

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2014 年 4 月 3 日 (03.04.2014)



(10) 国际公布号  
**WO 2014/047780 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*A61K 31/352* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/081920
- (22) 国际申请日: 2012 年 9 月 25 日 (25.09.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 鼎泓国际投资(香港)有限公司  
(DINKUM INTERNATIONAL INVESTMENT  
(HONG KONG) COMPANY LIMITED) [CN/CN]; 中  
国香港特别行政区九龙尖沙咀广东道 5 号海港城  
海洋中心 9 楼 906 室, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人: 赵镭 (ZHAO, Lei); 中国北京市北京经济技  
术开发区天宝西路 1 号狮城百丽 31 楼 2 号, Beijing  
100176 (CN)。
- (74) 代理人: 北京邦信阳专利商标代理有限公司  
(BOSS & YOUNG PATENT AND TRADEMARK  
LAW OFFICE); 中国北京市建国门外大街永安东里  
甲 3 号通用国际中心 1 号楼 A 座 5 层, Beijing  
100022 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保  
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,  
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,  
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保  
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,  
RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,  
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,  
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

## 本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING APIGENIN AND APIGENIN DERIVATIVE AND ORIDONIN AND ORIDONIN DERIVATIVE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物及其应用

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing apigenin and apigenin derivative and oridonin and oridonin derivative and the use thereof in the preparation of medicine for treating lung cancer, pancreatic cancer, colon cancer, liver cancer, prostate cancer, kidney cancer, gastric cancer, brain tumours, sarcoma, mesothelioma, head and neck squamous cell carcinoma, ovarian cancer or breast cancer.

(57) 摘要: 本发明涉及一种含有芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物及其在制备治疗肺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌的药物中的应用。



WO 2014/047780 A1

## 含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物及其应用

### 技术领域

5 本发明涉及一种药物组合物及其在制备治疗癌症的药物中的应用，具体涉及含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物及其在制备治疗肺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌的药物中的应用。

10

### 背景技术

世界卫生组织调查报告表明，全球癌症状况日益严重，今后20年新患者的人数将由目前的每年1000万增加到1500万，因癌症而死亡的人数也将由每年的600万增加至1000万。其中，原发性肝癌为发生在肝细胞与肝  
15 内胆管上皮细胞的癌变，是人类最常见的恶性肿瘤之一；结肠癌的发病与环境、生活习惯，尤其是饮食方式有关，一般认为高脂肪饮食和纤维素不足是主要发病原因。随着生活水平的提高，饮食结构的改变，结肠癌的发病率呈逐年上升趋势。间皮瘤是发生在胸腔或腹腔内壁上的肿瘤，可分为良性或恶性。胸膜间皮瘤是胸膜原发肿瘤，有局限型（多为良性）  
20 和弥漫型（都是恶性）之分。其中弥漫型恶性间皮瘤是胸部愈后最坏的肿瘤之一。大多数病人在40-70岁之间，男性多于女性。恶性胸膜间皮瘤的治疗，目前仍然没有有效的根治方法。腹膜间皮瘤是指原发于腹膜间皮细胞的肿瘤。临床表现不具有特征性，腹膜间皮瘤约占所有间皮瘤病例的20%，大多数病例在45-64岁之间。腹膜间皮瘤临床表现不具特异性。  
25 迄今为止，腹膜间皮瘤尚缺乏特效的治疗方法。头颈部鳞状细胞癌是常见的头颈部疾病，其发病率居恶性肿瘤第六位，每年大约有400万个新发病例，特别是在发展中国家成为男性第3常见癌症。原发部位主要是头颈部4个常见部位-口腔、鼻咽、口咽、下咽和喉。目前，手术联合放疗、化疗是头颈部鳞状细胞癌的主要治疗手段。前列腺癌是男性泌尿生殖系

统肿瘤中最重要的一种，是人类特有的疾病。前列腺癌为老年病，大多在50岁以后发病。随着人类平均寿命的延长、诊断技术的提高，生活方式的改变，前列腺癌的发病率在不断上升，因此研究前列腺癌的治疗药物迫在眉睫。

5 目前已上市的抗肿瘤药物较多，如烷化剂药物、抗代谢药物、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂等，但是大多药物由于毒性较大，病人不耐受。大量的临床实践证明，中药或中西医结合能有效治疗恶性肿瘤，同时能减轻放化疗的毒副作用。运用现代医学手段，发现一些活性天然产物能有效抑制肿瘤细胞的生长，有诱导细胞凋亡的作用。目前使用的众多抗  
10 生素和抗肿瘤药物或直接来源于天然产物，或经其结构改造而得。因此，安全性高的活性天然产物运用于临床以治疗癌症将具有广阔的前景，也是目前肿瘤治疗领域发展的新方向。

