



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104797296 B

(45)授权公告日 2019.12.17

(21)申请号 201380043906.5

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

(22)申请日 2013.08.19

代理人 郑斌 郑毅

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104797296 A

(51)Int.Cl.

A61K 36/37(2006.01)

(43)申请公布日 2015.07.22

A61K 31/337(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 31/704(2006.01)

61/684,792 2012.08.19 US

A61K 31/517(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00(2006.01)

2015.02.16

A61P 35/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/US2013/055602 2013.08.19

CN 102443039 A, 2012.05.09,

(87)PCT国际申请的公布数据

US 5916564 A, 1999.06.29,

W02014/031543 EN 2014.02.27

Ranadheer Ravula et al.. "Extract of Tripterygium wilfordii sensitizes drug resistant".《J Clin Pharmacol》.2011, 第1364页“1124364”.

(73)专利权人 健康科学西部大学

CHEN,YW et al.. "Triptolide

地址 美国加利福尼亚州

circumvents drug-resistant effect".《Anti-cancer drugs》.2010, 502-513.

(72)发明人 莫塞斯·辛·萨姆·乔 黄英

审查员 萧金仪

王竞华 拉纳德希尔·拉武拉

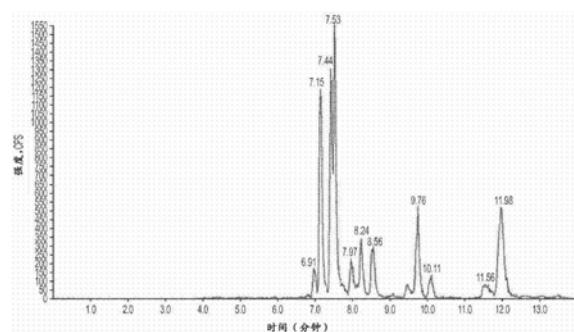
权利要求书1页 说明书25页 附图13页

(54)发明名称

治疗药物的组合以及可药用载体的化学治疗组合物,其中(a)和(b)以有效治疗癌症的组合量施用。

克服化学治疗抗性的雷公藤提取物

(57)摘要



B  
CN 104797296 B

本发明提供了用于克服癌症治疗中的药物抗性的来自雷公藤(Tripterygium wilfordii)的提取物和组合物。本发明涉及雷公藤的有机溶剂提取物及其在癌症治疗中的用途,特别是在对化学治疗药物的治疗已经表现出抗性的癌症的治疗中的用途。公开了治疗癌症的方法。所述方法向有此需要的患者施用(a)雷公藤的有机溶剂提取物和(b)化学治疗药物的组合。以有效治疗癌症的组合量施用雷公藤的有机溶剂提取物(a)和化学治疗药物(b)。被治疗的癌症至少部分地对单独化学治疗药物(b)的治疗有抗性。还公开了包含(a)雷公藤的有机溶剂提取物和(b)化学

1. (a) 雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 的有机溶剂提取物和 (b) **Herceptin®** 或拉帕替尼的组合在制备用于在有此需要的患者中治疗乳腺癌的药物中的用途, 其中 (a) 和 (b) 配制成用于以有效治疗乳腺癌的组合量施用, 其中所述乳腺癌至少部分地对单独 **Herceptin®** 或拉帕替尼 (b) 的治疗有抗性, 其中所述有机溶剂提取物是乙醇提取物, 其中所述雷公藤的乙醇提取物可通过MS/LC色谱图来鉴定, 其中至少一部分 (a) 在施用 (b) 之前施用。

2. (a) 雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 的有机溶剂提取物和 (b) 柔红霉素的组合在制备用于在有此需要的患者中治疗白血病的药物中的用途, 其中 (a) 和 (b) 配制成用于以有效治疗白血病的组合量施用, 其中所述白血病至少部分地对单独柔红霉素 (b) 的治疗有抗性, 其中所述有机溶剂提取物是乙醇提取物, 其中所述雷公藤的乙醇提取物可通过MS/LC色谱图来鉴定, 其中至少一部分 (a) 在施用 (b) 之前施用。

3. 权利要求1或2所述的用途, 其中 (a) 以使 (b) 的效力提高到超过 (b) 单独施用之效力的量施用。

## 克服化学治疗抗性的雷公藤提取物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年8月19日提交的美国申请序列号61/684,792的优先权，并且本文通过引用包括其公开内容。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及增强化学治疗药物之效力的化合物和天然物质。

### 背景技术

[0004] 在持续的化学治疗的过程中总是产生抗药性。克服该问题是癌症治疗中的重大挑战。事实上，肿瘤细胞利用多种机制来提高其对化学治疗药物的抗性。例如，肿瘤细胞可过表达多药抗性转运体和癌蛋白表皮生长因子受体基因以及诱导NF-E2相关因子2(一种上调参与谷胱甘肽代谢和药物解毒的多种基因的氧化还原敏感转录因子(redoxsensing transcription factor))的活性。参见(Huang等,2005a; Makarovskiy等,2002; Wang等,2010); (Salzberg等,2007; Sirotnak等,2000); (Singh等,2010; Zhang等,2010); 和(Huang和Sadee,2003; Seruga等,2010)。刺猬通路(Hedgehog pathway)是参与化学抗性的另一细胞信号通路。(Domingo-Domenech等,2012)

[0005] 迄今为止,还未发现被设计用于靶向特定抗性机制的物质是有效的。然而,用于解决抗药性之新治疗的一种潜在来源是传统的中草药。事实上,这样的药物已使用了数千年用以恢复由多种疾病造成的身体功能失衡。用草药的治疗通常包括摄入包含多种化学组分的草药“提取物”,其可潜在地作用于体内的不同位点和通路。因此,这些药物具有靶向多种细胞和分子机制的潜能,这可提供克服药物抗性的新机遇或者仅仅提高药物的效力。参见Chow&Huang 2010, Pon等2010。如本文中所述,来自一种特定传统中草药*Tripterygium wilfordii*(中文(普通话)名称为雷公藤)的乙醇提取物使对化学治疗药物之治疗已经有了抗性的癌细胞变得敏感,这样使得癌症再一次对化学治疗药物变得敏感。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明涉及雷公藤的有机溶剂提取物及其在癌症治疗(特别是在治疗对化学治疗药物之治疗已经表现出一些抗性的癌症)中的用途。在提取物的多种实施方案中可用的雷公藤有机溶剂提取物可以是(i)乙醇提取物;并且可由如图1中所描述的MS/LC色谱图所鉴定。

[0008] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗癌症的方法。所述方法向有此需要的患者施用(a)雷公藤的有机溶剂提取物和(b)化学治疗药物的组合。以对治疗癌症有效的组合量施用雷公藤的有机溶剂提取物(a)和化学治疗药物(b)。被治疗的癌症至少部分地对单独化学治疗药物(b)的治疗有抗性。在本发明的一个实施方案中,该方法(a)以使(b)的效力提高到超过(b)单独施用之效力的量施用。在本发明的一些实施方案中,癌症可以是乳腺癌、白血病或前列腺癌,并且化学治疗药物(b)是目前用于治疗此类癌症的药物,例如,多西他赛、柔红霉素、曲妥珠单抗和拉帕替尼。

[0009] 雷公藤的有机溶剂提取物(a)和化学治疗药物(b)可以依次施用或共施用。当它们依次施用时,在施用(b)之前施用至少一部分(a)。可以以相同的方式并且使用相似的或相同的化学治疗组合物来施用雷公藤的有机溶剂提取物(a)。如上面所指出的,在本发明的一个方法中,雷公藤的有机溶剂提取物(a)和化学治疗药物(b)可共施用并且可在含有(a)和(b)两者的单一组合物中。因此,本发明的另一个实施方案涉及化学治疗组合物,其包含(a)雷公藤的有机溶剂提取物和(b)化学治疗药物的组合以及可药用载体,其中以有效治疗癌症的组合量施用(a)和(b)。

[0010] 表格简述

[0011] 表1报告了用12 $\mu$ g/ml的雷公藤提取物(Lei Gong Teng extract,LGT-E)预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的磺酰罗丹明B(sulforhodamine B,SRB)细胞生存力测定结果。

[0012] 表2报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时且不用LGT-E预处理的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0013] 表3报告了用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时后的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0014] 表4报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时且不用LGT-E预处理的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0015] 表5报告了用50 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时后的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0016] 表6报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时且不用LGT-E预处理的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0017] 表7报告了用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时后的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0018] 表8报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时且不用LGT-E预处理的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0019] 表9报告了用12.5 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时后的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0020] 表10报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时且不用LGT-E预处理的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0021] 表11报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时后或不用LGT-E预处理的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0022] 表12报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时后或不用LGT-E预处理的多西他赛敏感性PC3细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0023] 表13报告了用多种浓度的LGT-E处理72小时后的多西他赛敏感性PC3细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0024] 表14报告了用多种浓度的LGT-E处理72小时后的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0025] 表15报告了用多种浓度的LGT-E处理72小时后的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0026] 表16报告了用多种浓度的LGT-E处理72小时后的多西他赛敏感DU145细胞的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0027] 表17报告了用于建立每一种药物的IC<sub>50</sub>的细胞系和四种化学治疗药物的浓度范围。

[0028] 表18总结了在多西他赛、柔红霉素、曲妥珠单抗和拉帕替尼的情况下LGT-E的CE测定结果。

[0029] 表19报告了用50μg/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时的多西他赛敏感DU145细胞的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0030] 表20报告了用多种浓度的多西他赛处理72小时且不用LGT-E预处理的多西他赛敏感DU145细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0031] 表21报告了用13μg/ml的LGT-E预处理,随后用多种浓度的**Herceptin®**处理72小时后的**Herceptin®**敏感性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474细胞的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0032] 表22报告了用多种浓度的**Herceptin®**处理72小时且不用LFT-E预处理的**Herceptin®**敏感性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0033] 表23报告了用13μg/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的**Herceptin®**处理72小时后的**Herceptin®**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474/Her细胞的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0034] 表24报告了用多种浓度的**Herceptin®**处理72小时且没有用LGT-E预处理的**Herceptin®**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474/Her的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0035] 表25报告了用多种浓度的拉帕替尼处理72小时后的**Herceptin®**敏感性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0036] 表26报告了用13μg/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的**Herceptin®**处理72小时的**Herceptin®**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474-TxR细胞的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0037] 表27报告了用多种浓度的**Herceptin®**处理72小时且没有用LGT-E预处理的**Herceptin®**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474-TxR的碘酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。

[0038] 表28报告了用12.5μg/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的拉帕替尼处理72小时的**Herceptin®**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌BT474-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0039] 表29报告了用多种浓度的拉帕替尼处理72小时且没有用LGT-E预处理的**Herceptin<sup>®</sup>**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌BT474-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0040] 表30报告了用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的拉帕替尼处理72小时的**Herceptin<sup>®</sup>**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌BT474-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0041] 表31报告了用多种浓度的拉帕替尼处理72小时且没有用LGT-E预处理的**Herceptin<sup>®</sup>**抗性、HER2-阳性乳腺导管癌BT474-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0042] 表32报告了在拉帕替尼敏感性、HER2-阳性乳腺癌系中拉帕替尼敏感度的拉帕替尼剂量响应分析的SRB细胞生存力测定结果。

[0043] 表33报告了在拉帕替尼抗性、HER2-阳性乳腺癌系中拉帕替尼敏感度的拉帕替尼剂量响应分析的SRB细胞生存力测定结果。

[0044] 表34报告了用12.5 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的拉帕替尼处理72小时的拉帕替尼抗性、HER2-阳性乳腺癌SkBr3-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0045] 表35报告了用多种浓度的拉帕替尼处理72小时且没有用LGT-E预处理的拉帕替尼抗性、HER2-阳性乳腺癌SkBr3-TxR细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0046] 表36报告了用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的柔红霉素处理72小时的柔红霉素敏感性髓性白血病K562细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0047] 表37报告了用多种浓度的柔红霉素处理72小时且没有用LGT-E预处理的柔红霉素敏感性髓性白血病K562细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0048] 表38报告了用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的柔红霉素处理72小时的柔红霉素抗性髓性白血病K562/Dox细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0049] 表39报告了用多种浓度的柔红霉素处理72小时且没有用LGT-E预处理的柔红霉素抗性髓性白血病K562/Dox细胞的SRB细胞生存力测定结果。

[0050] 附图简述

[0051] 图1示出了雷公藤(A)根皮和(B)木质部组织的高压液相色谱-二极管-阵列检测(HPLC-DAD)色谱指纹。

[0052] 图2示出了雷公藤提取物产品-雷公藤提取物(LGT-E)的液相色谱和质谱色谱图。

[0053] 图3示出了来自用(A)12 $\mu$ g/ml的雷公藤提取物(LGT-E)或(B)25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时的多西他赛抗性PC3-TxR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表1-4。

[0054] 图4示出了来自用(A)50 $\mu$ g/ml的LGT-E、(B)25 $\mu$ g/ml的LGT-E或(C)12.5 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的多西他赛处理72小时的多西他赛抗性DU145-TxR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表5-10。

[0055] 图5示出了来自(A)多西他赛抗性的PC3-TxR细胞和(B)多西他赛敏感性PC3细胞的多西他赛剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表11和12。

[0056] 图6示出了来自(A)多西他赛敏感性PC3和多西他赛抗性PC3-TXR细胞以及(B)多西他赛敏感性DU145细胞和多西他赛抗性DU145-TXR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表13-16。

[0057] 图7示出了来自用50 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理的多西他赛敏感性DU145细胞的多西他

赛剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表19-20。

[0058] 图8示出了来自用13 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理的**Herceptin**<sup>®</sup>敏感性、HER2阳性乳腺导管癌系BT474的**Herceptin**<sup>®</sup>剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表21-22。

[0059] 图9示出了来自用13 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理**Herceptin**<sup>®</sup>抗性、HER2阳性乳腺导管癌系BT474/Her的**Herceptin**<sup>®</sup>剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表23-24。

[0060] 图10示出了来自**Herceptin**<sup>®</sup>敏感性BT474细胞的**Herceptin**<sup>®</sup>剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表25。

[0061] 图11示出了来自用13 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理的**Herceptin**<sup>®</sup>抗性、HER2阳性乳腺导管癌系BT474/Her的**Herceptin**<sup>®</sup>剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表26-27。

[0062] 图12示出了来自用(A) 12 $\mu$ g/ml或(B) 25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的拉帕替尼处理72小时的**Herceptin**<sup>®</sup>抗性、HER2阳性乳腺导管癌BT474-TxR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表28-31。

[0063] 图13示出了来自拉帕替尼敏感性、HER2阳性乳腺癌系SkBr3对其拉帕替尼抗性亚系SkBr3-TxR的拉帕替尼敏感度的拉帕替尼剂量响应分析的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表32-33。

[0064] 图14示出了来自用12.5 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的拉帕替尼处理72小时的拉帕替尼抗性、HER2阳性乳腺癌SkBr3-TxR细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表34-35。

[0065] 图15示出了来自用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的柔红霉素处理72小时的柔红霉素敏感性髓性白血病K562细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表36-37。

[0066] 图16示出了用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理、随后用多种浓度的柔红霉素处理72个小时的柔红霉素抗性髓性白血病K562/Dox细胞的磺酰罗丹明B(SRB)细胞生存力测定结果。参见表38-39。

[0067] 图17例示了体内LGT-E的化学增敏作用。图17A涉及在15天的用20mg/kg体重的多西他赛处理期间,SCID小鼠肿瘤寄主中PC3-TxR细胞肿瘤相对于多西他赛敏感性PC3-ATCC细胞肿瘤针对肿瘤大小的多西他赛抗性,施用多西他赛的第0天为Doc处理的第1天。图17B涉及LGT-E(500mg/kg体重)相对于多西他赛处理PC3-TxR肿瘤的化学增敏作用,使用图17A中所述的PC3-TxR肿瘤模型,包括未经处理的肿瘤、LGT-E处理的肿瘤和LGT-E和多西他赛处理的肿瘤。

[0068] 发明详述

[0069] 本文中描述了通过向有此需要的患者施用雷公藤的乙醇提取物和化学治疗药物

的组合来治疗癌症的方法和药物制剂,其中雷公藤的乙醇提取物和化学治疗药物以有效治疗癌症的组合量来施用。在多种实施方案中,本发明的方法治疗至少部分地对单独施用化学治疗药物(即不存在雷公藤的乙醇提取物)时的化学治疗药物治疗有抗性的癌症。因此,在多种实施方案中,本发明的方法通过使化学治疗药物抗性癌细胞与本文所述雷公藤乙醇提取物的至少一种组分接触来克服抗癌化学治疗药物抗性并且引起细胞对化学治疗药物的抗性逆转,从而使得化学治疗药物引起抗药性癌细胞的死亡或细胞抑制(cytostasis)。因此,本发明的治疗方法用于抑制、延迟或阻止那些对化学治疗剂有抗药性的肿瘤细胞的生长。

[0070] 本发明的雷公藤提取物是从中国吉林省获得的药用植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook f.)的根木质部获得的。如上所述,本发明的方法使用雷公藤的乙醇提取物。在多种实施方案中,本发明的方法使用通过合并来自一系列95%的乙醇提取的所提取材料而制备的雷公藤的乙醇提取物。在多种其他实施方案中,通过将所提取材料吸附到硅胶中并使被吸附的材料经受额外的乙醇提取来进一步提取经乙醇提取的雷公藤材料。通常通过将提取物置于旋转蒸发器中,从提取物中除去乙醇。干燥的材料可任选为冻干的。最后,通过本方法使用的雷公藤之干燥的乙醇提取物称为LGT-E,并且其特征在于具有如图2中所述的液相色谱和质谱色谱图。

