



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115252613 B

(45) 授权公告日 2024.01.12

(21) 申请号 202210952677.X

A61P 1/16 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.09

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115252613 A

(56) 对比文件

CN 111278430 A, 2020.06.12

WO 9212132 A1, 1992.07.23

(43) 申请公布日 2022.11.01

陈家诚等. “肝癌细胞仑伐替尼耐药的基因筛选及其通路研究”. 肝胆胰外科杂志. 2022, 第34卷(第3期), 157-163.

(73) 专利权人 北京清华长庚医院

地址 102218 北京市昌平区立汤路168号

贾成舒等. “PI3K抑制剂与其他药物联用克服耐药性的研究进展”. 中国药科大学学报. 2017, 第48卷卷(第5期), 523-528.

(72) 发明人 王韞芳 柳娟 孙大伟

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

专利代理师 于腾昊

陈华蕾. 肝细胞癌靶向治疗效果相关生物标志物的研究进展. 医学综述. 2022, 第28卷卷(第1期), 63-68.

(51) Int. Cl.

A61K 31/473 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

审查员 雷耀龙

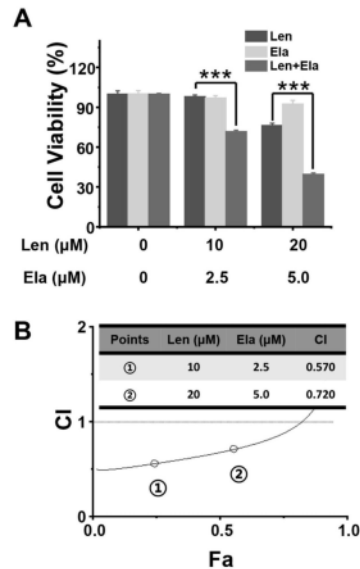
权利要求书1页 说明书9页 附图8页

(54) 发明名称

药物组合物及其在逆转仑伐替尼耐药性中的用途

(57) 摘要

本发明涉及生物医药领域,具体涉及药物组合物及其在逆转仑伐替尼耐药性中的用途。本发明的一个目的在于提供一种药物组合物,其含有依克立达、库潘尼西中的至少之一以及仑伐替尼。通过依克立达、库潘尼西中的至少之一与仑伐替尼的协同作用,明显提高了对肝癌仑伐替尼耐药细胞的抑制作用,同时,能够显著抑制仑伐替尼耐药细胞集落形成,促进仑伐替尼耐药细胞凋亡,并且在肝癌荷瘤小鼠实验中取得了较好的抑瘤效果。



1. 一种药物组合物,其特征在于,含有依克立达以及仑伐替尼,其中,所述依克立达和仑伐替尼的摩尔比为(1-60):4。
2. 权利要求1所述的药物组合物在制备治疗肝癌的药物中的用途。

药物组合物及其在逆转仑伐替尼耐药性中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及药物组合物及其在逆转仑伐替尼耐药性中的用途。

背景技术

[0002] 虽然在全球范围内乙肝患者受到越来越多的重视,但是由于经济条件和区域的不同,肝癌的早期诊断仍不尽完善。尤其是经济落后的农村及偏远山区的患者直到出现临床症状才开始就诊,此时癌症大多已发展到中晚期。而当今对于中晚期肝癌的治疗,一直以来都是人类面临的难题。尽管有多种治疗方法可供选择,但是均难以实现患者的长期生存。每一种新药的问世,都会引起医学界的巨大反响,随之而来的也有许多问题需要去面对。最为关键的就是几乎每一种化疗药物的长期应用都会产生耐药。

[0003] 仑伐替尼(商品名为乐卫玛),活性成份为甲磺酸仑伐替尼,分子式: $C_{21}H_{19}ClN_4O_4 \cdot CH_4O_3S$,分子量:522.96,可以抑制多个酪氨酸激酶受体,包括成纤维细胞生长因子受体(FGFR)1-4、血管内皮生长因子受体(VEGFR)1-4、血小板衍生生长因子受体(PDGR) α 、原癌基因RET以及c-KIT。仑伐替尼通过阻断VEGF受体后可以抑制肿瘤血管生成,阻断FGFR、PDGR α 、RET及c-KIT后可以抑制肿瘤细胞增殖,最终仑伐替尼展现出强效的抗肿瘤作用。主要表现在仑伐替尼可以延长晚期肝癌患者的整体生存期、无进展生存期,同时可以将一部分不可切除肝癌转化为可切除肝癌。目前,仑伐替尼已被FDA批准用于晚期肝癌患者靶向治疗一线用药。但在临床工作中,发现部分肝癌患者对仑伐替尼反应欠佳或治疗后肿瘤进展。此种情况的原因大致可分为两类:一个原因是肿瘤对仑伐替尼天然耐药;另一个原因是肿瘤对仑伐替尼产生适应性调节,使得肿瘤细胞在高浓度仑伐替尼下存活。然而,关于肝癌仑伐替尼耐药机制及耐药后的补救治疗措施仍是亟待解决的科学问题。

发明内容

[0004] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提供一种药物组合物及其在逆转肝癌仑伐替尼耐药性中的用途,通过依克立达、库潘尼西中的至少之一与仑伐替尼的协同作用,明显提高了对肝癌仑伐替尼耐药细胞的抑制作用,同时,能够显著抑制肝癌耐药细胞集落形成,促进肝癌耐药细胞凋亡,并且在肝癌荷瘤小鼠实验中取得了较好的抑瘤效果。

[0005] 本发明第一方面提供一种药物组合物。根据本发明的实施方案,所述药物组合物含有依克立达、库潘尼西中的至少之一以及仑伐替尼。

[0006] 本发明提供的药物组合物,其中含有的依克立达或库潘尼西能够逆转仑伐替尼耐药性,显著抑制仑伐替尼耐药肝癌细胞增殖及集落形成,并促进仑伐替尼耐药肝癌细胞发生凋亡,有效逆转肝癌仑伐替尼耐药。针对仑伐替尼耐药性肝癌细胞,相比单独的依克立达、库潘尼西、仑伐替尼用药,依克立达或库潘尼西与仑伐替尼的联合用药具有更高的抗癌活性。

[0007] 根据本发明的实施方案,所述药物组合物中含有依克立达和仑伐替尼,其中,所述依克立达和仑伐替尼的摩尔比为(1-60):4。由此能够进一步抑制仑伐替尼耐药肝癌细胞增殖及集落形成,促进仑伐替尼耐药肝癌细胞发生凋亡。

[0008] 根据本发明的实施方案,所述药物组合物中含有库潘尼西和仑伐替尼,其中,所述库潘尼西和仑伐替尼的摩尔比为(1-20):10。由此能够进一步抑制仑伐替尼耐药细胞增殖及集落形成,促进耐药细胞发生凋亡。

[0009] 本发明第二方面提供依克立达、库潘尼西中的至少之一在制备仑伐替尼耐药性逆转剂中的用途。

[0010] 本发明第三方面提供依克立达、库潘尼西中的至少之一在逆转仑伐替尼耐药性中的用途。

[0011] 依克立达、库潘尼西中的至少之一不仅能够逆转仑伐替尼耐药性,并且联合用药时,可明显降低用药药物浓度,提高抗肿瘤疗效。

[0012] 本发明第四方面提供依克立达、库潘尼西中的至少之一在抑制仑伐替尼耐药肝癌细胞增殖以及细胞集落形成中的用途。

[0013] 本发明第五方面提供依克立达、库潘尼西中的至少之一在促进仑伐替尼耐药肝癌细胞凋亡中的用途。

[0014] 本发明第六方面提供第一方面所述的药物组合物在制备治疗肝癌的药物中的用途。

[0015] 采用本发明的药物组合物,特别是针对对仑伐替尼产生耐药的组织或个体,联合用药能够显著抑制耐药细胞的增殖以及集落形成形成,促进耐药细胞凋亡。因此,采用本发明的药物组合物能够用于制备治疗肝癌的药物。

