



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113786491 A

(43) 申请公布日 2021.12.14

(21) 申请号 202111172123.X

A61P 11/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.10.08

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 中国医学科学院医药生物技术研究所

地址 100050 北京市东城区天坛西里1号

(72) 发明人 何琪杨 王金彩 陈淑珍 王爱民 张娟 陈阳

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所 11430

代理人 范盈

(51) Int. Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/4748 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

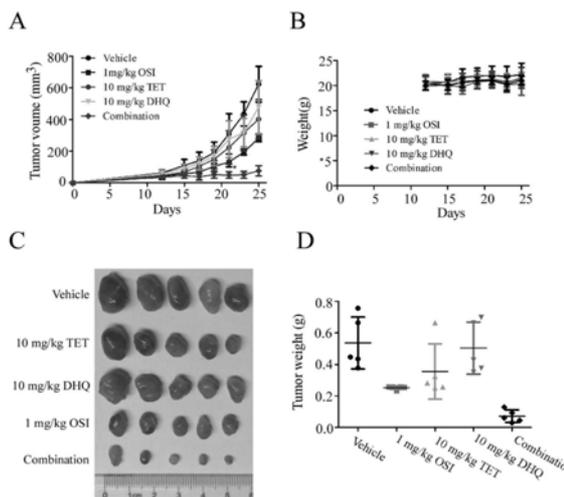
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种含汉防己甲素、二氢槲皮素或槲皮素的抗肿瘤联用制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种含汉防己甲素、二氢槲皮素或槲皮素的抗肿瘤联用制剂。所述的汉防己甲素和二氢槲皮素或槲皮素的组合物及其相关盐类，联用制剂中还包含靶向药物，所述靶向药物为奥希替尼或其作用类似药物阿美替尼。所述的肿瘤优选的为非小细胞肺癌。本发明的联用制剂对奥希替尼具有明显的增效、逆转耐药性的作用。



1. 一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

(1) 治疗有效量的汉防己甲素(tetrandrine,TET)或其相关的盐类;

(2) 治疗有效量的黄酮醇类或二氢黄酮醇类化合物;优选的,所述的黄酮醇类化合物为槲皮素(querletin,QUE)或其相关的盐类;所述的二氢黄酮醇类化合物为二氢槲皮素(dihydroquerletin,DHQ)或其相关的盐类;

(3) 治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为第三代酪氨酸激酶抑制剂;更优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为奥希替尼(osimertinib,OSI)或阿美替尼(ALM);

以及(4)必要的药用辅料。

2. 一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

(1) 治疗有效量的汉防己甲素(tetrandrine,TET)或其相关的盐类;

(2) 治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为第三代酪氨酸激酶抑制剂;更优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为奥希替尼(osimertinib,OSI)或阿美替尼(ALM);

以及(3)必要的药用辅料。

3. 一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

(1) 治疗有效量的黄酮醇类或二氢黄酮醇类化合物;优选的,所述的黄酮醇类化合物为槲皮素(querletin,QUE)或其相关的盐类;所述的二氢黄酮醇类化合物为二氢槲皮素(dihydroquerletin,DHQ)或其相关的盐类;

(2) 治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为第三代酪氨酸激酶抑制剂;更优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为奥希替尼(osimertinib,OSI)或阿美替尼(ALM);

以及(3)必要的药用辅料。

4. 根据权利要求1-3任一所述的抗肿瘤联用制剂,其特征在于,所述的肿瘤为肺部肿瘤;

优选的,所述的肿瘤为非小细胞肺癌;

更优选的,所述的肿瘤为EGFR突变导致的酪氨酸激酶抑制剂耐药型非小细胞肺癌。

5. 汉防己甲素(tetrandrine,TET)、槲皮素(querletin,QUE)或二氢槲皮素(dihydroquerletin,DHQ)在制备抗肿瘤联用制剂中的应用,所述的抗肿瘤联用制剂中还至少包含酪氨酸激酶抑制剂。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的肿瘤为非小细胞肺癌;优选的,所述的肿瘤为EGFR突变导致的酪氨酸激酶抑制剂耐药型非小细胞肺癌。

7. 一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

(1) 质量配比为1%-80%的汉防己甲素;

(2) 质量配比为1%-80%的二氢槲皮素;

(3) 质量有效量的奥希替尼;

以及(4)必要的药用辅料。

8. 根据权利要求7所述的抗肿瘤联用制剂,其特征在于,所述的制剂中,汉防己甲素:二氢槲皮素:奥希替尼的质量比为10:10:1。

一种含汉防己甲素、二氢槲皮素或槲皮素的抗肿瘤联用制剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药技术领域,具体的,涉及一种含汉防己甲素、二氢槲皮素或槲皮素的抗肿瘤联用制剂。

