



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/155 (2006.01); A61K 31/352 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015155283, 23.05.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.05.2014

Дата регистрации:  
01.11.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
24.05.2013 JP 2013-110278

(43) Дата публикации заявки: 29.06.2017 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 01.11.2018 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 24.12.2015

(86) Заявка РСТ:  
JP 2014/064354 (23.05.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/189152 (27.11.2014)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КИЙОНО Кунихико (JP),  
ОНИСИ Кендзи (JP),  
НАГАХАМА Ясухару (JP),  
БАТАНАБЕ Такаси (JP)

(73) Патентообладатель(и):

РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ФОР  
НЬЮТРИШН ЭНД ЭДЖИНГ КО., ЛТД.  
(JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: NAOMI OI et all. Taxifolin  
suppresses UV-induced skin carcinogenesis by  
targeting EGFR and PI3-K //Cancer Prev Res  
(Philla.), 2012 Sep, 5(9): 1103-114.  
TAXIARCHIS V. et all. Metformin angd  
cancer: new applications for an old drug //  
Med.oncol, published online: 08.February 2010,  
DOI 10.1007/s112032-011-9846-7. WO  
2012166008 A1, 06.12.2012. JUNICHI (см.  
прод.)

## (54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ МЕТРОФОРМИН И ДИГИДРОКВЕРЦЕНИН, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к средству для профилактики или лечения злокачественной опухоли, такой как рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника. Комбинация, предназначенная для профилактики или лечения злокачественной опухоли, которая включает метформин или его фармацевтически приемлемую соль и

дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль, где злокачественной опухолью являются рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника, и содержание метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации составляет 1-600 моль метформина или его фармацевтически

приемлемой соли на 1 моль дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли. Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с метформином или его фармацевтически приемлемой солью для приготовления комбинации. Способ профилактики или лечения злокачественной опухоли, включающий введение комбинации индивидууму, нуждающемуся в этом. Лекарственное средство для профилактики или лечения рака поджелудочной железы. Способ профилактики или лечения рака поджелудочной железы. Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения рака поджелудочной железы в составе комбинации. Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного препарата для

профилактики или лечения рака поджелудочной железы. Лекарственное средство для профилактики или лечения злокачественной опухоли, содержащее метформин или его фармацевтически приемлемую соль, предназначенное для применения в составе комбинации. Лекарственное средство для профилактики или лечения злокачественной опухоли, содержащее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль, предназначенное для применения в составе комбинации. Вышеописанные средства обладают неожиданной терапевтической активностью в отношении профилактики или лечения злокачественной опухоли, такой как рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника. 9 н. и 5 з.п. ф-лы, 7 ил., 8 табл., 12 пр.

(56) (продолжение):

**MATSUO et al. Hyperactivation of 4E-Binding protein 1 as a mediator of biguanide-Induced Cytotoxicity during Glucose derivation //Therapeutic discovery, published: may 2012, DOI 10.1158/1535-7163.MCT-11-0871. MORIDANI MY et al. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor //Chem Biol Interact. 2002 Mar 20, 139(3):251-64.**

R U 2 6 7 1 4 8 8 C 2

R U 2 6 7 1 4 8 8 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/155 (2006.01); A61K 31/352 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01)

(21)(22) Application: 2015155283, 23.05.2014

(24) Effective date for property rights:  
23.05.2014Registration date:  
01.11.2018

Priority:

(30) Convention priority:  
24.05.2013 JP 2013-110278

(43) Application published: 29.06.2017 Bull. № 19

(45) Date of publication: 01.11.2018 Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: 24.12.2015

(86) PCT application:  
JP 2014/064354 (23.05.2014)(87) PCT publication:  
WO 2014/189152 (27.11.2014)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i  
Partnery"

(72) Inventor(s):

KIJONO Kunikhiko (JP),  
ONISI Kendzi (JP),  
NAGAKHAMA Yasukharu (JP),  
VATANABE Takasi (JP)

(73) Proprietor(s):

RISERCH INSTITYUT FOR NYUTRISHN  
END EDZHING KO., LTD. (JP)

(54) PHARMACEUTICAL COMBINATION COMPRISING METFORMIN AND DIHYDROQUERCETIN AND ITS USE FOR TREATMENT OF CANCER

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the pharmaceutical industry, and more particularly to an agent for the prevention or treatment of a malignant tumor such as lung cancer, liver cancer, bile duct cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, breast cancer or ovarian cancer. Disclosed is a combination for the prevention or treatment of a cancer that comprises metformin or a pharmaceutically acceptable salt thereof and dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the malignant tumor is lung cancer, liver cancer, bile duct cancer, pancreatic cancer, prostate

cancer, breast cancer or ovarian cancer, and the content of metformin or a pharmaceutically acceptable salt thereof and dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof in combination is 1–600 moles of metformin

or a pharmaceutically acceptable salt thereof per 1 mole of dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Use of dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof in combination with metformin or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the preparation of the combination. Method for preventing or treating a malignant tumor, comprising

administering a combination to an individual in need thereof. Drug for the prevention or treatment of pancreatic cancer. Method for the prevention or treatment of pancreatic cancer. Use of dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof as a medication for the prevention or treatment of pancreatic cancer as a combination thereof. Use of dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the preparation of a medication for the prevention or treatment of pancreatic cancer. Medication for the prevention or treatment of a malignant tumor

comprising metformin or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in combination. Medication for the prevention or treatment of a malignant tumor, comprising dihydroquercetin or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in combination.

EFFECT: above described agents have unexpected therapeutic activity in the prevention or treatment of a malignant tumor such as lung cancer, liver cancer, bile duct cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, breast cancer or ovarian cancer.

14 cl, 7 dwg, 8 tbl, 12 ex

R U 2 6 7 1 4 8 8 C 2

R U 2 6 7 1 4 8 8 C 2

**Область, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к лекарственному препарату, который содержит комбинацию метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли.

**Предшествующий уровень техники**

В патентном документе 1 описан метод лечения и предупреждения метаболических расстройств и других заболеваний путем введения пиренового аналога или его производного в комбинации с одним или более дополнительными агентами, такими как, например, агенты, снижающие уровень липидов, или агенты, снижающие уровень глюкозы в крови. В указанном документе, одним из описанных примеров аналога пирона является таксифолин, а одним из описанных примеров агента, снижающего уровень глюкозы, является метформин. Однако, в этом документе не описан какой-либо конкретный пример комбинации метформина и таксифолина, а также не описано синергическое действие лекарственного препарата, содержащего такую комбинацию, против злокачественных опухолей, или действие, подавляющее молочный ацидоз.

[Список документов]

[Патентный документ]

Патентный документ 1: WO 2010/042886

**Описание сущности изобретения****Проблемы, которые могут быть решены с помощью настоящего изобретения**

Гидрохлорид метформина является коммерчески доступным соединением и представляет собой бигуанидное гипогликемическое средство для перорального введения, которое, как известно, активирует АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК).

В последние годы появились сообщения, что соединение, активирующее АМРК (АМРК-активирующий агент), такое как метформин, фенформин, олигомицин, динитрофенол, 2-дезоксиглюкоза, 5-аминоимидазол-4-карбоксиамид-рибонуклеотид, пероксид водорода, сорбит, кальцимицин, 4-гидрокси-3-(2'-гидроксибифенил-4-ил)-6-оксо-6,7-дигидротиено[2,3-b]пиридин-5-карбонитрил (А-769662), галегин, троглитазон, фенобарбитал, кверцетин, ресвератрол, берберин и т.п., обладают действием, направленным против злокачественных опухолей, при введении этих соединений отдельно или в комбинации с уже известными противораковыми средствами, а также рассматривалась возможность применения этих соединений для разработки лекарственного средства, направленного против злокачественных опухолей.

Однако, как указывалось выше, применение АМРК-активирующих средств, таких как метформин, фенформин, 5-аминоимидазол-4-карбоксиамид-рибонуклеотид, сорбит, кальцимицин, А-769662, галегин, троглитазон и т.п., связано с проблемами, заключающимися в развитии тяжелого молочного ацидоза у пациентов, принимающих эти лекарственные средства.

Задача настоящего изобретения состоит в получении нового лекарственного препарата, который способен снижать побочные эффекты, вызываемые метформином или его фармацевтически приемлемой солью, и который может быть использован в качестве лекарственного средства против злокачественных опухолей.

Известно, что метформин подавляет раковые стволовые клетки. Было высказано предположение, что такой лекарственный препарат, который подавляет раковые стволовые клетки, будет не только действовать против злокачественных опухолей, но также будет способствовать предупреждению развития метастазов рака и предупреждению рецидивов рака.

Целью настоящего изобретения является разработка нового лекарственного

препарата, который обладает действием, направленным на подавление раковых стволовых клеток, и который может быть использован в качестве лекарственного средства против злокачественных опухолей.

#### Способы решения указанных проблем

5 В попытке решить вышеупомянутые проблемы, авторами настоящего изобретения были проведены интенсивные исследования, в результате которых было обнаружено, что введение комбинации метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли, будет приводить к предотвращению повышения уровня молочной кислоты в крови, индуцируемого метформином или его фармацевтически приемлемой солью. Кроме того, авторами  
10 настоящего изобретения было обнаружено, что комбинация метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли заметно усиливает действие метформина или его фармацевтически приемлемой соли, направленное против злокачественных опухолей.

15 Авторами настоящего изобретения было также обнаружено, что дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль являются эффективными средствами для профилактики или лечения рака поджелудочной железы.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль являются эффективными средствами для  
20 подавления раковых стволовых клеток поджелудочной железы.

Исходя из этих данных, авторами настоящего изобретения были проведены дополнительные исследования, которые были положены в основу настоящего изобретения.

В соответствии с этим, настоящее изобретение включает нижеследующие объекты.

25 [1] Лекарственное средство, которое включает комбинацию метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли, где метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль содержатся в одном препарате, либо метформин или его фармацевтически приемлемую соль и  
30 дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль изготовлены в виде отдельных фармацевтических композиций и использованы в комбинации.