[0016] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0017] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0018] 图1显示了Huh7 LR细胞筛选过程及形态变化;A图显示了Huh7 LR细胞经过多轮仑伐替尼诱导,获得Huh7 LR细胞过程中仑伐替尼浓度变化及时间轴;B图显示了Huh7 P 细胞和Huh7 LR细胞的形态差异;

[0019] 图2显示了Huh7 P细胞和Huh7 LR细胞增殖实验 IC_{50} 检测结果;

[0020] 图3显示了Huh7 P细胞和Huh7 LR细胞增殖速度对比以及细胞集落形成实验结果,其中,A图显示了Huh7 P细胞和Huh7 LR细胞增殖速度对比,B图显示了Huh7 P及Huh7 LR细胞经仑伐替尼处理后集落形成结果,C图显示了Image J软件进行集落形成定量比较,*** $P < 0.001$;

[0021] 图4显示了采用流式细胞术检测仑伐替尼对Huh7 P及Huh7 LR细胞凋亡的影响,其中,A图显示了仑伐替尼处理Huh7 P及Huh7 LR细胞,48小时后采用流式细胞术检测的细胞凋亡情况,B图显示了不同组别细胞凋亡统计分析结果,*** $P < 0.001$;

[0022] 图5显示了不同浓度的仑伐替尼(以Len表示)、依克立达(以Ela表示)以及二者联

用对Huh7 LR细胞增殖的影响,其中,A图展示了MTT检测不同浓度的两种药物单独以及组合对耐药细胞增殖活性的影响,B图展示了基于Chou-Talalay药物联合作用的定量方法绘制的Plot图及CI值,*** $P < 0.001$;

[0023] 图6显示了仑伐替尼(10 μM)、依克立达(2.5 μM)单独使用以及二者联用对Huh7 LR细胞集落形成的影响,A图显示了不同组别的细胞集落,B图显示了不同组别处理后,细胞集落的统计分析结果,*** $P < 0.001$;

[0024] 图7显示了仑伐替尼(20 μM)、依克立达(10 μM)单独使用以及二者联用对Huh7 LR细胞凋亡的影响,其中,A图展示了经不同药物处理72小时后Huh7 LR细胞形态;B图展示了采用流式细胞术检测不同药物处理组细胞凋亡情况,早期凋亡细胞位于图中右下象限,晚期凋亡细胞位于图中右上象限;C图展示了凋亡率统计学分析结果,*** $P < 0.001$;

[0025] 图8显示了靶向EGFR/PI3K通路的药物作用靶点示意图,其中,吉非替尼(Gefitinib) 靶向EGFR,库潘尼西(Copantinib) 靶向PI3K。

[0026] 图9显示了不同浓度的仑伐替尼、吉非替尼、库潘尼西单独使用以及仑伐替尼+吉非替尼联用、仑伐替尼+库潘尼西联用,对Huh7 LR细胞增殖的影响,其中,A图展示了MTT 检测不同药物组合及浓度梯度下对耐药细胞Huh7 LR细胞增殖活性的影响,柱状图中的五个柱子从左至右依次为仑伐替尼、吉非替尼、仑伐替尼+吉非替尼、库潘尼西、仑伐替尼+ 库潘尼西组;B图展示了基于Chou-Talalay药物联合作用的定量方法绘制的Plot图及CI值, *** $P < 0.001$;

[0027] 图10显示了仑伐替尼、吉非替尼、库潘尼西单独使用以及仑伐替尼+吉非替尼联用、仑伐替尼+库潘尼西联用,对Huh7 LR细胞凋亡的影响,其中,A图展示了经不同药物处理72小时后Huh7 LR细胞形态;B图展示了采用流式细胞术检测不同药物处理组细胞凋亡比例,早期凋亡细胞位于图中右下象限,晚期凋亡细胞位于图中右上象限;C图展示了凋亡率统计学分析结果,*** $P < 0.001$;

[0028] 图11显示了溶剂组、吉非替尼单药组、依克立达单药组、仑伐替尼单药组、仑伐替尼 +吉非替尼组、仑伐替尼+依克立达组对仑伐替尼耐药BALB/C小鼠的治疗效果评价,其中, A图展示了不同用药组肿瘤体积变化,B图展示了小鼠体重随时间变化情况,*** $P < 0.001$,图中,Veh:溶剂组(5%羧甲基纤维素钠);Gef:吉非替尼组(80mg/kg/d);Ela:依克立达组(80mg/kg/d);Len:仑伐替尼组(5mg/kg/d);Len+Gef:仑伐替尼+吉非替尼组(仑伐替尼5mg/kg/d,吉非替尼80mg/kg/d);Len+Ela:仑伐替尼+依克立达组(仑伐替尼5 mg/kg/d,依克立达80mg/kg/d);

[0029] 图12显示了显示了溶剂组、吉非替尼单药组、依克立达单药组、仑伐替尼单药组、仑伐替尼+吉非替尼组、仑伐替尼+依克立达组对仑伐替尼耐药BALB/C小鼠的治疗效果照片及肿瘤重量检测,A图展示了不同用药组肿瘤的大小和形态,B图展示了肿瘤重量,*** $P < 0.001$ 。

具体实施方式

[0030] 下面参考具体实施例,对本发明进行描述,需要说明的是,这些实施例仅仅是描述性的,而不以任何方式限制本发明。

[0031] 实施例的实验中所用到的试剂,如无特殊说明,均可通过市售获得。

[0032] 此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本公开的描述中,“多个”的含义是至少两个,例如两个,三个等,除非另有明确具体的限定。

[0033] 根据本发明一个具体的实施方案,本发明提供一种药物组合物,含有依克立达、库潘尼西中的至少之一以及仑伐替尼。相比药物的单独使用,联合用药显著抑制肝癌肿瘤细胞的增殖,逆转肿瘤耐药性。

[0034] 依克立达(Elacridar):是MDR1和BCRP双泵的抑制剂。目前已有体外、临床前及临床研究表明联合应用依克立达可以逆转MDR1和/或BCRP介导的化疗药物耐药,同时依克立达可以通过抑制药物外排泵增加抗肿瘤药物的血药浓度。

[0035] 吉非替尼(Gefitinib):选择性抑制EGFR受体,该药物首先被应用于其它药物治疗失败的非小细胞肺癌患者。此后,作为单药或与其它药物联合应用也用于其它肿瘤的治疗。关于其在肝癌中的应用,吉非替尼可以抑制肝癌细胞生长、促进其凋亡以及导致细胞周期停滞,同时吉非替尼在大鼠模型上可以表现出抑制肝癌结节形成的作用。

[0036] 库潘尼西(Copanlisib):是PI3K的抑制剂,最先被用于复发性滤泡型淋巴瘤,此后该药物也被用于治疗其它晚期及复发性实体瘤。关于其在肝癌中的作用,体外研究表明库潘尼西与索拉非尼联合应用可以促进肝癌细胞凋亡。

[0037] 吉非替尼、库潘尼西均为FDA批准药物。

[0038] 根据本发明一个具体的实施方案,本发明提供一种含有依克立达和仑伐替尼的药物组合物。

[0039] 根据本发明一个具体的实施方案,本发明提供一种含有库潘尼西和仑伐替尼的药物组合物。

[0040] 根据本发明一个具体的实施方案,所述药物组合物中除了包含作为活性成分的依克立达、库潘尼西中的至少之一以及仑伐替尼之外,也可以含有其他的本领域已知的药物中能够加入的辅料。

[0041] 根据本发明一个具体的实施方案,本发明所述的药物组合物包括将依克立达、库潘尼西中的至少之一与仑伐替尼混合形成一种混合药物,也包括依克立达、库潘尼西中的至少之一与仑伐替尼独立形成两种药物,只是在施用的时候,进行联合用药。

