

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104622874 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201510081298. 8

(22) 申请日 2015. 02. 15

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 杨鹏远

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

*A61K 31/517*(2006. 01)

*A61K 31/433*(2006. 01)

*A61P 35/00*(2006. 01)

*A61P 35/04*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

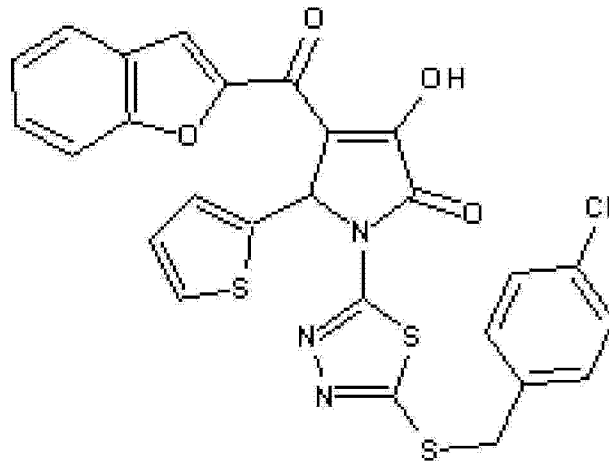
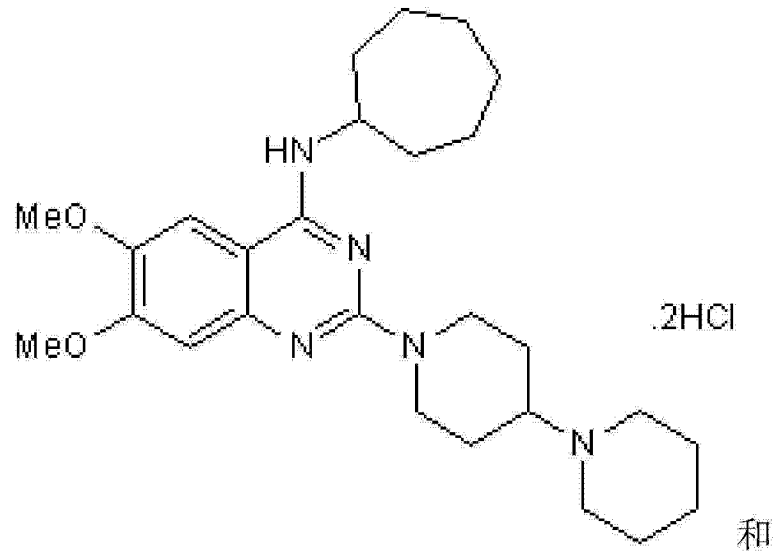
CCR4 拮抗剂在抑制癌生长及转移中的应用

(57) 摘要

本发明涉及 CCR4 拮抗剂在抑制癌生长及转移中的应用,属于生物医药技术领域,具体涉及 CCR4 拮抗剂,尤其是 C-021 和 ST45177901 在抑制癌尤其是肝癌生长及转移中的应用。本发明提供的化合物在抑制癌尤其是肝癌生长及转移中具有良好的临床应用前景。

1. CCR4 拮抗剂在制备用于抑制癌生长及抑制癌症转移的药物中的用途。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述 CCR4 拮抗剂是小分子化合物 c-021、ST45177901 或其组合, 所述小分子化合物 c-021、ST45177901 的结构式分别为



3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述癌症是肝癌。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述 CCR4 拮抗剂可以被制备成注射剂, 片剂或胶囊剂。

## CCR4 拮抗剂在抑制癌生长及转移中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及 CCR4 拮抗剂在抑制癌生长及转移中的应用。

### 背景技术

[0002] 肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,具有恶性度高、进展快、预后差的特点,严重威胁着人类健康和生命安全。中国是全球肝癌发病率最高和病死数最多的国家,肝癌患者约占全球的 55%。近年来,肝癌在全球的发病率都呈上升趋势,而中国新增癌症病例高居世界第一位,其中肝癌的新增病例和死亡人数均居世界首位。由于肝脏具有丰富的血流供应,因此,血管转移是最重要的肝癌转移途径。有报道称,90%以上的癌症患者死于癌转移。目前国内外应用于治疗肝癌血管转移的有效药物很少,因此,深入开展肝癌血管转移的药物防治研究具有重要意义。

