發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】(中文/英文)

二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽、或含有彼之組合物的醫藥用途

PHARMACEUTIAL USES OF DIHYDROQUERCETIN OR A PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF OR COMBINATIONS CONTAINING THE SAME

【技術領域】

[0001] 本發明關於其中將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽與二氫槲皮素（dihydroquercetin）或其醫藥上可接受之鹽組合的藥物。

【先前技術】

[0002] 專利文獻 1 描述經由投予吡喃酮類似物或其衍生物聯同一或多種額外之作用劑，諸如，例如降脂劑或降血糖劑來治療及預防代謝性失調及其他疾病的方法。據描述，吡喃酮類似物之一種實例為花旗松素（taxifolin），而降血糖劑之一種實例為二甲二胍。然而，此文獻並未揭示二甲二胍與花旗松素之組合的任何具體實例，且未描述含有彼等之組合的藥物於對抗惡性腫瘤之協同效果或降低乳酸酸中毒的效果。

〔文件列表〕

〔專利文獻〕

[0003]

[專利文獻 1]：WO 2010/042886

【發明內容】

本發明所欲解決之問題

[0004] 鹽酸二甲二胍為市售之雙胍口服降血糖劑，已知其具有活化經 AMP 活化之蛋白激酶（AMPK）的作用。

近年來，據報導，具有活化 AMPK（AMPK 活化劑）之作用的化合物，諸如二甲二胍、苯乙基二胍（phenformin）、寡黴素（oligomycin）、二硝基苯酚、2-脫氧葡萄糖、5-胺基咪唑-4-羧醯胺核糖核苷酸、過氧化氫、山梨醇、卡西黴素（calcimycin）、4-羥基-3-（2'-羥基聯苯基-4-基）-6-合氧基-6,7-二氫噻吩並[2,3-b]吡啶-5-腈（A-769662）、山羊豆鹼（galegine）、曲格列酮（troglitazone）、苯巴比妥、槲皮素（quercetin）、白藜蘆醇（resveratrol）、小蘗鹼（berberine）及類似物於單獨使用或與現有之抗癌劑組合使用時可顯示出抗惡性腫瘤的效果，且現已考慮將其研發作為抗惡性腫瘤劑。

然而，上述之 AMPK 活化劑，諸如二甲二胍、苯乙基二胍、5-胺基咪唑-4-羧醯胺核糖核苷酸、山梨醇、卡西黴素、A-769662、山羊豆鹼、曲格列酮及類似物與接受給藥之患者中的嚴重乳酸酸中毒問題有關。

本發明的目的係提供一種新穎藥物，其能夠減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用，並可作為抗惡性腫

瘤劑。

已知二甲二胍具有抑制癌症幹細胞的作用。這類抑制癌症幹細胞的藥物預計不僅能提供抗惡性腫瘤的效果，且亦能預防癌症轉移及預防復發。

本發明的目的亦為提供一種新穎藥物，其具有抑制癌症幹細胞的作用，並可作為抗惡性腫瘤劑。

解決問題的方法

[0005] 本發明者已進行深入研究來試圖解決上述問題，並發現將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽與二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽組合能抑制血液中由二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽所引起的乳酸值增加。此外，本發明者已發現二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽與二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的組合物可顯著加強二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的抗惡性腫瘤作用。

本發明者亦已發現二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽能有效預防或治療胰臟癌。

本發明者已發現二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽能有效抑制胰臟癌幹細胞。

基於這樣的發現，本發明者已進行進一步之研究並完成本發明。

[0006] 因此，本發明提供以下內容。

[1] 一種藥物，其中係將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽與二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽組合，其中二甲

二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽係被包含在單一製劑中，或者二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽係被分別配製成醫藥組成物並組合使用。

[2] 如上述[1]之藥物，其中二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽係被包含在單一製劑中。

[3] 如上述[1]之藥物，其中二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽係被分別配製成醫藥組成物並組合使用。

[4] 如上述[1]至[3]中任一項之藥物，其係用於預防或治療惡性腫瘤。

[5] 如上述[4]之藥物，其中該惡性腫瘤為選自由下列所組成之群組的兒童腦瘤：星形膠質細胞瘤（astroglioma）、惡性髓母細胞瘤（malignant medulloblastoma）、生殖細胞瘤（germ cell tumor）、顱咽管瘤（craniopharyngioma）及室管膜瘤（ependymoma）；選自由下列所組成之群組的成人腦瘤：神經膠質瘤（glioma）、神經膠質腫瘤（glial tumor）、腦膜瘤、腦下垂體腺瘤及神經鞘瘤（neurinoma）；選自由下列所組成之群組的頭頸癌：上頜竇癌（maxillary sinus cancer）、咽癌（pharyngeal cancer）、喉癌（laryngeal cancer）、口腔癌、唇癌、舌癌及腮腺癌（parotid cancer）；選自由下列所組成之群組

的胸腺癌及腫瘤：小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺瘤病及間皮瘤（mesothelioma）；選自由下列所組成之群組的胃腸癌及腫瘤：食道癌、肝癌、原發性肝癌、膽囊癌、膽管癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胰臟癌及胰臟內分泌腫瘤；選自由下列所組成之群組的泌尿器官癌症及腫瘤：陰莖癌（penile cancer）、腎盂輸尿管癌（renal pelvis ureteral cancer）、腎細胞癌、睪丸腫瘤、前列腺癌、膀胱癌、威爾姆斯氏細胞瘤（Wilms tumor）及尿路上皮癌（urothelial cancer）；選自由下列所組成之群組的婦科癌症及腫瘤：外陰癌、子宮頸癌、子宮體癌、子宮內膜癌、子宮肉瘤、絨毛膜癌、陰道癌、乳癌、卵巢癌及卵巢生殖細胞腫瘤；成人及兒童軟組織肉瘤；選自由下列所組成之群組的骨腫瘤：骨肉瘤（osteosarcoma）及尤因氏瘤（Ewing's tumor）；選自由下列所組成之群組的內分泌組織之癌症及腫瘤：腎上腺皮質癌及甲狀腺癌；選自由下列所組成之群組的惡性淋巴瘤及白血病：惡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma）、霍奇金氏病、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、急性髓細胞性白血病、急性淋巴性白血病、成人T細胞白血病淋巴瘤、慢性髓細胞性白血病及慢性淋巴性白血病；及選自由下列所組成之群組的皮膚癌及腫瘤：慢性骨髓增生性疾病、惡性黑色素瘤、鱗狀細胞癌、基底細胞癌及蕈樣真菌病（mycosis fungoides）。

[6] 如上述[1]至[5]中任一項之藥物，其係用於治療

那些除了二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽以外的抗惡性腫瘤藥對其提供僅為不足效果的患者。

[7] 如上述[1]至[5]中任一項之藥物，其中係將一或多種除了二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽以外的抗惡性腫瘤藥組合。

[8] 如上述[6]或[7]之藥物，其中該除了二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽以外的抗惡性腫瘤藥為分子標靶藥物、烷基化劑、代謝拮抗劑、植物生物鹼、抗癌抗生素、激素劑或免疫治療劑。

[9] 一種商品組套，其包含如上述[1]至[8]中任一項之藥物及與其相關之書面文件，該書面文件說明該藥物可以或應當用於預防或治療惡性腫瘤。

[10] 一種用於減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用之藥劑，其包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分。

[11] 一種二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的抗惡性腫瘤作用之增強劑，其包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分。

[12] 一種用於減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用之藥劑，其包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分，其係與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用。

[13] 一種抗惡性腫瘤作用之增強劑，其包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分，其係與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用。

[14] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的組合於製造用於預防或治療惡性腫瘤之藥物的用途。

[15] 一種用於預防或治療惡性腫瘤之方法，其包含將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽投予至有此需要之個體，其中二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽係以單一製劑之形式投予，或以分開之製劑的形式同時或在不同時間點投予。

