



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106860870 B

(45)授权公告日 2020.03.31

(21)申请号 201710123189.7

(22)申请日 2011.11.11

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106860870 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(30)优先权数据  
10382300.1 2010.11.12 EP

(62)分案原申请数据  
201180063925.5 2011.11.11

(73)专利权人 法马马有限公司  
地址 西班牙马德里

(72)发明人 维多利亚·莫内奥·奥卡尼亚  
赫马·圣玛丽亚·努涅斯  
路易斯·弗朗西斯科·加西亚·费尔南德斯  
卡洛斯·玛丽亚·加尔马里尼  
玛丽亚·何塞·纪廉·纳瓦罗  
巴勃罗·曼努埃尔·阿维莱斯·马林

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 11467

代理人 金星

(51)Int.Cl.  
A61K 45/06(2006.01)  
A61K 31/4995(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)  
A61K 31/513(2006.01)  
A61K 31/519(2006.01)  
A61K 31/69(2006.01)  
A61K 38/15(2006.01)

(56)对比文件  
US 2005/0049031 A1,2005.03.03,说明书第1,3-4页.  
CN 1564822 A,2005.01.12,说明书第1页第1段,第27页化合物27,第10页第7段,第11页第2段.  
W.A.Messersmith,et al.Phase I trial of weekly trabectedin (ET-743) and gemcitabine.《Cancer Chemother Pharmacol》.2008,第63卷第181-188页.

审查员 康鹏程

权利要求书1页 说明书52页 附图110页

(54)发明名称

抗肿瘤生物碱的联合治疗

(57)摘要

本发明涉及PM01183与几种抗癌药物的组合,特别是选自抗肿瘤铂配合物、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、抗癌抗生素、拓扑异构酶I和/或II抑制剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、氮芥类烷化剂、亚硝脲烷化剂、非典型烷化剂、雌激素拮抗剂、雄激素拮抗剂、mTOR抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、及选自aplidine、ET-743、PM02734和PM00104的其他药物的其他抗癌药物、及这些组合在癌症治疗中的应用。

1. PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物在制备通过联合治疗治疗癌症的药剂中的用途,所述联合治疗利用PM01183或药学上可接受的盐与另一抗癌药物协同组合,其中PM01183或药学上可接受的盐与另一抗癌药物形成相同药剂的部分,或其中PM01183或药学上可接受的盐与另一抗癌药物提供为同时或不同时间施用的不同药剂,其中所述另一抗癌药物选自有丝分裂抑制剂或拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂,其中:

有丝分裂抑制剂选自紫杉醇和多烯紫杉醇,以及治疗的癌症选自肺癌、肉瘤、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌;

拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂选自托泊替康、依立替康、和依托泊甙,以及治疗的癌症选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中PM01183或药学上可接受的盐与另一抗癌药物形成相同药剂的部分,其中所述另一抗癌药物选自有丝分裂抑制剂或拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物提供为同时或不同时间施用的不同药剂,其中所述另一抗癌药物选自有丝分裂抑制剂或拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物提供为不同时间施用的不同药剂,其中所述另一抗癌药物选自有丝分裂抑制剂或拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的用途,其中与PM01183或其药学上可接受的盐联合的抗癌药物是选自紫杉醇和多烯紫杉醇。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中有丝分裂抑制剂是紫杉醇。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中治疗的癌症选自肺癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌和乳腺癌。

8. 根据权利要求1至4任一项所述的用途,其中与PM01183或其药学上可接受的盐联合的抗癌药物是选自托泊替康、依立替康和依托泊甙的拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂是依立替康。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中治疗的癌症选自肺癌、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌。

11. 一种用于通过利用PM01183或药学上可接受的盐与另一抗癌药物协同组合联合治疗治疗癌症的试剂盒,其中所述试剂盒包含PM01183或其药学上可接受的盐的剂型和/或另一抗癌药物的剂型,所述另一抗癌药物选自有丝分裂抑制剂或拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂,其中:

有丝分裂抑制剂选自紫杉醇和多烯紫杉醇,以及治疗的癌症选自肺癌、肉瘤、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌;

拓扑异构酶 I 和/或 II 抑制剂选自托泊替康、依立替康和依托泊甙,以及治疗的癌症选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌。

## 抗肿瘤生物碱的联合治疗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及PM01183与其他抗癌药物的联合,特别是选自抗肿瘤铂配合物、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、抗癌抗生素、拓扑异构酶I和/或II抑制剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、氮芥类烷化剂、亚硝脲烷化剂、非典型烷化剂、雌激素拮抗剂、雄激素拮抗剂、mTOR抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂,以及选自aplidine、ET-743、PM02734和PM00104的其它药物的其他抗癌药物,及这些组合在癌症治疗中的应用。

### 背景技术

[0002] 当身体的一部分细胞开始失控生长时发生癌症。尽管存在很多种癌症,但它们均是由异常细胞的失控生长引起的。癌细胞可以侵入附近组织,并通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部分。存在几种主要类型的癌症。癌是一种恶性肿瘤,其是失控且渐进的异常生长,由上皮细胞产生。上皮细胞覆盖身体的内表皮和外表皮,包括器官、血管内膜和其它小腔。肉瘤是由骨骼、软骨、脂肪、肌肉、血管或其他结缔组织或支持组织的细胞产生的癌症。白血病是由诸如骨髓的造血组织产生的癌症,且产生大量异常血细胞并进入血液。淋巴瘤和多发性骨髓瘤是由免疫系统的细胞产生的癌症。

[0003] 另外,癌症是侵入性的并趋向于渗透到周围组织并产生转移。癌症可直接扩散到周围组织中,也可通过淋巴和循环系统扩散到身体的其他部分。

[0004] 有很多治疗癌症的方法,包括局部疾病的手术和放疗,及化疗。然而,很多类型的癌症的现有治疗方法的疗效是有限的,且需要具有临床效果的新型改良的治疗方式。这对于患晚期疾病和/或转移性疾病的患者及渐进性疾病复发的患者是特别准确的,其中疾病复发的患者是在用之前的既定疗法治疗后,由于获得抗性及相关毒性引起的疗法施用中的限制,所述既定疗法变得无效或无法忍受。

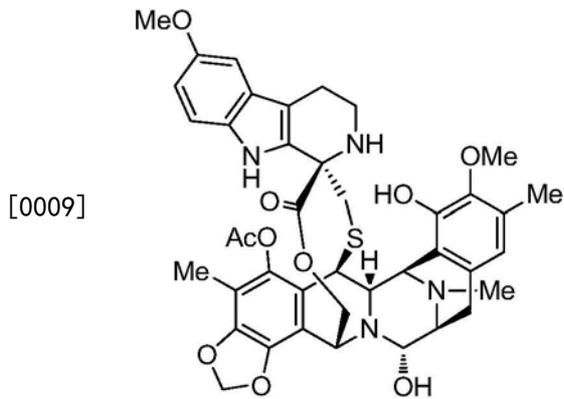
[0005] 自20世纪50年代以来,癌症化疗管理已取得重大进展。不幸的是,超过50%的癌症患者不响应初始治疗或在经过对治疗的初始响应后出现复发,并最终死于渐进性转移性疾病。因此,不断致力于设计和发现新的抗癌药物是极其重要的。

[0006] 经典形式的化疗,主要集中于通过靶向一般的细胞代谢过程,包括DNA、RNA和蛋白质的生物合成,杀死快速增殖的癌细胞。基于化疗药物如何影响癌细胞内的特定化学物质,药物干扰癌细胞的细胞活动或过程,以及药物影响癌细胞的细胞周期的特定阶段,将化疗药物分为几组。最常用的化疗药物类型包括:DNA-烷化药物(例如环磷酰胺、异环磷酰胺、顺铂、卡铂、氮烯唑胺),抗代谢物(5-氟尿嘧啶、卡培他滨、6-巯基嘌呤、氨甲喋呤、吉西他滨、阿糖胞苷、氟达拉滨),有丝分裂抑制剂(例如紫杉醇、多烯紫杉醇、长春花碱、长春新碱),抗癌抗生素(例如柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌),拓扑异构酶I和/或II抑制剂(例如托泊替康、依立替康、依托泊甙、替尼泊苷)和激素疗法(例如它莫西芬、氟他米特)。

[0007] 理想的抗癌药物可以选择性地杀死癌细胞,其对于非癌细胞的毒性具有宽指数,且即使较长时间暴露于药物其还可维持对抗癌细胞的功效。不幸的是,这些药物的现有化

疗不具有理想的分布。多数具有很窄的治疗指数，另外，暴露于低亚致死浓度的化学治疗剂的癌细胞可能会产生对这种药剂的耐药性，且可经常产生对其他抗肿瘤剂的交叉耐药性。

[0008] PM01183,也被称为tryptamicidin,是一种合成生物碱,其目前用于治疗癌症的临床试验,且其具有以下化学结构:



[0010] PM01183已经显示了对固体和非固体肿瘤细胞系的高度有效的体外活性,及在小鼠中几种异种移植的人肿瘤细胞系的重要的体内活性,所述人肿瘤诸如乳腺癌、肾脏癌和卵巢癌。PM01183通过DNA小沟中鸟嘌呤的共价修饰发挥其抗癌作用,最终使癌细胞中DNA双链断裂,S期阻滞及细胞凋亡。关于这种化合物的更多信息可参见WO 03/01427;100<sup>th</sup>AACR Annual Meeting, April 18-22, 2009, Denver, CO, Abstract Nr.2679and Abstract Nr.4525;和Leal JFM等Br. J. Pharmacol. 2010, 161, 1099-1110。

[0011] 由于癌症是动物和人类死亡的主要原因,已进行多次努力且仍在进行努力以获得施用于患有癌症患者的有效并安全的治疗。本发明将解决的问题是提供对治疗癌症有用的抗癌治疗方法。

## 发明内容

[0012] 本发明确立了PM01183增强其他抗癌药物的抗肿瘤活性,特别是选自抗肿瘤铂配合物、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、抗癌抗生素、拓扑异构酶I和/或II抑制剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、氮芥类烷化剂、亚硝脲烷化剂、非典型烷化剂、雌激素拮抗剂、雄激素拮抗剂、mTOR抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂,和选自aplidine、ET-743、PM02734和PM00104的其他试剂的其他抗癌药物。因此PM01183和所述其他抗癌药物可成功地用于治疗癌症的联合疗法。

[0013] 因此,本发明涉及使用这些联合疗法治疗癌症的药物组合物、试剂盒和方法,及两种药物在治疗癌症和制备用于联合疗法的药剂中的用途。

[0014] 根据本发明的一方面,我们提供了基于PM01183或其药学上可接受的盐治疗癌症的有效的联合疗法,并使用如上所述的其他抗癌药物。

[0015] 在另一个实施方式中,本发明涉及PM01183或其药学上可接受的盐在癌症治疗中的用途,包括治疗有效量的PM01183或其药学上可接受的盐与治疗有效量的另一抗癌药物的联合施用。

[0016] 在另一个实施方式中,本发明涵盖了治疗癌症的方法,其包含向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的PM01183或其药学上可接受的盐,及治疗有效量的另一抗癌药物。

[0017] 在另一方面,本发明涵盖了在癌症治疗中增加或增强抗癌药物疗效的方法,其包含向需要的患者施用治疗有效量的PM01183或其药学上可接受的盐,与其他抗癌药物的组合。

[0018] 在另一个实施方式中,本发明涵盖了使用PM01183或其药学上可接受的盐在制备治疗癌症的药剂中的用途,所述癌症通过使用PM01183或其药学上可接受的盐及另一抗癌药物的联合疗法治疗。

[0019] 在还一方面,本发明涵盖了用于治疗癌症的联合疗法的药物组合物,其包含PM01183或其药学上可接受的盐,和/或另一抗癌药物和其药学上可接受的载体。

[0020] 本发明还涵盖了用于治疗癌症的试剂盒,其包含PM01183或其药学上可接受的盐的剂型,和/或另一抗癌药物的剂型,及联合使用两种药物的说明书。

[0021] 在一个优选的方面,本发明涉及PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物的协同联合。

[0022] 附图简述

[0023] 图1-20.PM01183分别与奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、紫杉醇、多烯紫杉醇、长春新碱、柔红霉素、丝裂霉素C、放线菌素D、托泊替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、环磷酰胺、卡氯芥、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、ET-743和PM00104联合对抗A549细胞的体外活性数据。

[0024] 图21-41.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、阿糖胞苷、吉西他滨、多烯紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、丝裂霉素C、放线菌素D、托泊替康、依托泊甙、伏立诺他、环磷酰胺、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗A673细胞的体外活性数据。

[0025] 图42-56.PM01183分别与顺铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、氨甲喋呤、柔红霉素、阿霉素、丝裂霉素C、托泊替康、依立替康、依托泊甙、氮烯唑胺、替西罗莫司、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗SK-MEL-2细胞的体外活性数据。

[0026] 图57-80.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、紫杉醇、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、丝裂霉素C、放线菌素D、托泊替康、依立替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、氟他米特、替西罗莫司、厄洛替尼、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗PC-3细胞的体外活性数据。

[0027] 图81-98.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、柔红霉素、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、替西罗莫司、厄洛替尼、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗PANC-1细胞的体外活性数据。

[0028] 图99-123.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、环磷酰胺、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗HGC-27细胞的体外活性数据。

[0029] 图124-150.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、放线菌素D、丝裂霉素C、托泊替康、依立替康、依托泊甙、伏立诺他、环磷酰胺、卡氯芥、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗IGROV-1细胞的体外活性数据。

[0030] 图151-170.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、托泊替康、依立替康、依托泊甙、硼替佐米、环磷酰胺、厄洛替尼、ET-743和PM00104联合对抗HEP-G2细胞的体外活性数据。

[0031] 图171-197.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、放线菌素D、丝裂霉素C、托泊替康、依立替康、依托泊甙、伏立诺他、环磷酰胺、卡氯芥、氮烯唑胺、它莫西芬、替西罗莫司、厄洛替尼、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗MDA-MB-231细胞的体外活性数据。

[0032] 图198-219.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、多烯紫杉醇、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、放线菌素D、丝裂霉素C、托泊替康、依立替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、环磷酰胺、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine和PM02734联合对抗HT-29细胞的体外活性数据。

[0033] 图220-242.PM01183分别与顺铂、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿霉素、放线菌素D、丝裂霉素C、托泊替康、依立替康、依托泊甙、伏立诺他、环磷酰胺、氮烯唑胺、厄洛替尼、aplidine、ET-743、PM02734和PM00104联合对抗RXF-393细胞的体外活性数据。

[0034] 图243-262.PM01183分别与顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、长春新碱、柔红霉素、阿霉素、托泊替康、依立替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine、ET-743和PM02734联合对抗U87-MG细胞的体外活性数据。

[0035] 图263.使用安慰剂、PM01183、紫杉醇及PM01183联合紫杉醇治疗的小鼠中A2780肿瘤的肿瘤体积评估。

[0036] 图264.使用安慰剂、PM01183、长春瑞滨及PM01183联合长春瑞滨治疗的小鼠中A2780肿瘤的肿瘤体积评估。

[0037] 图265.使用安慰剂、PM01183、阿霉素及PM01183联合阿霉素治疗的小鼠中A2780肿瘤的肿瘤体积评估。

[0038] 图266.使用安慰剂、PM01183、顺铂及PM01183联合顺铂治疗的小鼠中HGC-27肿瘤的肿瘤体积评估。

[0039] 图267.使用安慰剂、PM01183、5-氟尿嘧啶及PM01183联合5-氟尿嘧啶治疗的小鼠中HGC-27肿瘤的肿瘤体积评估。

[0040] 图268.使用安慰剂、PM01183、吉西他滨及PM01183联合吉西他滨治疗的小鼠中SW1990肿瘤的肿瘤体积评估。

[0041] 图269.使用安慰剂、PM01183、替莫唑胺及PM01183联合替莫唑胺治疗的小鼠中U87-MG肿瘤的肿瘤体积评估。

[0042] 图270.使用安慰剂、PM01183、依立替康及PM01183联合依立替康治疗的小鼠中H460肿瘤的肿瘤体积评估。

[0043] 图271.使用安慰剂、PM01183、氮烯唑胺及PM01183联合氮烯唑胺治疗的小鼠中HT1080肿瘤的肿瘤体积评估。

[0044] 图272.使用安慰剂、PM01183、依立替康及PM01183联合依立替康治疗的小鼠中HT-

29肿瘤的肿瘤体积评估。

[0045] 图273.PM01183与氨甲喋呤在JURKAT细胞系中的联合治疗效果。

[0046] 图274.PM01183与氨甲喋呤在MOLT-4细胞系中的联合治疗效果。

[0047] 图275.PM01183与柔红霉素在JURKAT细胞系中的联合治疗效果。

[0048] 图276.PM01183与aplidine在JURKAT细胞系中的联合治疗效果。

[0049] 图277.PM01183与aplidine在MOLT-4细胞系中的联合治疗效果。

[0050] 图278.PM01183与ET-743在JURKAT细胞系中的联合治疗效果。

[0051] 图279.PM01183与ET-743在MOLT-4细胞系中的联合治疗效果。

[0052] 图280.PM01183与PM00104在JURKAT细胞系中的联合治疗效果。

[0053] 图281.PM01183与PM00104在MOLT-4细胞系中的联合治疗效果。

[0054] 图282.PM01183与PM02734在JURKAT细胞系中的联合治疗效果。

[0055] 图283.PM01183与PM02734在MOLT-4细胞系中的联合治疗效果。

[0056] 图284.PM01183与阿糖胞苷在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0057] 图285.PM01183与氨甲喋呤在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0058] 图286.PM01183与氨甲喋呤在U-937细胞系中的联合治疗效果。

[0059] 图287.PM01183与吉西他滨在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0060] 图288.PM01183与吉西他滨在U-937细胞系中的联合治疗效果。

