



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103054846 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 201210562409.3

(22) 申请日 2012.12.18

(73) 专利权人 杭州雷索药业有限公司
地址 311120 浙江省杭州市萧山区金城路
1038 号 817 室

(72) 发明人 李春启 吴转斌 朱晓宇 朱凤

(51) Int. Cl.

A61K 31/277(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004/006906 A2, 2004.01.22,
Srinivasan Madhusudan et al.. Drug
inhibition of angiogenesis. Srinivasan
Madhusudan et al. Current Opinion in
Pharmacology. 2002 年第 2 卷第 4 期, 第 403-414
页.《Current Opinion in Pharmacology》. 2002,
第 2 卷 (第 4 期), 403-414.

Zhihui Cheng et al. Intra-leukocyte
expression of two-component systems in
Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma
Phagocytophilum and effects of the
histidine kinase inhibitor closantel.
Zhihui Cheng et al. Cellular Microbiology

(2006)8(8), 1241 - 1252.《Cellular
Microbiology》. 2006, 第 8 卷 (第 8 期), 1241 -
1252.

Zhihui Cheng et al. Intra-leukocyte
expression of two-component systems in
Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma
Phagocytophilum and effects of the
histidine kinase inhibitor closantel.
Zhihui Cheng et al. Cellular Microbiology
(2006)8(8), 1241 - 1252.《Cellular
Microbiology》. 2006, 第 8 卷 (第 8 期), 1241 -
1252.

审查员 崔义文

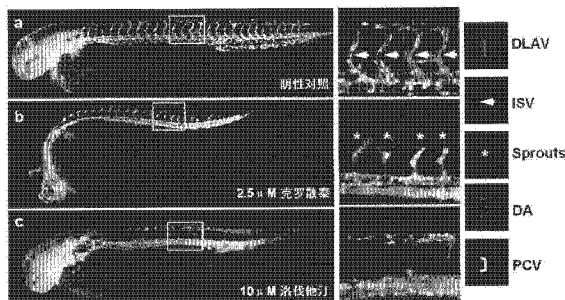
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

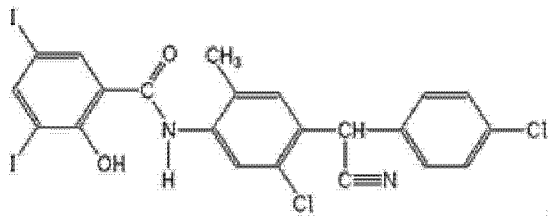
一种能抗血管生成的化合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种能抗血管生成的化合物及其
在抗血管生成药物中的用途。利用斑马鱼血管生
成模型进行体内药效学实验证实,本发明的化合
物能够显著抑制斑马鱼血管生成。因此,可以用于
抗血管生成类、抗肿瘤作用或老年视黄斑变性药
物的制备。



1. 化合物在制备血管生成抑制剂中的应用,所述化合物的结构式如下:



2. 药物组合物在制备血管生成抑制剂中的应用,其特征在于,所述的药物组合物由如权利要求1中所述的化合物、药学上可接受的辅料组成。

3. 药物制剂在制备血管生成抑制剂中的应用,其特征在于,所述的药物制剂为含有如权利要求2中所述的药物组合物的口服制剂或注射剂。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的口服制剂为片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂或混悬剂。

5. 如权利要求1中所述的化合物在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的肿瘤是指与肿瘤血管生成相关的疾病。

6. 药物组合物在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的药物组合物由如权利要求1中所述的化合物、药学上可接受的辅料组成;所述的肿瘤是指与肿瘤血管生成相关的疾病。

7. 药物制剂在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的药物制剂为含有如权利要求6中所述的药物组合物的口服制剂或注射剂;所述的肿瘤是指与肿瘤血管生成相关的疾病。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述的口服制剂为片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂或混悬剂。

9. 如权利要求1中所述的化合物在制备治疗湿性老年视黄斑变性药物中的应用,其特征在于,所述的湿性老年视黄斑变性是指与脉络膜血管异常增生相关的疾病。

10. 药物组合物在制备治疗湿性老年视黄斑变性药物中的应用,其特征在于,所述的药物组合物由如权利要求1中所述的化合物、药学上可接受的辅料组成;所述的湿性老年视黄斑变性是指与脉络膜血管异常增生相关的疾病。

11. 药物制剂在制备治疗湿性老年视黄斑变性药物中的应用,其特征在于,所述的药物制剂为含有如权利要求10中所述的药物组合物的口服制剂或注射剂;所述的湿性老年视黄斑变性是指与脉络膜血管异常增生相关的疾病。

12. 根据权利要求11所述的应用,其特征在于,所述的口服制剂为片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂或混悬剂。

一种能抗血管生成的化合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及到医药技术领域,具体涉及到一种抗血管生成的化合物及其用途。

背景技术

[0002] 血管生成 (angiogenesis) 与人类多种重大疾病高度相关,如恶性肿瘤,老年视黄斑变性 (Age-related macular degeneration, AMD), 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis), 风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis), 糖尿病视网膜变性 (Diabetic retinopathy) 以及肿瘤转移 (Tumor metastasis) 等^[1]。随着中国人口老龄化逐渐加剧,目前这些重大疾病已严重危害我国人民群众的生命健康。

[0003] 1971年,哈佛大学 Judah Folkman 教授首次提出抗肿瘤血管疗法,他认为实体肿瘤的生长和扩散依赖于肿瘤内新血管的形成,并通过新生血管获取养分;新血管的形成和生长,促进了肿瘤细胞的转移^[2-4]。经过40年大量的基础理论研究,目前基于这一疗法,已有多个重磅专利新药上市,如罗氏的 Bevacizumab (商品名 Avastin, 2010年全球销售额67亿美元),拜耳的 Sorafenib (商品名 Nexavar, 2010年全球销售额9.94亿美元),辉瑞的 Sunitinib (商品名 Sutent, 2010年全球销售额10.7亿美元)^[5-6]。但这些药物价格十分昂贵,均为外企医药巨头垄断。国内目前只有1支真正意义的抗肿瘤血管生成药物通过 SFDA 批准上市(恩度,先声药业,2005年上市),但年销售额很少(2010年销售额仅2.5亿人民币),尚无法参与全球竞争。其次,由于恩度(重组人血管内皮抑制素注射液, Recombinant Human Endostatin Injection)为大分子蛋白质类药物,生产这类高纯度安全制剂需要很高的技术门槛,而且此类型的药物在体内的半衰期较短,从而限制了这些活性蛋白的临床应用。

[0004] 老年视黄斑变性 (Age-related macular degeneration, 简称 AMD) 是一种累及眼底视网膜黄斑区的变性眼疾。它因年龄增长而产生黄斑区变性,可引起中心视力急剧下降。据统计,全世界超过3000万人罹患此病。黄斑变性分为干性和湿性两种。湿性老年视黄斑变性主要因为脉络膜血管异常生成,新生的无效微血管出现渗漏,血管渗漏的液体进而破坏黄斑,导致中心视力显著下降,影响生活质量,甚至变盲。湿性老年视黄斑变性已经成为65岁以上老年人失明的罪魁祸首。

