的药物抑制作用效果明显减弱(图4E)。同样,采用JNK蛋白磷酸酶抑制剂抑制其磷酸化水平(图4F)后,MCL对GH3及MMQ细胞的药物抑制作用效果明显减弱(图4G)。而采用P38蛋白磷酸酶抑制剂抑制其磷酸化水平(图4H)后,MCL对

GH3及MMQ细胞的药物抑制作用效果明显减弱(图4I)。

[0089] 实施例7含笑内酯及其衍生物可抑制雌激素诱导的大鼠垂体泌乳素腺瘤肿瘤组织生长。

[0090] 为了进一步证实,MCL对垂体泌乳素腺瘤的抑制作用在动物活体中同样具有效果,发明人采用雌激素诱导的大鼠垂体泌乳素腺瘤模型进行药物干预治疗。雌二醇诱导6周后,对成熟的大鼠垂体泌乳素腺瘤模型进行 DMAMCL (200mg/kg) 药物干预2周。MRI检查结果显示(图5A),DMAMCL 药物干预可显著抑制瘤体组织生长。药物处理组肿瘤的体积为 $25.03 \pm 4.89\text{mm}^3$,对照组肿瘤的体积为 $30.60 \pm 5.90\text{mm}^3$ (图5B,左)。肿瘤体积方面,药物处理组肿瘤质量为 $12.22 \pm 0.67\text{mg}$,对照组肿瘤的质量为 $10.89 \pm 0.78\text{mg}$ (图5B,右)。(图5C)对瘤体组织进行免疫组化检测后发现,药物处理后的瘤体组织中,MAPK信号通路关键调控蛋白ERK,P38和JNK的磷酸化明显提高。(图5D)对瘤体组织进行Western blot检测后发现,药物处理后的瘤体组织中,细胞凋亡蛋白Bax及自噬性死亡相关蛋白ATG7,P62,LC3-II表达都有所提高,而抗凋亡蛋白Bcl-2则有所下降。

[0091] 实施例8含笑内酯(MCL)可抑制其他肿瘤类型的垂体腺瘤生长。

[0092] 为了进一步探究MCL对泌乳素腺瘤以外的其他类型垂体瘤是否同样具有抑制作用。发明人对经蝶内镜垂体肿瘤切除患者的部分瘤体组织进行原代培养(病人基本信息见表1)。8例人垂体腺瘤组织进行原代培养后予以MCL (20 μM) 药物处理24小时,CCK-8实验检测其细胞活性。结果显示8例原代肿瘤细胞中,6例细胞组织对MCL治疗敏感,2例临床无功能垂体腺瘤对MCL治疗无效(图6A)。对8例人垂体腺瘤组织蛋白进行Western blot检测后发现,6例对MCL治疗敏感组织样本中,MAPK关键调控蛋白 ERK、JNK、P38磷酸化显著增强,且自噬相关蛋白ATG7、P62及LC3-II 蛋白表达明显升高(图6B)。(图6C)对8例人垂体腺瘤组织样本免疫组化 HE染色检测结果。NFPA,临床无功能垂体腺瘤;GH,生长激素腺瘤;PRL,泌乳素腺瘤。

[0093] 表1:8例人垂体腺瘤患者临床基本信息情况

Case	Gender	Age	Tumor Size (mm)	PRL ^a (ng/ml)		GH ^b (ng/ml)		Pathology
				Before	After	Before	After	
				Surgery	Surgery	Surgery	Surgery	
1	M	72	33×24×22	2.92	2.54	0.03	0.25	NFPA
2	M	65	30×17×17	10.30	4.62	0.02	0.68	NFPA
[0094] 3	M	64	20×18×16	26.73	8.09	0.20	0.44	NFPA
4	F	54	20×19×15	14.35	8.35	0.04	0.47	NFPA
5	F	41	15×11×09	17.96	5.94	1.28	1.03	NFPA
6	M	54	35×33×23	14.08	2.51	0.13	0.58	NFPA
7	F	40	19×13×11	15.62	3.4	17.56	0.43	GH ^c
8	F	22	26×22×20	387.01	72.39	0.65	0.23	PRL ^d

[0095] a: 正常值, 男性: 2.63-13.08ng/ml, 女性: 3.33-26.62ng/ml.