[2] Лекарственное средство по вышеуказанному пункту [1], где метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль содержатся в одном препарате.

35 [3] Лекарственное средство по вышеуказанному пункту [1], где метформин или его фармацевтически приемлемую соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль изготовлены в виде отдельных фармацевтических композиций и использованы в комбинации.

[4] Лекарственное средство по любому из вышеуказанных пунктов [1]-[3],  
40 предназначенное для профилактики или лечения злокачественной опухоли.

[5] Лекарственное средство по вышеуказанному пункту [4], где злокачественной опухолью являются опухоль головного мозга у детей, выбранная из группы, состоящей из астроглиомы, злокачественной медуллобластомы, опухоли зародышевых клеток, краниофарингиомы и эпендимомы; опухоль головного мозга у взрослых, выбранная  
45 из группы, состоящей из глиомы, глиальной опухоли, менингиомы, аденомы гипофиза и невриномы; рак головы и шеи, выбранный из группы, состоящей из рака челюстного синуса, рака носоглотки, рака гортани, рака ротовой полости, рака губы, рака языка и рака околоушной железы; рак и опухоль грудной клетки, выбранные из группы,

состоящей из мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легких, аденоматоза легких и мезотелиомы; рак и опухоль желудочно-кишечного тракта, выбранные из группы, состоящей из рака пищевода, рака печени, первичного рака печени, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака желудка, рака прямой и ободочной кишки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака поджелудочной железы и опухоли эндокринной системы поджелудочной железы; рак и опухоль мочеполовых путей, выбранные из группы, состоящей из рака пениса, рака почечной лоханки, рака мочеоточника, почечноклеточного рака, рака яичек, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, опухоли Вильмса и рака уротелиальной системы; рак и опухоль женских половых органов, выбранные из группы, состоящей из рака вульвы, рака шейки матки, рака тела матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака хориона, рака влагалища, рака молочной железы, рака яичника и опухоли зародышевых клеток яичника; саркома мягких тканей у взрослых и детей; опухоль кости, выбранная из группы, состоящей из остеосаркомы и опухоли Юинга; рак и опухоль эндокринной ткани, выбранные из группы, состоящей из рака коры надпочечника и рака щитовидной железы; злокачественная лимфома и лейкоз, выбранные из группы, состоящей из злокачественной лимфомы, неходжкинской лимфомы, болезни Ходжкина, множественной миеломы, опухоли клеток плазмы, острого миелоидного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, Т-клеточной лимфомы взрослых, хронического миелоидного лейкоза и хронического лимфоцитарного лейкоза; и рак и опухоль кожи, выбранные из группы, состоящей из хронического миелопролиферативного заболевания, злокачественной меланомы, плоскоклеточного рака, базальноклеточного рака и грибовидного микоза.

[6] Лекарственное средство по любому из вышеуказанных пунктов [1]-[5], применяемое для лечения пациента, который является невосприимчивым к лечению другим лекарственным средством против злокачественной опухоли, не являющимся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью.

[7] Лекарственное средство по любому из вышеуказанных пунктов [1]-[5], которое содержит комбинацию лекарственных средств против злокачественной опухоли одного или более видов, не являющихся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью.

[8] Лекарственное средство по вышеуказанному пункту [6] или [7], где указанное лекарственное средство против злокачественной опухоли, не являющееся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью, представляет собой лекарственное средство, нацеленное на молекулу-мишень; алкилирующий агент; ингибитор метаболизма; растительный алкалоид; противораковый антибиотик; гормон или иммунотерапевтическое средство.

[9] Комерческая упаковка, содержащая лекарственное средство по любому из вышеуказанных пунктов [1]-[8] и имеющая отпечатанную инструкцию, в которой указано, что данное лекарственное средство может или должно быть применено для профилактики или лечения злокачественной опухоли.

[10] Средство для снижения побочного эффекта метформина или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное средство содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента.

[11] Усилитель действия метформина или его фармацевтически приемлемой соли против злокачественной опухоли, где указанный усилитель содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента.

[12] Средство для снижения побочного эффекта метформина или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное средство содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, используемого в комбинации с метформином или его фармацевтически приемлемой солью.

5 [13] Усилитель действия, направленного против злокачественной опухоли, где указанный усилитель содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, используемого в комбинации с метформином или его фармацевтически приемлемой солью.

10 [14] Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с метформином или его фармацевтически приемлемой солью для приготовления лекарственного препарата для профилактики или лечения злокачественной опухоли.

15 [15] Способ профилактики или лечения злокачественной опухоли, включающий введение метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом, где метформин или его фармацевтически приемлемую соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде одного препарата, либо их вводят в виде отдельных препаратов одновременно или в различные периоды времени.

20 [16] Лекарственное средство для профилактики или лечения рака поджелудочной железы, включающее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента.

[17] Способ профилактики или лечения рака поджелудочной железы, включающий введение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом.

25 [18] Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения рака поджелудочной железы.

[19] Дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль, применяемые для профилактики или лечения рака поджелудочной железы.

30 [20] Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного препарата для профилактики или лечения рака поджелудочной железы.

35 [21] Ингибитор раковых стволовых клеток поджелудочной железы, содержащий дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента.

[22] Способ подавления роста раковых стволовых клеток поджелудочной железы, включающий введение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом.

40 [23] Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в качестве ингибитора роста раковых стволовых клеток поджелудочной железы.

[24] Дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль, применяемые для подавления роста раковых стволовых клеток поджелудочной железы.

[25] Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли для продуцирования ингибитора раковых стволовых клеток поджелудочной железы.

45 [26] Лекарственное средство, содержащее метформин или его фармацевтически приемлемую соль и используемое в комбинации с дигидрокверцетином или его фармацевтически приемлемой солью.

[27] Лекарственное средство, содержащее дигидрокверцетин или его фармацевтически

приемлемую соль и используемое в комбинации с метформином или его фармацевтически приемлемой солью.

### **Эффект настоящего изобретения**

Лекарственное средство согласно изобретению, содержащее комбинацию метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли, обладает синергическим действием, направленным против злокачественной опухоли, а поэтому оно может быть использовано в качестве лекарственного средства против злокачественной опухоли.

Лекарственное средство согласно изобретению представляет собой безопасное лекарственное средство, которое снижает степень молочного ацидоза, так как дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль предотвращают повышение уровня молочной кислоты в крови, индуцируемое метформином или его фармацевтически приемлемой солью.

Поскольку лекарственное средство согласно изобретению обладает синергическим действием, направленным против злокачественной опухоли, то это позволяет снижать уровень вводимых доз, и, как предполагается, предотвращать появление побочных эффектов.

Лекарственное средство согласно изобретению, содержащее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, может быть использовано в качестве профилактического или терапевтического средства для предупреждения или лечения рака поджелудочной железы.

Гемцитабин, который представляет собой лекарственное средство первого ряда, используемое для лечения рака поджелудочной железы, стимулирует рост раковых стволовых клеток поджелудочной железы, на что указывают результаты,

представленные ниже в примере 12.

Лекарственное средство согласно изобретению, обладающее синергическим действием, снижающим число раковых стволовых клеток поджелудочной железы, является особенно подходящим для профилактики или лечения рака поджелудочной железы. Кроме того, предполагается, что использование комбинации лекарственного средства согласно изобретению и гемцитабина позволит решить проблемы, связанные с увеличением числа раковых стволовых клеток и повышением риска возникновения рецидивов в случае проведения лечения гемцитабином, а поэтому, такая комбинация является особенно подходящей для ее применения в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения рака поджелудочной железы.

Лекарственное средство согласно изобретению, содержащее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, обладает действием, снижающим число раковых стволовых клеток поджелудочной железы. Поэтому, такое лекарственное средство может быть использовано для профилактики или лечения рака поджелудочной железы, и, как предполагается, для предупреждения метастазов или рецидивов рака поджелудочной железы.

### **Краткое описание графического материала**

На фиг. 1 представлены результаты, полученные как описано в примере 1.

На фиг. 2 представлены результаты, полученные как описано в примере 2.

На фиг. 3 представлены результаты, полученные как описано в примере 3.

На фиг. 4 представлены результаты, полученные с использованием рацемата дигидрокверцетина ((2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) как описано в примере 10.

На фиг. 5 представлены результаты, полученные с использованием оптически

активного дигидрокверцетина ((2R,3R)-дигидрокверцетина) как описано в примере 10.

На фиг. 6 представлены результаты, полученные как описано в примере 11.

На фиг. 7 представлены результаты, полученные как описано в примере 12. На этой фигуре, Met означает метформин, DHQ означает дигидрокверцетин, а Gem означает гемцитабин.

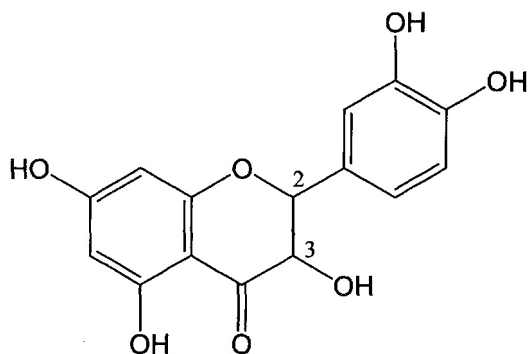
#### Описание вариантов осуществления изобретения

##### (I) Применение комбинации метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли

Примерами фармацевтически приемлемых солей метформина являются соль неорганической кислоты, соль органической кислоты, соль кислотной аминокислоты и т.п.

