

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 17 日 (17.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/248192 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/155 (2006.01) A61K 31/4706 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/091116

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 13 日 (13.06.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 万晓春(WAN, Xiaochun); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 章桂忠(ZHANG, Guizhong); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 刘翌(LIU, Zhao);

中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深圳中一联合知识产权代理有限公司(SHENZHEN ZHONGYI UNION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省深圳市福田区园岭街道深南中路1014号报春大厦9楼(5号信箱), Guangdong 518028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: COMPOSITION HAVING ANTI-TUMOR EFFECT AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种具有抗肿瘤作用的组合物及其应用

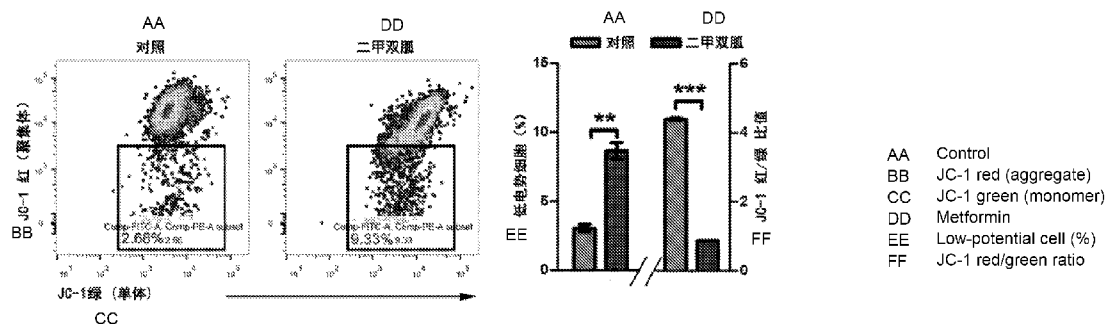


图 1

(57) Abstract: A composition having an anti-tumor effect and an application thereof. The composition having an anti-tumor effect comprises at least one of a mitophagy inhibitor and a lysosome inhibitor, as well as metformin. According to the above-mentioned composition, the addition of the metformin can inhibit tumor growth by inhibiting mitochondrial respiration and enhance the autophagic capability of mitochondria in cells; the addition of the mitophagy inhibitor and lysosome inhibitor blocks mitophagy, and thus can significantly promote the death of metformin-induced tumor cells.

(57) 摘要: 一种具有抗肿瘤作用的组合物及其应用, 所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种, 以及二甲双胍。通过上述组合物, 添加二甲双胍, 其能够通过抑制线粒体呼吸抑制肿瘤生长, 同时细胞内线粒体自噬能力增强; 加入线粒体自噬抑制剂或者溶酶体抑制剂阻断线粒体自噬, 能够显著促进二甲双胍诱导的肿瘤细胞死亡。

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种具有抗肿瘤作用的组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物领域，尤其涉及一种具有抗肿瘤作用的组合物及其应用。

背景技术

[0002] 肿瘤是一种非遗传的基因病。正常细胞在致癌因素作用下，基因发生了改变，失去对其生长的正常调控，导致异常增生。肿瘤细胞有三个显著的基本特征，即：不死性，迁移性和失去接触抑制。肿瘤治疗，不管是传统的手术、放化疗，还是新生的分子靶向治疗、免疫细胞治疗，其核心思想都是杀死、清除肿瘤细胞。尽管近年来生物医药技术发展突发猛进，但目前的肿瘤治疗水平依然不高。肿瘤细胞具有不死性，如何打破这种不死性以杀死、清除癌细胞是各种治疗方法的核心。目前临床上常用的肿瘤治疗手段如化疗、放疗、激素治疗及一些生物疗法的作用机制之一便是诱导肿瘤细胞发生凋亡。不管是传统的放化疗还是新兴的生物疗法，都无法彻底灭杀肿瘤，耐药和复发案例时有发生。因此，临床上亟需一些新的肿瘤治疗方案/药物。然而，受限于肿瘤细胞异质性，单一治疗方法/药物很难彻底杀死所有肿瘤细胞。更糟糕的是，这种不完全的治疗一方面会助长那些对该疗法不敏感的肿瘤细胞爆发性增殖，导致治疗失败或复发；另一方面肿瘤细胞基因组原本就不稳定，治疗过程中产生的生存压力往往促使原本对药物敏感的肿瘤细胞发生基因组以及表达谱的改变，进化出抵抗治疗的能力，即发生耐药。此外，尽管抗肿瘤策略越来越多，也日趋先进，但目前仍有很大一部分患者无法从现有的治疗策略中获益，或者初期获益后出现耐药。因此，目前的肿瘤治疗方法都无法彻底战胜肿瘤，总体治疗水平不高。

[0003] 二甲双胍是治疗二型糖尿病的一线药物。除了降血糖作用，近年来的研究发现二甲双胍与二型糖尿病患者的肿瘤发病率降低直接相关，并进一步发现其对多种肿瘤生长具有抑制作用，是一种有潜力的抗肿瘤药物。但在这些研究中，研究人员也发现，二甲双胍的使用剂量较大，通过口服的方式无法在血液循环或者肿瘤部位达到该剂量。因此，单一使用二甲双胍，无法有效地起到抗肿瘤的

作用效果，限制了二甲双胍的应用潜力。

发明概述

技术问题

[0004] 本发明实施例提供了一种具有抗肿瘤作用的组合物及其应用，以解决现有技术中使用二甲双胍作为抗肿瘤活性成分时，二甲双胍增强肿瘤细胞内线粒体自噬，导致肿瘤细胞中的受损线粒体得以清除，肿瘤细胞继续维持生存的问题。

问题的解决方案

技术解决方案

[0005] 本发明实施例是这样实现的，第一方面，提供了一种具有抗肿瘤作用的组合物，所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍。