[0042] 根据本发明一个具体的实施方案,所述药物组合物中含有依克立达和仑伐替尼,其中,所述依克立达和仑伐替尼的摩尔比为(1-60):4。

[0043] 根据本发明一个具体的实施方案,在药物组合物中,例如依克立达浓度为 $2.5\mu\text{M}$,仑伐替尼为 $10\mu\text{M}$,或者依克立达浓度为 $10\mu\text{M}$,仑伐替尼为 $20\mu\text{M}$,或者依克立达浓度为 $5\mu\text{M}$,仑伐替尼为 $20\mu\text{M}$ 。在进行药物施用,例如,依克立达施用剂量为 80mg/kg/d ,仑伐替尼施用剂量为 5mg/kg/d 。

[0044] 根据本发明一个具体的实施方案,所述药物组合物中含有库潘尼西和仑伐替尼,其中,所述库潘尼西和仑伐替尼的摩尔比为(1-20):10。

[0045] 根据本发明一个具体的实施方案,在药物组合物中,例如库潘尼西浓度为 $3\mu\text{M}$,仑伐替尼为 $30\mu\text{M}$,或者库潘尼西浓度为 $12.5\mu\text{M}$,仑伐替尼为 $10\mu\text{M}$,或者库潘尼西浓度为 $25\mu\text{M}$,仑伐替尼为 $20\mu\text{M}$ 。

[0046] 在本发明中,“Huh7 LR细胞”是指Huh7 Lenvatinib resistance (Huh7 LR),即仑伐替尼耐药细胞。

[0047] 下面将结合实施例对本公开的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本公开,而不应视为限定本公开的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0048] 实施例1制备仑伐替尼耐药肝癌细胞系Huh7 LR

[0049] 1、诱导获取仑伐替尼耐药的Huh7 LR肝癌细胞系

[0050] 经过10个月的逐渐增加仑伐替尼药物剂量的诱导,Huh7仑伐替尼耐药 (Huh7 lenvatinib resistance,Huh7 LR)细胞可以耐受仑伐替尼20 μ M浓度,随后Huh7 LR细胞维持在浓度为 20 μ M的仑伐替尼含药培养基中。Huh7 LR细胞筛选过程及药物剂量过程如图1中A图所示。同原始细胞 (Huh7 P)相比,Huh7 LR细胞形态发生变化,表现为外形变小,细胞呈聚集性生长,细胞形态如图1中B图所示。

[0051] 2、检测Huh7 LR细胞的抗药性

[0052] (1)通过细胞增殖实验 (MTT)检测Huh7 LR细胞的耐药性,96小时MTT检测结果显示,Huh7 P细胞的仑伐替尼IC₅₀值为5.34 \pm 1.07 μ M,而Huh7 LR细胞的仑伐替尼IC₅₀值大于20 μ M。两者IC₅₀差别显著 (P<0.05) (图2)。药物半抑制浓度 (Half Maximal Inhibitory Concentration,IC₅₀)是指使细胞活性降至50%的药物浓度。

[0053] 细胞增殖实验过程如下:

[0054] 取对数生长期的细胞,应用胰蛋白酶进行消化,终止消化后离心收集细胞,制备成单细胞悬液。应用细胞计数板计数后,将细胞密度调整成4 \times 10⁴个/ml。将上述细胞悬液制备好后混匀,96孔板中每孔加入100 μ l,即4000个细胞/孔,放置在细胞培养箱 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中培养过夜。此过程中,96孔板边缘孔不加细胞,加入PBS,减少液体蒸发对于细胞增殖的影响。次日,弃上述培养基,分别加入不同浓度梯度的药物后,继续培养96小时。96小时后,弃掉上述培养基后,加入MTT工作液 (工作终浓度为5mg/ml),继续孵育4小时。4小时后弃上述液体,每孔加入100 μ l DMSO,37 $^{\circ}$ C孵育10分钟后,使底部结晶物质充分溶解后,在多功能微孔板检测仪上进行检测,检测波长为490nm测量OD值。整个过程中,空白对照组 (不加入细胞组)进行同样操作,每个梯度重复孔 \geq 3个。计算细胞活性 (%) = (实验组OD值 - 空白对照组OD值) / (不加药组OD值 - 空白对照组OD值)。

[0055] (2)评估Huh7 LR细胞的集落形成能力

[0056] 应用实时细胞活性计数仪 (RTCA)检测耐药细胞的实时增殖速度,结果表明Huh7 LR细胞在仑伐替尼含药培养基 (20 μ M)中的增殖速度较Huh7 P细胞增殖速度快 (图3中A图)。此外,应用集落形成实验比较原始细胞与耐药细胞的集落形成能力。结果表明,接种同样数量细胞、同样培养条件下,在含有仑伐替尼药物培养基 (20 μ M)中,Huh7 LR细胞的集落形成数量较Huh7细胞明显多 (图3中B、C图),差异具有统计学意义 (P<0.001)。集落形成实验结果表明Huh7 LR细胞集落形成能力较Huh7 P细胞明显更强。

[0057] 集落形成实验方法如下:

[0058] 取对数生长期细胞,应用胰蛋白酶消化,离心后将细胞重悬制成细胞悬液。对比耐药细胞与原始细胞集落形成能力时,应用6孔板,每孔接种1000个细胞,加入含有仑伐替尼

药物培养基(仑伐替尼浓度为20 μ M)。比较不同药物组合处理后细胞集落形成能力时,应用6孔板,每孔加入2000个细胞,放置在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)中培养过夜;次日弃培养基后,更换成含有不同浓度药物的培养基,继续培养72小时;72小时后至2周时间段内,更换为不含药培养基,间隔周期3天/次。上述两种处理至2周时,肉眼可见集落形成,弃培养基、PBS清洗2次后,应用甲醇进行固定20分钟,0.1%结晶紫染色10分钟,相机进行拍照后,应用Image J软件进行集落计数。

[0059] (3)流式细胞术评估Huh7 LR细胞的抗凋亡能力

[0060] 应用流式细胞术进行细胞抗凋亡能力检测。应用仑伐替尼(20 μ M)分别处理Huh7细胞及Huh7 LR细胞。48小时后Huh7细胞的凋亡率为11.74%,而Huh7 LR细胞的凋亡率为3.27%;两者进行统计学分析,差别有意义($P < 0.001$) (图4中A和B图)。

[0061] 流式检测细胞凋亡实验如下:

[0062] 取处于对数生长期的细胞,弃培养基、PBS清洗后,应用胰蛋白酶消化,终止并制备细胞悬液后计数;于6孔板中接种细胞,细胞密度为200,000个/孔,培养过夜。次日,将培养基更换为含有不同药物浓度的培养基,继续孵育72小时。后续步骤如下:

[0063] ①培养结束后,应用PBS清洗细胞,用不含有EDTA胰酶消化收集细胞于流式样品管中,1500g/min,5分钟;应用PBS清洗一次,继续重复离心一次;

[0064] ②弃上清,加入195 μ l Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;

[0065] ③加入5 μ l Annexin V FITC,轻轻混匀;

[0066] ④加入10 μ l碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀;

[0067] ⑤室温避光孵育15分钟,进行流式检测,每个样本至少分析50,000个细胞。

[0068] 实施例2依克立达与仑伐替尼协同抑制Huh7 LR细胞增殖

[0069] 1、细胞增殖实验方法

[0070] 取对数生长期的Huh7 LR细胞,应用胰蛋白酶进行消化,终止消化后离心收集细胞,制备成单细胞悬液。应用细胞计数板计数后,将细胞密度调整成 4×10^4 个/ml。将上述细胞悬液制备好后混匀,96孔板中每孔加入100 μ l,即4000个细胞/孔,放置在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)中培养过夜。此过程中,96孔板边缘孔不加细胞,加入PBS,减少液体蒸发对于细胞增殖的影响。次日,弃上述培养基,分别加入不同浓度梯度的药物后,继续培养96小时。96小时后,弃掉上述培养基后,加入MTT工作液(工作终浓度为5mg/ml),继续孵育4小时。4小时后弃上述液体,每孔加入100 μ l DMSO,37 $^{\circ}$ C孵育10分钟后,使底部结晶物质充分溶解后,在多功能微孔板检测仪上进行检测,检测波长为490nm测量OD值。整个过程中,空白对照组(不加入细胞组)进行同样操作,每个梯度重复孔 ≥ 3 个。计算细胞活性(%) = (实验组OD值 - 空白对照组OD值) / (不加药组OD值 - 空白对照组OD值)。