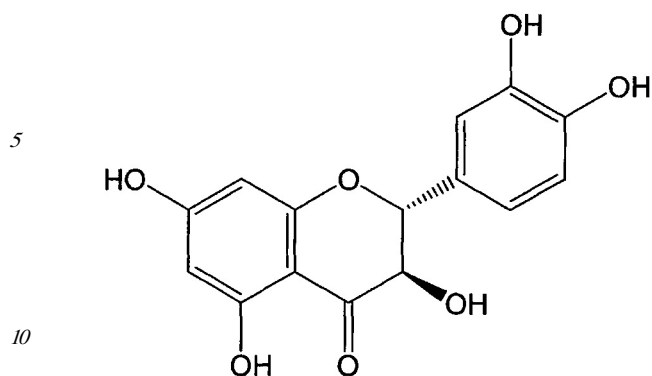
Примерами солей неорганической кислоты являются соли хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, азотной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты и т.п. Примерами солей органической кислоты являются соли муравьиной кислоты, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты, фумаровой кислоты, щавелевой кислоты, винной кислоты, малеиновой кислоты, лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты, метансульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, п-толуолсульфоновой кислоты и т.п. Примерами солей кислотной аминокислоты являются соли аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и т.п. Из этих солей, особенно предпочтительным является гидрохлорид.

Дигидрокверцетин представляет собой соединение, в котором двойная связь между 2-положением и 3-положением пиранового кольца кверцетина является восстановленной, где указанное соединение имеет следующую формулу:



Дигидрокверцетин имеет 4 стереоизомера с 2 асимметричными атомами углерода (во 2-положении и в 3-положении хроманового кольца)((2R,3R)-дигидрокверцетин, (2S,3S)-дигидрокверцетин, (2R,3S)-дигидрокверцетин, (2S,3R)-дигидрокверцетин). Хотя дигидрокверцетин согласно изобретению может представлять собой комбинацию одного или более видов этих изомеров или рацемат этих изомеров (например, смесь (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина), однако, предпочтительным является рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина, и (2R,3R)-дигидрокверцетин, а особенно предпочтительным является (2R,3R)-дигидрокверцетин.

Известно, что из этих изомеров, изомер (2R,3R)-дигидрокверцетин, представленный следующей формулой:



содержится в лиственнице сибирской (*Larix sibirica*) и называется также таксифолином. В настоящем изобретении могут быть использованы природные вещества, такие как таксифолин, экстрагируемый известным методом, и др., но могут быть также использованы и коммерчески доступные продукты.

Примерами фармацевтически приемлемых солей дигидрокверцетина являются соли неорганического основания, соли органического основания, соли основной аминокислоты и т.п.

Примерами солей неорганического основания являются соли щелочного металла, такого как натрий, калий и т.п., соли щелочноземельного металла, такого как кальций, магний и т.п., а также соли алюминия, аммония и т.п. Примерами солей органического основания являются соли триметиламина, триэтиламина, пиридина, пиколина, этаноламина, диэтанолamina, триэтанолamina, дициклогексиламина, N,N-дибензилэтилендиаминa и т.п. Примерами солей основной аминокислоты являются соли аргинина, лизина, орнитина и т.п. Примерами предпочтительных солей являются соли щелочного металла и щелочноземельного металла.

Метформин и его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин и его фармацевтически приемлемая соль, используемые в настоящем изобретении, также включают соединения, помеченные одним и тем же изотопом, где один или более атомов заменены одним или более атомами, имеющими конкретную атомную массу или конкретное массовое число. Примерами изотопов, которые могут быть включены в эти соединения, являются изотоп водорода, углерода, азота, кислорода, серы, фтора и хлора, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  и т.п. Конкретное помеченное изотопом соединение, содержащее вышеупомянутый изотоп и/или другой изотоп другого атома, например, соединение, имеющее радиоактивный изотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  и т.п., может быть использовано в анализе на распределение лекарственного средства в ткани и/или в анализе на распределение субстрата в ткани. Меченный тритием (то есть,  $^3\text{H}$ ) изотоп и изотоп углерод-14 (то есть,  $^{14}\text{C}$ ) являются особенно предпочтительными с точки зрения простоты их получения и детектирования. Кроме того, предполагается, что замена тяжелым изотопом, таким как дейтерий (то есть,  $^2\text{H}$ ) и т.п., будет приводить к повышению метаболической стабильности, что может, например, сообщать особые преимущества при лечении, а именно, приводить к увеличению времени полужизни *in vivo* или к снижению необходимой дозы лекарственного средства.

В лекарственном средстве согласно изобретению, метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически

приемлемая соль используются в комбинации. В лекарственном средстве согласно изобретению, метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль могут быть приготовлены отдельно и использованы одновременно, либо они могут содержаться в одном и том же препарате.

5 Альтернативно, метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль могут быть приготовлены отдельно и введены одному индивидууму одновременно или в различные периоды времени одним и тем же способом или различными способами. То есть, лекарственное средство согласно изобретению представляет собой лекарственное средство, содержащее  
10 метформин или его фармацевтически приемлемую соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в одном препарате, и лекарственное средство, полученное с использованием комбинации фармацевтической композиции, содержащей метформин или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтической композиции, содержащей дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль, которые  
15 были приготовлены отдельно.

Лекарственное средство согласно изобретению может быть приготовлено, например, в виде фармацевтической композиции, такой как таблетка (включая таблетку с сахарным покрытием и таблетку с пленочным покрытием), порошок, гранулы, капсулы (включая мягкую капсулу), жидкость, инъекция, суппозитории, препарат пролонгированного  
20 высвобождения (например, микрокапсулы пролонгированного высвобождения) или препарат быстрого высвобождения, например, путем смешивания метформина или его фармацевтически приемлемой соли и/или дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли с фармакологически приемлемым носителем известным методом, с последующим безопасным введением этой композиции перорально или парентерально  
25 (например, местно, ректально, внутривенно и т.п.). Инъекция может быть введена внутривенно, внутримышечно, подкожно или вовнутрь органа, либо она может быть введена непосредственно в участок поражения.

Примерами фармакологически приемлемых носителей, которые могут быть использованы для приготовления лекарственного средства согласно изобретению, являются различные стандартные органические или неорганические вещества-носители,  
30 такие как наполнитель, замасливатель, связующий агент и дезинтегратор для твердых препаратов, а также растворитель, солюбилизаторы, суспендирующий агент, агент, придающий изотоничность, забуферивающий агент и смягчитель для жидких препаратов и т.п. Кроме того, при необходимости могут быть также использованы соответствующие  
35 количества обычно используемых добавок, таких как консервант, антиоксидант, краситель, подсластитель, адсорбент, смачивающий агент и т.п.

Примерами наполнителей являются лактоза, сахароза, D-маннит, крахмал, кукурузный крахмал, кристаллическая целлюлоза, легкая безводная кремниевая кислота и т.п.

40 Примерами замасливателей являются стеарат магния, стеарат кальция, тальк, коллоидная двуокись кремния и т.п.

Примерами связующих агентов являются кристаллическая целлюлоза, сахароза, D-маннит, декстрин, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, крахмал, желатин, метилцеллюлоза, натрий-содержащая  
45 карбоксиметилцеллюлоза и т.п.

Примерами дезинтегрантов являются крахмал, карбоксиметилцеллюлоза, кальций-содержащая карбоксиметилцеллюлоза, натрий-содержащий карбоксиметилированный крахмал, L-гидроксипропилцеллюлоза и т.п.

Примерами растворителей являются вода для инъекций, спирт, пропиленгликоль, макрогол, кунжутное масло, кукурузное масло, оливковое масло и т.п.

Примерами солюбилизаторов являются полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, D-маннит, бензинбензоат, этанол, триаминометан, холестерин, триэтаноламин, карбонат натрия, цитрат натрия и т.п.

Примерами суспендирующих агентов являются поверхностно-активные вещества, такие как стеарилтриэтаноламин, лаурилсульфат натрия, лауриламинопропионовая кислота, лецитин, хлорид бензалкония, хлорид бензэтония, моностеарат глицерина и т.п.; гидрофильные полимеры, такие как поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, натрий-содержащая карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и т.п., и т.п.

Примерами агентов, придающих изотоничность, являются глюкоза, D-сорбит, хлорид натрия, глицерин, D-маннит и т.п.

Примерами забуферивающих агентов являются буферы, такие как фосфат, ацетат, карбонат, цитрат и т.п.

Примерами смягчителей являются бензиловый спирт и т.п.

Примерами консервантов являются параоксибензоаты, хлорбутанол, бензиловый спирт, фенетиловый спирт, дегидроуксусная кислота, сорбиновая кислота и т.п.

Примерами антиоксидантов являются сульфит, аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -токоферол и т.п.

Содержание метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в лекарственном средстве согласно изобретению может быть соответствующим образом выбрано в зависимости от формы препарата и т.п.

Так, например, содержание метформина в лекарственном средстве согласно изобретению, включающем метформин и дигидрокверцетин в одном препарате, обычно составляет приблизительно от 0,01 до 99,99 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 0,1 до 50 масс.% по отношению ко всему препарату, а содержание дигидрокверцетина обычно составляет приблизительно от 0,01 до 99,99 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 0,1 до 50 масс.% по отношению ко всему препарату.

Относительное содержание метформина и дигидрокверцетина в лекарственном средстве согласно изобретению составляет приблизительно 0,0005-300 частей по массе, предпочтительно, приблизительно 0,5-300 частей по массе, более предпочтительно, приблизительно 0,5-100 частей по массе, еще более предпочтительно, приблизительно 2,5-50 частей по массе, а особенно предпочтительно, приблизительно 2,5-10 частей по массе метформина на 1 часть по массе дигидрокверцетина.

Кроме того, относительное содержание метформина и дигидрокверцетина в лекарственном средстве согласно изобретению составляет приблизительно 1-600 моль, предпочтительно, приблизительно 1-200 моль, более предпочтительно, приблизительно 5-100 моль, а еще более предпочтительно, приблизительно 5-20 моль метформина на 1 моль дигидрокверцетина.

Хотя содержание добавок, таких как носитель и т.п. в лекарственном средстве согласно изобретению варьируется в зависимости от формы препарата, однако, обычно, оно составляет приблизительно от 1 до 99,99 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 10 до 90 масс.% по отношению ко всему препарату.