[0061] 图289.PM01183与柔红霉素在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0062] 图290.PM01183与柔红霉素在U-937细胞系中的联合治疗效果。

[0063] 图291.PM01183与ET-743在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0064] 图292.PM01183与ET-743在U-937细胞系中的联合治疗效果。

[0065] 图293.PM01183与PM00104在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0066] 图294.PM01183与PM00104在U-937细胞系中的联合治疗效果。

[0067] 图295.PM01183与PM02734在RAMOS细胞系中的联合治疗效果。

[0068] 图296.PM01183与PM02734在U-937细胞系中的联合治疗效果。

[0069] 发明详述

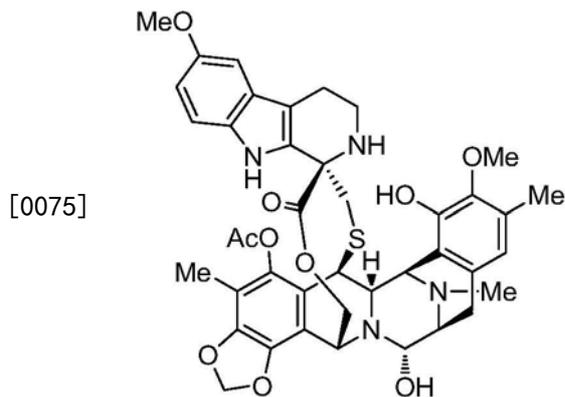
[0070] 我们惊奇的发现当其他抗癌药物与PM01183联合时,PM01183极大地提高了这些抗癌药物的抗癌活性。因此,本发明的目的在于提供一种基于PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物联合的有效的癌症治疗方法。

[0071] 在本申请中,“癌症”是指包括肿瘤、瘤形成及任何其他由恶性组织或细胞引起的恶性疾病。

[0072] 本文中使用的术语“治疗(treating)”,除非另有说明,否则是指逆转、缓解或抑制这个术语适用的疾病或疾病状况的发展,或这种疾病或疾病状况的一种或多种症状。本文中使用的术语“治疗(treatment)”,除非另有说明,否则是指如上定义的“治疗(treating)”的行为。

[0073] 整个说明书中使用的术语“联合”是指包含向患有癌症的患者以相同或不同的药物制剂,并在同一时间或不同时间施用所提到的治疗药物。如果治疗药物不同时施用,其应在足够接近的时间内施用以提供增效或协同响应。

[0074] 如上所述,PM01183是一种合成生物碱,其结构如下:



[0076] 术语“PM01183”旨在涵盖任何药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前体药物或任何其他化合物，其施用于患者后能够直接或间接地提供所述的化合物。通过本领域已知的方法进行盐、溶剂化物、水合物和前体药物的制备。

[0077] 药学上可接受的盐可通过常规的化学方法由母体化合物合成，所述母体化合物包含碱性或酸性基团。通常，例如，这些盐由这些化合物的游离酸或碱形式与水中或有机溶剂中或两者混合物中化学计量的合适的碱或酸反应制备。通常，优选非水介质，如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。酸加成盐的实例包括无机酸加成盐，例如，盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐，及有机酸加成盐，例如，乙酸盐、三氟乙酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐。碱加成盐的实例包括无机盐，例如，钠盐、钾盐、钙盐和铵盐，及有机碱盐，例如，乙二胺、乙醇胺、N,N-二烯基乙醇胺、三乙醇胺和碱性氨基酸的盐。

[0078] PM01183前体药物的任何化合物均落在本发明范围和主旨内。术语“前体药物”广义使用且涵盖体内转化为PM01183的那些衍生物。前体药物可以水解、氧化或以其他方式在生物条件下反应以提供PM01183。前体药物的实例包括，但不限于，PM01183的衍生物和代谢物，其包括可生物水解的基团，例如可生物水解的酰胺，可生物水解的酯，可生物水解的氨基甲酸盐，可生物水解的碳酸盐，可生物水解的脲，和可生物水解的磷酸盐类似物。通常使用已知的方法制备前体药物，所述方法例如Burger在“*Medicinal Chemistry and Drug Discovery*” 6th ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) 及“*Design and Applications of Prodrugs*” (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers) 中所述的。

[0079] 另外，本文中提到的任何药物可以非晶体形态或晶体形态作为游离化合物或作为溶剂化物(如水合物)，且这两种形态均在本发明范围内。溶剂化的方法通常是本领域内已知的。

[0080] 此外，根据本发明使用的PM01183可通过以下合成方法制备，例如W0 03/014127中所公开的方法，其通过引用纳入本文。

[0081] PM01183或其药学上可接受的盐的药物组合物可与合适的赋形剂用于静脉给药，所述药物组合物包括溶液、悬浮剂、乳化剂、冻干组合物等。优选地，PM01183可被提供并储存为无菌冻干产物，其包含PM01183和适合治疗用途的制剂中的赋形剂。对于PM01183或其药学上可接受的盐的药物组合物的进一步指导，参见例如W0 2006/046079中所描述的制剂，其通过引用纳入本文。

[0082] 优选地通过静脉注射施用PM01183，或其药学上可接受的盐，或包含所述化合物的

药物组合物。可使用长达72小时的输液时间,更优选为1至24小时之间,最优选的是约1小时或约3小时。尤其可取的是短输液时间,其允许不在医院过夜的情况下进行治疗。然而,如果需要,可以输液24小时左右或更长时间。

[0083] 优选地周期性地完成PM01183的施用。在一优选的给药方案中,在每个周期的第一周给患者静脉输注PM01183,且在周期的其余时间让患者恢复。每个周期的优选持续时间为3周或4周。根据需要可进行多个周期。尽管可根据变化设计其他方案,但施用PM01183或其药学上可接受的盐的最优给药方案是每3周静脉输注一次,约1小时。

[0084] 在本发明中,特别优选的是在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物的联合,另一抗癌药物选自抗肿瘤铂配合物、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、抗癌抗生素、拓扑异构酶I和/或II抑制剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、氮芥类烷化剂、亚硝脲烷化剂、非典型烷化剂、雌激素拮抗剂、雄激素拮抗剂、mTOR抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂及选自aplidine、ET-743、PM02734和PM00104的其他药物。

[0085] 特别优选的癌症类型选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞瘤(也被称为肝癌)、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、食道癌、成神经细胞瘤、脑癌、宫颈癌、肛门癌、睾丸癌、白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。

[0086] 在优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与抗肿瘤铂配合物的联合,更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌和淋巴瘤的癌症。这种化学治疗剂组包括,但不限于,顺铂、奥沙利铂、卡铂、三铂四硝酸酯(BBR3464)、沙铂、四铂、ormiplatin、异丙铂、奈达铂和洛铂。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与顺铂、奥沙利铂、卡铂、三铂四硝酸酯、沙铂、四铂、ormiplatin、异丙铂、奈达铂和洛铂的联合,且更优选的是在癌症治疗中与顺铂和奥沙利铂的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌的癌症。

[0087] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与抗代谢物的联合,更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、食道癌、脑癌、肛门癌、白血病和淋巴瘤的癌症。这种化学治疗剂组包括,但不限于,5-氟尿嘧啶、吉西他滨、阿糖胞苷、卡培他滨、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、氨喋呤、氨甲喋呤、培美曲塞、雷替曲塞、克拉屈滨、氯法拉滨、巯基嘌呤、喷司他丁和硫鸟嘌呤。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与5-氟尿嘧啶、吉西他滨、阿糖胞苷、卡培他滨、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、氨喋呤、氨甲喋呤、培美曲塞、雷替曲塞、克拉屈滨、氯法拉滨、巯基嘌呤、喷司他丁和硫鸟嘌呤的联合,且更优选的是在癌症治疗中与5-氟尿嘧啶、吉西他滨、阿糖胞苷和氨甲喋呤的联合,且更特别的治疗选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌、白血病和淋巴瘤的癌症。

[0088] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与有丝分裂抑制剂的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌、白血病和淋巴瘤的癌症。这种化学治疗剂组包括,但不限于紫杉醇、多烯紫杉醇、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。特别优选的是

PM01183或其药学上可接受的盐与紫杉醇、多烯紫杉醇、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨的联合,且更优选的是在癌症治疗中与紫杉醇、多烯紫杉醇、长春新碱和长春瑞滨的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌的癌症。

[0089] 在另一优选的实施方式中,本发明的涉及癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与抗癌抗生素的联合,且更特别的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、成神经细胞瘤、脑癌、肛门癌、睾丸癌、白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于,柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、匹杉琼、戊柔比星、丝裂霉素C、争光霉素、放线菌素A和光神霉素。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、匹杉琼、戊柔比星、丝裂霉素C、争光霉素、放线菌素D和光神霉素的联合,且更优选的是癌症治疗中与柔红霉素、阿霉素、丝裂霉素C和放线菌素D的联合,更特别的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌、白血病和淋巴瘤。

[0090] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与拓扑异构酶I和/或II抑制剂的联合,更特别的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、成神经细胞瘤、脑癌、宫颈癌、睾丸癌、白血病和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于托泊替康、SN-38、依立替康、喜树碱、鲁比替康、依托泊甙、安吡啶和替尼泊昔。特别优选PM00104或其药学上可接受的盐与托泊替康、SN-38、依立替康、喜树碱、鲁比替康、依托泊甙、安吡啶和替尼泊昔的联合,且更优选的是癌症治疗中与托泊替康、依立替康和依托泊甙的联合,且更特别的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌。

[0091] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与蛋白酶体抑制剂的联合,且更特别的是治疗肺癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、结肠直肠癌、脑癌、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于硼替佐米、双硫仑、表没食子儿茶素没食子酸酯和环丁内酯(salinosporamide) A。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与硼替佐米、双硫仑、表没食子儿茶素没食子酸酯和环丁内酯A的联合,且更优选的是癌症治疗中与硼替佐米的联合,更特别的是治疗肺癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、结肠直肠癌和脑癌。

[0092] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与组蛋白去乙酰化酶抑制剂的联合,且更特别的是治疗肺癌、肉瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于罗米地辛、帕比司他、伏立诺他、mocetinostat、belinostat、恩替诺特、resminostat、PCI-24781、AR-42、CUDC-101和丙戊酸。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与罗米地辛、帕比司他、伏立诺他、mocetinostat、belinostat、恩替诺特、resminostat、PCI-24781、AR-42、CUDC-101和丙戊酸的联合,且更优选的是癌症治疗中与伏立诺他的联合,更特别的是治疗肺癌、肉瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌。

[0093] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受

的盐与氮芥类烷化剂的联合,更特别的是治疗肺癌、肉瘤、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于,美法仑、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、氮芥、尿嘧啶氮芥、雌氮芥和苯达莫司汀。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与美法仑、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、氮芥、尿嘧啶氮芥、雌氮芥和苯达莫司汀的联合,且更优选的是癌症治疗中与环磷酰胺的联合,更特别的是治疗肺癌、肉瘤、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌和肾癌。

[0094] 在另一优选的实施方式中,本发明的涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与亚硝脲类烷化剂的联合,且更特别的是治疗肺癌、卵巢癌、乳腺癌、脑癌、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于,环己亚硝脲、甲基环己亚硝脲、卡氯芥、福莫司丁和链脲霉素。特别优选PM01183或其药学上可接受的盐与环己亚硝脲、甲基环己亚硝脲、卡氯芥、福莫司丁和链脲霉素的联合,且更优选的是癌症治疗中与卡氯芥的治疗,更特别的是治疗肺癌、卵巢癌和乳腺癌。

[0095] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与非典型烷化剂的联合,且更特别的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌、白血病和淋巴瘤。这种化学治疗剂组包括,但不限于甲基苄胍、氮烯唑胺、替莫唑胺和六甲蜜胺。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与甲基苄胍、氮烯唑胺、替莫唑胺和六甲蜜胺的联合,且更优选的是在治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌中与氮烯唑胺和替莫唑胺的联合。

[0096] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与雌激素拮抗剂的联合,且更特别的是治疗乳腺癌。这种化学治疗剂组包括,但不限于托瑞米芬、氟维司群、它莫西芬和萘福昔定。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与托瑞米芬、氟维司群、它莫西芬和萘福昔定的联合,且更优选的是治疗乳腺癌中与它莫西芬的联合。

[0097] 在另一优选的实施方式中,本发明的目的是在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与雄激素拮抗剂的联合,且更特别的是治疗前列腺癌。这种化学治疗剂组包括,但不限于比卡鲁胺、氟他米特、MDV3100和尼鲁米特。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与比卡鲁胺、氟他米特、MDV3100和尼鲁米特的联合,且更优选的是治疗前列腺癌中与氟他米特的联合。

[0098] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与mTOR抑制剂的联合,且更特别的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌。这种化学治疗剂组包括,但不限于西罗莫司、替西罗莫司、依维莫司、地磷莫司、KU-0063794和WYE-354。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与西罗莫司、替西罗莫司、依维莫司、地磷莫司、KU-0063794和WYE-354的联合,且更优选的是治疗肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌和脑癌中与替西罗莫司的联合。

[0099] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与酪氨酸激酶抑制剂的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌癌症。这种化学治疗剂组包括,但不限

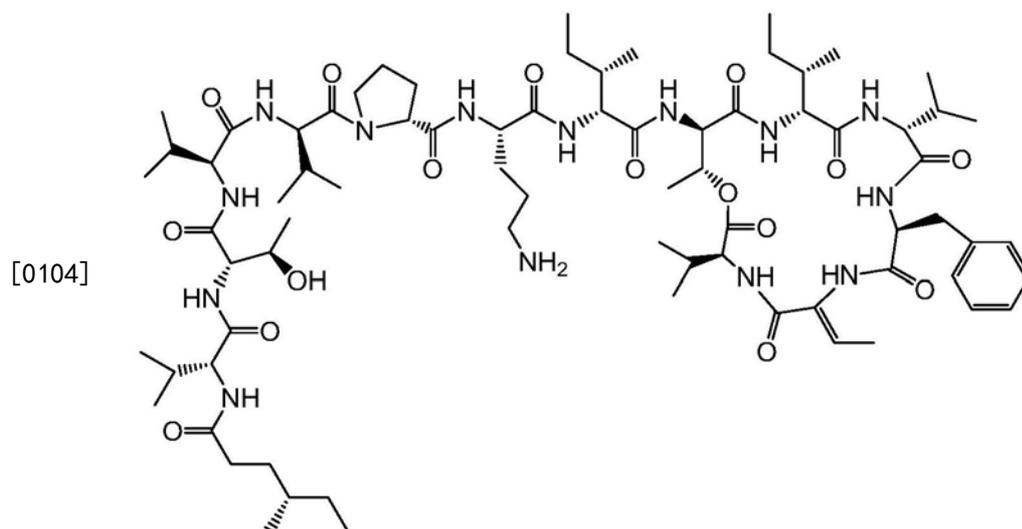
于厄洛替尼、索拉非尼、阿西替尼、伯舒替尼、西地尼布、克唑替尼、达沙替尼、吉非替尼、伊马替尼、卡拉替尼、拉帕替尼、来他替尼、来那替尼、尼洛替尼、semaxanib、舒尼替尼、瓦他拉尼和凡德他尼。特别优选的是PM01183或其药学上可接受的盐与厄洛替尼、索拉非尼、阿西替尼、伯舒替尼、西地尼布、克唑替尼、达沙替尼、吉非替尼、伊马替尼、卡拉替尼、拉帕替尼、来他替尼、来那替尼、尼洛替尼、semaxanib、舒尼替尼、瓦他拉尼和凡德他尼的联合,且更优选的是在癌症治疗中与厄洛替尼的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌和脑癌的癌症。

[0100] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与aplidine的联合,且更特别的是治疗选自肉瘤、胃癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌和白血病的癌症。

[0101] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与ET-743(曲贝替定)的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、白血病和淋巴瘤的癌症。

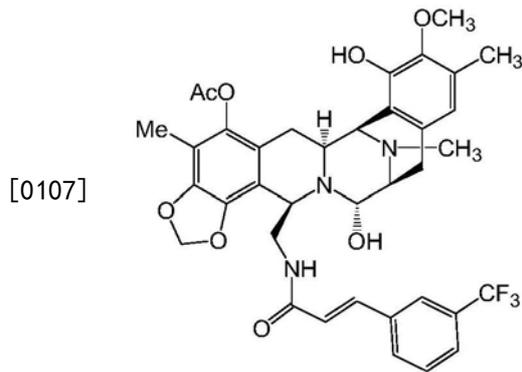
[0102] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与PM02734的联合,且更特别的是治疗选自肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、脑癌、白血病和淋巴瘤的癌症。

[0103] PM02734((4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-cyclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val))是关于kahalalide化合物家族的合成缩肽,其目前在临床试验中用于治疗癌症治疗。这种化合物是WO 2004/035613中的研究对象且其具有以下结构:



[0105] 在另一优选的实施方式中,本发明涉及在癌症治疗中PM01183或其药学上可接受的盐与PM00104的联合,且更特别的是治疗选自肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、白血病和淋巴瘤的癌症。

[0106] PM00104是关于jorumycin和renieramycins,及safracin和saframycin化合物的合成生物碱,其目前在临床试验中用于癌症治疗且具有以下结构:



[0108] 关于PM00104的更多细节参见WO 01/87894。

[0109] 本发明包括本文涉及的任何药物的任何药学上可接受的盐,其可通过如前公开的常规化学方法由母体化合物合成。

[0110] 在一实施方式中,本发明涉及PM01183或其药学上可接受的盐及选自上述药物列表的另一抗癌药物的协同组合。可通过测试组合及分析结果获得协同作用的指征,例如通过Chou-Talalay方法或通过任何其他合适的方法,例如实施例部分提供的那些方法。