[0071] 可由本发明的方法治疗的癌症包括多种器官的实体肿瘤和血液学肿瘤两者。实体肿瘤的非限制性实例是转移性乳腺癌和前列腺癌(包括雄激素依赖性和雄激素非依赖性前列腺癌)。通过本发明的方法可治疗的血液学肿瘤包括例如慢性髓细胞源性白血病(chronic myelogenous leukemia,CML),其特征在于在血液、骨髓、脾、肝以及有时在其他组织中不成熟粒细胞(例如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)的异常增殖。

[0072] 适于与本发明的雷公藤提取物或提取物组分组合使用的化学治疗药物的非限制性实施例包括:拓扑异构酶抑制剂,包括例如多柔比星和柔红霉素;紫杉烷类,包括多西他赛;靶向嵌入到靶细胞表面的受体(例如HER受体)的生物制剂,所述HER受体包括HER2/neu,其为曲妥珠单抗(以**Herceptin**<sup>®</sup>商标名出售)的靶标。

[0073] 如本文所使用的术语“治疗”是指向具有对化学治疗药物有抗药性之癌症的对象共施用雷公藤的乙醇提取物和化学治疗药物,目的是治疗、治愈、减轻、缓减、改变、补救、改进、改善或影响癌症。在多种实施方案中,本发明的方法将本发明的雷公藤的乙醇提取物和与提取物共施用的化学治疗药物同时施用或即时先后施用,而在另一些实施方案中,在施用化学治疗药物之前施用雷公藤的乙醇提取物以使被治疗的癌细胞在与化学治疗药物接触之前至少部分地变得敏感。

[0074] 术语“有效量”是指使癌细胞对指定化学治疗药物的抗性降低所需的雷公藤乙醇提取物的量。如本领域的技术人员所公认的,有效量可依赖于施用的途径、赋形剂的使用和共同使用其他药剂的可能性而不同。

[0075] 如上所述,本发明包括包含雷公藤提取物或提取物组分的药物组合物。为了实践本发明的方法,上述的药物组合物可以经口、肠道外、通过吸入气雾剂、表面地、经直肠、经鼻、口腔、经阴道或通过植入储库(implanted reservoir)来施用。本文中所使用的术语“肠道外”包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内(intrasyновial)、胸骨内、鞘内、病灶内(intralesional)和颅内注射或输注技术。

[0076] 可注射组合物可以常规的形式制备,或者作为液体溶液或混悬液,适于在注射之前液体中溶液或混悬液的固体形式或者作为乳剂。注射剂、溶液和乳剂还可包含一种或更多种赋形剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。此外,如果需要,待施用的药物组合物还可含有少量的无毒性辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解性增强剂和其他这样的试剂,例如,乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺和环糊精。

[0077] 用于口服施用的组合物可以是任何可口服的剂型,包括但不限于胶囊剂、片剂、乳剂和水混悬剂、分散体和溶液剂。在口服使用片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于以胶囊形式口服施用时,可用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服施用水混悬剂或乳剂时,活性成分可与乳化剂或助悬剂组合混悬或溶解在油相中。

[0078] 就与制剂中的活性成分兼容的意义而言,药物组合物中的载体必须是“可接受的”(且优选能够使其稳定)并且对于待治疗的对象无害。例如,一种或更多种增溶剂(其与稠合的二环或三环化合物或者更多的增溶剂形成更多种可溶性复合物)可被用作递送活性化合物的可药用载体。其他载体的实例包括胶体二氧化硅、硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和D&C黄色#10。

## 实施例

[0079] 实施例1

[0080] 雷公藤的认证。雷公藤的根购自三元药物有限公司(Sanyuan Pharmaceuticals Co.Ltd.) (中华人民共和国吉林省),并在澳门科技大学的澳门医学和健康应用研究所(Macau Institute of Applied Research for Medicine and Health of Macau University Of Science and Technology,Macau)进行认证,如下。根据相同的方案对雷公藤的根皮和根木质部进行了认证。因此,将根皮和根木质部组织各自研磨成粉末并使其通过60目筛。对于每种根或木质部制备物,精确称量0.2g研磨粉末并添加20mL乙酸乙酯。于45℃下使用浴超声处理1小时以提取样品。将该混合物过滤,并用20mL甲醇重悬残余物,随后于45℃下通过浴超声再处理1小时。将乙酸乙酯提取物和甲醇提取物合并,并使用旋转蒸发器将其蒸干。用2ml甲醇使固体提取物重构,并通过0.45μg过滤器进行过滤。HPLC-DAS

[0081] 用Agilent 1200系列LC系统和模块(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)进行高压液相色谱(HPLC)层析。使用对称(Symmetry) C18 (250×4.6mm,5μm)柱(Waters Corp.,Milford,MA)进行色谱层析。分析柱的温度设定为20℃,且检测波长为210nm。使用含乙腈(A)和0.1%的磷酸(v/v)(B)的流动相以1ml/分钟流量进行线性梯度洗脱。梯度开始于40%的洗脱剂A和60%的洗脱剂B。在20分钟内将梯度线性改变至50%的洗脱剂B,在20分钟内至25%的洗脱剂B,并在10分钟内至20%的洗脱剂B。然后在10分钟内将梯度进一步变回至80%的洗脱剂B,并保持在该百分比。雷公藤根皮和木质部组织的HPLC-二极管-阵列检测(HPLC-DAD)色谱图指纹分别示于图1A和1B。

[0082] 雷公藤提取物的制备。将雷公藤根木质部组织(390.61g)置于混合器中并混合成小块。将混合的根材料加入到2L的95%乙醇中,超声处理1小时,然后在95%乙醇中浸渍过夜。之后,使用真空加压过滤该材料,并收集乙醇。加压过滤后剩余的残余物用600mL的95%

乙醇洗涤两次，并在每次洗涤周期中，超声处理30分钟。来自两次洗涤的乙醇与初始的2L乙醇合并在一起，并且使用旋转蒸发器蒸发合并的提取物，然后冷冻干燥。前述提取步骤的总产率为产生16.16g乙醇提取材料，其通过在硅胶60上吸附蒸发的产物并且使吸附的材料按以下溶剂的顺序依次提取而进一步分馏：95%的乙醇和氯仿。对乙醇和氯仿提取物的化学增敏作用进行了定量。还制备了水提取物并将其与乙醇和氯仿的提取物比较从而确定了其CE。雷公藤水提物来自中国云南，并且获自江阴天江药物有限公司 (Tianjiang Pharmaceutical Co.,Ltd., 中国江苏)，并通过ACE Pharmaceuticals Ltd (Hong Kong) 市售可得。

[0083] 评估提取物的化学增敏性

[0084] 化学增敏效应 (chemosensitizing effect, CE) 是当化合物和化学治疗药物共施用时，化合物可降低(即化学增敏)所需化学治疗药物浓度之半最大抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 的程度的量度。这里， $IC_{50}$ 是抑制50%细胞增殖的化学治疗药物的浓度。CE表示为： $CE = IC_{50D}/IC_{50E+D}$ 。 $IC_{50D}$ 是针对评估的受试提取物(或怀疑具有CE的其他化合物)之化学治疗药物的 $IC_{50}$ 。 $IC_{50E+D}$ 是受试提取物和化学治疗药物之组合的 $IC_{50}$ 。受试提取物或化合物的CE可根据待评估的细胞类型和特定的化学治疗剂或种类或者治疗剂的组合而不同。

[0085] 通常当以高于产生CE所需的浓度施用受试提取物或化合物时，受试提取物或化合物也可以是非特异性细胞毒素(与靶向肿瘤细胞的化学治疗药物相反)。理想地，产生CE所需的受试化合物的浓度显著低于其 $IC_{50}$ 。可通过计算用于受试提取物或化合物的化学增敏效用指数 (Chemosensitizing Utility Index, CUI) 值来对这些浓度之间差异进行定量。CUI表达为： $CUI = CE \times (IC_{50E}/Con_E)$ 。 $IC_{50E}$ 是抑制50%细胞增殖的提取物(例如，雷公藤的提取物或提取的化合物)的浓度。 $Con_E$ 是产生理想的CE所需的提取物或化合物的浓度。然后体内的环境下测试发现具有理想CE和CUI值之提取物和化合物作为化学增敏剂的潜能。

[0086] CE和CUI值是从上述的水、乙醇和氯仿提取物中单独地获得的。使用化学治疗剂多西他赛，联合多西他赛抗性的前列腺癌系PC3-TxR(密歇根大学)，使用如下面实施例5中所述的基于磺酰罗丹明B(SRB)的增殖测定进行这些分析。所有上述的提取物都与理想的CE和CUI值相联系。水、乙醇和氯仿提取物的 $IC_{50E+D}$ 浓度分别为9.3、3.97和3.8nM，且CUI值分别为17.74、27.39和17.37。基于乙醇相对较高的CUI值，选择乙醇进行进一步研究，如以下实施例中所记录。在实施例中，乙醇被称为雷公藤提取物(LGT-E)。

[0087] LGT-E的液相色谱和质谱(LC-MS)分析。如上述制备的500mg/ml的LGT-E提取物产品的储备溶液是通过将500mg的LGT-E提取物溶解在乙醇中制成的。于80%的乙腈中将储备液进一步稀释至500μg/ml。使用API3200LC/MS/MS系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 和两个装备有SIL-20A Prominence自动进样器的Shimadzu LC-20AD Prominence液相色谱泵 (Shimadzu, Columbia, MD, USA) 对10μl等分试样进行LC-MS/MS分析。使用具有SB-C18Guard Cartridge (12.5×2.1mm, Zorbax, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 的Zorbax SB C18柱 (150×2.1mm, 5μm, Zorbax, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 进行色谱分析。

[0088] 使用含乙腈(A)和含2mM乙酸铵的0.2%甲酸(B)的流动相以0.35ml/分钟的流量进行线性梯度洗脱。梯度开始于30%的洗脱剂A和70%的洗脱剂B进行3分钟，并在2分钟内线性地改变至40%的洗脱剂B并保持2分钟。然后在1分钟内将梯度变回至95%的洗脱剂B，并

保持该百分比6分钟。分析柱和自动进样器的温度都设定为室温。然后将所有液相色谱洗脱剂引入到大气压力化学电离(atmospheric-pressure chemical ionization,APCI)源。质谱条件为:气体1,氮气(30psi);气体2,氮气(30psi);雾化器电流(5.0v);源温度,400℃;幕气,氮气(25psi)。对于LGT-E的HPLC色谱图示于图2。

[0089] 用于评估LGT-E的CE的细胞系。在实施例中描述了LGT-E的化学增敏效应的持续分析,本文中利用以下的人细胞系:(i)多西他赛抗性的前列腺癌系DU145-TxR和PC3-TxR(由匹兹堡大学医学系和联盟医疗(Partners Healthcare)提供,但在实施例2-7中使用的PC3-TxR细胞是从密歇根大学获得的);(ii)多西他赛敏感的系PC3和DU145(购自ATCC,Manassas,VA,USA);(iii) **Herceptin®**敏感性、HER2阳性乳腺导管癌系BT474(由Cui博士,Cedars-Sinai,Beverly Hills,CA提供);(iv) **Herceptin®**抗性、HER2阳性乳腺癌系SkBr3(由Xiaojiang Cui博士,Cedars-Sinai,Beverly Hills,CA提供);以及(v)分别为柔红霉素敏感性和抗性的髓性白血病系K562和K562/Dox(由Kenneth Chan博士,俄亥俄州立大学提供)。

[0090] 实施例2

[0091] LGT-E对于多西他赛抗性前列腺癌细胞系PC3-TrX对多西他赛之增敏作用的剂量依赖效应。通过放置进每个孔中将PC3-TxR细胞接种到有盖的无菌F-底**Cellstar®**96孔细胞培养板(目录号#655180,购自Greiner Bio-one,Monroe,NC)中,向含3000个细胞的100 $\mu$ l RPMI 1640培养基中补充含10%胎牛血清(Thermo Scientific,Logan,UT)和青霉素溶液(100U/ml)以及链霉素(100 $\mu$ g/ml)(Life Technologies Grand Island,NY)。细胞处于平板接种的52代。为每个所测试的实验条件分配一式三份的孔,并且对于细胞进行孔接种允许24小时的恢复期。在恢复期期间,在37℃和5%CO<sub>2</sub>下孵育细胞。

[0092] 通过向DMSO中添加适量的LGT-E粉末以形成500mg/ml的储备溶液来制备LGT-E。交替涡旋并超声处理该储备溶液直到LGT-E粉末融入溶液。将储备溶液在RPMI 1640培养基(Mediatech,Manassas,VA,或者Life Technologies Grand Island,NY)中稀释以达到LGT-E的期望浓度(例如12、25或60 $\mu$ g/ml)。

[0093] 用LGT-E预处理细胞是通过从孔中抽吸培养基,接着加入50 $\mu$ l含12 $\mu$ g/ml或25 $\mu$ g/ml浓度之LGT-E溶液的LGT-E溶液并在37℃和5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育细胞两个小时。在两个小时的预处理期结束时,在LGT-E培养基存在下,将1:3系列稀释的50 $\mu$ l等分试样的多西他赛(其在RPMI 1640培养基中含有1×10<sup>2</sup>至1×10<sup>-3</sup> nM的多西他赛(即,100、33.3、10.0、3.33、1.0、0.333、0.1和0.001nM))加入到预处理的细胞中。在加入到细胞之前,立即将来自储备溶液(105 $\mu$ M多西他赛于DMSO中,目录号#:01885,购自Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的多西他赛稀释。加入多西他赛之后,在预处理步骤使用的相同温度和大气压条件下将细胞再孵育72小时。

[0094] 在72小时的多西他赛处理期后,使用碘酰罗丹明B(SRB)测定以对活细胞进行定量。从各个孔中吸出介质,并用10%冷的三氯乙酸(TCA)(目录#:T6399,购自Sigma-Aldrich)溶液替换,并于4℃下孵育1小时。TCA孵育后,吸出TCA溶液,用自来水将细胞清洗5次。除去最后一次洗涤液后,将培养板的盖子打开并留置在室温下,直到表面干燥,这将历时一至两个小时。然后将50 $\mu$ l的0.4%碘酰罗丹明B(SRB)钠盐(目录号#:S9012,购自Sigma-

Aldrich) 溶液加入到每个孔中, 将培养板在室温下孵育20至30分钟。之后, 用溶于10mM TRIS碱(目录号: 161-0719, 购自Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)的1%乙酸溶液将孔洗涤5次。随后将培养板放置以干燥数小时或过夜。通过向每个孔中添加100 $\mu$ l SRB溶解溶液(10mM TRIS碱)使得在干燥的孔中残留的SRB溶解, 或者将培养板放置在轻轻晃动的振动器上或者使培养板在室温下保持静止直到SRB溶解, 这将历时约五到十分钟。通过酶标仪在565nm吸光度下经分光光度测定与固定的活细胞数目相关的各孔中SRB的量。通过比较LGT-E预处理的细胞和用多西他赛处理而未用LGT-E处理的细胞来确定细胞生存力的升高或降低。

[0095] 在本实施例中描述的实验结果如下: 表1和表3报告了关于用12 $\mu$ g/ml和25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理细胞生存力数据; 表2和表4报告了通过仅用指定浓度的多西他赛处理细胞而获得的对照数据。图3以图形的形式总结了表1-4的数据。

[0096] 表1

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.090 | 0.140 | 0.422 | 1.275 | 1.924 | 2.084 | 2.091 | 2.084 |
| 背景=0.047            | 0.077 | 0.143 | 0.460 | 1.329 | 2.011 | 2.124 | 2.125 | 2.074 |
| 平均值A                | 0.084 | 0.143 | 0.433 | 1.276 | 2.000 | 2.116 | 2.155 | 2.046 |
| SD                  | 0.007 | 0.003 | 0.023 | 0.052 | 0.072 | 0.029 | 0.083 | 0.058 |
| 存活%                 | 4.1   | 7.0   | 21.2  | 62.4  | 97.8  | 103.4 | 105.3 | 100.0 |
| CV                  | 7.79  | 1.77  | 5.35  | 4.08  | 3.58  | 1.36  | 3.86  | 2.83  |

[0098] 表2

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.243 | 0.672 | 1.716 | 2.124 | 2.316 | 2.142 | 2.190 | 2.257 |
| 背景=0.047            | 0.257 | 0.699 | 1.734 | 2.195 | 2.337 | 2.354 | 2.216 | 2.185 |
| 平均值A                | 0.252 | 0.605 | 1.676 | 2.184 | 2.354 | 2.173 | 2.151 | 2.215 |
| SD                  | 0.007 | 0.048 | 0.030 | 0.038 | 0.019 | 0.115 | 0.033 | 0.036 |
| 存活%                 | 11.3  | 29.7  | 77.0  | 97.7  | 105.3 | 100.2 | 98.5  | 100.0 |
| CV                  | 2.83  | 7.35  | 1.74  | 1.76  | 0.82  | 5.15  | 1.50  | 1.63  |

[0100] 表3

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.092 | 0.104 | 0.200 | 0.754 | 1.672 | 2.013 | 2.071 | 2.027 |
| 背景=0.047            | 0.115 | 0.102 | 0.203 | 0.699 | 1.774 | 2.104 | 2.122 | 2.066 |
| 平均值A                | 0.085 | 0.095 | 0.179 | 0.681 | 1.634 | 1.991 | 1.960 | 2.068 |
| SD                  | 0.016 | 0.005 | 0.013 | 0.038 | 0.072 | 0.060 | 0.083 | 0.023 |
| 存活%                 | 4.7   | 4.9   | 9.4   | 34.6  | 82.5  | 99.1  | 99.9  | 100.0 |
| CV                  | 16.19 | 4.73  | 6.76  | 5.35  | 4.28  | 2.94  | 4.04  | 1.13  |