Если метформин и дигидрокверцетин приготавливают отдельно, то содержание метформина в препарате, включающем метформин, обычно составляет приблизительно

от 0,01 до 100 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 0,1 до 90 масс.% по отношению ко всему препарату, а содержание дигидрокверцетина в препарате, включающем дигидрокверцетин, обычно составляет приблизительно от 0,01 до 100 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 0,1 до 90 масс.% по отношению ко всему

5 препарату. Содержание добавок, таких как носитель и т.п., указано выше.

Относительное содержание метформина и дигидрокверцетина, если их приготавливают отдельно, обычно составляет приблизительно 0,0005-300 частей по массе, предпочтительно, приблизительно 0,5-300 частей по массе, более предпочтительно, приблизительно 0,5-100 частей по массе, еще более предпочтительно, приблизительно

10 2,5-50 частей по массе, а особенно предпочтительно, приблизительно 2,5-10 частей по массе метформина на 1 часть по массе дигидрокверцетина.

Кроме того, относительное содержание метформина и дигидрокверцетина, если их приготавливают отдельно, составляет приблизительно 0,001-600 моль, предпочтительно, приблизительно 1-600 моль, более предпочтительно, приблизительно 1-200 моль, еще

15 более предпочтительно, приблизительно 1-100 моль, а наиболее предпочтительно, приблизительно 5-20 моль метформина на 1 моль дигидрокверцетина.

В случае использования фармацевтически приемлемой соли метформина и/или фармацевтически приемлемой соли дигидрокверцетина, содержание этих солей в препарате и их относительное содержание составляет в пределах, указанных выше для

20 метформина и дигидрокверцетина.

Эти препараты могут быть получены известным методом, обычно применяемым в стадиях приготовления таких препаратов.

В случае инъекций, препараты для инъекций (например, препарат Captisol) могут быть получены, например, путем приготовления водной инъекции метформина или его

25 фармацевтически приемлемой соли и/или дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли вместе с диспергирующими агентами (например, твином 80 (изготавливаемым Atlas Powder, USA), HCO 60 (изготавливаемым Nikko Chemicals),

полиэтиленгликолем, карбоксиметилцеллюлозой, альгинатом натрия, гидроксипропилметилцеллюлозой, декстрином и т.п.), со стабилизаторами (например,

30 аскорбиновой кислотой, пирросульфитом натрия и т.п.), с поверхностно-активными веществами (например, полисорбатом 80, макроголом и т.п.), с солюбилизаторами (например, глицерином, этанолом, Каптизолом (торговый знак натриевой соли

сульфобутилового эфира- $\beta$ -циклодекстрина) и т.п.), с забуферивающими агентами (например, лимонной кислотой; фосфорной кислотой и солями щелочных металлов,

35 образованных этими кислотами; лимонной кислотой и солями щелочных металлов, образованных этой кислотой и т.п.), с агентами, придающими изотоничность (например, хлоридом натрия, хлоридом калия, маннитом, сорбитом, глюкозой и т.п.), с агентами, корректирующими pH (например, хлористоводородной кислотой, гидроксидом натрия и т.п.), с консервантами (например, этилпарагидроксibenзоатом, бензойной кислотой,

40 метил-п-гидроксibenзоатом, пропил-п-гидроксibenзоатом, бензиловым спиртом и т.п.), с растворителями (например, концентрированным глицерином, меглумином и т.п.), с солюбилизаторами (например, пропиленгликолем, сахарозой и т.п.), с

мягчителями (например, глюкозой, бензиловым спиртом и т.п.) и т.п. или приготовления масляной инъекции путем растворения, суспендирования или эмульгирования указанных

45 соединений в растительном масле, таком как оливковое масло, кунжутное масло, масло из семян хлопчатника, кукурузное масло и т.п., или в солюбилизаторе, таком как пропиленгликоль и т.п.

В случае использования препарата для перорального введения (таблетки), например,

такой препарат может быть получен путем смешивания метформина или его фармацевтически приемлемой соли и/или дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли с наполнителями (например, лактозой, сахарозой, крахмалом, кукурузным крахмалом и т.п.), с дезинтеграторами (например, крахмалом, карбонатом кальция и т.п.), со связующими агентами (например, крахмалом, аравийской камедью, карбоксиметилцеллюлозой, поливинилпирролидоном, гидроксипропилцеллюлозой, желатином и т.п.), с замасливателями (например, тальком, стеаратом магния, полиэтиленгликолем 6000 и т.п.) и т.п., с последующим прямым прессованием смеси и, если это необходимо, с нанесением покрытия известным методом маскировки вкуса, например, нанесением энтеросолюбильного покрытия или покрытия пролонгированного действия.

Примерами используемых здесь агентов для нанесения покрытий являются гидроксипропилметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, полиоксиэтиленгликоль, твин 80, плуроник F68, ацетат-фталат целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-сукцинат гидроксиметилцеллюлозы, Эвдрагит (изготавливаемый Rohm, Germany, сополимер метакриловой кислоты и акриловой кислоты) и краситель (например, красный железистоокисный (3), диоксид титана и т.п.) и т.п. Примерами сахарных покрытий являются сахароза, тальк, аравийская камедь, краситель (например, красный железистоокисный (3), диоксид титана и т.п.), полирующий агент (например, пчелиный воск и т.п.) и т.п.

В случае использования суппозиторий, например, метформин или его фармацевтически приемлемая соль и/или дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль могут быть приготовлены известным методом в виде маслянистых или водных твердых, полутвердых или жидких суппозиторий с использованием субстратов, таких как маслянистые основы (например, глицериды высших жирных кислот [например, масло какао, витепсолы (изготавливаемые Dynamitnovel Ltd., Germany) и т.п.], жирные кислоты с цепью средней длины [например, миглиолы (изготавливаемые Dynamitnovel Ltd., Germany) и т.п.], растительные масла (например, кунжутное масло, соевое масло, масло из семян хлопчатника и т.п.) и т.п.), водные основы (например, полиэтиленгликоли, пропиленгликоль и т.п.), водные гелевые основы (например, натуральные смолы, производное целлюлозы, виниловый полимер, полимер акриловой кислоты и т.п.) и т.п.

Лекарственное средство согласно изобретению не дает каких-либо значительных побочных эффектов и является безопасным при введении человеку и животным (например, мышам, крысам, кроликам, собакам, кошкам, коровам, лошадям, свиньям, обезьянам и т.п.).

Доза лекарственного средства согласно изобретению может быть соответствующим образом выбрана в зависимости от цели применения, возраста и пола пациента, тяжести заболевания и т.п. Доза лекарственного средства согласно изобретению для взрослого пациента (с массой тела 60 кг) в день обычно составляет приблизительно 250-3000 мг, предпочтительно, 500-2250 мг метформина или его фармацевтически приемлемой соли, и приблизительно 40-1200 мг, а предпочтительно, 50-900 мг дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли. Эту дозу вводят один или несколько раз в день.

Лекарственное средство согласно изобретению может быть использовано в качестве профилактического или терапевтического средства для предупреждения или лечения злокачественной опухоли.

Примерами злокачественных опухолей являются опухоль головного мозга у детей, выбранная из группы, состоящей из астроглиомы, злокачественной медуллобластомы,

опухоли зародышевых клеток, краниофарингиомы и эпендимомы; опухоль головного мозга у взрослых, выбранная из группы, состоящей из глиомы, глиальной опухоли, менингиомы, аденомы гипофиза и невриномы; рак головы и шеи, выбранный из группы, состоящей из рака челюстного синуса, рака горла (например, рака носоглотки, рака ротоглотки, рака гортанной части глотки), рака гортани, рака ротовой полости, рака губы, рака языка и рака околоушной железы; рак и опухоль грудной клетки, выбранные из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легких, аденоматоза легких и мезотелиомы; рак и опухоль желудочно-кишечного тракта, выбранные из группы, состоящей из рака пищевода, рака печени, первичного рака печени, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака желудка, рака прямой и ободочной кишки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака поджелудочной железы и опухоли эндокринной системы поджелудочной железы; рак и опухоль мочеполовых путей, выбранные из группы, состоящей из рака пениса, рака почечной лоханки, рака мочеочника, почечноклеточного рака, рака яичек (также называемого опухолью яичек), рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, опухоли Вильмса и рака уротелиальной системы; рак и опухоль женских половых органов, выбранные из группы, состоящей из рака вульвы, рака шейки матки, рака тела матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака хориона, рака влагалища, рака молочной железы, рака яичника и опухоли зародышевых клеток яичника; саркома мягких тканей у взрослых и детей; опухоль кости, выбранная из группы, состоящей из остеосаркомы и опухоли Юинга; рак и опухоль эндокринной ткани, выбранные из группы, состоящей из рака коры надпочечника и рака щитовидной железы; злокачественная лимфома и лейкоз, выбранные из группы, состоящей из злокачественной лимфомы, неходжкинской лимфомы, болезни Ходжкина, множественной миеломы, опухоли клеток плазмы, острого миелоидного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, Т-клеточной лимфомы взрослых, хронического миелоидного лейкоза и хронического лимфоцитарного лейкоза; и рак и опухоль кожи, выбранные из группы, состоящей из хронического миелопролиферативного заболевания, злокачественной меланомы, плоскоклеточного рака, базальноклеточного рака и грибовидного микоза.

Поскольку лекарственное средство согласно изобретению обладает явно выраженным действием, направленным против злокачественной опухоли, то, предполагается, что оно будет оказывать действие против злокачественной опухоли у пациента, который является невосприимчивым к лечению другим лекарственным средством против злокачественной опухоли, не являющимся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью.

Лекарственное средство согласно изобретению может быть также объединено с лекарственными средствами против злокачественной опухоли одного или более видов, не являющимися метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью.

Примерами лекарственных средств против злокачественной опухоли, не являющихся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью, являются лекарственное средство, нацеленное на молекулу-мишень; алкилирующий агент; ингибитор метаболизма; растительный алкалоид; противораковый антибиотик; гормон; иммунотерапевтическое средство и т.п.