[0111] 协同作用的可能的有利结果包括1) 增加治疗效果的疗效,2) 降低剂量但增加或保持相同的疗效以避免毒性,3) 尽量减少或减缓耐药性的发展,及4) 提供对靶标(或药效协同作用)对宿主(毒性拮抗作用)的选择性协同作用。因此,具有协同作用的两种化疗剂的联合的治疗方案,与只示出相加效应的两种药物的联合的治疗方案不同。就此而言,如果存在协同作用,可能需要更少剂量的一种或两种药物(与单一治疗使用的量相比较)以获得相同或更好的疗效,且可能减少或甚至避免可能的毒性副作用。或者,如果联合中两种药物的剂量与其单独使用时(单剂)相同,可预见联合的疗效增加。因此,给定药物联合中协同作用的存在将改变治疗和/或治疗方案的时间长短。

[0112] 在另一个实施方式中,本发明涉及一种增加或增强抗癌药物疗效的方法,所述抗癌药物选自癌症治疗中上述给定的药物的列表,所述方法包含向有需要的患者施用治疗上有效量的PM01183或其药学上可接受的盐与另一抗癌药物的联合。可通过测试组合及分析结果获得增加或增强疗效的指征,例如肿瘤生长抑制。通过比较联合两种药物(PM01183和其他药物)的治疗与其他药物单药治疗的平均肿瘤体积评估肿瘤生长抑制。就此而言,当联合治疗的响应强于与联合治疗中使用相同时间和剂量以单剂给药(单药治疗)的最有效药物的最佳响应时,确定疗效增加或增强。本发明的这个方面在实施例部分,特别是实施例13-19进一步说明。

[0113] 在另一方面,本发明涉及PM01183或其药学上可接受的盐在制备治疗癌症的药剂中的用途,治疗癌症通过PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定药物列表的另一抗癌药物的联合治疗。

[0114] 在另一方面,本发明涉及治疗癌症的方法,其包含向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的PM01183或其药学上可接受的盐,并联合治疗有效量的选自上述给定药物列表的另一抗癌药物。

[0115] 在另一方面,本发明涉及PM01183或其药学上可接受的盐用于治疗癌症,其包含施用治疗有效量的PM01183或其药学上可接受的盐,并联合治疗有效量的选自上述给定药物列表的另一抗癌药物。

[0116] 根据本发明,PM01183或其药学上可接受的盐及其他抗癌药物可在同时或不同时间在相同的药剂中或作为不同药剂进行施用。优选地,PM01183或其药学上可接受的盐及其他抗癌药物在不同时间作为不同药剂进行施用。当不同时间分别施用时,PM01183或其药学上可接受的盐或其他抗癌药物,可首先施用。另外,可在同一天或不同天施用两种药物,且在治疗周期内可使用相同方案或不同方案施用。此外,可通过使用相同给药途径或不同途径完成两种药物的施用。例如,这两种药物可通过静脉给药,或可选地一种药物口服另一种药物静脉给药。

[0117] 因此,本发明的药物组合物可包含单一药学上可接受剂型的所有组分(药物)或可选地,可分别配制组分并与另一组分联合施用。在本发明中可用使用本领域技术人员已知的各种药学上可接受的剂型。此外,由本领域技术人员通过考虑给药途径及组合物组分的溶解特性进行选择本发明中使用的合适的剂型。

[0118] 联合中两种药物的准确剂量将根据特定剂型、应用模式和接受治疗的特定部位、患者和肿瘤改变。还应考虑其他因素,例如年龄、体重、性别、日常饮食、给药时间、排泄率、患者状况、其他药物组合、反应灵敏度和疾病严重程度。在最大耐受剂量范围内连续地或定期地进行给药。

[0119] 本发明的联合可单独使用或与一种或多种抗癌药物或支持护理剂的联合。

[0120] 另外,根据肿瘤类型和疾病的发展阶段,本发明治疗方法的抗癌作用包括,但不限于,抑制肿瘤生长,肿瘤生长延迟,肿瘤消退,肿瘤收缩,治疗停止时增加肿瘤的再生时间,减缓病情发展及预防转移。预计,当本发明治疗方法施用于患者时,例如需要这种治疗的人类患者,所述治疗将产生效果,通过以下因素测得,例如,抗癌作用的程度、响应速率、疾病恶化的时间或成活率。特别地,本发明的治疗适合于人类患者,尤其是那些复发或之前化疗难以治疗的患者。还设想第一线治疗。

[0121] 在另一方面,本发明涉及用于癌症治疗的试剂盒,其包含至少一个周期的剂量单位的PM01183或其药学上可接受的盐的供给,及联合使用PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定药物列表的另一抗癌药物的印刷说明书。

[0122] 在相关方面,本发明的目的是用于癌症治疗的试剂盒,其包含至少一个周期的剂量单位的PM01183或其药学上可接受的盐的供给,至少一个周期的剂量单位的选自上述给定药物列表的另一抗癌药物的供给,及联合使用这两种药物的印刷说明书。

[0123] 在另一方面,本发明还提供了包含PM01183或其药学上可接受的盐及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物,用于癌症治疗中与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物联合。

[0124] 在还一方面,本发明还提供了包含PM01183或其药学上可接受的盐、选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物和药学上可接受的载体的药物组合物。这种药物组合物优选地用于治疗癌症。

[0125] 在另一方面,本发明进一步提供了PM01183或其药学上可接受的盐在制备组合物中的用途,所述组合物用于癌症治疗中与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物联合。

[0126] 在另一方面,本发明进一步提供了PM01183或其药学上可接受的盐在癌症治疗中的用途,其与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物联合。

[0127] 在一实施方式中,PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定的药物列表的

另一抗癌药物的联合接触或以其他方式治疗癌细胞。癌细胞优选为人类细胞且包括肿瘤细胞、肉瘤细胞、白血病细胞、淋巴瘤细胞和骨髓瘤细胞。更优选地，癌细胞为肺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、食道癌、成神经细胞瘤、脑癌、宫颈癌、肛门癌、睾丸癌、白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤细胞。另外，联合提供了对抗癌细胞的协同抑制效应，特别是对抗上述人类癌细胞。

[0128] 例如，联合抑制接触癌细胞的增殖或存活。接触癌细胞与非接触癌细胞相比增殖或存活水平较低，其支持PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物的联合有效地治疗患癌症的患者。

[0129] 在另一方面，本发明提供了抑制癌细胞生长的方法，其包含将所述癌细胞与有效量的与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物联合的PM01183或其药学上可接受的盐接触。

[0130] 在另一方面，本发明提供了抑制癌细胞生长的方法，其包含将所述癌细胞与PM01183或其药学上可接受的盐和选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物的协同联合接触，其中所述联合与(i)不存在其他抗癌药物的PM01183或其药学上可接受的盐，或(ii)不存在PM01183的其他抗癌药物相比，提高了对癌细胞生长的抑制。

[0131] 在另一方面，本发明提供了包含PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物的协同联合的药物组合物，其用于抑制癌细胞生长，其中所述联合与(i)不存在其他抗癌药物的PM01183或其药学上可接受的盐，或(ii)不存在PM01183的其他抗癌药物相比，提高了对癌细胞生长的抑制。

[0132] 在另一个实施方式中，PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物的联合抑制肿瘤生长或减小体内肿瘤大小。特别地，联合抑制了体内癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤的生长和/或减小了其大小。优选地，联合抑制了肺、肉瘤、恶性黑色素瘤、膀胱、前列腺、胰腺、甲状腺、胃、卵巢、肝、乳腺、结肠直肠、肾、食道、成神经细胞瘤、大脑、子宫、肛门、睾丸、白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤中的肿瘤生长。

[0133] 例如，这些联合抑制了肿瘤生长或减少了人类恶性肿瘤异种移植的大小，特别是动物模型中人类胃、胰腺、肉瘤、肺、结肠直肠和卵巢肿瘤异种移植瘤的大小。施用这些联合的动物模型中人恶性肿瘤异种移植生长减缓或大小减小进一步支持了PM01183或其药学上可接受的盐与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物的联合可有效治疗患癌症的患者。

[0134] 因此，在另一方面，本发明提供了减少肿瘤大小的方法，其包含施用有效量的与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物联合的PM01183或其药学上可接受的盐。

[0135] 在另一方面，本发明提供了抑制肿瘤生长的方法，其包含施用有效量的与选自上述给定的药物列表的另一抗癌药物联合的PM01183或其药学上可接受的盐。

[0136] 下列实施例进一步说明本发明。这些实施例不应解释为对本发明范围的限制。

[0137] 为了提供更加简洁的描述，本文中给定的一些定量表达不用术语“大约”限定。可以理解，不论术语“大约”是否明确地使用，本文中给定的每个定量是指实际的给定值，且其也指这个给定值的近似值，其可以是基于本领域的普通技术的合理推断，包括由于上述给定值的实验和/或测量条件的等值或近似值。

### 具体实施方式

[0138] 实施例1. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人肺癌细胞系的效果。

[0139] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗肺癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0140] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:奥沙利铂、卡氯芥、环磷酰胺、丝裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、吉西他滨、紫杉醇、多烯紫杉醇、长春新碱、柔红霉素、放线菌素D、托泊替康、依托泊甙、硼替佐米、伏立诺他、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0141] 选择人肺癌细胞系A549进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养A549细胞。

[0142] 分两部分进行筛选:

[0143] a. 在第一组实验中,将药物暴露于A549细胞72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。简言之,收集细胞并在96孔微量滴定板中以5,000细胞/150μL培养基的密度播种,并在不含药物的培养基中培养24小时,之后仅用载体或者待测化合物处理72小时。

[0144] 通过MTT还原试验测定细胞毒效应,其中使用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,四唑,其在活细胞的线粒体中还原成紫色甲臞。将MTT(50μL的1mg/mL原液)加入到每孔中,并在37℃下培养8小时直到形成甲臞晶体。缓慢去除培养基后,加入DMSO以将不溶的紫色甲臞产物溶解到彩色溶液中。通过测定540nm处的光密度,定量每个孔的吸光度。结果以对照细胞生长的百分比表示。使用Prism v5.02软件(GraphPad)计算用于组合研究的IC<sub>50</sub>值(抑制50%细胞生长时的药物浓度)。结果以摩尔浓度表示,并且以2~4个独立试验的平均值表示。

[0145] 每个独立试剂对A549肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露)在表1中示出。

[0146] 表1:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0147]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	3.60E-09	奥沙利铂	9.00E-04	5-FU	9.23E-05
吉西他滨	2.80E-10	紫杉醇	4.00E-08	多烯紫杉醇	3.00E-09
长春新碱	2.50E-07	柔红霉素	3.55E-07	丝裂霉素C	2.49E-04
放线菌素D	4.70E-09	托泊替康	8.00E-07	依托泊甙	7.82E-07
硼替佐米	3.10E-09	伏立诺他	6.81E-06	环磷酰胺	1.00E-03
卡氯芥	1.00E-03	氮烯唑胺	6.00E-04	替西罗莫司	3.29E-06
厄洛替尼	1.00E-05	ET-743	2.25E-08	PM00104	7.00E-09

[0148] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合每种上述试剂培养A549人肿瘤细胞。使用之前获得的IC<sub>50</sub>值作为每种化合物的初始浓度(100%浓度)。根据初始IC<sub>50</sub>值的百分比(100%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、25%和0%),对每组化合物进行任意比例的稀释,并且测试互补结合的(相反的浓度)剂量响应曲线如下:

	PM01183 的 IC <sub>50</sub>	试剂的 IC <sub>50</sub>
[0149]	100%	0%
	75%	25%
	70%	30%
	60%	40%
	50%	50%
[0150]	40%	60%
	30%	70%
	25%	75%
	0%	100%

[0151] 作为视觉辅助,在散点图上绘制响应值,X轴为剂量比,Y轴为响应值%。在两个端点响应值之间绘制水平线(例如,在100% IC<sub>50</sub>PM01183和100% IC<sub>50</sub>标准化学治疗剂之间)。如果在两个端点的响应值大约相等,高于或低于该添加的预测线的点可以分别被理解为分别代表拮抗或协同作用的药物相互作用。

[0152] 每种药物与PM01183的体外联合可能具有协同作用、加成作用或拮抗作用。对于肿瘤细胞协同的细胞毒效应效果最佳,并且暗示PM01183与另一药物的联合比单独施用药物更加有效。

[0153] 根据该试验,发现在A549人肺癌细胞系中:

[0154] a.PM01183与奥沙利铂的联合示出了强协同作用(图1)。

[0155] b.PM0183与5-氟尿嘧啶的联合(图2)以及PM01183与吉西他滨的联合(图3)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0156] c.PM01183与紫杉醇的联合在50/50-40/60剂量比下示出了协同作用(图4),PM01183与多烯紫杉醇的联合在75/25和50/50剂量比下示出了协同作用(图5),并且PM01183与长春新碱的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用(图6)。

[0157] d.PM01183与柔红霉素的联合(图7)、PM01183与丝裂霉素C的联合(图8)、以及PM01183与放线菌素D的联合(图9)在几乎所有的剂量比下都示出协同作用。

[0158] e.PM01183与托泊替康的联合示出了强协同作用(图10),而PM01183与依托泊甙的联合在60/40和25/75剂量比下示出了协同作用(图11)。

[0159] f.PM01183与硼替佐米的联合在40/60-30/70剂量比下示出了协同作用(图12)。

[0160] g.PM01183与伏立诺他的联合(图13)在几乎所有的剂量比下都示出了强协同作用。

[0161] h.PM01183与环磷酰胺的联合(图14)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0162] i.PM01183与卡氮芥的联合示出了强协同作用(图15)。

[0163] j.PM01183与氮烯唑胺的联合示出了强协同作用(图16)。

[0164] k.PM01183与替西罗莫司的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用(图17)。

[0165] l.PM01183与厄洛替尼的联合示出了强协同作用(图18)。

[0166] m.PM01183与ET-743的联合在75/25-60/40和30/70剂量比下示出了协同作用(图

19)。

[0167] n.PM01183与PM00104的联合(图20)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0168] 实施例2. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人肉瘤细胞系的效果。

[0169] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗肉瘤的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0170] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价: 顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺、丝裂霉素(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20°C下储存)、吉西他滨、多烯紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿糖胞苷、放线菌素D、托泊替康、依托泊甙、伏立诺他、氮烯唑胺、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine、PM02734、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20°C下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50 $\mu$ L等分液加入到每孔中。

[0171] 选择人横纹肌肉瘤细胞系A673进行该试验。在37°C下, 5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下, 在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养A673细胞。

[0172] 如实施例1中所公开的, 分两部分进行筛选:

[0173] a. 在第一组试验中, 将药物暴露于A673肿瘤细胞系72小时后, 测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0174] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于A673肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露), 在表2中示出结果。

[0175] 表2: 每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	2.20E-09	顺铂	3.03E-05	奥沙利铂	7.80E-05
阿糖胞苷	1.97E-07	吉西他滨	4.34E-10	多烯紫杉醇	6.50E-10
长春新碱	8.60E-09	长春瑞滨	5.00E-08	柔红霉素	5.20E-07
丝裂霉素 C	2.99E-06	放线菌素 D	9.56E-10	托泊替康	2.40E-08
依托泊甙	1.55E-06	伏立诺他	2.16E-06	环磷酰胺	1.00E-03
氮烯唑胺	3.00E-04	替西罗莫司	1.00E-06	厄洛替尼	5.00E-05
Aplidine	2.16E-09	ET-743	1.90E-09	PM02734	3.60E-06
PM00104	3.00E-09				

[0178] b. 在第二组试验中, 使用PM01183联合上述每种试剂培养A673人肿瘤细胞, 用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0179] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板, 并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0180] 根据该试验, 发现在A673人肉瘤细胞系中:

[0181] a. PM01183与顺铂的联合(图21)以及PM01183与奥沙利铂的联合(图22)示出了强协同作用。

[0182] b. PM01183与阿糖胞苷的联合示出了强协同作用(图23), 而PM01183与吉西他滨的

联合在75/25-70/30剂量比下示出了协同作用(图24)。

[0183] c.PM01183与多烯紫杉醇的联合(图25)、PM01183与长春新碱的联合(图26)以及PM01183与长春瑞滨的联合(图27)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0184] d.PM01183与柔红霉素的联合(图28)、PM01183与放线菌素D的联合(图30)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与丝裂霉素C的联合(图29)示出了强协同作用。

[0185] e.PM01183与托泊替康的联合(图31)以及PM01183与依托泊甙的联合(图32)在几乎所有的剂量比下都示出了强协同作用。

[0186] f.PM01183与伏立诺他的联合(图33)示出了强协同作用。

[0187] g.PM01183与环磷酰胺的联合(图34)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0188] h.PM01183与氮烯唑胺的联合在75/25-70/30和40/60剂量比下示出了协同作用(图35)。

[0189] i.PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图36)。

[0190] j.PM01183与厄洛替尼的联合示出了强协同作用(图37)。

[0191] k.PM01183与aplidine的联合在50/50-30/70剂量比下示出了协同作用(图38)。

[0192] l.PM01183与ET-743的联合(图39)在30/70-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0193] m.PM01183与PM02734的联合(图40)在75/25和40/60剂量比下示出了协同作用。

[0194] n.PM01183与PM00104的联合展示了协同作用(图41)。

[0195] 实施例3. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人恶性黑色素瘤细胞系的效果。

[0196] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗恶性黑色素瘤的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0197] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、丝裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、阿霉素、柔红霉素、阿糖胞苷、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、氮烯唑胺、替西罗莫司、PM02734, ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0198] 选择人恶性黑色素瘤细胞系SK-MEL-2进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的最低必需培养基(MEME)中培养SK-MEL-2细胞。

[0199] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0200] a. 在第一组试验中,将药物暴露于SK-MEL-2肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0201] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于SK-MEL-2肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表3中示出结果。

[0202] 表3:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0203]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	2.00E-09	顺铂	1.60E-04	5-FU	7.00E-04
阿糖胞苷	3.89E-06	氨甲喋呤	1.00E-04	柔红霉素	1.77E-07