[0005] 治疗湿性老年视黄斑变性的方法主要有光动力疗法和抗血管药物疗法。光动力疗法主要通过静脉注入光敏药物,继而采用特定波长的非热能激光照射脉络膜新生血管病灶,将光敏药物活化。用光动力疗法治疗湿性老年视黄斑变性,只能稳定或降低湿性老年视黄斑变性视力下降的风险,并非对因治疗,不能阻止复发的可能。一般需要多次治疗。而且治疗后要避光48小时,以免发生光敏反应,造成皮肤灼伤,因此,给患者带来很多痛苦。目前治疗湿性老年视黄斑变性,已上市的药物主要有:辉瑞的哌加他尼钠 (Pegaptanib, 商品名 Macugen), 诺华的兰尼单抗 (Ranibizumab, 商品名 Lucentis), 拜耳的艾力亚 (VEGF-Trap-eye, 商品名 Eylea), 这些药物的价格非常昂贵,一般需要每月经玻璃体内注射给药,这种冗长的给药过程很难被患者接受。因此,开发新型廉价的滴眼液来治疗湿性老年

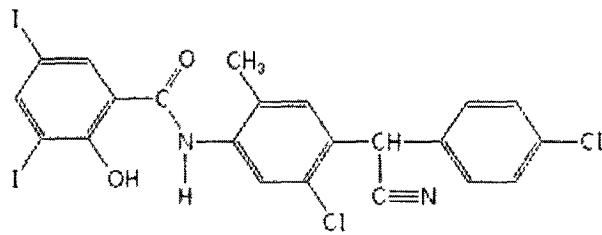
视黄斑变性是未来的发展趋势。

[0006] 综上所述,在小分子化合物中寻求新的血管生成抑制剂来有效治疗上述疾病已成为研发热点,开发具有自主知识产权的专利靶向抗血管生成小分子药物迫在眉睫。

[0007] 克罗散泰(英文名称:Closantel;中文名称:克罗散泰;中文别名:氯氰碘柳胺;氯氰柳胺;氯生太尔;化学名称:5'-Chloro-4'-(4-chloro- α -cyanobenzyl)-3,5-diiodo-2'-methylsalicylanilide,分子式: $C_{22}H_{14}Cl_2I_2N_2O_2$,分子量:663.07)是一种广谱驱虫药,对多种吸虫、线虫和节肢动物的幼虫均有良好的疗效。克罗散泰是一种较强的氧化磷酸化解偶联剂,可以抑制虫体线粒体的磷酸化过程,从而阻止虫体内三磷酸腺甙(ATP)的合成,导致虫体能量代谢的活力迅速减弱而最终死亡。

[0008] 克罗散泰的化学结构式如下:

[0009]



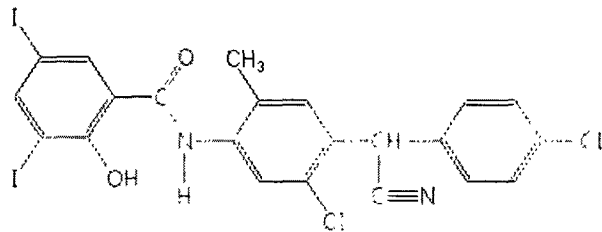
[0010] 至今尚未见有关克罗散泰抗血管生成(anti-angiogenesis)活性的相关报道。

发明内容

[0011] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0012] 一种化合物,其结构式如下:

[0013]



[0014] 一种药物组合物,其特征在于:包括上述化合物及药学上可接受的辅料。

[0015] 一种药物制剂,其特征在于:包括上述药物组合物。

[0016] 优选的,所述制剂为口服制剂或注射剂。

[0017] 优选的,所述口服制剂为片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、微囊片剂、混悬剂、滴丸或口服液体。

[0018] 上述化合物在制备抗血管生成、抗肿瘤或治疗老年视黄斑变性的药物中的应用。

[0019] 上述药物组合物在制备抗血管生成、抗肿瘤或治疗老年视黄斑变性的药物中的应用。

[0020] 上述药物制剂在制备抗血管生成、抗肿瘤或治疗老年视黄斑变性的药物中的应用。

[0021] 本发明利用斑马鱼血管生成模型进行克罗散泰抗血管药效学实验。和传统的血管研究模型(啮齿类的小鼠和鸡胚尿囊膜)相比,目前大量的研究证实,斑马鱼是最理想的血

管生物学以及抗血管生成药物评价模型。啮齿类的老鼠和鸡胚尿囊模存在各自的缺点^[7-8]。通过利用斑马鱼血管生成模型进行药效学评价和药物新靶点验证,已有多支抗癌药物进入临床前实验(Pre-clinical Trial)或者临床试验(Clinical Trial)阶段(包括已获得FDA批准上市的药物),如 Vatalanib(Novartis)^[9]、Thalidomide(Celgene)^[10]、Compound 6(TargeGen)^[11]、Rosuvastatin^[12]、Solenopsin(Eli Lilly)^[13]等等。

[0022] 经斑马鱼两套体内血管模型证实,克罗散泰对斑马鱼体节间血管(intersegmental vessel, ISV)^[12,14]和肠下血管(subintestinal vessel, SIV)^[15-16]均有显著抑制的功能,因此,可用于制备抗血管生成抑制剂。

[0023] 经斑马鱼人类乳腺癌(JF305)移植模型证实,克罗散泰能够显著抑制人类乳腺癌(JF305)的生长;经斑马鱼视黄斑变性模型证实,克罗散泰对老年视黄斑变性具有显著的治疗效果。因此,克罗散泰可用于抗肿瘤及治疗老年视黄斑变性。

[0024] 本发明克罗散泰价格低廉、安全性高、原料来源广泛,辅以药学上可接受的辅料,采用常规制剂技术即可制成各种口服、注射、外用制剂,具有良好的开发前景。

附图说明

[0025] 图1为本发明受精后48h(48hpf)血管转基因荧光斑马鱼体节间血管(ISV)模型。框定区域为斑马鱼体节血管网络局部放大观察的部位。背长轴血管(DLAV, dorsallongitudinal anastomotic vessel),体节间血管(ISV, intersegmental vessel),背主动脉(DA, dorsal aorta),后主静脉(PCV, posterior cardinal vein)。

[0026] 图2为本发明定性观察克罗散泰对斑马鱼体节间血管生成(angiogenesis)的抑制效果。图a-c,受精后23hpf的斑马鱼经过药物处理24h,观察时相为48hpf。图a为阴性对照(0.1% DMSO),图b为克罗散泰处理组,图c为阳性对照(10 μ M 洛伐他汀)。与阴性对照相比,2.5 μ M 克罗散泰能够完全抑制斑马鱼体节间血管(ISV)的生成,背长轴血管(DLAV)完全缺失,仅在背主动脉部位看到少许零星血管内皮细胞出芽(Sprouts),见星号指示。

[0027] 图3为本发明定量评价克罗散泰对斑马鱼体节间血管(ISV)生成模型的抑制效果。图a-e,受精后23hpf的斑马鱼经过药物处理24h,观察时相为48hpf。图a为阴性对照(0.1% DMSO),图b-d为不同浓度的克罗散泰处理组,图e为阳性对照(10 μ M 洛伐他汀)。框定区域为体节间血管(ISV)放大观察的部位。与阴性对照相比,克罗散泰能够显著抑制斑马鱼体节间血管(ISV)的生成(见星号指示),并呈现明显的剂量依耐性,见图f。***P < 0.001,差异极显著。

[0028] 图4为本发明克罗散泰对斑马鱼体节间血管(ISV)生成的抑制率。克罗散泰对斑马鱼体节间血管(ISV)生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,各浓度克罗散泰组对斑马鱼体节间血管(ISV)生成的抑制率分别为:0.5 μ M(1.45%),1 μ M(22.10%),1.5 μ M(47.10%),2 μ M(56.52%),2.5 μ M(86.23%),3 μ M(90.94%),4 μ M(100%),5 μ M(100%)。