Примерами вышеупомянутых «лекарственных средств, нацеленных на молекулу-мишень» являются иматиниб, гефитиниб, эрлотиниб, сунитиниб, сорафениб, бриваниб,

тивантиниб, линифаниб, бортезониб, нилотиниб, дазатиниб, лестауртиниб, лапатиниб, талидомид, леналидомид, сиролимус, эверолимус, темсиролимус, вориноостат, третиноин, тамибаротен, ритуксимаб, бевацизумаб, рамуцирумаб, панитумумаб, цетуксимаб, трастузумаб, алемтузумаб, гемтузумаб, озогамидин, ибритумомаб-тиуксетан, азацитидин, децитабин, золедроновая кислота, триоксид мышьяка, облимерсен и т.п.

Примерами вышеупомянутых «алкилирующих агентов» являются мехлоретамин; циклофосфамид; ифосфамид; кармустин; бусульфид; темозоломид; прокарбазин; ломустин; дакарбазин; бендамустин; мелфалан; нимустин; ранимустин; хлорамбуцил; фотемустин; препараты на основе платины, такие как оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин и т.п.; и т.п.

Примерами вышеупомянутых «ингибиторов метаболизма» являются гемцитабин, метотрексат, капецитабин, цитарабин, флударабин, кладрибин, эноцитабин, кармофур, тегафур, тегафур•урацил, тегафур•гимерацил•отерацил-калий, 5-фторурацил, доксифлуридин, неларабин, гидроксикарбамид, пентостатин, меркаптопурин, лейковорин, пеметрексед и т.п.

Примерами вышеупомянутых «растительных алкалоидов» являются ингибиторы топоизомеразы, такие как иринотекан, топотекан, ногитекан, этопозид, собузуксан и т.п.; ингибиторы митоза, такие как паклитаксел, Абраксан (торговый знак), доцетаксел, иксабепилон, винбластин, виндезин, винкристин, винорелбин, эрибулин и т.п.; и т.п.

Примерами вышеупомянутых «противораковых антибиотиков» являются доксорубин, митомицин С, митоксантрон, эпирубин, идарубин, даунорубин, акларубин, амрубин, пирарубин, актиномицин D, блеомицин, пепломицин, циклоспорин и т.п.

Примерами вышеупомянутых «гормонов» являются тамоксифен, анастрозол, летрозол, эксеместан, фульвестрант, флутамид, бикалутамид, эстрамустин, хормадинон, торемифен, гозерелин, преднизон, лейпрорелин, абиратерон, дексаметазон и т.п.

Примерами вышеупомянутых «иммунотерапевтических средств» являются GM-CSF, интерферон-альфа 2b, интерлейкин 2, филграстим, эпоэтин-альфа и т.п.

Настоящее изобретение также относится к готовому препарату в упаковке, содержащей вышеупомянутое «лекарственное средство, включающее комбинацию метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли» согласно изобретению и имеющей отпечатанную инструкцию, в которой указано, что данное лекарственное средство может или должно быть применено для профилактики или лечения злокачественной опухоли.

Настоящее изобретение также относится к средству для снижения побочного эффекта (в частности, молочного ацидоза) метформина или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное средство содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, и у усилителю действия метформина или его фармацевтически приемлемой соли против злокачественной опухоли, где указанный усилитель содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента. Настоящее изобретение также относится к средству для снижения побочного эффекта (в частности, молочного ацидоза) метформина или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное средство содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, который используется в комбинации с метформином или его фармацевтически приемлемой солью, и к усилителю действия метформина или его фармацевтически приемлемой соли против злокачественной опухоли, где указанный усилитель содержит дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в

качестве активного ингредиента, который используется в комбинации с метформином или его фармацевтически приемлемой солью.

Что касается агента, снижающего побочные эффекты, и усилителя действия, направленного против злокачественной опухоли, то примеры описанных здесь «метформина»; «метформина или его фармацевтически приемлемой соли»; «дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли»; способа введения; дозы лекарственного средства; индивидуума, которому вводят такое лекарственное средство; заболевания, подвергаемого лечению и т.п. аналогичны примерам для лекарственного средства согласно изобретению, описанным выше.

**(II) Лекарственное средство, содержащее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента**

Настоящее изобретение относится к лекарственному средству для профилактики или лечения рака поджелудочной железы, включающему дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, и к ингибитору раковых стволовых клеток поджелудочной железы, включающему дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента.

Примеры используемых «дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли», способа введения, индивидуума, которому вводят такое лекарственное средство, и т.п. аналогичны примерам, описанным выше в разделе (I).

Лекарственное средство и ингибитор согласно изобретению могут быть приготовлены, например, в виде фармацевтической композиции, такой как таблетка (включая таблетку с сахарным покрытием и таблетку с пленочным покрытием), порошок, гранулы, капсулы (включая мягкую капсулу), жидкость, инъекция, суппозитории, препарат пролонгированного высвобождения (например, микрокапсулы пролонгированного высвобождения) или препарат быстрого высвобождения, например, путем смешивания дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли с фармакологически приемлемым носителем известным методом, и последующего безопасного введения этой композиции перорально или парентерально (например, местно, ректально, внутривенно и т.п.). Инъекция может быть введена внутривенно, внутримышечно, подкожно или вовнутрь органа, либо она может быть введена непосредственно в участок поражения. Фармакологически приемлемый носитель аналогичен носителю, описанному выше в разделе (I).

Эти препараты могут быть получены известным методом, обычно применяемым в стадиях приготовления таких препаратов.

Содержание дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в лекарственном средстве согласно изобретению и в ингибиторе согласно изобретению может быть соответствующим образом выбрано в зависимости от формы препарата и т.п.

Так, например, содержание дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли обычно составляет приблизительно от 0,01 до 99,99 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 0,1 до 90 масс.% по отношению ко всему препарату.

Хотя содержание добавок, таких как носитель и т.п. в лекарственном средстве и ингибиторе согласно изобретению варьируется в зависимости от формы препарата, однако, обычно, оно составляет приблизительно от 1 до 99,99 масс.%, а предпочтительно, приблизительно от 10 до 90 масс.% по отношению ко всему препарату.

Лекарственное средство и ингибитор согласно изобретению предпочтительно содержат метформин или его фармацевтически приемлемую соль, поскольку метформин или его фармацевтически приемлемая соль обладают синергическим действием,

направленным против злокачественной опухоли. Термин «метформин или его фармацевтически приемлемая соль» аналогичен термину, описанному выше в разделе (I).

Содержание метформина или его фармацевтически приемлемой соли обычно составляет приблизительно от 0,5 до 100 масс.%, предпочтительно, приблизительно от 2,5 до 50 масс.%, а более предпочтительно, приблизительно от 2,5 до 10 масс.% на 1 часть по массе дигидрокверцетина.

Лекарственное средство и ингибитор согласно изобретению могут быть использованы в комбинации с гемцитабином.

Доза гемцитабина может быть определена исходя из дозы коммерчески доступных препаратов гемцитабина.

Доза лекарственного средства и ингибитора согласно изобретению может быть соответствующим образом выбрана в зависимости от цели применения, возраста и пола пациента, тяжести заболевания и т.п. Доза дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли для взрослого пациента (с массой тела 60 кг) в день обычно составляет приблизительно 40-1200 мг, предпочтительно, приблизительно 50-900 мг, а еще более предпочтительно, приблизительно 100-1050 мг. Эту дозу вводят один или несколько раз в день.

### Примеры

Настоящее изобретение подробно описано ниже со ссылкой на соответствующие примеры, которые не должны рассматриваться как ограничение настоящего изобретения.

[Пример 1] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака легких человека NCI-H1299 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

#### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированную (56°C, обработка в течение 30 минут) фетальную бычью сыворотку (далее, эта среда сокращенно обозначена 10% FBS-RPMI1640) (NACALAI TESQUE, INC.), с получением 200 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 20 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 5 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,5 ммоль/л).

#### 3) Клетки

Клеточную линию рака легких человека NCI-H1299 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (catalog no. CRL-5803, Cancer Res. 1992; 52 (9 Suppl): 2732s-2736s). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4E-BP1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформином: 20 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,5 ммоль/л

дигидрокверцетина

(4) Группа комбинированной обработки: 20 ммоль/л метформина + 0,5 ммоль/л дигидрокверцетина

Культированные путем пересева клетки NCI-H1299 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет (IWAKI) при плотности 0,5 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором Дульбекко (D-PBS), и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток (Cell Signaling Technology, Inc.). После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA (Cell Signaling Technology, Inc., catalog No. 7854). Концентрации общего белка в клеточном экстракте измеряли с помощью анализа на белок BCA (Pierce), и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

#### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группы, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением (фиг. 1).

#### 7) Выводы

В клетках NCI-H1299, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 2] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака поджелудочной железы человека AsPC-1 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

#### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 200 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 20 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 2 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,2 ммоль/л).

### 5 3) Клетки

Клеточную линию рака поджелудочной железы человека AsPC-1 получали от Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. (новое название DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD., In Vitro. 1982; 18: 24-34). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 10 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4E-BP1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) 15 обрабатывали следующим образом:

- (1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол
- (2) Группа, обработанная только метформином: 20 ммоль/л метформина
- (3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,2 ммоль/л

дигидрокверцетина

### 20 (4) Группа комбинированной обработки: 20 ммоль/л метформина + 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

Культивированные путем пересева клетки AsPC-1 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на 25 гемоцитометре и доводили до  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 0,5 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в 30 указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/ 35 Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.отк.).

40 Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группы, обработанной каждым отдельно взятым 45 средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием

компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрохверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением (фиг. 2).

#### 7) Выводы

В клетках AsPC-1, при введении комбинации метформина и дигидрохверцетина наблюдался синергический эффект в отношении ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрохверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 3] Ингибирующее действие дигидрохверцетина на продуцирование лактата, индуцируемое метформином, в клеточной линии фибробластов легких человека WI-38 (*in vitro*)

#### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрохверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрохверцетина и (2S,3S)-дигидрохверцетина) закупали у Bionet.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 200 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 20 ммоль/л). Дигидрохверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 10 ммоль/л дигидрохверцетина (в конечной концентрации 1 ммоль/л).