[0096] b: 正常值, 男性: 0.003-0.971ng/ml, 女性: 0.01-3.607ng/ml.

[0097] c: IGF-1: 术前, 688μg/L; 术后三天, 159μg/L; 正常值: 109-284μg/L。

[0098] d: 此患者耐受溴隐亭药物治疗。15mg/d溴隐亭治疗超过6个月, 肿瘤体积减少小于20%并且血泌乳素水平维持于457.23ng/ml。

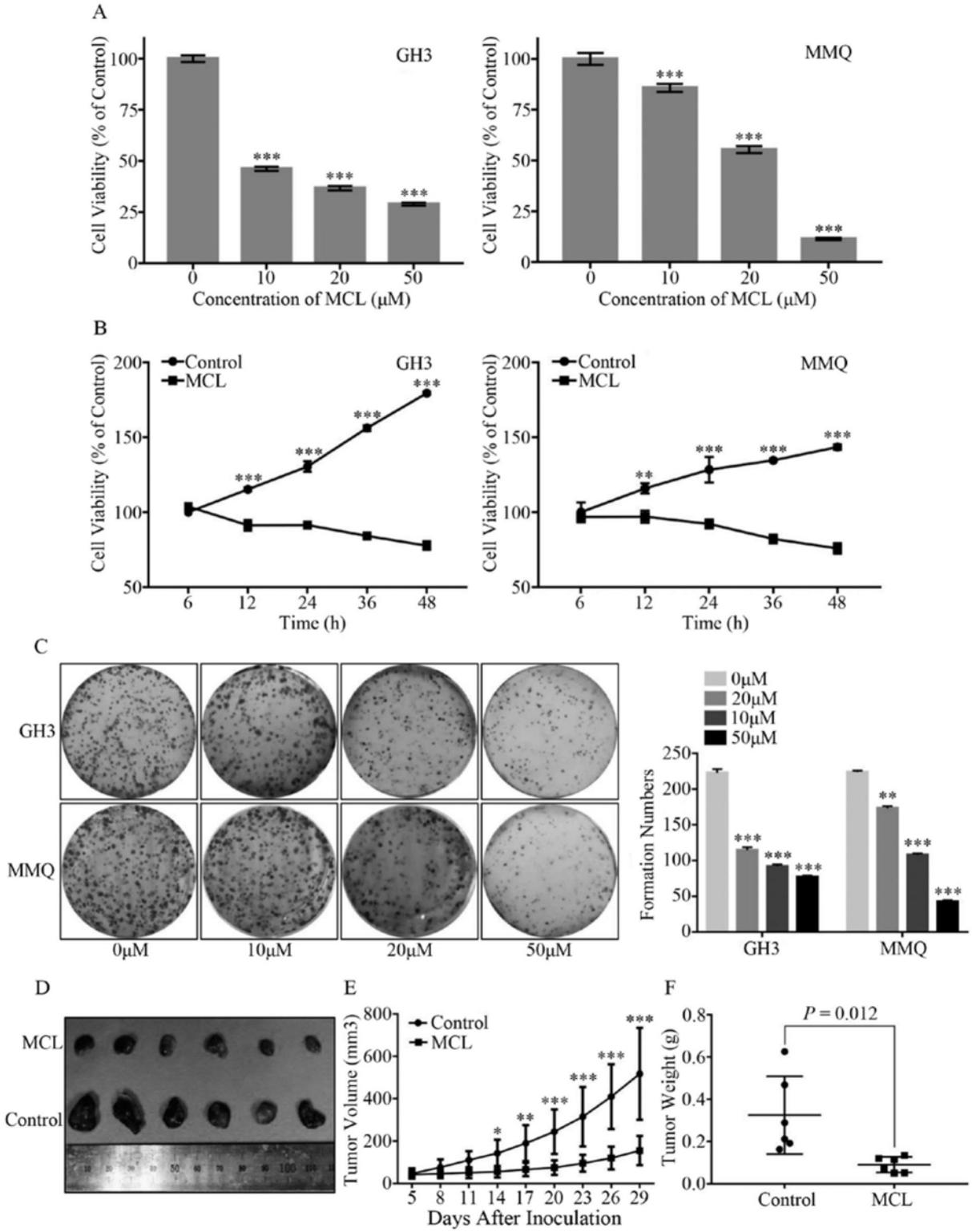