[0029] 图5为本发明受精后72小时(72hpf)血管转基因荧光斑马鱼肠下血管(SIV)模型。框定区域为肠下血管(SIV)网络局部放大观察的部位。箭头指示肠下血管(SIV, subintestinal vessel)。

[0030] 图 6 为本发明定量观察克罗散泰对斑马鱼肠下血管 (SIV) 的抑制效果。图 a-d, 受精后 48hpf 的斑马鱼经过药物处理 24h, 观察时相为 72hpf。图 a 为阴性对照 (0.1% DMSO), 图 b-c 为不同浓度的克罗散泰处理组, 图 d 为阳性对照 (10 μ M 洛伐他汀)。虚线所示区域为肠下血管 (SIV) 面积放大观察的部位。与阴性对照相比, 克罗散泰能够显著抑制斑马鱼肠下血管 (SIV) 的生成, 表现为肠下血管面积减小, 并呈现明显的剂量依耐性, 见图 e。* $P < 0.05$, 差异显著; *** $P < 0.001$, 差异极显著。

[0031] 图 7 为本发明克罗散泰对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率。克罗散泰对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加, 两个浓度克罗散泰组对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率分别为: 1 μ M (14.31%), 2.5 μ M (62.54%)。

[0032] 图 8 为本发明斑马鱼人类乳腺癌 (JF305) 移植模型评价克罗散泰的抗肿瘤药效。图 a-f, 移植人类乳腺癌 (JF305) 后 2dpf 的斑马鱼经过药物处理 4d, 观察时相为 6dpf。图 a 为空白对照, 图 b 为阴性对照 (0.1% DMSO), 图 d-f 为不同浓度的克罗散泰处理组, 图 c 为阳性对照 (1000 μ M 5-FU)。

[0033] 图 9 为本发明克罗散泰对移植癌细胞的生长抑制率。克罗散泰对人类移植癌细胞生长的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加, 三个浓度克罗散泰组抑制率分别为: 1 μ M (0.3%), 2.5 μ M (23.9%), 10 μ M (43.9%)。

[0034] 图 10 为本发明定量评价克罗散泰对视黄斑变性的治疗作用。图 a-e, 受精后 1dpf 的斑马鱼经过药物处理 4d, 观察时相为 5dpf。虚线所示圆形区域内为脉络膜血管。图 a 为阴性对照 (0.1% DMSO), 图 b 为模型组 (1mg/ml 氯化钴), 图 c-e 为不同剂量的克罗散泰处理组。

[0035] 图 11 为本发明克罗散泰对脉络膜血管异常增生的抑制率。克罗散泰对脉络膜血管异常增生的抑制率随着注射剂量的上升而呈现梯度增加, 三个剂量克罗散泰组抑制率分别为: 1 μ M (9.1%), 2.5 μ M (21.2%), 10 μ M (30.8%)。

具体实施方式

[0036] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步阐述, 但本发明的保护范围并不限于此。

[0037] 斑马鱼相关缩略词

[0038] 受精后小时数: hpf-hours postfertilization

[0039] 背长轴血管: DLAV-dorsal longitudinal anastomotic vessel

[0040] 体节间血管: ISV-intersegmental vessel

[0041] 背主动脉: DA-dorsal aorta

[0042] 后主静脉: PCV-posterior cardinal vein

[0043] 肠下血管: SIV-subintestinal vessel

[0044] 绿色荧光蛋白: GFP-green fluorescent protein

[0045] 实施例 1 定性观察克罗散泰对斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成模型的抑制效果

[0046] 斑马鱼:

[0047] 本实施例使用的斑马鱼为血管转基因绿色荧光斑马鱼 (一种由斑马鱼内皮细胞特异表达的基因作为驱动子驱动绿色荧光蛋白在斑马鱼血管内皮细胞特异表达) (图 1),

饲养和使用标准严格参照美国实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的要求进行。

[0048] 养鱼水 (Fish water) :

[0049] 配置方法:1L 反渗透水 (reverse osmosis (RO) water) 加入 0.3g 海盐 (Instant Ocean salts)。

[0050] 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯) :

[0051] 购买于阿拉丁 (货号 #1095515, 批号 #30573)。0.1% DMSO 溶液 (阴性对照) 配置:使用时,用养鱼水配置成浓度为 0.1% 的工作液,现配现用。

[0052] 洛伐他汀 (阳性对照) :

[0053] 购买于大连美仑,纯度大于 98% (HPLC 法)。使用时,用 0.1% DMSO 溶液配置成实验所需的浓度,本实验中阳性对照药的使用浓度为 10 μ M。

[0054] 克罗散泰 (Closantel) :

[0055] 购买于 Sigma-Aldrich 公司 (货号 #57808-65-8, 批号 #SZBA292XV), 使用时用 0.1% DMSO 溶液配置成不同浓度的克罗散泰溶液,使用浓度分别为 0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M, 2 μ M, 2.5 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M。

[0056] 实验方法 :

[0057] (1) 实验分组及胚胎处理:取 45 只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 23hpf (hour-postfertilization, hpf), 随机分为 3 组 (阴性对照组, 克罗散泰药物处理组, 阳性对照组), 每组胚胎数量为 15 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 15 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0058] (2) 药物处理:用移液器 (量程 100 ~ 1000 μ l, Eppendorf) 迅速将预先配置好的药液加入 48 孔细胞培养平板对应的孔中, 每孔 1ml。加药液之前, 用移液器 (量程 10 ~ 1000 μ l, Eppendorf) 将 48 孔板中孵育胚胎的饲养用水尽力移出, 此操作需在短时间内预先完成, 以防止胚胎干燥。实验环境温度控制在 28.5 $^{\circ}$ C 左右, 相对湿度 40 ~ 70%。然后用锡箔纸将 48 孔板包裹好, 做好实验标记, 迅速放置于斑马鱼培养箱中继续培养 24h (培养箱温度控制在 28.5 \pm 0.5 $^{\circ}$ C)。

[0059] (3) 表型观察及统计:在体式显微镜下观察各孔胚胎的表型, 观察指标:观察药物对胚胎发育、血液循环, 心脏跳动等方面的影响。然后, 将血液循环受到影响的胚胎置于体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进一步观察拍照, 拍照时相为 48hpf, 以确认血管生成抑制表型。

[0060] 实验结果见图 2。

[0061] 实施例 2 定量评价克罗散泰对斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成模型的抑制效果

[0062] 斑马鱼血管内皮细胞出芽从受精后 20hpf 开始, 30-31hpf 左右形成主要的体节间血管网络, 如背长轴血管 (DLAV) 和体节间血管 (ISV), 48hpf 基本上形成完整的体轴血管网络^[17], 此时清晰可见完整的体节间血管 (ISV)。完整的体节间血管主要指连接背主动脉 (DA) 和背长轴血管之间 (DLAV) 之间的那一段血管, 见图 1 (48hpf 血管转基因荧光斑马鱼体节间血管模型)。48hpf 的斑马鱼一共有 28 对完整的体节间血管 (ISVs)。实验方法如下:

[0063] (1) 实验分组及胚胎处理:取 300 只发育良好的斑马鱼胚胎, 胚胎发育时相为受精后 23hpf (hour-postfertilization, hpf), 随机分为 10 组, 见下表:

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	23~48hpf
[0064] 克罗散泰	0.5 μ M	
	1 μ M	
	1.5 μ M	
	2 μ M	
	2.5 μ M	
	3 μ M	
	4 μ M	
	5 μ M	
阳性对照	10 μ M 洛伐他汀	