[0006] 第二方面，提供了一种抗肿瘤药物，所述抗肿瘤药物包括上述的具有抗肿瘤作用的组合物。

发明的有益效果

有益效果

[0007] 本发明实施例中，以二甲双胍作为抗肿瘤活性成分时，二甲双胍能够通过抑制线粒体呼吸，导致肿瘤细胞中线粒体损伤、抑制肿瘤生长，但同时，二甲双胍处理过的肿瘤细胞，能促进细胞内线粒体自噬，导致肿瘤细胞中的受损线粒体得以清除，肿瘤细胞继续维持生存，本发明提供的的一种具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍。添加线粒体自噬抑制剂，线粒体自噬抑制剂能够阻断线粒体自噬，使细胞内受损的线粒体得不到清除，影响细胞线粒体网络的稳定性以及细胞的生存，诱导细胞凋亡；另一方面，由于线粒体自噬发生后需要与溶酶体融合才能将受损线粒体降解，添加溶酶体抑制剂，溶酶体抑制剂能够阻断受损线粒体的降解，抑制受损线粒体的清除，使细胞内积累大量受损的线粒体，进一步诱导细胞凋亡。所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍，二者协同作用，能够显著促进二甲双胍诱导的肿瘤细胞

死亡，有效地起到抗肿瘤的作用效果。

[0008] 本发明还提供了一种抗肿瘤药物，所述抗肿瘤药物包括上述的具有抗肿瘤作用的组合物，所制备的抗肿瘤药物药效显著，抗肿瘤效果好。

对附图的简要说明

附图说明

[0009] 图1是本发明第一实施例提供的经二甲双胍刺激的淋巴瘤细胞线粒体膜电位的分析；

[0010] 图2是本发明第二实施例提供的经二甲双胍刺激的宫颈癌细胞系线粒体自噬的分析。

[0011] 图3是本发明第三实施例提供的二甲双胍（Met）及二甲双胍/环孢素A（Met/Cyclosporin A）组合物对宫颈癌细胞系Hela死亡的分析；

[0012] 图4是本发明第三实施例提供的二甲双胍（Met）及二甲双胍/Mdivi-1（Met/Mdivi-1）组合物对宫颈癌细胞系Hela死亡的分析；

[0013] 图5是本发明第三实施例提供的二甲双胍（Met）及二甲双胍/环孢素A（Met/Cyclosporin A）组合物对淋巴瘤细胞（Raji）死亡的分析；

[0014] 图6是本发明第三实施例提供的二甲双胍（Met）及二甲双胍/Mdivi-1（Met/Mdivi-1）组合物对淋巴瘤细胞（Raji）死亡的分析；

[0015] 图7是本发明第三实施例提供的二甲双胍（Met）及二甲双胍/氯喹（Met/Chloroquine）组合物对宫颈癌细胞系Hela死亡的分析。

发明实施例

本发明的实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0017] 本发明实施例中，接收设备从穿戴设备的RFID电子标签中获取所述穿戴设备的标识信息，并将所述穿戴设备的标识信息发送至转发节点，穿戴设备将获取的生命体征数据转换为啁啾数据，穿戴设备将所述啁啾数据发送至转发节点。

[0018] 为了说明本发明所述的技术方案，下面通过具体实施例来进行说明。

[0019] 本发明中，各溶液配制方法如下：

[0020] 二甲双胍溶液：350 mg二甲双胍（sigma, D150959）溶于10 mL PBS中，配成200 mM贮存液。

[0021] 环孢素A溶液：50 mg环孢素A A (Selleck, S2286) 溶于831.5 uL DMSO中，配成50 mM贮存液。

[0022] Mdivi-1溶液：20 mg Mdivi-1溶于1.13 mL DMSO中，配成50 mM贮存液。

[0023] 氯喹溶液：0.25 g氯喹 (Sigma, C6628-25G, MW515.86)，加入9.7 mL opti-MEM，配制成50 mM贮存液。

[0024] 二甲双胍，是一种线粒体呼吸链复合物I的抑制剂，能够通过抑制线粒体呼吸，进而影响细胞内活性氧的主要来源。当线粒体受到胞内活性氧的攻击时，其DNA、蛋白质、脂质会遭受不同程度的损伤，使线粒体的电子传递链发生异常，导致胞内活性氧进一步积累及线粒体损伤，破坏细胞稳态，导致ATP无法水解，无法为基体提供能量，并释放死亡相关蛋白，促进细胞死亡，抑制肿瘤细胞生长；同时，二甲双胍处理后癌细胞线粒体膜电位降低，并且细胞中膜电位丧失的线粒体更多，因此，添加二甲双胍会导致肿瘤细胞线粒体损伤。但是，同时，经二甲双胍处理后，细胞线粒体自噬增强，而线粒体自噬一种选择性清除受损、冗余线粒体的过程，对细胞线粒体网络稳定和细胞生存至关重要，线粒体损伤后，往往诱导线粒体自噬，自噬能够防止损伤的线粒体释放促进凋亡蛋白，因此诱导自噬，可以抑制细胞凋亡，用以清除受损线粒体以维持细胞生存。

[0025] 即：使用二甲双胍作为抗肿瘤活性成分时，经二甲双胍处理后，会增强肿瘤细胞内线粒体自噬，导致肿瘤细胞中的受损线粒体得以清除，肿瘤细胞继续维持生存。鉴于此，

[0026] 本发明实例提供一种具有抗肿瘤作用的组合物，所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍。

[0027] 具体的，为了提高二甲双胍的抗肿瘤的效果，所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍。其中，添加线粒体自噬抑制剂，阻断线粒体自噬，使细胞内受损的线粒体得不到清除，影响细胞线粒体网络的稳定性以及细胞的生存。