[0102] 表4

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.332 | 0.763 | 1.791 | 2.350 | 2.432 | 2.413 | 2.363 | 2.449 |
| 背景=0.047            | 0.306 | 0.776 | 1.862 | 2.321 | 2.369 | 2.373 | 2.292 | 2.376 |
| 平均值A                | 0.313 | 0.801 | 1.802 | 2.332 | 2.255 | 2.314 | 2.360 | 2.285 |
| SD                  | 0.013 | 0.019 | 0.038 | 0.015 | 0.090 | 0.050 | 0.040 | 0.082 |
| 存活%                 | 13.4  | 32.9  | 76.7  | 98.5  | 99.2  | 99.9  | 98.7  | 100.0 |
| CV                  | 4.25  | 2.48  | 2.10  | 0.63  | 3.82  | 2.10  | 1.72  | 3.47  |

[0104] 实施例3

[0105] LGT-E对于多西他赛抗性的前列腺癌细胞系DU145-TrX对多西他赛之增敏作用的剂量依赖效应。使用实施例2中描述的方法,研究了LGT-E预处理对于经多西他赛处理的DU145-TrX细胞的化学增敏效应。在这项研究中,用50、25或12.5 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^{-3}$ nM多西他赛之50 $\mu$ l等分试样的多西他赛处理细胞。DU145-TxR在第38代进行平板接种。表5、7和9报告了分别有关用50、25和12.5 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理细胞生存力数据。表6、8和10报告了从未经LGT-E预处理的DU145-TxR细胞获得的对照数据。图4以图形的形式总结了表5-10的数据。

[0106] 表5

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.110 | 0.103 | 0.260 | 0.638 | 1.565 | 1.846 | 1.854 | 1.922 |
| 背景=0.046            | 0.103 | 0.103 | 0.214 | 0.679 | 1.576 | 1.978 | 1.989 | 1.985 |
| 平均值A                | 0.118 | 0.115 | 0.222 | 0.741 | 1.770 | 1.978 | 1.974 | 2.076 |
| SD                  | 0.110 | 0.107 | 0.232 | 0.686 | 1.637 | 1.934 | 1.939 | 1.994 |
| 存活%                 | 0.008 | 0.007 | 0.025 | 0.052 | 0.115 | 0.076 | 0.074 | 0.077 |
| CV                  | 5.5   | 5.4   | 11.6  | 34.4  | 82.1  | 97.0  | 97.2  | 100.0 |
|                     | 6.81  | 6.48  | 10.60 | 7.56  | 7.04  | 3.94  | 3.82  | 3.88  |

[0108] 表6.DU145-TxR细胞,未经预处理

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 2.268 | 2.368 | 2.380 | 2.399 | 2.385 | 2.360 | 2.441 | 2.408 |
| 背景=0.046            | 2.159 | 2.369 | 2.397 | 2.434 | 2.398 | 2.414 | 2.379 | 2.309 |
| 平均值A                | 2.192 | 2.304 | 2.332 | 2.316 | 2.350 | 2.318 | 2.338 | 2.262 |
| SD                  | 2.206 | 2.347 | 2.370 | 2.383 | 2.378 | 2.364 | 2.386 | 2.326 |
| 存活%                 | 0.056 | 0.037 | 0.034 | 0.061 | 0.025 | 0.048 | 0.052 | 0.075 |
| CV                  | 94.8  | 100.9 | 101.9 | 102.4 | 102.2 | 101.6 | 102.6 | 100.0 |
|                     | 2.53  | 1.59  | 1.42  | 2.54  | 1.04  | 2.04  | 2.17  | 3.20  |

[0110] 表7

[0111]

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.139 | 0.337 | 0.762 | 1.752 | 2.312 | 2.349 | 2.437 | 2.379 |
| 背景=0.046            | 0.142 | 0.332 | 0.825 | 1.863 | 2.385 | 2.534 | 2.377 | 2.359 |
| 平均值A                | 0.158 | 0.305 | 0.786 | 1.681 | 2.298 | 2.334 | 2.432 | 2.354 |
| SD                  | 0.010 | 0.017 | 0.032 | 0.092 | 0.047 | 0.111 | 0.033 | 0.013 |
| 存活%                 | 6.2   | 13.7  | 33.5  | 74.7  | 98.6  | 101.8 | 102.2 | 100.0 |
| CV                  | 6.96  | 5.30  | 4.02  | 5.20  | 2.00  | 4.63  | 1.38  | 0.56  |

[0112] 表8

[0113]

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 2.185 | 2.349 | 2.450 | 2.494 | 2.430 | 2.525 | 2.531 | 2.492 |
| 背景=0.046            | 2.194 | 2.371 | 2.444 | 2.450 | 2.438 | 2.453 | 2.449 | 2.369 |
| 平均值A                | 2.136 | 2.302 | 2.269 | 2.342 | 2.428 | 2.323 | 2.327 | 2.297 |
| SD                  | 2.172 | 2.341 | 2.388 | 2.429 | 2.432 | 2.434 | 2.436 | 2.386 |
| 存活%                 | 0.031 | 0.035 | 0.103 | 0.078 | 0.005 | 0.102 | 0.103 | 0.099 |
| CV                  | 91.0  | 98.1  | 100.1 | 101.8 | 101.9 | 102.0 | 102.1 | 100.0 |

[0114] 表9

[0115]

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 0.420 | 1.055 | 2.116 | 2.412 | 2.562 | 2.451 | 2.538 | 2.562 |
| 背景=0.046            | 0.408 | 1.059 | 2.152 | 2.385 | 2.479 | 2.538 | 2.540 | 2.650 |
| 平均值A                | 0.542 | 1.090 | 2.219 | 2.365 | 2.635 | 2.522 | 2.596 | 2.612 |
| SD                  | 0.457 | 1.068 | 2.163 | 2.388 | 2.559 | 2.504 | 2.558 | 2.608 |
| 存活%                 | 0.074 | 0.019 | 0.052 | 0.024 | 0.078 | 0.046 | 0.033 | 0.044 |
| CV                  | 17.5  | 41.0  | 82.9  | 91.5  | 98.1  | 96.0  | 98.1  | 100.0 |

[0116] 表10.DU145-TxR细胞,未经预处理

[0117]

| 多西他赛 (nM)           | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份) | 2.342 | 2.416 | 2.402 | 2.480 | 2.513 | 2.454 | 2.600 | 2.538 |
| 背景=0.046            | 2.274 | 2.395 | 2.508 | 2.511 | 2.551 | 2.494 | 2.600 | 2.515 |
| 平均值A                | 2.196 | 2.338 | 2.372 | 2.409 | 2.372 | 2.372 | 2.391 | 2.439 |
| SD                  | 2.271 | 2.383 | 2.428 | 2.467 | 2.479 | 2.440 | 2.531 | 2.498 |
| 存活%                 | 0.073 | 0.040 | 0.071 | 0.052 | 0.094 | 0.062 | 0.121 | 0.052 |
| CV                  | 90.9  | 95.4  | 97.2  | 98.8  | 99.3  | 97.7  | 101.3 | 100.0 |

[0118] 实施例4

[0119] 比较多西他赛敏感性前列腺癌细胞与多西他赛抗性前列腺癌细胞的多西他赛敏感度。为了确定多西他赛抗性细胞系比其各自亲代的多西他赛敏感性细胞系更具抗性的程度,在不存在LGT-E预处理下用多西他赛处理后,比较了多西他赛抗性PC3-TxR细胞系和获得PC3-TxR之多西他赛敏感性细胞系PC3的细胞生存力。按实施例2中所述进行了细胞培养

条件、多西他赛处理和细胞生存力分析。如实施例2中,用1:3系列稀释的含 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^{-3}$ nM多西他赛之50μl等分试样的多西他赛处理细胞。PC3-TrX和PC3细胞分别接种于52代和11代。表11和12分别示出了从多西他赛抗性PC3-TxR细胞和多西他赛敏感性PC3细胞之多西他赛处理而获得的数据。图5以图形的形式总结了表11和12的数据。

[0120] 表11

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.049 | 0.332<br>0.306<br>0.313 | 0.763<br>0.776<br>0.801 | 1.791<br>1.862<br>1.802 | 2.350<br>2.321<br>2.332 | 2.432<br>2.369<br>2.255 | 2.413<br>2.373<br>2.314 | 2.363<br>2.292<br>2.360 | 2.449<br>2.376<br>2.285 |
| 平均值A                            | 0.317                   | 0.780                   | 1.818                   | 2.334                   | 2.352                   | 2.366                   | 2.338                   | 2.370                   |
| SD                              | 0.013                   | 0.019                   | 0.038                   | 0.015                   | 0.090                   | 0.050                   | 0.040                   | 0.082                   |
| 存活%                             | 13.4                    | 32.9                    | 76.7                    | 98.5                    | 99.2                    | 99.9                    | 98.7                    | 100.0                   |
| CV                              | 4.25                    | 2.48                    | 2.10                    | 0.63                    | 3.82                    | 2.10                    | 1.72                    | 3.47                    |

[0121] 表12

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.049 | 0.287<br>0.331<br>0.330 | 0.354<br>0.370<br>0.339 | 0.448<br>0.450<br>0.517 | 1.038<br>1.090<br>0.976 | 1.811<br>1.855<br>1.797 | 1.982<br>2.247<br>2.091 | 2.591<br>2.097<br>2.111 | 2.362<br>2.291<br>2.082 |
| 平均值A                            | 0.316                   | 0.354                   | 0.472                   | 1.035                   | 1.821                   | 2.107                   | 2.266                   | 2.245                   |
| SD                              | 0.025                   | 0.016                   | 0.039                   | 0.057                   | 0.030                   | 0.133                   | 0.281                   | 0.146                   |
| 存活%                             | 14.1                    | 15.8                    | 21.0                    | 46.1                    | 81.1                    | 93.8                    | 101.0                   | 100.0                   |
| CV                              | 7.95                    | 4.38                    | 8.33                    | 5.52                    | 1.66                    | 6.32                    | 12.41                   | 6.48                    |

[0122] 实施例5

[0125] 多西他赛敏感性和多西他赛抗性的前列腺癌细胞之LGT-E IC<sub>50</sub>的测定。对多西他赛敏感性细胞系PC3和DU145以及其多西他赛抗性亚系进行了LGT-E IC<sub>50</sub>浓度的测定。按实施例2中描述的进行了细胞培养条件和细胞生存力的分析。然而,不同于实施例2,细胞是在100.0、33.3、10.0、3.33、1.0、0.333、0.1或0.001μg/ml的LGT-E存在下于标准的培养条件下孵育72小时,并且细胞未经多西他赛处理。PC3和PC3-TrX细胞分别于15和38代进行平板接种且DU145和DU145-TrX各自于46代进行平板接种。表13和表14分别报告了从PC3和PC3-TxR获得的细胞生存力数据。表15和表16分别报告了从DU145-TxR和DU145细胞获得的细胞生存力数据。图6以图形的形式总结了表13-16的数据。

[0126] 表13

| LGT-E (μg/ml)                   | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.046 | 0.355<br>0.328<br>0.323 | 0.208<br>0.186<br>0.181 | 0.255<br>0.250<br>0.235 | 0.665<br>0.560<br>0.590 | 1.327<br>1.496<br>1.281 | 1.649<br>1.723<br>1.629 | 1.555<br>1.658<br>1.579 | 1.629<br>1.705<br>1.668 |
| 平均值A                            | 0.335                   | 0.192                   | 0.247                   | 0.605                   | 1.368                   | 1.667                   | 1.597                   | 1.667                   |
| SD                              | 0.017                   | 0.014                   | 0.010                   | 0.054                   | 0.113                   | 0.050                   | 0.054                   | 0.038                   |
| 存活%                             | 20.1                    | 11.5                    | 14.8                    | 36.3                    | 82.0                    | 100.0                   | 95.8                    | 100.0                   |
| CV                              | 5.13                    | 7.49                    | 4.22                    | 8.94                    | 8.27                    | 2.97                    | 3.37                    | 2.28                    |

[0128] 表14

| <i>LGT-E</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.046   | 0.354 | 0.245 | 0.279 | 1.261 | 2.395 | 2.416 | 2.468 | 2.455 |
|                                   | 0.366 | 0.260 | 0.311 | 1.503 | 2.445 | 2.559 | 2.536 | 2.495 |
|                                   | 0.353 | 0.241 | 0.291 | 1.331 | 2.394 | 2.508 | 2.497 | 2.506 |
| 平均值A                              | 0.358 | 0.249 | 0.294 | 1.365 | 2.411 | 2.494 | 2.500 | 2.485 |
| <i>SD</i>                         | 0.007 | 0.010 | 0.016 | 0.125 | 0.029 | 0.072 | 0.034 | 0.027 |
| 存活%                               | 14.4  | 10.0  | 11.8  | 54.9  | 97.0  | 100.4 | 100.6 | 100.0 |
| <i>CV</i>                         | 2.02  | 4.03  | 5.50  | 9.12  | 1.21  | 2.91  | 1.36  | 1.08  |

[0130] 表15

| <i>LGT-E</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.043   | 1.247 | 0.442 | 1.224 | 1.883 | 1.966 | 1.936 | 1.953 | 1.880 |
|                                   | 1.699 | 0.416 | 1.156 | 1.948 | 1.995 | 1.999 | 2.056 | 2.034 |
|                                   | 1.173 | 0.444 | 0.869 | 1.827 | 1.940 | 2.002 | 1.962 | 1.896 |
| 平均值A                              | 1.373 | 0.434 | 1.083 | 1.886 | 1.967 | 1.979 | 1.990 | 1.936 |
| <i>SD</i>                         | 0.285 | 0.016 | 0.188 | 0.061 | 0.028 | 0.037 | 0.057 | 0.085 |
| 存活%                               | 70.9  | 22.4  | 55.9  | 97.4  | 101.6 | 102.2 | 102.8 | 100.0 |
| <i>CV</i>                         | 0.207 | 0.036 | 0.174 | 0.032 | 0.014 | 0.019 | 0.029 | 0.044 |

[0132] 表16

| <i>LGT-E</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 100   | 33.3  | 10    | 3.33  | 1     | 0.333 | 0.1   | 0.001 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.043   | 1.036 | 0.217 | 0.651 | 2.179 | 2.162 | 2.235 | 2.163 | 2.109 |
|                                   | 1.104 | 0.257 | 0.685 | 2.148 | 2.174 | 2.229 | 2.097 | 2.090 |
|                                   | 0.854 | 0.272 | 0.792 | 2.129 | 2.083 | 2.150 | 2.115 | 2.002 |
| 平均值A                              | 0.998 | 0.248 | 0.709 | 2.152 | 2.139 | 2.204 | 2.125 | 2.067 |
| <i>SD</i>                         | 0.129 | 0.028 | 0.074 | 0.025 | 0.049 | 0.047 | 0.034 | 0.057 |
| 存活%                               | 48.3  | 12.0  | 34.3  | 104.1 | 103.5 | 106.7 | 102.8 | 100.0 |
| <i>CV</i>                         | 0.130 | 0.115 | 0.104 | 0.012 | 0.023 | 0.022 | 0.016 | 0.028 |

[0134] 实施例6

[0135] 当与多种不同的化学治疗药物和癌细胞系配对时LGT-E的CE值的比较。在该比较中,确定以下的LGT-E IC<sub>50</sub>: (i) 多西他赛与多西他赛敏感性细胞系PC3和DU145及其多西他赛抗性的亚系配对; (ii) 多柔比星分别与多柔比星敏感性和抗性髓性白血病系K562和K562/Dox配对; (iii) **Herceptin®** 敏感性、HER2阳性乳腺导管癌系BT474; 以及 (iv)

**Herceptin®** 抗性、HER2阳性乳腺癌系SkBr3。按实施例2中所描述的进行上述细胞系的细胞培养,所不同的是对于K562、K562/Dox、BT474、SkBr3系,每个孔中平板接种5000个而不是3000个细胞。

[0136] 与LTG-E组合进行化学增敏性测试的化学治疗药物是多西他赛、柔红霉素、**Herceptin®** 和拉帕替尼。为了确定这些药物各自的IC<sub>50</sub>以及验证在这些研究中使用的细胞系的已知药物敏感度,如上详述平板接种细胞系并在如表17所示的上述化学治疗药物存

在下培养细胞系72个小时,随后进行细胞生存力的SRB分析。表17还包含每个所测试细胞系的系列稀释药物浓度。

[0137] 表17

| 化学治疗药物     | 用于确定 IC <sub>50</sub> 的药浓度的范围         | 用于确定 IC <sub>50</sub> 的细胞系 |
|------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 多西他赛       | 100, 33, 10, 3.3, 1, 0.3, 0.1 (nM)    | PC3 和 DU145                |
| Herceptin® | 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 (μM)     | BT474                      |
| 拉帕替尼       | 20, 6.7, 2, 0.7, 0.2, 0.07, 0.02 (μM) | BT474 和 SkBr3              |
| 柔红霉素       | 100, 33, 10, 3.3, 1, 0.3, 0.1 (μM)    | K562                       |

[0139] 在确定了多西他赛、柔红霉素、Herceptin®和拉帕替尼的IC<sub>50</sub>浓度之后,通过用12.5、25和50μg/ml的LGT-E预处理已制备、平板接种的化学治疗药物抗性细胞系的培养物以确定药物的CE值并且如实施例2和4中所述测定生存力。如实施例2中,预处理时间为两小时。表18总结了化学治疗药物的CE的测定结果。