图1

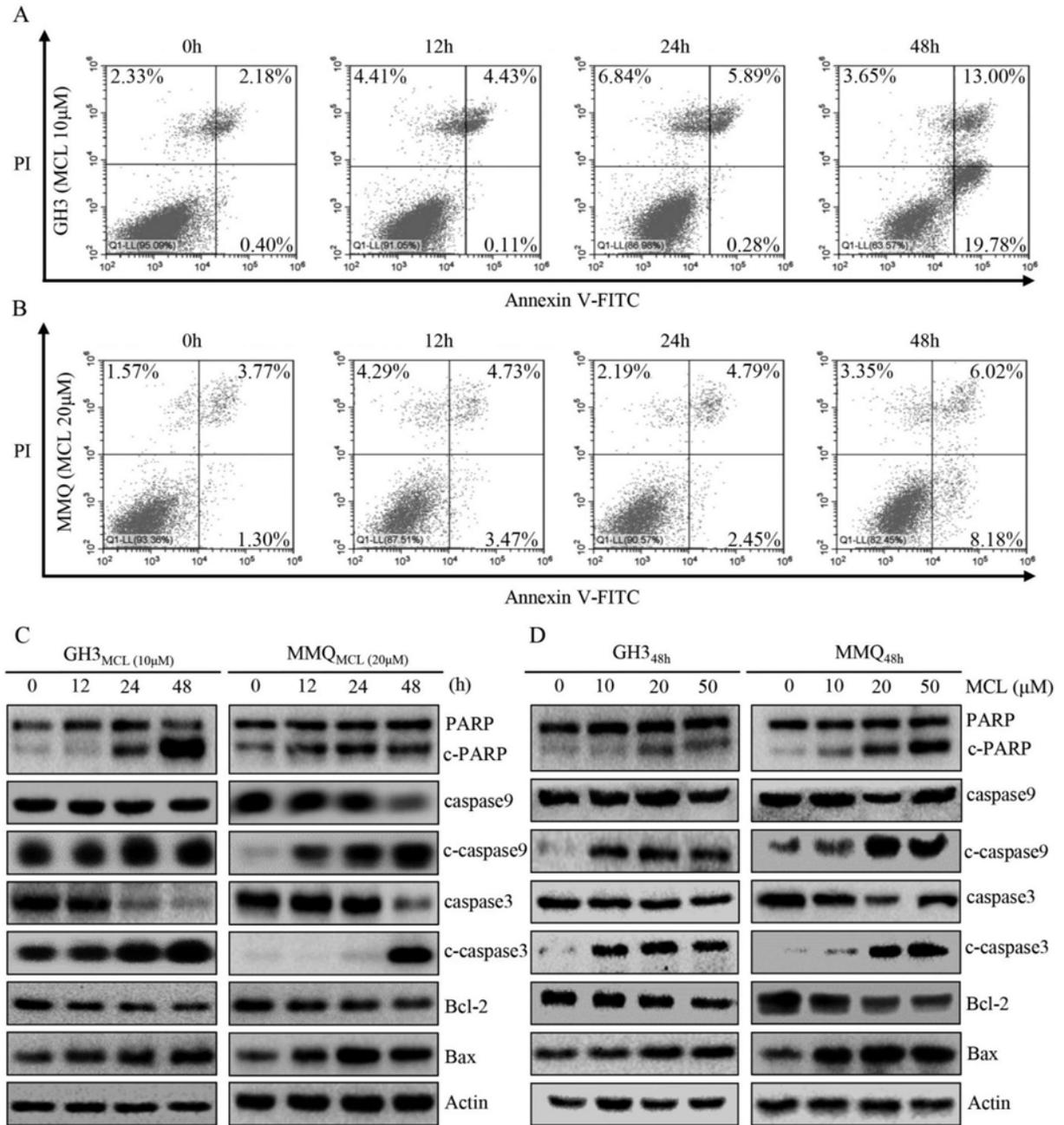


图2

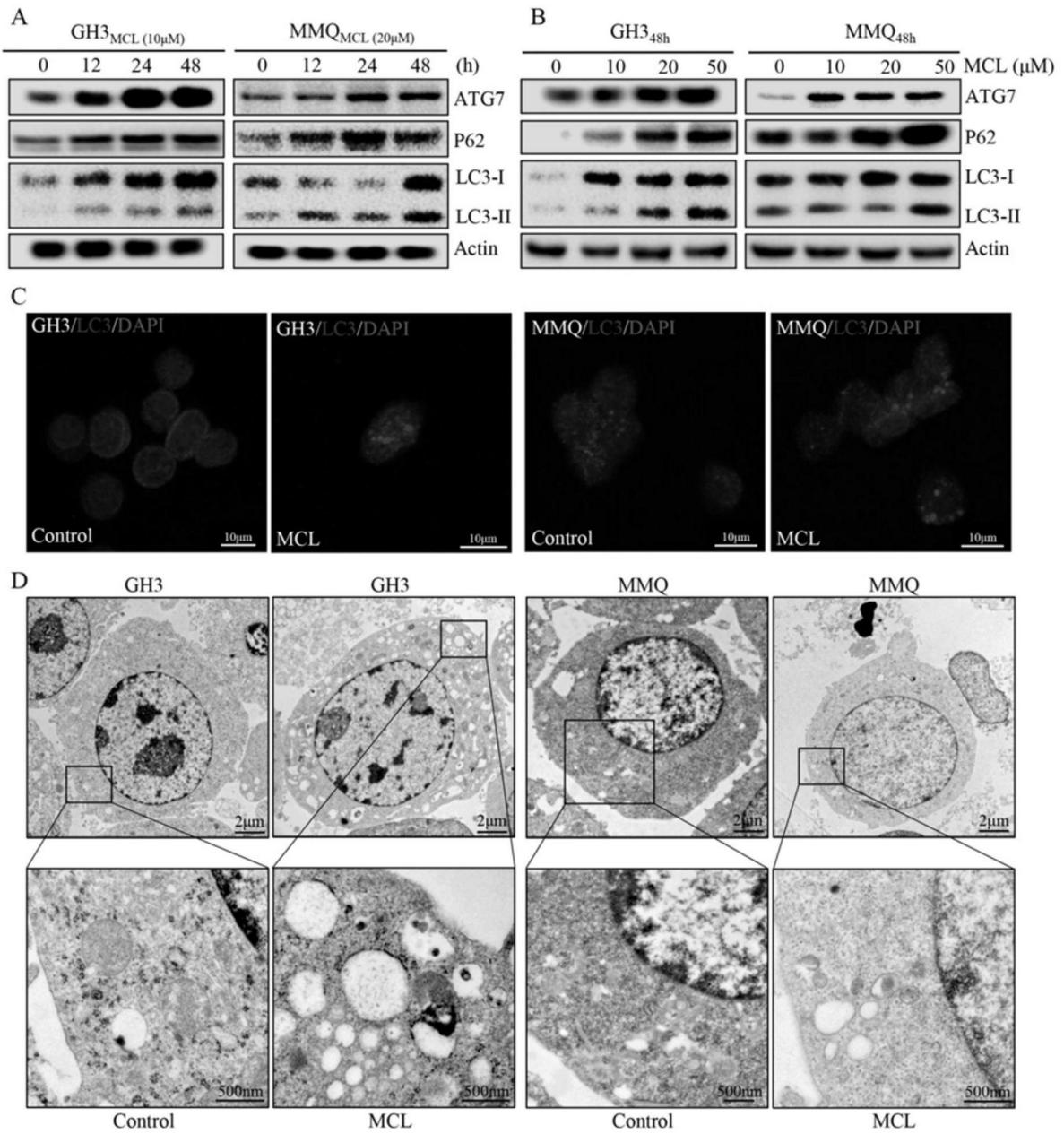