[0065] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 15 只胚胎, 每个药物浓度处理 30 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0066] (2) 药物处理: 见实施例 1 中的实验方法操作步骤 (2)。

[0067] (3) 表型观察及定量统计: 将各浓度药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进行观察拍照, 拍照时相为 48hpf, 以分析各药物浓度对斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成的影响。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计, 统计指标如下:

[0068] ①完整的体节间血管 (ISVs) 数量: 连接背主动脉 (DA) 和背长轴血管之间 (DLAV) 之间的血管

[0069]

$$\text{②体节间血管生成抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{(药物处理组) ISVs数量}}{\text{(阴性对照组) ISVs数量}}\right) \times 100\%$$

[0070] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图, 并计算克罗散泰抑制斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成的 IC_{50} 。实验结果见图 3~图 4: 克罗散泰对斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加, 各浓度克罗散泰组对斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成的抑制率分别为: 0.5 μ M (1.45%), 1 μ M (22.10%), 1.5 μ M (47.10%), 2 μ M (56.52%), 2.5 μ M (86.23%), 3 μ M (90.94%), 4 μ M (100%), 5 μ M (100%), IC_{50} 为 1.69 μ M。

[0071] 实施例 3 定量评价克罗散泰对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成模型的抑制效果

[0072] 斑马鱼肠下血管 (SIV, subintestinal vessel) 生长在卵黄囊两侧, 其形状似一个篮子, 肠下血管 (SIV) 由体节腹侧向下延伸的长度约为 50~100 μ m^[15-16]。见图 5 (72hpf 血管转基因荧光斑马鱼肠下血管模型)。实验方法如下:

[0073] (1) 实验分组及胚胎处理: 取 120 只发育良好的斑马鱼胚胎, 胚胎发育时相为受精后 48hpf (hour-postfertilization, hpf), 随机分为 4 组, 见下表:

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
[0074] 阴性对照	0.1% DMSO	48~72hpf
克罗散泰	1 μ M	
	2.5 μ M	
阳性对照	10 μ M 洛伐他汀	

[0075] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 15 只胚胎, 每个药物浓度处理 30 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0076] (2) 药物处理: 见实施例 1 中的实验方法操作步骤 (2)。

[0077] (3) 表型观察及定量统计: 将各浓度药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进行观察拍照, 拍照时相为 72hpf, 以分析各药物浓度对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的影响。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计, 统计指标如下:

[0078] ① 肠下血管面积 (SIV area): 利用 Nikon AZ100 体式荧光显微镜配置的 NIS-Elements 3.1 软件进行计算

[0079]

$$\text{② 肠下血管(SIV)生成抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{(药物处理组) SIV面积}}{\text{(阴性对照组) SIV面积}} \right) \times 100\%$$

[0080] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图, 实验结果见图 6~图 7: 克罗散泰对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加, 两个浓度克罗散泰组对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率分别为: 1 μ M (14.31%), 2.5 μ M (62.54%)。

[0081] 综上所述, 根据上述一系列实验可以看出, 克罗散泰对血管生成具有十分明显的抑制效果, 未来可用于制备抑制血管生成类药物。

[0082] 实施例 4 斑马鱼人类乳腺癌 (JF305) 移植模型评价克罗散泰的抗肿瘤药效

[0083] 实体肿瘤的生长和扩散依赖于肿瘤内新血管的形成, 并通过新生血管获取养分; 新血管的形成和生长, 促进了肿瘤细胞的转移。本实施例用于说明克罗散泰能够抑制肿瘤的生长和迁移。实验方法如下:

[0084] (1) 实验分组及胚胎处理: 取 150 只移植有人类乳腺癌 (JF305) 细胞的斑马鱼胚胎, 胚胎发育时相为受精后 2dpf (day-postfertilization, dpf), 随机分为 5 组, 见下表:

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
[0085] 阴性对照	0.1% DMSO	2~6dpf
克罗散泰	1 μ M	
	2.5 μ M	
	10 μ M	
阳性对照	1000 μ M 5-FU	

[0086] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 6 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 30 只胚胎, 每个药物浓度处理 30 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 3ml。

[0087] (2) 药物处理: 用移液器迅速将预先配置好的药液加入 6 孔细胞培养平板对应的孔中, 每孔 3ml。然后用锡箔纸将 6 孔板包裹好, 做好实验标记, 放置于斑马鱼培养箱中继续培养 4d (培养箱温度控制在 35.5 \pm 0.5 $^{\circ}$ C)。

[0088] (3) 表型观察及定量统计:将各浓度药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜(Nikon AZ100 体式荧光显微镜)下进行观察拍照,拍照时相为6dpf,以分析各药物浓度对斑马鱼人类乳腺癌(JF305)移植模型的抑制作用。从各实验组随机取10只胚胎进行定量统计,统计指标如下:

[0089] ①定性评价克罗散泰对肿瘤转移的抑制作用;

[0090] ②定量评价克罗散泰对肿瘤生长的抑制作用:利用尼康NIS-Elements 3.1软件计算肿瘤细胞荧光强度(S),统计学处理结果以mean±SE表示;克罗散泰对肿瘤生长的抑制效果计算公式如下:

[0091]

$$\text{肿瘤生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{S(\text{药物处理组})}{S(\text{阴性对照组})}\right) \times 100\%$$

[0092] 利用GraphPad Prism软件进行统计作图,实验结果见图8~图9:克罗散泰对人类移植癌细胞生长的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,三个浓度克罗散泰组抑制率分别为:1μM(0.3%),2.5μM(23.9%),10μM(43.9%)。

[0093] 实施例5定量评价克罗散泰对湿性老年视黄斑变性的治疗作用

[0094] 湿性老年视黄斑变性主要因为脉络膜血管异常生成,新生的无效微血管出现渗漏,血管渗漏的液体进而破坏黄斑。本实施例用于说明克罗散泰对湿性老年视黄斑变性具有治疗效果。实验方法如下:

[0095] (1) 实验分组及胚胎处理:取150只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后1dpf(day-postfertilization, dpf),随机分为5组,见下表:

组别	药物剂量	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	1~5dpf
模型组	1mg/ml 氯化钴	
治疗组	0.026μg 克罗散泰+1mg/ml 氯化钴	
	0.087μg 克罗散泰+1mg/ml 氯化钴	
	0.26μg 克罗散泰+1mg/ml 氯化钴	

[0097] 每组斑马鱼胚胎数量30只。操作时将胚胎均匀分配至6孔细胞培养平板(Greiner,德国)中,每孔30只胚胎,每孔胚胎饲养用水3ml。

[0098] (2) 药物处理:阴性对照组中加入DMSO,使其终浓度为0.1%;模型组中加入氯化钴,使其终浓度为1mg/ml;克罗散泰高中低三个治疗组的克罗散泰通过显微注射方式给药,每组均注射30只胚胎,注射后将胚胎按组分别放入3ml含有1mg/ml氯化钴的饲养用水中。

[0099] (3) 表型观察及定量统计:将各剂量药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜(Nikon AZ100 体式荧光显微镜)下进行观察拍照,拍照时相为5dpf,以分析各药物剂量对斑马鱼眼部脉络膜异常增生血管的抑制作用。从各实验组随机取10只胚胎进行定量统计,统计指标如下:

[0100] ①定性评价克罗散泰对眼部脉络膜异常增生血管的抑制作用;

[0101] ②定量评价克罗散泰对脉络膜异常增生血管的抑制作用:利用NIS-Elements3.1软件计算脉络膜异常增生血管荧光强度(S),统计学处理结果以mean±SE表示;克罗散泰

对脉络膜异常增生血管的抑制效果计算公式如下：

[0102]

$$\text{脉络膜血管异常增生抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{S(\text{药物处理组})}{S(\text{模型组})}\right) \times 100\%$$

[0103] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图,实验结果见图 10 ~ 图 11 : 克罗散泰对脉络膜血管异常增生的抑制率随着剂量的上升而呈现梯度增加,三个剂量克罗散泰组抑制率分别为 :0.026 μg (9.1%), 0.087 μg (21.2%), 0.26 μg (30.8%)。

[0104] 参考文献

[0105] [1]Folkman J. Angiogenesis :an organizing principle for drug discovery? Nat RevDrug Discov. 2007Apr ;6(4) :273-86.