[0071] 2、实验分组设计和结果

[0072] 应用MTT法对不同处理组细胞增殖活性进行检测,如图5,结果显示:①单独应用仑伐替尼(10 μ M,以Len表示)或单独应用依克立达(2.5 μ M,以E1a表示)时细胞活性几乎不受影响,而当仑伐替尼(10 μ M)和依克立达(2.5 μ M)联用时细胞活性降至71.70%;②单独应用仑伐替尼(20 μ M)时细胞活性为76.23%,单独应用依克立达(5 μ M)时细胞活性为92.49%,而当仑伐替尼(20 μ M)和依克立达(5 μ M)联用时细胞活性降至39.67% (图5中A图)。基于以上两组浓度梯度下细胞增殖率,进一步应用Chou-Talalay药物联合作用的定量方法,计算联合

指数(CI):仑伐替尼10 μ M与依克立达2.5 μ M联用组,CI=0.57;仑伐替尼20 μ M与依克立达5.0 μ M联用组,CI=0.720。鉴于上述CI值均小于1,表明仑伐替尼与依克立达可以协同抑制Huh7 LR细胞增殖(图5中B图)。

[0073] 实施例3依克立达与仑伐替尼联用对Huh7 LR集落形成能力的影响

[0074] 1、集落形成实验方法

[0075] 取对数生长期Huh7 LR细胞,应用胰蛋白酶消化,离心后将细胞重悬制成细胞悬液。对比耐药细胞与原始细胞集落形成能力时,应用6孔板,每孔接种1000个细胞,加入含有仑伐替尼药物培养基(仑伐替尼浓度为20 μ M)。比较不同药物组合处理后细胞集落形成能力时,应用6孔板,每孔加入2000个细胞,放置在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)中培养过夜;次日弃培养基后,更换成含有不同浓度药物的培养基,继续培养72小时;72小时后至2周时间段内,更换为不含药培养基,间隔周期3天/次。上述两种处理至2周时,肉眼可见集落形成,弃培养基、PBS清洗2次后,应用甲醇进行固定20分钟,0.1%结晶紫染色10分钟,相机进行拍照后,应用Image J软件进行集落计数。

[0076] 2、实验分组及结果

[0077] 肿瘤干样细胞具有干细胞的异常分化及自我更新潜能,与多种肿瘤的化疗药物耐药相关。进行集落形成实验评估药物对肿瘤细胞干性增殖的影响,分为4组:对照组、仑伐替尼组(10 μ M)、依克立达组(2.5 μ M)、仑伐替尼(10 μ M)+依克立达(2.5 μ M)组。研究结果如图6所示,表明仑伐替尼单药可以抑制Huh7 LR细胞集落形成,仑伐替尼联合依克立达可以进一步抑制Huh7 LR细胞集落形成(图6中A图);进一步进行统计学分析,差别有显著意义(P<0.001)(图6中B图)。

[0078] 实施例4依克立达与仑伐替尼联用对Huh7 LR细胞凋亡的影响

[0079] 1、流式检测细胞凋亡实验设计

[0080] 取处于对数生长期的Huh7 LR细胞,弃培养基、PBS清洗后,应用胰蛋白酶消化,终止并制备细胞悬液后计数;于6孔板中接种细胞,细胞密度为200,000个/孔,培养过夜。次日,将培养基更换为含有不同药物浓度的培养基,继续孵育72小时。后续步骤如下:

[0081] ①培养结束后,应用PBS清洗细胞,用不含有EDTA胰酶消化收集细胞于流式样品管中,1500g/min,5分钟;应用PBS清洗一次,继续重复离心一次;

[0082] ②弃上清,加入195 μ l Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;

[0083] ③加入5 μ l Annexin V FITC,轻轻混匀;

[0084] ④加入10 μ l碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀;

[0085] ⑤室温避光孵育15分钟,进行流式检测,每个样本至少分析50,000个细胞。

[0086] 2、实验分组和结果

[0087] 应用不同的药物处理Huh7 LR细胞(作用时间为72小时):对照组、仑伐替尼组(20 μ M)、依克立达组(10 μ M)、仑伐替尼(20 μ M)+依克立达(10 μ M)组(图7中A图)。然后,应用Annexin V-FITC/PI染色法,通过流式细胞术检测不同处理组细胞凋亡比例(早期凋亡+晚期凋亡)(图7中B图),进一步进行统计学分析(图7中C图)。结果表明:同单独用药相比,依克立达与仑伐替尼联用,可显著促进Huh7 LR细胞凋亡,差异具有统计学意义(P<0.001)。

[0088] 实施例5EGFR/PI3K抑制剂与仑伐替尼协同抑制Huh7LR细胞增殖

[0089] EGFR信号通路及其下游PI3K/AKT通路激活在介导恶性肿瘤耐药中发挥重要作用。

而仑伐替尼作用于细胞膜表面的酪氨酸激酶受体包括VEGFR、PDGFR、FGFR、c-KIT以及RET，但却不包括EGFR。基于以上情况，发明人推测EGFR通路激活可能参与介导仑伐替尼耐药。此处，选用FDA批准的药物吉非替尼（靶向EGFR）和库潘尼西（靶向PI3K）进行后续研究，图8展示了靶向EGFR/PI3K通路的药物作用靶点示意图。

[0090] 采用与实施例2中相同的细胞增殖实验方法，应用MTT进行细胞增殖活性检测。如图9中A图所示，结果表明：①单独应用仑伐替尼10 μ M（以Len表示）、20 μ M时细胞活性分别为98.01%、76.30%，单独应用吉非替尼（以Gef表示）5 μ M、10 μ M时细胞活性分别为86.93%、77.23%，单独应用库潘尼西（以Cop表示）12.5nM、25nM时细胞活性分别为64.77%、58.20%；②仑伐替尼（10 μ M）+吉非替尼（5 μ M）、仑伐替尼（20 μ M）+吉非替尼（10 μ M）时细胞活性分别为60.04%、48.20%，仑伐替尼（10 μ M）+库潘尼西（12.5nM）、仑伐替尼（20 μ M）+吉非替尼（25nM）时细胞活性分别为46.74%、31.8%。应用Chou-Talalay 药物联合作用的定量方法，计算联合指数（CI）：仑伐替尼10 μ M与吉非替尼5.0 μ M联合应用组，CI=0.611；仑伐替尼20 μ M与吉非替尼10.0 μ M联合应用组，CI=0.967；仑伐替尼10 μ M与库潘尼西12.5nM联合应用组，CI=0.542；仑伐替尼20 μ M与库潘尼西25.0nM 联合应用组，CI=0.700。鉴于上述CI值均小于1，表明仑伐替尼与吉非替尼（或库潘尼西）在抑制Huh7 LR细胞增殖上起协同作用（图9中B图）。

[0091] 实施例6EGFR/PI3K抑制剂联合仑伐替尼促进Huh7 LR细胞凋亡

[0092] 为进一步评估EGFR/PI3K通路抑制剂与仑伐替尼联用对细胞凋亡的影响，进一步应用流式细胞术对细胞凋亡情况进行检测。采用与实施例4中相同的流式检测细胞凋亡实验设计。

[0093] 首先，应用不同的药物处理Huh7 LR细胞（作用时间为72小时）：对照组，仑伐替尼组（30 μ M），吉非替尼组（30 μ M），库潘尼西组（3 μ M），仑伐替尼（30 μ M）+吉非替尼（30 μ M）组，仑伐替尼（30 μ M）+库潘尼西（3 μ M）组（图10中A图）。然后，应用 Annexin V-FITC/PI染色法，应用流式细胞术检测不同处理组细胞凋亡比例（早期凋亡+晚期凋亡）（图10中B图），进一步进行统计学分析（图10中C图）。结果表明：同仑伐替尼单药相比，“仑伐替尼+吉非替尼”或“仑伐替尼+库潘尼西”联用组，均可显著促进Huh7 LR 细胞凋亡（P<0.001）。