- [0028] 在一些实施例中，所述具有抗肿瘤作用的组合物包含二甲双胍与线粒体自噬抑制剂。在一些实施例中，所述具有抗肿瘤作用的组合物包含二甲双胍与溶酶体抑制剂。在一些实施例中，所述具有抗肿瘤作用的组合物包含二甲双胍、线粒体自噬抑制剂及溶酶体抑制剂。
- [0029] 优选的，所述线粒体自噬抑制剂选自环孢素A、Mdivi-1、3-甲基腺嘌呤的任意一种。
- [0030] 在一个具体实施例中，所述的具有抗肿瘤作用的组合物包含二甲双胍与线粒体自噬抑制剂环孢素A（Cyclosporin A, CsA）。其中，添加二甲双胍能够通过抑制肿瘤细胞中线粒体呼吸，导致肿瘤细胞线粒体损伤，促进细胞死亡，以抑制肿瘤细胞的生长。环孢素A由11个氨基酸残基组成的中性环状多肽，通过抑制线粒体通透性转换孔（MTP）的开放而影响线粒体，抑制线粒体自噬，抑制线粒体进行自身清除。因此，二甲双胍组合线粒体自噬抑制剂环孢素A进行作用，可以促进二甲双胍诱导细胞死亡。
- [0031] 具体的，所述二甲双胍与线粒体自噬抑制剂环孢素A组合物为组合物溶液，且在所述组合物溶液中，二甲双胍的浓度为50 μ M-30 mM，环孢素A的浓度为0.1 μ M-20 μ M。在本发明具体实施例中，环孢素A溶液的添加浓度为5 μ M；二甲双胍溶液的添加浓度为10 mM。若添加的浓度太低，二甲双胍与环孢素A的组合物溶液没有达到促进二甲双胍诱导细胞死亡的效果；若添加的浓度太高，则会对细胞造成其他毒副作用。
- [0032] 在另一个具体实施例中，所述的具有抗肿瘤作用的组合物包含二甲双胍与线粒体自噬抑制剂Mdivi-1。其中，Mdivi-1是线粒体DRP（发动蛋白相关GTP酶）分裂选择性抑制剂以及线粒体分裂发动蛋白（Dnm1）抑制剂。其添加主要是抑制线粒体分裂调控因子DRP及分裂发动蛋白Dnm1的活性，阻断线粒体分裂，从而抑制I型线粒体自噬。二甲双胍组合线粒体自噬抑制剂Mdivi-1进行作用，可进一步促进二甲双胍诱导细胞凋亡。
- [0033] 具体的，所述二甲双胍与线粒体自噬抑制剂Mdivi-1组合物为组合物溶液，且在所述组合物溶液中，二甲双胍的浓度为50 μ M-30 mM，Mdivi-1的浓度为0.1 μ M-50 μ M。在本发明具体实施例中，所述二甲双胍溶液的添加浓度为10

mM, Mdivi-1溶液的添加浓度为10 μ M。若添加的浓度太低,二甲双胍与Mdivi-1的组合物溶液没有促进二甲双胍诱导细胞死亡的效果;若添加的浓度太高,则会对细胞造成其他毒副作用。细胞中发生的自噬过程,属于真核生物中高度保守的过程,均发生在细胞质中,自噬发生后均在溶酶体中实现蛋白的降解,因此,当细胞中线粒体受到损伤发生自噬过程之后,均需要与溶酶体融合方能实现将受损线粒体进行降解。具体的,本发明优选实施例中,选择溶酶体抑制剂与二甲双胍进行组合制备具有抗肿瘤作用的组合物。添加溶酶体抑制剂,能够阻断受损线粒体的降解,抑制受损线粒体的清除,使细胞内积累大量受损的线粒体,进一步诱导细胞死亡。再协同二甲双胍,二者协同作用,能够显著促进二甲双胍诱导的肿瘤细胞死亡,有效地起到抗肿瘤的作用效果。

[0034] 在本发明优选实施例中,所述溶酶体抑制剂选自氯喹、巴法络霉素A1、诺考达唑、长春碱、羟氯喹、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂的任意一种。在本发明具体实施例中,所述具有抗肿瘤作用的组合物包含二甲双胍和氯喹(Chloroquine, CQ)。其中,二甲双胍的添加能够通过抑制线粒体呼吸,以抑制肿瘤细胞的生长或通过线粒体损伤促进肿瘤细胞死亡。。肿瘤细胞感受到二甲双胍诱导的线粒体损伤后,反馈性上调线粒体自噬以维持细胞生存。氯喹本身具有弱碱性,同时具有趋溶酶体的特性,一旦其选择性地进入溶酶体内,就会破坏溶酶体的酸性环境,抑制单酰基甘油脂肪酶、磷脂酶A2等酶的活性,从而抑制溶酶体功能。因此,与二甲双胍联合应用,氯喹可以通过破坏溶酶体的功能抑制自噬,提高二甲双胍对癌细胞的杀伤作用。具体的,所述二甲双胍和氯喹(Chloroquine, CQ)组合物为组合物溶液,且所述组合物溶液中,二甲双胍的浓度为50 μ M-30 mM,氯喹的浓度为5-100 μ M。在本发明具体实施例中,所述二甲双胍溶液的添加浓度为10 mM,氯喹溶液的添加浓度为50 μ M。若添加的浓度太低,二甲双胍与氯喹的组合物溶液没有促进二甲双胍诱导细胞死亡的效果;若添加的浓度太高,则会对细胞造成其他毒副作用。

[0035] 在本发明优选实施例中,选用不同来源的肿瘤细胞检测二甲双胍及其组合物对肿瘤细胞凋亡的影响。优选的,所述肿瘤细胞选自宫颈癌细胞系及血液瘤细胞系的任意一种,其中,血液瘤细胞系可选淋巴瘤细胞。优选的,所述淋巴瘤细

胞 (Raji) 以 1×10^6 细胞/孔的密度进行转接, 宫颈癌细胞系 (Hela) 以 2×10^5 细胞/孔的密度进行转接, 过夜培养即可。

[0036] 优选的, 在所述过夜培养的肿瘤细胞中, 添加所述具有抗肿瘤作用的组合物的溶液, 培养36-48 h。优选的, 所述培养时间是根据不同细胞的敏感性不同进行确定的, 宫颈癌细胞系 (Hela) 细胞培养36小时即可, 其他血液瘤细胞需要48小时。若培养时间太短会导致抗肿瘤药物协同效果不明显。

