



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 109045007 B

(45)授权公告日 2020.01.07

(21)申请号 201810698342.3

A61K 31/352(2006.01)

(22)申请日 2018.06.29

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 姜晖

申请公布号 CN 109045007 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(73)专利权人 佛山科学技术学院

地址 528000 广东省佛山市南海区狮山镇

仙溪水库西路佛山科学技术学院

(72)发明人 刘连 陈建萍 李雄 刘腾

彭咏波 崔亮 刘武昆 谢国健

(74)专利代理机构 广东广信君达律师事务所

44329

代理人 张燕玲 杨晓松

(51)Int.Cl.

A61K 31/196(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物
及其用途

(57)摘要

本发明属于天然药物领域,公开了一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物及其用途。该复方药物组合物的活性成分是由摩尔比为1:5~1:40苯丁酸氮芥和染料木素组成。两者联合用药具有较强的协同治疗淋巴瘤的用途。

1. 一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物,其特征在于:该复方药物组合物的活性成分是由苯丁酸氮芥和染料木素组成;所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:5~1:40。

2. 根据权利要求1所述的一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物,其特征在于:所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:5~1:20。

3. 根据权利要求1所述的一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物,其特征在于:所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:5~1:10。

4. 根据权利要求1所述的一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物,其特征在于:所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:10。

5. 根据权利要求1所述的一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物,其特征在于:该复方药物组合物还含有药物上可接受的载体。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物在制备抗淋巴瘤药物中的用途。

一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物及其用途

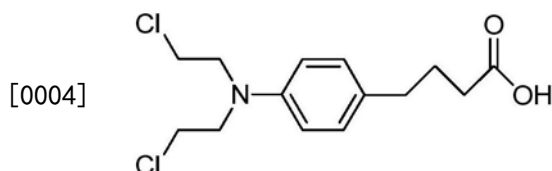
技术领域

[0001] 本发明属于天然药物领域,特别涉及一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物及其用途。

背景技术

[0002] 癌症是严重危害人类健康的一大顽症,现已成为仅次于心血管病的第二大杀手。进入21世纪以来,由于现代工业化的快速进程,环境污染等诸多因素导致淋巴细胞系统免疫被破坏而引起淋巴瘤发病率呈逐年上升的趋势,使我们意识到研发出一种能够用于防治淋巴瘤的药物系统显得非常迫切。

[0003] 氮芥类化合物具有确切的抗癌活性,是使用较早而又重要的一类抗肿瘤药,在肿瘤的治疗中占有重要的地位,尤其是血液系统肿瘤,如慢性淋巴细胞白血病、恶性淋巴瘤和多发性骨髓瘤。苯丁酸氮芥毒性相对较小,是最早作为氮芥类的抗体导向酶前药疗法药物之一,而且近几年有报道苯丁酸氮芥(Chlorambucil, CLB)活性较好。其结构如下:



[0005] 如何将苯丁酸氮芥的优越抗癌疗效与具有靶向抗癌活性的抑制剂联合协同治疗淋巴瘤等恶性肿瘤,是一类值得关注的很有潜力的抗肿瘤复合药物。组合苯丁酸氮芥和临床药物用于恶性肿瘤淋巴瘤的预防和治疗作用尚未见相关文献报道几乎没有。

[0006] 染料木黄酮(Genistein, GEN),是大豆异常黄酮中的一种主要活性因子,是大豆异黄酮产品中最有效的功能成分,具有多种生理功能。染料木黄酮在结构上与哺乳动物的雌激素一雌二醇相似,具有雌激素的活性基团一二酚羟基,所以染料木黄酮具有类雌激素活性等多种生理活性。GEN具有弱雌激素活性、抗氧化活性、抗溶血活性和抗真菌活性,能有效地预防和抑制白血病、骨质疏松、结肠癌、肺癌、胃癌、乳腺癌和前列腺癌、妇女更年期综合征等多种疾病的发生,尤其是对乳腺癌和前列腺癌有积极的预防和治疗作用,这将有助于提高化疗药物的效应。这些为复合CLB和染料木素给药治疗恶性肿瘤淋巴瘤提供了全新的机会。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术中存在的缺点和不足,本发明的首要目的在于提供一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物;该复方药物组合物的活性成分是由苯丁酸氮芥和染料木素组成。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种上述具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物的用途;药理试验证明该复方药物组合物具有协同抗淋巴瘤作用。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