背景技术

[0002] 汉防己甲素(tetrandrine, TET),又名粉防己碱,来源于粉防己等中药,具有多种药理活性。1970年代,汉防己甲素作为抗高血压的药物在我国上市,后来发现其具有良好的治疗矽肺的活性而得到临床广泛应用。1992年,何琪杨等首先发现汉防己甲素能逆转CHO细胞对抗肿瘤药物多柔比星的耐药性,后来深入研究发现人白血病HL-60耐药细胞对汉防己甲素更为敏感。其他学者的研究发现汉防己甲素能阻断肿瘤细胞于G1期,增强靶向药物索拉非尼对肝癌的活性。2020年,还发现汉防己甲素具有很强的抑制新冠病毒的活性。

[0003] 二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ),又名花旗松素(taxifolin),属于类黄酮类(flavonoids)的天然产物,存在于多种蔬菜、植物中药中,例如:落叶松、洋葱等植物。二氢槲皮素对人体的毒性低、具有多种药理活性,例如:很强的抗氧化活性,较强的抗肿瘤作用,抗肝损伤的作用强于相似结构的槲皮素(quercetin, QUE)。2019年,欧盟批准用于食品抗氧化剂。2021年4月底,国家卫健委批准二氢槲皮素为新资源食品原料,每天的用量不超过100mg。

[0004] 肺癌是全球死亡率最高的肿瘤,我国的情况也是如此。其中,80%-85%的肺癌为非小细胞肺癌,在此类肺癌中,大约30-40%患者中的表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)发生突变,是靶向药物酪氨酸激酶抑制剂的合适靶点。奥希替尼(osimertinib, OSI)是第三代针对突变EGFR的靶向药物,由英国阿斯利康公司研发上市。目前,已经被美国FDA和我国药监局批准为针对EGFR T790M突变患者的的二线治疗、一线治疗和手术后辅助治疗等3种适应症的治疗,是肺癌治疗领域表现最为优异的靶向药物。阿美替尼(Almonertinib, ALM)是我国豪森生物科技公司研发的、具有奥希替尼类似活性的第三代靶向药物,目前已经被我国药监局批准为针对EGFR T790M突变的二线治疗。。

发明内容

[0005] 本发明首先涉及一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

[0006] (1) 治疗有效量的汉防己甲素(tetrandrine, TET)或其相关的盐类;

[0007] (2) 治疗有效量的黄酮醇类或二氢黄酮醇类化合物;优选的,所述的黄酮醇类化合物为槲皮素(quercetin, QUE)或其相关的盐类;所述的二氢黄酮醇类化合物为二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ)或其相关的盐类;

[0008] (3) 治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为第三代酪氨酸激酶抑制剂;更优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为奥希替尼(osimertinib, OSI)或阿美替尼(ALM);

[0009] 以及(4)必要的药用辅料;

[0010] 所述的肿瘤为肺部肿瘤;优选的,所述的肿瘤为非小细胞肺癌;更优选的,所述的肿瘤为EGFR突变导致的酪氨酸激酶抑制剂耐药型非小细胞肺癌。

[0011] 本发明还涉及一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

[0012] (1) 治疗有效量的汉防己甲素(tetrandrine, TET)或其相关的盐类;

[0013] (2) 治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为第三代酪氨酸激酶抑制剂;更优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为奥希替尼(osimertinib, OSI)或阿美替尼(ALM);

[0014] 以及(3)必要的药用辅料;

[0015] 所述的肿瘤为肺部肿瘤;优选的,所述的肿瘤为非小细胞肺癌;更优选的,所述的肿瘤为EGFR突变导致的酪氨酸激酶抑制剂耐药型非小细胞肺癌。

[0016] 本发明还涉及一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

[0017] (1) 治疗有效量的黄酮醇类或二氢黄酮醇类化合物;优选的,所述的黄酮醇类化合物为槲皮素(quercetin, QUE)或其相关的盐类;所述的二氢黄酮醇类化合物为二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ)或其相关的盐类;

[0018] (2) 治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为第三代酪氨酸激酶抑制剂;更优选的,所述的酪氨酸激酶抑制剂为奥希替尼(osimertinib, OSI)或阿美替尼(ALM);

[0019] 以及(3)必要的药用辅料;

[0020] 所述的肿瘤为肺部肿瘤;优选的,所述的肿瘤为非小细胞肺癌;更优选的,所述的肿瘤为EGFR突变导致的酪氨酸激酶抑制剂耐药型非小细胞肺癌。

[0021] 本发明还涉及汉防己甲素(tetrandrine, TET)、槲皮素(quercetin, QUE)或二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ)在制备抗肿瘤联用制剂中的应用,所述的抗肿瘤联用制剂中还至少包含酪氨酸激酶抑制剂;优选的,所述的肿瘤为非小细胞肺癌;更优选的,所述的肿瘤为EGFR突变导致的酪氨酸激酶抑制剂耐药型非小细胞肺癌。

[0022] 本发明还涉及一种抗肿瘤联用制剂,所述的制剂包含:

[0023] (1) 质量配比为1%-80%的汉防己甲素;

[0024] (2) 质量配比为1%-80%的二氢槲皮素;

[0025] (3) 质量有效量的奥希替尼;

[0026] 以及(4)必要的药用辅料。

[0027] 优选的,所述的制剂中,汉防己甲素:二氢槲皮素:奥希替尼的质量比为10:10:1。

[0028] 本发明的有益效果在于:

[0029] 1) 肺癌细胞对奥希替尼的耐药性是临床治疗中最为常见的问题,通过应用本发明的组合物可以明显逆转其耐药性,降低耐药性的发生率。

[0030] 2) 虽然奥希替尼的临床治疗疗效好,仍然部分患者对其不敏感,本发明的组合物有可能提高奥希替尼治疗的疗效、降低副作用,缩短治疗周期,延长肺癌患者的寿命。

[0031] 3) 本发明的组合物自身具有一定的抗肿瘤作用,对其他靶向药物或细胞毒化疗药物均有一定的增效作用。除了奥希替尼外,该组合物有可能与更多的靶向药物协同作用,以提高肿瘤患者疗效和生存率。

[0032] 4) 本发明的组合物汉防己甲素、二氢槲皮素均来自中药天然产物,毒性低,活性

高,有助于相关中药的抗肿瘤精准应用,拓展临床的应用范围。

附图说明

- [0033] 图1汉防己甲素或二氢槲皮素单独增强奥希替尼对非H1975细胞的增殖抑制作用。
- [0034] 图2汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强奥希替尼对非H1975细胞的增殖抑制作用。
- [0035] 图3汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物逆转HCC827/OR耐奥希替尼细胞的增殖抑制作用。
- [0036] 图4汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强阿美替尼对H1975细胞的增殖抑制作用。
- [0037] 图5汉防己甲素和槲皮素的组合物增强奥希替尼对H1975细胞的增殖抑制作用。
- [0038] 图6汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强奥希替尼对NCI-H460细胞的增殖抑制作用。
- [0039] 图7汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强奥希替尼在裸鼠体内的抗肿瘤作用。

具体实施方式

- [0040] 实验材料
- [0041] 奥希替尼 (S7297)、汉防己甲素 (S2403)、槲皮素 (S2347) 和二氢槲皮素 (S2366) 购自SELLECK Chemical公司。
- [0042] 阿美替尼 (S8817) 购自SELLECK Chemical公司。
- [0043] EGFR野生型的非小细胞肺癌NCI-H460细胞、非小细胞肺癌H1975细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。
- [0044] 耐奥希替尼的非小细胞肺癌HCC827/OR细胞由西安交通大学石璞玉博士惠赠。
- [0045] RPMI-1640培养基 (C11875500BT)、胎牛血清 (#10099-141)、HBSS平衡盐缓冲液 (#14025-092) 和0.25%胰蛋白酶 (#25200-072) 均购自赛默飞世尔科技有限公司。
- [0046] 培养细胞用的60mm平皿 (430166)、96孔板 (3599) 购自Corning公司。CCK-8试剂 (B34302) 购自美国Bimake公司。
- [0047] 实施例1 汉防己甲素或二氢槲皮素单独增强奥希替尼对非小细胞肺癌H1975细胞的增殖抑制作用
- [0048] 1.1 CCK-8法检测细胞增殖率变化
- [0049] 1) 将处于对数生长期的H1975细胞用0.0625%的胰蛋白酶消化,以 3×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,并置于含5%CO₂的37℃恒温保湿培养箱中培养24h;
- [0050] 2) 加不同浓度的药物处理细胞,每个浓度设置3个复孔;
- [0051] 3) 药物处理72h后,在细胞培养液中直接加入20μL的CCK-8试剂,充分混匀后,将96孔板重新放回到细胞培养箱中,继续孵育1h;
- [0052] 4) 将96孔板置于酶标板振荡器上振荡30s以充分混匀,通过酶标仪测定在450nm波长处测定吸光度值(OD)。
- [0053] 通过下列公式,计算各组的细胞存活率,其中对照组的细胞存活率设定为100%。计算公式如下:细胞存活率(%) = (给药组的OD值 - 空白OD值) / (对照组的OD值 - 空白组OD

值) x 100%。

[0054] 1.2实验结果

[0055] 选取对细胞增殖没有明显抑制作用浓度(1,2 μ M)的汉防己甲素(TET)与奥希替尼(OSI)合用,可以检测到TET具有明显的增强奥希替尼的作用,随着TET浓度增加而奥希替尼的抑制作用增加(图1)。同样的,选取对细胞增殖没有明显抑制作用浓度(50,100 μ M)的二氢槲皮素(DHQ)与奥希替尼合用,具有明显的增效作用,尤其是较高浓度100nM OSI作用组增效最为明显。本实施例结果表明:单独使用TET或DHQ能明显提高奥希替尼的抗肿瘤活性。

[0056] 实施例2 汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强奥希替尼对非小细胞肺癌H1975细胞的增殖抑制作用

[0057] 2.1实验方法

[0058] 使用CCK-8法检测药物作用后的细胞增殖抑制作用,方法与实施例1相同。

[0059] 2.2实验结果

[0060] 从图2的结果可以看到:TET、DHQ单药对细胞的增殖抑制作用并不明显,但合用后可明显增强OSI的作用,并具有浓度相关性。例如:2 μ M TET与100 μ M DHQ组合,可将100nM OSI的细胞存活率由47%降至19.3%,具有明显的协同作用。

