

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/15 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510112147.0

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100346830C

[22] 申请日 2005.12.28

[21] 申请号 200510112147.0

[73] 专利权人 上海交通大学医学院附属瑞金医院

地址 200025 上海市瑞金二路 197 号

[72] 发明人 陈竺 陈赛娟 赵维莅 王兰

刘元华 阎金松

[56] 参考文献

CN1705635A 2005.12.7

The combination of cytotoxic and molecular-targeted therapies – can it be done JACKMAN

A. L. drug discovery today: therapeutic strategies, Vol. 1 No. 4. 2004

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

代理人 翟羽

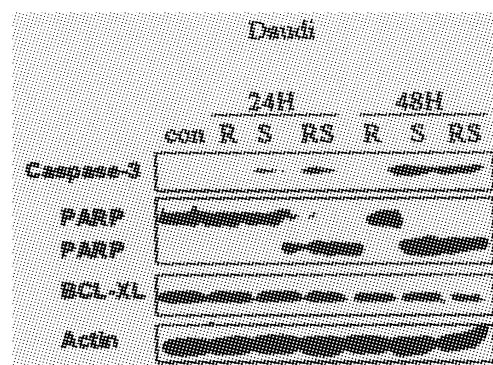
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 9 页

[54] 发明名称

一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物，该药物由利妥昔 (Rituximab, Rituxan, 美罗华) 和 SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, 辛二酰苯胺氧脲酸) 组成，该药物有明显协同作用，较单用可显著抑制 B 淋巴瘤细胞生长增殖，协同诱导凋亡，协同抑制 NF- κ B 活性和下调 BCL-XL 表达。两药组合在提高疗效的同时可大幅降低治疗费用。



- 1、 一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物,其特征在于该药物由利妥昔和 SAHA 组成,其中,利妥昔用量为 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SAHA 用量为 1-10 μM 。
- 2、 如权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于利妥昔用量为 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SAHA 用量为 1-5 μM 。
- 3、 如权利要求 1 所述的药物组合物,其特征在于利妥昔用量为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SAHA 用量为 2.5 μM 。

一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物

技术领域

本发明涉及一种治疗癌症的药物组合物,尤其涉及一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物。

背景技术

淋巴瘤是一种起源于淋巴组织的恶性肿瘤,近年来在世界范围内的发病率几乎增长了一倍,严重危害人类的健康。B 细胞淋巴瘤是最常见的淋巴瘤种类,约占淋巴瘤的 50-60%。除早期、局限性、低度恶性的 B 细胞淋巴瘤可单纯使用放射治疗外,目前主要的治疗方式仍为联合化疗。采用联合化疗可使约 50-60%的患者获得疾病缓解,20-30%的患者获得长期生存,但大部分患者对治疗无效或治疗后迅速复发,疾病进展快,预后差。更重要的是,化疗的毒副反应大,患者尤其是老年或合并其它疾病患者不能耐受。

CD20 广泛表达于 B 细胞淋巴瘤细胞表面,是开展免疫治疗的理想靶点。近年来,人-鼠嵌合性抗 CD20 单克隆抗体利妥昔 (Rituximab, Rituxan, 美罗华) 已成功应用于临床,通过抗体介导的针对细胞特异表面标记的免疫治疗,具有低毒,低骨髓抑制和较高特异性的特点,为 B 细胞淋巴瘤的治疗开辟了新途径。然而患者的治疗费用昂贵,部分患者在

治疗早期或疾病复发时发生耐药。因此，研究利妥昔和其他药物联合应用的可行性对于提高疗效、降低费用具有重要意义。

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂可通过抑制 HDAC, 阻断由于 HDAC 募集功能紊乱而导致的基因表达受抑, 有显著的抗肿瘤效应。其中 SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, 辛二酰苯胺氧肟酸) 已进入 II 期临床, 治疗复发的 B 细胞淋巴瘤患者有一定的疗效, 是一种极具潜力的靶向治疗药物。

发明内容

本发明的目的在于提供一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物。

本发明的目的是通过以下技术方法来实现的: 本发明一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物, 该药物由利妥昔和 SAHA 组成。利妥昔用量为 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SAHA 用量为 1-10 μM 。利妥昔用量可为 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SAHA 用量可为 1-5 μM 。利妥昔用量优选为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SAHA 用量优选为 2.5 μM 。

本发明应用了以下两种人的细胞株: 对利妥昔敏感的滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株, 和对利妥昔耐药的 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株。该两种人的细胞株分别经不同浓度的利妥昔 (0、1、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 SAHA (0、1、2.5、5、10 μM) 联合处理, 进行了 MTT 实验、流式细胞仪检测 annexin-V 和线粒体跨膜电位实验、免疫印迹分析实验及核蛋白胶电泳转移检测实验。