[16] 一種用於預防或治療胰臟癌之藥物，其包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分。

[17] 一種用於預防或治療胰臟癌之方法，其包含將二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽投予至有此需要之個體。

[18] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於作為用於預防或治療胰臟癌之藥物的用途。

[19] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽，其係用於預防或治療胰臟癌。

[20] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於製造用於預防或治療胰臟癌之藥物的用途。

[21] 一種胰臟癌幹細胞抑制劑，其包含二氫槲皮素

或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分。

[22] 一種抑制胰臟癌幹細胞之方法，其包含將二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽投予至有此需要之個體。

[23] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於作為胰臟癌幹細胞抑制劑之用途。

[24] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽，其係用於抑制胰臟癌幹細胞。

[25] 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於製造胰臟癌幹細胞抑制劑之用途。

[26] 一種藥物，其包含用於與二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽組合使用之二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽。

[27] 一種藥物，其包含用於與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用之二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽。

[0007]

本發明之效果

含有二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的組合物之本發明藥物具有協同之抗惡性腫瘤效果，且可用來作為抗惡性腫瘤藥。

本發明之藥物為減少乳酸酸中毒之安全藥物，因為二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽抑制血液中由二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽引起的乳酸值增加。

由於本發明之藥物具有協同之抗惡性腫瘤效果，其能

夠以低劑量投藥，且進一步地，預期可減少副作用。

含有二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分之本發明的藥物可用來作為預防或治療胰臟癌之藥物。

如下述實施例 12 之結果所顯示者，吉西他濱（gemcitabine）（為用於治療胰臟癌的第一備選藥物）允許胰臟癌幹細胞生長。

具有協同性胰臟癌幹細胞抑制效果的本發明藥物在作為用於預防或治療胰臟癌的藥物上特別有用。此外，本發明之藥物與吉西他濱的組合物預計可改善吉西他濱治療中癌症幹細胞增加及復發風險增加的臨床問題，且在作為預防或治療胰臟癌的藥物上特別有用。

含有二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分的本發明藥物顯示出胰腺腫瘤幹細胞抑制效果。因此，其可用來作為預防或治療胰臟癌之藥物，並預計可進一步防止胰臟癌轉移或復發。

【圖式簡單說明】

[0008]

第 1 圖顯示出實施例 1 之結果。

第 2 圖顯示出實施例 2 之結果。

第 3 圖顯示出實施例 3 之結果。

第 4 圖顯示出實施例 10 中二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素）之結果。

第 5 圖顯示出實施例 10 中之光學活性二氫槲皮素

（（2R,3R）-二氫槲皮素）的結果。

第 6 圖顯示出實施例 11 之結果。

第 7 圖顯示出實施例 12 之結果。在圖形中，Met 意指二甲二胍，DHQ 意指二氫槲皮素，而 Gem 意指吉西他濱。

【實施方式】

實施態樣之說明

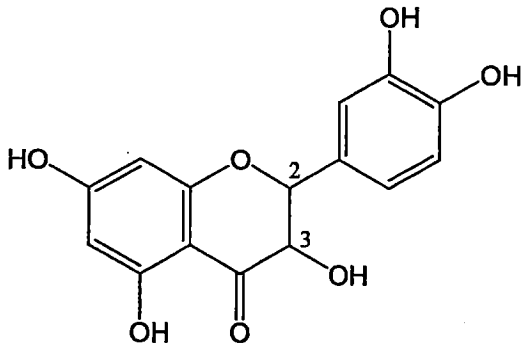
[0009] （I）組合使用二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽

二甲二胍之醫藥上可接受之鹽的實例包括具有無機酸之鹽、具有有機酸之鹽、具有酸性胺基酸之鹽及類似物。

具有無機酸之鹽的實例包括具有鹽酸、氫溴酸、硝酸、硫酸、磷酸及類似物之鹽。具有有機酸之鹽的實例包括具有甲酸、醋酸、三氟醋酸、富馬酸、草酸、酒石酸、馬來酸、檸檬酸、琥珀酸、蘋果酸、甲磺酸、苯磺酸、對甲苯磺酸及類似物之鹽。具有酸性胺基酸之鹽的實例包括具有天門冬胺酸、麩胺酸及類似物之鹽。其中，鹽酸為較佳者。

[0010] 二氫槲皮素為其中該槲皮素之吡喃環的位置 2 及位置 3 之間的雙鍵已被還原的化合物，其由下式表示：

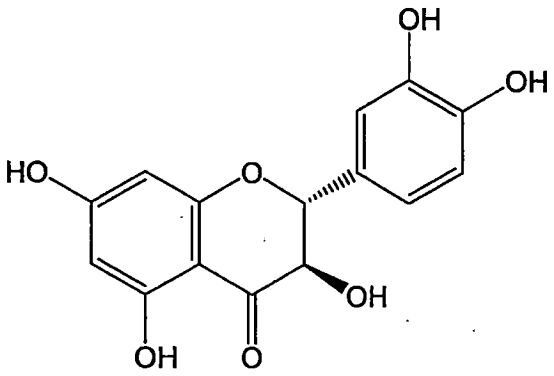
[0011]



[0012] 二氫槲皮素含有 4 種以 2 個不對稱碳原子（色環之位置 2 及位置 3）為基礎的立體異構體（（2R,3R）-二氫槲皮素、（2S,3S）-二氫槲皮素）、（2R,3S）-二氫槲皮素、（2S,3R）-二氫槲皮素）。雖然本發明中之二氫槲皮素可為一或多種這些異構體或這些異構體之外消旋體的的組合（例如（2R,3R）-二氫槲皮素和（2S,3S）-二氫槲皮素之混合物），（2R,3R）-二氫槲皮素和（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體，及（2R,3R）-二氫槲皮素為較佳者，而（2R,3R）-二氫槲皮素為特佳者。

在異構體中，已知（2R,3R）-二氫槲皮素係由下式表示：

[0013]



[0014] 其係包含在落葉松（Larix sibirica）中，亦稱為花旗松素。本發明中亦可使用天然存在的物質，諸如藉由已知方法所萃取之花旗松素及類似物，亦可使用市售之產品。

[0015] 二氫槲皮素之醫藥上可接受之鹽的實例包括具有無機鹼之鹽、具有有機鹼之鹽、具有鹼性胺基酸之鹽及類似物。

具有無機鹼之鹽的實例包括具有鹼金屬（諸如鈉、鉀及類似物）、鹼土金屬（諸如鈣、鎂及類似物）和鋁、銨及類似物之鹽。具有有機鹼之鹽的實例包括具有三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二環己胺、N,N-二苄基乙二胺及類似物之鹽。具有鹼性胺基酸之鹽的實例包括具有精胺酸、賴胺酸、鳥胺酸及類似物之鹽。較佳之鹽的實例包括鹼金屬鹽及鹼土金屬鹽。

[0016] 可用於本發明中之二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽，以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽亦包含該經相同同位素標記之化合物，該化合物中之一或多個原子被具有特定原子量或質量數的一或多個原子所取代。可被納入這些化合物中之同位素的實例包括氫、碳、氮、氧硫、氟及氯同位素，諸如 ^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O、^{33}S、^{34}S、^{36}S、^{18}F、^{36}Cl 及類似物。含有上述同位素及/或其他原子之其他同位素的經特定同位素標記之化合物（例如納入放射活性同位素，諸如 ^{3}H、^{14}C 及類似物

之化合物）可用於進行藥物組織分佈分析法及/或基質組織分佈分析。鑑於製備之容易度及可檢測性，氚化（即，^{3}H）之同位素及碳-14（即，^{14}C）同位素為特佳者。此外，以較重之同位素，諸如氘（即，^{2}H）及類似物取代時可望改善代謝穩定性，例如，在治療時由於較重之同位素在體內的半衰期增加或由於必要的劑量減少，因而能提供特殊優勢來改善代謝穩定性。