[0140] 表18

[0141]

| 治疗药物       | 增敏剂<br>(μg/ml) |       | 细胞系                     | 当仅用药物处理<br>细胞时药物的 IC <sub>50</sub> | 当在药物处理前用化学<br>增敏剂预处理<br>细胞时药物的 IC <sub>50</sub> | CE     |
|------------|----------------|-------|-------------------------|------------------------------------|---|--------|
| 多西他赛       | 未添加            | PC3   | 1.796 nM (1.45 ng/ml)   |                                    |   |        |
|            | LGT-E          | 12.5  | PC3-TxR                 | 17.54 nM (14.17 ng/ml)             | 4.077 nM (3.29 ng/ml)                           | 4.3    |
|            | LGT-E          | 25    | PC3-TxR                 | 18.33 nM (14.8 ng/ml)              | 2.195 nM (1.77 ng/ml)                           | 8.35   |
|            | LGT-E          | 50    | DU-145                  | 6.652 nM (5.37 ng/ml)              | 3.389 nM (2.74 ng/ml)                           |        |
|            | LGT-E          | 12.5  | DU-145-<br>TxR          | >100 nM (80.78 ng/ml)              | 23.49 nM (18.98 ng/ml)                          | 4.26   |
|            | LGT-E          | 25    | DU-145-<br>TxR          | >100 nM (80.78 ng/ml)              | 5.759 nM (4.65 ng/ml)                           | >17.36 |
| 柔红霉素       | 未添加            | K562  | 1.046 μM (0.55 μg/ml)   |                                    |   |        |
|            | LGT-E          | 25    | K562                    | 32.62 μM (17.2 μg/ml)              | 6.534 μM (3.45 μg/ml)                           | 4.99   |
| Herceptin® | 未添加            | BT474 | 3.593 μM (523 μg/ml)    |                                    |   |        |
|            | LGT-E          | 12.5  | BT474-<br>TxR           | 30 μM (4366 μg/ml)                 | 30 μM (4366 μg/ml)                              | 1.0    |
| 拉帕替尼       | 未添加            | BT474 | 0.1158 μM (0.067 μg/ml) |                                    |   |        |
|            | LGT-E          | 12.5  | BT474-<br>TxR           | 20 μM (11.6 μg/ml)                 | 4 μM (2.32 μg/ml)                               | 5.0    |
|            | LGT-E          | 25    | BT474-<br>TxR           | 11 μM (6.39 μg/ml)                 | 2 μM (1.16 μg/ml)                               | 5.5    |
|            | 未添加            | SkBr3 | 0.2407 μM (0.14 μg/ml)  |                                    |   |        |
|            | LGT-E          | 12.5  | SkBr3-<br>TxR           | 6.204 μM (3.6 μg/ml)               | 3.924 μM (2.28 μg/ml)                           | 1.58   |

[0142] 实施例7

[0143] LGT-E对于多西他赛敏感性前列腺癌细胞系DU145对多西他赛之增敏作用的剂量依赖性。使用实施例2中所述的方法,研究LGT-E预处理对于经多西他赛处理的DU145细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用50μg/ml的LGT-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含1×10<sup>2</sup>至1×10<sup>-3</sup>nM多西他赛之50μl等分试样的多西他赛处理细胞。表19报告了细胞生存力数

据。表20报告了从未经LGT-E预处理的DU145细胞获得的对照数据。图7以图形的形式总结了表19和表20的数据。

[0144] 表19

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.060 | 0.220<br>0.265<br>0.247 | 0.241<br>0.283<br>0.229 | 0.620<br>0.610<br>0.656 | 1.407<br>1.437<br>1.416 | 2.574<br>2.561<br>2.551 | 2.685<br>2.581<br>2.645 | 2.633<br>2.703<br>2.628 | 2.652<br>2.662<br>2.581 |
| 平均值A                            | 0.244                   | 0.251                   | 0.629                   | 1.420                   | 2.562                   | 2.637                   | 2.655                   | 2.632                   |
| SD                              | 0.023                   | 0.028                   | 0.024                   | 0.015                   | 0.012                   | 0.052                   | 0.042                   | 0.044                   |
| 存活%                             | 9.3                     | 9.6                     | 23.9                    | 54.0                    | 97.4                    | 100.2                   | 100.9                   | 100.0                   |
| CV                              | 9.27                    | 11.28                   | 3.85                    | 1.08                    | 0.45                    | 1.99                    | 1.58                    | 1.68                    |

[0146] 表20

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.060 | 0.589<br>0.650<br>0.555 | 0.694<br>0.635<br>0.652 | 1.184<br>1.268<br>1.196 | 2.318<br>2.365<br>2.453 | 2.758<br>2.741<br>2.756 | 2.769<br>2.760<br>2.771 | 2.740<br>2.733<br>2.775 | 2.741<br>2.730<br>2.744 |
| 平均值A                            | 0.598                   | 0.661                   | 1.216                   | 2.379                   | 2.752                   | 2.767                   | 2.750                   | 2.739                   |
| SD                              | 0.048                   | 0.030                   | 0.045                   | 0.069                   | 0.009                   | 0.006                   | 0.023                   | 0.007                   |
| 存活%                             | 21.8                    | 24.1                    | 44.4                    | 86.9                    | 100.5                   | 101.0                   | 100.4                   | 100.0                   |
| CV                              | 8.04                    | 4.60                    | 3.73                    | 2.88                    | 0.34                    | 0.21                    | 0.82                    | 0.27                    |

[0148] 实施例8

[0149] 通过由LTG-E预处理 **Herceptin®** 敏感性、HE2阳性乳腺导管癌系BT474提供了有限的额外 **Herceptin®** 增敏作用。使用实施例2和9中所述的细胞培养方法,如适于BT474细胞的 **Herceptin®** 处理,研究了LTG-E预处理对经 **Herceptin®** 处理的BT474细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用13μg/ml的LTG-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^{-3}$ nM **Herceptin®** 之50μl等分试样的 **Herceptin®** 处理细胞。表21报告了有关 **Herceptin®** 处理之前用LTG-E预处理的细胞生存力数据。表22报告了从 **Herceptin®** 处理之前未经LTG-E预处理的细胞中获得的对照数据。图8以图形的形式总结了表21和22的数据。

[0150] 表21

| 曲妥珠单抗 (μM)                      | 30                      | 10                      | 3                       | 1                       | 0.3                     | 0.1                     | 0.03                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 0.607<br>0.693<br>0.760 | 0.416<br>0.708<br>0.696 | 0.970<br>0.959<br>0.997 | 1.247<br>1.321<br>1.182 | 1.441<br>1.417<br>1.315 | 1.431<br>1.328<br>1.277 | 1.491<br>1.323<br>1.204 | 1.541<br>1.423<br>1.367 |
| 平均值A                            | 0.687                   | 0.607                   | 0.976                   | 1.250                   | 1.391                   | 1.346                   | 1.340                   | 1.444                   |
| SD                              | 0.077                   | 0.165                   | 0.020                   | 0.070                   | 0.067                   | 0.078                   | 0.144                   | 0.089                   |
| 存活%                             | 47.6                    | 42.0                    | 67.6                    | 86.6                    | 96.4                    | 93.2                    | 92.8                    | 100.0                   |
| CV                              | 11.16                   | 27.21                   | 2.00                    | 5.56                    | 4.81                    | 5.83                    | 10.76                   | 6.15                    |

[0152] 表22

| 曲妥珠单抗 (μM)                      | 30                      | 10                      | 3                       | 1                       | 0.3                     | 0.1                     | 0.03                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 0.815<br>0.565<br>0.759 | 0.717<br>0.648<br>0.657 | 1.187<br>1.225<br>1.293 | 1.386<br>1.462<br>1.389 | 1.490<br>1.581<br>1.512 | 1.508<br>1.669<br>1.660 | 1.405<br>1.678<br>1.505 | 1.596<br>1.690<br>1.533 |
| 平均值A                            | 0.713                   | 0.674                   | 1.235                   | 1.413                   | 1.528                   | 1.613                   | 1.530                   | 1.607                   |
| SD                              | 0.131                   | 0.038                   | 0.054                   | 0.043                   | 0.047                   | 0.090                   | 0.138                   | 0.079                   |
| 存活%                             | 44.4                    | 42.0                    | 76.9                    | 87.9                    | 95.1                    | 100.4                   | 95.2                    | 100.0                   |
| CV                              | 18.39                   | 5.56                    | 4.35                    | 3.05                    | 3.11                    | 5.61                    | 9.03                    | 4.92                    |

[0154] 实施例9

[0155] 通过由LGT-E预处理 **Herceptin®** 抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474/Her提供了LTG-E介导的 **Herceptin®** 增敏作用。使用在实施例2和9中所述的细胞培养方法,如适于BT474细胞的 **Herceptin®** 处理,研究了LTG-E预处理对经 **Herceptin®** 处理的BT474/Her细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用13μg/ml的LTG-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^{-3}$ nM **Herceptin®** 之50μl等分试样的 **Herceptin®** 处理细胞。表23报告了有关 **Herceptin®** 处理之前用LTG-E预处理的细胞生存力。表24报告了从 **Herceptin®** 处理之前未经LTG-E预处理的细胞中获得的对照数据。图9以图形的形式总结了表23和24的数据。

[0156] 表23

| 曲妥珠单抗 (μM)                      | 30                      | 10                      | 3                       | 1                       | 0.3                     | 0.1                     | 0.03                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.047 | 1.020<br>0.803<br>0.468 | 1.755<br>1.638<br>0.920 | 1.757<br>1.599<br>1.655 | 1.928<br>1.713<br>1.680 | 1.947<br>1.837<br>1.829 | 1.808<br>1.665<br>1.772 | 1.780<br>1.689<br>1.729 | 1.792<br>1.682<br>1.695 |
| 平均值A                            | 0.764                   | 1.438                   | 1.670                   | 1.774                   | 1.871                   | 1.748                   | 1.733                   | 1.723                   |
| SD                              | 0.278                   | 0.452                   | 0.080                   | 0.135                   | 0.066                   | 0.074                   | 0.046                   | 0.060                   |
| 存活%                             | 44.3                    | 83.4                    | 96.9                    | 102.9                   | 108.6                   | 101.5                   | 100.6                   | 100.0                   |
| CV                              | 36.41                   | 31.45                   | 4.80                    | 7.59                    | 3.52                    | 4.25                    | 2.63                    | 3.49                    |

[0158] 表24

| 曲妥珠单抗 (μM)                      | 30                      | 10                      | 3                       | 1                       | 0.3                     | 0.1                     | 0.03                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.047 | 1.870<br>2.271<br>2.216 | 1.758<br>2.417<br>2.254 | 1.867<br>2.299<br>2.172 | 2.128<br>2.271<br>2.216 | 2.104<br>2.327<br>2.346 | 2.137<br>2.323<br>2.279 | 2.016<br>2.346<br>2.249 | 2.238<br>2.432<br>2.386 |
| 平均值A                            | 2.119                   | 2.143                   | 2.113                   | 2.205                   | 2.259                   | 2.246                   | 2.204                   | 2.352                   |
| SD                              | 0.217                   | 0.343                   | 0.222                   | 0.072                   | 0.135                   | 0.097                   | 0.170                   | 0.101                   |
| 存活%                             | 90.1                    | 91.1                    | 89.8                    | 93.8                    | 96.0                    | 95.5                    | 93.7                    | 100.0                   |
| CV                              | 10.26                   | 16.02                   | 10.51                   | 3.27                    | 5.96                    | 4.33                    | 7.70                    | 4.31                    |

[0160] 实施例10

[0161] 测定了 **Herceptin®** 敏感性BT474细胞系的拉帕替尼IC<sub>50</sub>。按实施例2中所述细胞

培养条件并进行细胞生存力分析,不同之处在于每个孔接种5000个细胞。然而,不像实施例2中,在存在表25示出的拉帕替尼的浓度(μM)下于标准的培养条件下孵育细胞72小时。在表25中还报告了拉帕替尼IC<sub>50</sub>数据并在图10中以图形的形式表示。

[0162] 表25

| 拉帕替尼(μM)                        | 50                      | 16.7                    | 5                       | 1.67                    | 0.5                     | 0.167                   | 0.05                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.046 | 0.035<br>0.063<br>0.018 | 0.137<br>0.137<br>0.134 | 0.240<br>0.250<br>0.224 | 0.383<br>0.347<br>0.338 | 0.415<br>0.501<br>0.445 | 0.909<br>0.894<br>0.838 | 1.082<br>1.083<br>1.165 | 1.655<br>1.745<br>1.664 |
| 平均值A                            | 0.038                   | 0.136                   | 0.238                   | 0.356                   | 0.453                   | 0.880                   | 1.110                   | 1.688                   |
| SD                              | 0.023                   | 0.002                   | 0.013                   | 0.024                   | 0.044                   | 0.037                   | 0.048                   | 0.050                   |
| 存活%                             | 2.3                     | 8.0                     | 14.1                    | 21.1                    | 26.9                    | 52.1                    | 65.7                    | 100.0                   |
| CV                              | 59.45                   | 1.28                    | 5.52                    | 6.70                    | 9.63                    | 4.25                    | 4.29                    | 2.94                    |

[0164] 实施例11

[0165] 通过由LTG-E预处理 **Herceptin®** 抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474-TxR提供了LTG-E介导的 **Herceptin®** 增敏作用。使用实施例2和9中所述的细胞培养方法,如适于BT474细胞的 **Herceptin®** 处理,研究了LTG-E预处理对于经 **Herceptin®** 处理的BT474-TxR细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用13μg/ml的LTG-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含1×10<sup>2</sup>至1×10<sup>-3</sup>nM **Herceptin®** 之50μl等分试样的**Herceptin®** 处理细胞。表26报告了有关**Herceptin®** 处理之前用LTG-E预处理的细胞生存力数据。表27报告了从**Herceptin®** 处理之前未经LTG-E预处理的细胞中获得的对照数据。图11以图形的形式总结了表26和27的数据。

[0166] 表26

| 曲妥珠单抗(μM)                       | 200                     | 66.7                    | 20                      | 6.67                    | 2                       | 0.667                   | 0.2                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 1.480<br>1.555<br>1.580 | 1.066<br>0.986<br>1.115 | 1.012<br>1.011<br>1.017 | 1.577<br>1.533<br>1.529 | 1.901<br>2.098<br>2.062 | 1.836<br>1.939<br>1.929 | 1.848<br>1.955<br>1.873 | 1.867<br>1.909<br>1.885 |
| 平均值A                            | 1.538                   | 1.056                   | 1.013                   | 1.546                   | 2.020                   | 1.901                   | 1.892                   | 1.887                   |
| SD                              | 0.052                   | 0.065                   | 0.004                   | 0.027                   | 0.105                   | 0.057                   | 0.056                   | 0.021                   |
| 存活%                             | 81.5                    | 55.9                    | 53.7                    | 81.9                    | 107.1                   | 100.8                   | 100.3                   | 100.0                   |
| CV                              | 3.38                    | 6.15                    | 0.35                    | 1.73                    | 5.21                    | 2.99                    | 2.94                    | 1.12                    |

[0168] 表27

[0169]

| 曲妥珠单抗 (μM)                      | 200                     | 66.7                    | 20                      | 6.67                    | 2                       | 0.667                   | 0.2                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 2.089<br>1.811<br>1.980 | 1.959<br>1.803<br>2.063 | 1.985<br>1.461<br>1.600 | 2.071<br>1.980<br>2.099 | 2.049<br>2.106<br>2.224 | 1.982<br>2.058<br>2.134 | 1.929<br>2.096<br>2.015 | 1.948<br>2.050<br>2.090 |
| 平均值A                            | 1.960                   | 1.941                   | 1.682                   | 2.050                   | 2.126                   | 2.058                   | 2.013                   | 2.029                   |
| SD                              | 0.140                   | 0.131                   | 0.272                   | 0.062                   | 0.089                   | 0.076                   | 0.084                   | 0.073                   |
| 存活%                             | 96.6                    | 95.7                    | 82.9                    | 101.0                   | 104.8                   | 101.4                   | 99.2                    | 100.0                   |
| CV                              | 7.15                    | 6.75                    | 16.15                   | 3.03                    | 4.20                    | 3.71                    | 4.16                    | 3.61                    |

[0170] 实施例12

[0171] 通过由LGT-E预处理 **Herceptin®** 抗性、HER2-阳性乳腺导管癌系BT474-TxR提供了LGT-E介导的在帕替尼增敏作用。使用实施例2和9中所述的细胞培养方法,如适于BT474细胞,研究了LGT-E预处理对于经拉帕替尼处理的BT474-TxR细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用12.5或25μg/ml的LGT-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含30至 $1 \times 10^{-3}$ nM拉帕替尼之50μl等分试样的拉帕替尼处理细胞。表28和表30报告了有关拉帕替尼处理之前用12.5或25μg/ml LGT-E预处理的细胞生存力数据。表29和表31报告了从拉帕替尼处理之前未经LGT-E预处理的细胞中获得的对照数据。图12以图形的形式总结了表51-54的数据。

[0172] 表28

[0173]

| 拉帕替尼 (μM)                       | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 0.416<br>0.393<br>0.404 | 0.512<br>0.434<br>0.437 | 0.526<br>0.521<br>0.552 | 0.594<br>0.602<br>0.596 | 0.738<br>0.712<br>0.670 | 1.024<br>0.871<br>0.836 | 0.898<br>0.968<br>0.944 | 1.048<br>0.980<br>0.962 |
| 平均值A                            | 0.405                   | 0.461                   | 0.533                   | 0.598                   | 0.707                   | 0.911                   | 0.937                   | 0.997                   |
| SD                              | 0.012                   | 0.044                   | 0.017                   | 0.004                   | 0.034                   | 0.100                   | 0.036                   | 0.045                   |
| 存活%                             | 40.6                    | 46.3                    | 53.5                    | 59.9                    | 70.9                    | 91.3                    | 94.0                    | 100.0                   |
| CV                              | 2.84                    | 9.58                    | 3.12                    | 0.70                    | 4.85                    | 10.98                   | 3.80                    | 4.55                    |