本发明所公开的一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物, 其优点表现在: 通过使用本发明的药物组合物, 发挥两种药的协同作用, 可以协同抑

制 B 淋巴瘤细胞生长增殖，协同诱导 B 淋巴瘤细胞凋亡，协同抑制 NF- κ B 活性和下调 BCL-XL 表达。两药组合在提高疗效的同时可大幅降低费用。

附图说明

图 1A 显示单用利妥昔抑制 B 淋巴瘤细胞生长的效果图。

图 1B 显示单用 SAHA 抑制 B 淋巴瘤细胞生长的效果图。

图 1C 显示合用利妥昔、SAHA 抑制 B 淋巴瘤细胞生长的效果图。

图 2A 显示流式细胞仪检测滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株凋亡对照组的效果图。

图 2B 显示单用利妥昔诱导滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株凋亡的效果图。

图 2C 显示单用 SAHA 诱导滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株凋亡的效果图。

图 2D 显示合用利妥昔、SAHA 诱导滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株凋亡的效果图。

图 2E 显示合用利妥昔、SAHA 诱导滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株凋亡的协同指数效果图。

图 2F 显示用流式细胞仪检测 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株凋亡对照组的效果图。

图 2G 显示单用利妥昔诱导 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株凋亡的效果图。

图 2H 显示单用 SAHA 诱导 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株凋亡的效果图。

图 2I 显示合用利妥昔、SAHA 诱导 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株凋亡的效果图。

图 2J 显示合用利妥昔、SAHA 诱导 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株凋亡的协同指数效果图。

图 3 显示单用及合用利妥昔或 SAHA 作用 24 小时线粒体跨膜电位的结果图。

图 4 A 显示单用及合用利妥昔或 SAHA 对滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株 Caspase-3、PARP 和 BCL-XL 影响的结果图。

图 4B 显示显示单用及合用利妥昔或 SAHA 对 Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株 Caspase-3、PARP 和 BCL-XL 影响的结果图。

图 5 显示单用及合用利妥昔或 SAHA 对 B 淋巴瘤细胞 NF- κ B 活性影响的结果图

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步描述。

实施例 1

一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物制备

本发明一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物,该药物由利妥昔和 SAHA 按照一定的浓度比例混合制得。其中利妥昔用量为 20 μ g/ml , SAHA 用量为 2.5 μ M。

实施例 2

一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物制备

本发明一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物,该药物由利妥昔和 SAHA 按照一定的浓度比例混合制得。其中利妥昔用量为 1 μ g/ml , SAHA 用量

为 10 μ M。

实施例 3

一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物制备

本发明一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物,该药物由利妥昔和 SAHA 按照一定的浓度比例混合制得。其中利妥昔用量为 100 μ g/ml , SAHA 用量为 1 μ M。

实施例 4

一种治疗 B 细胞淋巴瘤的药物组合物药效评价

(一)试剂:

利妥昔购自上海罗氏公司, -4 $^{\circ}$ C 保存。SAHA 由上海默沙东赠送, 溶解于 DMSO 中, 储存液浓度为 100 mM, -20 $^{\circ}$ C 保存。MTT、碘化丙啶(PI)、rhodamine 123 (Rh123)、二硫苏糖醇购自 Sigma 公司。抗 PARP、caspase-3、BCL-XL、NF- κ B (P65)、过氧化物酶偶联的羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗均购自 Santa Cruz 公司。抗 β -actin 购自 Abcam 公司。

(二)细胞培养, 细胞存活和细胞形态学:

本研究应用了以下两种人的细胞株: 滤泡型淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞株, 对利妥昔敏感, Burkitt' s 淋巴瘤 Daudi 细胞株, 对利妥昔耐药。淋巴瘤细胞在 5%CO₂-95%空气, 饱和湿度以及 37 $^{\circ}$ C 的条件下, 培养于 RPMI-1640 培养液中(Gibco/BRL), 并加入 10%胎牛血清。在每次实验中, 细胞接种密度为 2 \times 10⁵ /ml。细胞的存活率采用台盼兰拒染实验检测。细胞形态学观察采用瑞氏染色法。

(三)MTT 实验:

在 96 孔板中，用不同浓度利妥昔或 SAHA 处理细胞。72 小时后，向每孔中加入 0.1 mg MTT，在 37℃ 下孵育 4 小时后，在分光光度计 570nm 处测量标本吸光度值。

(四) 流式细胞仪检测 annexin-V 和线粒体跨膜电位:

细胞凋亡用 ApoAlert Annexin V-FITC Apoptosis kit (BD) 进行分析。在检测线粒体跨膜电位中，细胞用 PBS 洗后，在 37℃ 下与 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rh123 孵育 30 分钟，然后再用 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI 染色。荧光强度用流式细胞仪进行测量。

(五) 免疫印迹分析:

用 200 ml Laemmli 裂解缓冲液 (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2mM EDTA, 10% glycerol, 2% SDS and 5% β -mercaptoethanol) 裂解 5×10^6 细胞。蛋白裂解物 (20 μg) 用于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，再转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜在溶于 TBS/0.05% Tween 20 的 5% 脱脂牛奶中封闭，之后与一抗在室温孵育 2 小时，与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 小时。免疫复合物用辣根过氧化物酶化学发光检测试剂盒检测。

(六) 核蛋白分离:

1×10^7 细胞与不含 NP-40 的裂解缓冲液 (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, pH 7.9) 洗后，重悬于提取缓冲液 (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA and 25% 甘油) 中，冰上孵育 20 分钟。12000 $\times g$ 离心 10 分钟后，上清即为核蛋白。

(七) 胶电泳转移检测实验:

Daudi 细胞核蛋白提取物用考马斯亮蓝试剂 (Pierce) 定量。核蛋白

(10 μg) 与 ^{32}P 标记的双链 NF- κB (5' -AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') 共有序列孵育, 然后用 4% 非变性 PAGE 凝胶分离, 用放射自显影检测被标记的条带。

(八) 统计分析:

实验结果用三次独立实验的平均值和标准差表示, 用 t 检验来比较差异。P 值小于 0.05 则认为具有统计学差异。所有的统计采用 SAS8.2 软件。

(九) 结果:

采用 CD20 阳性 B 淋巴瘤细胞系 SU-DHL-4 和 Daudi 细胞进行培养, 通过分析生长曲线观察利妥昔、SAHA 单独及联合应用对细胞生长增殖的影响。B 淋巴瘤细胞分别经不同浓度的利妥昔 (0、1、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 SAHA (0、1、2.5、5、10 μM) 联合处理。单用和合用不同剂量利妥昔或 SAHA 对 B 淋巴瘤细胞的抑制作用见图 1A、图 1B、图 1C, 利妥昔 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 联合 SAHA (2.5 μM) 应用 48 小时可显著抑制 SU-DHL-4 和 Daudi 细胞的增殖。

用流式细胞仪检测单用及合用药后 B 淋巴瘤细胞的凋亡 (Annexin V 和 PI 双染法)。SU-DHL-4 经利妥昔 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、SAHA 2.5 μM 及利妥昔 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 SAHA 2.5 μM 联合处理的 48 小时后, Annexin V 阳性细胞分别为: 对照组 3.4% (见图 2A); 利妥昔组 17.3% (见图 2B); SAHA 组 26.3% (见图 2C); 利妥昔与 SAHA 合用组 56.7% (见图 2D)。在 Daudi 细胞中: 对照组 3.0% (见图 2F); 利妥昔组 4.2% (见图 2G); SAHA 组 24.4% (见图 2H); 利妥昔与 SAHA 合用组 61.7% (见图 2I)。同时我们应用 Berenbaum 建立

的等效应线图法分析利妥昔与 SAHA 的联合应用是协同、相加或拮抗。将利妥昔与 SAHA 单用与合用 Annexin V 阳性率取 $30\pm 5\%$ ，计算两者合用的协同指数 (combined index, CI): $CI = d1/D1 + d2/D2$ 。D1、D2 代表单用药物 1 和 2 时产生 $30\pm 5\%$ 效应时所需的药物剂量，d1、d2 代表联合应用药物 1 和 2 时产生同等效应时的药物剂量。CI>1，图形为凸形，两者联合应用为拮抗作用，CI=1，图形为一直线，两者联合应用为相加作用，CI<1，图形为凹形，两者联合应用为协同作用。利妥昔与 SAHA 作用于 SU-DHL-4 和 Daudi 细胞，图形均为凹型 (见图 2E、图 2J)，证明两者为协同作用。

用亲脂阴离子染料 Rh123 和 PI 双染色检测单个细胞可获得线粒体跨膜电位 ($\Delta\psi_m$) 和细胞膜的完整性，前者由于线粒体摄取量与线粒体 $\Delta\psi_m$ 成正比，摄取量减少表示 $\Delta\psi_m$ 下降；PI 不能通过完整的细胞膜，细胞发生凋亡早期细胞膜仍保持完整，PI 不能进入细胞，反之，坏死细胞膜破坏早期即发生 PI 染色增加。请参阅见图 3，经利妥昔 ($20\mu\text{g/ml}$) 联合 SAHA ($2.5\mu\text{M}$) 合用 24 小时后出现了 $\Delta\psi_m$ 的下降。