阿霉素	3.00E-07	丝裂霉素C	9.00E-07	托泊替康	4.37E-07
依立替康	1.80E-05	依托泊甙	2.89E-06	氮烯唑胺	6.30E-04
替西罗莫司	5.00E-05	ET-743	2.00E-09	PM02734	1.76E-06
PM00104	2.00E-09				

[0204] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养SK-MEL-2肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0205] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0206] 根据该试验,发现在SK-MEL-2人黑色素瘤细胞系中:

[0207] a. PM01183与顺铂的联合(图42)在75/25,50/50和30/70剂量比下示出了协同作用。

[0208] b. PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图43)、PM01183与阿糖胞苷的联合(图44)、以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图45)示出了强协同作用。

[0209] c. PM01183与柔红霉素的联合(图46)以及PM01183与阿霉素的联合(图47)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与丝裂霉素C的联合(图48)示出了强协同作用。

[0210] d. PM01183与托泊替康的联合(图49)、PM01183与依立替康的联合(图50)、以及PM01183与依托泊甙的联合(图51)示出了协同作用,在相同的剂量比下显示了强协同作用。

[0211] e. PM01183与氮烯唑胺的联合示出了协同作用(图52)。

[0212] f. PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图53)。

[0213] g. PM01183与ET-743的联合(图54)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0214] h. PM01183与PM02734的联合(图55)在25/75-50/50剂量比下示出了协同作用。

[0215] i. PM01183与PM00104的联合(图56)在几乎所有的剂量比下都展示了协同作用。

[0216] 实施例4. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人前列腺癌细胞系的效果。

[0217] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗前列腺癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0218] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂、丝裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、多烯紫杉醇、紫杉醇、长春瑞滨、柔红霉素、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、伏立诺他、替西罗莫司、硼替佐米、厄洛替尼、氟他米特、PM02734、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0219] 选择人前列腺癌细胞系PC-3进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的罗斯韦尔公园纪念研究所培养基(RPMI)中培养PC-3细胞。

[0220] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0221] a. 在第一组试验中,将药物暴露于PC-3肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0222] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于PC-3肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表4中示出结果。

[0223] 表4:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	2.60E-09	顺铂	1.10E-04	奥沙利铂	1.71E-04
5-FU	1.00E-03	阿糖胞苷	4.00E-05	吉西他滨	4.00E-07
氨甲喋呤	1.20E-04	多烯紫杉醇	1.86E-08	紫杉醇	9.00E-08
长春瑞滨	1.00E-05	柔红霉素	1.15E-06	阿霉素	1.48E-06
丝裂霉素 C	1.00E-05	放线菌素 D	1.00E-08	托泊替康	6.33E-07
依立替康	7.00E-05	依托泊甙	4.80E-05	硼替佐米	8.00E-07
伏立诺他	3.90E-06	氟他米特	4.90E-05	替西罗莫司	5.00E-07
厄洛替尼	2.33E-04	ET-743	8.00E-09	PM02734	5.40E-07
PM00104	7.10E-09				

[0226] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养PC-3人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0227] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0228] 根据该试验,发现在PC-3人前列腺癌细胞系中:

[0229] a. PM01183与顺铂的联合(图57)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与奥沙利铂的联合(图58)示出了强协同作用。

[0230] b. PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图59)以及PM01183与阿糖胞苷的联合(图60)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,PM01183与吉西他滨的联合示出了强协同作用(图61)。最后,PM01183与氨甲喋呤的联合在30/70-25/75剂量比下示出了协同作用(图62)。

[0231] c. PM01183与多烯紫杉醇的联合(图63)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与紫杉醇的联合(图64)在40/60-30/70剂量比下示出了协同作用。PM01183与长春瑞滨的联合(图65)示出了强协同作用。

[0232] d. PM01183与柔红霉素的联合(图66)以及PM01183与阿霉素的联合(图67)示出了强协同作用。PM01183与丝裂霉素C的联合(图68)以及PM01183与放线菌素D的联合(图69)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0233] e. PM01183与托泊替康的联合(图70)以及PM01183与依立替康的联合(图71)示出了强协同作用,而PM01183与依托泊甙的联合(图72)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0234] f. PM01183与硼替佐米的联合(图73)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0235] g. PM01183与伏立诺他的联合(图74)示出了协同作用。

[0236] h. PM01183与氟他米特的联合(图75)在40/60-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0237] i. PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图76)。

[0238] j. PM01183与厄洛替尼的联合(图77)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

- [0239] k.PM01183与ET-743的联合(图78)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。
- [0240] l.PM01183与PM02734的联合(图79)在75/25-70/30和30/70剂量比下示出了协同作用。
- [0241] m.PM01183与PM00104的联合示出了强协同作用(图80)。
- [0242] 实施例5. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人胰腺癌细胞系的效果。
- [0243] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗胰腺癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。
- [0244] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价: 顺铂、奥沙利铂(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、吉西他滨、柔红霉素、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、伏立诺他、替西罗莫司、硼替佐米、厄洛替尼、PM02734、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。
- [0245] 选择人胰腺癌细胞系PANC-1进行该试验。在37℃下, 5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下, 在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的罗斯韦尔公园纪念研究所培养基(RPMI)中培养PANC-1细胞。
- [0246] 如实施例1中所公开的, 分两部分进行筛选:
- [0247] a. 在第一组试验中, 将药物暴露于PANC-1肿瘤细胞系72小时后, 测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。
- [0248] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于PANC-1肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露), 在表5中示出结果。
- [0249] 表5: 每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0250]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	2.80E-09	顺铂	1.47E-04	奥沙利铂	1.84E-04
阿糖胞苷	9.00E-05	吉西他滨	1.00E-06	氨甲喋呤	1.00E-05
柔红霉素	8.69E-07	阿霉素	3.45E-06	放线菌素D	2.20E-08
托泊替康	4.37E-06	依立替康	9.00E-05	依托泊甙	1.00E-05
硼替佐米	4.16E-07	伏立诺他	6.05E-06	替西罗莫司	1.00E-05
厄洛替尼	4.16E-07	ET-743	2.10E-08	PM02734	9.00E-06
PM00104	7.89E-09				

- [0251] b. 在第二组试验中, 使用PM01183联合上述每种试剂培养PANC-1人肿瘤细胞, 使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。
- [0252] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板, 并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。
- [0253] 根据该试验, 发现在PANC-1人胰腺癌细胞系中:
- [0254] a. PM01183与顺铂的联合(图81)以及PM01183与奥沙利铂的联合(图82)示出了强协同作用。
- [0255] b. PM01183与阿糖胞苷的联合(图83)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,

而PM01183与吉西他滨的联合(图84)以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图85)示出了强协同作用。

[0256] c. PM01183与柔红霉素的联合(图86)以及PM01183与阿霉素的联合(图87)显示了协同作用,而PM01183与放线菌素D的联合(图88)在75/25和30/70-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0257] d. PM01183与托泊替康的联合(图89)以及PM01183与依立替康的联合(图90)示出了强协同作用,而PM01183与依托泊甙的联合(图91)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0258] e. PM01183与硼替佐米的联合(图92)在75/25-70/30和50/50剂量比下示出了协同作用。

[0259] f. PM01183与伏立诺他的联合(图93)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0260] g. PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图94)。

[0261] h. PM01183与厄洛替尼的联合示出了强协同作用(图95)。

[0262] i. PM01183与ET-743的联合(图96)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0263] j. PM01183与PM02734的联合(图97)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0264] k. PM01183与PM00104的联合在75/25和50/50剂量比下示出了协同作用(图98)。

[0265] 实施例6. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人胃癌细胞系的效果。

[0266] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗胃癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0267] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、氮烯唑胺、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、伏立诺他、替西罗莫司、硼替佐米、厄洛替尼、aplidine、PM02734、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0268] 选择人胃癌细胞系HGC-27进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的Iscove改良的Dulbecco培养基(IDMD)中培养HGC-27细胞。

[0269] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0270] a. 在第一组试验中,将药物暴露于HGC-27肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0271] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于HGC-27肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表6中示出结果。

[0272] 表6:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0273]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	8.50E-10	顺铂	8.00E-05	奥沙利铂	1.06E-04
5-FU	1.00E-05	阿糖胞苷	5.00E-05	吉西他滨	5.34E-10
氨甲喋呤	3.30E-08	紫杉醇	5.00E-09	长春新碱	1.25E-08
长春瑞滨	6.50E-08	柔红霉素	3.72E-07	阿霉素	5.40E-08

放线菌素D	3.74E-09	托泊替康	8.08E-07	依立替康	4.00E-06
依托泊甙	2.90E-06	硼替佐米	5.60E-09	伏立诺他	1.20E-06
环磷酰胺	1.00E-03	氮烯唑胺	3.46E-04	替西罗莫司	1.50E-07
厄洛替尼	7.50E-06	Aplidine	9.00E-09	ET-743	5.80E-09
PM02734	9.50E-07	PM00104	3.20E-09		

[0274] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养HGC-27人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0275] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0276] 根据该试验,发现在HGC-27人胃癌细胞系中:

[0277] a. PM01183与顺铂的联合(图99)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与奥沙利铂的联合(图100)示出了强协同作用。

[0278] b. PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图101)以及PM01183与阿糖胞苷的联合(图102)展示了协同作用,在相同剂量比下协同作用更强。PM01183与吉西他滨的联合(图103)以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图104)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0279] c. PM01183与紫杉醇的联合示出了强协同作用(图105)。PM01183与长春新碱的联合(图106)以及PM01183与长春瑞滨的联合(图107)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0280] d. PM01183与柔红霉素的联合(图108)以及PM01183与放线菌素D的联合(图110)示出了强协同作用。PM01183与阿霉素的联合(图109)在75/25-60/40剂量比下展示了协同作用。

[0281] e. PM01183与托泊替康的联合示出了强协同作用(图111)。PM01183与依立替康的联合(图112)在70/30-60/40和40/60剂量比下示出了协同作用,而PM01183与依托泊甙的联合(图113)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0282] f. PM01183与硼替佐米的联合示出了强协同作用(图114)。

[0283] g. PM01183与伏立诺他的联合(图115)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0284] h. PM01183与环磷酰胺的联合示出了强协同作用(图116)。

[0285] i. PM01183与氮烯唑胺的联合示出了强协同作用(图117)。

[0286] j. PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图118)。

[0287] k. PM01183与厄洛替尼的联合示出了强协同作用(图119)。

[0288] l. PM01183与aplidine的联合示出了强协同作用(图120)。

[0289] m. PM01183与ET-743的联合(图121)在50/50和75/25剂量比下示出了协同作用。

[0290] n. PM01183与PM02734的联合示出了强协同作用(图122)。

[0291] o. PM01183与PM00104的联合(图123)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0292] 实施例7. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人卵巢癌细胞系的效果。

[0293] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗卵巢癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0294] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺、卡氯芥、丝

裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、多烯紫杉醇、紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、氮烯唑胺、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、伏立诺他、替西罗莫司、厄洛替尼、aplidine、PM02734、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0295] 选择人卵巢癌细胞系IGROV-1进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的罗斯韦尔公园纪念研究所培养基(RPMI)中培养IGROV-1细胞。

[0296] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0297] a.在第一组试验中,将药物暴露于IGROV-1肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0298] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于IGROV-1肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表7中示出结果。

[0299] 表7:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0300]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	3.20E-09	顺铂	7.00E-05	奥沙利铂	8.50E-06
5-FU	9.00E-05	阿糖胞苷	1.17E-05	吉西他滨	6.34E-09
氨甲喋呤	1.00E-04	多烯紫杉醇	5.01E-08	紫杉醇	9.50E-08
长春新碱	3.79E-07	长春瑞滨	1.39E-06	柔红霉素	3.55E-07
阿霉素	2.59E-07	放线菌素D	3.29E-09	丝裂霉素C	3.00E-06
托泊替康	3.00E-07	依立替康	1.00E-05	依托泊甙	3.06E-06
伏立诺他	2.88E-06	卡氯芥	7.12E-04	环磷酰胺	1.00E-03
氮烯唑胺	3.98E-04	替西罗莫司	1.27E-07	厄洛替尼	7.91E-06
Aplidine	1.50E-09	ET-743	6.45E-09	PM02734	3.33E-07
PM00104	3.30E-09				

[0301] b.在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养IGROV-1人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0302] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0303] 根据该试验,发现在IGROV-1人卵巢癌细胞系中:

[0304] a.PM01183与顺铂的联合(图124)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与奥沙利铂的联合示出了强协同作用(图125)。

[0305] b.PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图126)以及PM01183与阿糖胞苷的联合(图127)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。PM01183与吉西他滨的联合(图128)以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图129)展示了协同作用。

[0306] c.PM01183与多烯紫杉醇的联合(图130)、PM01183与紫杉醇(图131)的联合、以及PM01183与长春新碱的联合(图132)示出了强协同作用,而PM01183与长春瑞滨的联合(图133)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0307] d.PM01183与柔红霉素的联合(图134)展示了协同作用。PM01183与阿霉素的联合(图135)以及PM01183与放线菌素D的联合(图136)在几乎所有的剂量比下都展示了协同作用,而PM01183与丝裂霉素C的联合(图137)在50/50和30/70-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0308] e.PM01183与托泊替康的联合(图138)、PM01183与依立替康的联合(图139)以及PM01183与依托泊甙的联合(图140)展示了协同作用。

[0309] f.PM01183与伏立诺他的联合(图141)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0310] g.PM01183与环磷酰胺的联合(图142)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0311] h.PM01183与卡氯芥的联合(图143)在几乎所有的剂量比下都展示了协同作用。

[0312] i.PM01183与氮烯唑胺的联合(图144)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0313] j.PM01183与替西罗莫司的联合展示了协同作用(图145)。

[0314] k.PM01183的联合与厄洛替尼展示了协同作用(图146)。

[0315] l.PM01183与aplidine的联合(图147)在70/30-60/40剂量比下示出了协同作用。

[0316] m.PM01183与ET-743的联合(图148)在75/25-60/40剂量比下示出了协同作用。

[0317] n.PM01183与PM02734的联合示出了强协同作用(图149)。

[0318] o.PM01183与PM00104的联合(图150)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0319] 实施例8. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人肝细胞癌细胞系的效果。

[0320] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗肝细胞癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0321] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、紫杉醇、多烯紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、阿糖胞苷、阿霉素、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、硼替佐米、厄洛替尼、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0322] 选择人肝细胞癌细胞系HepG2进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的最低必需培养基(MEME)中培养HepG2细胞。

[0323] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0324] a.在第一组试验中,将药物暴露于HepG2肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0325] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于HepG2肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表8中示出结果。

[0326] 表8:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0327]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	2.50E-09	顺铂	5.00E-05	奥沙利铂	2.80E-05
5-FU	4.50E-06	阿糖胞苷	2.06E-05	吉西他滨	5.34E-09
氨甲喋呤	3.96E-08	多烯紫杉醇	5.00E-07	紫杉醇	5.70E-08

长春新碱	6.00E-08	长春瑞滨	1.02E-06	柔红霉素	3.00E-07
阿霉素	2.00E-07	托泊替康	1.00E-06	依立替康	1.00E-06
依托泊甙	1.04E-05	硼替佐米	3.90E-07	环磷酰胺	1.00E-03
厄洛替尼	8.60E-06	ET-743	7.21E-09	PM00104	3.00E-09

[0328] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种制剂培养HepG2人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0329] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0330] 根据该试验,发现在HepG2人肝细胞癌细胞系中:

[0331] a. PM01183与顺铂的联合(图151)以及PM01183与奥沙利铂(图152)的联合示出了强协同作用。

[0332] b. PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图153)在75/25、50/50和30/70的剂量比下示出了协同作用。PM01183与阿糖胞苷(图154)的联合、PM01183与吉西他滨的联合(图155)以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图156)示出了强协同作用。

[0333] c. PM01183与多烯紫杉醇的联合(图157)示出了强协同作用。PM01183与紫杉醇(图158)以及PM01183与长春新碱的联合(图159)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与长春瑞滨的联合(图160)在50/50和30/70-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0334] d. PM01183与柔红霉素的联合(图161)以及PM01183与阿霉素的联合(图162)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0335] e. PM01183与托泊替康的联合(图163)以及PM01183与依托泊甙的联合(图165)示出了强协同作用。PM01183与依立替康的联合(图164)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0336] f. PM01183与硼替佐米的联合(图166)在75/25-60/40剂量比下示出了协同作用。

[0337] g. PM01183与环磷酰胺的联合(图167)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0338] h. PM01183与厄洛替尼的联合(图168)示出了强协同作用。

[0339] i. PM01183与ET-743的联合(图169)在60/40-50/50剂量比下示出了协同作用。

[0340] j. PM01183与PM00104的联合(图170)示出了强协同作用。

[0341] 实施例9. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人乳腺癌细胞系的效果。

[0342] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗乳腺癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0343] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺、卡氯芥、丝裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、紫杉醇、多烯紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、氮烯唑胺、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、伏立诺他、替西罗莫司、厄洛替尼、它莫西芬、PM02734、ET-743和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0344] 选择人乳腺癌细胞系MDA-MB-231进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条

件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养MDA-MB-231细胞。

[0345] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0346] a.在第一组试验中,将药物暴露于MDA-MB-231肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0347] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于MDA-MB-231肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表9中示出结果。

[0348] 表9:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	3.50E-09	顺铂	1.53E-04	奥沙利铂	1.08E-04
5-FU	9.00E-05	阿糖胞苷	9.57E-06	吉西他滨	8.50E-09
氨甲喋呤	5.94E-06	多烯紫杉醇	2.50E-09	紫杉醇	8.50E-09
长春新碱	5.00E-08	长春瑞滨	1.20E-05	柔红霉素	3.70E-07
阿霉素	6.00E-07	放线菌素 D	4.54E-10	丝裂霉素 C	2.00E-06
托泊替康	1.66E-07	依立替康	8.50E-06	依托泊甙	4.80E-06
伏立诺他	1.70E-06	环磷酰胺	1.00E-03	卡氮芥	9.00E-04
氮烯唑胺	1.92E-05	它莫西芬	1.30E-05	替西罗莫司	1.20E-05
厄洛替尼	1.00E-04	ET-743	2.00E-09	PM02734	2.80E-06
PM00104	1.00E-09				