[0174] 表29

[0175]

| 拉帕替尼 (μM)                       | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 0.598<br>0.616<br>0.567 | 0.677<br>0.677<br>0.667 | 0.726<br>0.717<br>0.774 | 0.742<br>0.752<br>0.844 | 0.932<br>0.956<br>0.993 | 1.043<br>1.126<br>1.151 | 1.054<br>1.125<br>1.132 | 1.137<br>1.085<br>1.181 |
| 平均值A                            | 0.594                   | 0.674                   | 0.739                   | 0.780                   | 0.961                   | 1.107                   | 1.104                   | 1.135                   |
| SD                              | 0.025                   | 0.006                   | 0.031                   | 0.056                   | 0.031                   | 0.057                   | 0.043                   | 0.048                   |
| 存活%                             | 52.3                    | 59.4                    | 65.2                    | 68.7                    | 84.7                    | 97.6                    | 97.3                    | 100.0                   |
| CV                              | 4.17                    | 0.86                    | 4.15                    | 7.21                    | 3.20                    | 5.11                    | 3.91                    | 4.24                    |

[0176] 表30

[0177]

| 拉帕替尼 ( μM)                      | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.045 | 0.264<br>0.222<br>0.231 | 0.337<br>0.413<br>0.316 | 0.485<br>0.516<br>0.447 | 0.654<br>0.483<br>0.512 | 0.762<br>0.640<br>0.548 | 0.953<br>0.664<br>0.603 | 1.016<br>0.749<br>0.699 | 1.041<br>0.939<br>0.893 |
| 平均值A                            | 0.239                   | 0.355                   | 0.482                   | 0.549                   | 0.650                   | 0.740                   | 0.821                   | 0.957                   |
| SD                              | 0.022                   | 0.051                   | 0.035                   | 0.092                   | 0.107                   | 0.187                   | 0.170                   | 0.076                   |
| 存活%                             | 24.9                    | 37.1                    | 50.4                    | 57.4                    | 67.9                    | 77.3                    | 85.8                    | 100.0                   |
| CV                              | 9.27                    | 14.38                   | 7.17                    | 16.66                   | 16.53                   | 25.28                   | 20.76                   | 7.91                    |

[0178]

表31

[0179]

| 拉帕替尼 ( μM)                      | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.047 | 0.530<br>0.445<br>0.571 | 0.647<br>0.604<br>0.694 | 0.779<br>0.673<br>0.686 | 0.881<br>0.818<br>0.790 | 0.933<br>0.841<br>0.941 | 1.148<br>1.073<br>1.017 | 1.021<br>0.968<br>0.924 | 1.160<br>1.147<br>1.221 |
| 平均值A                            | 0.515                   | 0.648                   | 0.712                   | 0.829                   | 0.905                   | 1.079                   | 0.971                   | 1.176                   |
| SD                              | 0.064                   | 0.045                   | 0.058                   | 0.047                   | 0.056                   | 0.066                   | 0.049                   | 0.040                   |
| 存活%                             | 43.8                    | 55.1                    | 60.6                    | 70.5                    | 76.9                    | 91.8                    | 82.6                    | 100.0                   |
| CV                              | 12.48                   | 6.95                    | 8.12                    | 5.62                    | 6.14                    | 6.09                    | 5.00                    | 3.36                    |

[0180]

实施例13

[0181] 拉帕替尼敏感性、HER2阳性乳腺癌系SkBr3与其拉帕替尼抗性亚系之拉帕替尼敏感性的比较。为了确定拉帕替尼耐药细胞比其各自的亲本拉帕替尼敏感的细胞系对拉帕替尼更耐药之程度,在没有化学增敏预处理步骤存在下,在拉帕替尼处理之后,比较了拉帕替尼抗性SkBr3-TxR细胞系和获得SkBr3-TxR的拉帕替尼敏感性细胞系SkBr3的细胞生存力。按实施例2中所述进行细胞培养条件和细胞生存力分析。如实施例2中,用包含20、6.7、2、0.7、0.2、0.07或0.02μM的拉帕替尼的50μl等份试样处理细胞。表32和33分别示出了在SkBr3和SkBr3-TxR系中的拉帕替尼剂量反应。图13以图形的形式总结了表32-33的数据。

[0182]

表32

[0183]

| 拉帕替尼 ( μM)                      | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.047 | 0.220<br>0.215<br>0.228 | 0.206<br>0.198<br>0.228 | 0.344<br>0.331<br>0.365 | 0.738<br>0.681<br>0.705 | 1.325<br>1.255<br>1.362 | 1.710<br>1.681<br>1.729 | 2.038<br>1.934<br>2.195 | 2.216<br>2.145<br>2.247 |
| 平均值A                            | 0.221                   | 0.211                   | 0.347                   | 0.708                   | 1.314                   | 1.707                   | 2.056                   | 2.203                   |
| SD                              | 0.007                   | 0.016                   | 0.017                   | 0.029                   | 0.054                   | 0.024                   | 0.131                   | 0.052                   |
| 存活%                             | 10.1                    | 9.6                     | 15.8                    | 32.2                    | 59.7                    | 77.5                    | 93.3                    | 100.0                   |
| CV                              | 2.96                    | 7.36                    | 4.94                    | 4.04                    | 4.13                    | 1.42                    | 6.39                    | 2.37                    |

[0184]

表33

| 拉帕替尼 ( μM)                      | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.047 | 0.605<br>0.599<br>0.615 | 1.117<br>1.069<br>1.012 | 1.754<br>1.781<br>1.790 | 2.086<br>2.177<br>2.063 | 2.205<br>2.233<br>2.264 | 2.350<br>2.314<br>2.370 | 2.341<br>2.390<br>2.340 | 2.244<br>2.301<br>2.349 |
| 平均值A                            | 0.607                   | 1.066                   | 1.775                   | 2.109                   | 2.234                   | 2.345                   | 2.357                   | 2.298                   |
| SD                              | 0.008                   | 0.053                   | 0.019                   | 0.060                   | 0.030                   | 0.028                   | 0.029                   | 0.053                   |
| 存活%                             | 26.4                    | 46.4                    | 77.2                    | 91.8                    | 97.2                    | 102.0                   | 102.6                   | 100.0                   |
| CV                              | 1.33                    | 4.93                    | 1.06                    | 2.86                    | 1.32                    | 1.21                    | 1.21                    | 2.29                    |

[0186] 实施例14

[0187] LGTE预处理 **Herceptin®** 和拉帕替尼抗性、HER2-阳性乳腺癌系SkBr3-TxR提供LGT-E-介导的拉帕替尼增敏作用。用实施例2中所述的细胞培养方法,不同的是,每个孔接种5000个SkBr3-TxR细胞,研究了LGT-E对经拉帕替尼处理的SkBr3-TxR细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用12.5μg/ml的LGT-E预处理细胞,之后用包含20、6.7、2、0.7、0.2、0.07或0.02μM拉帕替尼之50μl等份试样的拉帕替尼处理细胞。表34报告了有关预处理的细胞生存力数据。表35报告了从拉帕替尼处理之前未经LGT-E预处理的细胞获得的对照数据。图14以图形的形式总结了表34和35的数据。

[0188] 表34

| 拉帕替尼 ( μM)                      | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.047 | 0.424<br>0.435<br>0.358 | 0.810<br>0.716<br>0.790 | 1.378<br>1.235<br>1.431 | 1.679<br>1.652<br>1.712 | 2.042<br>1.967<br>1.986 | 2.101<br>1.939<br>2.111 | 2.109<br>2.223<br>2.121 | 2.226<br>2.238<br>2.177 |
| 平均值A                            | 0.406                   | 0.772                   | 1.348                   | 1.681                   | 1.999                   | 2.051                   | 2.151                   | 2.214                   |
| SD                              | 0.042                   | 0.050                   | 0.101                   | 0.030                   | 0.039                   | 0.097                   | 0.063                   | 0.032                   |
| 存活%                             | 18.3                    | 34.9                    | 60.9                    | 75.9                    | 90.3                    | 92.6                    | 97.2                    | 100.0                   |
| CV                              | 1.33                    | 4.93                    | 1.06                    | 2.86                    | 1.32                    | 1.21                    | 1.21                    | 2.29                    |

[0190] 表35

| 拉帕替尼 ( μM)                      | 20                      | 6.7                     | 2                       | 0.67                    | 0.2                     | 0.067                   | 0.02                    | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.044 | 0.481<br>0.657<br>0.612 | 1.124<br>1.068<br>1.092 | 1.684<br>1.543<br>1.613 | 2.067<br>2.071<br>1.974 | 2.083<br>2.223<br>2.100 | 2.181<br>2.213<br>2.225 | 2.233<br>2.287<br>2.306 | 2.324<br>2.289<br>2.267 |
| 平均值A                            | 0.584                   | 1.095                   | 1.614                   | 2.038                   | 2.136                   | 2.207                   | 2.276                   | 2.294                   |
| SD                              | 0.091                   | 0.028                   | 0.071                   | 0.055                   | 0.076                   | 0.023                   | 0.038                   | 0.029                   |
| 存活%                             | 25.4                    | 47.7                    | 70.4                    | 88.8                    | 93.1                    | 96.2                    | 99.2                    | 100.0                   |
| CV                              | 15.67                   | 2.57                    | 4.37                    | 2.69                    | 3.58                    | 1.03                    | 1.66                    | 1.25                    |

[0192] 实施例15

[0193] 柔红霉素敏感性髓性白血病系K562中无LGT-E介导的对柔红霉素敏化作用的提高。使用实施例2中所述的细胞培养方法,研究了LTG-E对经柔红霉素处理的K562细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用25μg/ml的LGT-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含30至1×10<sup>-3</sup>nM柔红霉素之50μl等分试样处理细胞。表36报告了有关柔红霉素处理之前用LTG-E预处理细胞生存力数据。表37报告了从柔红霉素处理之前未经LGT-E预处理的细胞中获得的

对照数据。图15以图形的形式总结了表36和表37的数据。

[0194] 表36

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.044 | 0.585<br>0.483<br>0.591 | 0.854<br>0.723<br>0.591 | 1.422<br>1.266<br>0.756 | 1.304<br>1.458<br>1.229 | 1.534<br>1.612<br>1.493 | 2.283<br>2.210<br>2.277 | 2.837<br>2.840<br>2.875 | 2.851<br>2.863<br>2.864 |
| 平均值A                            | 0.553                   | 0.723                   | 1.148                   | 1.331                   | 1.547                   | 2.257                   | 2.851                   | 2.860                   |
| SD                              | 0.061                   | 0.132                   | 0.348                   | 0.117                   | 0.060                   | 0.041                   | 0.021                   | 0.007                   |
| 存活%                             | 19.3                    | 25.3                    | 40.2                    | 46.5                    | 54.1                    | 78.9                    | 99.7                    | 100.0                   |
| CV                              | 10.97                   | 18.19                   | 30.34                   | 8.77                    | 3.91                    | 1.80                    | 0.74                    | 0.25                    |

[0196] 表37

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.044 | 0.496<br>0.387<br>0.424 | 0.422<br>0.204<br>0.272 | 1.057<br>0.327<br>0.812 | 1.275<br>1.259<br>1.272 | 1.512<br>1.379<br>1.350 | 2.242<br>2.353<br>2.227 | 2.858<br>2.899<br>2.863 | 2.840<br>2.853<br>2.839 |
| 平均值A                            | 0.436                   | 0.300                   | 0.732                   | 1.269                   | 1.414                   | 2.274                   | 2.874                   | 2.844                   |
| SD                              | 0.055                   | 0.112                   | 0.372                   | 0.009                   | 0.086                   | 0.069                   | 0.022                   | 0.008                   |
| 存活%                             | 15.3%                   | 10.5%                   | 25.7%                   | 44.6%                   | 49.7%                   | 80.0%                   | 101.0%                  | 100.0%                  |
| CV                              | 12.72%                  | 37.24%                  | 50.74%                  | 0.67%                   | 6.11%                   | 3.03%                   | 0.78%                   | 0.27%                   |

[0198] 实施例16

[0199] 在柔红霉素抗性髓性白细胞系K562/Dox中LGT-E介导的柔红霉素增敏作用的提高。使用在实施例2中所述的细胞培养方法,研究了LGT-E预处理对经柔红霉素处理的K562/Dox细胞的化学增敏作用。在这项研究中,用25 $\mu$ g/ml的LGT-E预处理细胞,之后用1:3系列稀释的含30至1 $\times$ 10 $^{-3}$  $\mu$ M柔红霉素的50 $\mu$ l等分试样处理细胞。表38报告了有关柔红霉素处理之前用LGT-E预处理的细胞生存力。表39报告了从柔红霉素处理之前未经LGT-E预处理的细胞中获得的对照数据。图16以图形的形式总结了表38和39的数据。

[0200] 表38

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.043 | 0.563<br>0.412<br>0.557 | 1.165<br>1.137<br>1.223 | 0.870<br>1.328<br>1.581 | 2.389<br>2.339<br>2.174 | 2.722<br>2.740<br>2.657 | 2.812<br>2.816<br>2.805 | 2.817<br>2.864<br>2.863 | 2.905<br>2.838<br>2.499 |
| 平均值A                            | 0.510                   | 1.175                   | 1.259                   | 2.300                   | 2.706                   | 2.811                   | 2.848                   | 2.747                   |
| SD                              | 0.086                   | 0.044                   | 0.360                   | 0.113                   | 0.044                   | 0.006                   | 0.027                   | 0.218                   |
| 存活%                             | 18.6                    | 42.8                    | 45.8                    | 83.7                    | 98.5                    | 102.3                   | 103.7                   | 100.0                   |
| CV                              | 16.75                   | 3.73                    | 28.62                   | 4.89                    | 1.61                    | 0.20                    | 0.94                    | 7.92                    |

[0202] 表39

[0203]

| 多西他赛 (nM)                       | 100                     | 33.3                    | 10                      | 3.33                    | 1                       | 0.333                   | 0.1                     | 0.001                   |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 565 nm处的A<br>(一式三份)<br>背景=0.043 | 0.703<br>0.775<br>0.691 | 1.683<br>1.716<br>1.652 | 2.731<br>2.740<br>2.678 | 2.863<br>2.847<br>2.834 | 2.395<br>2.620<br>2.512 | 2.962<br>2.951<br>2.967 | 2.914<br>2.918<br>2.967 | 2.653<br>2.827<br>2.835 |
| 平均值A                            | 0.723                   | 1.683                   | 2.716                   | 2.848                   | 2.509                   | 2.960                   | 2.933                   | 2.771                   |
| SD                              | 0.045                   | 0.032                   | 0.034                   | 0.015                   | 0.113                   | 0.008                   | 0.030                   | 0.103                   |
| 存活%                             | 26.1                    | 60.7                    | 98.0                    | 102.8                   | 90.5                    | 106.8                   | 105.8                   | 100.0                   |
| CV                              | 16.75                   | 3.73                    | 28.62                   | 4.89                    | 1.61                    | 0.20                    | 0.94                    | 7.92                    |

[0204] 实施例17

[0205] LGT-E是体内多西他赛的有效化学增敏剂。基于表明LGT-E是多西他赛的化学增敏剂的结果,设计了体内研究以评估口服施用LGT-E对多西他赛的化学治疗效果的影响。考虑这一目标,通过在7天的疗程逐步提高为100、250、500、750和1000mg/kg的单次(仅一次)口服剂量,以及为62.5、125、250或500mg/kg的每日剂量来确定CD-1小鼠(Charles River Laboratories International, Inc. Wilmington, MA)的口服最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)。具体而言,MTD被定义为这样的剂量:(i)非致命的;(ii)与对照动物相比,引起对体重增长不超过10%的阻滞;和(iii)不引起明显的器官功能障碍或副作用。在该单剂量和多剂量的方法两者的情况下,MTD为约500mg/kg。

[0206] 在确定LTG-E的MTD之后,比较与多西他赛(20mg/kg, i.v)组合施用的LGT-E(500mg/kg,经口管饲法)以及单独多西他赛处理的抗肿瘤效果。更具体地,这些研究涉及使用6个称重为15至20g、4-6周大的重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)雄性小鼠(Taconic Farms, Inc. Oxnard, CA),其被安置在具有HEPA过滤空气的笼子里(12小时光照/暗周期)。通过皮下注射PC3和PC3-TxR细胞在小鼠中引起形成肿瘤。为了进行细胞注射,首先分别将PC3和PC3-TxR细胞混悬在1:1基质胶(Matrigel)混合物(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, U.S.A)和RPMI 1640(Mediatech, Manassas, VA, 或Life Technologies Grand Island, NY)中。然后通过注射将细胞经皮下植入到小鼠的胁部。细胞注射后始终显示肿瘤生长了19天的小鼠用于肿瘤研究。更具体地,当异种移植的肿瘤达到约120mm<sup>3</sup>的体积(通过使用半椭圆体的公式,即,体积=宽度<sup>2</sup>×(长度/2)来计算)时起始这些研究。

[0207] 根据上述基本方法进行肿瘤研究以测量在15天过程中每只小鼠肿瘤大小的变化(在处理的第一天开始)。在研究中具有肿瘤的小鼠随机分为6组:组(1)具有PC3细胞肿瘤异种移植物且仅用多西他赛处理的小鼠(20mg/kg,静脉内注射(IV),每周一次,n=9)和组(3)具有PC3-TxR细胞肿瘤异种移植物且分别用多西他赛处理的小鼠(20mg/kg, IV,每周一次,n=8)。在研究过程中组(1)和(3)肿瘤大小的变化示于图17A中。组(2)具有PC3-TxR细胞肿瘤异种移植物且根本不经处理的小鼠(n=7);组(3)具有PC3-TxR细胞肿瘤异种移植物且分别用多西他赛处理的小鼠(20mg/kg, IV,每周一次,n=8);组(4)具有PC3-TxR细胞肿瘤异种移植物且用LTG-E处理的小鼠(500mg/kg,经口管饲法(P0),每日,n=8);组(5)具有PC3-TxR细胞肿瘤异种移植物且用多西他赛(20mg/kg, IV,每周一次)和LTG-E(250mg/kg,P0,每日)处理的小鼠(n=8)(数据未示出);和组(6)具有PC3-TxR细胞肿瘤异种移植物且用多西他赛(20mg/kg, IV,每周一次)和LTG-E(500mg/kg,P0,每日)的处理的小鼠(n=9)。在研究过程中

