

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610163262.5

[43] 公开日 2007年6月6日

[11] 公开号 CN 1973834A

[22] 申请日 2006.12.15

[21] 申请号 200610163262.5

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 刘志强 关松磊 宋凤瑞 刘忠英
胡秀丽

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

姜黄素用于制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用

[57] 摘要

本发明涉及姜黄素用于制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用。所述的耐药恶性肿瘤为：卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、肝癌、食道癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌、皮肤癌、胰腺癌、恶性淋巴瘤。其有效成分为：姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素或它们的混合物；其有效成分与助溶剂、稳定剂及助溶剂构成组合物；姜黄素单独作用或与顺铂等化疗药协同作用于卵巢癌耐药细胞。该药物克服了以往对耐药性恶性肿瘤的治疗方法用药量大，治疗方案复杂，或使用传统毒副作用大的逆转剂等的缺陷。通过减少化疗药的用药剂量及缩短药物的起效时间，可降低化疗药的毒副作用；与传统逆转剂相比，具有安全、高效的优点，小剂量即可逆转耐药。

1、姜黄素用于制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用，其特征在于，所述的耐药恶性肿瘤为：卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、肝癌、食道癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌、皮肤癌、胰腺癌、恶性淋巴瘤。

2、根据权利要求1所述的姜黄素用于制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用，其特征在于，其有效成分为：姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素或它们的混合物；其有效成分与助溶剂、稳定剂及助溶剂构成组合物；

所述的助溶剂为：吐温-20 或吐温-80；

稳定剂兼助溶剂为： β -环糊精或羟丙基- β -环糊精；

姜黄素在吐温-20 或吐温-80 中的溶解比例为 10mg/1ml ~ 5mg/2ml；姜黄素与 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精的重量比为 5.5: 100。

姜黄素用于制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用

技术领域

本发明涉及姜黄素用于制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用，具体涉及姜黄素用于制备治疗卵巢癌等恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用。

背景技术

化疗是治疗肿瘤的主要手段之一，肿瘤细胞产生的多药耐药(multidrug-resistance, MDR)已成为当前影响肿瘤化学治疗疗效的主要障碍，有关资料统计，90%以上肿瘤患者死因或多或少都与耐药有关，因此寻找低毒有效的MDR逆转剂是提高化疗疗效的一个重要方法。目前已有多种多药耐药逆转剂处于基础和临床试验阶段。肿瘤细胞耐药的原因是复杂的，但其多药耐药基因过度表达产生的耐药蛋白是最主要的原因。其中P-gp蛋白是最常见的一种，它是一种能量依赖性药物转出泵，可使化疗药物从癌细胞内泵出细胞外，从而使药物在细胞内积蓄浓度下降，药物对细胞毒性降低。临床上遇到这种情况通常以更换治疗方案为对策，但因为多数患者是多药耐药，所以更换方案后往往效果亦不佳，最终导致化疗失败。

研发新的抗肿瘤药物是克服耐药的一个途径，但难度大、周期长，相比之下寻找更具有现实性。异博定、环孢霉素A等药物能增加细胞内药物的积累而逆转耐药，但毒副作用很大，很难广泛用于临床。因此，寻找高效、低毒、作用靶点广、逆转作用显著的肿瘤多药耐药逆转剂刻不容缓。

姜黄素(curcumin)是姜黄、郁金、莪术的主要成分，是一种多酚性色素，可作为食品添加剂应用，毒性非常低。具有利胆、降

血脂、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗动脉粥样硬化、调节免疫等多种作用。姜黄素作为恶性肿瘤耐药的逆转药物，已有其作为制备治疗白血病、膀胱癌和口腔上皮癌的的逆转药物应用的报道。但是，姜黄素作为制备治疗除以上三种之外的其它恶性肿瘤耐药逆转药物的应用，还未见报道。

发明内容

本发明的目的是提供姜黄素作为制备治疗恶性肿瘤耐药逆转药物的应用。

姜黄素作为制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用，所述的耐药恶性肿瘤包括：卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、肝癌、食道癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌、皮肤癌、胰腺癌、恶性淋巴瘤。

其有效成分为姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素或它们的混合物；其有效成分与助溶剂、稳定剂及助溶剂构成组合物。

所述的助溶剂为：吐温-20 或吐温-80；

稳定剂兼助溶剂为： β -环糊精或羟丙基- β -环糊精；

姜黄素在吐温-20 或吐温-80 中的溶解比例为 10mg/1ml ~ 5mg/2ml；姜黄素与 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精的重量比为 5.5: 100。