[0351] b.在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养MDA-MB-231人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0352] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0353] 根据该试验,发现在MDA-MB-231人乳腺癌细胞系中:

[0354] a.PM01183与顺铂(图171)的联合以及PM01183与奥沙利铂(图172)的联合示出了协同作用。

[0355] b.PM01183与5-氟尿嘧啶(图173)的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。PM01183与阿糖胞苷(图174)的联合以及PM01183与吉西他滨(图175)的联合示出了强协同作用,而PM01183与氨甲喋呤(图176)的联合在75/25-70/30和50/50剂量比下示出了协同作用。

[0356] c.PM01183与多烯紫杉醇(图177)的联合以及PM01183与紫杉醇(图178)的联合示出了协同作用。PM01183与长春新碱(图179)联合在75/25和50/50剂量比下,示出了协同作用,而PM01183与长春瑞滨(图180)的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0357] d.PM01183与柔红霉素(图181)的联合以及PM01183与丝裂霉素C(图184)的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。PM01183与阿霉素的联合(图182)示出了强协同作用,PM01183与放线菌素D的联合(图183)示出了协同作用。

[0358] e.PM01183与托泊替康的联合(图185)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

PM01183与依立替康的联合(图186)和PM01183与依托泊甙的联合(图187)展示了协同作用。

[0359] f. PM01183与伏立诺他(图188)的联合,在75/25和50/50-40/60剂量比下,示出了协同作用。

[0360] g. PM01183与环磷酰胺的联合(图189)示出了强协同作用。

[0361] h. PM01183与卡氯芥的联合(图190)在几乎所有的剂量比下都展示了协同作用。

[0362] i. PM01183与氮烯唑胺的联合(图191)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0363] j. PM01183与它莫西芬的联合(图192)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0364] k. PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图193)。

[0365] l. PM01183与厄洛替尼的联合示出了强协同作用(图194)。

[0366] m. PM01183与ET-743的联合示出了强协同作用(图195)。

[0367] n. PM01183与PM02734的联合(图196)在几乎所有的剂量比下都展示了协同作用。

[0368] o. PM01183与PM00104的联合(图197)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0369] 实施例10. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人结肠直肠癌细胞系的效果。

[0370] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗结肠直肠癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0371] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺、丝裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、多烯紫杉醇、长春瑞滨、柔红霉素、氮烯唑胺、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、依托泊甙、伏立诺他、硼替佐米、替西罗莫司、厄洛替尼、PM02734和aplidine(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0372] 选择人结肠癌细胞系HT-29进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养HT-29细胞。

[0373] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0374] a. 在第一组试验中,将药物暴露于HT-29肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0375] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于HT-29肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),在表10中示出结果。

[0376] 表10:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	3.70E-09	顺铂	2.20E-04	奥沙利铂	1.03E-04
5-FU	9.00E-06	阿糖胞苷	7.80E-06	吉西他滨	4.00E-07
多烯紫杉醇	3.20E-10	长春瑞滨	3.00E-08	柔红霉素	5.32E-07
阿霉素	9.00E-07	放线菌素 D	3.27E-09	丝裂霉素 C	2.00E-06

[0377]

[0378]	托泊替康	3.28E-07	依立替康	9.00E-06	依托泊甙	5.44E-06
	硼替佐米	6.15E-09	伏立诺他	2.76E-06	环磷酰胺	1.00E-03
	氮烯唑胺	2.47E-05	替西罗莫司	3.50E-06	厄洛替尼	2.56E-05
	Aplidine	1.76E-09	PM02734	2.14E-07		

[0379] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养HT-29人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0380] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0381] 根据该试验,发现在HT-29人结肠癌细胞系中:

[0382] a. PM01183与顺铂的联合(图198)在75/25-70/30剂量比下示出了协同作用,而PM01183与奥沙利铂的联合(图199)示出了强协同作用。

[0383] b. PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图200)以及PM01183与吉西他滨的联合(图202)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,PM01183与阿糖胞苷的联合(图201)示出了强协同作用。

[0384] c. PM01183与多烯紫杉醇的联合(图203)在50/50和75/25剂量比下展示了协同作用,而PM01183与长春瑞滨的联合(图204)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0385] d. PM01183与柔红霉素的联合(图205)以及PM01183与丝裂霉素C的联合(图208)示出了强协同作用。PM01183与阿霉素的联合(图206)以及PM01183与放线菌素D的联合(图207)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0386] e. PM01183与托泊替康的联合(图209)以及PM01183与依托泊甙的联合(图211)示出了强协同作用。PM01183与依立替康的联合(图210)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0387] f. PM01183与硼替佐米的联合(图212)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0388] g. PM01183与伏立诺他的联合(图213)展示了协同作用。

[0389] h. PM01183与环磷酰胺的联合(图214)在40/60-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0390] i. PM01183与氮烯唑胺的联合(图215)示出了强协同作用。

[0391] j. PM01183与替西罗莫司的联合示出了强协同作用(图216)。

[0392] k. PM01183与厄洛替尼的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用(图217)。

[0393] l. PM01183与aplidine的联合(图218)在40/60-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0394] m. PM01183与PM02734(图219)的联合在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0395] 实施例11. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人肾脏癌细胞系的效果。

[0396] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗肾癌的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0397] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、环磷酰胺、丝裂霉素C(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、氨甲喋呤、多烯紫杉醇、长春新碱、长春瑞滨、柔红霉素、氮烯唑胺、阿糖胞苷、阿霉素、放线菌素D、托泊替康、依立替康、依托泊甙、伏立诺他、厄洛替尼、PM02734、ET-743、PM00104和aplidine(这些

化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0398] 选择人肾脏癌细胞系RXF-393进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的罗斯韦尔公园纪念研究所培养基(RPMI)中培养RXF-393细胞。

[0399] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0400] a.在第一组试验中,将药物暴露于RXF-393肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0401] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于RXF-393肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),并在表11中示出结果。

[0402] 表11:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0403]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	5.00E-09	顺铂	6.67E-05	5-FU	3.00E-04
阿糖胞苷	5.00E-05	吉西他滨	5.00E-07	氨甲喋呤	1.75E-04
多烯紫杉醇	5.94E-10	长春新碱	1.73E-08	长春瑞滨	8.50E-06
柔红霉素	6.20E-07	阿霉素	8.00E-07	放线菌素D	7.09E-10
丝裂霉素C	9.00E-06	托泊替康	3.93E-07	依立替康	1.40E-05
依托泊甙	2.00E-05	伏立诺他	4.10E-06	环磷酰胺	1.00E-03
氮烯唑胺	7.94E-04	厄洛替尼	4.80E-06	Aplidine	1.50E-09
ET-743	9.60E-09	PM02734	5.00E-06	PM00104	5.40E-09

[0404] b.在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种制剂培养RXF-393人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0405] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0406] 根据该试验,发现在RXF-393人肾脏癌细胞系中:

[0407] a.PM01183与顺铂的联合(图220)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0408] b.PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图221)、PM01183与阿糖胞苷(图222)的联合、PM01183与吉西他滨的联合(图223)、以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图224)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0409] c.PM01183与多烯紫杉醇的联合(图225)、PM01183与长春新碱的联合(图226)以及PM01183与长春瑞滨的联合(图227)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0410] d.PM01183与柔红霉素的联合(图228)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。PM01183与阿霉素的联合(图229)75/25-60/40剂量比下示出了协同作用,而PM01183与放线菌素D的联合(图230)在75/25-70/30和30/70剂量比下示出了协同作用。PM01183与丝裂霉素C的联合(图231)示出了强协同作用。

[0411] e.PM01183与托泊替康的联合(图232)示出了强协同作用。PM01183与依立替康的联合(图233)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与依托泊甙的联合(图234)在75/25和40/60-30/70剂量比下示出了协同作用。

[0412] f.PM01183与伏立诺他的联合(图235)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0413] g.PM01183与环磷酰胺的联合(图236)在75/25-70/30和25/75剂量比下示出了协同作用。

[0414] h.PM01183与氮烯唑胺的联合(图237)在60/40-50/50剂量比下示出了协同作用。

[0415] i.PM01183与厄洛替尼的联合示出了强协同作用(图238)。

[0416] j.PM01183与aplidine的联合(图239)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0417] k.PM01183与ET-743的联合(图240)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0418] l.PM01183与PM02734的联合(图241)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0419] m.PM01183与PM00104的联合(图242)示出了强协同作用。

[0420] 实施例12. 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂联合治疗人成胶质细胞瘤细胞系的效果。

[0421] 本研究的目的在于确定PM01183加强用于治疗成胶质细胞瘤的化学治疗剂的抗肿瘤活性的能力。

[0422] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:顺铂、奥沙利铂(这些化合物的原液在无菌双蒸水中制备并在-20℃下储存)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、多烯紫杉醇、长春新碱、柔红霉素、氮烯唑胺、阿霉素、托泊替康、依立替康、氨甲喋呤、依托泊甙、伏立诺他、替西罗莫司、硼替佐米、厄洛替尼、PM02734、ET-743和aplidine(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并在-20℃下储存)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0423] 选择人成胶质细胞瘤细胞系U87-MG进行该试验。在37℃下,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的条件下,在补充有10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素的最低必需培养基(MEME)中培养U87-MG细胞。

[0424] 如实施例1中所公开的,分两部分进行筛选:

[0425] a. 在第一组试验中,将药物暴露于U87-MG肿瘤细胞系72小时后,测定每种药物的IC<sub>50</sub>值。

[0426] 使用与实施例1中公开的相同的方法估算每个独立试剂对于U87-MG肿瘤细胞系的IC<sub>50</sub>值(72小时药物暴露),并在表12中示出结果。

[0427] 表12:每种试剂的IC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0428]

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
PM01183	4.50E-09	顺铂	4.40E-05	奥沙利铂	1.90E-04
5-FU	1.00E-03	吉西他滨	4.50E-07	氨甲喋呤	5.00E-05
多烯紫杉醇	1.00E-07	长春新碱	1.00E-07	柔红霉素	2.84E-07
阿霉素	3.00E-07	托泊替康	7.50E-07	依立替康	7.54E-06
依托泊甙	1.85E-05	硼替佐米	4.00E-07	伏立诺他	1.60E-05
氮烯唑胺	7.00E-04	替西罗莫司	3.50E-06	厄洛替尼	1.49E-04
Aplidine	3.80E-09	ET-743	5.00E-09	PM02734	4.08E-06

[0429] b. 在第二组试验中,使用PM01183联合上述每种试剂培养U87-MG人肿瘤细胞,使用与实施例1中描述的特定的IC<sub>50</sub>浓度相同的组合。

[0430] 如上所述进行细胞培养和细胞涂板,并且通过实施例1中公开的MTT试验测定细胞毒效应。

[0431] 根据该试验,发现在U87-MG人成胶质细胞瘤细胞系中:

[0432] a.PM01183与顺铂的联合(图243)在70/30和50/50剂量比下示出了协同作用,而PM01183与奥沙利铂的联合(图244)示出了强协同作用。

[0433] b.PM01183与5-氟尿嘧啶的联合(图245)以及PM01183与氨甲喋呤的联合(图247)展示了协同作用。PM01183与吉西他滨的联合(图246)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0434] c.PM01183与多烯紫杉醇的联合(图248)以及PM01183与长春新碱的联合(图249)示出了强协同作用。

[0435] d.PM01183与柔红霉素的联合(图250)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用,而PM01183与阿霉素的联合(图251)在75/25和60/40剂量比下示出了协同作用。

[0436] e.PM01183与托泊替康的联合(图252)以及PM01183与依托泊甙的联合(图254)示出了强协同作用。PM01183与依立替康的联合(图253)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0437] f.PM01183与硼替佐米的联合(图255)在几乎所有的剂量比下都示出了协同作用。

[0438] g.PM01183与伏立诺他的联合(图256)示出了强协同作用。

[0439] h.PM01183与氮烯唑胺的联合(图257)展示了协同作用。

[0440] i.PM01183与替西罗莫司的联合(图258)在50/50和30/70剂量比下示出了协同作用。

[0441] j.PM01183与厄洛替尼的联合(图259)在40/60-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0442] k.PM01183与aplidine的联合(图260)在50/50-25/75剂量比下示出了协同作用。

[0443] m.PM01183与ET-743的联合(图261)示出了强协同作用。

[0444] l.PM01183与PM02734的联合(图262)示出了强协同作用。

[0445] 实施例13. 体内研究以确定PM01183与紫杉醇、长春瑞滨和阿霉素的联合在人卵巢肿瘤异种移植中的效果。

[0446] 这些研究的目的在于通过使用人卵巢癌异种移植模型,评估PM01183加强紫杉醇、长春瑞滨和阿霉素的抗肿瘤活性的能力。

[0447] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠(Harlan Laboratories Models,S.L.(西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23℃下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0448] 在这些研究中使用的肿瘤模型是A2780细胞系,其从欧洲细胞保藏中心(ECACC n° 93112519)获得。

[0449] A2780细胞在37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下,RPMI-1640培养基中生长。使用26G针头和1cc注射器,对每只动物在右侧腹皮下进行下植入含有1x10<sup>7</sup>个A2780细胞(在PM01183和阿霉素以及PM01183和长春瑞滨研究中,该细胞来自体外第5代,在PM01183和紫杉醇研究中,该细胞来自体外第9代)的0.05ml的50%基质胶和50%无血清培养基、不含抗生素的悬浮液。

[0450] 使用数显卡尺(Fowler Sylvac,S235PAT)对肿瘤尺寸进行测定。由二维肿瘤尺寸,使用长椭球体积的计算公式以估算肿瘤体积(mm<sup>3</sup>):肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)=[L x W<sup>2</sup>]÷2,其中L是肿瘤的长度,其是以mm表示的最长的直径,并且W是肿瘤的宽度,其是以mm表示的最短的直

径。假定单位密度,将体积转换为重量(即, $1\text{mm}^3=1\text{mg}$ )。从治疗的第一天(0天)开始,每周测量肿瘤体积和动物体重2-3次。

[0451] 通过检测体重变化、临床症状以及注射部位的局部损伤的迹象评估治疗的耐受性。

[0452] 在PM01183与紫杉醇的联合试验中,当肿瘤的体积达到大约 $195\text{mm}^3$ 时,在PM01183与长春瑞滨的联合试验中,当肿瘤的体积达到大约 $158\text{mm}^3$ 时,以及在PM01183与阿霉素的联合试验中,当肿瘤的体积达到大约 $163.5\text{mm}^3$ 时,根据体重小鼠被随机分配到治疗组和对照组中( $N=5-7/\text{组}$ ),并通过NewLab肿瘤学软件(2.25.06.00版)测量肿瘤体积。

[0453] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶的形式提供,然后用输液用水重新获得 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 的浓度。在5%注射用葡萄糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。阿霉素以含有盐酸阿霉素的固体粉末形式提供,其在0.9%的盐溶液中重新获得。长春瑞滨以溶液形式提供,其通过在0.9%的盐溶液中稀释产物获得。紫杉醇以溶液形式提供,其通过在5%的注射用葡萄糖溶液中稀释产物至目标终浓度而获得。

[0454] 在这些实验中,PM01183和紫杉醇、PM01183和长春瑞滨以及PM01183和阿霉素的治理、以及安慰剂都通过静脉施用,每周一次,连续两周,分别在第0天和第7天进行。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0455] 比较治疗组(T)的平均肿瘤体积与对照组( $T/C \times 100\%$ )的平均肿瘤体积,从而评估抗肿瘤效果。此外,当联合组的响应大于作为单独试剂(单一疗法)以与联合治疗相同的方案和剂量进行施用的最佳活性剂的最佳响应时,确定为增强效应。

[0456] 最后,定量测定药物相互作用程度的联合指数(CI),其通过受治疗影响的分数获得,每个试验组在最后一天(PM01183和紫杉醇联合研究、PM01183和阿霉素联合研究的第10天、PM01183和长春瑞滨联合研究的第9天)使用中效原理(Chou T.C.Pharmacol.Rev.2006, 58, 621-681)的测量结果为Fa(定义为 $1-T/C$ )。

[0457] 表13记录了单独施用PM01183和紫杉醇,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图263示出了使用安慰剂、PM01183、紫杉醇和相应的各组以两者最高剂量比的联合治疗的小鼠体内A2780肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0458] 表13

组	剂量	实验材料	天数 T/C %				
			0	3	5	7	10
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	101.6	68.9	83.1	69.1	52.8
G03	0.135 mg/kg	PM01183	101.2	89.9	99.8	84.5	61.2
G04	0.09 mg/kg	PM01183	94.2	88.5	114.1	103.3	88.0
G05	0.045 mg/kg	PM01183	94.0	91.1	99.6	88.0	73.1
G06	25 mg/kg	紫杉醇	95.3	49.3	42.9	34.0	19.8
G07	18.75 mg/kg	紫杉醇	95.0	60.4	43.2	41.5	31.1
G08	12.5 mg/kg	紫杉醇	96.2	62.5	73.9	62.5	50.8
G09	6.25 mg/kg	紫杉醇	94.3	60.2	79.7	81.3	59.2
G10	0.18 mg/kg 25 mg/kg	PM01183 紫杉醇	93.3	45.9	28.8	20.9	9.2
G11	0.135 mg/kg 18.75 mg/kg	PM01183 紫杉醇	93.4	40.5	37.1	36.0	22.6
G12	0.09 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 紫杉醇	96.5	64.3	67.7	73.2	49.0
G13	0.045 mg/kg 6.25 mg/kg	PM01183 紫杉醇	96.2	78.6	89.1	91.1	77.2