[0017] 在本發明之藥物中係組合使用二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽。在本發明之藥物中可將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽同時配製，或可將其包含在同一製劑中。或者，可將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽分開配製，並可將其同時投予單一個體，或在不同時間點經由相同途徑或不同的途徑投予。也就是說，本發明之藥物包括將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽和二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽包含在單一製劑中的藥物，以及將經分開配製之包含二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的醫藥組成物和包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的醫藥組成物組合使用之藥物。

[0018] 本發明之藥物可經由，例如根據已知方法將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及/或二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽與醫藥上可接受之載體混合來配製成，例如醫藥組成物，諸如片劑（包括糖衣片、膜衣片）、粉

劑、顆粒、膠囊（包括軟膠囊）、液體、注射劑、栓劑、緩釋製劑（例如緩釋微膠囊）、或立即釋出製劑，並安全地經由口服或經由腸胃道外途徑投予（例如經由局部、直腸、靜脈內途徑投予等）。注射可用於靜脈內、肌肉內、皮下或器官內投予，或可直接投予在損傷處。

可用於製造本發明之藥物的醫藥上可接受之載體的實例包括各種傳統使用之有機或無機載體物質，諸如用於固體製劑之賦形劑、潤滑劑、黏合劑及崩散劑，用於液體製劑之溶劑、增溶劑、懸浮劑、等張劑、緩衝劑和舒緩劑（soothing agent）及類似物。此外，當需要時，亦可使用適當量之一般添加劑，諸如防腐劑、抗氧化劑、著色劑、甜味劑、吸附劑、濕潤劑及類似物。

[0019] 賦形劑之實例包括乳糖、蔗糖、D-甘露醇、澱粉、玉米澱粉、結晶型纖維素、輕質無水矽酸及類似物。

潤滑劑之實例包括硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、滑石、膠體二氧化矽及類似物。

黏合劑之實例包括結晶型纖維素、蔗糖、D-甘露糖醇、糊精、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮、澱粉、明膠、甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉及類似物。

崩散劑之實例包括澱粉、羧甲基纖維素、羧甲基纖維素鈣、羧甲基澱粉鈉、L-羥丙基纖維素及類似物。

溶劑之實例包括注射用水、醇、丙二醇、聚乙二醇

（macrogol）、芝麻油、玉米油、橄欖油及類似物。

增溶劑之實例包括聚乙二醇（polyethylene glycol）、丙二醇、D-甘露醇、苯甲酸苄酯、乙醇、三胺基甲烷、膽固醇、三乙醇胺、碳酸鈉、檸檬酸鈉及類似物。

懸浮劑之實例包括表面活性劑，諸如硬脂醯三乙醇胺、月桂基硫酸鈉、月桂基胺基丙酸、卵磷脂、苯扎氯銨、苄索氯銨、單硬脂酸甘油酯及類似物；親水性聚合物，諸如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素及類似物；及類似物。

等張劑之實例包括葡萄糖、D-山梨糖醇、氯化鈉、甘油、D-甘露醇及類似物。

緩衝劑之實例包括，諸如磷酸鹽、醋酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽緩衝劑及類似物；及類似物。

舒緩劑之實例包括苄醇及類似物。

防腐劑之實例包括對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苄醇、苯乙醇、脫氫醋酸、山梨酸及類似物。

抗氧化劑之實例包括亞硫酸鹽、抗壞血酸、α-生育酚及類似物。

[0020] 在本發明之藥物中，二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的含量可根據該製劑之形式及類似物來適當地選擇。

例如，在單一製劑中含有二甲二胍及二氫槲皮素的本

發明藥物中，二甲二胍的含量一般為約 0.01 至約 99.99 重量%，較佳為約 0.1 至約 50 重量%（相對於整個製劑），而二氫槲皮素之含量一般為約 0.01 至約 99.99 重量%，較佳為約 0.1 至約 50 重量%（相對於整個製劑）。

在本發明之藥物中，二甲二胍和二氫槲皮素的含量比為每 1 重量份之二氫槲皮素對約 0.0005-300 重量份，較佳為約 0.5-300 重量份，更佳為約 0.5-100 重量份，再更佳為約 2.5-50 重量份，特佳為約 2.5-10 重量份的二甲二胍。

此外，在本發明之藥物中，二甲二胍和二氫槲皮素的含量比為每 1 莫耳二氫槲皮素對約 1-600 莫耳，較佳為約 1-200 莫耳，更佳為約 5-100 莫耳，再更佳為約 5-20 莫耳之二甲二胍。

本發明之藥物中，雖然添加劑（諸如載體）及類似物的含量會根據製劑之形式而有所不同，其通常為約 1 至約 99.99 重量%，較佳為約 10 至約 90 重量%（相對於整個製劑）。

[0021] 當將二甲二胍和二氫槲皮素分開配製時，含有二甲二胍之製劑中的二甲二胍含量通常為約 0.01 至約 100 重量%，較佳為約 0.1 至約 90 重量%（相對於整個製劑），含有二氫槲皮素之製劑中的二氫槲皮素含量通常為約 0.01 至約 100 重量%，較佳為約 0.1 至約 90 重量%（相對於整個製劑）。添加劑（諸如載體及類似物）之含量如上述。

當二甲二胍及二氫槲皮素被分開配製時，其使用率通常為每 1 重量份之二氫槲皮素對約 0.0005-300 重量份，較佳為約 0.5-300 重量份，更佳為約 0.5-100 重量份，再更佳為約 2.5-50 重量份，特佳為約 2.5-10 重量份之二甲二胍。

此外，當二甲二胍和二氫槲皮素被分開配製時，其使用率為每 1 莫耳二氫槲皮素對約 0.001-600 莫耳，較佳為約 1-600 莫耳，更佳為約 1-200 莫耳，再更佳為約 1-100 莫耳，特佳為約 5-20 莫耳量之二甲二胍。

當使用二甲二胍之醫藥上可接受之鹽及/或二氫槲皮素之醫藥上可接受之鹽時，彼等在製劑中之含量及彼等之含量比係在如上文中所指出之用於二甲二胍和二氫槲皮素的相同範圍內。

[0022] 這些製劑可以藉由製備步驟中一般使用之已知方法來製備。

在注射劑的情況中，例如，注射劑（例如 Captisol 製劑）可經由製造二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及/或二氫槲皮素或其藥學上可接受之鹽加上以下作用劑的水性注射劑來產生：分散劑（例如吐溫 80（由美國 Atlas Powder 製造）、HCO 60（由 Nikko Chemicals 製造）、聚乙二醇、羧甲基纖維素、藻酸鈉、羥丙基甲基纖維素、糊精等）、穩定劑（例如抗壞血酸、焦亞硫酸鈉等）、表面活性劑（例如聚山梨醇酯 80、聚乙二醇等）、增溶劑（例如甘油、乙醇、Captisol（商品名，磺丁基醚-β-環糊精

鈉鹽）等）、緩衝劑（例如檸檬酸、磷酸及其鹼金屬鹽、檸檬酸及其鹼金屬鹽等）、等張劑（例如氯化鈉、氯化鉀、甘露醇、山梨糖醇、葡萄糖等）、pH 調節劑（例如鹽酸、氫氧化鈉等）、防腐劑（例如對羥基苯甲酸乙酯、苯甲酸、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、苄醇等）、溶解劑（例如濃縮之甘油、葡甲胺等）、增溶劑（例如丙二醇、蔗糖等）、舒緩劑（例如葡萄糖、苄醇等）及類似物，或可製造油性注射液，此係經由將上述作用劑溶解、懸浮或乳化在植物油（諸如橄欖油、芝麻油、棉籽油、玉米油及類似物）中或增溶劑（諸如丙二醇等）中來產生。

在口服製劑（片劑）之情況中，例如口服製劑可經由下列步驟製造：將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及/或二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽與賦形劑（例如乳糖、蔗糖、澱粉、玉米澱粉等）、崩散劑（例如澱粉、碳酸鈣等）、黏合劑（例如澱粉、阿拉伯膠、羧甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮、羥丙基纖維素膠、明膠等）、潤滑劑（例如滑石、硬脂酸鎂、聚乙二醇 6000 等）及類似物混合，將該混合物壓縮模塑，然後，當需要時，藉由用於掩味、腸衣或緩釋之已知方法塗層。