组(2-4和6)肿瘤大小的变化示于图17B中。

[0208] 在研究过程中组(1)和组(3)的肿瘤大小的变化示于图17A中,这表明,在SCID小鼠中PC3和PC3-TxR细胞两者都成功地生长。在研究过程中组(2-4和6)的肿瘤大小变化示于图17B。LGT-E单独并不显示出任何抗肿瘤效果,但与仅有顺铂的组相比,其显著增强了顺铂的抗肿瘤效果。

[0209] 参考文献:

- [0210] Chow M, and Huang Y."Utilizing Chinese Medicines to Improve Cancer Therapy—Fiction or Reality?"*Current Drug Discovery Technologies*,2010.
- [0211] Huang Y, and Sadee w. (2003). Drug sensitivity and resistance genes in cancer chemotherapy:a chemogenomics approach.*Drug Discov Today* 8,356–363.
- [0212] Huang Y., and Sadee w. (2006). Membrane transporters and channels in chemoresistance and sensitivity of tumor cells.*Cancer Lett* 239,168–182.
- [0213] Huang Y, et al. (2004) .Membrane transporters and channels:role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance.*Cancer Res* 64, 4294–4301.
- [0214] Huang Y, et al. (2005a) .Correlating gene expression with chemical scaffolds of cytotoxic agents:ellipticines as substrates and inhibitors of MDR1.*Pharmacogenomics J* 5,112–125.
- [0215] Huang Y, et al. (2005b) .Cystine-glutamate transporter SLC7A 11in cancer chemosensitivity and chemoresistance.*Cancer Res* 65.7446–7454.
- [0216] Makarovskiy,AN et al. (2002) .Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure.*Cell Mol Life Sci* 59,1198–1211.
- [0217] Pon D,et al."Harnessing traditional Chinese medicine to improve cancer therapy:issues for future development".*Therapeutic Delivery*2010;1:335–344.
- [0218] Salzberg M,et al.(2007) .An open-label,noncomparative phase I trial to evaluate the efficacy and safety of docetaxel in combination with gefitinib in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer,*Onkologie* 30, 355–360.
- [0219] Seruga B.,et al.(2010) .Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer.*Nat Rev Clin Oncol*.
- [0220] Singh A,et al. (2010) .Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype.*Mol Cancer Ther* 9,2365–2376.
- [0221] sirotnak FM,et al. (2000) .Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase.*Clin Cancer Res* 6,4885–4892.
- [0222] wang Z.,et al. (2010) .Transporter-mediated multidrug resistance and

its modulation by Chinese medicines and other herbal products.Curr Drug Discovery Technologies 1:54-56

[0223] wang Z.,et al.(2011) An Improved Method for Evaluation of Chemosensitizing Effect from Herb-Drug Combination-Example with Tripterygium wilfordii..Abstract Presented 8th International Conference of Society for Integrative Oncology,Cleveland,November 10-12.

[0224] Zhang P,et al.(2010).Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth.Mol Cancer Ther 9,336-346.