姜黄素作为制备治疗恶性肿瘤耐药的逆转药物的应用，具体制备及使用方法，由制备实施例 1 和制备实施例 2 给出，其可以按已有的技术制成口服剂、混悬剂、注射剂、输液剂。

姜黄素单独作用或与顺铂等化疗药协同作用。姜黄素单独逆转耐药的用药的终浓度 $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ ，起效时间 ≥ 12 小时；姜黄素协同化疗药物的逆转耐药的用药终浓度 $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ ，起效时间 ≥ 12 小时。

本发明具有以下优点：（a）与传统恶性肿瘤耐药的逆转药物相比，具有安全高效的优点，小剂量即可逆转耐药（见附图 1、2、3），且未见有任何毒副作用。（b）与化疗药合用可明显减少化疗药的用药剂量和缩短化疗药的起效时间，从而明显降低化疗药的毒副作用，减轻患者由化疗带来的痛苦。（c）药材来源广泛、易得，价格低廉。

附图说明

图 1 是未加药卵巢癌耐药细胞扫描电镜图。未加本发明的姜黄素的卵巢癌耐药细胞，在高倍镜下所见细胞情况。

图 2 是加入顺铂及姜黄素后卵巢癌的耐药细胞图。

图 3 是加入姜黄素后的卵巢癌耐药细胞图。

通过图 1 与图 2 的和图 3 比较可直观看出：未加本发明的姜黄素时，细胞数目多、排列紧密，形状饱满、圆润、光镜下观察透光性好；加入顺铂及姜黄素或单独加入姜黄素 18 小时后，细胞数目少，排列疏散，形状不规则，光镜下观察细胞透光性差，且散布较多的细胞碎片。

下面提供的实施例用于进一步阐明本发明。

具体实施方式

制备实施例 1：称取姜黄素（纯度 $\geq 95\%$ ）100mg，加 40ml 无水乙醇，使其溶解，55℃下，滴入 60ml β -环糊精饱和水溶液（85.0g/l）中，搅拌 1 h，停止加热，继续搅拌 5h，得橙黄色混悬物，室温静置 12 h，过 80 目筛，50℃烘干得橙黄色药物粉末，即姜黄素- β -环糊精包合物。将包合物粉末与 0.9%生理盐水，按质量比为 3:1 溶解于 0.9%生理盐水（0.9g 氯化钠溶解于 100ml 蒸馏水）中，所得溶液过滤、杀菌，得到姜黄素的有效药物组合物。使用时，根据所需浓度用 0.9%生理盐水适当稀释。

制备实施例 2: 称取姜黄素 (纯度 $\geq 95\%$) 50mg, 加 5ml 吐温-80, 研磨 30min, 加 2ml 无水乙醇及 30ml 0.9%生理盐水, 继续研磨 2 小时, 得到姜黄素澄清药液, 过滤、除菌, 得到姜黄素的有效药物组合物。使用时, 根据所需浓度用 0.9%生理盐水适当稀释。

应用实施例 1

取处于对数生长期的卵巢癌耐药细胞 CoC1/DDP, 以 5×10^4 个/ml 浓度接种于 96 孔细胞培养板。实验设 5 组, 1 个对照组, 4 个加药组, 每组设 3 个复孔。对照组每孔加含细胞的培养液 150ml, 0.9%生理盐水 50ml, 共 200ml 加药组每孔加含细胞培养液 150ml, 药液 50ml (其中姜黄素是按照制备方法 1 制成的稀释药液), 共 200ml。

置 37 °C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养 18h 后加 MTT(噻唑蓝) 20 μ l/孔, 继续培养 4h, 离心 3500rpm, 10min, 弃上清, 加二甲基亚砜 (DMSO) 200 μ l/孔, 避光振荡 20min, 用酶标仪检测 OD₅₁₅。结果见表 1。

用到的公式如下:

$$1、抑制率 = \frac{\text{对照孔 OD 值} - \text{加药孔 OD 值}}{\text{对照孔 OD 值}} \times 100\%$$

$$2、逆转倍数 = \text{逆转前 IC}_{50} / \text{逆转后 IC}_{50} (\text{半数抑制浓度})$$

表 1 不同处理因素对卵巢癌耐药细胞株 CoC1/DDP 增殖的影响

	对照组	顺铂	顺铂+异博定	顺铂+姜黄素*
加药浓度 (μ g/ml)	0	0	10+20	10+5
平均抑制率 (%)	0	50.62	48.12	53.05
逆转倍数	——	——	6	6

注: *表示药物组合物药液中的姜黄素

结果分析:

通过表 1 证明了姜黄素协同顺铂抑制卵巢癌耐药细胞增殖的作用, 当姜黄素的终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 时, 基本达到了 IC_{50} , 逆转倍数约为 6 倍, 其逆转效果与传统逆转剂异博定相比基本相同, 而姜黄素的用药剂量仅为异博定的 1/4。

应用实施例 2

取处于对数生长期的卵巢癌耐药细胞 CoC1/DDP, 以 5×10^4 个/ml 浓度接种于 96 孔细胞培养板。实验设 4 组, 1 个对照组, 3 个加药组, 每组设 3 个复孔。对照组每孔加含细胞的培养液 150ml、0.9%生理盐水 50ml, 共 200ml; 加药组每孔加含细胞的培养液 150ml, 药液 50ml (其中的姜黄素是按照制备方法 1 制成的稀释药液), 共 200ml。

置 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养 18h 后加 MTT $20 \mu\text{l}$ /孔, 继续培养 4 h, 离心 3500rpm、10min, 弃上清, 加二甲基亚砜 (DMSO) $200 \mu\text{l}$ /孔, 避光振荡 30min, 用酶标仪检测 OD_{515} 。用到的公式同实施例 1, 结果见表 2:

表 2 不同处理因素卵巢癌耐药细胞株 CoC1/DDP 的影响

处理因素	加药浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	平均抑制率 (%)	逆转倍数
对照组	0	0	—
顺铂	60	46.03	—
顺铂+异博定	10+20	42.83	6
姜黄素*	20	47.65	6

注: *表示药物组合物药液中的姜黄素

结果分析:

通过表 2 证明了姜黄素单独抑制卵巢癌耐药细胞增殖的作用,

当姜黄素的终浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$ 时，基本达到了 IC_{50} ，逆转倍数约为 6 倍，其抑制作用与单独使用大剂量顺铂基本相同，而姜黄素的用药量仅为顺铂的 1/3。

应用实施例 3

取处于对数生长期的卵巢癌耐药细胞 CoC1/DDP，以 5×10^4 个/ml 浓度接种于 96 孔细胞培养板。实验设 5 组，1 个对照组，4 个加药组，每组设 3 个复孔。对照组每孔加含细胞的培养液 150ml、0.9% 生理盐水 50ml，共 200ml；加药组每孔加含细胞的培养液 150ml、按照制备方法 2 制成的稀释药液 25ml，顺铂药液 25ml，共 200ml。

置 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养 18h 后加 MTT $20 \mu\text{l}$ /孔，继续培养 4 h，离心 3500rpm、10min，弃上清，加二甲基亚砜 (DMSO) $200 \mu\text{l}$ /孔，避光振荡 20min，用酶标仪检测 OD_{515} 。用到的公式同实施例 1，结果见表 3：

表 3 姜黄素增加卵巢癌耐药细胞 CoC1/DDP 对化疗药敏感性的研究

顺铂+姜黄素* ($\mu\text{g/ml}$)	平均抑制率 (%)	逆转倍数
0	—	—
60+0	52.39	—
10+5	49.48	6
5+5	48.73	12
2.5+10	49.72	24

注：* 表示药物组合物药液中的姜黄素

结果分析：

通过表 3 可以看出：加入姜黄素后，尽管顺铂的浓度在逐渐下降，但抑制率基本都稳定在 50% 左右，与单独大剂量使用顺铂效果一致。证明了姜黄素能增加卵巢癌耐药细胞对化疗药敏感性，从而

大大减少了化疗药的用量，降低了化疗药带来的毒副作用。

应用实施例 4

取处于对数生长期的卵巢癌耐药细胞 CoC1/DDP，以 5×10^4 个/ml 浓度接种于 96 孔细胞培养板，实验设 5 组，1 个对照组，4 个加药组，每组设 3 个复孔。对照组每孔加含细胞的培养液 150ml、0.9%生理盐水 50ml，共 200ml；加药组每孔加含细胞的培养液 150ml，药液 50ml（其中的姜黄素有效药液按照按照制备方法 2 制成），共 200ml。

置 37 °C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养，分别于 6、12、18 小时后加 MTT 20 μl/孔，继续培养 4 小时，离心 3500rpm、10min，弃上清，加二甲基亚砜(DMSO) 200 μl/孔，避光振荡 30min，至紫蓝色沉淀完全溶解，用酶标仪检测 OD₅₁₅。用到的公式同实施例 1，结果见表 4：