冬凌草甲素(Oridonin, Ori)是从唇形科香茶菜属(Rabdosia)植物中分离出的化学结构为对映贝壳杉烯二萜类有机化合物。长期以来中国、  
15 韩国和日本等地民间广泛将冬凌草用于抗炎、抗菌和治疗肿瘤。研究表明，冬凌草甲素通过诱导肿瘤细胞凋亡、阻滞肿瘤细胞增殖周期及降低端粒酶活性等发挥抗肿瘤作用。冬凌草甲素因毒副作用较小且具有较强的抗肿瘤活性而得到广泛的关注。

芹菜素(Apigenin)是一种黄酮类化合物，广泛存在于多种水果和蔬菜中，具有抗肿瘤、抗氧化及抗炎等多种生物学作用。近年来通过药理  
20 研究发现，芹菜素抗肿瘤作用明显，可抑制肿瘤细胞生长，诱导肿瘤细胞凋亡，并可抑制肿瘤血管形成、侵袭和转移，此外，还能干扰肿瘤细胞的信号传导途径。芹菜素在抗肿瘤方面的应用备受关注。

随着肿瘤分子生物学的研究进展，肿瘤分子靶向治疗已成为肿瘤研  
25 究的热点，在多种肿瘤的治疗中发挥了重要的作用。然而，大部分肿瘤的生物学行为并非由单一信号传导通路所支配，而是多个信号传导通路共同起作用的。中医药以其多基因多靶点的作用优势正日益受到关注，因此联合用药针对多靶点进行靶向治疗将不仅旨在减少或延缓耐药性的出现、降低毒性，而且通过多种药物对癌细胞杀伤的协同作用取得更好

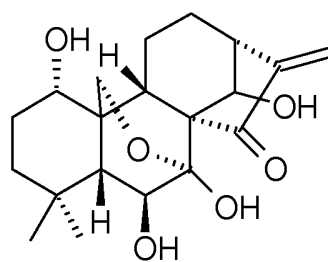
的疗效。

## 发明内容

针对以上技术缺陷，本发明提供一种药物组合物及其在制备治疗癌症的药物中的应用，具体为含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物在制备治疗肺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌的药物中的应用。

本发明含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物为芹菜素；所述冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物为冬凌草甲素。

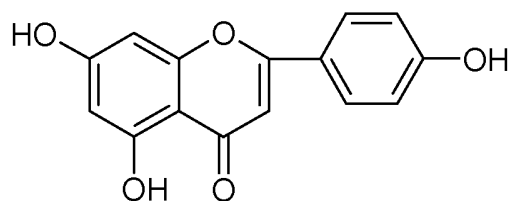
本发明药物组合物中的冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物优选为冬凌草甲素，其相应的结构式如式 I 所示。



I

本发明药物组合物中，所述组分不限于冬凌草甲素本身，还可以是其可药用的盐、水合物或衍生物等。

本发明药物组合物中的芹菜素及芹菜素类衍生物优选为芹菜素，其结构式如式 II 所示。



II

本发明药物组合物中，所述组分不限于芹菜素本身，还可以是其可药用的盐、水合物或衍生物等。

本发明含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物中，芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 5.0-60.0: 3.5-30.0；进一步优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

5 的摩尔比为 10.0-30.0: 7.5-15.0。

本发明含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物可以用于治疗各种肿瘤，所述肿瘤包括但不限于肺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌。

10

本发明优选芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物用于制备治疗结肠癌、肝癌、前列腺癌、间皮瘤及头颈鳞状癌的药物中的应用。

在本发明药物组合物用于制备治疗结肠癌的药物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

15 的摩尔比为 12.5-20.0: 7.5-15.0；优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

的摩尔比为 15.0-20.0: 10.0-15.0；更进一步优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

20 的摩尔比为 20.0: 15.0。

在本发明药物组合物用于制备治疗肝癌的药物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

的摩尔比为 10.0-25.0: 7.5-15.0。

其中，在制备治疗 HUH-7 类型肝癌的药物的应用中，优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

25 的摩尔比优选为 15.0-25.0: 10.0-15.0；最佳为所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