[0003] CC 趋化因子受体 4(CC chemokine receptor 4, CCR4) 又称 CKR4、CMKBR4、ChemR13、K5-5 等,属于 CC 趋化因子受体家族,含 360 个氨基酸残基,定位于 3 号染色体 p24-p21.3 区域,为 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体,主要表达于各淋巴细胞和组织,CCR4 的高表达与多种血液系统肿瘤以及恶性实体瘤的浸润、转移和预后相关。已知的 CCR4 高亲和力配体有两个,分别为胸腺活化调节趋化因子(Thymus and activation regulated chemokine, TARC/CCL17) 和巨噬细胞衍生趋化因子(macrophage-derived chemokine, MDC/CCL22)。CCR4 主要通过 CCR4+Treg 细胞及 CCR4+Th2 细胞发挥免疫效应,如 Treg 细胞表面的 CCR4 通过与其配体 TARC、MDC 的结合趋化 Treg 细胞,引起免疫逃逸,从而导致不良临床后果。通过研究 CCR4 拮抗剂抑制 TARC/MDC-CCR4 信号通路,有可能成为恶性肿瘤分子靶向治疗的新策略。

[0004] CCR4 拮抗剂根据其化学结构可分为:噻唑烷酮类、内酰胺类、2-氨基噻唑类、芳基磺酰胺类、二氨基嘧啶类、2,4-二氨基喹啉类及环胺类化合物等。在哮喘、鼻炎、皮炎、血栓性疾病、自身免疫性疾病等疾病的研究中均有良好的治疗效果,具有较大的临床应用价值。

[0005] 迄今为止,尚未见 CCR4 拮抗剂用于治疗肝癌生长及转移的报道。

### 发明内容

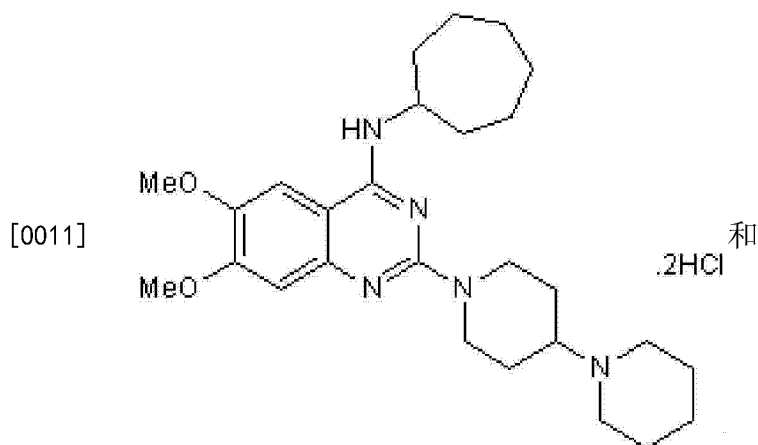
[0006] 本发明研究发现,CCR4 拮抗剂,尤其是小分子化合物 c-021 及 ST45177901 可有效拮抗 CCR4,具有抑制癌尤其是肝癌生长及转移的作用。

[0007] 所述小分子化合物 c-021 和 ST45177901 均为 CCR4 拮抗剂,通过小鼠原位肝癌模型研究发现,这两种化合物均可通过有效拮抗 CCR4,从而抑制 TARC/MDC-CCR4 信号通路趋化 Treg 细胞,有效抑制了小鼠体内肝癌的生长及转移,具有良好的临床应用前景。

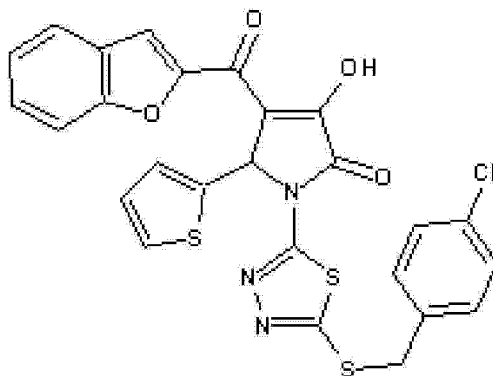
[0008] 因此,本发明涉及以下各项:

[0009] 1. CCR4 拮抗剂在制备用于抑制癌生长及抑制癌症转移的药物中的用途。

[0010] 2. 根据第 1 项所述的用途,所述 CCR4 拮抗剂是小分子化合物 c-021、ST45177901 或其组合,所述小分子化合物 c-021、ST45177901 的结构式分别为



[0012]



[0013] 3. 根据第 1 或 2 项所述的用途,所述癌症是肝癌。

[0014] 4. 根据第 1 或 2 项所述的用途,所述 CCR4 拮抗剂可以被制备成注射剂,片剂或胶囊剂。

[0015] 本发明利用小鼠肝癌原位移植实验的效果验证结果表明,CCR4 拮抗剂,尤其是小分子化合物 c-021 及 ST45177901,均可有效抑制肿瘤细胞的生长及转移,c-021 的抑制效应更为显著。

[0016] 本发明提供的小分子化合物在治疗肝癌生长及转移中具有良好的临床应用前景。

#### 附图说明

[0017] 图 1. 化合物 c-021 对小鼠肝癌生长及转移的作用

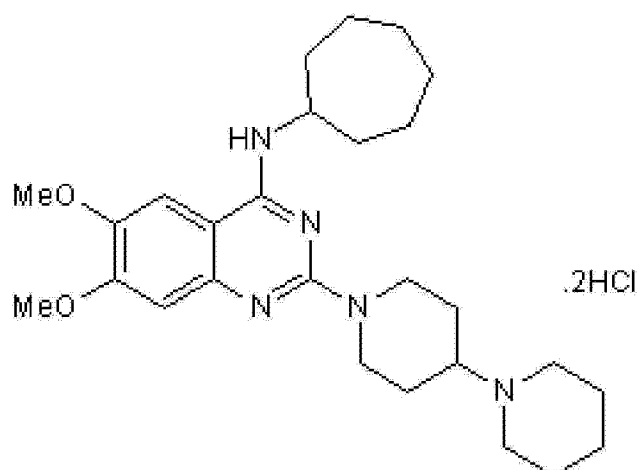
[0018] 图 2. 化合物 ST45177901 对小鼠肝癌生长及转移的作用

#### 具体实施方式

[0019] 实施例 1:化合物

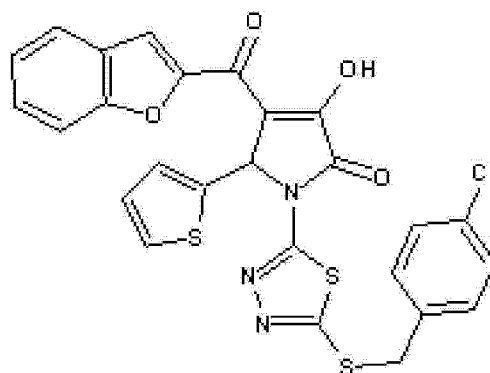
[0020] 1. 小分子化合物 c-021 购于 Tocris 公司(货号:3581,纯度>99%),该化合物分子式为  $C_{27}H_{41}N_5O_2 \cdot 2HCl$ ,结构如下:

[0021]



[0022] 2. 小分子化合物 ST45177901 购于 Timtec 公司 (货号:MFCD04147999, 纯度 >99%), 该化合物分子式为  $C_{26}H_{16}ClN_3O_4S_3$ , 结构如下:

[0023]



[0024] 实施例 2:CCR4 拮抗剂用于治疗肝癌生长及转移的动物实验

[0025] 小鼠肝癌原位移植模型可有效模拟肝癌自然生长、侵袭及转移的过程, 是研究肝癌常用的动物实验模型 (Gao YS, Chen XP, Li KY, Wu ZD. Nude mice model of human hepatocellular carcinoma via orthotopic implantation of histologically intact tissue. World J Gastroenterol. 2004. 10:3107-3111)。因此用其验证化合物 c-021 及 ST45177901 在肝癌生长及转移中的作用。

[0026] 1、动物

[0027] C57/6BL 小鼠, 雄性, 体重 20 ~ 24g, 每组 6 只 / 笼群养, 共分 4 组。购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于 SPF 级动物房。