利妥昔与 SAHA 单用或合用 SU-DHL-4 细胞和 Daudi 细胞蛋白表达变化见图 4A、图 4B 示。利妥昔单用 Caspase-3 活化不明显，SAHA 单用可以诱导 Caspase-3 表达增加，相应的其底物 PARP 剪切成 89KD 的片段，不能发挥正常功能，导致细胞凋亡，利妥昔和 SAHA 合用时这种效应更明显。因此，利妥昔诱导 B 淋巴瘤细胞系凋亡无需激活的 Caspases 参与，而 SAHA 诱导 B 淋巴瘤细胞系凋亡通过激活的 Caspases 进行，这也可以部分解释两者协同作用的机制。BCL-XL 是 BCL-2 家族的重要的凋亡抑制因子，可通过稳定线粒体膜通透性，减少凋亡因子的释放，抑制细胞凋亡。利妥昔

和 SAHA 可以下调 BCL-XL 蛋白表达, 合用组 BCL-XL 的下调更明显, 从而促进淋巴瘤细胞凋亡 (图 4A 和图 4B)。

NF- κ B 是一个信号传导家族, 多以异源性二聚体形式发挥作用, 在细胞核内调节与细胞恶性转化、免疫以及炎症反应有关的许多基因的表达。BCL-XL 是 NF- κ B 的靶基因, NF- κ B 激活可上调 BCL-XL 的表达。在利妥昔 (20 μ g/ml) 联合 SAHA (2.5 μ M) 应用 48 小时可抑制 NF- κ B 的表达 (图 5A)。在 Daudi 细胞中, 核蛋白胶电泳转移检测进一步证实两者合用可导致 NF- κ B 转录活性的减低 (图 5B)。

综上所述, 抗 CD20 单克隆抗体利妥昔与组蛋白去乙酰化酶抑制剂合用能够抑制 NF- κ B 活性, 下调 BCL-XL 表达, 协同抑制淋巴瘤细胞凋亡, 可能成为 B 细胞淋巴瘤的又一种有效治疗方法。