图3

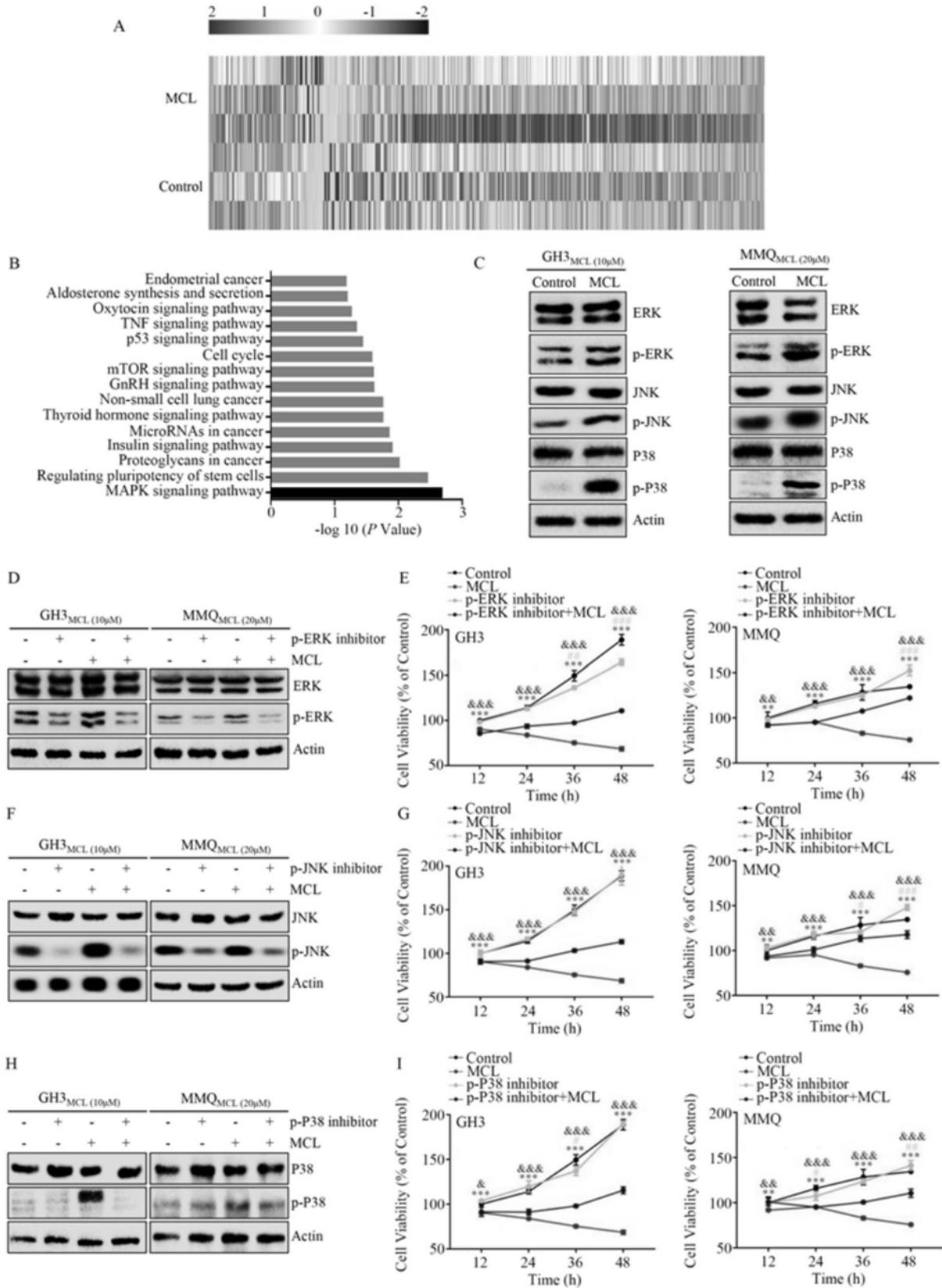


图4