[0028] 2、细胞

[0029] 利用 IVIS 公司的荧光素酶报告系统, 构建了含荧光素酶报告基因的 Hepa1-6 细胞系。并给每只小鼠接种  $3 \times 10^6$  个上述细胞, 获得实验小鼠。

[0030] 所述含荧光素酶报告基因的 Hepa1-6 细胞系的具体构建方法如下:

[0031] Hepa1-6 细胞购自 ATCC 细胞库 (货号: CRL-1830), 荧光素酶报告质粒购自 IVIS 公司 (pcDNA6-Luci)。将每 2ug 所述质粒与 200ul jetPRIME buffer (公司: Polyplus, 货号: PT-114-07) 混合, 再加 4ul jetPRIME 转染试剂 (公司: Polyplus, 货号: PT-114-07) 转染至 Hepa1-6 细胞, 培养 48h 后加入 2mg/mL G418 (公司: Amresco, 货号 E859-5G) 继续培养, 连续培养 2 周, 获得稳转细胞系。

[0032] 3、药物

[0033] 将实验小鼠进行分组：

[0034] c-021 组：

[0035] 实验组：每两天腹腔注射小分子化合物 c-021, 10  $\mu$  mol/kg

[0036] 对照组：每两天腹腔注射 PBS

[0037] ST45177901 组：

[0038] 实验组：每两天腹腔注射小分子化合物 ST45177901, 10  $\mu$  mol/kg

[0039] 对照组：每两天腹腔注射 PBS

[0040] 4、实验仪器

[0041] 仪器名称：小动物活体体内成像系统 IVIS Spectrum, 型号：IVIS Spectrum, 生产厂家：美国 Caliper。

[0042] 5、实验方法

[0043] 将小鼠用 10% 水合氯醛（购自国药集团化学试剂有限公司, 货号 30037517）腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 75% 酒精擦拭腹部消毒, 剪去多余毛发, 暴露腹部皮肤, 沿腹中线于剑突下剪开 0.5cm 小口, 暴露肝脏, 挤出肝左叶, 用眼科镊固定肝左叶, 注射 20-30  $\mu$  l 含  $3 \times 10^6$  所述含荧光素酶的 Hepa1-6 稳转细胞于肝实质中, 轻压片刻将肝左叶送回腹腔, 分别缝合肌肉层与皮肤。实验组分别每两天腹腔注射化合物 c-021 (10  $\mu$  mol/kg) 和 ST45177901 (10  $\mu$  mol/kg), 对照组则腹腔注射 PBS。在手术后 1d、14d (对于 c-021)/10d (对于 ST45177901) 分别进行荧光显像, 观察肝癌细胞生长及转移情况。

[0044] (1) 化合物 c-021 对小鼠肝癌生长及转移的影响

[0045] 手术后 1d 检测两组荧光信号强度未见明显区别, 经过给药处理 14d, 经 c-021 处理的实验组小鼠肝癌细胞荧光信号几乎检测不到, 与对照组相比差别显著, 而且对照组中荧光信号分布不均, 出现多个强信号点, 为转移灶信号 (图 1)。由上述实验结果可知, c-021 具有显著的抑制肝癌细胞生长及转移的作用。

[0046] (2) 化合物 ST45177901 对小鼠肝癌生长及转移的影响

[0047] 手术后 1d 检测两组荧光信号强度未见明显区别, 经过给药处理 10d, 经 ST45177901 处理的实验组小鼠肝癌细胞荧光信号明显弱于对照组, 其中三只几乎检测不到荧光信号, 且对照组中荧光信号分布不均, 出现多个强信号点, 为转移灶信号 (图 2)。由上述实验结果可知, ST45177901 具有显著的抑制肝癌细胞生长及转移的作用。