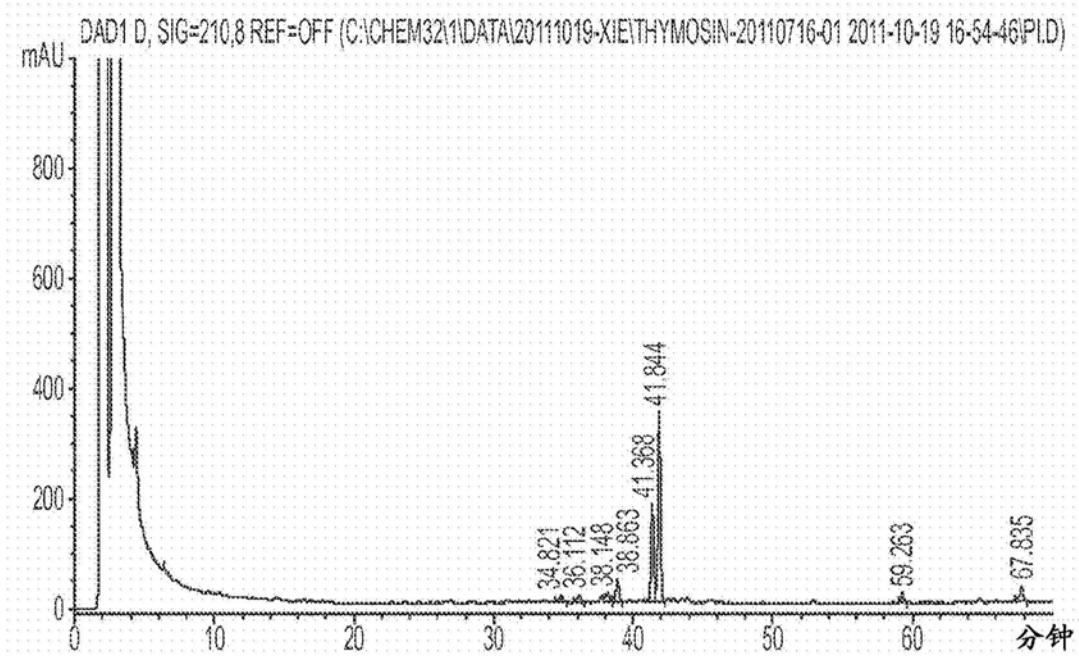


图1A

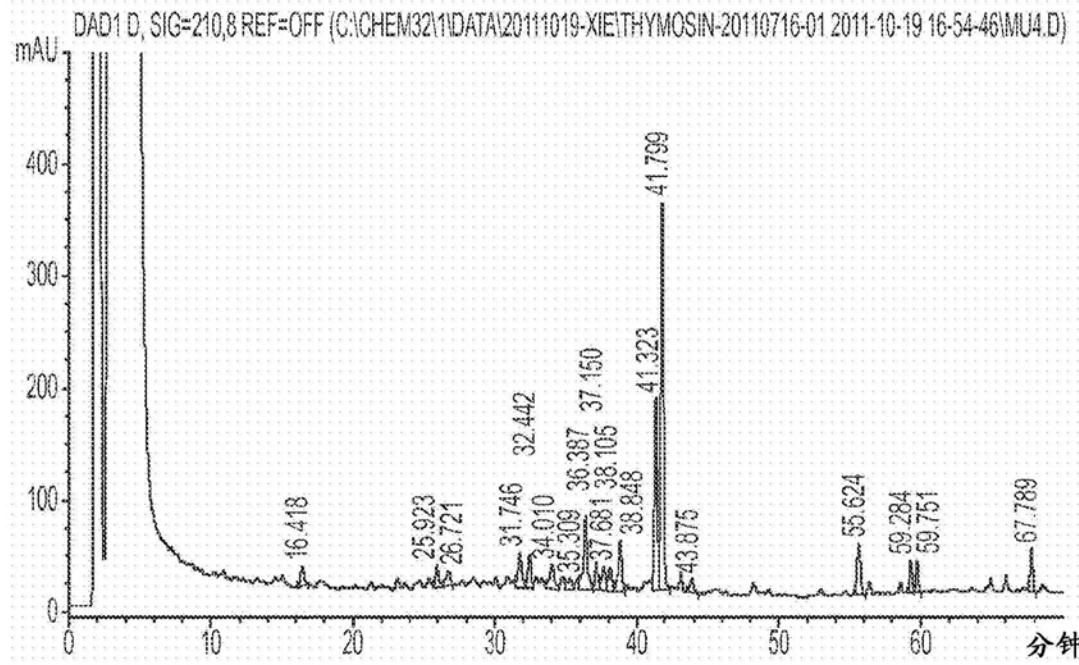


图1B

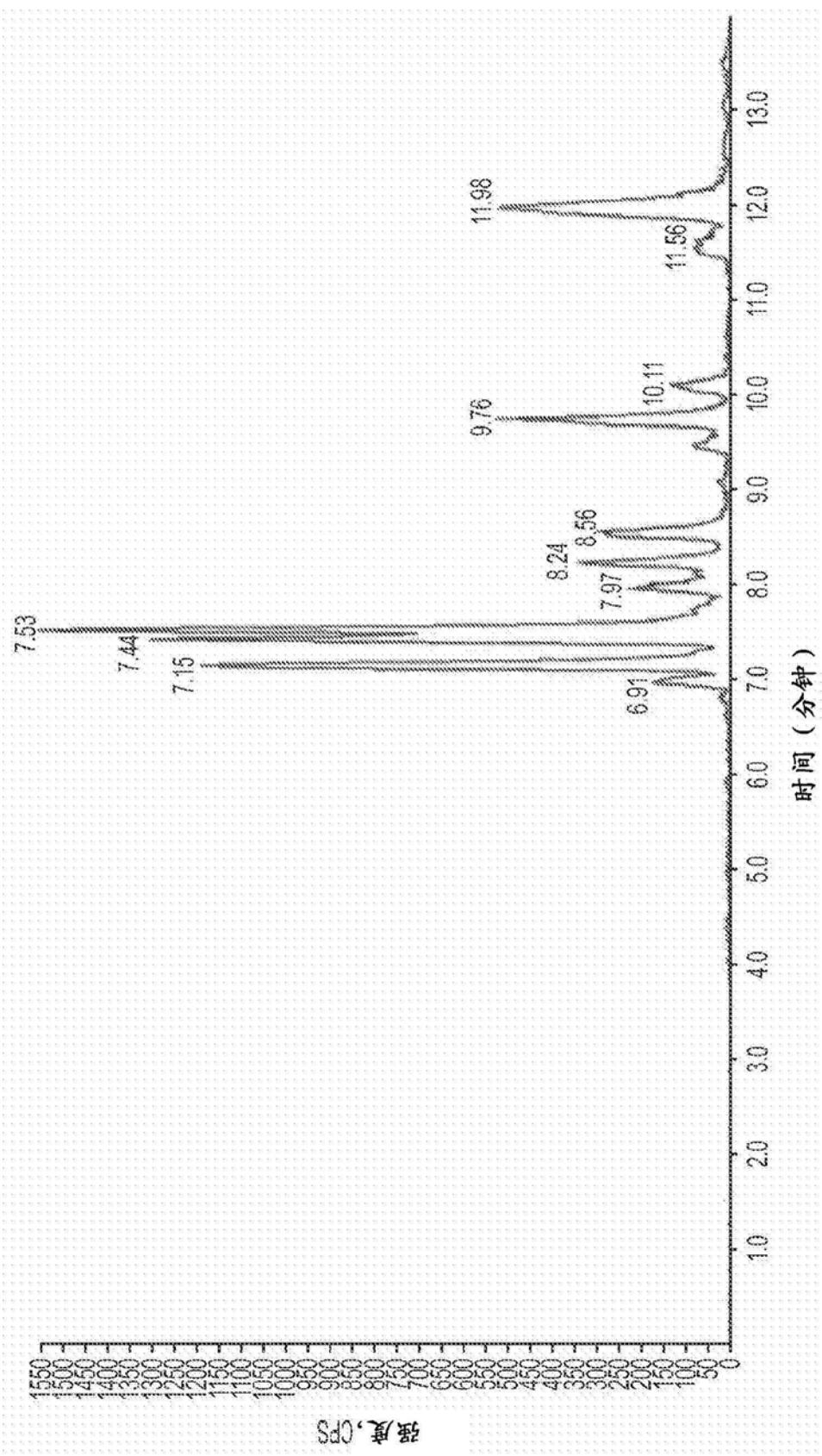


图2

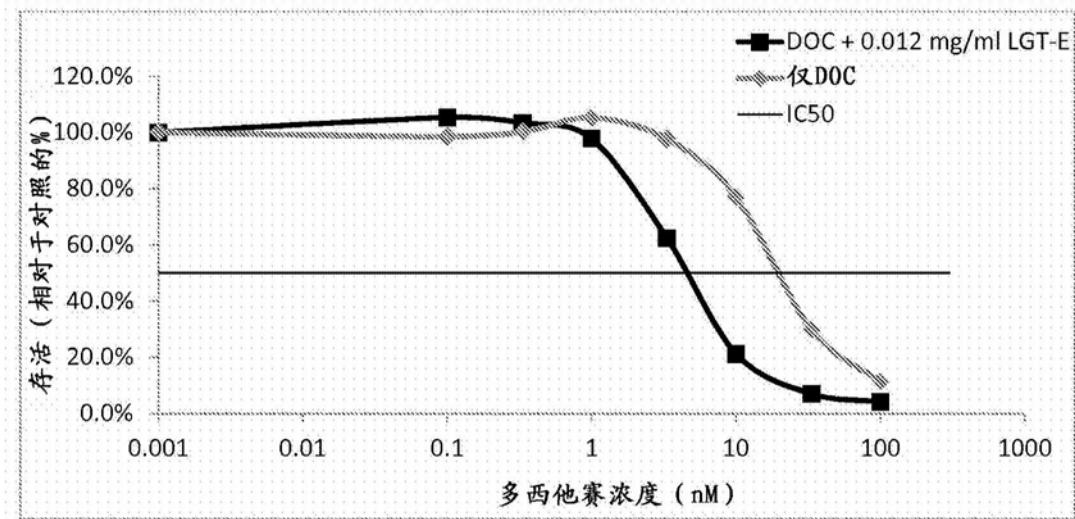


图3A

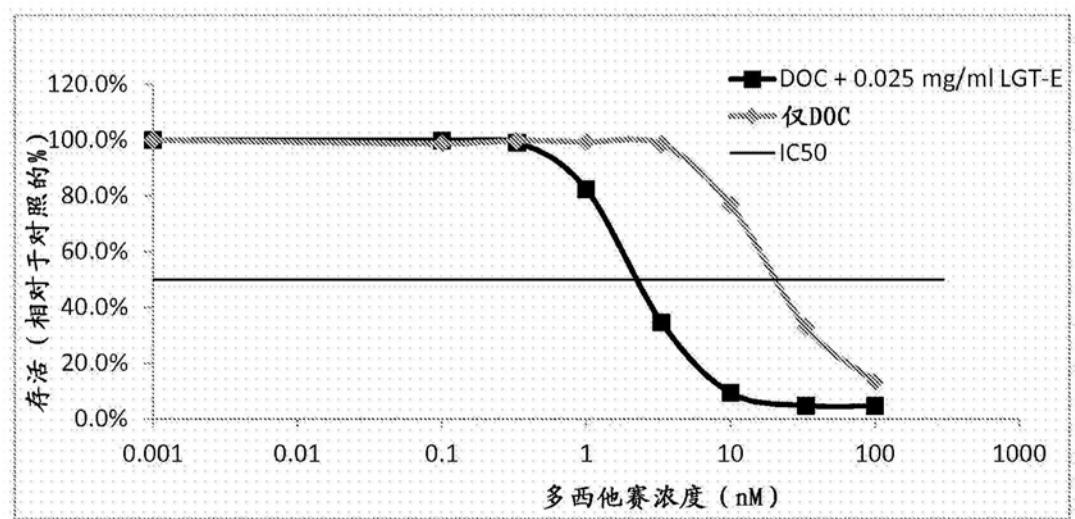


图3B

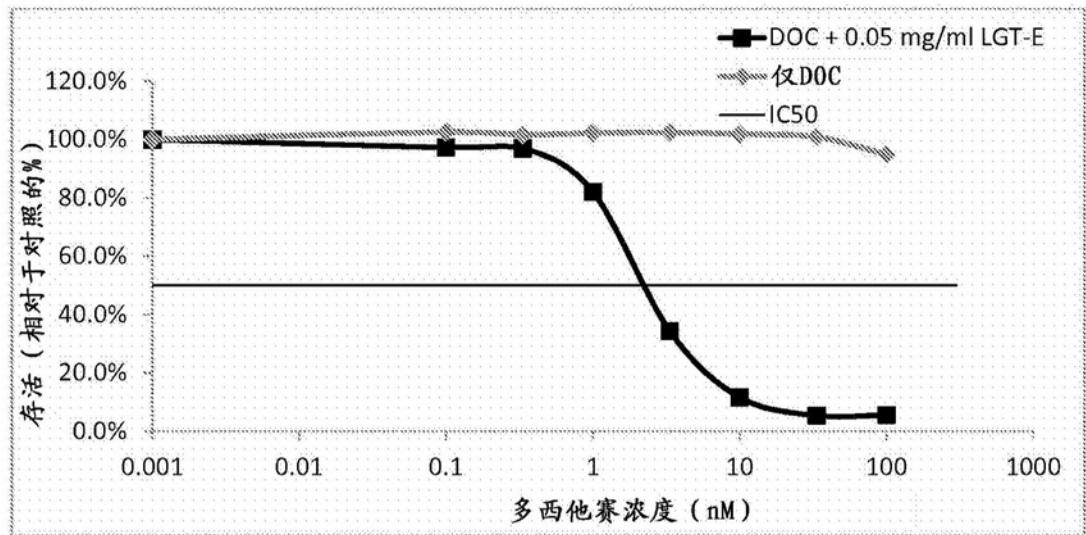


图4A

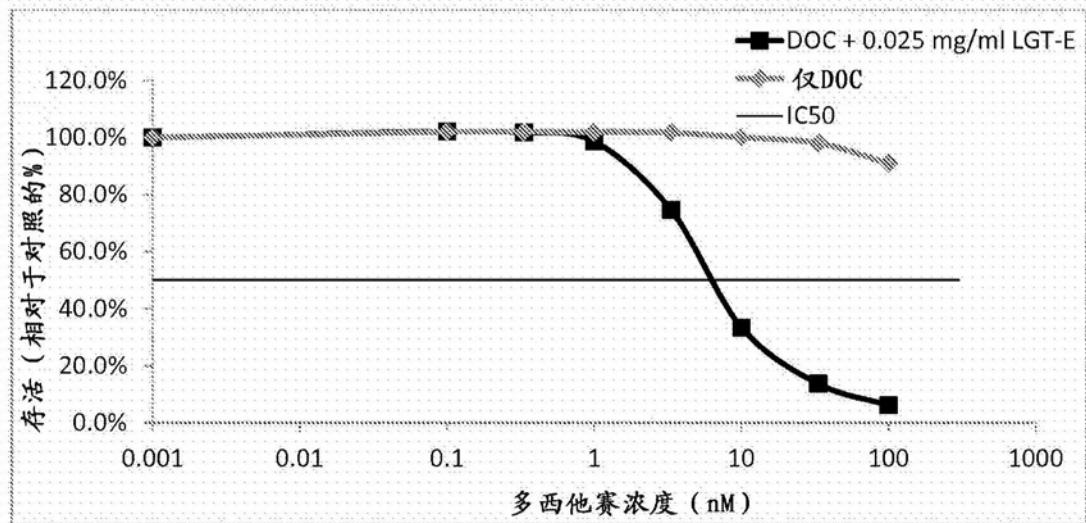


图4B

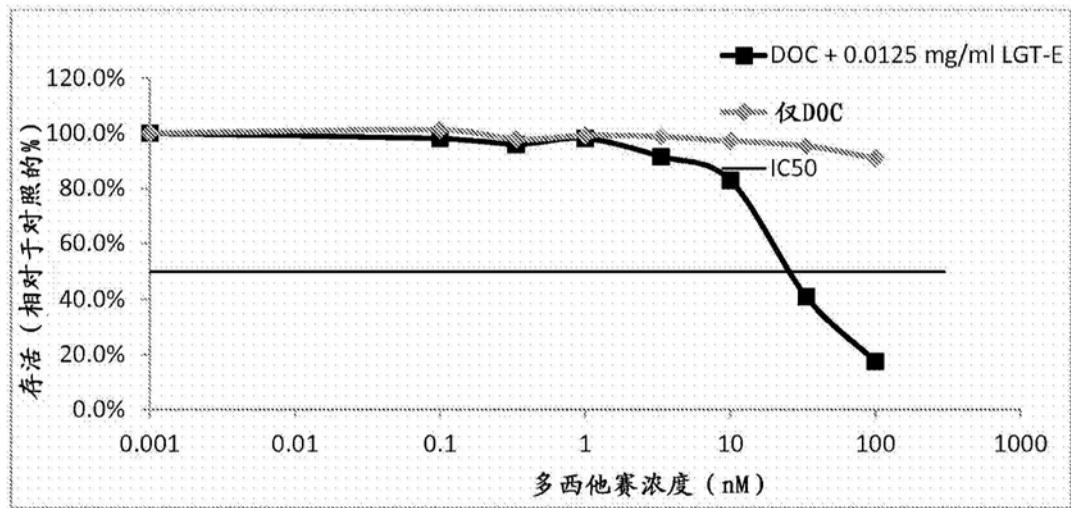


图4C

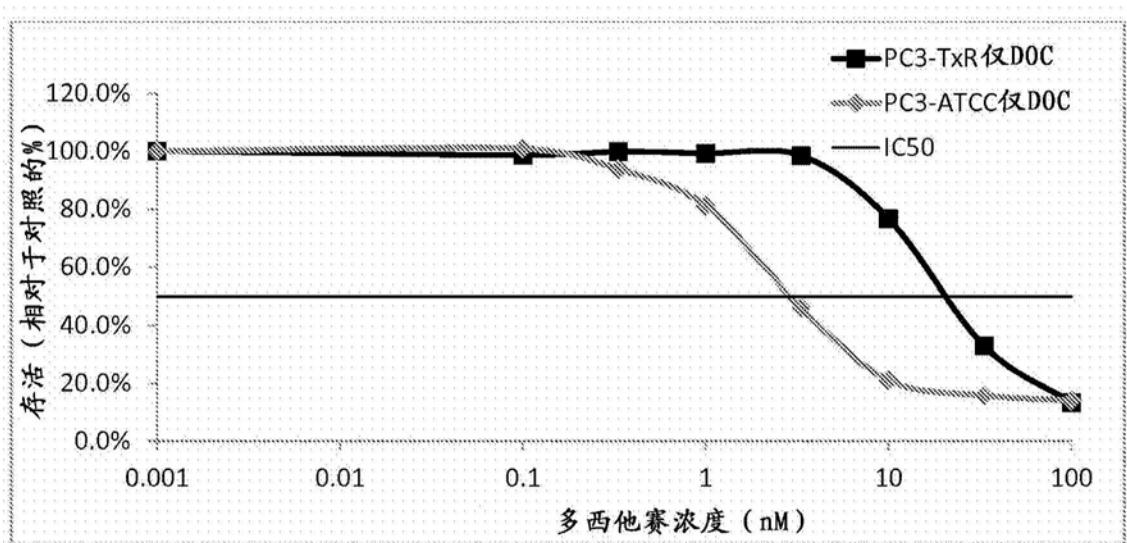


图5

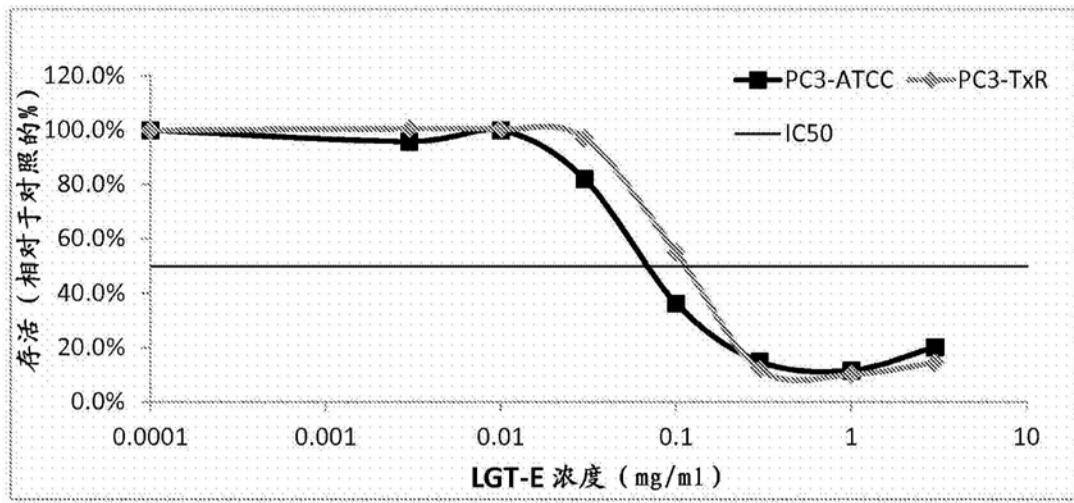


图 6A

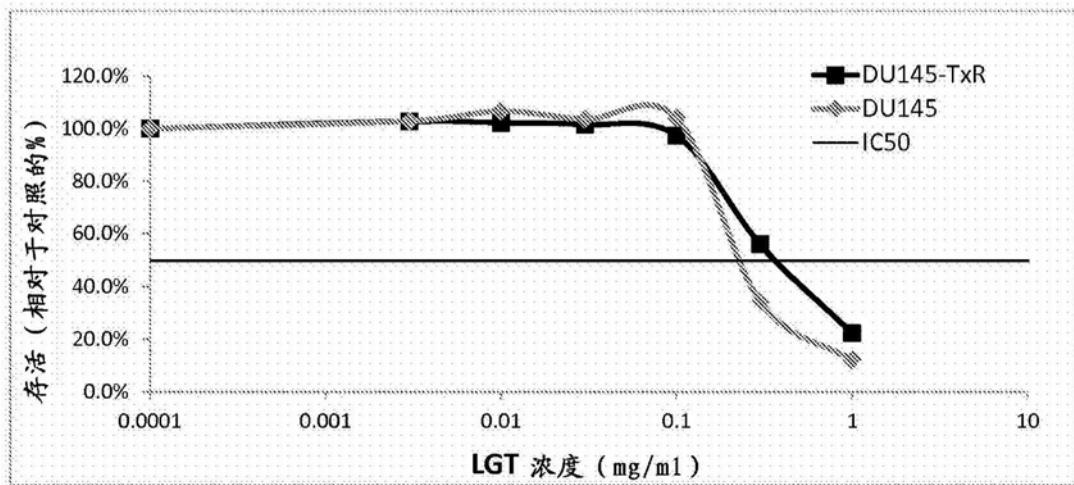


图 6B

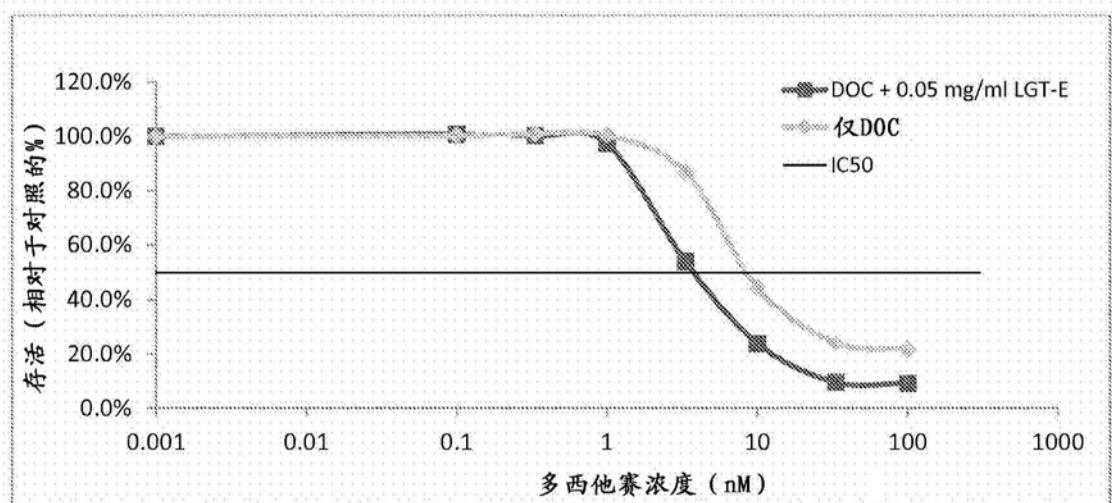


图7