的摩尔比为 25.0: 15.0。

在制备治疗 SK-Hep-1 类型肝癌的药物的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物

的摩尔比为 15.0-25.0:

7.5-15.0; 进一步优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0-25.0: 10.0-15.0; 最佳为所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 25.0: 15.0。

5 在本发明药物组合物用于制备治疗前列腺癌的药物中的应用中, 所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-25.0: 7.5-15.0; 优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0-25.0: 10.0-15.0; 更进一步优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的  
10 摩尔比为 25.0: 15.0。

在本发明药物组合物用于制备治疗间皮瘤的药物中的应用中, 所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 12.5-20.0: 7.5-15.0; 优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-20.0: 10.0-15.0; 更进一步优  
15 选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0: 15.0。

在本发明药物组合物用于制备治疗头颈鳞状癌的药物中的应用中, 所述芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-30.0: 7.5-15.0; 优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草  
20 甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0-30.0: 10.0-15.0; 更进一步优选为芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 30.0: 15.0。

含有芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物在制备治疗肺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾  
25 癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌的药物中的应用中, 在将本发明组合物制成同时给药的药剂的方案中, 冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物可以含在同一种药物制剂如片剂或胶囊中, 也可以将冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物分别做成制剂, 如分别做成片剂或胶囊, 并采

用本领域常规的方式将它们包装或结合在一起，患者然后按照药品说明书的指示同时服用；在将本发明组合物制成先后给药的药剂的方案中，可以将冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物分别做成不同的制剂，并采用本领域常规的方式将它们包装或结合在一起，患者然后按照药品说明书指示的先后顺序进行服用，或将上述组合物中的两种成分制成一种控释的制剂，先释放组合物中的一种成分、然后再释放组合物中的另一种成分，患者只需要服用该控释组合物制剂；在将本发明组合物制备成交叉给药的药剂的方案中，可以将冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物分别做成不同的制剂，并采用本领域常规的方式将它们包装或结合在一起，患者然后按照药品说明书指示的交叉顺序服用，或者将该药物组合物制备成冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物交叉释放的控释制剂。

芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物在制备治疗肺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌的药物中的应用中，所述组合物中的冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物可以同时使用或以任何先后的顺序使用，如可以将冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物同时给患者服用；也可以先将冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物药物给患者服用、然后服用芹菜素及芹菜素类衍生物，或先服用芹菜素及芹菜素类衍生物、然后服用冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物药物，对于两者服用的时间间隔没有特别要求，但优选服用两种药物的时间间隔不超过一天；或者两种药物交替给药。

本发明中，可将本发明冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物采用本领域常规的方法制备成适于胃肠道给药或非胃肠道给药的药物制剂，本发明优选将冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物制成胃肠道给药的药物制剂，其制剂形式可以为常规片剂或胶囊、或控释、缓释制剂。在本发明冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物组合物的药物制剂中，根据

不同的制剂形式和制剂规格，所述组合物在制剂中的含量以质量计可以为1-99%，优选为10%-90%；制剂使用的辅料可采用本领域常规的辅料，以不和本发明组合物发生反应或不影响本发明药物的疗效为前提；所述制剂的制备方法可采用本领域常规的制备方法进行制备。

5 本发明中，组合物的制备方法没有什么限制，冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物和芹菜素及芹菜素类衍生物两者可以进行直接混合然后做成制剂，或分别和/或相应的辅料混合分别做成制剂，然后再按照本领域常规的方式包装在一起，或分别和相应的辅料混合然后再混合做成制剂。

10 本发明中的药物组合物的给药剂量根据给药对象、给药途径或药物的制剂形式不同可以进行适当的变化，但以保证该药物组合物在哺乳动物体内能够达到有效的血药浓度为前提。

15 本发明分别进行了芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物组合杀死 HCT-116(结肠癌细胞株)、HUH-7和 SK-Hep-1(肝癌细胞株)、LNCaP(前列腺癌细胞株)、H-28(间皮瘤细胞株)和 SCC-1(头颈鳞状癌细胞株)的试验，结果提示，本发明含芹菜素及芹菜素类衍生物和冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的药物组合物在治疗结肠癌、肝癌、前列腺癌、间皮瘤及头颈鳞状癌方面具有显著的协同效应，提高了药物的疗效，降低了用药剂量，减少了副作用的发生。