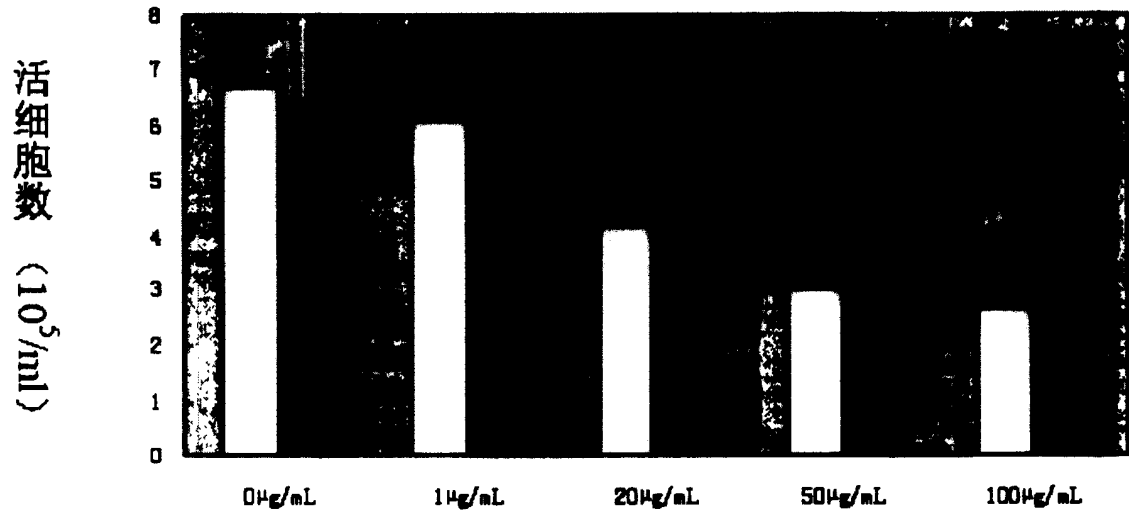


图 1A

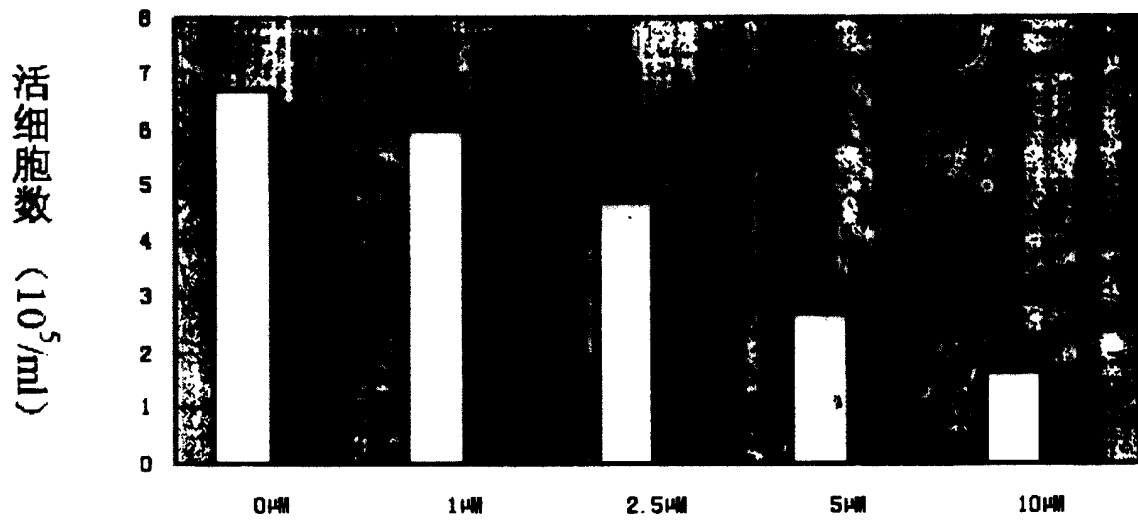


图 1B

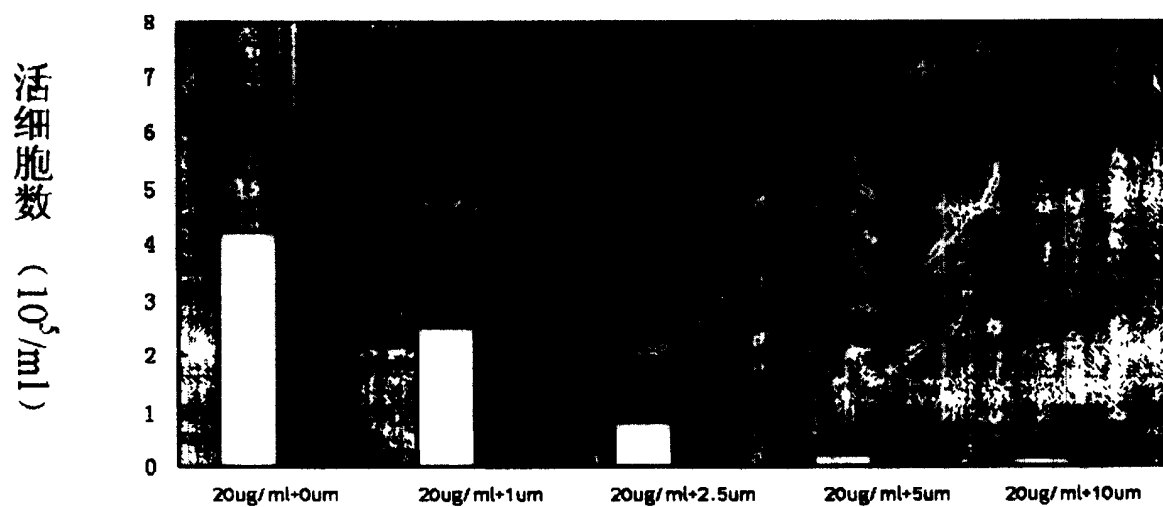


图 1C



图 2A

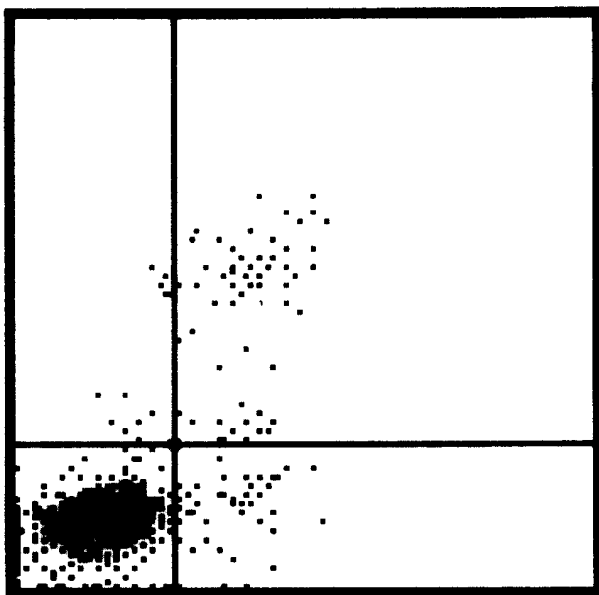