[0094] 实施例7抑制细胞凋亡

[0095] 1、BALB/c裸鼠荷瘤实验

[0096] 应用BALB/c裸鼠进行仑伐替尼耐药模型构建。步骤及流程如下：

[0097] ①小鼠右背侧面皮下接种1 \times 10⁷个Huh7仑伐替尼耐药细胞（混悬细胞液及Matrigel 胶按照1:1混合，共200 μ l）；

[0098] ②当肿瘤直径约6mm时，将动物随机分为6组：溶剂组（5%羧甲基纤维素钠溶液）、吉非替尼组（80mg/kg/d）、依克立达组（80mg/kg/d）、仑伐替尼组（5mg/kg/d）、仑伐替尼（5mg/kg/d）+吉非替尼（80mg/kg/d）组、仑伐替尼（5mg/kg/d）+依克立达（80mg/kg/d）组，进行灌胃给药（5次/周）。其中依克立达联合用药组中依克立达在仑伐替尼2小时前给药；

[0099] ③此过程中，每2-3天测量一次肿瘤体积及小鼠体重，肿瘤体积（mm³）=0.5 \times 肿瘤最长经线 \times 肿瘤最短经线²。

[0100] 2、体内联合用药抑制肿瘤生长

[0101] 应用Huh7仑伐替尼耐药细胞在BALB/C裸鼠上建立荷瘤模型，以期评估联合用药的

体内抗肿瘤作用。皮下接种耐药细胞1周后,肿瘤直径接近6mm,随机分成如上6组,溶剂组(图11中以Veh表示)、吉非替尼单药组、依克立达单药组、仑伐替尼单药组、仑伐替尼+吉非替尼组、仑伐替尼+依克立达组,按照上述记录的方法开始给药。监测肿瘤体积及小鼠体重,给药2周后将动物进行安乐死,获取肿瘤,拍照并称重。如图11中A图显示:同溶剂组相比,单独应用吉非替尼或依克立达并不能抑制肿瘤生长,但是仑伐替尼单独用药组及仑伐替尼联合用药组可显著抑制肿瘤生长。同仑伐替尼单独用药组相比,仑伐替尼联合用药组(仑伐替尼+吉非替尼,仑伐替尼+依克立达)抑制肿瘤生长效果更显著,其中仑伐替尼+依克立达组抑制肿瘤生长效果最显著(图11中A图)。同时,用药过程中,不同组小鼠的体重波动不大,表明联合用药并未产生明显副作用(图11中B图)。

[0102] 观察不同药物处理组肿瘤外观并称量肿瘤重量,如图12中A和B图所示。发现:①溶剂组、吉非替尼单药组、依克立达单药组的肿瘤颜色为红色富血供的肿瘤,而仑伐替尼单药组、仑伐替尼+吉非替尼组、仑伐替尼+依克立达组的肿瘤为(淡粉色-白色)乏血供肿瘤(图12中A图);②进一步进行肿瘤称重,肿瘤重量与其肿瘤体积呈一致趋势(即应用溶剂组、吉非替尼单药组及依克立达单药组肿瘤重量最大,仑伐替尼单药组肿瘤重量居中,仑伐替尼+吉非替尼组肿瘤重量较小,而仑伐替尼+依克立达组肿瘤重量最小)(图12中B图)。

[0103] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、“一些实施方案”或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0104] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变形。