表 4 加药时间对卵巢癌耐药细胞株 CoC1/DDP 增殖的影响

处理因素	药物浓度 (μg/ml)	6h IR(%)	12h IR(%)	18h IR(%)
对照	0	——	——	——
顺铂	10	8.31	13.88	29.27
顺铂+异博定	10+20	12.97	45.26	54.41
顺铂+姜黄素*	10+5	16.46	53.72	54.21
姜黄素*	5	6.29	22.59	23.04

注：*表示药物组合物药液中的姜黄素

结果分析：

通过表 4 可以看出：单独使用小剂量化疗药时，加药时间对细胞增殖没有影响；加入逆转剂 12 小时后，细胞增殖受到明显抑制。证明逆转剂可使小剂量化疗药在短期内起效，从而提高药效，且以姜黄素作为逆转剂的抑制作用与传统逆转剂异博定相当。

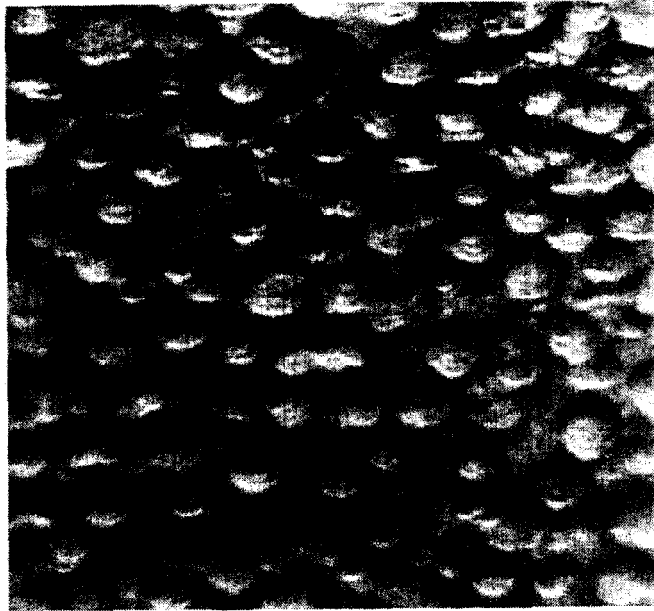


图 1

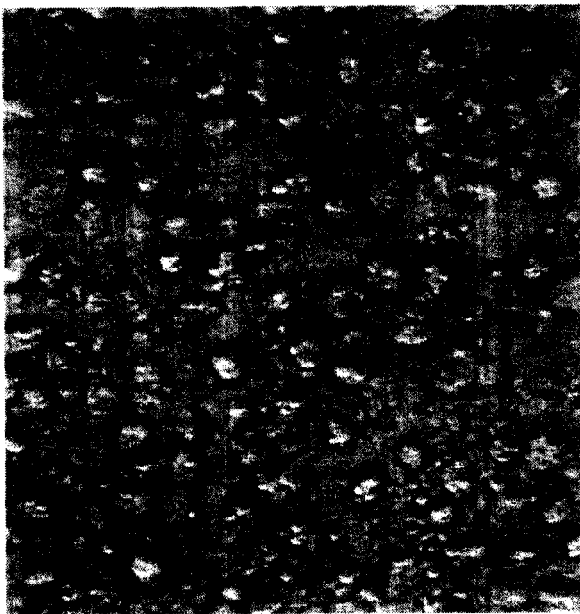


图 2

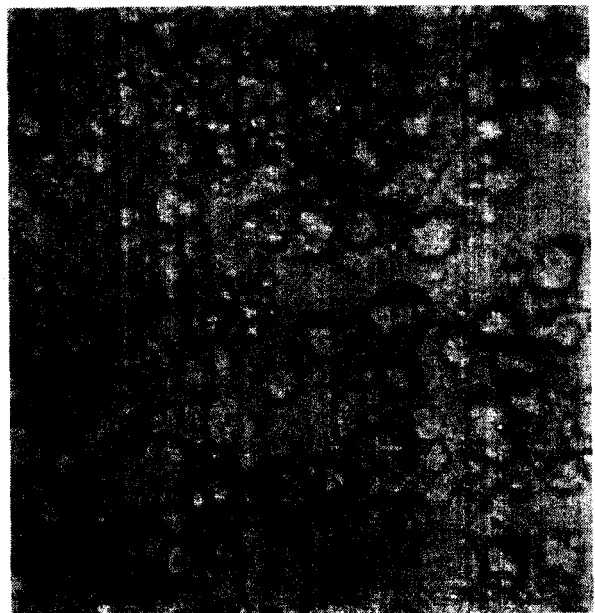


图 3