此處所使用之塗層劑的實例包括羥丙基甲基纖維素、乙基纖維素、羥甲基纖維素、羥丙基纖維素、聚氧基乙二醇、吐溫 80、普朗尼克（pluronic）F68、鄰苯二甲酸醋酸纖維素、鄰苯二甲酸羥丙基甲基纖維素、琥珀酸醋酸羥

甲基纖維素、Eudragit（由德國 Rohm 製造，甲基丙烯酸-丙烯酸共聚物）和染料（例如三氧化二鐵、二氧化鈦等）及類似物。糖衣之實例包括蔗糖、滑石、阿拉伯膠、染料（例如三氧化二鐵、二氧化鈦等）、拋光劑（例如蜂蠟等）及類似物。

在栓劑的情況中，例如，可根據已知方法經由使用基質，諸如油性基質（例如高級脂肪酸之甘油酯[例如可可脂、witepsol（由德國 Dynamitnovel 有限公司製造）等]、中鏈脂肪酸[例如 miglyol（由德國 Dynamitnovel 有限公司製造）等]、植物油（例如芝麻油、大豆油、棉籽油等）等）、水性基質（例如聚乙二醇、丙二醇等）、水性凝膠基質（例如天然樹膠、纖維素衍生物、乙烯基聚合物、丙烯酸聚合物等）及類似物來將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及/或二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽配製成油性或水性固體、半固體或液體栓劑。

[0023] 本發明之藥物顯示出降低之副作用且可安全地投予人類及動物（例如小鼠、大鼠、兔、狗、貓、牛、馬、豬、猴等）。

[0024] 本發明藥物之劑量可根據用途、患者之年齡及性別、疾病程度等適當地選擇。用於成人（體重 60 公斤）之本發明藥物的劑量通常為每天約 250-3000 毫克，較佳為 500-2250 毫克之二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽，且通常為約 40-1200 毫克，較佳為 50-900 毫克之二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽。該劑量係每天在一至數

個部分中投予。

[0025] 本發明之藥物可作為用於惡性腫瘤之預防或治療劑。

惡性腫瘤之實例包括選自由下列所組成之群組的兒童腦瘤：星形膠質細胞、惡性髓母細胞瘤、生殖細胞瘤、顱咽管瘤及室管膜瘤；選自由下列所組成之群組的成人腦瘤：神經膠質瘤、神經膠質腫瘤、腦膜瘤、腦下垂體腺瘤及神經鞘瘤；選自由下列所組成之群組的頭頸癌：上頜竇癌、咽癌（例如鼻咽癌、口咽癌、下咽癌）、喉癌、口腔癌、唇癌、舌癌及腮腺癌；選自由下列所組成之群組的胸腺癌及腫瘤：小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺瘤病及間皮瘤；選自由下列所組成之群組的胃腸癌及腫瘤：食道癌、肝癌、原發性肝癌、膽囊癌、膽管癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胰臟癌及胰臟內分泌腫瘤；選自由下列所組成之群組的泌尿器官癌症及腫瘤：陰莖癌、腎盂輸尿管癌、腎細胞癌、睪丸腫瘤（testis tumor）（亦稱為 orchis tumor）、前列腺癌、膀胱癌、威爾姆斯氏細胞瘤及尿路上皮癌；選自由下列所組成之群組的婦科癌症及腫瘤：外陰癌、子宮頸癌、子宮體癌、子宮內膜癌、子宮肉瘤、絨毛膜癌、陰道癌、乳癌、卵巢癌及卵巢生殖細胞腫瘤；成人及兒童軟組織肉瘤；選自由下列所組成之群組的骨腫瘤：骨肉瘤及尤因氏瘤；選自由下列所組成之群組的內分泌組織之癌症及腫瘤：腎上腺皮質癌及甲狀腺癌；選自由下列所組成之群組的惡性淋巴瘤及白

血病：惡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、急性髓細胞性白血病、急性淋巴性白血病、成人 T 細胞白血病淋巴瘤、慢性髓細胞性白血病及慢性淋巴性白血病；及選自由下列所組成之群組的皮膚癌及腫瘤：慢性骨髓增生性疾病、惡性黑色素瘤、鱗狀細胞癌、基底細胞癌及蕈樣真菌病。

[0026] 由於本發明之藥物具有特別顯著之抗惡性腫瘤效果，其可望對那些除了二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽以外的抗惡性腫瘤藥對其提供僅為不足效果的患者顯示出抗惡性腫瘤效果。

[0027] 本發明之藥物可進一步與一或多種除了二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽以外的抗惡性腫瘤藥組合。

除了二甲二胍和其醫藥上可接受之鹽以及二氫槲皮素和其醫藥上可接受之鹽以外的抗惡性腫瘤藥之實例包括分子標靶藥、烷基化劑、代謝拮抗劑、植物生物鹼、抗癌抗生素、激素藥、免疫治療劑及類似物。

上述之“分子標靶藥”的實例包括伊馬替尼（imatinib）、吉非替尼（gefitinib）、厄洛替尼（erlotinib）、舒尼替尼（sunitinib）、索拉非尼（sorafenib）、布立尼布（brivanib）、替瓦替尼（tivantinib）、利尼法尼（linifanib）、硼替佐米（bortezomib）、尼洛替尼（nilotinib）、達沙替尼

（dasatinib）、來他替尼（lestaurtinib）、拉帕替尼（lapatinib）、沙利竇邁（thalidomide）、來那度胺（lenalidomide）、西羅莫司（sirolimus）、依維莫司（everolimus）、特適癌（temsirolimus）、伏立諾他（vorinostat）、維甲酸（tretinoin）、他米巴羅汀（tamibarotene）、利妥昔單抗（rituximab）、貝伐單抗（bevacizumab）、雷莫蘆單抗（ramucirumab）、帕尼單抗（panitumumab）、西妥昔單抗（cetuximab）、曲妥珠單抗（trastuzumab）、阿崙單抗（alemtuzumab）、吉妥珠單抗（gemtuzumab）、奧唑米星（ozogamicin）、替伊莫單抗（ibritumomab tiuxetan）、阿扎胞苷（azacitidine）、地西他濱（decitabine）、唑來膦酸（zoledronic acid）、三氧化二砷（arsenic trioxide）、奧利默森（oblimersen）及類似物。

上述之“烷化劑”的實例包括氮芥（mechlorethamine）；環磷醯胺（cyclophosphamide）；異環磷醯胺（ifosfamide）；卡莫司汀（carmustine）；白消安（busulfan）；替莫唑胺（temozolomide）；丙卡巴肼（procarbazine）；洛莫司汀（lomustine）；達卡巴嗪（dacarbazine）；苯達莫司汀（bendamustine）；美法崙（melphalan）；尼莫司汀（nimustine）；雷莫司汀（ranimustine）；瘤克寧（chlorambucil）；福莫司汀（fotemustine）；鉑製劑，例如奧沙利鉑（oxaliplatin）、順鉑（cisplatin）、卡鉑（carboplatin）

及類似物；及類似物。

上述之“代謝拮抗劑”的實例包括吉西他濱（gemcitabine）、甲胺蝶呤（methotrexate）、卡培他濱（capecitabine）、阿糖胞苷（cytarabine）、氟達拉濱（fludarabine）、克拉屈濱（cladribine）、依諾他濱（enocitabine）、卡莫氟（carmofur）、替加氟（tegafur）、尿嘧啶替加氟（tegafur・uracil）、替吉奧（tegafur・gimeracil・oteracil potassium）、5-氟脲嘧啶（5-fluorouracil）、去氧氟尿苷（doxifluridine）、奈拉濱（nelarabine）、羥基脲（hydroxycarbamide）、噴司他丁（pentostatin）、巯嘌呤（mercaptopurine）、亞葉酸（leucovorin）、培美曲塞（pemetrexed）及類似物。