[0459] [0460] 安慰剂:含有100mg蔗糖、6.8mg磷酸二氢钾、适量的pH 3.8-4.5磷酸的冻干饼,其使用1mL的输液用水重新获得。

[0461] 表14记录了单独施用PM01183和长春瑞滨,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图264示出了使用安慰剂、PM01183、长春瑞滨和相应的各组以两者最高剂量比的联合治疗的小鼠体内A2780肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0462] 表14

组	剂量	试验材料	天数 T/C %				
			0	2	5	7	9
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	98.9	101.6	72.2	61.3	62.8
G03	0.135 mg/kg	PM01183	98.3	105.3	77.2	79.1	78.7
G04	0.09 mg/kg	PM01183	98.0	88.6	61.2	87.6	94.5
G05	0.045 mg/kg	PM01183	97.8	107.5	93.6	92.5	97.1
G06	16.0 mg/kg	长春瑞滨	99.0	62.5	20.8	24.5	20.0
G07	12.0 mg/kg	长春瑞滨	97.4	67.2	39.1	43.0	36.1
G08	8.0 mg/kg	长春瑞滨	97.6	79.5	45.0	54.2	47.9
G09	4.0 mg/kg	长春瑞滨	97.2	88.6	69.3	81.7	77.3
G10	0.18 mg/kg 16.0 mg/kg	PM01183 长春瑞滨	97.3	50.1	10.9	10.6	8.6
G11	0.135 mg/kg 12.0 mg/kg	PM01183 长春瑞滨	97.2	74.0	29.6	31.2	26.8
G12	0.09 mg/kg 8.0 mg/kg	PM01183 长春瑞滨	96.8	69.3	48.3	56.5	49.8
G13	0.045 mg/kg 4.0 mg/kg	PM01183 长春瑞滨	97.1	85.6	61.7	74.2	81.6

[0464] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0465] 表15记录了单独施用PM01183和阿霉素,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图263示出了使用安慰剂、PM01183、阿霉素和相应的各组以两者最高剂量比的联合治疗的小鼠体内A2780肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0466] 表15

组	剂量	实验材料	天数 T/C %				
			0	3	5	7	10
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100.9	70.2	68.5	69.3	62.1
G03	0.135 mg/kg	PM01183	102.2	82.4	86.6	89.2	82.4
G04	0.09 mg/kg	PM01183	100.2	93.3	95.2	93.5	87.7
G05	0.045 mg/kg	PM01183	100.1	98.2	98.6	97.7	90.0
G06	8.0 mg/kg	阿霉素	99.5	60.8	49.8	48.1	39.4
G07	6.0 mg/kg	阿霉素	99.4	71.0	60.3	56.8	54.3
G08	4.0 mg/kg	阿霉素	102.0	82.9	75.1	75.0	68.9
G09	2.0 mg/kg	阿霉素	99.8	91.5	93.1	94.2	86.2
G10	0.18 mg/kg 8.0 mg/kg	PM01183 阿霉素	99.7	47.6	32.6	30.3	21.1
G11	0.135 mg/kg 6.0 mg/kg	PM01183 阿霉素	100.6	67.0	54.9	53.9	44.9
G12	0.09 mg/kg 4.0 mg/kg	PM01183 阿霉素	98.3	74.7	69.0	63.1	64.4
G13	0.045 mg/kg 2.0 mg/kg	PM01183 阿霉素	98.1	83.1	86.6	78.1	79.2

[0468] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0469] 根据这些实验发现:

[0470] a. PM01183和紫杉醇的联合治疗对于抑制A2780卵巢癌细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为9.2%和22.6%(第10天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为25mg/kg和18.75mg/kg的紫杉醇)相比,PM01183和紫杉醇的组合产生更低的T/C值。具体地,组合(25mg/kg紫杉醇+0.18mg/kg PM01183)对单独的紫杉醇(25mg/kg紫杉醇)的TC(%)值为28.8对42.9(第5天)、20.9对34.0(第7天)和9.2对19.8(第10天),并且,组合(18.75mg/kg紫杉醇+0.135mg/kg PM01183)对单独的紫杉醇(18.75mg/kg紫杉醇)的TC(%)值为37.1对43.2(第5天),36.0对41.5(第7天)和22.6对31.1(第10天)。因此,当PM01183与紫杉醇联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0471] 此外,基于中效原理,PM01183和紫杉醇的联合施用的结果是CI值低于1( $F_a$ 高于0.8),这表明在患有卵巢癌A2780异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0472] b. PM01183和长春瑞滨的联合治疗对于抑制A2780卵巢癌细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为8.6%和26.8%(第9天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为16mg/kg和12mg/kg的长春瑞滨)相比,PM01183和长春瑞滨的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(16mg/kg长春瑞滨+0.18mg/kg PM01183)对单独的长春瑞滨(16mg/kg长春瑞滨)的TC(%)值为10.9对20.8(第5天)、10.6对24.5(第7天)和8.6对20.0(第9天),并且,组合(12mg/kg长春瑞滨+0.135mg/kg PM01183)对单独的长春瑞滨(12mg/kg长春瑞滨)的TC(%)值为29.6对39.1(第5天),31.2对43(第7天)和26.8对36.1(第9天)。因此,当PM01183与长春瑞滨联合施用,可

观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0473] 此外,基于中效原理,PM01183和长春瑞滨的联合施用的结果是CI值为0.75 (Fa等于0.97),这表明在患有卵巢癌A2780异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0474] c.PM01183和阿霉素的联合治疗对于抑制A2780卵巢癌细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小 ( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为21.1%和44.9% (第10天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为8mg/kg的阿霉素)相比,PM01183和阿霉素的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(8mg/kg阿霉素+0.18mg/kg PM01183)对单独的阿霉素(8mg/kg阿霉素)的TC(%)值为32.6对49.8(第5天)、30.3对48.1(第7天)和21.1对39.4(第10天)。因此,当PM01183与阿霉素联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0475] 此外,基于中效原理,PM01183和阿霉素的联合施用的结果是CI值低于1 (Fa高于0.8),这表明在患有卵巢癌A2780异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0476] 实施例14. 体内研究以确定PM01183与顺铂和5-氟尿嘧啶的联合在人胃肿瘤异种移植中的效果。

[0477] 这些研究的目的在于通过使用人胃肿瘤异种移植模型,评估PM01183加强顺铂和5-氟尿嘧啶的抗肿瘤活性的能力。

[0478] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠(Harlan Laboratories Models,S.L.(西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23°C下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0479] 在这些研究中使用的肿瘤模型是HGC-27细胞系,其从欧洲细胞保藏中心(ECACC n° 94042256)获得。

[0480] HGC-27细胞在37°C,5%CO<sub>2</sub>条件下,在Iscove改良的Dulbeco培养基(IDMD)中生长。使用26G针头和1cc注射器,对每只动物在右侧腹皮下植入含有 $5 \times 10^6$  HGC-27细胞(在PM01183和顺铂的研究中,为体外第4代,在PM01183和5-氟尿嘧啶的研究中,为体外第6代)的0.05ml的50%基质胶和50%无血清培养基,不含抗生素的悬浮液。

[0481] 根据实施例13中公开的方法进行肿瘤测量和治疗耐受性测定。

[0482] 在PM01183与顺铂的联合试验中,当肿瘤的体积达到大约165.5mm<sup>3</sup>时,以及在PM01183与5-氟尿嘧啶的联合试验中,当肿瘤的体积达到大约170mm<sup>3</sup>时,根据体重小鼠被随机分配到治疗组和对照组中(N=5-7/组),并通过NewLab肿瘤学软件(2.25.06.00版)测量肿瘤体积。

[0483] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶形式提供,然后用输液用水重新获得0.2mg/mL的浓度。在5%注射用葡萄糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。顺铂和5-氟尿嘧啶以溶液形式提供,其通过在0.9%的注射用盐溶液中稀释产物至目标终浓度而获得。

[0484] 在这些实验中,PM01183和顺铂以及PM01183和5-氟尿嘧啶的治疗、以及安慰剂都通过静脉施用,每周一次,连续两周,分别在第0天和第7天进行。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0485] 比较治疗组(T)的平均肿瘤体积与对照组(T/C x 100%)的平均肿瘤体积,从而评

估抗肿瘤效果。另外,使用实施例13所公开的方法确定增强作用和联合指数(CI)。

[0486] 表16记录了单独施用PM01183和顺铂,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图266示出了使用安慰剂、PM01183、顺铂和相应的各组以两者最高剂量比的联合治疗的小鼠体内HGC-27肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0487] 表16

组	剂量	实验材料	天数 T/C%						
			0	3	5	7	10	12	14
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	99.6	65.9	55.6	38.7	33.5	24.3	24.3
G03	0.135 mg/kg	PM01183	97.9	71.6	59.9	47.8	39.3	37.1	38.3
G04	0.09 mg/kg	PM01183	98.6	67.5	67.9	66.1	70.2	60.3	65.0
G05	0.045 mg/kg	PM01183	98.9	85.9	83.1	92.1	76.4	81.6	88.5
G06	6.0 mg/kg	顺铂	97.7	76.1	79.0	75.1	64.4	61.3	72.7
G07	4.5 mg/kg	顺铂	98.5	90.5	94.5	90.2	75.7	73.7	81.1
G08	3.0 mg/kg	顺铂	99.0	78.6	80.0	78.7	81.3	82.8	85.1
G09	1.5 mg/kg	顺铂	99.3	78.1	78.8	82.6	83.5	86.6	89.9
G10	0.18 mg/kg 6.0 mg/kg	PM01183 顺铂	95.7	55.0	42.4	22.3	12.9	7.6	4.6
G11	0.135 mg/kg 4.5 mg/kg	PM01183 顺铂	99.2	67.7	42.7	28.6	17.3	12.1	9.8
G12	0.09 mg/kg 3.0 mg/kg	PM01183 顺铂	99.9	80.0	64.3	45.7	47.2	42.4	56.7
G13	0.045 mg/kg 1.5 mg/kg	PM01183 顺铂	99.9	93.3	83.0	75.9	69.3	70.3	80.0

[0488] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0489] 表17记录了单独施用PM01183和5-氟尿嘧啶,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图267示出了使用安慰剂、PM01183、5-氟尿嘧啶和相应的各组以两者最高剂量比的联合治疗的小鼠体内HGC-27肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0490] 表17

组	剂量	实验材料	天数 T/C %						
			0	2	5	7	9	12	14
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	99.6	78.6	50.9	43.3	41.0	33.0	29.2
G03	0.135 mg/kg	PM01183	100.2	81.5	58.7	61.4	60.2	54.6	55.1
G04	0.09 mg/kg	PM01183	100.6	90.5	87.6	83.4	82.6	76.7	67.7
G05	0.045 mg/kg	PM01183	99.9	84.3	103.2	104.6	103.5	101.6	85.0
G06	50.0 mg/kg	5-氟尿嘧啶	100.3	81.2	82.3	81.1	75.6	69.6	60.7
[0492] G07	37.5 mg/kg	5-氟尿嘧啶	99.4	86.9	86.9	78.6	73.2	76.7	83.1
G08	25.0 mg/kg	5-氟尿嘧啶	100.6	89.8	97.0	111.4	102.6	93.9	82.8
G09	12.5 mg/kg	5-氟尿嘧啶	100.7	81.7	101.3	102.8	98.6	90.5	83.8
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 5-氟尿嘧啶	99.6	73.0	44.2	35.9	31.5	25.3	22.0
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 5-氟尿嘧啶	100.8	73.4	63.5	53.1	50.6	42.8	51.1
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 5-氟尿嘧啶	99.6	95.8	97.7	98.9	90.0	74.7	69.9
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 5-氟尿嘧啶	99.5	80.6	87.3	88.5	99.3	87.1	84.2

[0493] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0494] 根据这些实验发现:

[0495] a. PM01183和顺铂的联合治疗对于抑制HGC-27胃癌细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为4.6%和9.8%(第14天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为0.18mg/kg和0.135mg/kg的PM01183)相比,PM01183和顺铂的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(6mg/kg顺铂+0.18mg/kg PM01183)对单独的PM01183(0.18mg/kg PM01183)的TC(%)值为12.9对33.5(第10天)、7.6对24.3(第12天)和4.6对24.3(第14天),并且,组合(4.5mg/kg顺铂+0.135mg/kg PM01183)对PM01183单独(0.135mg/kg PM01183)的TC(%)值为17.3对39.3(第10天)、12.1对37.1(第12天)和9.8对38.3(第14天)。因此,当PM01183与紫杉醇联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0496] 此外,基于中效原理,PM01183和顺铂的联合施用的结果是CI值低于1( $F_a$ 高于0.8),这表明在患有胃癌HGC-27异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0497] b. PM01183和5-氟尿嘧啶的联合治疗对于抑制HGC-27胃癌细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为22.0%和51.1%(第14天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为0.18mg/kg的PM01183)相比,PM01183和5-氟尿嘧啶的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(50mg/kg 5-氟尿嘧啶+0.18mg/kg PM01183)对单独的PM01183(0.18mg/kg PM01183)的TC(%)值为35.9对43.3(第7天)、31.5对41.0(第9天)、25.3对33.0(第12天)和22.0对29.2(第14天)。因此,当PM01183与5-氟尿嘧啶联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0498] 此外,基于中效原理,PM01183和5-氟尿嘧啶的联合施用的结果是CI值为0.78( $F_a$ 等于0.97),这表明在患有胃癌HGC-27异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0499] 实施例15. 体内研究以确定PM01183与吉西他滨的联合在人胰腺肿瘤异种移植中

的效果。

[0500] 这些研究的目的在于通过使用人胰腺癌异种移植模型,评估PM01183加强吉西他滨的抗肿瘤活性的能力。

[0501] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠 (Harlan Laboratories Models, S.L. (西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23°C下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0502] 在这些研究中使用的肿瘤模型是SW1990细胞系,其从美国菌种保藏中心 (ATCC: CRL-2172™) 获得。

[0503] SW1990细胞在37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下,在RPMI-1640培养基 (IDMD) 中生长。使用26G针头和1cc注射器,对每只动物在右侧腹皮下植入含有5x10<sup>6</sup>SW1990细胞 (该细胞来自体外第12代) 的0.05ml的50%基质胶和50%无血清培养基,不含抗生素的悬浮液。

[0504] 根据实施例13中公开的方法进行肿瘤测量和治疗耐受性测定。

[0505] 当肿瘤的体积达到大约210mm<sup>3</sup>时,根据体重,小鼠被随机分配到治疗组和对照组中 (N=5-7/组),并通过NewLab肿瘤学软件 (2.25.06.00版) 测量肿瘤体积。

[0506] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶形式提供,然后用输液用水重新获得0.2mg/mL的浓度。在5%注射用葡萄糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。吉西他滨以溶液形式提供,其通过0.9%的注射用盐溶液重新获得至浓度为40mg/ml的原液。吉西他滨原液进一步使用0.9%的注射用盐溶液稀释到目标终浓度。

[0507] 在这些实验中,PM01183和吉西他滨的治疗、以及安慰剂都通过静脉施用,每周一次,连续三周,分别在第0天、第7天和第14天进行。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0508] 比较治疗组 (T) 的平均肿瘤体积与对照组 (T/C x 100%) 的平均肿瘤体积,从而评估抗肿瘤效果。另外,使用实施例13所公开的方法确定增强作用和联合指数。

[0509] 表18记录了单独施用PM01183和吉西他滨,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图268示出了使用安慰剂、PM01183、吉西他滨和相应的各组以两者最高剂量比联合治疗的小鼠体内SW199肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0510] 表18

			天数 T/C %					
组	剂量	实验材料	0	3	6	8	10	13
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100.0	74.3	61.3	59.4	56.7	56.1
G03	0.135 mg/kg	PM01183	99.6	81.3	71.0	73.1	65.6	63.1
G04	0.09 mg/kg	PM01183	101.1	81.5	72.8	68.7	68.4	74.4
G05	0.045 mg/kg	PM01183	100.2	83.6	82.8	93.3	82.9	88.1
G06	180.0 mg/kg	吉西他滨	102.2	84.1	73.9	66.1	60.9	59.4
G07	135.0mg/kg	吉西他滨	102.3	78.3	71.9	63.7	55.4	52.7
G08	90.0 mg/kg	吉西他滨	103.8	70.0	73.8	63.3	55.6	54.8
G09	45.0 mg/kg	吉西他滨	102.3	85.5	70.3	70.5	63.3	64.8
G10	0.18 mg/kg 180.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	102.1	69.7	51.2	46.2	36.0	34.1
G11	0.135 mg/kg 135.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	100.4	64.6	52.8	51.5	48.9	46.0
G12	0.09 mg/kg 90.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	98.2	83.2	64.4	59.7	50.6	49.6
G13	0.045 mg/kg 45.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	97.7	81.6	70.9	68.8	65.9	65.7

[0511]

[0512] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0513] 表18(续)

			天数 T/C %					
组	剂量	实验材料	15	17	20	22	24	28
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	53.2	47.8	44.2	45.3	44.8	38.9
G03	0.135 mg/kg	PM01183	56.3	56.7	56.9	56.5	53.0	51.7
G04	0.09 mg/kg	PM01183	74.7	80.7	71.9	75.4	77.3	63.9
G05	0.045 mg/kg	PM01183	92.6	86.5	85.1	84.5	85.8	85.4
G06	180.0 mg/kg	吉西他滨	58.5	52.1	49.1	48.6	46.9	39.3
G07	135.0mg/kg	吉西他滨	54.8	51.2	49.5	48.7	49.8	49.5
G08	90.0 mg/kg	吉西他滨	49.9	47.4	47.6	47.0	45.9	49.2
G09	45.0 mg/kg	吉西他滨	63.1	58.5	58.7	57.3	65.2	59.3
G10	0.18 mg/kg 180.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	34.7	31.6	31.7	28.0	26.0	22.7
G11	0.135 mg/kg 135.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	42.4	38.2	36.6	34.6	31.5	25.8
G12	0.09 mg/kg 90.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	47.4	46.0	43.8	49.1	46.0	42.9
G13	0.045 mg/kg 45.0 mg/kg	PM01183 吉西他滨	57.9	59.9	55.9	54.9	52.1	50.5