[0106] [2]Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during

[0107] tumorigenesis. Cell. 1996Aug 9 ;86(3) :353-64.

[0108] [3]Li CY, Shan S, Cao Y, et al. Role of incipient angiogenesis in cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2000 ;19(1-2) :7-11.

[0109] [4]Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000Sep 14 ;407(6801) :249-57.

[0110] [5]Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. CA Cancer J Clin. 2009Mar-Apr ;59(2) :111-37.

[0111] [6]Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors :current strategies and future prospects.

[0112] CA Cancer J Clin. 2010Jul-Aug ;60(4) :222-43.

[0113] [7]Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, et al. Quantitative angiogenesis assays in vivo--areview.

[0114] Angiogenesis. 2004 ;7 :1-16.

[0115] [8]Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. Nat Protoc. 2007 ;2(11) :2918-23.

[0116] [9]Chan J, Bayliss PE, Wood JM, et al. Dissection of angiogenic signaling in zebrafish using a chemical genetic approach. Cancer Cell. 2002Apr ;1(3) :257-67.

[0117] [10]Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, et al. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. Blood. 2005Jul 1 ;106(1) :125-34.

[0118] [11]Murphy EA, Shields DJ, Stoletov K, et al. Disruption of angiogenesis and tumor growth with an orally active drug that stabilizes the inactive state of PDGFRbeta/B-RAF. Proc Natl Acad Sci USA. 2010Mar 2 ;107(9) :4299-304.

[0119] [12]Wang C, Tao W, Wang Y, et al. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer. Eur Urol. 2010Sep ;58(3) :418-26.

- [0120] [13]Arbiser JL, Kau T, Konar M, et al. Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. Blood. 2007 Jan 15; 109(2):560-5.
- [0121] [14]Camus S, Quevedo C, Menéndez S, et al. Identification of phosphorylase kinase as a novel therapeutic target through high-throughput screening for anti-angiogenesis compounds in zebrafish. Oncogene. 2011 Dec 19. doi:10.1038/onc.2011.594.
- [0122] [15]Cheng J, Gu YJ, Wang Y, et al. Nanotherapeutics in angiogenesis: synthesis and in vivo assessment of drug efficacy and biocompatibility in zebrafish embryos. Int J Nanomedicine. 2011;6:2007-21.
- [0123] [16]Serbedzija GN, Flynn E, Willett CE. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. Angiogenesis. 1999;3(4):353-9.
- [0124] [17]Siekman AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. Nature. 2007 Feb 15;445(7129):781-4.