图 2B

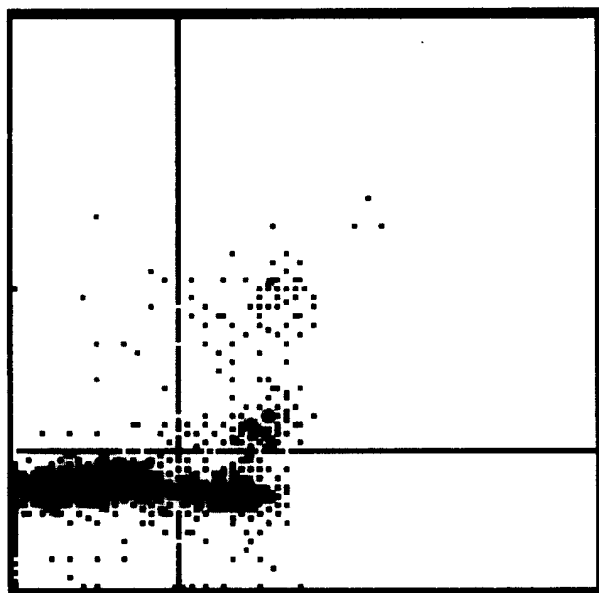


图 2C



图 2D

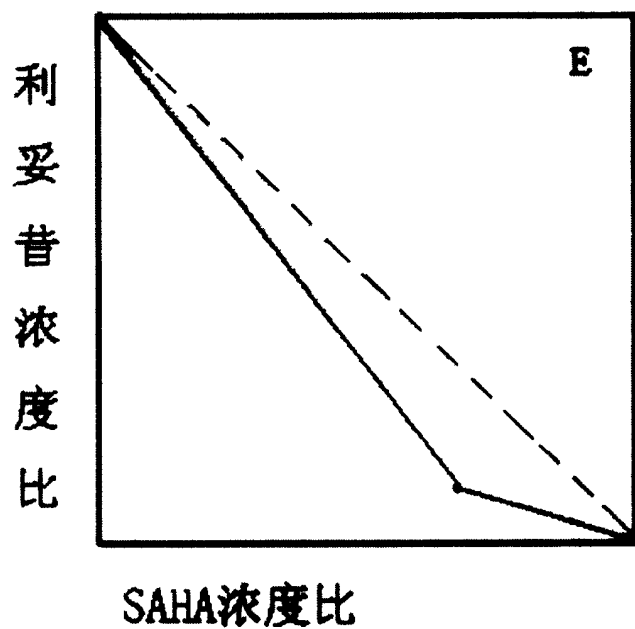


图 2E

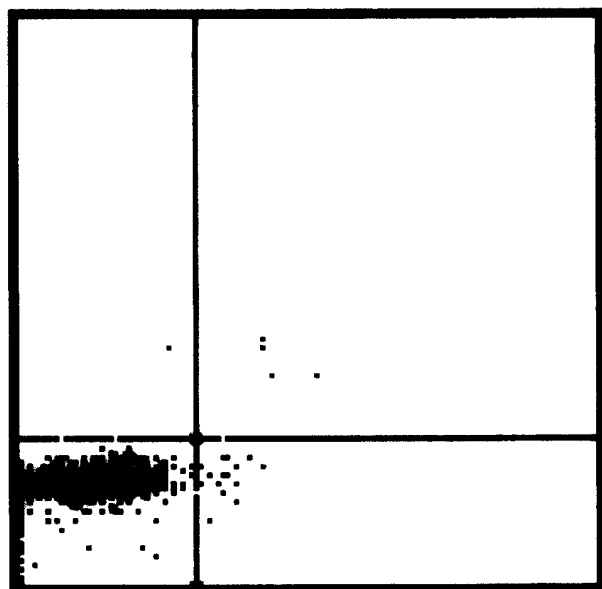


图 2F