#### 3) Клетки

Клеточную линию фибробластов легких человека WI-38 получали из ATCC (catalog no. CCL-75, Exp. Cell. Res., 25: 585-621, 1961). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли дигидрохверцетин, и клетки культивировали в течение 1 часа. Затем добавляли метформин и клетки культивировали в течение 6 часов. После культивирования брали образцы кондиционированной среды и определяли концентрацию лактата, содержащегося в этой среде, а затем проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформином: 20 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная комбинацией дигидрохверцетина и метформина: 20 ммоль/л метформина + 1 ммоль/л дигидрохверцетина.

Культивированные путем пересева клетки WI-38 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 24-луночный культуральный планшет (IWAKI) при плотности 0,5 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. В каждую лунку добавляли среду, содержащую дигидрохверцетин в указанной концентрации, и клетки культивировали в течение 1 часа. Затем добавляли среду, содержащую метформин в указанной концентрации, и клетки культивировали еще 6 часов. После культивирования, из каждой лунки брали образцы супернатанта культуры и пропускали через фильтр с отсечкой молекулярной массы 10 кДа с получением фильтрата. Концентрацию лактата определяли с использованием набора для анализа лактата II (BioVision), № по каталогу K627-100.

После взятия образцов супернатанта культуры, клетки два раза промывали D-PBS и добавляли буфер для лизиса клеток с получением лизатов целых клеток. Концентрации белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и концентрацию лактата в каждой лунке нормализовали по концентрации белка.

#### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния дигидрокверцетина на содержание лактата, продуцируемого под действием метформина, применяли t-критерий Стьюдента в целях сравнения концентраций лактата в среде для группы, обработанной только метформином, и для группы комбинированной обработки. Если величина для группы комбинированной обработки была значительно ниже, чем для группы, обработанной только метформином, то можно сделать вывод, что дигидрокверцетин оказывает действие, направленное на снижение содержания лактата. Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина p составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Метформин индуцировал продуцирование лактата в клетках WI-38. Дигидрокверцетин способствовал значительному снижению уровня продуцирования лактата, индуцированного метформином (фиг. 3).

#### 7) Выводы

В клетках WI-38 наблюдалось действие дигидрокверцетина, направленное на снижение уровня продуцирования лактата, индуцированного метформином. Это указывает на то, что дигидрокверцетин может быть использован в медицине для снижения риска развития молочного ацидоза, вызываемого метформином.

[Пример 4] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака печени человека HuH-7 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

#### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 50 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 5 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 2 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,2 ммоль/л).

#### 3) Клетки

Клеточную линию рака печени человека HuH-7 получали от Health Science Research Resources Bank (Cancer Res. 1982; 42 (9): 3858-63). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4E-BP1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформином: 5 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

(4) Группа комбинированной обработки: 5 ммоль/л метформина + 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

5 Культивированные путем пересева клетки NuH-7 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 1 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, 10 содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/ 15 Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

#### 20 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных 25 для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группой, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического 30 эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина p составляла менее, чем 0,05.

#### 35 6) Результаты

Результаты представлены в таблице 1.

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением.

40 Таблица 1

	Относительное количество белка фосфо-4E-BP1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	84,1	2,1
Метформин	61,7	3,5
Дигидрокверцетин	59,7	1,6
Метформин + Дигидрокверцетин	28,2	2,6

#### 45 7) Выводы

В клетках NuH-7, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект с точки зрения ингибирования пути передачи сигнала

пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 5] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака молочной железы человека MDA-MB-231 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 50 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 5 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 2 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,2 ммоль/л).

3) Клетки

Клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-231 получали из ATCC (J. Natl. Cancer Inst. 1974; 53 (3): 661-74). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4E-BP1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформином: 5 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

(4) Группа комбинированной обработки: 5 ммоль/л метформина + 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

Культивированные путем пересева клетки MDA-MB-231 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 1 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок ВСА, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка

фосфо-4Е-ВР1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группой, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформин (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Результаты представлены в таблице 2.

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4Е-ВР1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением.

Таблица 2	Относительное количество белка фосфо-4Е-ВР1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	33,3	3,1
Метформин	37,1	3,1
Дигидрокверцетин	25,9	0,6
Метформин + Дигидрокверцетин	19,8	1,4

#### 7) Выводы

В клетках MDA-MB-231, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект с точки зрения ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 6] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака предстательной железы человека 22Rv1 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

##### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

##### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 100 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 10 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 2 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,2 ммоль/л).

##### 3) Клетки

Клеточную линию рака предстательной железы человека 22Rv1 получали из ATCC (In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1999; 35 (7): 403-9). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

##### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4Е-ВР1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

- (1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол  
 (2) Группа, обработанная только метформином: 10 ммоль/л метформина  
 (3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,2 ммоль/л

дигидрокверцетина

- (4) Группа комбинированной обработки: 10 ммоль/л метформина + 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

Культивированные путем пересева клетки 22Rv1 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 1 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

#### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группой, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Результаты представлены в таблице 3.

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением.

Таблица 3		
	Относительное количество белка фосфо-4E-BP1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	51,0	6,7
Метформин	57,3	2,2
Дигидрокверцетин	53,1	4,5
Метформин + Дигидрокверцетин	36,2	1,5

#### 7) Выводы

В клетках 22Rv1, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект с точки зрения ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 7] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака желчных протоков человека HuH-28 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

#### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 200 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 20 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 2 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,2 ммоль/л).

#### 3) Клетки

Клеточную линию рака желчных протоков человека HuH-28 получали от Health Science Research Resources Bank (Res Exp Med (Berl). 1988; 188(5): 367-75). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4E-BP1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформином: 20 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

(4) Группа комбинированной обработки: 20 ммоль/л метформина + 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

Культивированные путем пересева клетки HuH-28 диссоциировали трипсином и суспендировали в среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 1 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

#### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное

отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4Е-ВР1 применяли критерий Дюнэтта в целях сравнения данных, полученных для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группой, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Результаты представлены в таблице 4.

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4Е-ВР1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением.

Таблица 4		
	Относительное количество белка фосфо-4Е-ВР1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	58,8	2,8
Метформин	55,2	1,5
Дигидрокверцетин	54,2	0,2
Метформин + Дигидрокверцетин	36,6	1,3

#### 7) Выводы

В клетках NuH-28, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект с точки зрения ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 8] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака яичника человека Саov-3 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

##### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

##### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 200 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 20 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 2 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,2 ммоль/л).

##### 3) Клетки

Клеточную линию рака яичника человека Саov-3 получали из ATCC (GYNECOL ONCOL. 1994; 53(1): 70-7). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

##### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4Е-ВР1, содержащегося в приготовленных

лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформином: 20 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

(4) Группа комбинированной обработки: 20 ммоль/л метформина + 0,2 ммоль/л дигидрокверцетина

Культированные путем пересева клетки Саов-3 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 1 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду, содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок ВСА, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

#### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группой, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Результаты представлены в таблице 5.

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением.

Таблица 5

	Относительное количество белка фосфо-4E-BP1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	21,6	2,7
Метформин	22,0	0,3
Дигидрокверцетин	21,0	1,0
Метформин + Дигидрокверцетин	16,8	0,3

## 7) Выводы

В клетках Саов-3, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект в отношении ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 9] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака поджелудочной железы человека AsPC-1 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 15, 30 и 60 ммоль/л метформина (в конечных концентрациях 1,5; 3 и 6 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 3 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,3 ммоль/л).

### 3) Клетки

Клеточную линию рака поджелудочной железы человека AsPC-1 получали от DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только метформин: 1,5; 3 и 6 ммоль/л метформина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,3 ммоль/л дигидрокверцетина

(4) Группа комбинированной обработки: 1,5; 3 и 6 ммоль/л метформина + 0,3 ммоль/л дигидрокверцетина

Культивированные путем пересева клетки AsPC-1 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и довели до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 1 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду,

содержащую метформин или дигидрокверцетин или метформин и дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок ВСА, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее) ± стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки влияния используемой комбинации на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 применяли критерий Дюнетта в целях сравнения данных, полученных

для группы комбинированной обработки, с данными, полученными для группы, обработанной каждым отдельно взятым средством. Если между группой комбинированной обработки и группой, обработанной каждым отдельно взятым средством, наблюдалось значимое различие, то проводили двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация) для оценки синергического эффекта у групп, обработанных метформином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных дигидрокверцетином (группы 3 и 4). Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

## 6) Результаты

Результаты представлены в таблицах 6-8.

У группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значительно большее снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1, чем у группы, обработанной каждым отдельно взятым соединением.

Таблица 6 Метформин:дигидрокверцетин = 1,5 ммоль/л:0,3 ммоль/л		
	Относительное количество белка фосфо-4E-BP1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	107,3	9,3
Метформин	83,1	5,5
Дигидрокверцетин	97,4	9,6
Метформин + Дигидрокверцетин	31,2	4,1

Таблица 7 Метформин:дигидрокверцетин = 3 ммоль/л:0,3 ммоль/л		
	Относительное количество белка фосфо-4E-BP1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	33,5	10,1
Метформин	36,9	1,7
Дигидрокверцетин	37,2	2,5
Метформин + Дигидрокверцетин	18,4	0,9

Таблица 8 Метформин:дигидрокверцетин = 6 ммоль/л:0,3 ммоль/л		
	Относительное количество белка фосфо-4E-BP1	
	Среднее	Ст. откл.
Контроль	107,3	9,3
Метформин	83,1	5,5
Дигидрокверцетин	89,7	7,1
Метформин + Дигидрокверцетин	29,4	1,2

## 7) Выводы

В клетках AsPC-1, при введении комбинации метформина и дигидрокверцетина наблюдался синергический эффект в отношении ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что комбинация метформина и дигидрокверцетина является эффективной для химиотерапии рака.