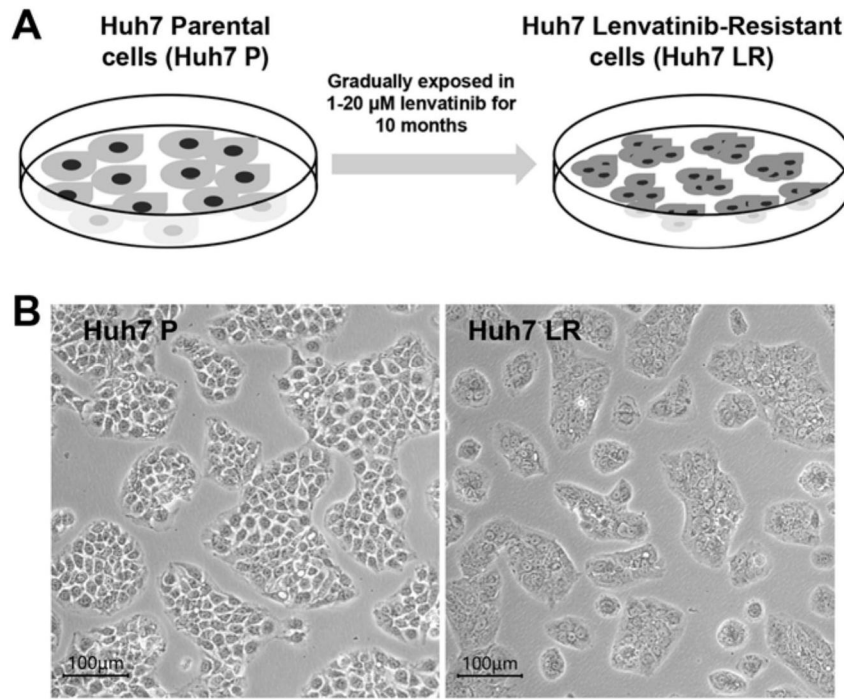


图1

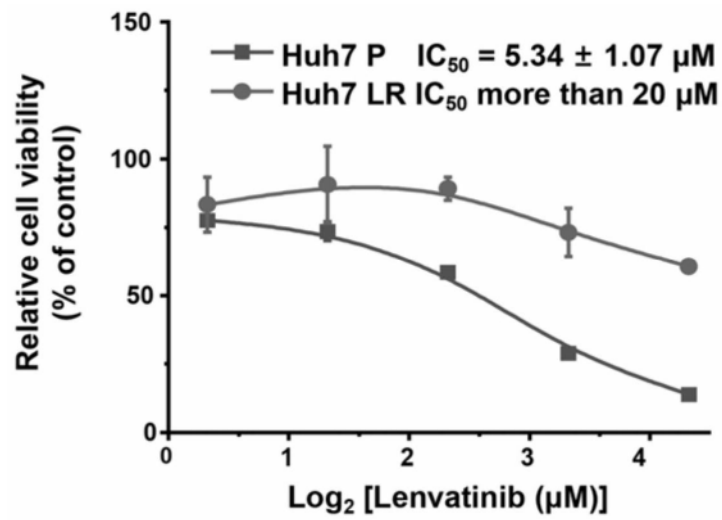


图2

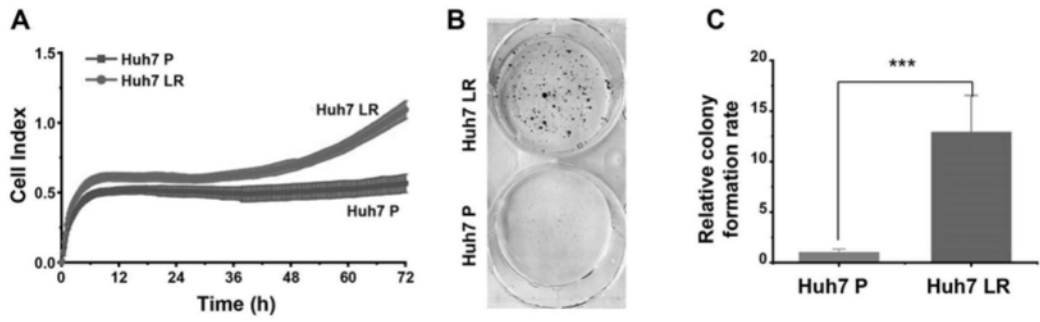


图3

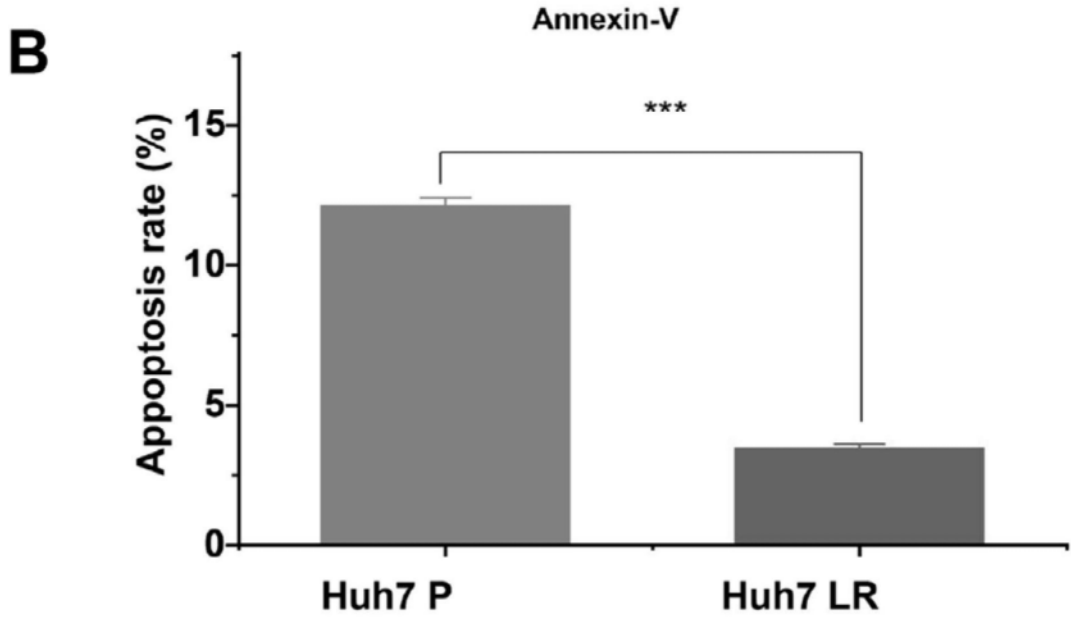
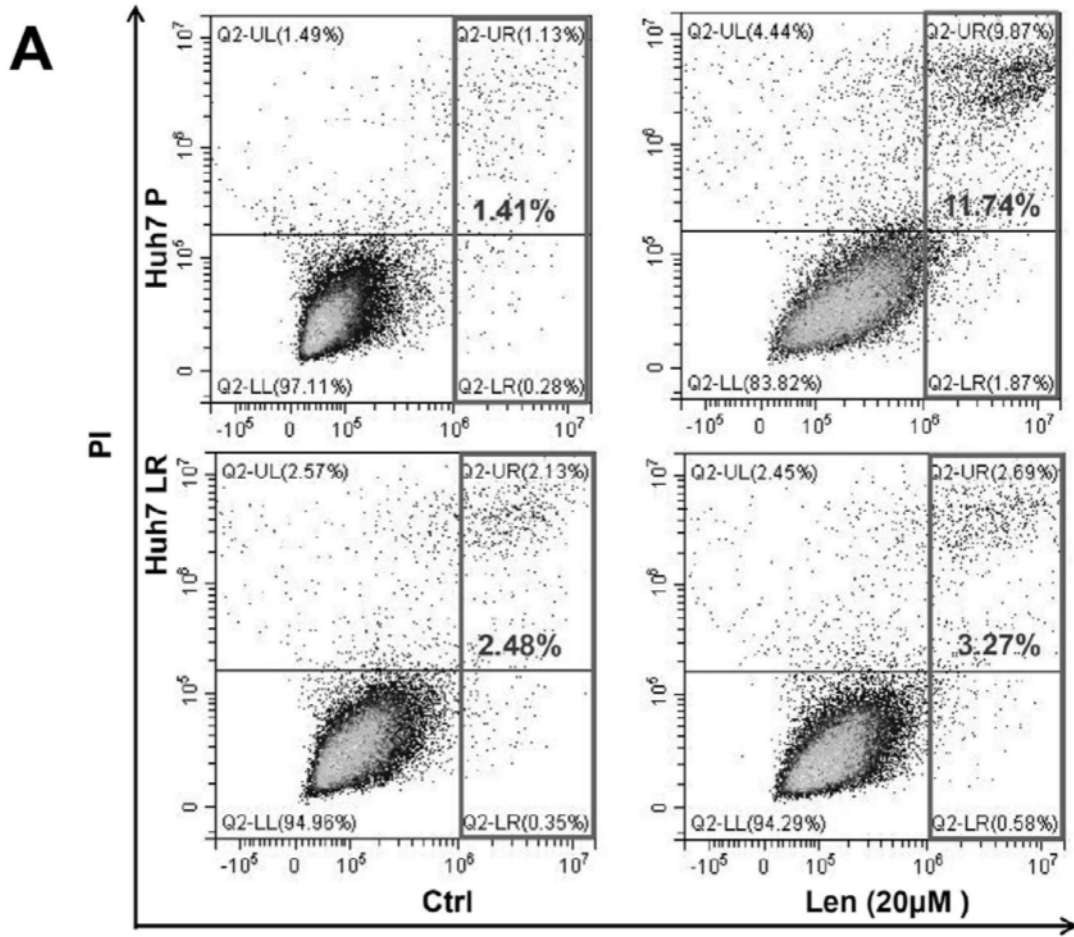