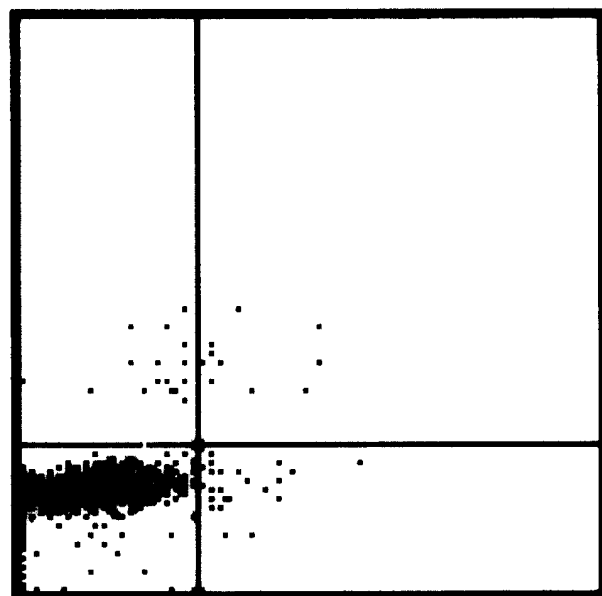


图 2G

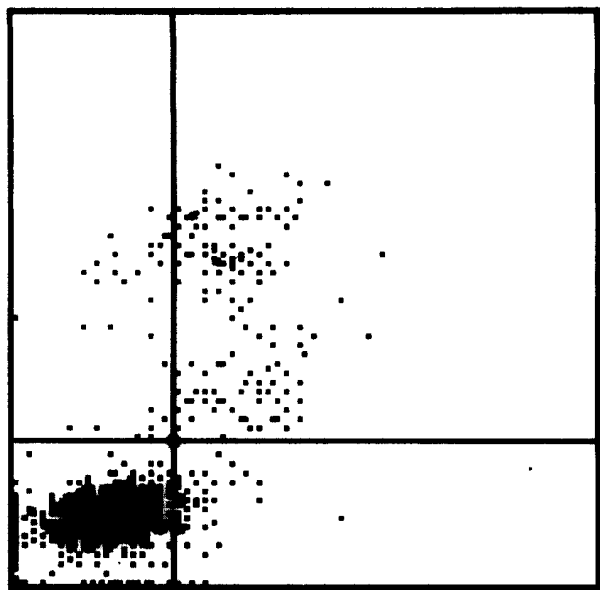


图 2H

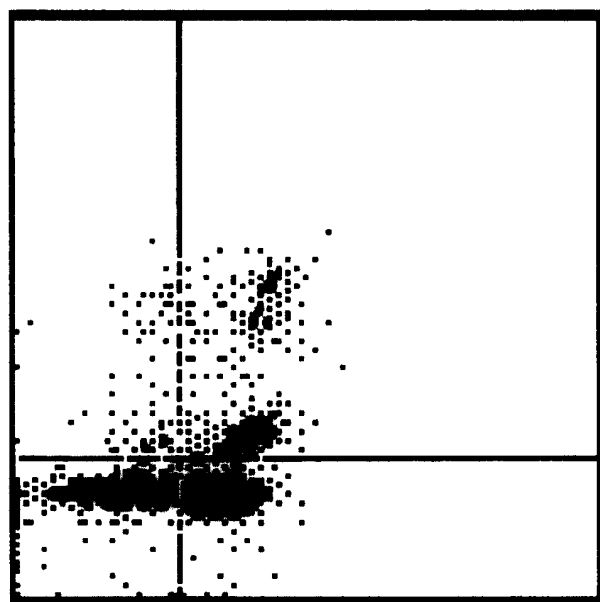


图 2I

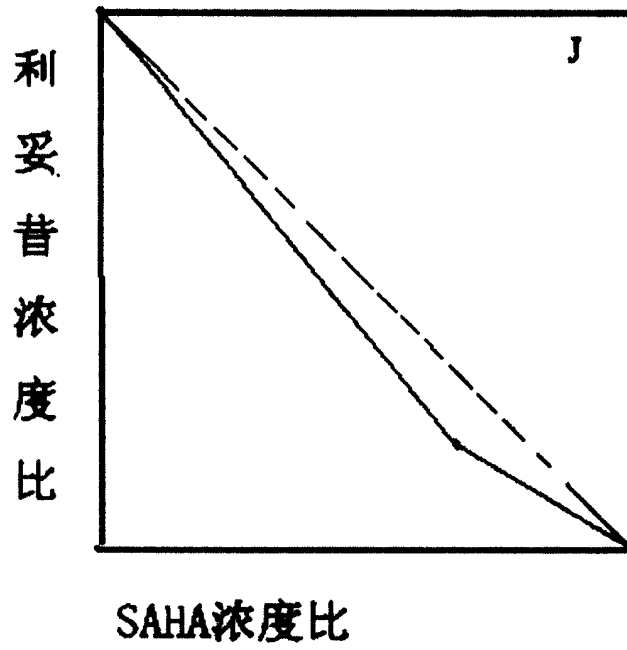


图 2J