[0037] 优选的, 利用流式细胞术检测二甲双胍及其组合物对肿瘤细胞凋亡的影响。

[0038] 以二甲双胍作为抗肿瘤活性成分时, 二甲双胍能够通过抑制线粒体呼吸, 导致肿瘤细胞中线粒体损伤、抑制肿瘤生长, 但同时, 二甲双胍处理过的肿瘤细胞, 能促进细胞内线粒体自噬, 导致肿瘤细胞中的受损线粒体得以清除, 肿瘤细胞继续维持生存, 本发明提供的的一种具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种, 以及二甲双胍。添加线粒体自噬抑制剂, 线粒体自噬抑制剂能够阻断线粒体自噬, 使细胞内受损的线粒体得不到清除, 影响细胞线粒体网络的稳定性以及细胞的生存, 诱导细胞凋亡; 另一方面, 由于线粒体自噬发生后需要与溶酶体融合才能将受损线粒体降解, 添加溶酶体抑制剂, 溶酶体抑制剂能够阻断受损线粒体的降解, 抑制受损线粒体的清除, 使细胞内积累大量受损的线粒体, 进一步诱导细胞凋亡。所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种, 以及二甲双胍, 二者协同作用, 能够显著促进二甲双胍诱导的肿瘤细胞死亡, 有效地起到抗肿瘤的作用效果。

[0039] 相应的, 本发明还提供了一种抗肿瘤药物, 所述抗肿瘤药物包括上述的具有抗肿瘤作用的组合物, 所制备的抗肿瘤药物药效显著, 抗肿瘤效果好。

[0040] 下面结合具体实施例的内容进一步进行说明。

[0041] 实施例一:

[0042] 线粒体膜电位的测定

[0043] 细胞处理: 将淋巴癌细胞 (Raji) 以 1×10^6 细胞/孔的密度接种12孔板中, 过夜培养后, 实验组加10 mM 二甲双胍溶液刺激18 h。收集细胞并进行JC-1(碧云天, C2006)染色, 流式检测线粒体膜电位。

[0044] 实验结果如图1分析可知, 利用流式细胞仪JC-1进行线粒体膜电位检测, 其中, JC-1是一种理想的用于检测线粒体膜电位的荧光探针, 可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。当线粒体膜电位较高时, JC-1聚集在线粒体基质中, 形成聚合物 (JC-1 red (aggregates)), 表现为产生红色荧光; 当线粒体膜电位较低时, JC-1不能聚集在线粒体基质中, 此时JC-1为单体 (JC-1 green(monomers)), 表现为产生绿色荧光。

[0045] 当没有用二甲双胍溶液处理时, JC-1 green (即JC-1单体) 含量为2.68%, 当利用二甲双胍溶液处理后, JC-1 green (即JC-1单体) 含量为9.33%; 因此, 利用二甲双胍溶液处理后, JC-1 red/green比值 (JC-1 red/green ratio) 降低, 即表示癌细胞线粒体膜电位降低, JC-1为单体, 不能聚集在线粒体基质中, 没有形成聚合物, 红色荧光强度降低; 且利用二甲双胍溶液处理得到的细胞中膜电位丧失的线粒体更多, 表明二甲双胍会导致肿瘤细胞线粒体损伤, 可能是线粒体呼吸紊乱导致的。

[0046] 实施例二:

[0047] 线粒体自噬的测定

[0048] 细胞处理: 将稳定表达mt-mKeima蛋白的宫颈癌细胞系 (Hela细胞) 以 2×10^5 细胞/孔接种于12孔板, 过夜培养后, 加10 mM二甲双胍溶液继续处理18h, 收集细胞, 流式细胞术检测mt-mKeima蛋白的红绿荧光强度。

[0049] 实验结果如图2, 其中, mt-mKeima是线粒体定位的蛋白, 对酸碱度敏感, mt-mKeima蛋白处于线粒体的中性环境 (mt-mKeima at neutral pH) 中时发出绿色荧光, 而当线粒体自噬末期, mt-mKeima蛋白随着线粒体进入溶酶体而处于酸性环境 (mt-mKeima at acidic pH), 蛋白转而发出红色荧光。因此, 通过检测mt-mKeima蛋白的红绿荧光改变, 可以反应细胞线粒体自噬的情况。

[0050] 当没有用二甲双胍 (Met) 溶液进行处理时, mt-mKeima蛋白处于酸性环境 (mt-mKeima at acidic pH) 为16.2%, 而利用二甲双胍溶液处理后, 检测mt-mKeima蛋白发出红色荧光, mt-mKeima蛋白处于酸性环境 (mt-mKeima at acidic pH) 为28.7%。说明蛋白随着线粒体进入溶酶体而处于酸性环境, 即mt-mKeima

at acidic pH的强度增强，说明细胞线粒体自噬（mitophagy）增强。

[0051] 上述实施例1、实施例2的结果表明二甲双胍溶液对癌细胞的处理，会导致癌细胞中线粒体膜电位降低，且细胞中膜电位丧失的线粒体会增加；同时，经过二甲双胍溶液处理后，细胞中线粒体的自噬能力也会增强。因此，本发明的具有抗肿瘤作用的组合物，所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍。

[0052] 实施例三：

[0053] 流式细胞术检测二甲双胍（Metformin, Met）及其组合物对肿瘤细胞凋亡的影响

[0054] 1. 细胞处理

[0055] 1) 淋巴瘤细胞（Raji）或宫颈癌细胞系Hela分别以 1×10^6 细胞/孔和 2×10^5 细胞/孔的密度接种12孔板中；

[0056] 2) 过夜培养后，加二甲双胍溶液（Met, 50 μ M-30 mM）或组合物（二甲双胍/环孢素A溶液, 10 mM/5 μ M; 二甲双胍/Mdivi-1溶液, 10 mM/10 μ M; 或二甲双胍/氯喹溶液, 10 mM/50 μ M;）进行培养36-48 h后，检测细胞死亡情况。

[0057] 其中，二甲双胍/环孢素A组合物溶液中，二者的添加浓度分别为10 mM、5 μ M；二甲双胍/Mdivi-1组合物溶液中，二者的添加浓度分别为10 mM、10 μ M；二甲双胍/氯喹组合物溶液中，二者的添加浓度分别为10 mM、50 μ M。