[Пример 10] Ингибирующее действие дигидрокверцетина на продуцирование лактата, индуцируемое метформином, в клеточной линии фибробластов легких человека WI-38 (*in vitro*)

### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Рацемат дигидрокверцетина ((2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet, а оптически активный дигидрокверцетин ((2R,3R)-дигидрокверцетин) закупали у SIGMA.

## 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в среде 10% FBS-RPMI1640 с получением 200 ммоль/л метформина (в конечной концентрации 20 ммоль/л). Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 10 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 1 ммоль/л).

## 3) Клетки

Клеточную линию фибробластов легких человека WI-38 получали из ATCC (catalog no. CCL-75, Exp. Cell. Res., 25: 585-621, 1961). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли дигидрокверцетин, и клетки культивировали в течение 1 часа. Затем добавляли метформин и клетки культивировали в течение 6 часов. После культивирования брали образцы кондиционированной среды и определяли концентрацию лактата, содержащегося в этой среде, а затем проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 1 ммоль/л дигидрокверцетина

(3) Группа, обработанная только метформином: 20 ммоль/л метформина

(4) Группа комбинированной обработки: 20 ммоль/л метформина + 1 ммоль/л

дигидрокверцетина

Культивированные путем пересева клетки WI-38 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на гемоцитометре и доводили до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 24-луночный культуральный планшет (IWAKI) при плотности 0,5 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем добавляли среду, содержащую дигидрокверцетин в указанной концентрации, и клетки культивировали в течение 1 часа. После чего добавляли среду, содержащую метформин в указанной концентрации, и клетки культивировали еще 6 часов. После культивирования, из каждой лунки брали образцы супернатанта культуры, и эти образцы пропускали через фильтр с отсежкой молекулярной массы 10 кДа с получением фильтрата. Концентрацию лактата определяли с использованием набора для анализа лактата II (BioVision), No. по каталогу K627-100. После взятия образцов супернатанта культуры, клетки два раза промывали D-PBS, и добавляли буфер для лизиса клеток с получением лизатов целых клеток. Концентрации белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и концентрацию лактата в каждой лунке нормализовали по концентрации белка.

## 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.отк.).

Для оценки влияния дигидрокверцетина на содержание лактата, продуцируемого под действием метформина, применяли t-критерий Стьюдента в целях сравнения концентраций лактата в среде для контрольной группы и для группы, обработанной только дигидрокверцетином, и в среде для контрольной группы и для группы, обработанной только метформином. Кроме того, для оценки влияния комбинации дигидрокверцетина и метформина на нормализованное содержание продуцированного лактата у групп, обработанных только дигидрокверцетином (группы 1 и 2), и у групп, обработанных только метформином (группы 3 и 4), применяли двухфакторный анализ ANOVA (двусторонний) (факторы: группа и концентрация). Если нормализованное

содержание продуцированного лактата у группы, обработанной только дигидрокверцетином, значительно отличалось от содержания лактата у контрольной группы, то это означает, что данный агент ингибирует продуцирование лактата. Если нормализованное содержание продуцированного лактата у группы, обработанной только метформином, значительно отличалось от содержания лактата у контрольной группы, то концентрацию агента корректировали так, чтобы этот агент индуцировал продуцирование лактата. Если различие нормализованного содержания продуцированного лактата у группы комбинированной обработки и у группы, обработанной только метформином, значительно превышало различие нормализованного содержания продуцированного лактата у контрольной группы и у группы, обработанной только дигидрокверцетином, то можно сделать вывод, что дигидрокверцетин обладает действием, снижающим содержание лактата. Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Рацемат и оптически активный дигидрокверцетин ингибировали продуцирование лактата в клетках WI-38 по сравнению с контрольной группой. Метформин индуцировал продуцирование лактата в этих клетках, и такое продуцирование значительно снижалось под действием рацемата и оптически активного дигидрокверцетина (Рацемат; фиг. 4, оптически активный дигидрокверцетин; фиг.5).

#### 7) Выводы

В клетках WI-38 наблюдалось действие рацемата и оптически активного дигидрокверцетина, направленное на снижение уровня продуцирования лактата, индуцированного метформином. Это указывает на то, что дигидрокверцетин может быть использован в медицине для снижения риска развития молочного ацидоза, вызываемого введением метформина.

[Пример 11] Ингибирование пути передачи сигнала пролиферации клеточной линии рака поджелудочной железы человека AsPC-1 (*in vitro*), достигаемое с использованием только дигидрокверцетина

#### 1) Тестируемые соединения

Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 5 и 10 ммоль/л дигидрокверцетина (в конечной концентрации 0,5 и 1 ммоль/л).

#### 3) Клетки

Клеточную линию рака поджелудочной железы человека AsPC-1 получали от Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. (новое название DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD., *In Vitro*. 1982; 18: 24-34). Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

На следующий день после посева клеток добавляли тестируемые соединения, и клетки культивировали в течение 6 часов, после чего их собирали. Затем определяли относительные количества белка фосфо-4E-BP1, содержащегося в приготовленных лизатах целых клеток, и проводили анализ полученных данных. Каждую группу (N=3) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1% этанол

(2) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,5 ммоль/л дигидрокверцетина

(3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 1 ммоль/л дигидрокверцетина.

Культированные путем пересева клетки AsPC-1 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на

гемоцитометре и доводили до  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 12-луночный культуральный планшет при плотности 0,5 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, в каждую лунку добавляли среду,

дигидрокверцетин в указанной концентрации. После инкубирования в течение 6 часов, клетки в каждой лунке два раза промывали D-PBS, и лизаты целых клеток приготавливали с использованием буфера для лизиса клеток. После центрифугирования брали образцы супернатантов и определяли относительное количество белка фосфо-4E-BP1 (Thr37/Thr46) в образцах с использованием наборов для ELISA как описано в примере 1. Концентрации общего белка в лизатах целых клеток измеряли с помощью анализа на белок BCA, и относительное количество белка фосфо-4E-BP1 в каждой лунке нормализовали по количеству общего белка.

#### 5) Статистический анализ

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.откл.).

Для оценки дозозависимого влияния дигидрокверцетина на относительное количество белка фосфо-4E-BP1 проводили линейный регрессионный анализ. Результаты анализа указывали на дозозависимый эффект. Затем для сравнения контрольной группы с группой, обработанной только одним агентом, применяли критерий Вильямса (односторонний). В результате было обнаружено, что дигидрокверцетин в концентрации не менее, чем 0,5 ммоль/л значительно снижает относительное количество белка фосфо-4E-BP1. Если относительное количество белка фосфо-4E-BP1 у группы, обработанной только дигидрокверцетином, значительно отличается от количества этого белка у контрольной группы, то можно сделать вывод, что данный агент обладает действием, снижающим количество указанного белка. Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

Дигидрокверцетин обнаруживал дозозависимое действие, направленное на снижение относительного количества белка фосфо-4E-BP1 (фиг. 6).

#### 7) Выводы

В клетках AsPC-1, при введении только одного дигидрокверцетина наблюдался дозозависимый эффект в отношении ингибирования пути передачи сигнала пролиферации. Это указывает на то, что дигидрокверцетин может быть использован для химиотерапии рака.

[Пример 12] Ингибирование экспрессии поверхностного маркера раковых стволовых клеток клеточной линии рака поджелудочной железы человека AsPC-1 (*in vitro*), достигаемое с использованием комбинации метформина и дигидрокверцетина

#### 1) Тестируемые соединения

Метформин закупали у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Дигидрокверцетин (рацемат (2R,3R)-дигидрокверцетина и (2S,3S)-дигидрокверцетина) закупали у Bionet. Гемцитабин закупали у Toronto Research Chemicals Inc.

#### 2) Получение тестируемых соединений

Метформин растворяли в дистиллированной воде и разводили средой 10% FBS-

RPMI1640 с получением 15 ммоль/л метформина. Дигидрокверцетин растворяли в этаноле и разводили средой с получением 0,3 ммоль/л дигидрокверцетина. Гемцитабин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и разводили средой с получением 100 нмоль/л гемцитабина.

### 5 3) Клетки

Клеточную линию рака поджелудочной железы человека AsPC-1 получали от DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. Эти клетки культивировали в среде 10% FBS-RPMI1640 при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 4) Добавление тестируемых соединений и их оценка

10 Каждую группу (N=10) обрабатывали следующим образом:

(1) Контрольная группа (носитель): среда, содержащая 1,5% дистиллированной воды, 0,3% этанола и 0,1% ДМСО

(2) Группа, обработанная только метформинном: 15 ммоль/л метформина

15 (3) Группа, обработанная только дигидрокверцетином: 0,3 ммоль/л дигидрокверцетина

(4) Группа обработки комбинацией метформина-дигидрокверцетина: 15 ммоль/л метформина + 0,3 ммоль/л дигидрокверцетина

(5) Группа, обработанная только гемцитабином: 100 нмоль/л гемцитабина

20 (6) Группа, обработанная комбинацией метформина, дигидрокверцетина и гемцитабина: 15 ммоль/л метформина + 0,3 ммоль/л дигидрокверцетина + 100 нмоль/л гемцитабина.

Культивированные путем пересева клетки AsPC-1 диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. Плотность клеточной суспензии определяли на

25 гемоцитометре и доводили до  $2 \times 10^4$  клеток/мл. Эти клетки высевали на 6-луночный культуральный планшет (IWAKI) при плотности 3 мл на лунку, и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, среду заменяли средой, содержащей каждое тестируемое соединение в данной концентрации, и клетки культивировали в течение 72 часов. По окончании культивирования, клетки диссоциировали трипсином и суспендировали в свежей среде. После промывки буфером для FACS (клеточного

30 сортирования с активацией флуоресценции), клетки окрашивали FITC-меченным антителом против человеческого CD44 и APC-меченным антителом против человеческого CD24, а затем обрабатывали при 4°C в течение 30 минут. После этого, клетки промывали буфером для FACS, пропускали через ситовой фильтр 40 микрон и определяли

35 количественное соотношение CD44- и CD24-позитивных клеток на проточном цитометре (Nippon Becton Dickinson and Company, Ltd.).