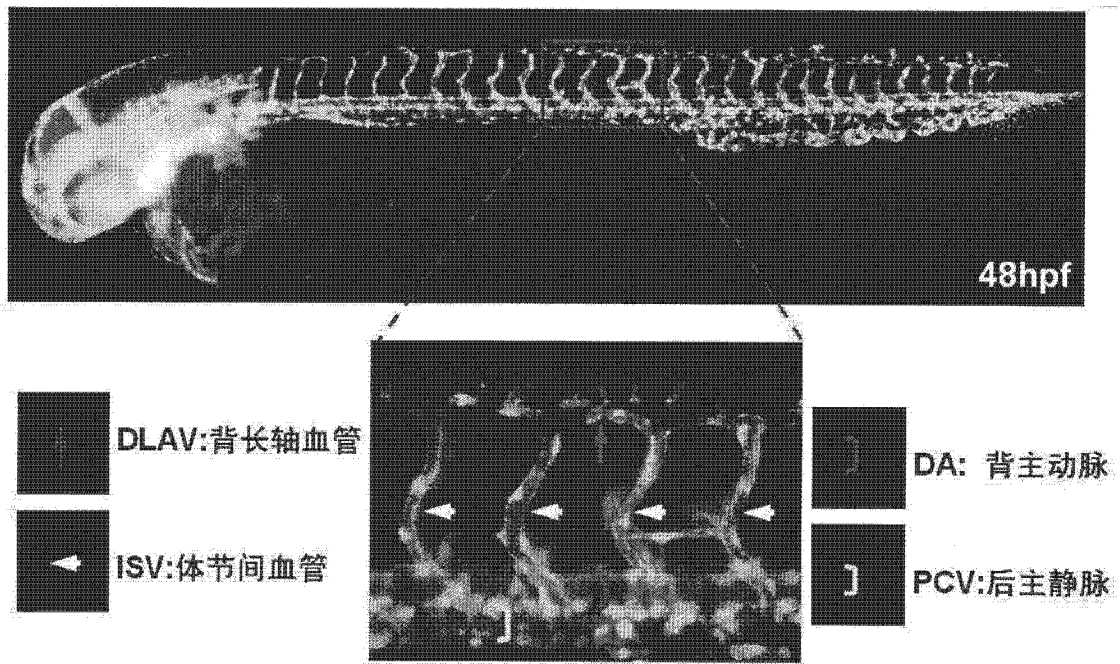


图 1

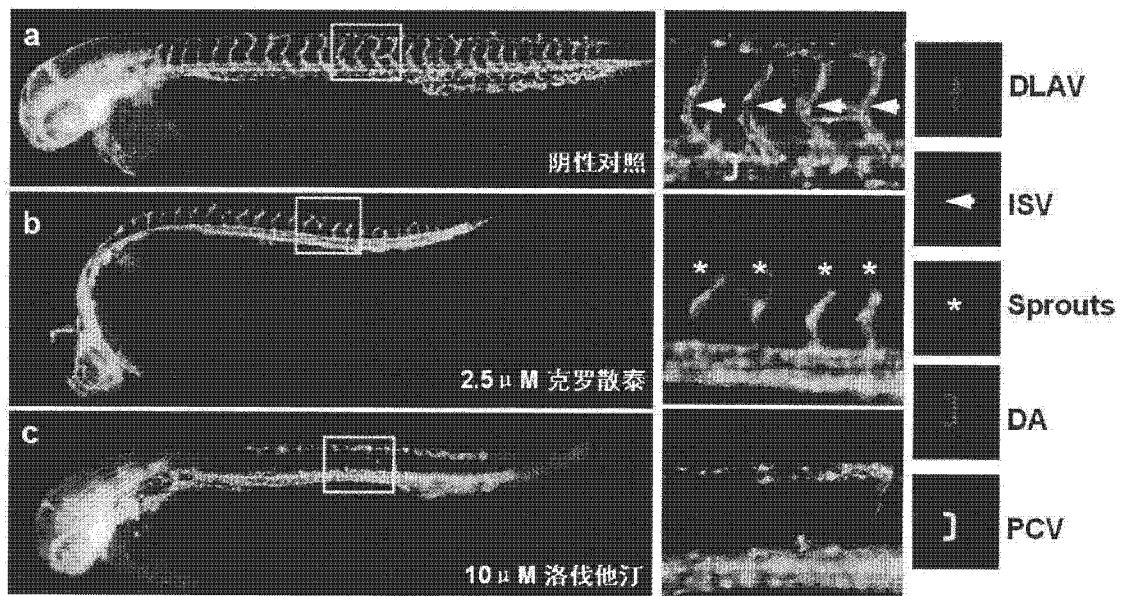


图 2

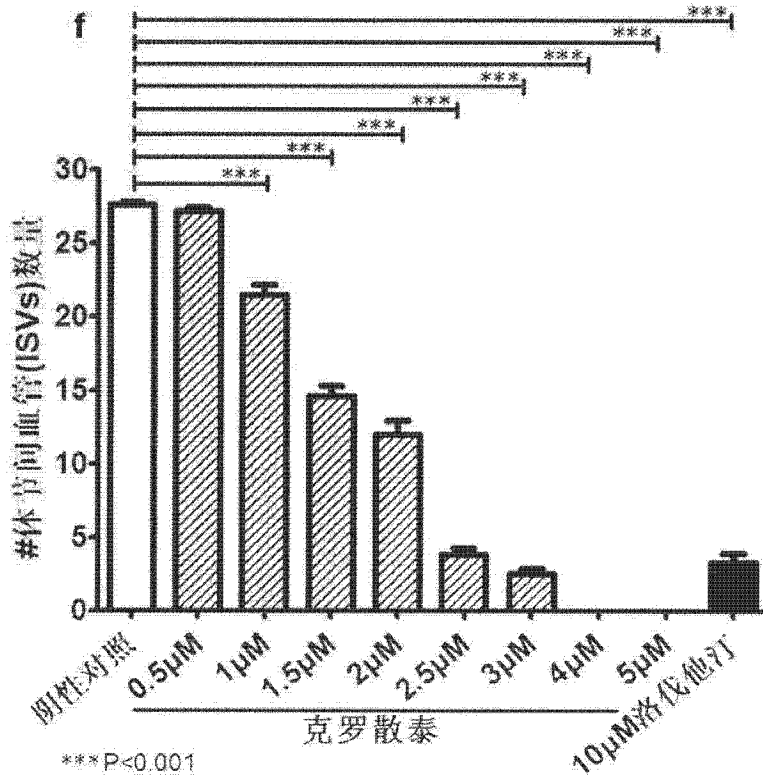
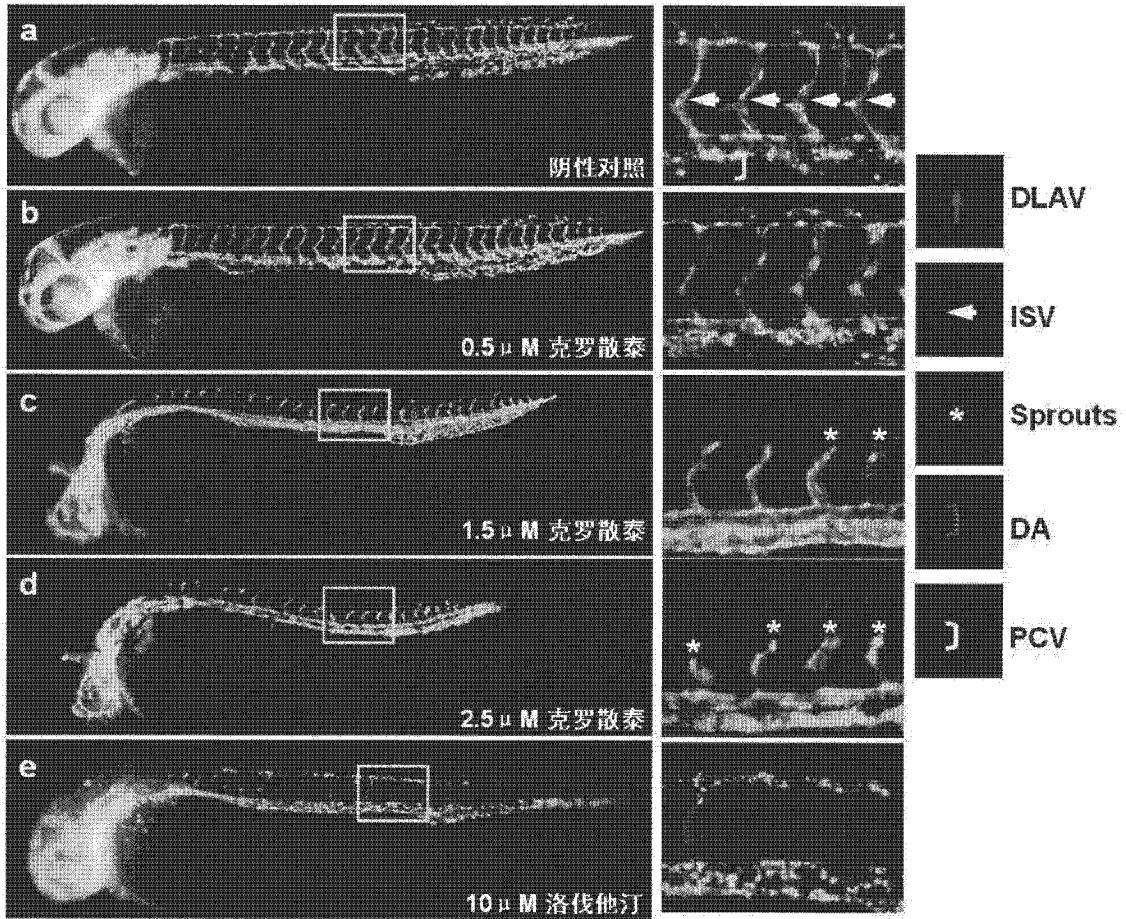