[0058] 2. 流式细胞术分析细胞死亡情况

[0059] 1) 收集细胞悬液，将细胞悬液3200 rpm，4°C离心5 min，弃掉上清，收集沉淀中的细胞；

[0060] 3) 用预冷的PBS洗涤细胞1次，然后用400 μ L PI染色液（碘化丙啶，0.05 mg/mL）重悬细胞；

[0061] 4) 4 °C避光染色15 min；

[0062] 5) 流式细胞仪检测凋亡情况：PI阳性的细胞为死亡细胞。

[0063] 二甲双胍（Met）及二甲双胍/环孢素A（Met/Cyclosporin A）组合物对宫颈癌细胞系Hela死亡的影响：由图3可知，当PI染色液I阳性越高，表示细胞的死亡率越高。其中，空白对照组的细胞死亡率（Cell

death) 为7.02%，加了二甲双胍 (Met) 的细胞死亡率 (Cell death) 为24.1%；当加入了环孢素A (CsA)，空白对照组加入环孢素A处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为11.6%，加了二甲双胍和环孢素A组处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为46.3%，因此，线粒体自噬抑制剂环孢素A (CsA) 显著促进二甲双胍 (Met) 诱导的Hela细胞死亡。

[0064] 二甲双胍 (Met) 及二甲双胍/Mdivi-1 (Met/Mdivi-1) 组合物对宫颈癌细胞系Hela死亡的影响：由图4可知，当 PI染色液I阳性越高，表示细胞的死亡率越高。其中，空白对照组的细胞死亡率 (Cell death) 为9.68%，加了二甲双胍组的细胞死亡率 (Cell death) 为26.2%；当加入了Mdivi-1，空白对照组加入Mdivi-1处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为12.7%，加了二甲双胍和Mdivi-1组处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为42.9%，因此，线粒体自噬抑制剂Mdivi-1显著促进二甲双胍 (Met) 诱导的Hela细胞死亡。

[0065] 二甲双胍 (Met) 及二甲双胍/环孢素A (Met/Cyclosporin A) 组合物对淋巴瘤细胞 (Raji) 死亡的影响：由图5可知，当 PI染色液I阳性越高，表示细胞的死亡率越高。其中，空白对照组的细胞死亡率 (Cell death) 为4.41%，加了二甲双胍组的细胞死亡率 (Cell death) 为17.3%；当加入了环孢素A，空白对照组加入环孢素A处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为6.59%，加了二甲双胍和环孢素A组处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为45.4%，因此，线粒体自噬抑制剂环孢素A (CsA) 显著促进二甲双胍 (Met) 诱导的Raji细胞死亡。

[0066] 二甲双胍 (Met) 及二甲双胍/Mdivi-1 (Met/Mdivi-1) 组合物对淋巴瘤细胞 (Raji) 死亡的影响：由图6可知，当 PI染色液I阳性越高，表示细胞的死亡率越高。其中，空白对照组的细胞死亡率 (Cell death) 为3.63%，加了二甲双胍组的细胞死亡率 (Cell death) 为14.4%；当加入了Mdivi-1，空白对照组加入Mdivi-1处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为4.79%，加了二甲双胍和Mdivi-1组处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为28.3%，因此，线粒体自噬抑制剂Mdivi-1显著促进二甲双胍 (Met) 诱导的Raji细胞死亡。

[0067] 二甲双胍 (Met) 及二甲双胍/氯喹二甲双胍/氯喹 (Met/Chloroquine) 组合物对宫颈癌细胞系Hela死亡的影响: 由图7可知, 当PI染色液I阳性越高, 表示细胞的死亡率越高。其中, 空白对照组的细胞死亡率 (Cell death) 为4.28%, 加了二甲双胍组的细胞死亡率 (Cell death) 为10.8%; 当加入了氯喹 (CQ), 空白对照组加入氯喹处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为7.64%, 加了二甲双胍和氯喹组处理后得到的细胞死亡率 (Cell death) 为22.4%, 因此, 溶酶体抑制剂氯喹 (CQ) 显著促进二甲双胍 (Met) 诱导的Hela细胞死亡。

[0068] 以上所述实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制; 尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明, 本领域的普通技术人员应当理解: 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分技术特征进行等同替换; 而这些修改或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围, 均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述具有抗肿瘤作用的组合物包括线粒体自噬抑制剂、溶酶体抑制剂中的至少一种，以及二甲双胍。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述线粒体自噬抑制剂选自环孢素A、Mdivi-1、3-甲基腺嘌呤的任意一种。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述溶酶体抑制剂选自氯喹、巴法络霉素A1、诺考达唑、长春碱、羟氯喹、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂的任意一种。
- [权利要求 4] 根据权利要求1-3任一所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述抗肿瘤作用的组合物包括环孢素A及二甲双胍。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述组合物为组合物溶液，且所述组合物溶液中，二甲双胍的浓度为50 μ M-30 mM，环孢素A的浓度为0.1 μ M-20 μ M。
- [权利要求 6] 根据权利要求1-3任一所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述抗肿瘤作用的组合物包括Mdivi-1及二甲双胍。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述组合物为组合物溶液，且所述组合物溶液中，二甲双胍的浓度为50 μ M-30 mM，Mdivi-1的浓度为0.1 μ M-50 μ M。
- [权利要求 8] 根据权利要求1-3任一所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述抗肿瘤作用的组合物包括氯喹及二甲双胍。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的具有抗肿瘤作用的组合物，其特征在于，所述组合物为组合物溶液，且所述组合物溶液中，二甲双胍的浓度为50 μ M-30 mM，氯喹的浓度为5-100 μ M。
- [权利要求 10] 一种抗肿瘤药物，其特征在于，所述抗肿瘤药物包括如权利要求1至9任一项所述的具有抗肿瘤作用的组合物。