### 5) Статистические анализы

Полученные результаты представлены как средняя величина (среднее)  $\pm$  стандартное отклонение (ст.отк.).

40 Для оценки влияния обработки только метформинном, только дигидрокверцетином и комбинацией метформина и дигидрокверцетина на количественное соотношение CD44- и CD24-позитивных клеток у обработанных групп применяли непарный двухфакторный анализ ANOVA для сравнения контрольной группы с группой, обработанной каждым из этих соединений, и группой, обработанной комбинацией этих

45 соединений. Для оценки влияния обработки только гемцитабином на количественное соотношение CD44- и CD24-позитивных клеток у обработанных групп применяли t-критерий Стьюдента для сравнения контрольной группы с группой, обработанной только гемцитабином. Кроме того, для оценки влияния обработки комбинацией

гемцитабина, метформина и дигидрокверцетина на количественное соотношение CD44- и CD24-позитивных клеток по сравнению с группой, обработанной только гемцитабином, применяли т-критерий Стьюдента для сравнения группы, обработанной только гемцитабином, с группой, обработанной комбинацией гемцитабина, метформина и дигидрокверцетина. Этот анализ осуществляли с использованием компьютерной программы SAS Software Release 9.3 (SAS Institute Japan). Различия считались статистически значимыми, если величина  $p$  составляла менее, чем 0,05.

#### 6) Результаты

У группы, обработанной только дигидрокверцетином, и у группы, обработанной комбинацией метформина и дигидрокверцетина, наблюдалось значимое снижение количественного соотношения CD44- и CD24-позитивных клеток AsPC-1 по сравнению с контрольной группой. У группы, обработанной только гемцитабином, наблюдалось значимое повышение количественного соотношения CD44- и CD24-позитивных клеток AsPC-1 по сравнению с контрольной группой. Увеличение количественного соотношения CD44- и CD24-позитивных клеток после введения только гемцитабина значительно ингибировалось после дополнительного введения метформина и дигидрокверцетина (фиг. 7).

#### 7) Выводы

После оценки количественного соотношения CD44- и CD24-позитивных клеток, определенных как раковые стволовые клетки поджелудочной железы, а именно, клетки клеточной линии рака поджелудочной железы AsPC-1, было обнаружено значительное снижение количественного соотношения этих клеток после добавления только дигидрокверцетина и добавления комбинации метформина и дигидрокверцетина. В противоположность этому, было обнаружено значительное увеличение количественного соотношения CD44- и CD24-позитивных клеток после введения гемцитабина. Кроме того, вышеупомянутое увеличение количественного соотношения CD44- и CD24-позитивных клеток после введения только гемцитабина значительно ингибировалось после введения комбинации метформина и дигидрокверцетина. Эти результаты позволяют предположить, что проблемы, связанные с повышением риска появления рецидивов, ассоциированного с увеличением числа раковых стволовых клеток после введения гемцитабина, могут быть решены путем введения комбинации гемцитабина и дигидрокверцетина или комбинации гемцитабина, метформина и дигидрокверцетина.

#### Промышленное применение

В соответствии с настоящим изобретением, лекарственное средство, которое обладает синергическим действием, направленным против злокачественной опухоли, и действием, подавляющим побочные эффекты, и которое может быть использовано в качестве лекарственного средства против злокачественной опухоли, может быть получено путем объединения метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли.

Эта заявка создана на основе японской патентной заявки No. 2013-110278, содержание которой во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

#### (57) Формула изобретения

1. Комбинация, предназначенная для профилактики или лечения злокачественной опухоли, которая включает метформин или его фармацевтически приемлемую соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль, где метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль содержатся в одном препарате, либо метформин или его

фармацевтически приемлемую соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль изготовлены в виде отдельных фармацевтических композиций и используются в комбинации, где злокачественной опухолью являются рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника, и

содержание метформина или его фармацевтически приемлемой соли и дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации составляет 1-600 моль метформина или его фармацевтически приемлемой соли на 1 моль дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Комбинация по п. 1, где метформин или его фармацевтически приемлемая соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемая соль содержатся в одном препарате.

3. Комбинация по п. 1, где метформин или его фармацевтически приемлемую соль и дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль изготавливают в виде отдельных фармацевтических композиций и используют в комбинации.

4. Комбинация по п. 1, применяемая для лечения пациента, который является невосприимчивым к лечению другим лекарственным средством против злокачественной опухоли, не являющимся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью.

5. Комбинация по п. 1, которая дополнительно содержит комбинацию лекарственных средств против злокачественной опухоли одного или более видов, не являющихся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью.

6. Комбинация по п. 4 или 5, где указанное лекарственное средство против злокачественной опухоли, не являющееся метформином и его фармацевтически приемлемой солью и дигидрокверцетином и его фармацевтически приемлемой солью, представляет собой лекарственное средство, нацеленное на молекулу-мишень; алкилирующий агент; ингибитор метаболизма; растительный алкалоид; противораковый антибиотик; гормон или иммунотерапевтическое средство.

7. Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с метформином или его фармацевтически приемлемой солью для приготовления комбинации по п. 1.

8. Способ профилактики или лечения злокачественной опухоли, включающий введение комбинации по п. 1 индивидууму, нуждающемуся в этом, где злокачественной опухолью являются рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника.

9. Лекарственное средство для профилактики или лечения рака поджелудочной железы, включающее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, предназначенное для применения в составе комбинации по п. 1.

10. Способ профилактики или лечения рака поджелудочной железы, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в составе комбинации по п. 1.

11. Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения рака поджелудочной железы в составе комбинации по п. 1.

12. Применение дигидрокверцетина или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного препарата для профилактики или лечения рака

поджелудочной железы, предназначенного для применения в составе комбинации по п. 1.

13. Лекарственное средство для профилактики или лечения злокачественной опухоли, содержащее метформин или его фармацевтически приемлемую соль, предназначенное для применения в составе комбинации по п. 1, где злокачественной опухолью являются рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника.

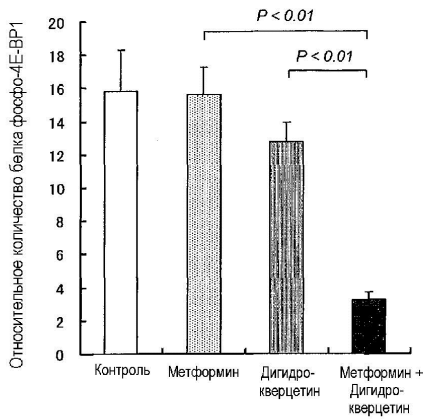
14. Лекарственное средство для профилактики или лечения злокачественной опухоли, содержащее дигидрокверцетин или его фармацевтически приемлемую соль, предназначенное для применения в составе комбинации по п. 1, где злокачественной опухолью являются рак легких, рак печени, рак желчных протоков, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы или рак яичника.

1

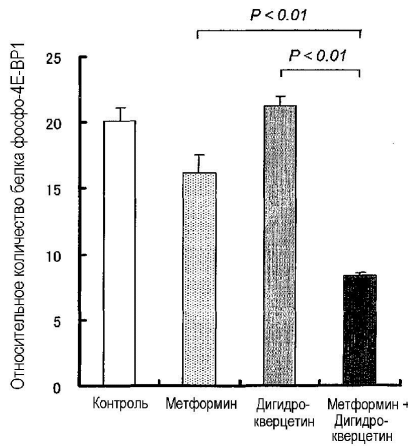
529940

1/4

Фиг.1



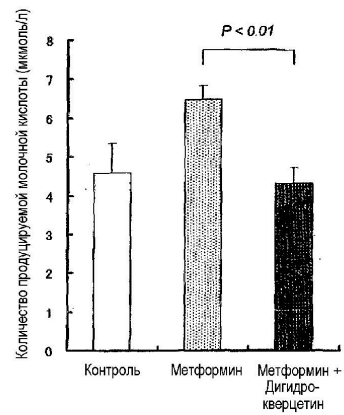
Фиг.2



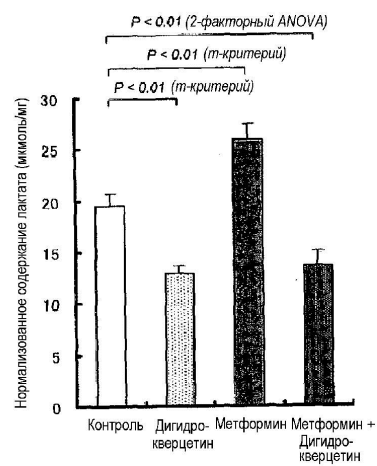
2

2/4

Фиг.3

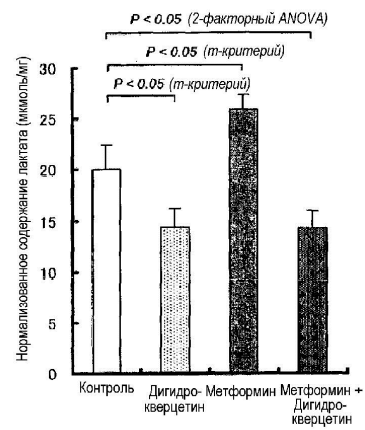


Фиг.4

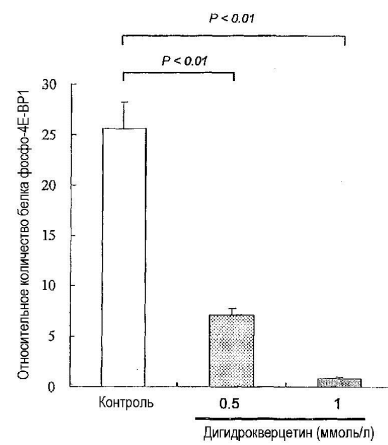


3/4

Фиг.5



Фиг.6



4/4

Фиг.7