[0061] 实施例3 汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物逆转HCC827/OR耐奥希替尼细胞的增殖抑制作用

[0062] 3.1实验方法

[0063] 使用CCK-8法检测药物作用后的细胞增殖抑制作用,方法与实施例1相同。

[0064] 3.2实验结果

[0065] HCC827/OR耐药细胞对奥希替尼具有较强的耐药性,因此,选择的OSI浓度为0.1、1 μ M,组合物(2 μ M TET+100 μ M DHQ)单独作用几乎对细胞存活率没有影响,但能十分明显地增强OSI的增殖抑制作用(图3)。说明该组合物具有逆转奥希替尼耐药性的作用。

[0066] 实施例4 汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强阿美替尼对H1975细胞的增殖抑制作用

[0067] 阿美替尼(ALM)是与奥希替尼作用类似的第三代酪氨酸激酶抑制剂,本实施例观察组合物能否增强ALM的增殖抑制作用。

[0068] 4.1实验方法

[0069] 使用CCK-8法检测药物作用后的细胞增殖抑制作用,方法与实施例1相同。

[0070] 4.2实验结果

[0071] 阿美替尼单独作用H1975细胞的抑制作用明显强于奥希替尼,故选取1、5nM低浓度与组合物合用,均能较明显的降低细胞存活率,且有浓度依赖性(图4)。例如:其中组合浓度(2 μ M TET+100 μ M DHQ)能将1nM ALM的单独作用细胞存活率64%降至21.9%,增效作用十分明显。

[0072] 实施例5 汉防己甲素和槲皮素的组合物增强奥希替尼对H1975细胞的增殖抑制作用

[0073] 槲皮素(QUE)是与二氢槲皮素化学结构、功效相似的化合物,本实验例观察汉防己甲素与槲皮素的组合物能否增强奥希替尼的增殖抑制作用。

[0074] 5.1实验方法

[0075] 使用CCK-8法检测药物作用后的细胞增殖抑制作用,方法与实施例1相同。

[0076] 5.3实验结果

[0077] 槲皮素的单药抑制作用明显强于二氢槲皮素,在本实施例中,选择10、20 μ M与TET组合使用。结果如图5所示,各浓度TET与QUE的组合物均能明加OSI的增殖抑制作用,具有一定的浓度依赖性。尤其是组合浓度(2 μ M TET+20 μ M QUE)可将10nM OSI的单独作用细胞存活率46%,降低至14.4%,增效作用十分明显。

[0078] 实施例6 汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强奥希替尼对NCI-H460细胞的增殖抑制作用

[0079] 奥希替尼主要治疗EGFR突变的非小细胞肺癌,本实施例观察该组合物是否能增强奥希替尼对EGFR野生型的NCI-H460细胞的增殖抑制作用。

[0080] 6.1实验方法

[0081] 使用CCK-8法检测药物作用后的细胞增殖抑制作用,方法与实施例1相同。

[0082] 6.3实验结果

[0083] NCI-H460细胞对OSI不敏感,故选择较高浓度的OSI与组合物合用。结果组合物均表现为十分明显的增效作用,且有浓度依赖性,尤其是组合浓度(4 μ M TET+200 μ M DHQ)可将0.1 μ M OSI的细胞存活率从99%降至26.7%,增效作用十分明显(图6)。

[0084] 实施例7 汉防己甲素和二氢槲皮素的组合物增强奥希替尼在裸鼠体内的抗肿瘤作用

[0085] 为了更好地评价组合物的体内作用结果,我们把H1975细胞接种到裸鼠体内成瘤,组合物的剂量为10mg/kg TET、10mg/kg DHQ,使用相等剂量给药,考察组合物的体内与奥希替尼合用的抑瘤效果。

[0086] 7.1实验材料

[0087] 奥希替尼(S7297)和汉防己甲素(S2403)购自SELLECK chemical公司,二氢槲皮素购自吉林省健维天然生物科技有限公司,H1975细胞的来源与实施例1相同。

[0088] 实验动物:18-22g的雌性BALB/c裸鼠:购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号:110324211103078355。

[0089] 实验器材:手术刀,大镊子、平头剪刀、平头镊子、套管针,1ml注射器,生理盐水,火胶棉,酒精棉球等。

[0090] 实验用药品配制:称取5mg的OSI,溶于100 μ l的乙醇配成50mg/ml的母液,每次取3.2 μ l加1596.8 μ l生理盐水混匀,使用剂量为1mg/kg。取1.6mg TET混悬1.6ml生理盐水,使用剂量为10mg/kg。称取10mg的DHQ,溶于100 μ l的乙醇配成100mg/ml的母液,每次取16 μ l加1584 μ l生理盐水混匀,使用剂量为10mg/kg。

[0091] 7.2实验方法

[0092] 裸鼠喂养在特定的无病菌的环境中,待小鼠适应环境、状态恢复,将体积达到1000mm³的H1975瘤块从小鼠体内取出,用已灭菌的手术刀切成1mm³的小块接种至小鼠右前肢,随机分组,5只为一组继续饲养。