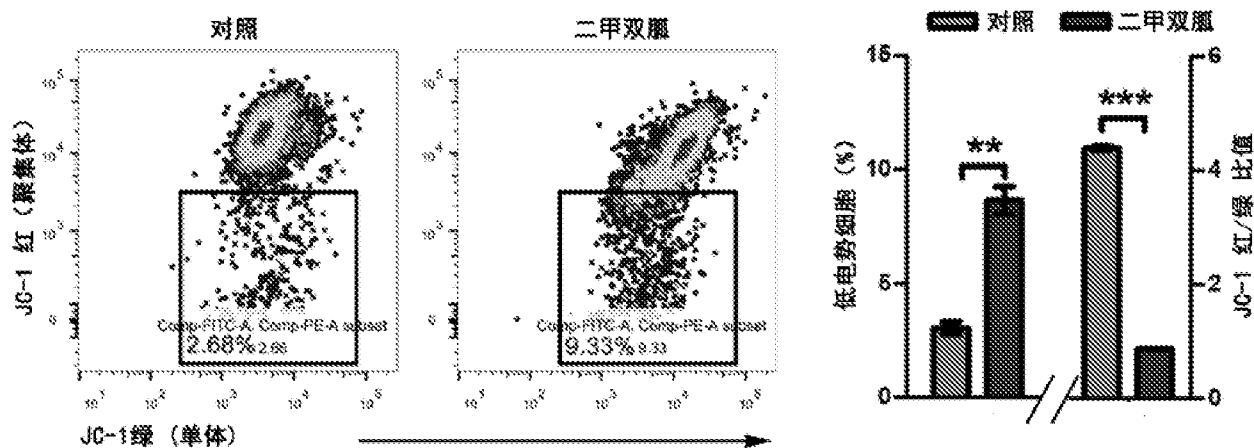


图 1

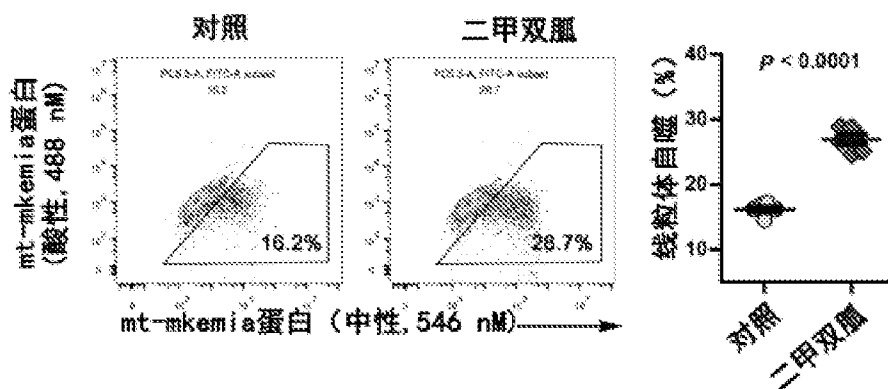


图 2

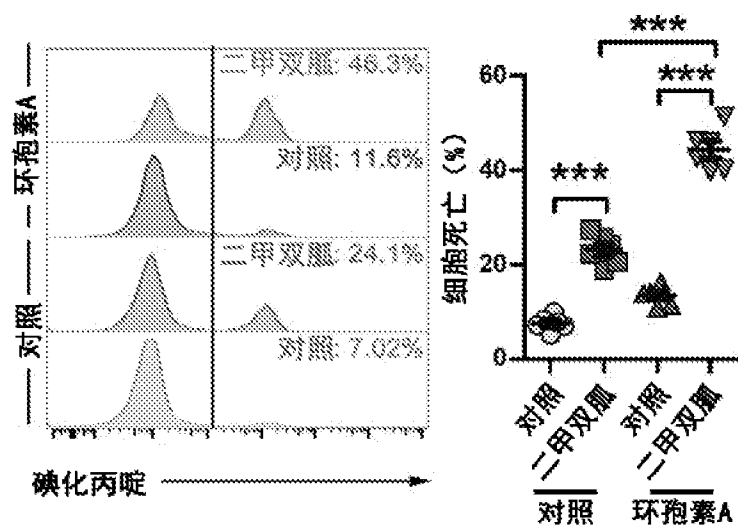


图 3

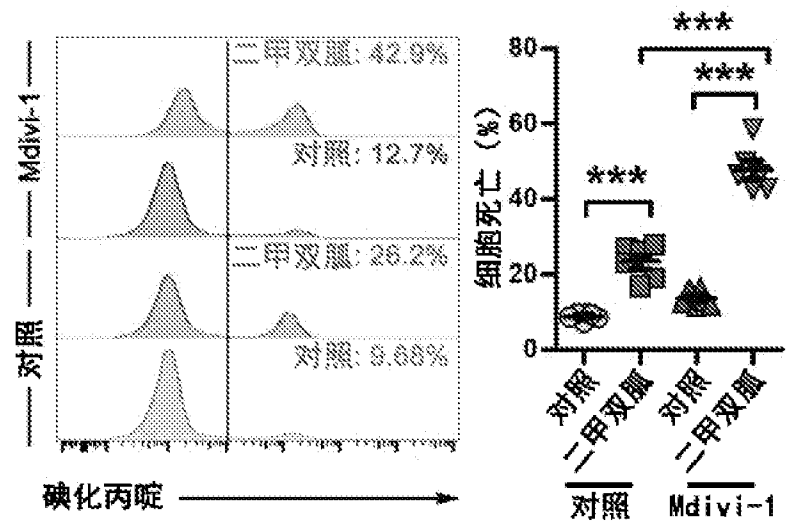


图 4

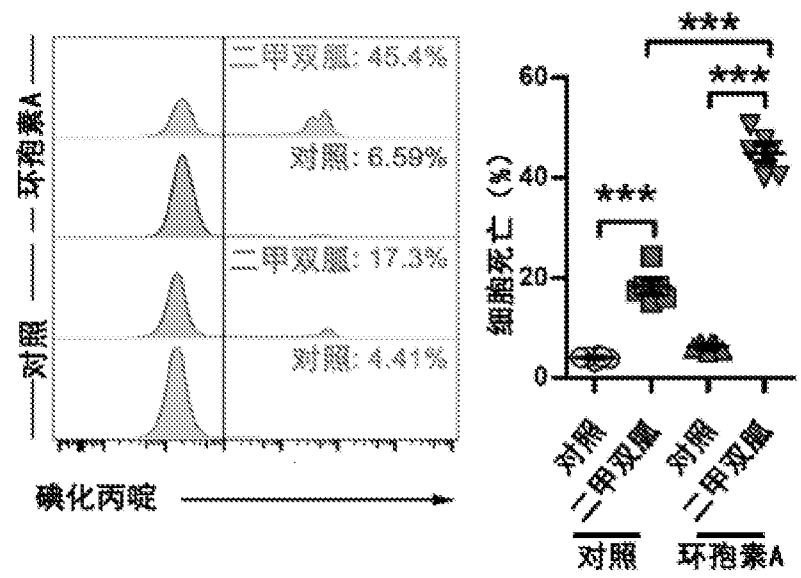


图 5

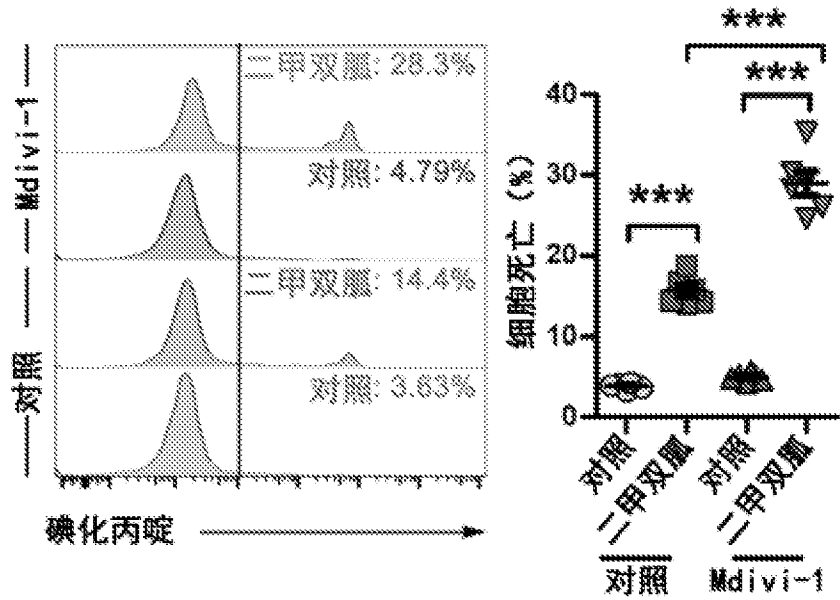


图 6

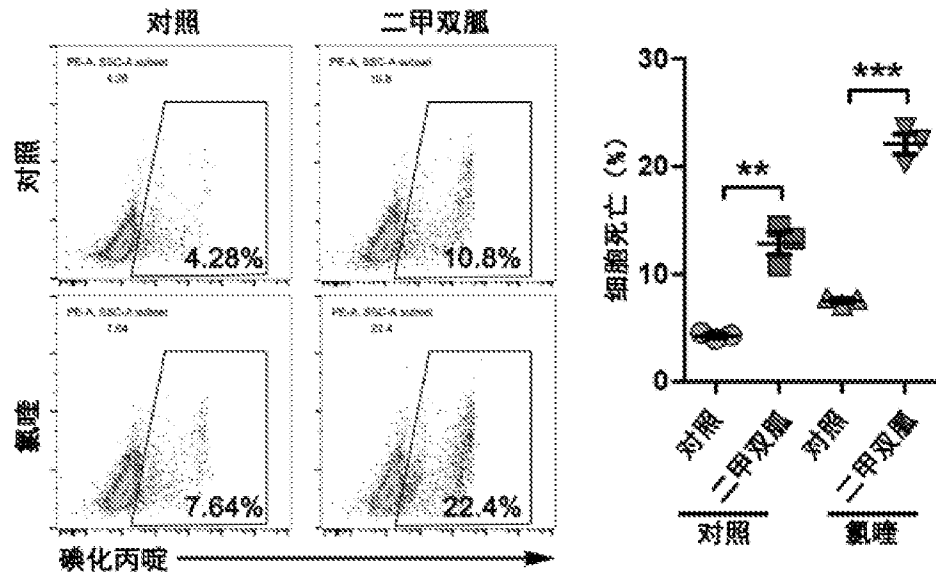


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/091116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/155(2006.01)i; A61K 38/13(2006.01)i; A61K 31/517(2006.01)i; A61K 31/4706(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNABS, CNTXT, EPODOC, CNKI, CA, EMBASE, VEN, NCBI, STN; 肿瘤, 癌, A61P35, 二甲双胍, 环孢素A, Mdivi-1, 氯喹, cancer, tumor, anticancer, antitumor, metformin, cyclosporin, chloroquine, 338967-87-6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	卢学春等 (LU, Xuechun et al.). "含盐酸二甲双胍联合方案治疗再生障碍性贫血的短期疗效观察 (Observations on the Short-term Therapeutic Effects of Combined Therapy with Metformin Hydrochloride for Aplastic Anemia)" 解放军医学杂志 (<i>Medical Journal of Chinese People's Liberation Army</i>), Vol. 37, No. 3, 01 March 2012 (2012-03-01), ISSN: 0577-7402, abstract, part "1.4 treatment solution"	1, 2, 4, 5, 10
A	卢学春等 (LU, Xuechun et al.). "含盐酸二甲双胍联合方案治疗再生障碍性贫血的短期疗效观察 (Observations on the Short-term Therapeutic Effects of Combined Therapy with Metformin Hydrochloride for Aplastic Anemia)" 解放军医学杂志 (<i>Medical Journal of Chinese People's Liberation Army</i>), Vol. 37, No. 3, 01 March 2012 (2012-03-01), ISSN: 0577-7402, abstract, part "1.4 treatment solution"	3, 6-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2020