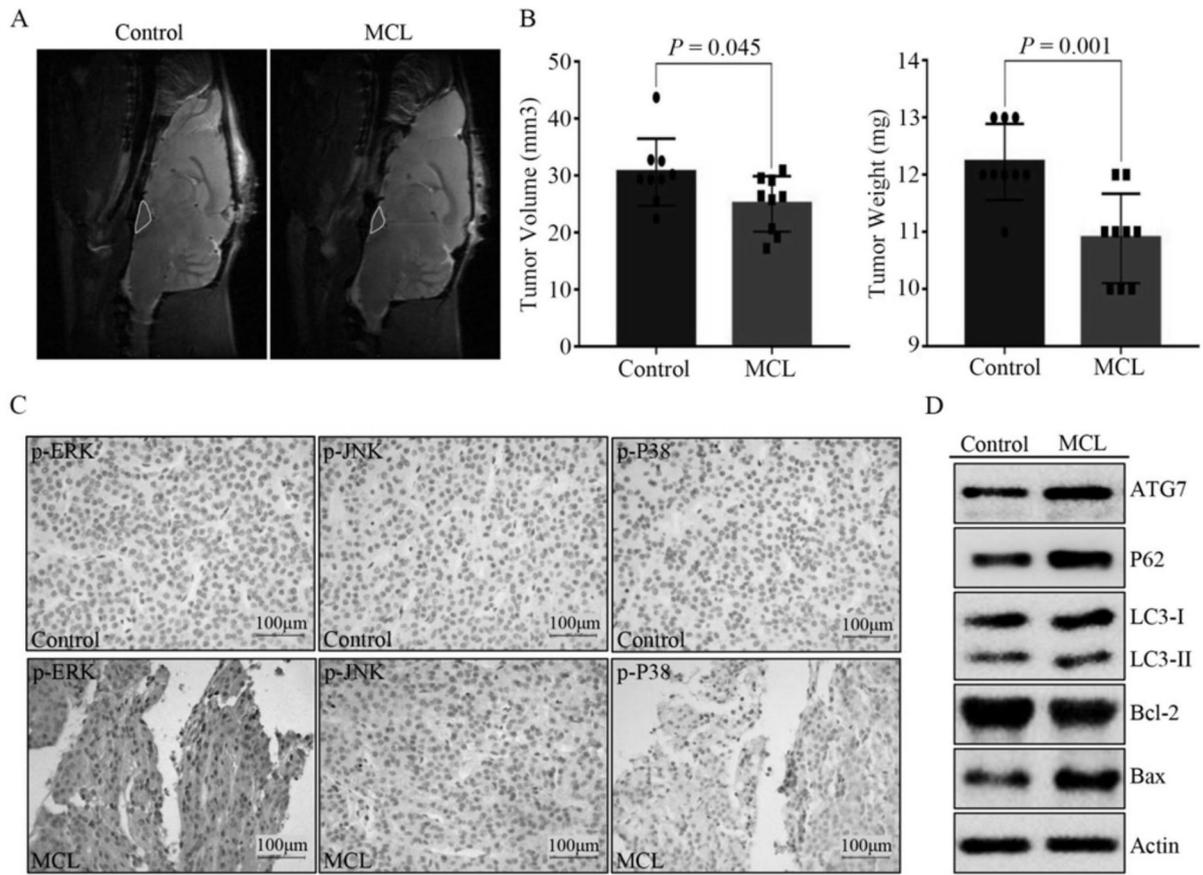


图5

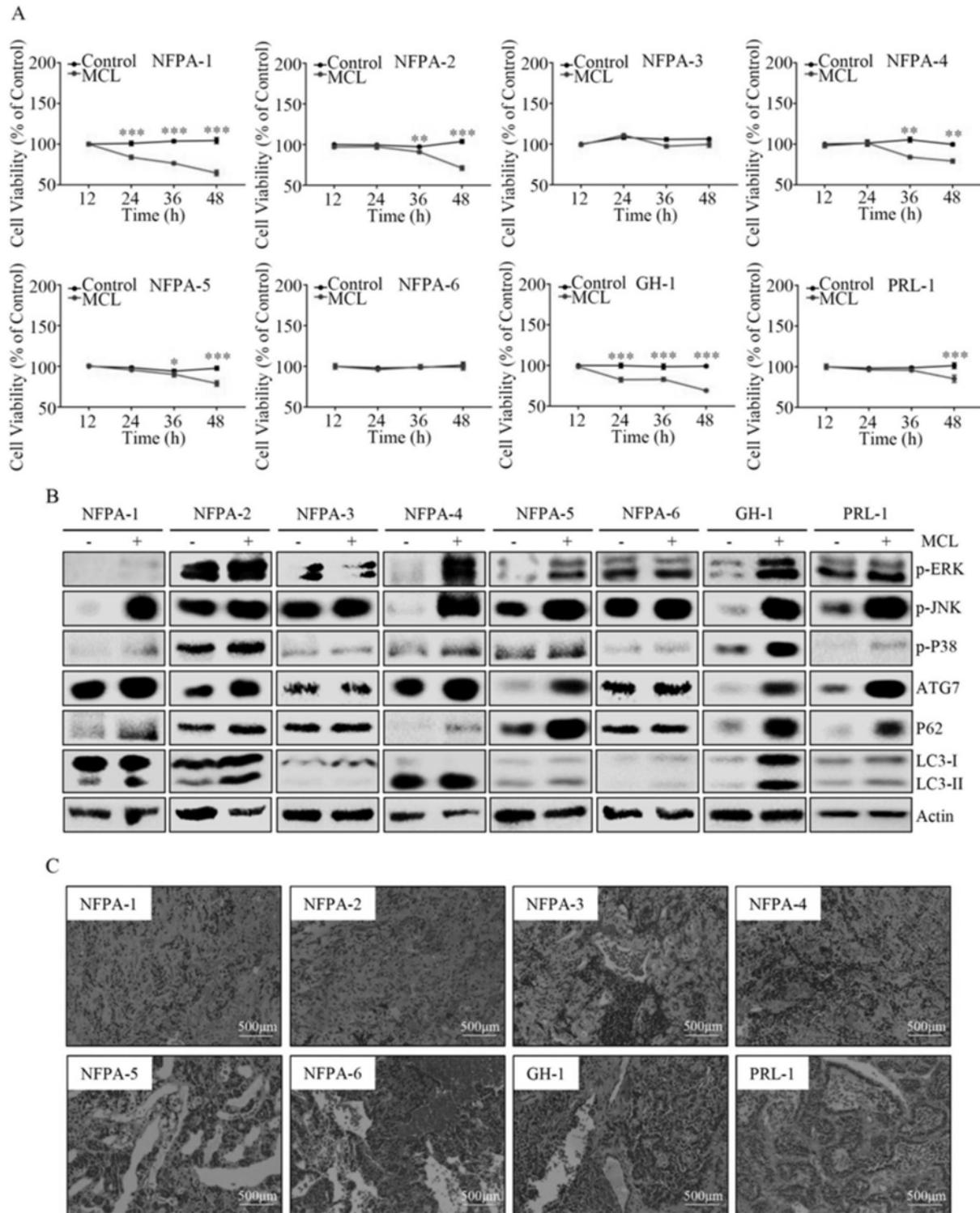


图6