[0093] 当瘤块长到可触摸的程度(大约一周后)对小鼠进行标记,并按体重和瘤块大小平均随机分组,设置溶剂对照组,OSI、TET、DHQ单药组、三药合用组,并以两天一次的频率给药,同时称重,用游标卡尺测量肿瘤的长径短径,以估计肿瘤体积,体积=(长径 \times 短径²) \div

2.给药方式为灌胃,200 μ l/只。

[0094] 给药七次后,处死动物,取瘤块并称重,计算各组的抑瘤率,抑瘤率(%) = (对照组的平均瘤重-给药组的平均瘤重)/对照组的平均瘤重x 100%。

[0095] 7.3实验结果

[0096] 根据肿瘤体积变化的定期测定结果(图7A),1mg/kg OSI、10mg/kg TET和10mg/kg DHQ单独给药,均有一定的抑制作用,其中以OSI的抑制作用最明显。而三药合用组表现为十分明显的体内抑瘤作用,肿瘤体积几乎无明显增加。最后一次给药取得肿瘤重量的结果(图7C、D),与体积变化类似,OSI单药的抑瘤率为52.8%,强于单药TET(33.7%)和单药DHQ(6.1%);而合用组的抑瘤率高达86.6%,增效作用十分明显。在给药期间,我们监测小鼠体重变化,各组别小鼠的体重变化差异不明显(图7B),说明组合物的毒性低。