上述之“植物生物鹼”的實例包括拓撲異構酶抑制劑，諸如伊立替康（irinotecan）、拓撲替康（topotecan）、諾吉替康（nogitecan）、依托泊苷（etoposide）、索布佐生（sobuzoxane）及類似物；有絲分裂抑制劑，諸如太平洋紫杉醇（paclitaxel）、Abraxane（商品名）、多西紫杉醇（docetaxel）、伊沙匹隆（ixabepilone）、長春鹼（vinblastine）、長春地辛（vindesine）、長春新鹼（vincristine）、長春瑞濱（vinorelbine）、艾瑞布林（eribulin）及類似物；及類似物。

上述之“抗癌抗生素”的實例包括阿黴素（doxorubicin）、絲裂黴素 C（mitomycin C）、米托蒽醌（mitoxantrone）、表柔比星（epirubicin）、伊達比星

（idarubicin）、柔紅黴素（daunorubicin）、阿柔比星（aclarubicin）、胺柔比星（amrubicin）、吡柔比星（pirarubicin）、放線菌素 D（actinomycin D）、博來黴素（bleomycin）、培洛黴素（peplomycin）、環孢菌素（cyclosporin）及類似物。

上述之“激素劑”的實例包括他莫昔芬（tamoxifen）、阿那曲唑（anastrozole）、來曲唑（letrozole）、依西美坦（exemestane）、氟維司群（fulvestrant）、氟他胺（flutamide）、比卡魯胺（bicalutamide）、雌莫司汀（estramustine）、氯地孕酮（chlormadinone）、托瑞米芬（toremifene）、戈舍瑞林（goserelin）、強的松（prednisone）、亮丙瑞林（leuprorelin）、阿比特龍（abiraterone）、地塞米松（dexamethasone）及類似物。

上述之“免疫治療劑”的實例包括 GM-CSF、干擾素 α2b、介白素 2、非格司亭（filgrastim）、依泊汀 α（epoetin alfa）及類似物。

[0028] 本發明亦關於包含上述本發明之“其中係組合二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的藥物”及與其相關聯之書面文件的商業包裝，該書面文件陳述該藥物可以或應當用於預防或治療惡性腫瘤。

[0029] 本發明進一步關於包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分以用於減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用（尤其是乳酸酸中毒）之藥劑，及

包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分以增強二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的抗惡性腫瘤作用之增強劑。本發明亦關於包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分並與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用以用於減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用（尤其是乳酸酸中毒）之藥劑，及包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分並與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用以增強二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的抗惡性腫瘤作用之增強劑。

在該副作用減少劑及抗惡性腫瘤作用增強劑中，“二甲二胍”、“二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽”、“二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽”之實例、投予形式、劑量、投予個體、標靶疾病等係類似於那些關於上述本發明之藥物的說明。

[0030]

（Ⅱ）含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分的藥物

本發明關於包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分之用於預防或治療胰臟癌之藥物，以及包含二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽作為活性成分之胰臟癌幹細胞抑制劑。

“二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽”的實例、投予形式、投予個體等係類似於那些關於上述（I）之說明。

本發明之藥物及抑制劑可根據已知方法，經由，例如

將二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽與醫藥上可接受之載體混合而被配製成，例如醫藥組成物，諸如片劑（包括糖衣錠、膜衣錠）、粉末、顆粒、膠囊（包括軟膠囊）、液體、注射劑、栓劑、緩釋製劑（例如緩釋微膠囊）、或速釋製劑，並安全地經由口服或腸胃道外途徑投予（例如局部、直腸、靜脈內途徑投予等）。注射劑可用於靜脈內、肌肉內、皮下或器官內投予，或可直接投予在患處。該醫藥上可接受之載體類似於那些關於上述（I）之說明。

這些製劑可藉由一般用於製備步驟的已知方法來製造。

[0031] 在本發明之藥物和抑制劑中的二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的含量可根據該製劑之形式等做適當的選擇。

例如，該二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽的含量通常為約 0.01 至約 99.99 重量%，較佳為約 0.1 至約 90 重量%（相對於整個製劑）。

雖然在本發明之藥物和抑制劑中的添加劑（諸如載體及類似物）之含量將根據該製劑之形式有所變化，其通常為約 1 至約 99.99 重量%，較佳為約 10 至約 90 重量%（相對於整個製劑）。

[0032] 較佳地，本發明之藥物和抑制劑含有二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽，因為二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽產生協同之抗惡性腫瘤效果。“二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽”類似於那些關於上述（I）之說明。

二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的含量一般為每 1 重量份之二氫槲皮素約 0.5 至約 100 重量%，較佳為約 2.5 至約 50 重量%，更佳為約 2.5 至約 10 重量%。

本發明之藥物和抑制劑可與吉西他濱組合使用。

吉西他濱之劑量可根據市售之吉西他濱製劑的劑量來測定。

[0033] 本發明之藥物和抑制劑的劑量可根據用途、患者年齡和性別、疾病程度等來進行適當的選擇。成人（體重 60 公斤）每天使用的劑量一般為約 40 至 1200 毫克，較佳為約 50 至 900 毫克，更佳為約 100 至 1050 毫克之二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽。該劑量係每天在 1 至數個部分中投予。

[0034] 下文中係參考實施例來詳細解釋本發明，其不應被解釋為用來限制本發明。

[0035]

[實施例 1]

在人肺癌細胞株 NCI-H1299（體外）中組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於含有 10%去活化（56℃，處理 30 分鐘）之胎牛血清的 RPMI-1640 培養基（以下簡稱為 10%FBS-RPMI1640 培養基）（NACALAI TESQUE 公司）中，以製備 200 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 20 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋之，以製備 5 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.5 毫莫耳/升）。

3）細胞

從美國典型培養物保存中心（ATCC）取得源自人肺癌之細胞株 NCI-H1299（目錄編號 CRL-5803，Cancer Res. 1992；52（9 Suppl）：2732s-2736s）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白的量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 20 毫莫

耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.5 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.5 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 NCI-H1299 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 1×10^6 細胞/毫升。以每孔 0.5 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤（IWAKI）中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 Dulbecco 磷酸鹽緩衝之生理鹽水（D-PBS）將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液（Cell Signaling Technology 公司）製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並使用 ELISA 套組（Cell Signaling Technology 公司，目錄編號 7854）定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析（Pierce）測量細胞萃取物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組（第 1 圖）。

7）結論

在 NCI-H1299 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0036]

[實施例 2]

在人胰臟癌細胞株 AsPC-1 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 200 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 20 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋之，以製備 2 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.2 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 Dainippon 製藥有限公司（現在為 DS PHARMA BIOMEDICAL 有限公司，In Vitro. 1982；18：24-34）取得源自人胰臟癌之細胞株 AsPC-1。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 AsPC-1 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 1×10^6 細胞/毫升。以每孔 0.5 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組（第 2 圖）。

7）結論

在 AsPC-1 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0037]

[實施例 3]

二氫槲皮素對人肺纖維母細胞株 WI-38 中（體外）由二甲二胍誘導之乳酸鹽製造的抑制作用

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 200 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 20 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋之，以製備 10 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 1 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 ATCC 取得源自人肺纖維母細胞之細胞株 WI-38（目錄編號 CCL-75，Exp. Cell Res. ,25：585-621，1961）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入二氫槲皮素，並將細胞培養 1 小時。然後，加入二甲二胍，再將細胞培養 6 小時。培養後，採取條件培養基之樣本，測量並評估包含在培養基中之乳酸鹽的濃度。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 20 毫莫耳