[0514]

[0515] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0516] 根据这些试验发现:

[0517] a. PM01183和吉西他滨的联合治疗对于抑制SW 1990胰腺癌细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为22.7%和25.8%(第28天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为0.18mg/kg的PM01183)相比,PM01183和吉西他滨的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(180mg/kg吉西他滨+0.18mg/kg PM01183)对单独的PM01183(0.18mg/kg PM01183)的TC(%)值为31.7对44.2(第20天)、28.0对45.3(第22天)和26.0对44.8(第24天)和22.7对38.9(第28天)。因此,当PM01183与吉西他滨联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0518] 此外,基于中效原理,PM01183和吉西他滨的联合施用的结果是CI值低于1( $F_a$ 高于0.8),这表明在患有胰腺癌SW 1990异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0519] 实施例16. 体内研究以确定PM01183与替莫唑胺的联合在人脑肿瘤异种移植中的效果。

[0520] 这些研究的目的在于通过使用人脑肿瘤异种移植模型,评估PM01183加强替莫唑胺的抗肿瘤活性的能力。

[0521] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠(Harlan Laboratories Models,S.L.(西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23°C下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0522] 在这些研究中使用的肿瘤模型是U87-MG细胞系,其从美国菌种保藏中心(ATCC HTB-14™)获得。

[0523] U87-MG细胞在37°C,5%CO<sub>2</sub>条件下,在最低必需培养基(MEME)中生长。使用26G针头和1cc注射器,对每只动物在右侧腹皮下植入含有 $5 \times 10^6$ 个U87-MG细胞(该细胞来自体外第5代)的0.05ml的50%基质胶和50%无血清培养基,不含抗生素的悬浮液。

[0524] 根据实施例13中公开的方法进行肿瘤测量和治疗耐受性测定。

[0525] 当肿瘤的体积达到大约139mm<sup>3</sup>时,根据体重,小鼠被随机分配到治疗组和对照组中(N=5-7/组),并通过NewLab肿瘤学软件(2.25.06.00版)测量肿瘤体积。

[0526] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶形式提供,然后用输液用水重新获得0.2mg/mL的浓度。在5%注射用葡萄糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。替莫唑胺以溶液形式提供,其通过在0.9%的注射用盐溶液中将10%DMSO中的产物稀释至目标终浓度而获得。

[0527] 在这些实验中,PM01183和替莫唑胺的治疗及安慰剂按以下方式施用,PM01183通过静脉施用,每周一次,连续三周,分别在第0天、第7天和第14天进行,替莫唑胺每天口服,连续8天(第0天至第7天),安慰剂的施用与PM01183和替莫唑胺的施用方案相同。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0528] 比较治疗组(T)的平均肿瘤体积与对照组(T/C x 100%)的平均肿瘤体积,从而评估抗肿瘤效果。另外,使用实施例13所公开的方法确定增强作用和联合指数(CI)。

[0529] 表19记录了单独施用PM01183和替莫唑胺,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图269示出了使用安慰剂、PM01183、替莫唑胺和相应的各组以两者最高剂量比联合治疗的小鼠体内U87-MG肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0530] 表19

组	剂量	实验材料	天数 T/C %							
			0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	99.8	95.5	64.8	63.2	52.0	44.1	38.5	37.1
G03	0.135 mg/kg	PM01183	98.5	90.5	61.2	71.3	67.7	65.3	64.2	63.6
G04	0.09 mg/kg	PM01183	97.9	99.5	74.4	85.1	69.4	71.8	74.1	73.5
G05	0.045 mg/kg	PM01183	98.2	101.0	80.4	83.8	78.8	77.7	76.7	82.5
G06	3.0 mg/kg	替莫唑胺	97.1	95.5	67.3	39.4	25.3	22.9	28.4	31.5
G07	1.5 mg/kg	替莫唑胺	94.1	96.9	75.6	73.0	56.5	59.3	50.0	53.5
[0531] G08	1.0 mg/kg	替莫唑胺	98.2	100.2	65.1	81.2	55.0	63.5	73.1	75.0
G09	0.75 mg/kg	替莫唑胺	97.7	98.9	76.3	77.3	64.4	63.1	62.8	72.7
G10	0.18 mg/kg 3.0 mg/kg	PM01183 替莫唑胺	97.8	95.0	50.9	33.1	21.0	18.3	16.6	17.4
G11	0.135 mg/kg 1.5 mg/kg	PM01183 替莫唑胺	98.7	102.4	62.7	42.0	30.3	29.1	29.0	30.9
G12	0.09 mg/kg 1.0 mg/kg	PM01183 替莫唑胺	96.2	101.0	79.3	76.1	49.8	51.2	57.6	56.5
G13	0.045 mg/kg 0.75 mg/kg	PM01183 替莫唑胺	101	106.0	67.4	73.0	57.8	59.0	69.3	72.2

[0532] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0533] 根据该试验发现:

[0534] a. PM01183和替莫唑胺的联合治疗对于抑制U87-MG脑肿瘤细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为17.4%和30.9%(第16天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为3mg/kg和1.5mg/kg的替莫唑胺)相比,PM01183和替莫唑胺的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(3mg/kg替莫唑胺+0.18mg/kg PM01183)对单独的替莫唑胺(3mg/kg替莫唑胺)的TC(%)值为18.3对22.9(第11天),16.6对28.4(第14天)及17.4对31.5(第16天),且组合(1.5mg/kg替莫唑胺+0.135mg/kg PM01183)对单独的替莫唑胺(1.5mg/kg替莫唑胺)的TC(%)值为29.1对59.3(第11天),29.0对50.0(第14天)及30.9对53.5(第16天)。因此,当PM01183与替莫唑胺联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0535] 此外,基于中效原理,PM01183和替莫唑胺的联合施用的结果是CI值低于1 (Fa高于0.8),这表明在患有脑U87-MG异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用。

[0536] 实施例17. 体内研究以确定PM01183与依立替康的联合在人肺肿瘤异种移植中的效果。

[0537] 这些研究的目的在于通过使用人肺癌异种移植模型,评估PM01183加强依立替康的抗肿瘤活性的能力。

[0538] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠 (Harlan Laboratories Models, S.L. (西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23°C下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0539] 在这些研究中使用的肿瘤模型是H460细胞系,其从美国菌种保藏中心(ATCC ref. HTB-177™)获得。

[0540] H460细胞在37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下,在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中生长。使用26G针头和1cc注射器,对每只动物在右侧腹皮下植入含有5x10<sup>6</sup>H460细胞(该细胞来自体外第10代)的0.05ml的50%基质胶和50%无血清培养基,不含抗生素的悬浮液。

[0541] 根据实施例13中公开的方法进行肿瘤测量和治疗耐受性测定。

[0542] 当肿瘤的体积达到大约177mm<sup>3</sup>时,根据体重,小鼠被随机分配到治疗组和对照组中(N=5-7/组),并通过NewLab肿瘤学软件(2.25.06.00版)测量肿瘤体积。

[0543] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶形式提供,然后用输液用水重新获得0.2mg/mL的浓度。在5%注射用葡萄糖糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。依立替康以溶液形式提供,其通过在5%注射用葡萄糖糖溶液中稀释产物至目标终浓度而获得。

[0544] 在这些实验中,PM01183和依立替康的治疗及安慰剂按以下方式静脉施用:PM01183每周一次,连续两周,分别在第0天和第7天,依立替康每4天一次,分别在第0天、第4天和第8天,安慰剂的施用与PM01183和依立替康的施用方案相同。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0545] 比较治疗组(T)的平均肿瘤体积与对照组(T/C x 100%)的平均肿瘤体积,从而评估抗肿瘤效果。另外,使用实施例13所公开的方法确定增强作用和联合指数(CI)。

[0546] 表20记录了单独施用PM01183和依立替康,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图270示出了使用安慰剂、PM01183、依立替康和相应的各组以两者最高剂量比联合治疗的小鼠体内H460肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0547] 表20

组	剂量	实验材料	天数 T/C %					
			0	2	5	7	9	12
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	114.4	79.6	74.7	75.0	69.1	64.9
G03	0.135 mg/kg	PM01183	117.6	77.4	67.5	71.7	66.7	52.9
G04	0.09 mg/kg	PM01183	116.9	83.1	83.9	76.9	80.6	84.9
G05	0.045 mg/kg	PM01183	108.3	78.7	61.2	67.2	78.8	87.9
G06	50.0 mg/kg	依立替康	112.1	54.9	34.7	27.5	24.8	22.9
[0548] G07	37.5 mg/kg	依立替康	114.9	51.9	44.0	36.7	35.6	37.0
G08	25.0 mg/kg	依立替康	112.0	55.6	54.9	49.6	53.1	51.8
G09	12.5 mg/kg	依立替康	97.5	50.3	44.4	48.6	50.0	51.5
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 依立替康	117.1	44.3	19.4	13.4	10.9	9.0
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 依立替康	111.2	51.7	23.8	18.4	15.7	15.3
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 依立替康	110.0	53.2	38.1	26.6	28.0	27.1
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 依立替康	109.0	60.4	60.1	56.5	60.0	58.5

[0549] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0550] 根据该试验发现:

[0551] a. PM01183和依立替康的联合治疗对于抑制H460肺肿瘤细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为9.0%和15.3%(第12天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为50mg/kg和37.5mg/kg的依立替康)相比,PM01183和依立替康的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(50mg/kg依立替康+0.18mg/kg PM01183)对单独的依立替康(50mg/kg依立替康)的TC(%)值为19.4对34.7(第5天),13.4对27.5(第7天),10.9对24.8(第9天)及9.0对22.9(第12天),且组合(37.5mg/kg依立替康+0.135mg/kg PM01183)对单独的依立替康(37.5mg/kg依立替康)的TC(%)值为23.8对44.0(第5天)、18.4对36.7(第7天)、15.7对35.6(第9天)、15.3对37.0(第12天)。因此,当PM01183与依立替康联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0552] 此外,基于中效原理,PM01183和依立替康的联合施用的结果是CI值低于1( $F_a$ 高于0.8),这表明在患有肺H460异种移植肿瘤的小鼠中,它们的联合具有协同作用或强协同作用。

[0553] 实施例18. 体内研究以确定PM01183与氮烯唑胺的联合在人纤维肉瘤异种移植中的效果。

[0554] 这些研究的目的在于通过使用人纤维肉瘤异种移植模型,评估PM01183加强替莫唑胺的抗肿瘤活性的能力。

[0555] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠(Harlan Laboratories Models,S.L.(西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23°C下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞

悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0556] 在这些研究中使用的肿瘤模型是HT1080细胞系,其从美国菌种保藏中心(ATCC CCL-121™)获得。

[0557] HT1080细胞在37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下,在最低必需培养基(MEME)中生长。使用26G针头和1cc注射器,通过肌肉注射对每只动物在腓肠肌肌肉原位植入含有5x10<sup>6</sup>个HT1080细胞(该细胞来自体外第9代)的无血清培养基且不含抗生素的悬浮液。

[0558] 通过使用数显卡尺(Fowler Sylvac,S235PAT)测定总直径(肿瘤+小腿)。从治疗第一天开始,每周测量总直径和动物体重2-3次。

[0559] 通过监测体重变化,临床症状及注射部位局部损伤的迹象评估治疗的耐受性。

[0560] 当总直径长度达到大约11.3mm时,根据体重,小鼠被随机分配到治疗组和对照组中(N=5-7/组),并通过NewLab肿瘤学软件(2.25.06.00版)测量肿瘤。

[0561] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶形式提供,然后用输液用水重新获得0.2mg/mL的浓度。在5%注射用葡萄糖糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。氮烯唑胺以溶液形式提供,其通过在5%注射用葡萄糖糖溶液中稀释产物至目标终浓度而获得。

[0562] 在这些实验中,PM01183和氮烯唑胺的治疗及安慰剂都通过静脉施用,每周一次,连续两周,分别在第0天和第7天。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0563] 比较治疗组(T)的平均总直径(肿瘤+小腿)与对照组(T/C x100%)的平均总直径(肿瘤+小腿),从而评估抗肿瘤效果。另外,使用实施例13所公开的方法确定增强作用和联合指数(CI)。

[0564] 表21记录了单独施用PM01183和氮烯唑胺,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图271示出了使用安慰剂、PM01183、氮烯唑胺和相应的各组以两者最高剂量比联合治疗的小鼠体内HT1080肿瘤的总直径(肿瘤+小腿)的评估值。

[0565] 表21

组	剂量	实验材料	天数 T/C %								
			0	2	4	7	9	11	14	16	
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100	59.3	40.0	26.9	26.7	11.5	21.2	30.6	
G03	0.135 mg/kg	PM01183	100	63.0	62.9	48.1	36.0	30.2	33.0	41.9	
G04	0.09 mg/kg	PM01183	100	66.7	57.1	65.4	48.0	42.7	45.8	56.4	
G05	0.045 mg/kg	PM01183	100	77.8	74.3	94.2	80.0	74.0	80.5	91.1	
G06	150.0 mg/kg	氮烯唑胺	100	40.7	28.6	30.8	44.0	37.5	44.9	57.3	
G07	112.5 mg/kg	氮烯唑胺	100	48.1	34.3	53.8	48.0	37.5	43.2	53.2	
[0566] G08	75.0 mg/kg	氮烯唑胺	100	74.1	65.7	69.2	58.7	45.8	46.6	51.6	
G09	37.5 mg/kg	氮烯唑胺	100	51.8	54.3	65.4	61.3	47.9	55.1	62.1	
G10	0.18 mg/kg 150.0 mg/kg	PM01183 氮烯唑胺	100	37.0	22.9	17.3	4.0	10.4	-4.2	1.0	
G11	0.135 mg/kg 112.5 mg/kg	PM01183 氮烯唑胺	100	29.6	25.7	11.5	-8.0	-17.7	-6.8	7.3	
G12	0.09 mg/kg 75.0 mg/kg	PM01183 氮烯唑胺	100	37.0	31.4	28.8	52.0	43.7	50.8	64.5	
G13	0.045 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 氮烯唑胺	100	55.6	51.4	67.3	70.7	62.5	59.3	62.1	

[0567] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0568] 根据该试验发现:

[0569] a. PM01183和氮烯唑胺的联合治疗对于抑制HT1080纤维肉瘤细胞的生长是有效的,与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小 ( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为1.0%和7.3% (第16天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为0.18mg/kg和0.135mg/kg的PM01183)相比,PM01183和氮烯唑胺的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(150mg/kg氮烯唑胺+0.18mg/kg PM01183)对单独的PM01183(0.18mg/kg PM01183)的TC(%)值为4.0对26.7(第9天),10.4对11.5(第11天),-4.2对21.2(第14天)及1.0对30.6(第16天),且组合(112.5mg/kg氮烯唑胺+0.135mg/kg PM01183)对单独的PM01183(0.135mg/kg PM01183)的TC(%)值为-8.0对36.0(第9天),-17.7对30.2(第11天),-6.8对33.0(第14天)及7.3对41.9(第16天)。因此,当PM01183与氮烯唑胺联合施用时,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0570] 此外,基于中效原理,PM01183和氮烯唑胺的联合施用的结果是CI值为0.28 ( $F_a$ 等于0.97),这表明在小鼠纤维肉瘤HT1080原位植入肿瘤中,它们的联合具有强协同作用。

[0571] 实施例19. 体内研究以确定PM01183与依立替康的联合在人结直肠肿瘤异种移植

中的效果。

[0572] 这些研究的目的在于通过使用人结直肠肿瘤异种移植模型,评估PM01183加强依立替康的抗肿瘤活性的能力。

[0573] 在所有的试验中使用雌性无胸腺裸鼠 (Harlan Laboratories Models, S.L. (西班牙巴塞罗那))。动物被安置在独立通风笼,每笼多达10只,12小时光-暗循环,21-23°C下,湿度40-60%。允许这些小鼠自由摄入辐照标准的啮齿动物的食物和无菌水。在使用肿瘤细胞悬浮液进行肿瘤移植之前,至少使动物适应5天。

[0574] 在这些研究中使用的肿瘤模型是HT-29细胞系,其从美国菌种保藏中心(ATCC ref. HTB-38™)获得。

[0575] HT-29细胞在37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下,在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中生长。使用26G针头和1cc注射器,对每只动物在右侧腹皮下植入含有5x10<sup>6</sup>个HT-29细胞(该细胞来自体外第10代)的0.05ml的0.9%注射用氯化钠溶液。

[0576] 根据实施例13中公开的方法进行肿瘤测量和治疗耐受性测定。通过监测体重变化,临床症状及注射部位局部损伤的迹象评估治疗的耐受性。

[0577] 当肿瘤的体积达到大约180mm<sup>3</sup>时,根据体重,小鼠被随机分配到治疗组和对照组中(N=5-7/组),并通过NewLab肿瘤学软件(2.25.06.00版)测量肿瘤体积。

[0578] PM01183以装有冻干PM01183饼的小瓶形式提供,然后用输液用水重新获得0.2mg/mL的浓度。在5%注射用葡萄糖溶液中进一步稀释PM01183原液,直到达到配制制剂的浓度。依立替康以溶液的形式提供,其通过5%注射用葡萄糖溶液稀释产物至目标终浓度而获得。

[0579] 在这些实验中,PM01183和依立替康的治疗及安慰剂按以下方式静脉施用,PM01183每周一次,连续三周,分别在第0天、第7天和第14天进行,依立替康每4天一次,分别在第0天、第4天、第8天、第12天和第16天,安慰剂的施用与PM01183和依立替康的施用方案相同。剂量水平组或者以单剂量施用或者以联合剂量施用。