图4

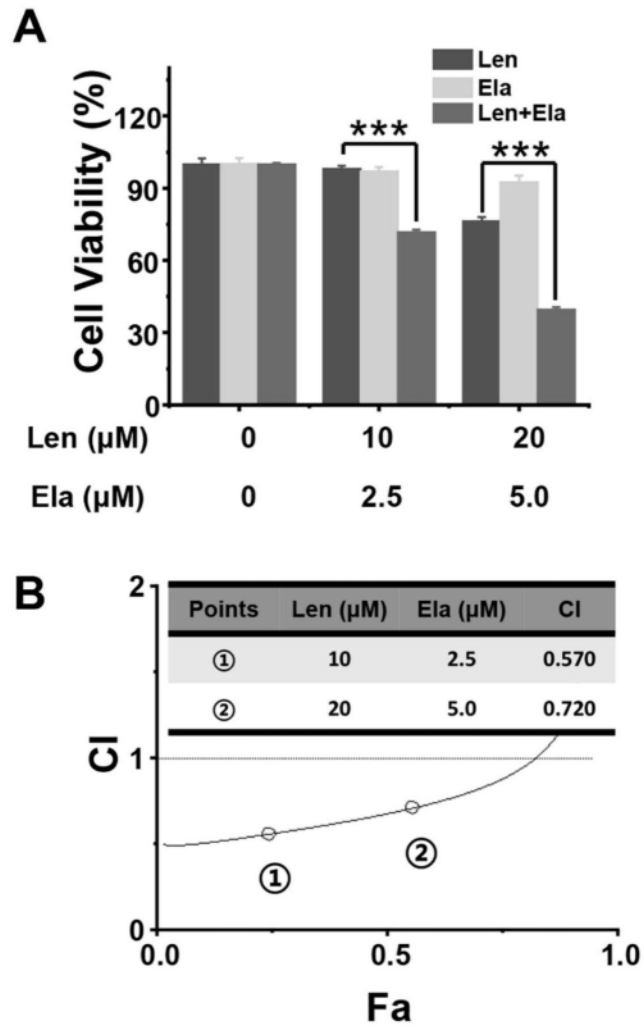


图5

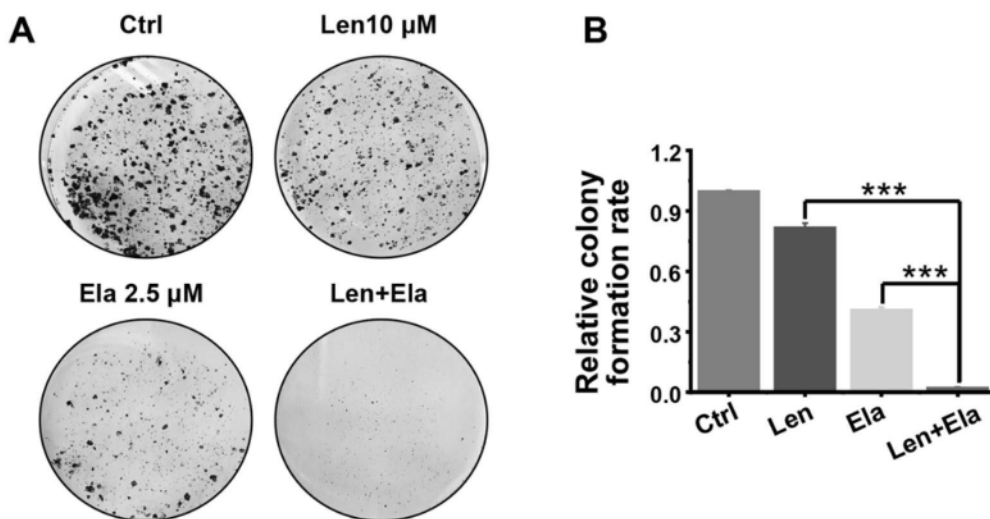


图6

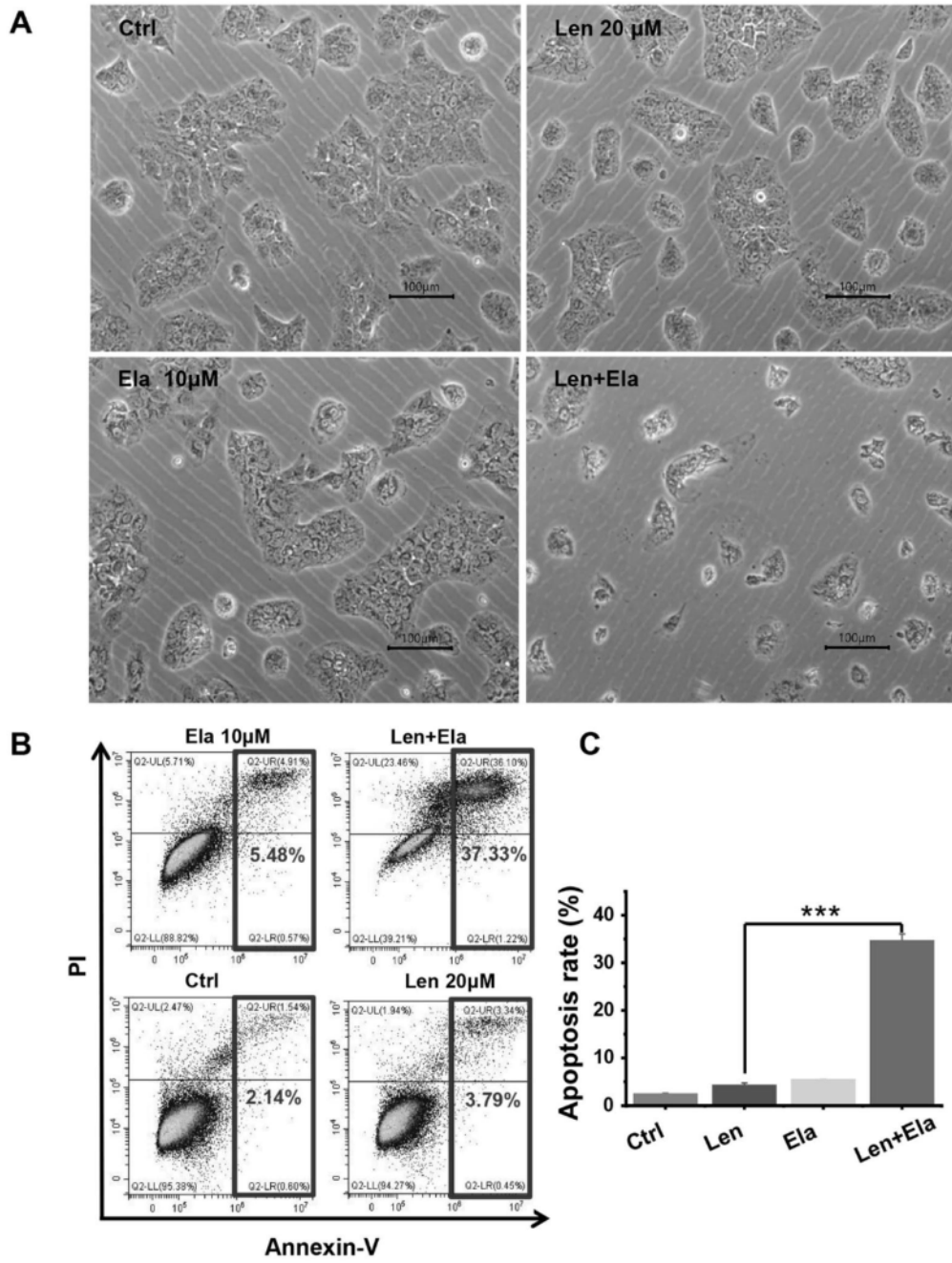


图7

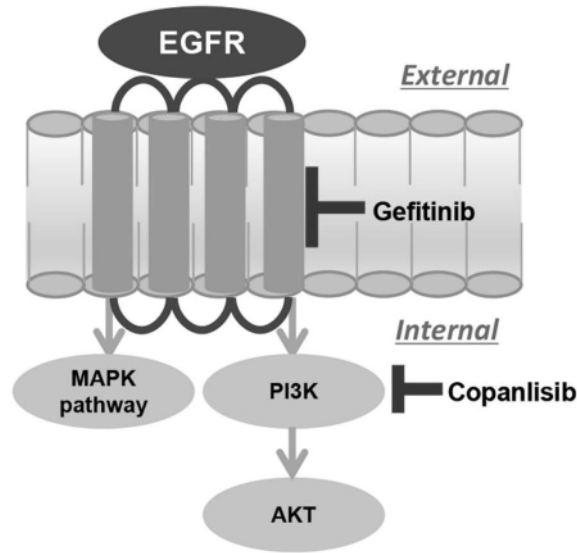


图8