[0097] 最后需要说明的是,以上实施例仅用于帮助本领域技术人员理解本发明的实质,不用于限定本发明的保护范围。

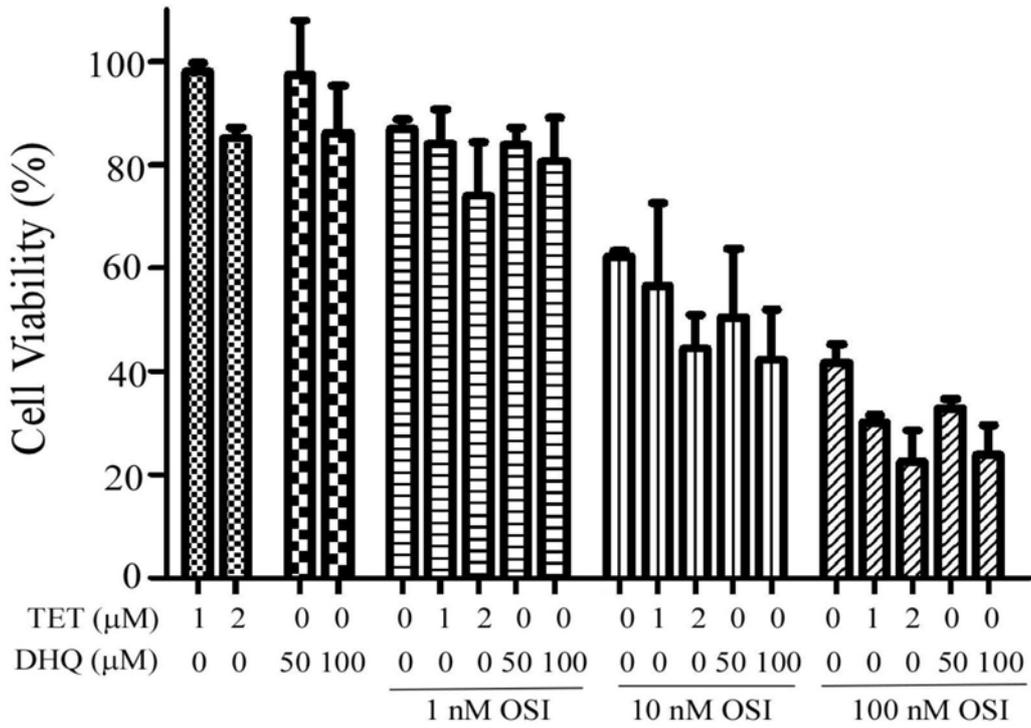


图1

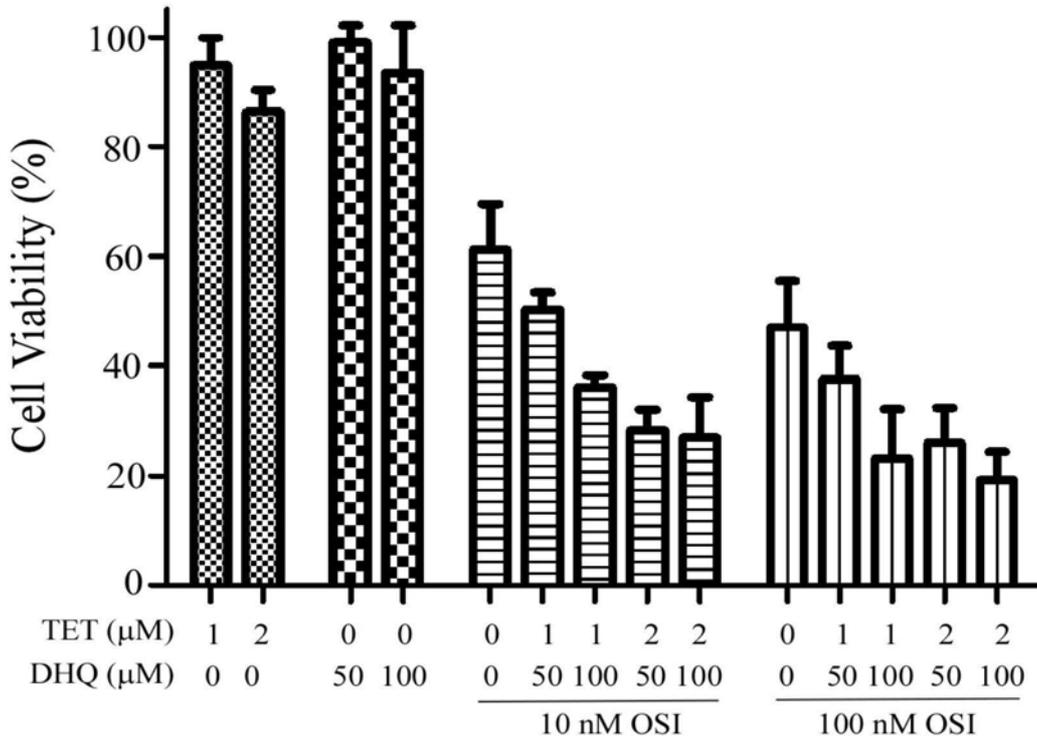


图2

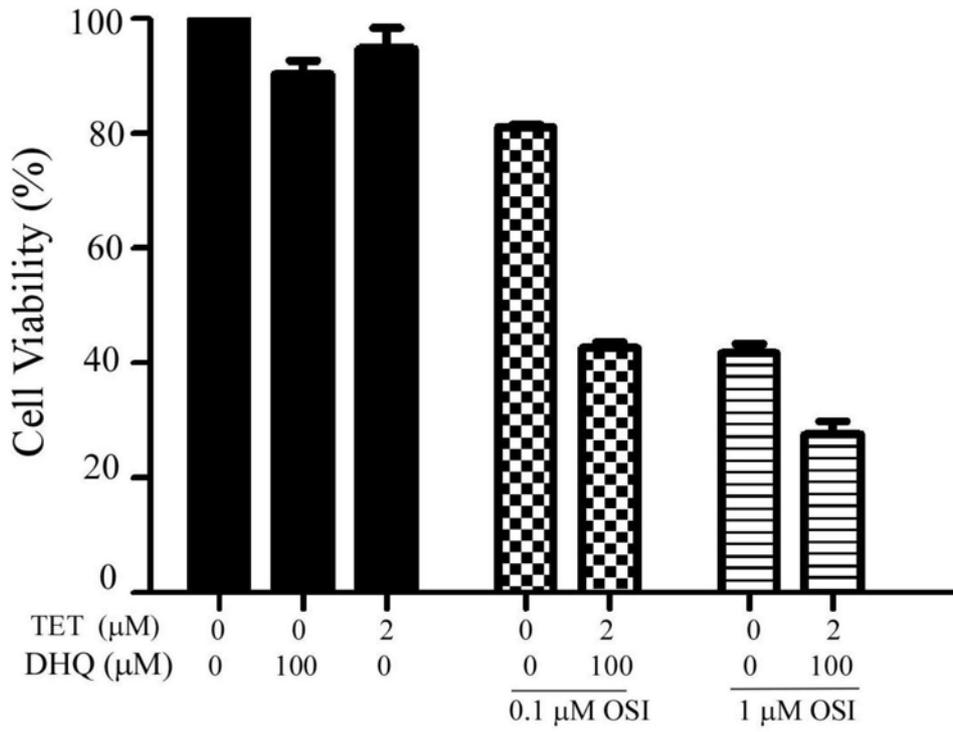