Date of mailing of the international search report

13 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/091116

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLENAAR, R. J. et al. "Study protocol of a phase IB/II clinical trial of metformin and chloroquine in patients with IDH1-mutated or IDH2-mutated solid tumours" <i>BMJ Open</i> . 2017 Jun 10; 7(6) e014961., Vol. 7, No. 6, 10 June 2017 (2017-06-10), ISSN: 2052-4897, abstract, p. 7, part "Dose of study drugs and dose-escalation schedule"	1, 3, 8-10
A	MOLENAAR, R. J. et al. "Study protocol of a phase IB/II clinical trial of metformin and chloroquine in patients with IDH1-mutated or IDH2-mutated solid tumours" <i>BMJ Open</i> . 2017 Jun 10; 7(6) e014961., Vol. 7, No. 6, 10 June 2017 (2017-06-10), ISSN: 2052-4897, abstract, p. 7, part "Dose of study drugs and dose-escalation schedule"	2, 4-7
X	MUSSIN, N. et al. "Sirolimus and Metformin Synergistically Inhibits Colon Cancer In Vitro and In Vivo" <i>J Korean Med Sci</i> , Vol. 32, No. 9, 30 September 2017 (2017-09-30), ISSN: 1011-8934, abstract	1, 2, 4, 5, 10
A	MUSSIN, N. et al. "Sirolimus and Metformin Synergistically Inhibits Colon Cancer In Vitro and In Vivo" <i>J Korean Med Sci</i> , Vol. 32, No. 9, 30 September 2017 (2017-09-30), ISSN: 1011-8934, abstract	3, 6-9
X	CANDIDO A, S. et al. "Metformin influences drug sensitivity in pancreatic cancer cells" <i>Adv Biol Regul.</i> , Vol. 68, 12 February 2018 (2018-02-12), ISSN: 2212-4926, p. 23, part 2.4, p. 24, Fig. 7, and p. 25, paragraph 8	1, 3, 8-10
A	CANDIDO A, S. et al. "Metformin influences drug sensitivity in pancreatic cancer cells" <i>Adv Biol Regul.</i> , Vol. 68, 12 February 2018 (2018-02-12), ISSN: 2212-4926, p. 23, part 2.4, p. 24, Fig. 7, and p. 25, paragraph 8	2, 4-7
X	ELSAKKA, A. M. A. et al. "Management of Glioblastoma Multiforme in a patient treated With Ketogenic Metabolic therapy and Modified standard of Care: a 24-Month Follow-Up" <i>Front. Nutr.</i> , Vol. 20, 29 March 2018 (2018-03-29), ISSN: 2296-861X, abstract, and p. 4, right column, paragraph 1	1, 3, 8-10
A	ELSAKKA, A. M. A. et al. "Management of Glioblastoma Multiforme in a patient treated With Ketogenic Metabolic therapy and Modified standard of Care: a 24-Month Follow-Up" <i>Front. Nutr.</i> , Vol. 20, 29 March 2018 (2018-03-29), ISSN: 2296-874X, abstract, and p. 4, right column, paragraph 1	2, 4-7

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/091116

A. 主题的分类

A61K 31/155(2006.01)i; A61K 38/13(2006.01)i; A61K 31/517(2006.01)i; A61K 31/4706(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNABS, CNTXT, EPODOC, CNKI, CA, EMBASE, VEN, NCBI, STN; 关键词: 肿瘤, 癌, A61P35, 二甲双胍, 环孢素A, Mdivi-1, 氯喹, cancer, tumor, anticancer, antitumor, metformin, cyclosporin, chloroquine, 338967-87-6

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	卢学春等. "含盐酸二甲双胍联合方案治疗再生障碍性贫血的短期疗效观察" 《解放军医学杂志》, 第37卷, 第3期, 2012年 3月 1日 (2012 - 03 - 01), ISSN: 0577-7402, 摘要, "1.4治疗方案" 部分	1-2, 4-5, 10
A	卢学春等. "含盐酸二甲双胍联合方案治疗再生障碍性贫血的短期疗效观察" 《解放军医学杂志》, 第37卷, 第3期, 2012年 3月 1日 (2012 - 03 - 01), ISSN: 0577-7402, 摘要, "1.4治疗方案" 部分	3, 6-9
X	Remco J Molenaar等. "Study protocol of a phase IB/II clinical trial of metformin and chloroquine in patients with IDH1-mutated or IDH2-mutated solid tumours" BMJ Open. 2017 Jun 10; 7(6) e014961., 第7卷, 第6期, 2017年 6月 10日 (2017 - 06 - 10), ISSN: 2052-4897, 摘要, 第7页 "Dose of study drugs and dose-escalation schedule" 部分	1, 3, 8-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 2月 24日

国际检索报告邮寄日期

2020年 3月 13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

韦轶

电话号码 62412193

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Remco J Molenaar等. " "Study protocol of a phase IB/II clinical trial of metformin and chloroquine in patients with IDH1-mutated or IDH2-mutated solid tumours" " BMJ Open. 2017 Jun 10; 7(6) e014961., 第7卷, 第6期, 2017年 6月 10日 (2017 - 06 - 10), ISSN: 2052-4897, 摘要, 第7页 "Dose of study drugs and dose-escalation schedule" 部分	2, 4-7
X	Mussin N等. " "Sirolimus and Metformin Synergistically Inhibits Colon Cancer In Vitro and In Vivo" " J Korean Med Sci, 第32卷, 第9期, 2017年 9月 30日 (2017 - 09 - 30), ISSN: 1011-8934, 摘要	1-2, 4-5, 10
A	Mussin N等. " "Sirolimus and Metformin Synergistically Inhibits Colon Cancer In Vitro and In Vivo" " J Korean Med Sci, 第32卷, 第9期, 2017年 9月 30日 (2017 - 09 - 30), ISSN: 1011-8934, 摘要	3, 6-9
X	Saverio Candidoa等. " "Metformin influences drug sensitivity in pancreatic cancer cells" " Adv Biol Regul., 第68卷, 2018年 2月 12日 (2018 - 02 - 12), ISSN: 2212-4926, 第23页, 2.4部分, 第24页Fig .7, 第25页第8段	1, 3, 8-10
A	Saverio Candidoa等. " "Metformin influences drug sensitivity in pancreatic cancer cells" " Adv Biol Regul., 第68卷, 2018年 2月 12日 (2018 - 02 - 12), ISSN: 2212-4926, 第23页, 2.4部分, 第24页Fig .7, 第25页第8段	2, 4-7
X	Ahmed M. A. Elsakka等. " "Management of Glioblastoma Multiforme in a patient treated With Ketogenic Metabolic therapy and Modified standard of Care: a 24-Month Follow-Up" " Front. Nutr., 第20卷, 2018年 3月 29日 (2018 - 03 - 29), ISSN: 2296-861X, 摘要, 第4页右栏第一段	1, 3, 8-10
A	Ahmed M. A. Elsakka等. " "Management of Glioblastoma Multiforme in a patient treated With Ketogenic Metabolic therapy and Modified standard of Care: a 24-Month Follow-Up" " Front. Nutr., 第20卷, 2018年 3月 29日 (2018 - 03 - 29), ISSN: 2296-861X, 摘要, 第4页右栏第一段	2, 4-7