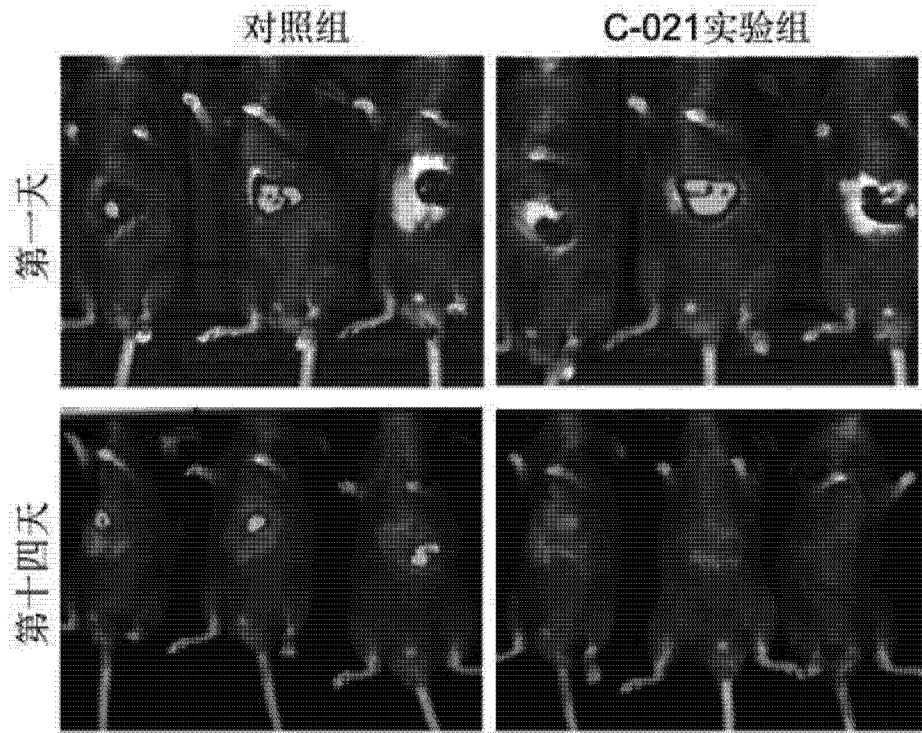


图 1

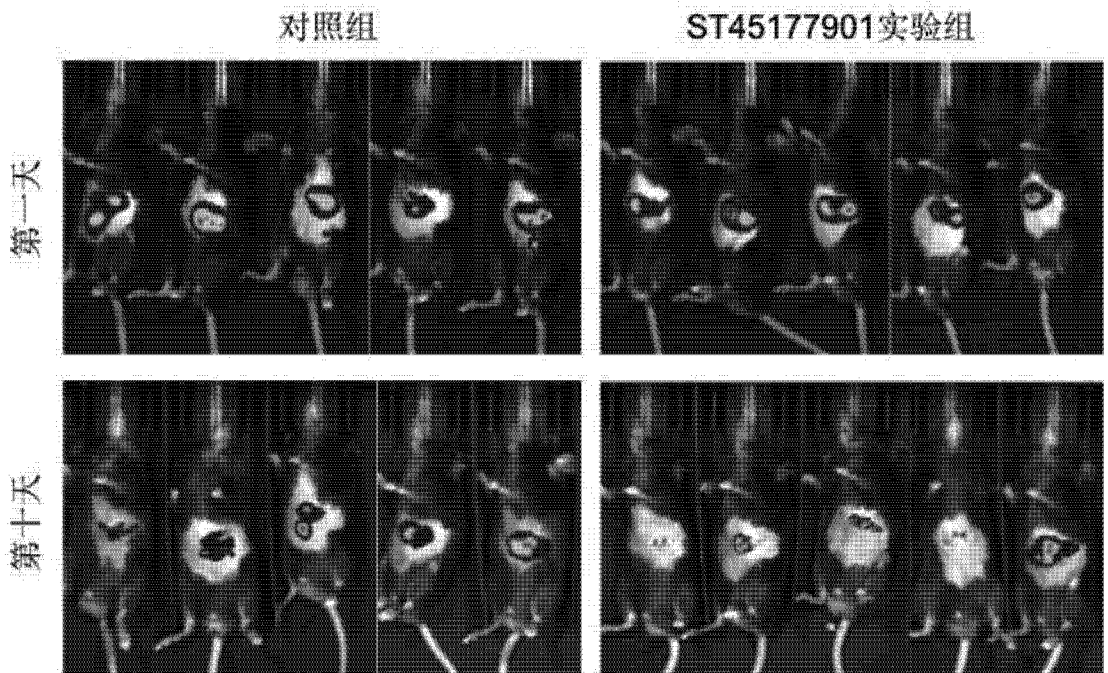


图 2