图3

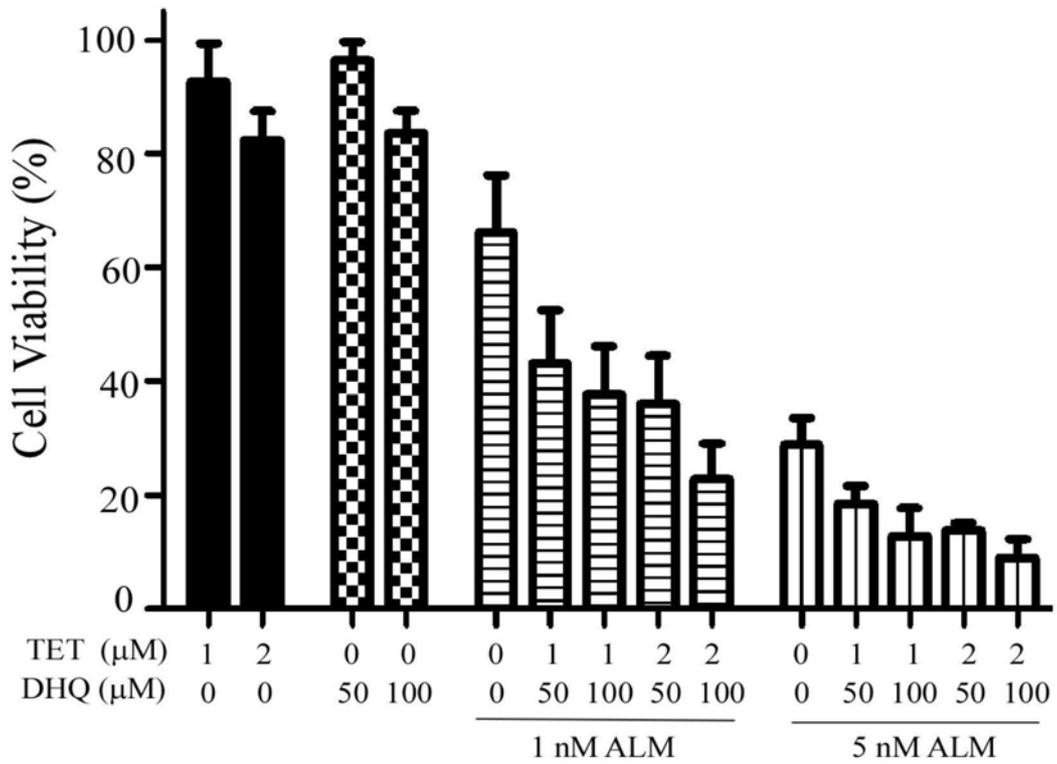


图4

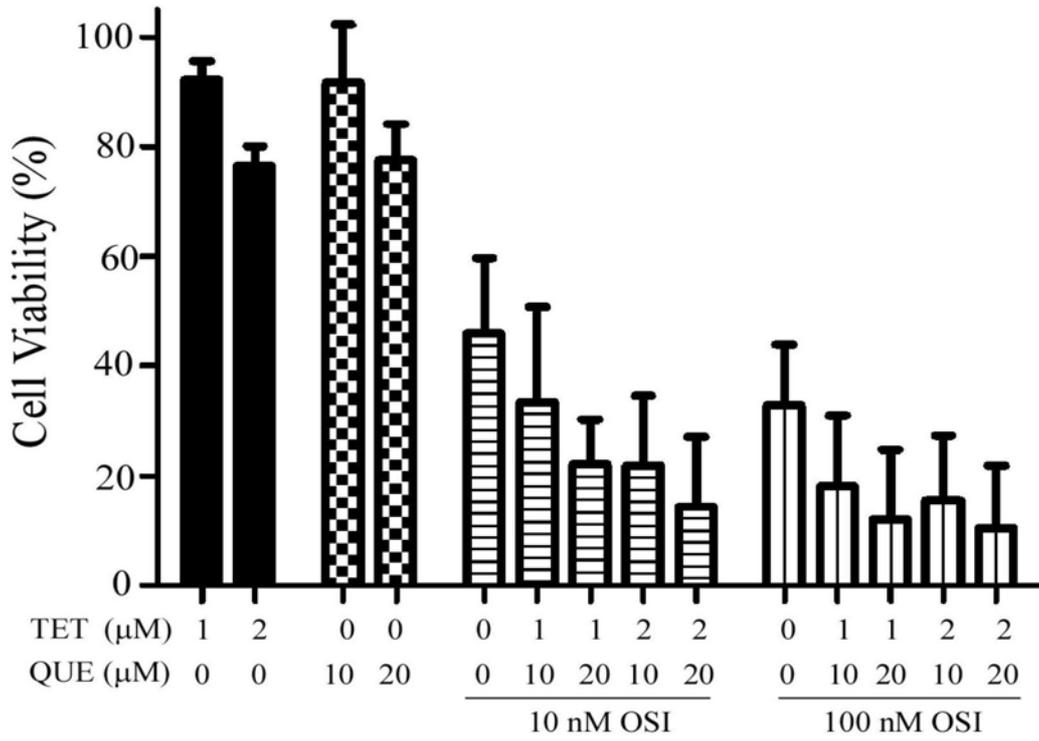


图5

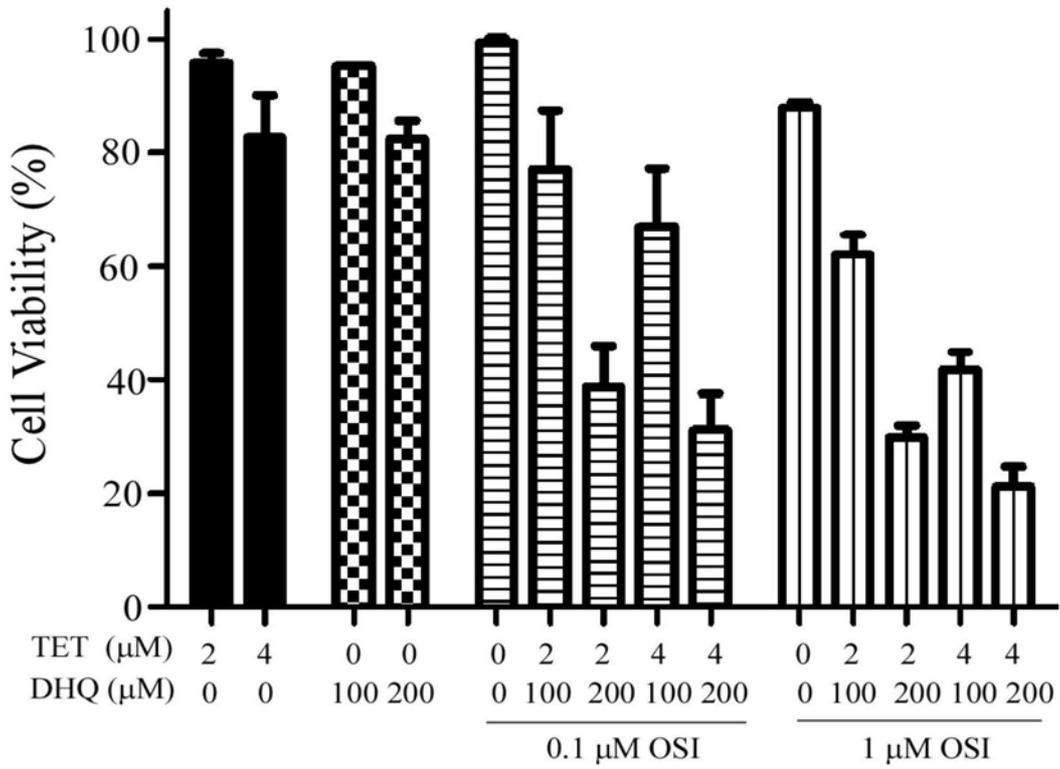