图 3

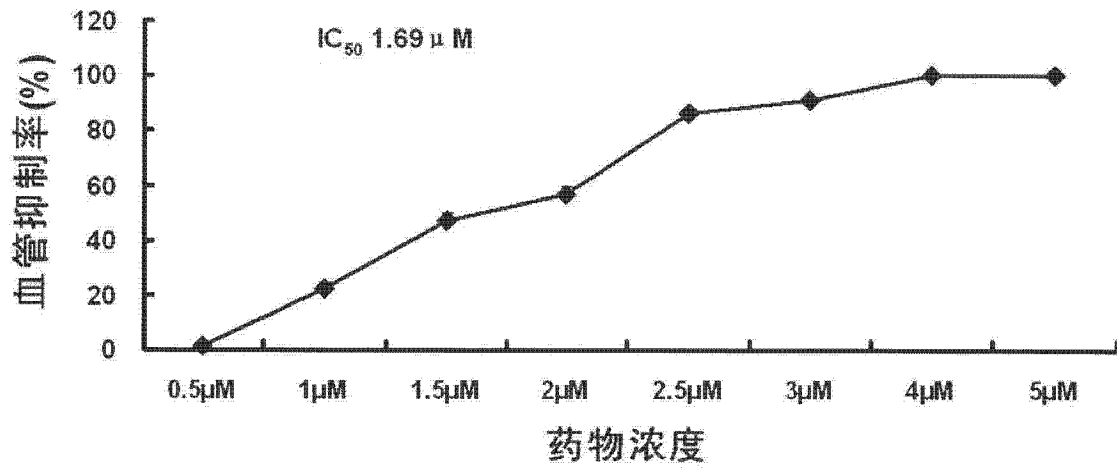


图 4

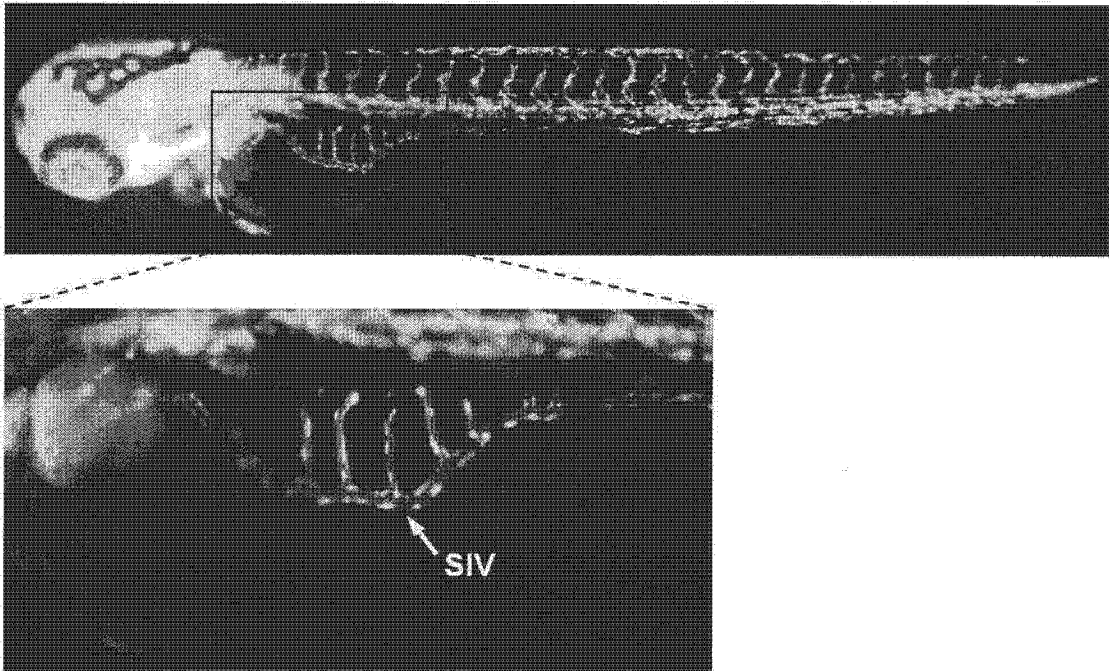


图 5

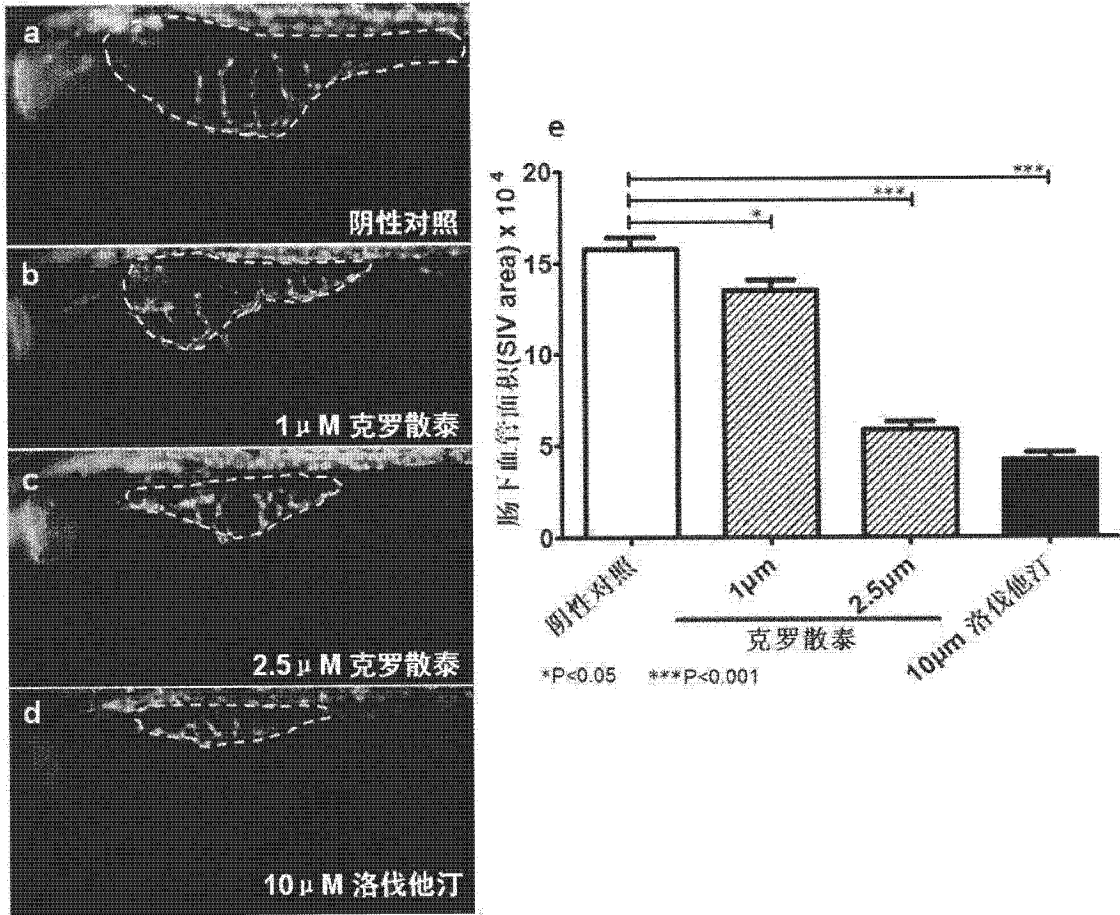


图 6

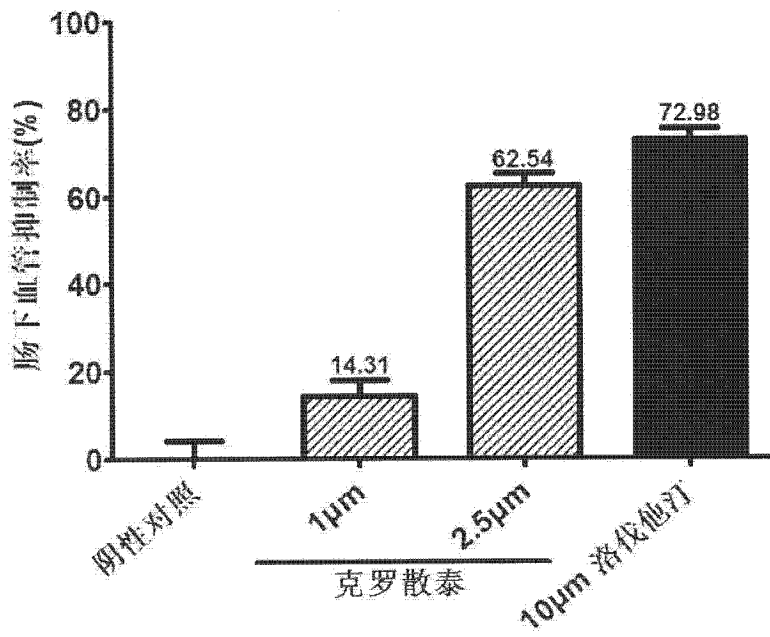