- [0010] 一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物,该复方药物组合物的活性成分是由苯丁酸氮芥和染料木素组成。
- [0011] 优选的,所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:5~1:40。
- [0012] 更加优选的,所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:5~1:20。
- [0013] 更加优选的,所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:5~1:10。
- [0014] 更加优选的,所述苯丁酸氮芥和染料木素的摩尔比为1:10。
- [0015] 该复方药物组合物还含有药物上可接受的载体。
- [0016] 所述复方药物组合物按照常规制备工艺制备得到。
- [0017] 上述的一种具有抗淋巴瘤活性的复方药物组合物在制备抗淋巴瘤药物中的用途。
- [0018] 上述药物可用于包括人在内的哺乳动物的淋巴瘤的治疗。
- [0019] 本发明与现有技术相比具有如下突出的优点及有益效果:
- [0020] 本发明人在对苯丁酸氮芥CLB和染料木素GEN配伍药理活性的研究中发现,将苯丁酸氮芥和染料木素组合给药,特别是当两者摩尔比为1:5-1:40配伍时具有很好抗癌细胞的协同作用;发明人分别对Daudi,Raji和BC-3为模型进行体外MTT筛选,发现其具有很强的抗增殖活性并呈良好的时效与量效关系,结合经典联合给药分析原理(Median-effect Principle)和统计分析,结果表明其具有协同作用,尤其是在 $fa < 0.5$ 时可明显产生协同效应抑制三种癌细胞增殖,这说明苯丁酸氮芥CLB和染料木素GEN复方药物组合物可在低剂量配伍时产生CLB或GEN单药高剂量的生物学效应,从而可以大大降低药物的毒副作用产生,具有良好的临床用药开发前景。同时,等效剂量评价表明,复合药物对正常肝细胞L-02的毒性尚未增加。

附图说明

- [0021] 图1为CLB和GEN及优化配伍组合作用PBMC细胞72小时的安全性评价(细胞凋亡率)。

具体实施方式

- [0022] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。
- [0023] 实施例1:采用Daudi细胞、Raji细胞和BC-3细胞筛选优化苯丁酸氮芥CLB和染料木素GEN复方药物组合物
- [0024] 取对数生长期的细胞,分别接种 3×10^4 个细胞/孔于96孔板上,待生长6小时后,离心弃上清,然后按以下分组给药:肿瘤细胞设不加药组和加药组,其中加药组设CLB和GEN单药组、CLB和GEN联合用药不同摩尔比例组,每组设4-6个复孔,培养24小时,弃上清,加入100 μ l含0.5mg/ml的MTT(四氮唑盐)无血清培养液培养4小时,加入100 μ l DMSO(二甲亚砜),放置于微型振荡仪上振荡10min,再置于酶标仪上570nm处检测OD值。结果按照以下抑制率公式计算每种情况下肿瘤细胞生长的抑制率,具体结果见表1。
- [0025] 抑制率 = $(1 - \text{加药组OD值} / \text{对照组OD值})$
- [0026] 表1为CLB和GEN单独和联合给药作用细胞72小时后不同浓度的 IC_{50} 抑制率。
- [0027] 当CLB和GEN按摩尔比1:5和1:40配伍组合时的抑制情况;当摩尔比为1:10和1:20时,GEN配伍的浓度相应调整增加。从其中我们可以获得随着配伍浓度的增加,其抑制率呈

浓度依赖性。其中我们发现随着配伍浓度的增加,其抑制率呈浓度依赖性。

[0028] 表1 CLB和染料木素单药作用72小时IC₅₀ (μM)

		CLB	GEN	CLB/GEN=1:5	CLB/GEN=1:10	CLB/GEN=1:20	CLB/GEN=1:40
[0029]	IC ₅₀ Daudi	28.8	127.1	13.1	6.5	3.7	1.7
	Raji	26.7	126.2	12.7	6.1	3.5	1.5
	BC-3	25.1	118.1	11.6	5.2	2.9	0.9
	LO2	>200	>200	>200	>200	>200	>200

[0030] 实施例2:CLB和GEN联合给药效应分析

[0031] 以Median-effect Principle(中效原理或Chou-Talalay联合指数法)为评价基础,应用CombiDrug统计软件绘制剂量-效应曲线及不同效应下的合用指数曲线(fa-C曲线),从两药合用的效应与合用指数的关系定量评价两药之间是协同、拮抗或相加关系。具体步骤如下:

[0032] 药物作用效应即抑制率(fa)=1-(试验组平均OD570值/肿瘤细胞空白对照组平均OD570)根据中效方程式 $fa/fu = (D/D_m)^m$,两边取对数 $\log fa/fu = m \log D - m \log D_m$,设 $a = -m \log D_m$, $b = m$, $x = \log D$, $y = \log fa/fu$,代入中效方程式得 $y = bx - a$;其中fa为药物作用效应, $fu = 1 - fa$,D为药物浓度,m为斜率,D_m为中效浓度,即50%效应时的药物浓度。依上述公式,计算出两种抗癌药单用及合用时各自的中效浓度D_m($\log D_m = -a/m$),再计算出单用及两药合用时在各种效应时所需药物浓度($D = D_m (fa/f_u)^{1/m}$),可计算出两药合用时在各种效应时的合用指数($CI = D_1/DX_1 + D_2/DX_2 + \alpha (D_1 D_2) / (DX_1 DX_2)$,D₁、D₂为两药合用时产生X效应时两药各自所需浓度,DX₁、DX₂为两药单独使用时产生X效应时两药各自浓度)。 $\alpha = 0$ 为两种相互排斥性药物, $\alpha = 1$ 为两种相互非排斥性药物。因CLB与染料木素作用机制不同,故本实验中取 $\alpha = 0$ 。当CI<1,两药合用效应为协同;CI=1,两药合用效应相加;CI>1,两药合用效应拮抗。