## 20 具体实施方式

下面结合具体的实施例对本发明作进一步的阐述，但本发明并不受限于此。

### **实施例**

试剂和方法：

25 细胞：HCT-116(结肠癌细胞株)、HUH-7 和 SK-Hep-1(肝癌细胞株)、LNCaP(前列腺癌细胞株)、H-28(间皮瘤细胞株)和 SCC-1(头颈鳞状癌细胞株)，均购自 American Type Culture Collection (ATCC)，美国马里兰州洛克威尔。

药品：以下实施例中所用药物组合物均按下列方法 1 或方法 2 所述



来制备；冬凌草甲素购自西安旭煌生物技术有限公司，芹菜素购自南京泽朗医药科技有限公司。

方法 1：准确称量相应的药物组合物的各组分，以二甲基亚砷分别溶解，各自配成 10mM 的贮存液，在-20℃下保存，使用时用新鲜的培养基  
5 稀释到合适的浓度，然后各自取 1 微升的各组分的溶液，混合在一起备用。所有的试验中，二甲基亚砷的最终浓度应 $\leq 5\text{g/L}$ ，以便不影响细胞的活性。

将所有的细胞于含 10% 小牛血清、100 kU/L 青霉素、100mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中，37℃、5% CO<sub>2</sub> 的湿度条件下培养，在加药的前一天，在六孔板上进行细胞接种  $2 \times 10^5$ /孔，然后向细胞中加入按上述  
10 方法制备的药物组合物溶液，使各组分达到其工作浓度，具体见表中第 1-9。

药物处理后，通过台盼蓝 (Trypan Blue) 测定细胞死亡，细胞通过在 37℃ 用胰蛋白酶钠 / EDTA 进行胰酶化作用 10 分钟。因为死亡的细胞  
15 从培养器上脱落进入培养基中，通过在 1200 转 / 分钟下离心收集所有的细胞，然后再用培养基重新悬浮沉淀物，与台盼蓝染料混合。染色之后，用光学显微镜和血细胞计数器进行计数。被染料染成蓝色的计为死亡细胞。随机选取 500 个细胞进行计数，死亡的细胞以占总计数细胞的百分比来表达。

方法 2：准确称量相应的药物组合物的各组分，以二甲基亚砷分别溶解，各自配成 10mM 的贮存液，在-20℃下保存。使用时用新鲜的培养基  
20 稀释到合适的浓度，然后各自取 1 微升的各组分的溶液备用。所有的试验中，二甲基亚砷的最终浓度应 $\leq 5\text{g/L}$ ，以便不影响细胞的活性。

将所有的细胞于含 10% 小牛血清、100 kU/L 青霉素、100mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中，37℃、5% CO<sub>2</sub> 的湿度条件下培养，在加药的前一天，在六孔板上进行细胞接种  $2 \times 10^5$ /孔，然后以任意次序向细胞中  
25 加入按上述方法制备的药物组合物的各组分溶液，使各组分达到其工作浓度，具体见表中第 10-18。

药物处理后，通过台盼蓝 (Trypan Blue) 测定细胞死亡，细胞通过

在 37℃用胰蛋白酶钠 / EDTA 进行胰酶化作用 10 分钟。因为死亡的细胞从培养器上脱落进入培养基中，通过在 1200 转 / 分钟下离心收集所有的细胞，然后再用培养基重新悬浮沉淀物，与台盼蓝染料混合。染色之后，用光学显微镜和血细胞计数器进行计数。被染料染成蓝色的计为死亡细  
5 胞。随机选取 500 个细胞进行计数，死亡的细胞以占总计数细胞的百分比来表达。

下列表 1 所示的药物组合中，第 1-9 的组合按方法 1 制备，第 10-18 的组合按方法 2 制备。

表 1

序号	芹菜素 (微摩尔)	冬凌草甲素 (微摩尔)
1	12.5	7.5
2	15.0	10.0
3	20.0	15.0
4	10.0	7.5
5	15.0	10.0
6	25.0	15.0
7	15.0	7.5
8	20.0	10.0
9	25.0	15.0
10	15.0	7.5
11	20.0	10.0
12	25.0	15.0
13	12.5	7.5
14	15.0	10.0
15	20.0	15.0
16	15.0	7.5
17	20.0	10.0
18	30.0	15.0