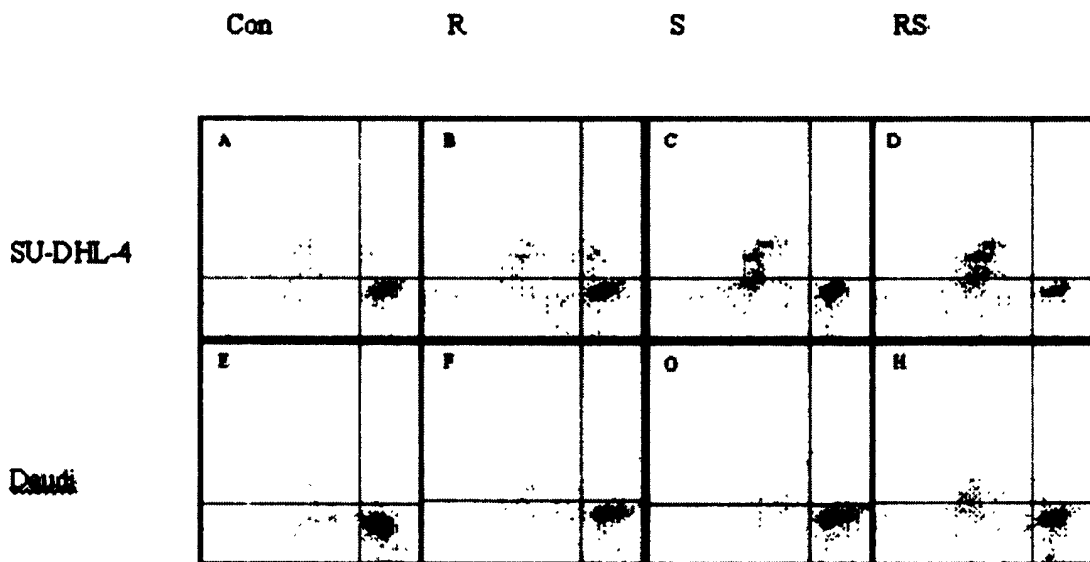


图 3

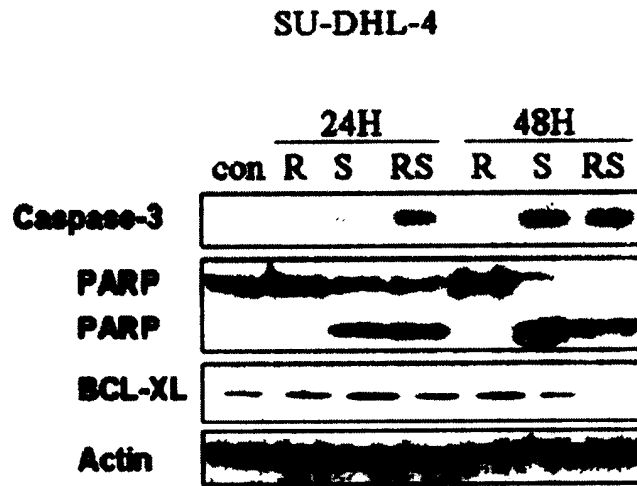


图 4A

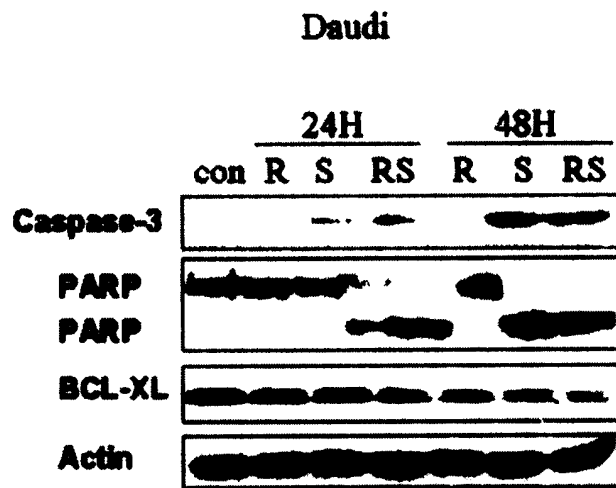


图 4B

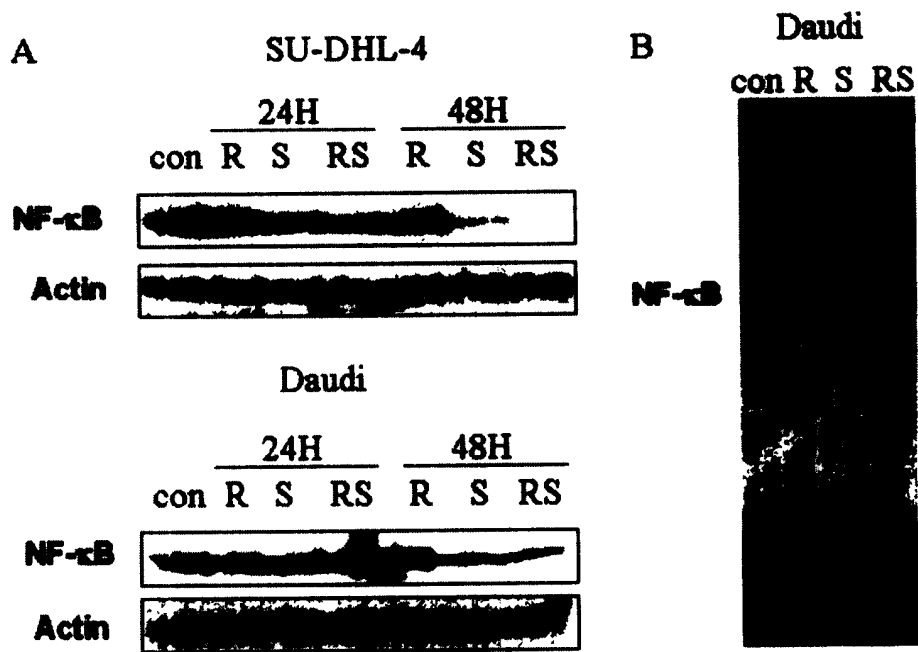


图 5