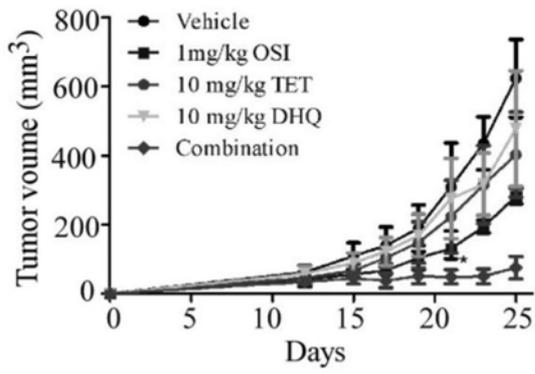
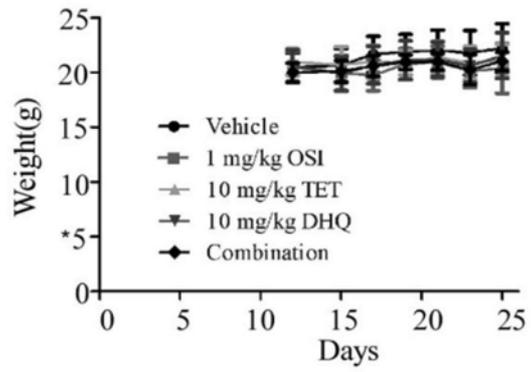


图6

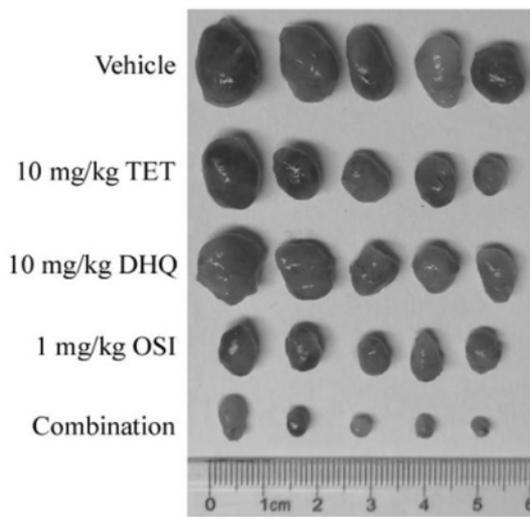
A



B



C



D

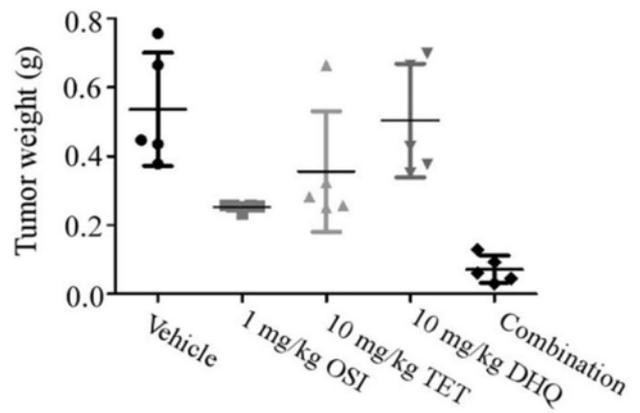


图7