**实施例 1** 不同比例的芹菜素与冬凌草甲素的组合协同增效促进 HCT-116 细胞死亡试验, 见表 2。

表 2

组别		使用量 ( $\mu\text{M}$ )	细胞死亡率%
对照组			1.2
低剂量	芹菜素	12.5	4.8
	冬凌草甲素	7.5	2.6
	芹菜素+冬凌草甲素	12.5 + 7.5	8.9
中剂量	芹菜素	15.0	11.6
	冬凌草甲素	10.0	6.2
	芹菜素+冬凌草甲素	15.0 + 10.0	57.3
高剂量	芹菜素	20.0	22.5
	冬凌草甲素	15.0	13.7
	芹菜素+冬凌草甲素	20.0 + 15.0	99

在考察相关化合物导致结肠癌细胞株 HCT-116 细胞死亡的试验中,

- 5 发现当单独使用 20.0 $\mu\text{M}$  芹菜素时约有 23% 细胞死亡, 单独使用 15.0 $\mu\text{M}$  冬凌草甲素约有 14% 细胞死亡; 而当两者在较低浓度下合用时 (15.0 $\mu\text{M}$  芹菜素 + 10.0 $\mu\text{M}$  冬凌草甲素) 则产生明显的协同作用, 导致 57% 的癌细胞死亡; 当两者以 20.0 $\mu\text{M}$  芹菜素 + 15.0 $\mu\text{M}$  冬凌草甲素的比例合用时, 则产生更加显著的协同作用, 导致 99% 的癌细胞死亡。

- 10 **实施例 2** 不同比例的芹菜素与冬凌草甲素的组合协同增效促进 HUH-7 细胞死亡试验, 见表 3。

表 3

组别		使用量 ( $\mu\text{M}$ )	细胞死亡率%
对照组			1.5
低剂量	芹菜素	10.0	1.7
	冬凌草甲素	7.5	1.6
	芹菜素+冬凌草甲素	10.0 + 7.5	12.4
中剂量	芹菜素	15.0	1.3

11

高剂量	冬凌草甲素	10.0	4.3
	芹菜素+冬凌草甲素	15.0 + 10.0	61.3
	芹菜素	25.0	2.4
	冬凌草甲素	15.0	8.5
	芹菜素+冬凌草甲素	25.0 + 15.0	99

在考察相关化合物导致肝癌细胞株 HUH-7 细胞死亡的试验中，发现当单独使用 25.0μM 芹菜素时几乎无细胞死亡，单独使用 15.0μM 冬凌草甲素时，也只有不到 10 % 细胞死亡；而当两者在较低浓度下合用时（15.0μM 芹菜素 + 10.0μM 冬凌草甲素）则产生明显的协同作用，导致 5 61 % 的癌细胞死亡；当两者以 25.0μM 芹菜素 + 15.0μM 冬凌草甲素的比例合用时，则产生更加显著的协同作用，导致 99 % 的癌细胞死亡。

**实施例 3** 不同比例的芹菜素与冬凌草甲素的组合协同增效促进 SK-Hep-1 细胞死亡试验，见表 4。

表 4

组别		使用量 (μM)	细胞死亡率%
对照组			3.6
低剂量	芹菜素	15.0	3.3
	冬凌草甲素	7.5	5.3
	芹菜素+冬凌草甲素	15.0 + 7.5	10.3
中剂量	芹菜素	20.0	5.6
	冬凌草甲素	10.0	10.6
	芹菜素+冬凌草甲素	20.0 + 10.0	42.9
高剂量	芹菜素	25.0	8.9
	冬凌草甲素	15.0	16.7
	芹菜素+冬凌草甲素	25.0 + 15.0	80.7

10 在考察相关化合物导致肝癌细胞株 SK-Hep-1 细胞死亡的试验中，发现当单独使用 25.0μM 芹菜素或单独使用 15.0μM 冬凌草甲素时，约有 10-15 % 细胞死亡；而当两者在较低浓度下合用时（20.0μM 芹菜素 + 10.0μM 冬凌草甲素）则产生较明显的协同作用，导致 43 % 的癌细胞死亡；

当两者以 25.0μM 芹菜素 + 15.0μM 冬凌草甲素的比例合用时，则产生更加显著的协同作用，导致 81 % 的癌细胞死亡。

**实施例 4** 不同比例的芹菜素与冬凌草甲素的组合协同增效促进 LNCaP 细胞死亡试验，见表 5。

5

表 5

组别		使用量 (μM)	细胞死亡率%
对照组			1.3
低剂量	芹菜素	15.0	1.8
	冬凌草甲素	7.5	1.7
	芹菜素+冬凌草甲素	15.0 + 7.5	12.8
中剂量	芹菜素	20.0	4.2
	冬凌草甲素	10.0	1.2
	芹菜素+冬凌草甲素	20.0 + 10.0	43.7
高剂量	芹菜素	25.0	7.8
	冬凌草甲素	15.0	1.9
	芹菜素+冬凌草甲素	25.0 + 15.0	81.3