[0033] 经过软件分析,本发明的复方药物组合物具有良好的协同作用,具体效应见表2,根据Median-effect Principle评价效应的原则,即CI指数<0.1时具有很强的协同作用(Very strong synergism);CI指数为0.1-0.3时为强协同效应(Strong synergism);CI指数为0.3-0.7具有协同效应(Synergism);CI指数为0.7-0.85具有中度协同效应(Moderate synergism);CI指数为0.85-0.90区间时具有弱协同效应(Slight synergism);CI指数为0.90-1.10区间时具有近叠加效应(Nearly additive);CI指数>1.10及以上时具有拮抗效应。表2可见,CLB和GEN配伍具有协同效应;尤其是当两者摩尔比为1:5-1:20配伍时具有良好的协同效应,当两者摩尔比为1:10时协同效应最强。

[0034] 表2 CLB和GEN不同配伍组合作用72小时的联合指数CI比较

摩尔比(CLB/GEN)				
抑制率 (fa)		1:5	1:10	1:20
[0035]	0.40	1.06	0.64	0.69
	0.50	0.94	0.53	0.66
	0.60	0.84	0.46	0.61
	0.75	0.72	0.40	0.56
	0.90	0.63	0.32	0.44
	0.95	0.49	0.26	0.33

[0036] 实施例3:CLB和GEN对外周血单核淋巴细胞的安全性

[0037] 将健康志愿者单核淋巴细胞PBMC进行分离和加药培养后评价CLB和GEN对PBMC细胞的安全性(图1):①抽取健康志愿者的新鲜血液到肝素抗凝管中(无菌);然后用等体积量PBS(或无血清的D-Hank缓冲液)重悬细胞(无菌);②将悬浮细胞加入预先铺好的人淋巴细胞分离液(预热37℃),淋巴分离液与细胞悬液的体积比不低于1:1;③500×g(或2000rpm)水平离心机离心20-30min,室温(20-30℃)慢速;④丢弃上层血浆,把中间白色雾层小心吸出加入到5ml(或1-2倍体积)的PBS(或无血清细胞培养缓冲液)中,200×g或1000rpm离心10min,室温(20-30℃),慢速,弃上清,所得沉淀即为外周血单核淋巴细胞(PBMC);⑤再按上述操作洗涤2次,每次500×g水平离心10min,室温(20-30℃)慢速,收集细胞沉淀;⑥采用活细胞拒染法(如台盼蓝)等检测细胞活力;⑦按加药设计方案放入细胞培养箱孵育72小时(CLB 10μM,GEN 50μM,CLB/GEN=1/10(10μM/100μM)),加药及对照进行流式检测细胞凋亡率。D1-D6为志愿者1-6号的血液样本。

[0038] 实施例4:苯丁酸氮芥CLB和染料木素GEN复方药物组合物按照以下处方制成片剂:

[0039] 处方如下:

[0040]	苯丁酸氮芥	30 克
	染料木素	340 克
	微晶纤维素	72 克
	淀粉	15 克
	羧甲基淀粉钠	20 克
	硬脂酸镁	2.5 克
	10%淀粉浆	5.5 克
		压制 1000 片

[0041] 制备工艺如下:

[0042] 将药物和辅料分别过80目筛,将染料木素与48克微晶纤维素和12克羧甲基淀粉钠充分混合,10%淀粉浆制软材,18目筛制粒,60℃下干燥,得颗粒1。将苯丁酸氮芥与24克微晶纤维素、15克淀粉和8克羧甲基淀粉钠充分混合,10%淀粉浆制软材,18目筛制粒,60℃下干燥,得颗粒2。按等量递增原则,将颗粒1和颗粒2充分混合,16目筛整粒,加入硬脂酸镁,混匀,压片,片重500mg。

[0043] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

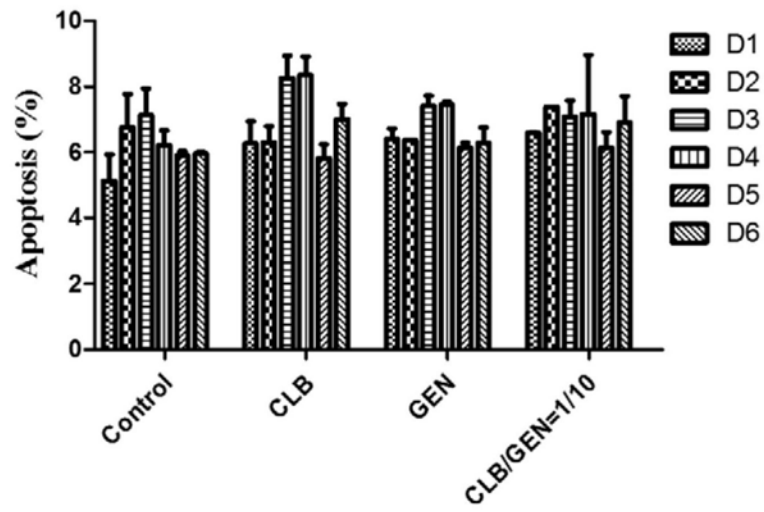


图1