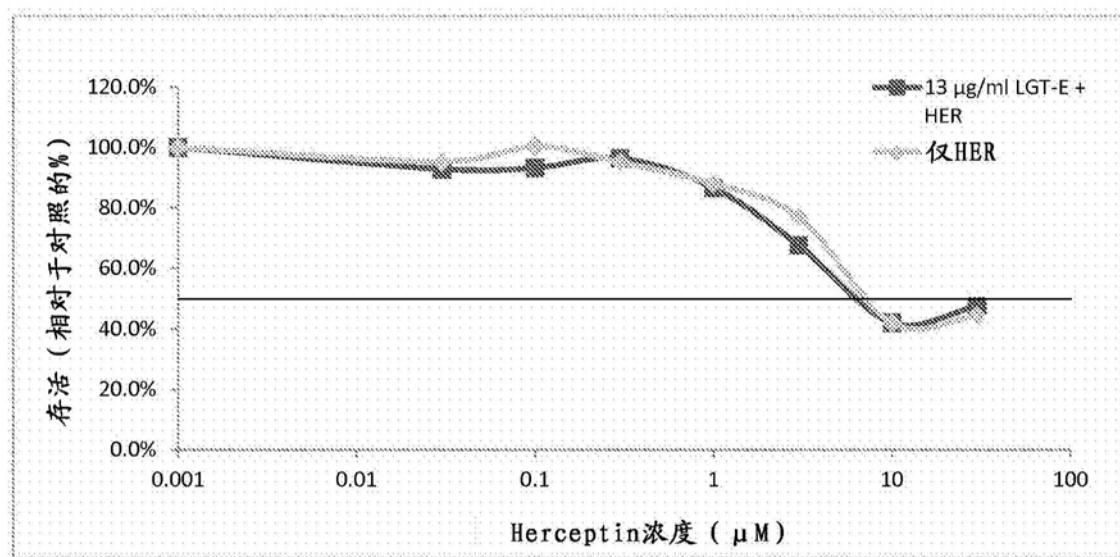


图8

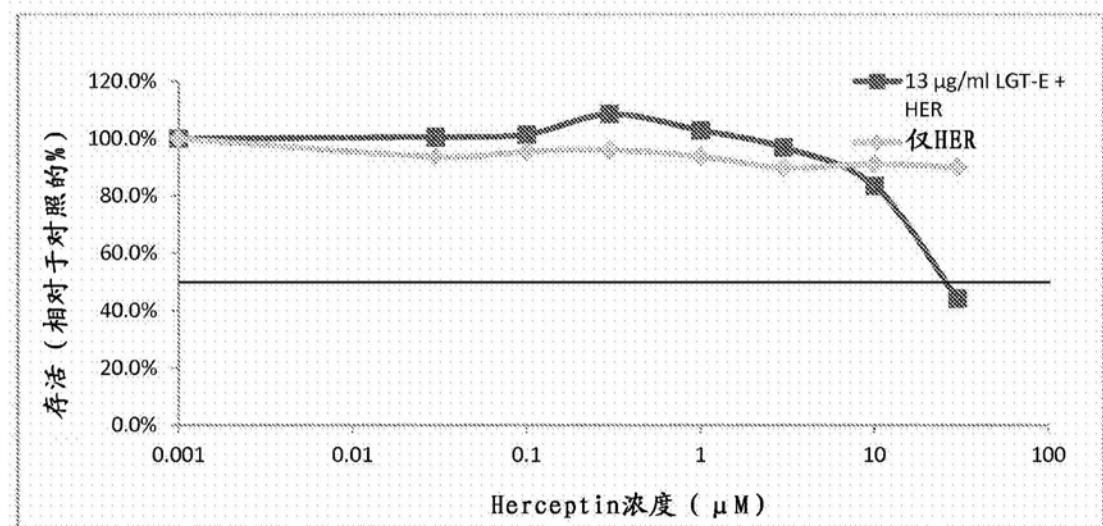


图9

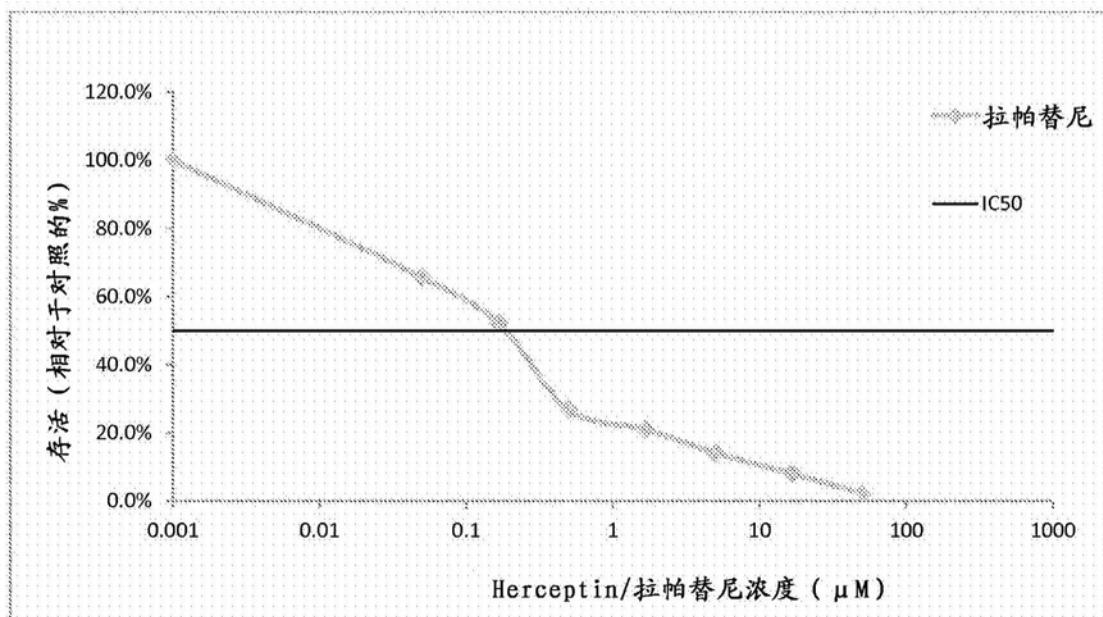


图10

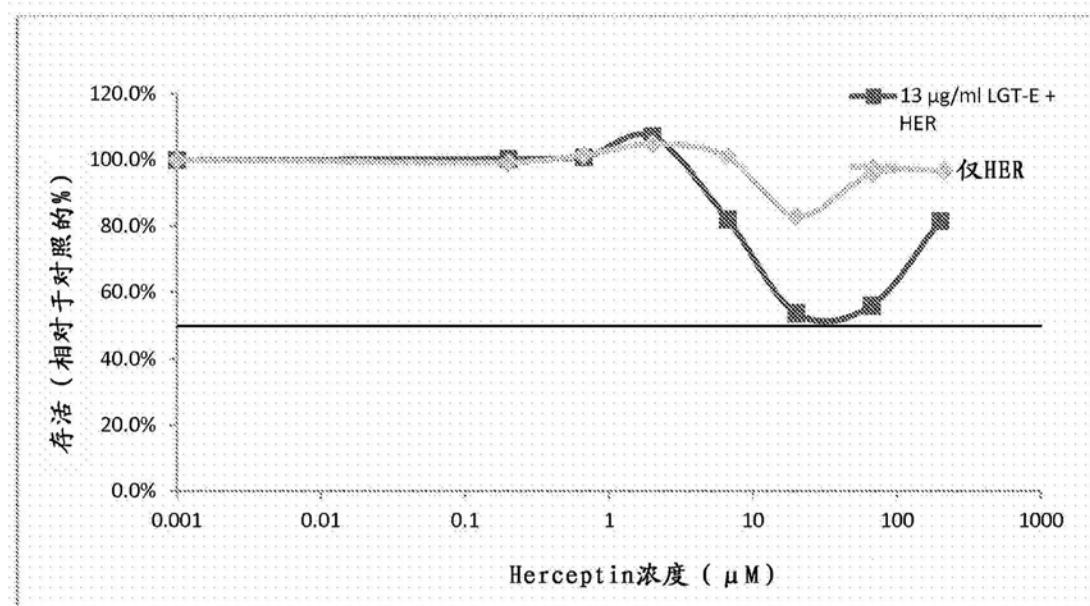


图11

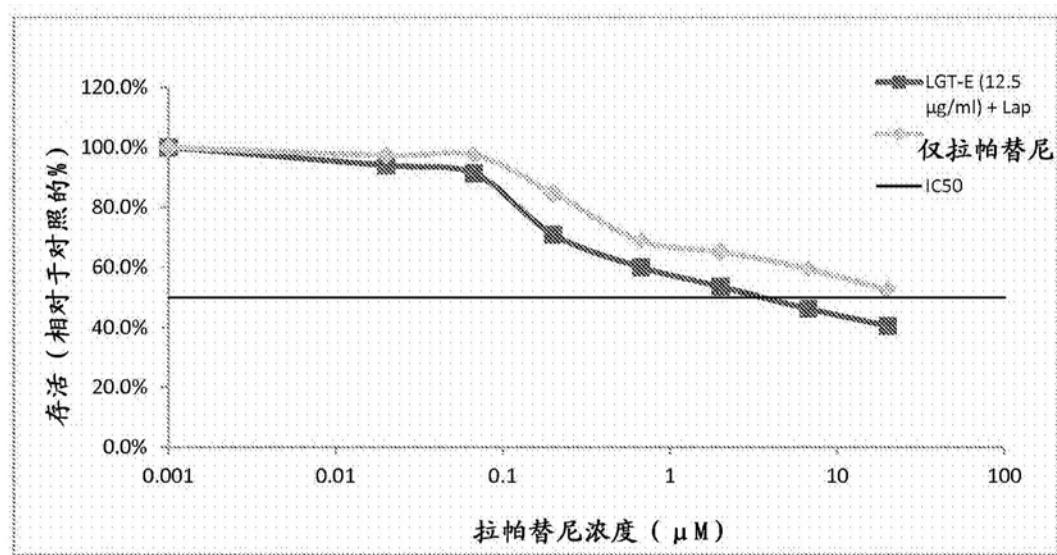


图12A

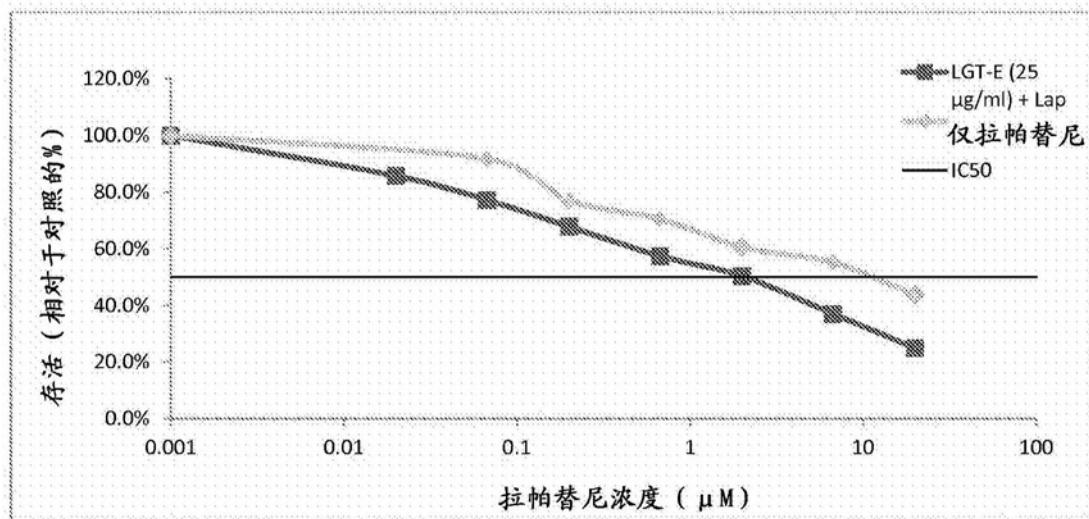


图12B

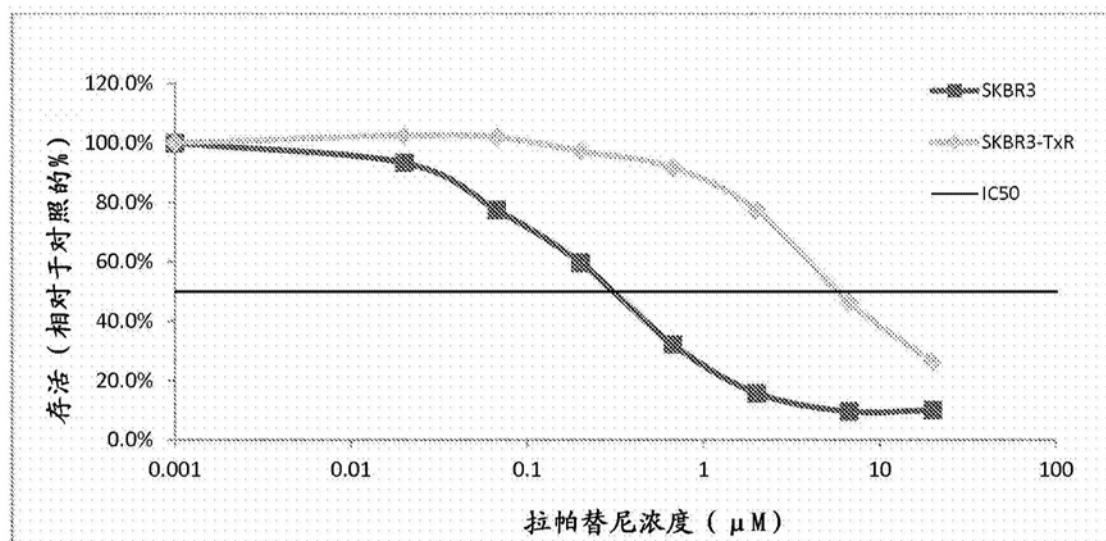


图13

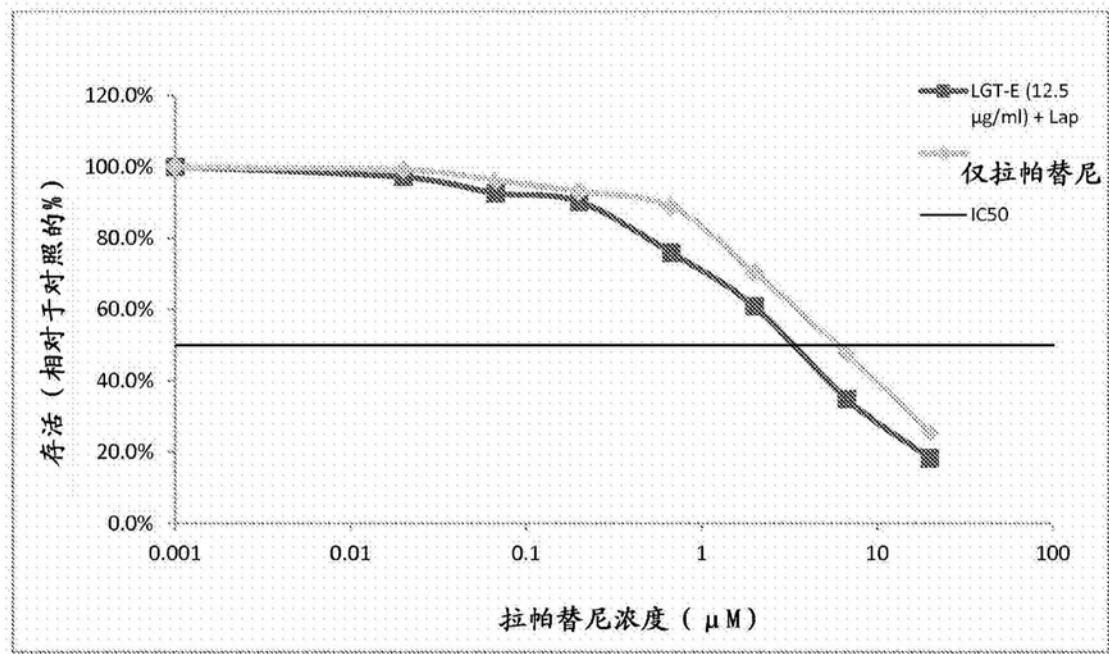


图14

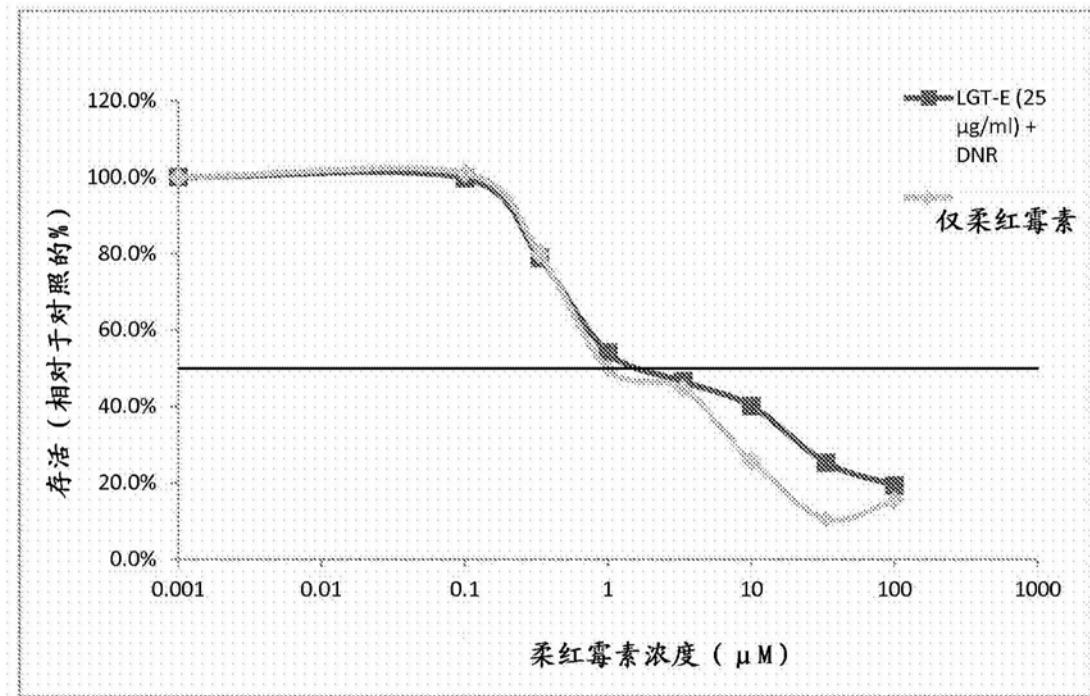


图15

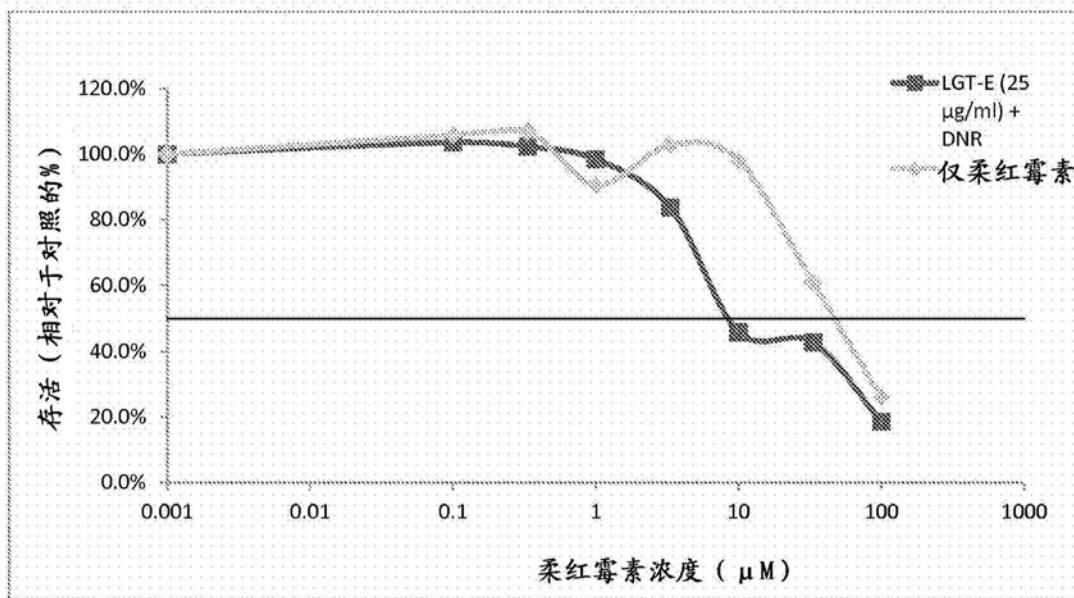


图16

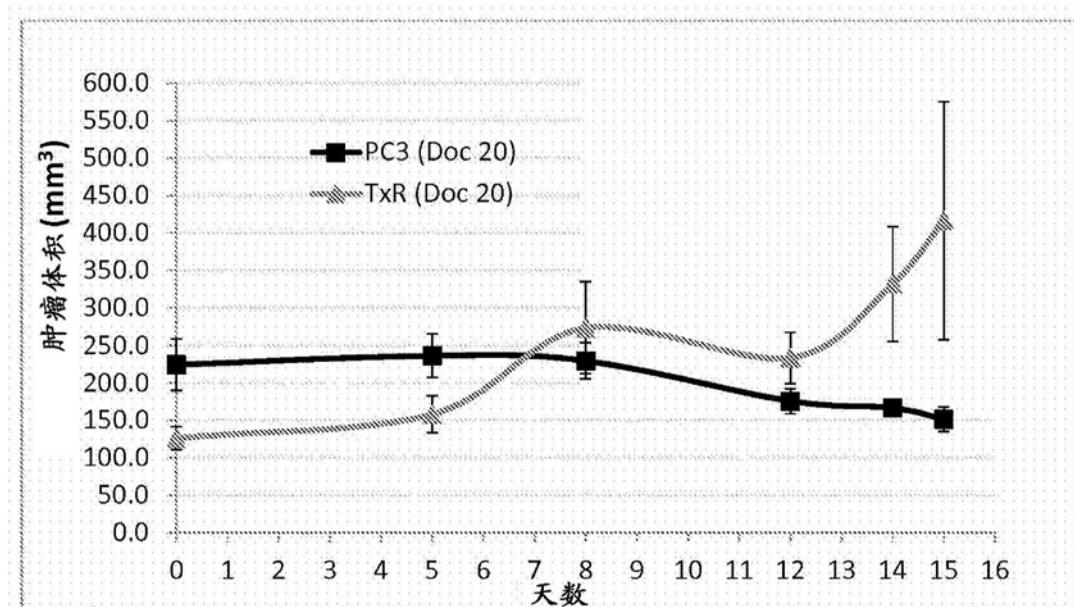


图17A

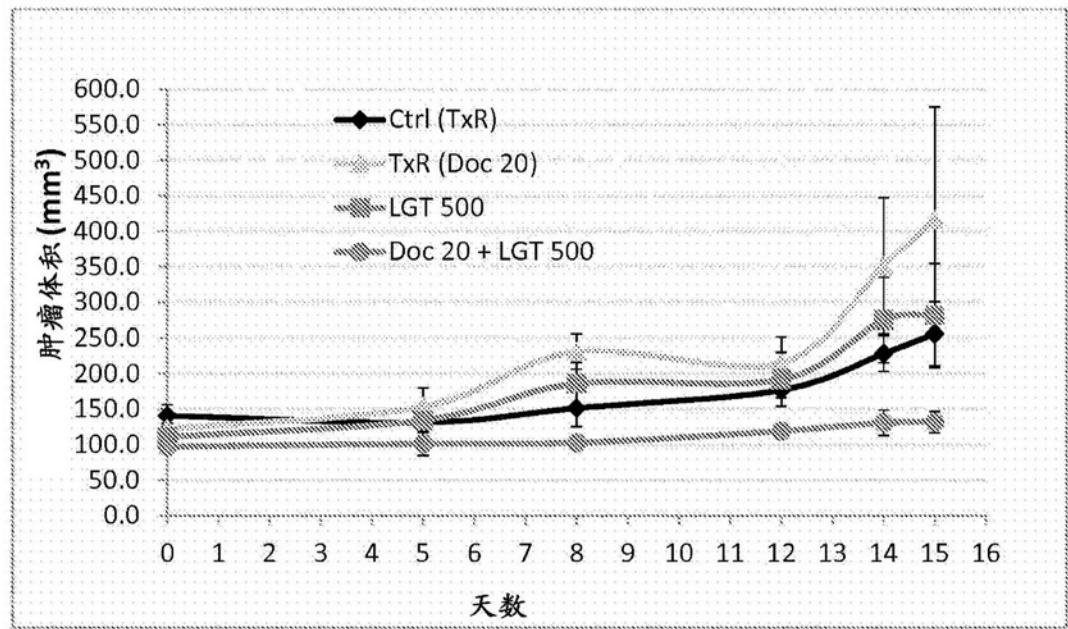


图17B