在考察相关化合物导致前列腺癌细胞株 LNCaP 细胞死亡的试验中，发现当单独使用 15.0μM 冬凌草甲素时几乎无细胞死亡，单独使用 25.0μM 芹菜素时，也只有不到 10 % 细胞死亡；而当两者在较低浓度下合用时（20.0μM 芹菜素 + 10.0μM 冬凌草甲素）则产生明显的协同作用，导致 44 % 的癌细胞死亡；当两者以 25.0μM 芹菜素 + 15.0μM 冬凌草甲素的比例合用时，则产生更加显著的协同作用，导致 81 % 的癌细胞死亡。

**实施例 5** 不同比例的芹菜素与冬凌草甲素的组合协同增效促进 H-28 细胞死亡试验，见表 6。

表 6

组别		使用量 (μM)	细胞死亡率%
对照组			2.4
低剂量	芹菜素	12.5	3.4
	冬凌草甲素	7.5	2.2

	芹菜素+冬凌草甲素	12.5 + 7.5	7.6
中剂量	芹菜素	15.0	9.6
	冬凌草甲素	10.0	3.6
	芹菜素+冬凌草甲素	15.0 + 10.0	45.6
高剂量	芹菜素	20.0	18.7
	冬凌草甲素	15.0	4.3
	芹菜素+冬凌草甲素	20.0 + 15.0	78.9

在考察相关化合物导致间皮瘤细胞株 H-28 细胞死亡的试验中，发现当单独使用 15.0μM 冬凌草甲素时几乎无细胞死亡，单独使用 20.0μM 芹菜素时约有 20% 细胞死亡；而当两者在较低浓度下合用时（15.0μM 芹菜素 + 10.0μM 冬凌草甲素）则产生明显的协同作用，导致 46% 的癌细胞死亡；当两者以 20.0μM 芹菜素 + 15.0μM 冬凌草甲素的比例合用时，则产生更加显著的协同作用，导致约 80% 的癌细胞死亡。

**实施例 6** 不同比例的芹菜素与冬凌草甲素的组合协同增效促进 SCC-1 细胞死亡试验，见表 7。

表 7

组别		使用量 (μM)	细胞死亡率%
对照组			1.9
低剂量	芹菜素	15.0	3.3
	冬凌草甲素	7.5	3.9
	芹菜素+冬凌草甲素	15.0 + 7.5	11.3
中剂量	芹菜素	20.0	10.6
	冬凌草甲素	10.0	7.3
	芹菜素+冬凌草甲素	20.0 + 10.0	67.6
高剂量	芹菜素	30.0	16.5
	冬凌草甲素	15.0	12.4
	芹菜素+冬凌草甲素	30.0 + 15.0	99

在考察相关化合物导致头颈鳞状癌细胞株 SCC-1 细胞死亡的试验中，发现当单独使用 30.0μM 芹菜素或单独使用 15.0μM 冬凌草甲素时，约有

14

15 % 细胞死亡；而当两者在较低浓度下合用时（20.0 $\mu$ M 芹菜素 + 10.0 $\mu$ M 冬凌草甲素）则产生明显的协同作用，导致 68 % 的癌细胞死亡；当两者以 30.0 $\mu$ M 芹菜素 + 15.0 $\mu$ M 冬凌草甲素的比例合用时，则产生更加显著的协同作用，导致 99 % 的癌细胞死亡。

5

尽管上述实施例已经对本发明的技术方案进行了详细地描述，但是本发明的技术方案并不限于以上实施例，在不脱离本发明的思想和宗旨的情况下，对本发明的技术方案所做的任何改动都将落入本发明的权利要求书所限定的范围。

10

15

20

25

## 权利要求书

1、一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有芹菜素及芹菜素  
5 类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物。

2、根据权利要求1所述的药物组合物，其特征在于，所述芹菜素及  
芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为  
5.0-60.0: 3.5-30.0，优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素  
及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 10.0-30.0: 7.5-15.0。

10 3、根据权利要求2所述的药物组合物，其特征在于，所述芹菜素及  
芹菜素类衍生物为芹菜素；所述冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物为冬  
凌草甲素。