图 7

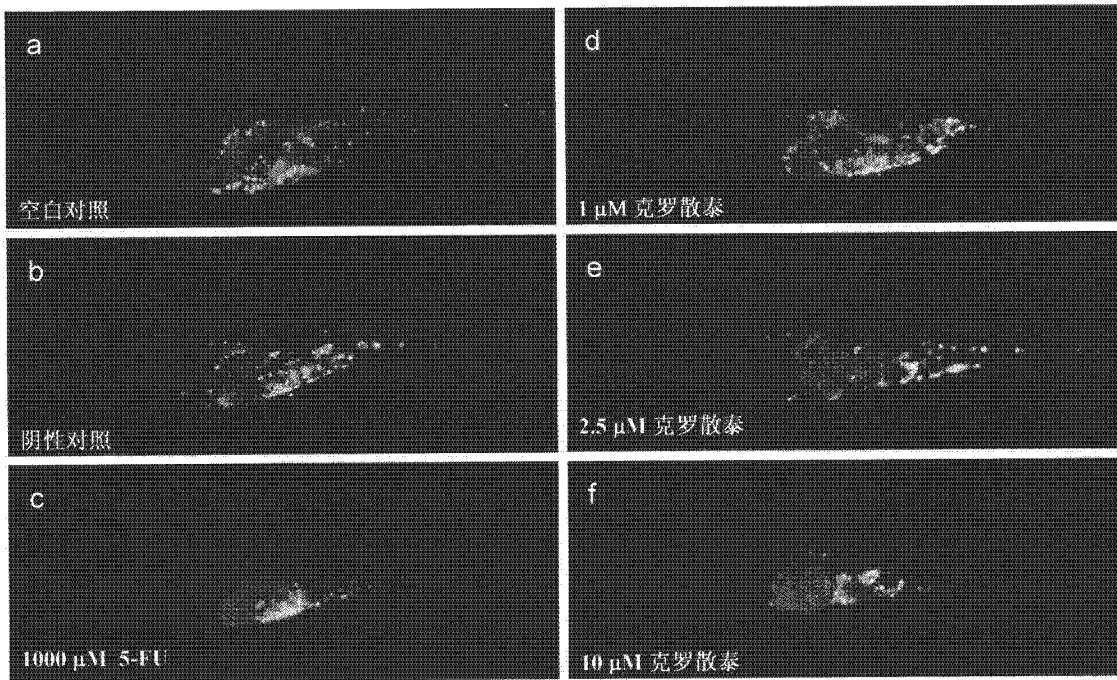


图 8

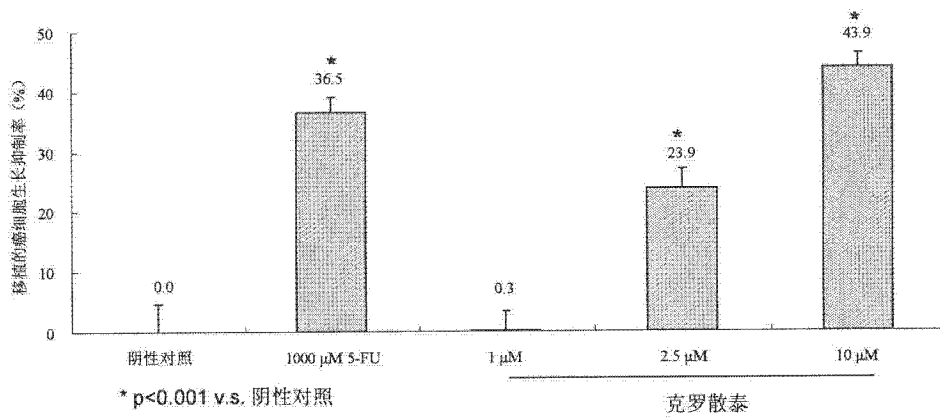


图 9

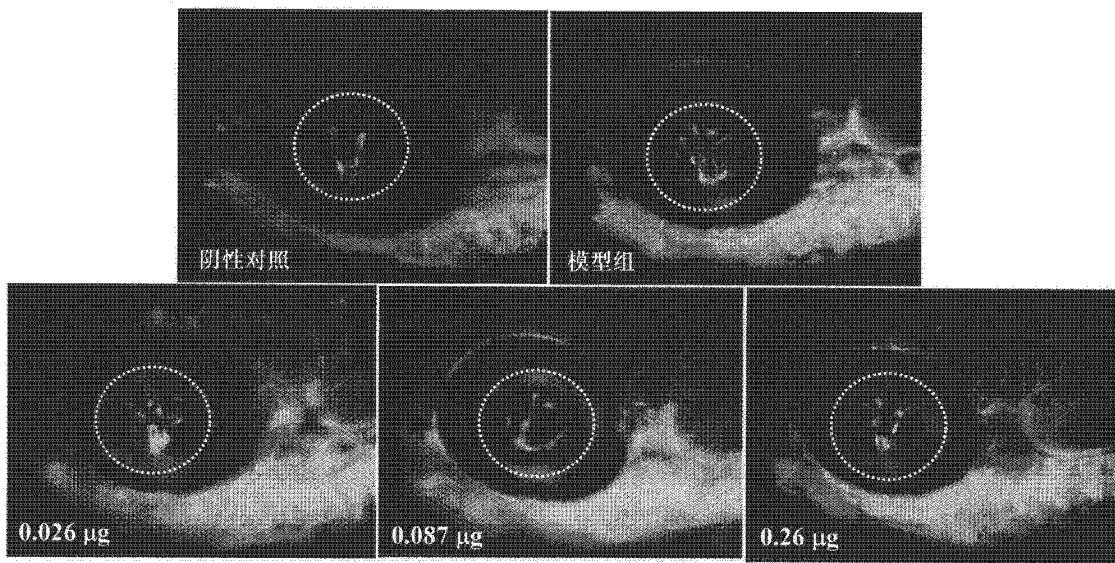


图 10

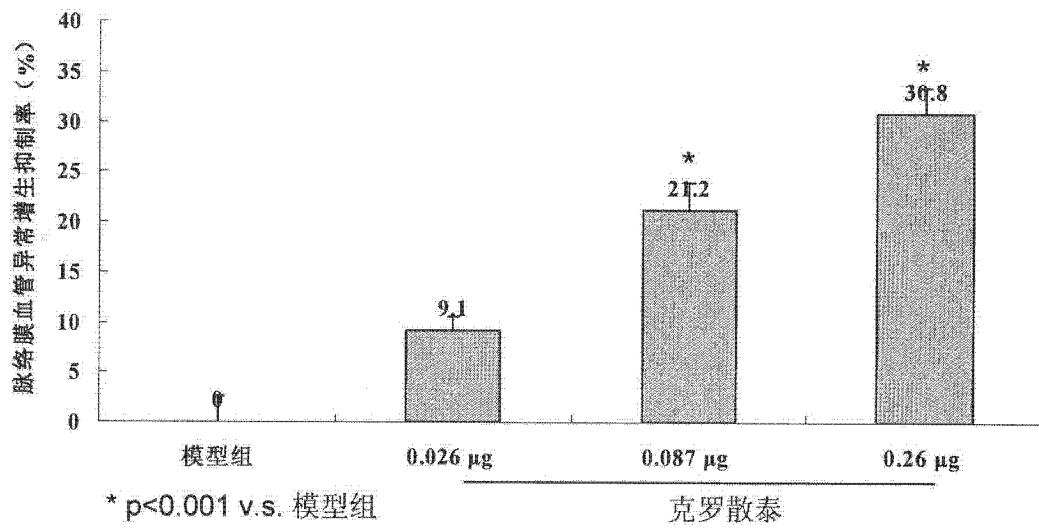


图 11