/升

（3）二氫槲皮素和二甲二胍組合治療組：二甲二胍20毫莫耳/升+二氫槲皮素1毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之WI-38細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔0.5毫升之體積將細胞接種在24孔多孔培養盤（IWAKI）中，並在37℃，5%CO_2的條件下培養一整夜。將含有指定濃度之二氫槲皮素的培養基加入每個孔中，並將細胞培養1小時。然後，加入含有指定濃度之二甲二胍的培養基，並將細胞進一步培養6小時。培養後，從每個孔中採取培養上清液之樣本並將其通過截留分子量10 kDa之過濾器以取得濾液。使用乳酸鹽分析套組II（BioVision公司）目錄編號K627-100測量乳酸鹽濃度。採取培養上清液之樣本後，以D-PBS清洗細胞兩次，並加入細胞裂解液以製備全細胞溶胞產物。藉由BCA蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之蛋白質的濃度，並參照該蛋白質濃將每個孔中之乳酸鹽的濃度進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估二氫槲皮素對由二甲二胍誘導製造之乳酸鹽含量的影響，在二甲二胍單一藥劑治療組及組合治療組之間進行培養基中之乳酸鹽濃度的Student氏t-檢驗。當組

合治療組中之數值明顯低於二甲二胍單一藥劑治療組時，二氫槲皮素被定義為對該含量具有抑制效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

二甲二胍誘導 WI-38 細胞中製造乳酸鹽。二氫槲皮素顯著抑制由二甲二胍誘導之乳酸鹽製造（第 3 圖）。

7）結論

在 WI-38 細胞中可觀察到二氫槲皮素對由二甲二胍誘導之乳酸鹽製造的抑制效果。這指出二氫槲皮素於降低由二甲二胍所造成之乳酸酸中毒的風險的臨床效用。

[0038]

[實施例 4]

在人肝癌細胞株 HuH-7 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 50 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 5 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋，以製備 2 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.2 毫莫耳/升）。

3）細胞

從健康科學研究資源庫（Health Science Research Resources Bank）取得源自人肝癌之細胞株 HuH-7（Cancer Res. 1982；42（9）：3858-63）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 5 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 5 毫莫耳/升+二氫槲皮

素 0.2 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 HuH-7 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 1 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式，使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效

果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

結果顯示於表 1 中。

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組。

[0039]

表 1

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	84.1	2.1
二甲二胍	61.7	3.5
二氫槲皮素	59.7	1.6
二甲二胍+ 二氫槲皮素	28.2	2.6

[0040]

7）結論

在 HuH-7 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0041]

[實施例 5]

在人乳癌細胞株 MDA-MB-231 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的

抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 50 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 5 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋，以製備 2 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.2 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 ATCC 取得源自人乳癌之細胞株 MDA-MB-231（J Natl Cancer Inst. 1974；53（3）：661-74）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組

（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 5 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 5 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 MDA-MB-231 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 1 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

結果顯示於表 2 中。

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組。

[0042]

表 2

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	33.3	3.1
二甲二胍	37.1	3.1
二氫槲皮素	25.9	0.6
二甲二胍+ 二氫槲皮素	19.8	1.4

[0043]

7）結論

在 MDA-MB-231 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍

及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0044]

[實施例 6]

在人前列腺癌細胞株 22Rv1 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 100 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 10 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋，以製備 2 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.2 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 ATCC 取得源自人前列腺癌之細胞株 22Rv1（In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1999；35（7）：403-9）。在

37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 10 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 10 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 22Rv1 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 1 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1

中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

結果顯示於表 3 中。

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組。

[0045]

表 3

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	51.0	6.7
二甲二胍	57.3	2.2
二氫槲皮素	53.1	4.5
二甲二胍+ 二氫槲皮素	36.2	1.5

[0046]

7）結論

在 22Rv1 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0047]

[實施例 7]

在人膽管癌細胞株 HuH-28 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以

製備 200 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 20 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋，以製備 2 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.2 毫莫耳/升）。

3）細胞

從健康科學研究資源庫取得源自人膽管癌之細胞株 HuH-28（Res Exp Med（Berl）. 1988； 188（5）： 367-75）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 HuH-28 細胞分離，並將

其懸浮於培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 1 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

結果顯示於表 4 中。

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組。

[0048]

表 4

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	58.8	2.8
二甲二胍	55.2	1.5
二氫槲皮素	54.2	0.2
二甲二胍+ 二氫槲皮素	36.6	1.3

[0049]

7）結論

在 HuH-28 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與細胞增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0050]

[實施例 8]

在人卵巢癌細胞株 Caov-3 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 200 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 20 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋，以製備 2 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.2 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 ATCC 取得源自人卵巢癌的細胞株 Caov-3（GYNECOL ONCOL. 1994； 53（1）：70-7）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.2 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 Caov-3 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 1 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸

-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

結果顯示於表 5 中。

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組。

[0051]

表 5

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	21.6	2.7
二甲二胍	22.0	0.3
二氫槲皮素	21.0	1.0
二甲二胍+ 二氫槲皮素	16.8	0.3

[0052]

7）結論

在 Caov-3 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0053]

[實施例 9]

在人胰臟癌細胞株 AsPC-1 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 15、30 及 60 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 1.5、3 及 6 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋，以製備 3 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.3 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 DS PHARMA BIOMEDICAL 有限公司取得源自人胰臟癌之細胞株 AsPC-1。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 1.5、3 及 6 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.3 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 1.5、3 及 6 毫莫耳/升 +二氫槲皮素 0.3 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 AsPC-1 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 1 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二甲二胍、或二氫槲皮素、或二甲二胍和二氫槲皮素兩者的培養基加入每個孔中。在 37℃，5%CO_2 的條件下培育 24 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估組合使用二甲二胍和二氫槲皮素對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量的影響，進行 Dunnett 試驗以比較組合治療組與各單一藥劑治療組。當觀察到組合治療組與各單一藥劑治療組具顯著差異時，進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）以評估二甲二胍治療組（第 1 和 2 組）及二氫槲皮素治療組（第 3 和 4 組）之間的協同效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

結果顯示於表 6-8 中。

組合使用二甲二胍和二氫槲皮素時對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量之抑制效果明顯強於各單一化合物組。

[0054]

表 6

二甲二胍：二氫槲皮素＝1.5 毫莫耳/升：0.3 毫莫耳/升

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	107.3	9.3
二甲二胍	83.1	5.5
二氫槲皮素	97.4	9.6
二甲二胍+ 二氫槲皮素	31.2	4.1

[0055]

表 7

二甲二胍：二氫槲皮素＝3 毫莫耳/升：0.3 毫莫耳/升

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	33.5	10.1
二甲二胍	36.9	1.7
二氫槲皮素	37.2	2.5
二甲二胍+ 二氫槲皮素	18.4	0.9

[0056]

表 8

二甲二胍：二氫槲皮素＝6 毫莫耳/升：0.3 毫莫耳/升

	相關磷酸-4E-BP1 蛋白量	
	平均值	SD
對照組	107.3	9.3
二甲二胍	83.1	5.5
二氫槲皮素	89.7	7.1
二甲二胍+ 二氫槲皮素	29.4	1.2

[0057]

7）結論

在 AsPC-1 細胞中可觀察到組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對與增殖相關之傳信途徑的協同抑制效果。這指出組合使用二甲二胍及二氫槲皮素在癌症化療中的效用。

[0058]

[實施例 10]

二氫槲皮素對人肺纖維母細胞株 WI-38 中（體外）由二甲二胍誘導之乳酸鹽製造的抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入，以及光學活性之二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素）係購自 SIGMA。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於 10%FBS-RPMI1640 培養基中，以製備 200 毫莫耳/升之二甲二胍（最終濃度為 20 毫莫耳/升）。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋之，以製備 10 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 1 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 ATCC 取得源自人肺纖維母細胞之細胞株 WI-38（目錄編號 CCL-75，Exp. Cell Res. ,25：585-621 ,1961）。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入二氫槲皮素，並將細胞培養 1 小時。然後，加入二甲二胍，再將細胞培養 6 小時。採取條件培養基之樣本，測量並評估包含在培養基中之乳酸鹽