4、权利要求1-3任一项所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的  
应用。

15 5、根据权利要求4所述的应用，其特征在于，所述癌症为肺癌、胰  
腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、脑瘤、肉瘤、间皮瘤、  
头颈鳞状癌、卵巢癌或乳腺癌。

6、根据权利要求5所述的应用，其特征在于，在制备治疗结肠癌的  
药物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草  
20 甲素类衍生物的摩尔比为 12.5-20.0: 7.5-15.0，优选所述芹菜素及芹菜  
素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-20.0:  
10.0-15.0。

7、根据权利要求5所述的应用，其特征在于，在制备治疗肝癌的药  
物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲  
25 素类衍生物的摩尔比为 10.0-25.0: 7.5-15.0。

8、根据权利要求7所述的应用，其特征在于，所述肝癌为 HUH-7 类  
型肝癌，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍  
生物的摩尔比为 15.0-25.0: 10.0-15.0。

9、根据权利要求7所述的应用，其特征在于，所述肝癌为 SK-Hep-1



类型肝癌，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-25.0: 7.5-15.0，优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0-25.0: 10.0-15.0。

5        10、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，在制备治疗前列腺癌的药物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-25.0: 7.5-15.0，优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0-25.0: 10.0-15.0。

10       11、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，在制备治疗间皮瘤的药物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 12.5-20.0: 7.5-15.0，优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-20.0: 10.0-15.0。

15       12、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，在制备治疗头颈鳞状癌的药物中的应用中，所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 15.0-30.0: 7.5-15.0，优选所述芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物的摩尔比为 20.0-30.0: 10.0-15.0。

20       13、根据权利要求 4-12 任一项所述的应用，其特征在于，所述药物组合物中的芹菜素及芹菜素类衍生物与冬凌草甲素及冬凌草甲素类衍生物同时使用或以任何先后的顺序使用。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/081920

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

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

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

WPI, EPODOC, CNPAT(CN), CNKI, CTCMPD(CN), CHEMICAL PHARMACEUTICAL ABSTRACT(CPA), CA, EMBASE: apegenin, apigenin, apigenine, apigenol, chamomile, LY 080400, LY080400, NSC 83244, NSC83244, Pelargidenon, UCCF 031, UCCF031, versulin, apogenin, pelargidenon, trihydrxoyflavone, flavone, oridonin, rubescensin A, kaurene, lung, pancreatic, colon, liver, prostate, renal, gastric, brain, mesothelial, squamous, cell, ovarian, breast, cancer, tumor, tumour, carcinoma, neoplasm, sarcoma, mesothelioma, etc

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03075943 A2 (CHEN, Sophie) 18 September 2003 (18.09.2003) claims 1, 4, 17, 18, 21 and 22, description, page 6, lines 13, 14, page 12, lines 3 to 4	1-13
Y	CN 101495108 A (ACTIVE BOTANICALS LIMITED) 29 July 2009 (29.07.2009) claims 1, 2 and 9, description, page 9, line 2 to page 11, line 10	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&”document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 05 June 2013 (05.06.2013)	Date of mailing of the international search report 04 July 2013 (04.07.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer  ZHOU, Wen  Telephone No. (86-10) 62411204

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/081920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1895244 A (JIANG, Binghua et al.) 17 January 2007 (17.01.2007) claim 1, description, page 1, paragraph [0002], page 2, paragraphs [0001] to [0003]	1-13
E	CN 102688228 A (DINGHONG INT INVESTMENT HONGKONG CO LTD) 26 September 2012 (26.09.2012) claims 1 to 13	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2012/081920

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 03075943 A2	18.09.2003	EP 1487434 B1	09.05.2007
		DE 60313754 D1	21.06.2007
		US 2005032882 A1	10.02.2005
		EP 1808172 A3	26.05.2010
		AU 2003217982 A8	27.10.2005
		CN 1984648 A	20.06.2007
		EP 1487434 A2	22.12.2004
		DE 60313754 T2	24.01.2008
		AU 2003217982 A1	22.09.2003
		EP 1808172 A2	18.07.2007
CN 101495108 A	29.07.2009	NO 20085147 A	09.02.2009
		WO 2007132190 A1	22.11.2007
		RU 2008148833 A	20.06.2010
		RU 2455002 C2	10.07.2012
		KR 20090037395 A	15.04.2009
		JP 2009536635 A	15.10.2009
		MX 2008014395 A	30.04.2009
		SG 171583 A1	29.06.2011
		EP 2026780 A1	25.02.2009
		US 2010016420 A1	21.01.2010
		CA 2651795 A1	22.11.2007
		IN 200810231 P1	20.03.2009
		BRPI 07127882 A2	11.09.2012
		AU 2007251374 A1	22.11.2007
		ZA 200810523 A	24.02.2010
CN 1895244 A	17.01.2007	None	
CN 102688228 A	26.09.2012	None	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2012/081920