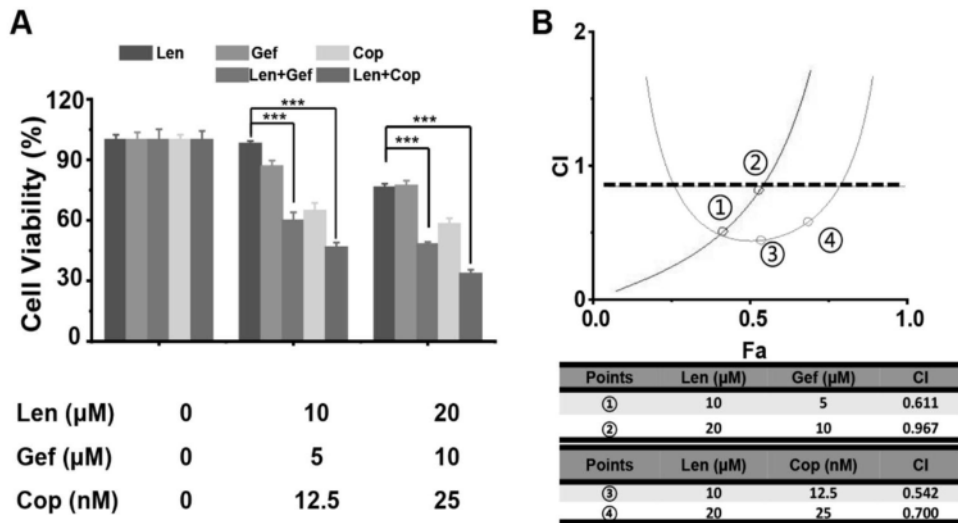


图9

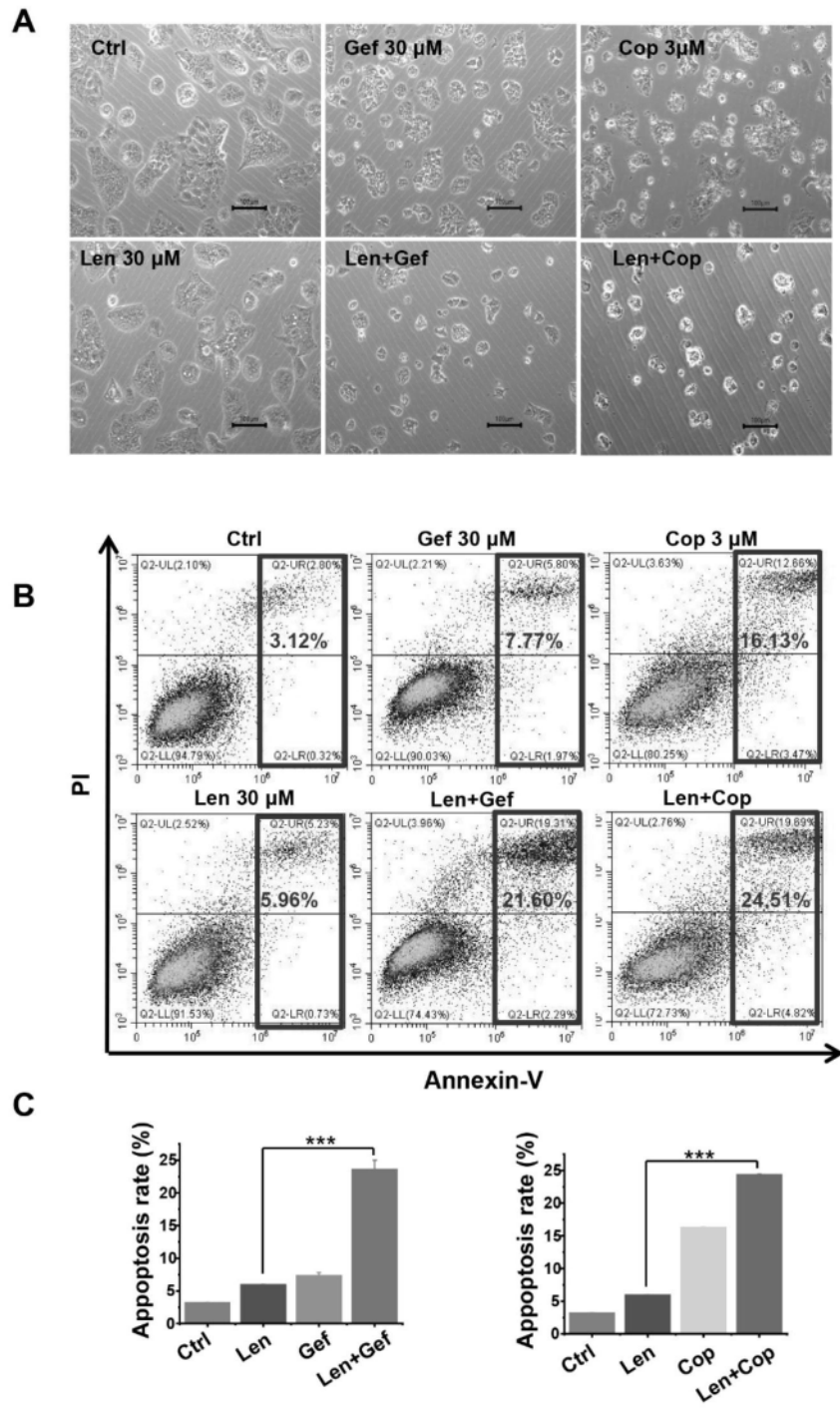


图10

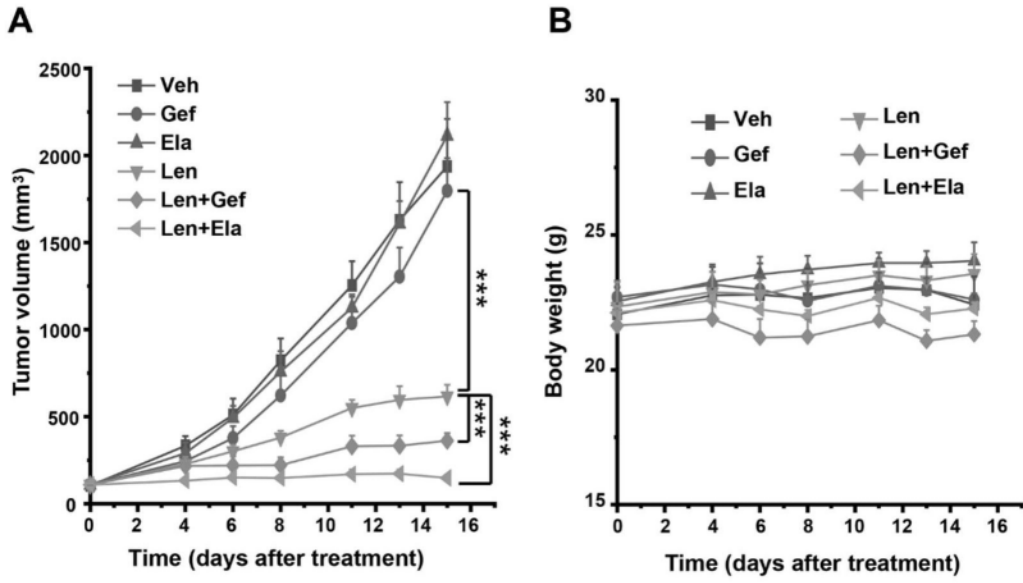


图11

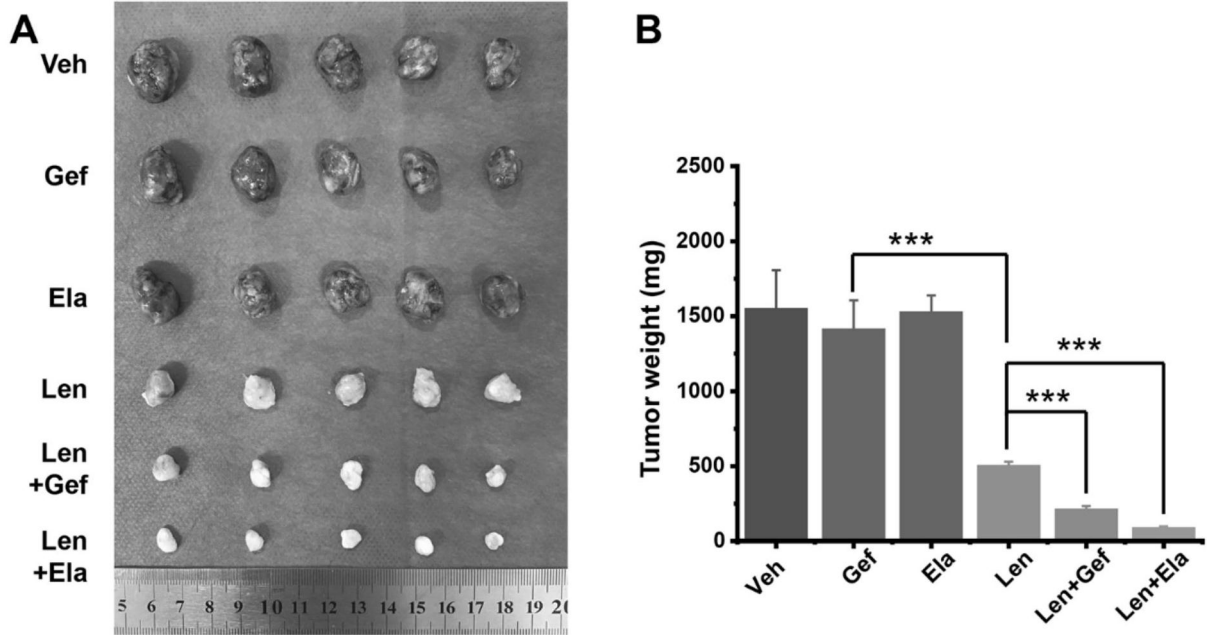


图12