的濃度。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 1 毫莫耳/升

（3）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升

（4）組合治療組：二甲二胍 20 毫莫耳/升+二氫槲皮素 1 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 WI-38 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2.5×10^5 細胞/毫升。以每孔 0.5 毫升之體積將細胞接種在 24 孔多孔培養盤（IWAKI）中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。將含有指定濃度之二氫槲皮素的培養基加入每個孔中，並將細胞培養 1 小時。然後，加入含有指定濃度之二甲二胍的培養基，並將細胞進一步培養 6 小時。培養後，從每個孔中採取培養上清液之樣本並將其通過截留分子量 10 kDa 之過濾器以取得濾液。使用乳酸鹽分析套組 II（BioVision 公司）目錄編號 K627-100 來測量乳酸鹽濃度。採取培養上清液之樣本後，以 D-PBS 清洗細胞兩次，並加入細胞裂解液以製備全細胞溶胞產物。使用 BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之蛋白質的濃度，並參照該蛋白質濃度將每個孔中之乳酸鹽的濃度進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估二氫槲皮素對由二甲二胍誘導製造之乳酸鹽含量的影響，在對照組及二氫槲皮素單一藥劑治療組之間進行培養基中之乳酸鹽濃度的 Student 氏 t-檢驗。此外，為了評估二氫槲皮素與二甲二胍之組合物對標準化之乳酸鹽產製含量的影響，在二氫槲皮素單一藥劑治療組（第 1 和 2 組）及二甲二胍治療組（第 3 和 4 組）之間進行雙因素 ANOVA（雙尾）（因素：組別及濃度）。當二氫槲皮素單一藥劑治療組中之標準化的乳酸鹽產製含量較對照組中者明顯時，該藥劑被評斷為對乳酸鹽產製具有抑制作用。當二甲二胍單一藥劑治療組中之標準化的乳酸鹽產製含量較對照組中者明顯時，該藥劑被評斷為對乳酸鹽產製具有誘導作用。當組合治療組與二甲二胍單一藥劑治療組之間的標準化之乳酸鹽產製含量的差異明顯大於對照組與二氫槲皮素單一藥劑治療組之差異時，二氫槲皮素被定義為對該含量具有抑制效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

與對照組相比較，外消旋體及光學活性二氫槲皮素二者均能抑制 WI-38 中之乳酸鹽的產製。二甲二胍誘導細胞中產製乳酸鹽，而外消旋體及光學活性二氫槲皮素二者均

能顯著抑制此作用（外消旋體；第 4 圖，光學活性；第 5 圖）。

7）結論

在 WI-38 細胞中可觀察到外消旋體和光學活性二氫槲皮素對由二甲二胍所誘導之乳酸鹽的產製具有抑制效果。這指出二氫槲皮素於降低由投予二甲二胍所造成之乳酸酸中毒風險的臨床效用。

[0059]

[實施例 11]

在人胰臟癌細胞株 AsPC-1 中（體外）由二氫槲皮素單一藥劑對與癌細胞增殖相關之傳信途徑的抑制效果

1）測試物質

二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。

2）測試物質之製備方法

將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋之，以製備 5 和 10 毫莫耳/升之二氫槲皮素（最終濃度為 0.5 和 1 毫莫耳/升）。

3）細胞

從 Dainippon 製藥有限公司（現在為 DS PHARMA

BIOMEDICAL 有限公司，In Vitro. 1982；18：24-34）取得源自人胰臟癌之細胞株 AsPC-1。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

接種細胞後第二天加入測試物質，並將該細胞培養 6 小時後再收穫之。測量並評估包含在所製備之全細胞溶胞產物中的相關磷酸-4E-BP1 蛋白量。依下述處理各組（N=3）：

（1）對照（載劑對照）組：含 1%乙醇之培養基

（2）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.5 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 1 毫莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 AsPC-1 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 $1x10^6$ 細胞/毫升。以每孔 0.5 毫升之體積將細胞接種在 12 孔多孔培養盤中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，將含有指定濃度之二氫槲皮素的培養基加入每個孔中。培育 6 小時後以 D-PBS 將每一個孔中之細胞清洗兩次，並使用細胞裂解液製備全細胞溶胞產物。離心後，採取上清液樣本，並以實施例 1 中之相同方式使用 ELISA 套組定量樣本中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白的量。使用

BCA 蛋白分析測量全細胞溶胞產物中之總蛋白的濃度，並參照總蛋白量將每個孔中之相關磷酸-4E-BP1（Thr37/Thr46）蛋白量進行標準化。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估二氫槲皮素在相關磷酸化 4E-BP1 蛋白量方面之劑量依賴關係，進行線性回歸分析。結果，觀察到劑量依賴性。然後，進行對照組與單一藥劑治療組之間的威廉氏試驗（Williams' test）（單尾）。結果，觀察到二氫槲皮素在不低於 0.5 毫莫耳/升之濃度下對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量具有顯著抑制作用。當二氫槲皮素單一藥劑治療組中之相關磷酸-4E-BP1 蛋白量較對照組中者明顯時，該藥劑被判定為對該量具有抑制效果。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

二氫槲皮素顯示出對相關磷酸-4E-BP1 蛋白量具有劑量依賴性抑制效果（第 6 圖）。

7）結論

在 AsPC-1 細胞中觀察到二氫槲皮素單一藥劑對與增殖相關之傳信途徑具有劑量依賴性抑制效果。這指出二氫

槲皮素於癌症化療中的效用。

[0060]

[實施例 12]

在人胰臟癌細胞株 AsPC-1 中（體外）組合使用二甲二胍及二氫槲皮素對癌幹細胞之表面標記的表現之抑制效果

1）測試物質

二甲二胍係從和光純化學工業株式會社購入。二氫槲皮素（（2R,3R）-二氫槲皮素及（2S,3S）-二氫槲皮素之外消旋體）係從 Bionet 購入。吉西他濱係從多倫多研究化學公司購入。

2）測試物質之製備方法

將二甲二胍溶解於蒸餾水中，並以 10%FBS-RPMI1640 培養基稀釋，以製備 15 毫莫耳/升之二甲二胍。將二氫槲皮素溶解於乙醇中，並以培養基稀釋之，以製備 0.3 毫莫耳/升之二氫槲皮素。將吉西他濱溶解於二甲亞碸（DMSO）中，並以培養基稀釋之，以製備 100 毫微莫耳/升之吉西他濱。

3）細胞

從 DS PHARMA BIOMEDICAL 有限公司取得源自人胰臟癌之細胞株 AsPC-1。在 37℃，5%CO_2 的條件下，將

細胞培養在 10%FBS-RPMI1640 培養基中。

4）添加測試物質並測量

依下述處理各組（N=10）：

（1）對照（載劑對照）組：1.5%蒸餾水、0.3%乙醇及含 0.1%DMSO 之培養基

（2）二甲二胍單一藥劑治療組：二甲二胍 15 毫莫耳/升

（3）二氫槲皮素單一藥劑治療組：二氫槲皮素 0.3 毫莫耳/升

（4）二甲二胍・二氫槲皮素組合治療組：二甲二胍 15 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.3 毫莫耳/升

（5）吉西他濱單一藥劑治療組：吉西他濱 100 毫微莫耳/升

（6）二甲二胍・二氫槲皮素・吉西他濱組合治療組：二甲二胍 15 毫莫耳/升+二氫槲皮素 0.3 毫莫耳/升+吉西他濱 100 毫微莫耳/升

以胰蛋白酶將經傳代培養之 AsPC-1 細胞分離，並將其懸浮於新鮮培養基中。使用血細胞計數儀測定該細胞懸浮液中之細胞密度，並將其調整為 2×10^4 細胞/毫升。以每孔 3 毫升之體積將細胞接種在 6 孔多孔培養盤（IWAKI）中，並在 37℃，5%CO_2 的條件下培養一整夜。第二天，以含有指定濃度之各測試物質的培養基更換該培養基，並將細胞培養 72 小時。培養結束時，以胰蛋白酶將細胞分