Continuation of:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (According to International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC)

A61K 31/352 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

# 国际检索报告

国际申请号  
**PCT/CN2012/081920**

## A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNPAT (CN), 中国期刊网(CNKI), 中国药物专利数据库, 中国药学文摘, CA, EMBASE:

芹菜甙元, 芹黄素, 芹菜素, 芹菜配基, 芹菜苷配基, 洋芹素, 芹菜苷原, 芹菜苷元, 芹菜甙原, 三羟基黄酮, 黄酮, 冬凌草甲素, 延命草宁, 冬凌草素甲, 贝壳杉烯, 肺癌, 胰腺癌, 结肠癌, 肝癌, 前列腺癌, 肾癌, 胃癌, 脑瘤, 肉瘤, 间皮瘤, 头颈鳞状癌, 头颈鳞状细胞癌, 卵巢癌, 乳腺癌等

Apegenin, apigenin, apigenine, apigenol, chamomile, LY 080400, LY080400, NSC 83244, NSC83244, Pelargidenon, UCCF 031, UCCF031, versulin, apogenin, pelargidenon, trihydrxoyflavone, flavone, oridonin, rubescensin A, kaurene, lung, pancreatic, colon, liver, prostate, renal, gastric, brain, mesothelial, squamous, cell, ovarian, breast, cancer, tumor, tumour, carcinoma, neoplasm, sarcoma, mesothelioma, etc

## C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 03075943 A2 (CHEN Sophie) 18.9 月 2003 (18.09.2003) 权利要求 1、4、17、18、21、22, 说明书第 6 页第 13-14 行、第 12 页第 3-4 行	1-13
Y	CN 101495108 A (活性植物科技有限公司) 29.7 月 2009 (29.07.2009) 权利要求 1、2、9, 说明书第 9 页第 2 行-第 11 页第 10 行	1-13

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期  
05.6 月 2013 (05.06.2013)

国际检索报告邮寄日期  
**04.7 月 2013 (04.07.2013)**

ISA/CN 的名称和邮寄地址:  
中华人民共和国国家知识产权局  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088  
传真号: (86-10)62019451

授权官员  
  
周文  
电话号码: (86-10) **62411204**

国际检索报告

国际申请号

**PCT/CN2012/081920**

**C(续). 相关文件**

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 1895244 A (姜秉华等) 17.1 月 2007 (17.01.2007) 权利要求 1, 说明书第 1 页第 2 段, 第 2 页第 1-3 段	1-13
E	CN 102688228 A (鼎泓国际投资(香港)有限公司) 26.9 月 2012 (26.09.2012) 权利要求 1-13	1-13

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2012/081920**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 03075943 A2	18.09.2003	EP 1487434 B1	09.05.2007
		DE 60313754 D1	21.06.2007
		US 2005032882 A1	10.02.2005
		EP 1808172 A3	26.05.2010
		AU 2003217982 A8	27.10.2005
		CN 1984648 A	20.06.2007
		EP 1487434 A2	22.12.2004
		DE 60313754 T2	24.01.2008
		AU 2003217982 A1	22.09.2003
		EP 1808172 A2	18.07.2007
CN 101495108 A	29.07.2009	NO 20085147 A	09.02.2009
		WO 2007132190 A1	22.11.2007
		RU 2008148833 A	20.06.2010
		RU 2455002 C2	10.07.2012
		KR 20090037395 A	15.04.2009
		JP 2009536635 A	15.10.2009
		MX 2008014395 A	30.04.2009
		SG 171583 A1	29.06.2011
		EP 2026780 A1	25.02.2009
		US 2010016420 A1	21.01.2010
		CA 2651795 A1	22.11.2007
		IN 200810231 P1	20.03.2009
		BRPI 07127882 A2	11.09.2012
		AU 2007251374 A1	22.11.2007
		ZA 200810523 A	24.02.2010
CN 1895244 A	17.01.2007	无	
CN 102688228 A	26.09.2012	无	



续:

A. 主题的分类 (按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类)

A61K 31/352 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i