離，並將其懸浮於新鮮培養基中。以 FACS（螢光活化細胞分類）緩衝液清洗後，以經 FITC 標示之抗人 CD44 抗體及經 APC 標示之抗人 CD24 抗體將細胞染色，並在 4℃下處理 30 分鐘。然後，以 FACS 緩衝液清洗細胞，將細胞通過 40 微米篩網過濾器並使用流式細胞儀（日本 Becton Dickinson 有限公司）測定 CD44 及 CD24 雙陽性細胞之比例。

5）統計分析

結果以平均值（MEAN）±標準差（SD）顯示。

為了評估二甲二胍及二氫槲皮素單一藥劑治療組及組合治療組對 CD44 及 CD24 雙陽性細胞之比例的影響，進行未配對雙因素 ANOVA 來比較對照組與各物質之單一治療組及組合治療組。為了評估吉西他濱單一治療組對 CD44 及 CD24 雙陽性細胞之比例的影響，進行 Student 氏 t-檢驗來比較對照組與吉西他濱單一治療組。此外，為了評估吉西他濱、二甲二胍及二氫槲皮素組合治療組相對於吉西他濱單一治療組而言對 CD44 及 CD24 雙陽性細胞之比例的影響，進行 Student 氏 t-檢驗來比較吉西他濱單一治療組和吉西他濱、二甲二胍及二氫槲皮素組合治療組。使用 SAS 軟體 Release 9.3（日本 SAS 機構）進行分析。當 p 值小於 0.05 時其差異被視為統計上有意義。

6）結果

與對照組相比較，二氫槲皮素單一治療組及二甲二胍和二氫槲皮素組合治療組顯著降低 AsPC-1 細胞中 CD44 和 CD24 雙陽性細胞之比例。與對照組相比較，吉西他濱單一治療組顯著增加 AsPC-1 細胞中 CD44 和 CD24 雙陽性細胞之比例。單獨添加吉西他濱所造成之 CD44 和 CD24 雙陽性細胞之比例增加可經由補充加入二甲二胍及二氫槲皮素而被顯著抑制（第 7 圖）。

7）結論

如在胰臟癌中之癌症幹細胞，胰臟癌細胞株 AsPC-1 中所測定者，在評估 CD24 和 CD44 雙陽性細胞之比例後可觀察到單獨添加二氫槲皮素及組合添加二甲二胍和二氫槲皮素可顯著降低 CD24 和 CD44 雙陽性細胞之比例。相反地，加入吉西他濱可觀察到 CD24 和 CD44 雙陽性細胞之比例顯著增加。此外，上述之藉由單獨添加吉西他濱所造成的 CD24 和 CD44 雙陽性細胞之比例增加可經由組合加入二甲二胍及二氫槲皮素而被顯著降低。這些結果表明，與吉西他濱治療相關之臨床問題（復發風險增加取決於腫瘤幹細胞富集）可經由組合使用吉西他濱和二氫槲皮素或組合使用吉西他濱、二甲二胍及二氫槲皮素來解決。

工業應用性

[0061] 根據本發明，經由組合二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽及二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽可提供用

來作為抗惡性腫瘤藥之具有協同之抗惡性腫瘤效果及減少副作用的藥劑。

[0062] 本申請案係以在日本提交之專利申請案編號2013-110278為基礎，其全部內容納入本文。

201906603

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽、或含有彼之組合物的醫藥用途

PHARMACEUTIAL USES OF DIHYDROQUERCETIN OR A PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF OR COMBINATIONS CONTAINING THE SAME

【中文】

本發明提供一種新穎藥物，其能夠減少二甲二胍（metformin）或其醫藥上可接受之鹽的副作用，並可作為抗惡性腫瘤劑，其中係將二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽與二氫槲皮素（dihydroquercetin）或其醫藥上可接受之鹽組合。

【英文】

Provided is a novel medicament capable of reducing the side effects of metformin or a pharmaceutically acceptable salt thereof and useful as an anti-malignant tumor agent, in which metformin or a pharmaceutically acceptable salt thereof and dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof are combined.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(１)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於製造用於減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用之藥劑的用途。

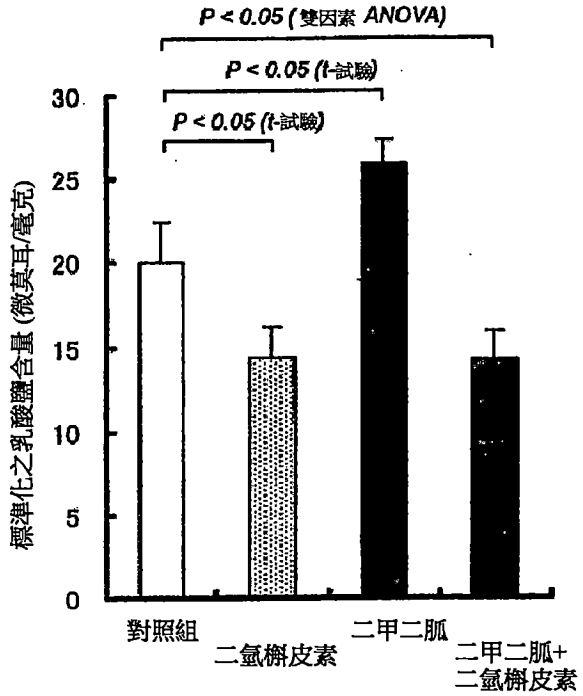
2. 一種二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於製造二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的抗惡性腫瘤作用之增強劑的用途。

3. 一種與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用之二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於製造用於減少二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽的副作用之藥劑的用途。

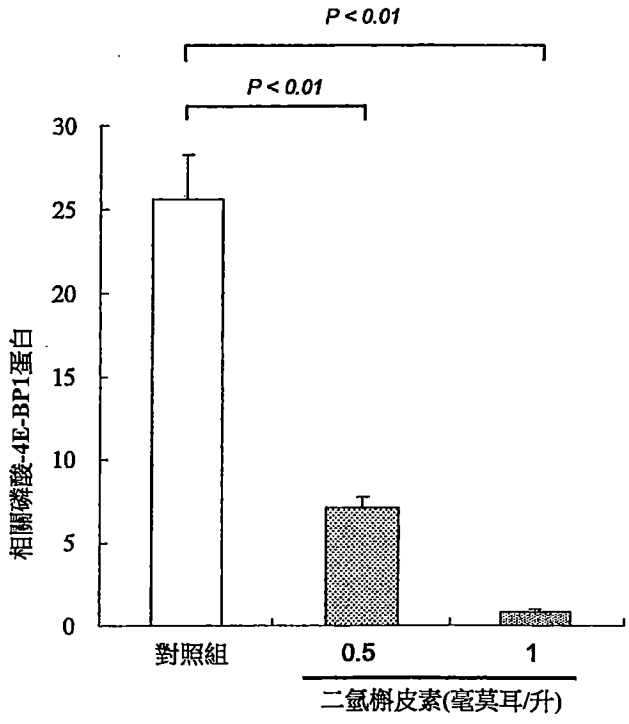
4. 一種與二甲二胍或其醫藥上可接受之鹽組合使用之二氫槲皮素或其醫藥上可接受之鹽於製造抗惡性腫瘤作用之增強劑的用途。

5. 如申請專利範圍第 2 或 4 項之用途，其中該惡性腫瘤選自由肺癌、胰臟癌、肝癌、乳癌、前列腺癌、膽管癌及卵巢癌所組成之群組。

第 5 圖


P < 0.05 (雙因素 ANOVA)
P < 0.05 (t-試驗)
P < 0.05 (t-試驗)
標準化之乳酸鹽含量 (微莫耳/毫克)
30
25
20
15
10
5
0
對照組
二氫槲皮素
二甲二胍
二甲二胍+
二氫槲皮素

第 6 圖


P < 0.01
P < 0.01
相關磷酸-4E-BP1蛋白
30
25
20
15
10
5
0
對照組
0.5
1
二氫槲皮素(毫莫耳/升)