[0580] 比较治疗组(T)的平均肿瘤体积与对照组(T/C x 100%)的平均肿瘤体积,从而评估抗肿瘤效果。另外,使用实施例13所公开的方法确定增强作用。

[0581] 表22记录了单独施用PM01183和依立替康,以及每个剂量水平联合施用获得的T/C%值,并且图272示出了使用安慰剂、PM01183、依立替康和相应的各组以两者最高剂量比联合治疗的小鼠体内HT-29肿瘤的肿瘤体积评估值。

[0582] 表22

			天数 T/C %				
组	剂量	实验材料	0	3	5	7	10
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100.4	108.4	86.5	101.1	116.5
G03	0.135 mg/kg	PM01183	98.4	106.4	95.3	116.6	115.2
G04	0.09 mg/kg	PM01183	98.4	100.9	88.7	121.9	129.8
G05	0.045 mg/kg	PM01183	99.8	103.7	100.6	111.1	135.8
G06	50.0 mg/kg	依立替康	100.1	114.7	93.7	96.1	70.5
G07	37.5 mg/kg	依立替康	98.4	108.1	97.5	99.2	84.3
G08	25.0 mg/kg	依立替康	98.8	108.6	97.2	101.4	96.5
G09	12.5 mg/kg	依立替康	99.0	99.1	90.6	97.4	92.7
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 依立替康	99.5	101.8	78.3	77.5	51.6
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 依立替康	98.4	98.0	85.2	85.4	60.7
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 依立替康	99.7	96.4	71.7	77.0	62.7
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 依立替康	100.7	104.8	104.3	116.0	98.8

[0583]

[0584] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0585] 表22(续)

			天数 T/C %			
组	剂量	实验材料	12	14	17	20
G01 (对照组)	10 ml/kg	安慰剂	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	115.4	123.4	86.7	77.5
G03	0.135 mg/kg	PM01183	119.1	121.5	133.1	105.2
G04	0.09 mg/kg	PM01183	114.1	109.4	116.1	93.4
G05	0.045 mg/kg	PM01183	125.1	109.3		
G06	50.0 mg/kg	依立替康	61.7	51.7	41.4	33.3
G07	37.5 mg/kg	依立替康	77.4	65.0	58.4	49.4
G08	25.0 mg/kg	依立替康	79.3	82.5	76.3	60.3
G09	12.5 mg/kg	依立替康	90.8	89.4	102.6	93.4
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 依立替康	43.8	30.4	21.7	15.6
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 依立替康	51.9	40.1	39.2	28.7
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 依立替康	57.7	50.1	47.2	40.7
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 依立替康	85.5	90.5	88.1	76.5

[0586]

[0587] 安慰剂:如表13中所公开的。

[0588] 根据该试验发现:

[0589] a. PM01183和依立替康的联合治疗对于抑制U87-MG脑肿瘤细胞的生长是有效的,

与对照组相比,具有统计上显著的肿瘤减小( $P < 0.01$ ),在两个高剂量组中,T/C值为15.6%和28.7%(第20天)。此外,与在该实验中更具活性的单独试剂(剂量为50mg/kg和37.5mg/kg的依立替康)相比,PM01183和依立替康的联合产生更低的T/C值。具体地,组合(50mg/kg依立替康+0.18mg/kg PM01183)对单独的依立替康(37.5mg/kg依立替康)的TC(%)值为30.4对51.7(第14天)、21.7对41.4(第17天)及15.6对33.3(第20天),且组合(37.5mg/kg依立替康+0.135mg/kg PM01183)对单独的依立替康(37.5mg/kg依立替康)的TC(%)值为40.1对65.0(第14天)、39.2对58.4(第17天)、及28.7对49.4(第20天)。因此,当PM01183与依立替康联合施用,可观察到明显增强的抗肿瘤活性。

[0590] **实施例20.** 体外研究以确定PM01183与化学治疗剂的联合在人白血病细胞系中的效果。

[0591] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:氨甲喋呤、柔红霉素、aplidine、ET-743、PM02734和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并储存在 $-20^{\circ}\text{C}$ )。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50 $\mu\text{L}$ 等分液加入到每孔中。

[0592] 选择人白血病细胞系JURKAT和MOLT-4进行该试验,其从美国菌种保藏中心(ATCC)获得。JURKAT和MOLT-4细胞在 $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 和95%湿度条件下,在无酚红的RPMI培养基中生长,该培养基中添加了10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素。

[0593] 筛选分两部分进行:

[0594] a. 在第一组实验中,使用72小时体外暴露的细胞毒性试验测定每种化合物对抗不同细胞系的相对效力。

[0595] 简言之,细胞以每孔150 $\mu\text{L}$ 培养基中50000细胞的密度接种于96孔微量滴定板,且用单独的载体或待测化合物治疗72小时之前在无药物的培养基中培养4-6小时。

[0596] 培养后,利用MTT还原试验评价细胞毒效应。将50 $\mu\text{L}$  MTT溶液(1mg/mL)加入孔中并在 $37^{\circ}\text{C}$ 下培养15-17小时,直到形成甲臞晶体。缓慢去除培养基后,加入DMSO以使不溶性紫色甲臞产物溶解形成有色溶液。通过测量540nm下的光密度确定孔的吸光度。结果表示为对照细胞生长的百分比。利用Prism v5.02软件(GraphPad)计算联合研究中使用的EC50值(最大有效浓度的一半)。EC50以摩尔浓度表示并且以至少三个独立实验的平均值表示。

[0597] 表23和24示出了每种药物获得的各自EC50值。

[0598] 表23:用于JURKAT肿瘤细胞系的每种药物的EC50值(摩尔浓度(M))

化合物	EC50 (M)	化合物	EC50 (M)	化合物	EC50 (M)
氨甲喋呤	1.45E-07	柔红霉素	7.92E-07	Aplidine	1.38E-08
ET-743	6.96E-09	PM00104	4.83E-09	PM01183	1.55E-09
PM02734	5.50E-06				

[0600] 表24:用于MoLT-4肿瘤细胞系的每种药物的EC50值(摩尔浓度(M))

化合物	EC50 (M)	化合物	EC50 (M)	化合物	EC50 (M)
氨甲喋呤	4.39E-08	Aplidine	1.27E-09	ET-743	3.84E-09
PM00104	1.55E-09	PM01183	8.57E-10	PM02734	1.44E-05

[0602] b. 在第二组实验中,使用前段描述的相同方法进行单独及两种药物联合测定的药

物的浓度-响应曲线。

[0603] 鉴于本研究中PM01183和其他标准药物各自EC50值之间的显著差异,使用两种固定浓度药物的不同比例。通常情况下,浓度固定比的选择是每种药物在EC50值的等效比(1:1),及其他比例表示高于或低于每种药物相应的EC50值的不同百分比。使用这些初始浓度,进行恒定的连续稀释以获得每组药物单独或联合的浓度-响应曲线。

[0604] 对于肿瘤细胞的生存力,与每种药物单独的效果相比较,通过Chou和Talalay方法评价两种药物联合的效果,所述方法基于中效原理(Chou and Talalay, Adv. Enzyme Regul. 1984, 22, 27-55)。中效方程: $f_a/f_u = (C/C_m)^m$  (其中C为药物浓度,  $C_m$ 为中效浓度(即, IC50、ED50或LD50,其抑制所研究的系统的50%),  $f_a$ 是药物浓度C影响的细胞分数,  $f_u$ 是未受影响分数,  $m$ 是浓度-响应曲线的sigmoidicity系数),该方程描述了浓度和药物对给定生物系统的作用的关系。

[0605] 基于这个方程,术语“联合指数”(CI)用作药物相互作用程度的定量测量。通过以下方程测定联合指数(CI):

$$[0606] \quad CI = (C)_1 / (C_x)_1 + (C)_2 / (C_x)_2$$

[0607] 其中  $(C_x)_1$  是药物1单独抑制系统x百分比的浓度,  $(C_x)_2$  是药物2单独抑制系统相同的x百分比的浓度,且  $(C)_1 + (C)_2$  是药物1和药物2联合抑制系统x百分比的浓度。通过解方程不同的  $f_a$  值(即,不同的细胞生长抑制程度)计算CI值。CI值<1表示协同作用,值等于1表示加性效应,值>1表示拮抗作用。

[0608] 使用CalcuSyn软件(Biosoft,英国剑桥)分析数据。使用Prism软件(GraphPad, San Diego, USA)统计分析并绘图。所有结果以至少三次独立实验的平均值表示。

[0609] 图273-283示出了待测药物的联合对细胞增殖的影响。

[0610] -PM01183与氨甲喋呤的联合。在JURKAT(图273)细胞系中PM01183与氨甲喋呤的联合在两种药物的确定浓度下产生一些协同效应(CI<1)。在MOLT-4(图274)细胞系中PM01183与氨甲喋呤的联合主要是加性效应。

[0611] -PM01183与柔红霉素的联合。在JURKAT(图275)细胞系中PM01183与柔红霉素的联合在化合物的确定浓度下为加性效应或协同效应(CI<1)。

[0612] -PM01183与aplidine的联合。在JURKAT(图276)和MOLT-4(图277)细胞系中PM01183与aplidine的联合在两种药物的确定浓度下产生一些协同效应(CI<1)。

[0613] -PM01183与ET-743的联合。在JURKAT(图278)细胞系中PM01183与ET-743的联合在两种药物的确定浓度下为加性效应或协同效应(CI<1)。在MOLT-4(图279)细胞系中PM01183与ET-743的联合主要是加性效应。

[0614] -PM01183与PM00104的联合。在JURKAT(图280)细胞系中PM01183与PM00104的联合至少为加性效应,产生一些协同效应(CI<1)。在MOLT-4(图281)细胞系中PM01183与PM00104的联合产生协同效应(CI<1)。

[0615] -PM01183与PM02734的联合。在JURKAT(图282)细胞系中PM01183与PM02734的联合在两种药物的确定浓度下主要是加性效应,产生一些协同效应(CI<1)。在MOLT-4(图283)细胞系中PM01183与ET-743的联合产生协同效应(CI<1)。

[0616] 实施例21。体外研究以确定PM01183与化学治疗剂的联合在人淋巴瘤细胞系中的效果。

[0617] 将以下试剂与PM01183联合施用进行评价:吉西他滨、阿糖胞苷、氨甲喋呤、柔红霉素、ET-743、PM02734和PM00104(这些化合物的原液在纯DMSO中制备并储存在-20℃)。在无血清培养基中进行另外的连续稀释直到终浓度为4X。将每种稀释化合物的50μL等分液加入到每孔中。

[0618] 选择人淋巴瘤细胞系RAMOS和U-937进行该实验,其从美国菌种保藏中心(ATCC)获得。RAMOS和U-937细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>和95%湿度条件下,在无酚红的RPMI培养基中生长,该培养基中添加了10%牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/mL的青霉素-链霉素。

[0619] 如实施例20中所述筛选分两部分进行。

[0620] 在第一组实验中,表25和26示出了测定的每种药物的各自EC<sub>50</sub>值。

[0621] 表25:用于RAMOS肿瘤细胞系的每种药物的EC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0622]

化合物	EC <sub>50</sub> (M)	化合物	EC <sub>50</sub> (M)	化合物	EC <sub>50</sub> (M)
吉西他滨	2.51E-08	阿糖胞苷	3.64E-08	氨甲喋呤	5.02E-06
柔红霉素	3.15E-07	ET-743	9.55E-09	PM00104	4.35E-09
PM01183	1.39E-09	PM02734	1.36E-05		

[0623] 表26:用于U-937肿瘤细胞系的每种药物的EC<sub>50</sub>值(摩尔浓度(M))

[0624]

化合物	EC <sub>50</sub> (M)	化合物	EC <sub>50</sub> (M)	化合物	EC <sub>50</sub> (M)
吉西他滨	3.27E-08	氨甲喋呤	2.63E-08	柔红霉素	3.04E-07
ET-743	8.62E-09	PM00104	4.50E-09	PM01183	1.03E-09
PM02734	6.85E-06				

[0625] 在第二组实验中,进行单独及两种药物联合测定的药物的浓度-响应曲线。使用如实施例20中描述的Chou和Talalay方法评价药物联合的效果。

[0626] 图284-296示出了待测药物的联合对细胞增殖的影响。

[0627] -PM01183与阿糖胞苷的联合。在RAMOS(图284)细胞系中PM01183与阿糖胞苷的联合产生一些协同效应(CI<1)。

[0628] -PM01183与氨甲喋呤的联合。在RAMOS(图285)细胞系中PM01183与氨甲喋呤的联合在两种药物的确定浓度下产生一些协同效应(CI<1)。在U-937(图286)细胞系中PM01183与氨甲喋呤的联合在确定浓度下产生一些协同效应。

[0629] -PM01183与吉西他滨的联合。在RAMOS(图287)细胞系中PM01183与吉西他滨的联合在两种药物的确定浓度下为加性效应或协同效应(CI<1)。在U-937(图288)细胞系中PM01183与吉西他滨的联合产生协同效应(CI<1)。

[0630] -PM01183与柔红霉素的联合。在RAMOS(图289)和U-937(图290)细胞系中PM01183与柔红霉素的联合至少为加性效应,产生一些协同效应(CI<1)。

[0631] -PM01183与ET-743的联合。在RAMOS(图291)和U-937(图292)细胞系中PM01183与ET-743的联合在化合物的确定浓度下产生协同效应(CI<1)。

[0632] -PM01183与PM00104的联合。在RAMOS(图293)中PM01183与PM00104的联合产生协同效应(CI<1)。在U-937(图294)细胞系中PM01183与PM00104的联合在两种药物的确定浓度下产生一些协同效应(CI<1)。

[0633] -PM01183与PM02734的联合。在RAMOS(图295)细胞系中PM01183与PM02734的联合产生协同效应(CI<1),而在U-937(图296)细胞系中PM01183与ET-743的联合在两种药物最

高浓度下至少为加性效应,产生一些协同效应(CI<1)。

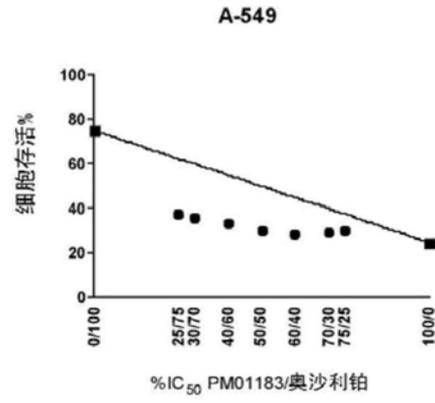


图1

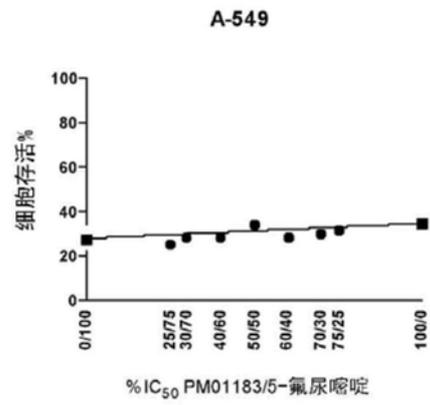


图2

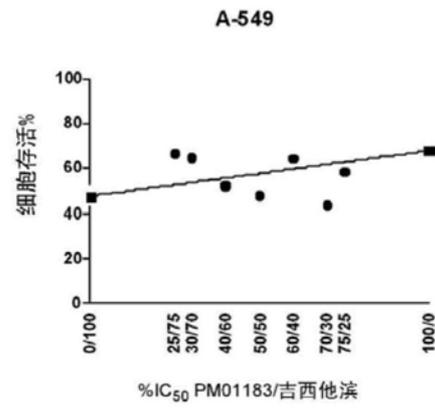


图3

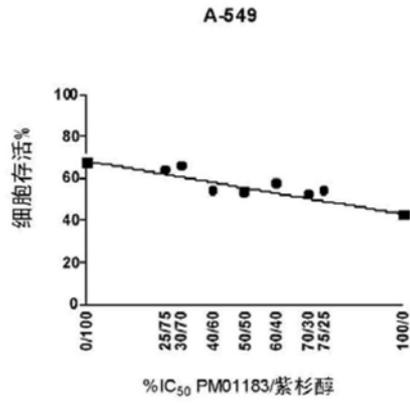


图4

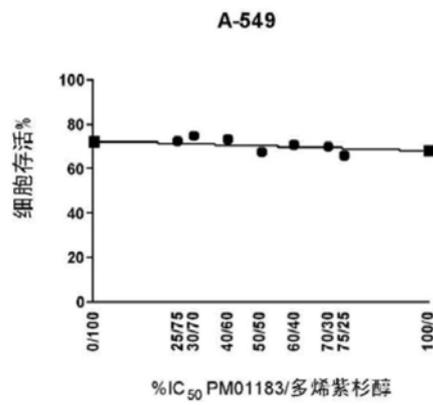


图5

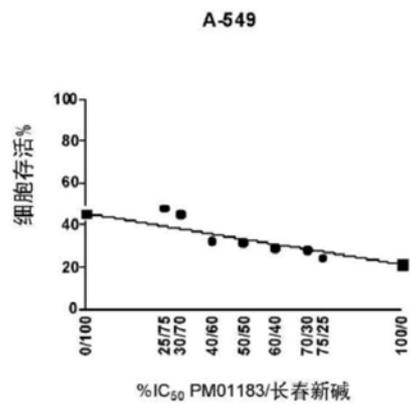


图6

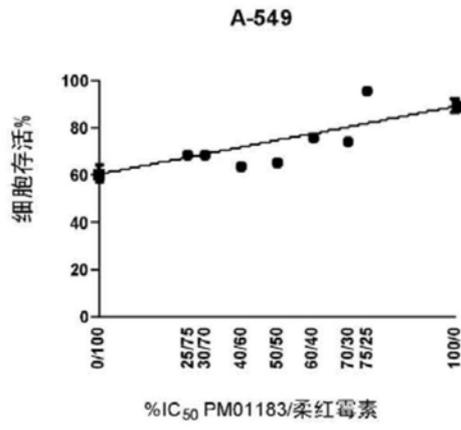


图7

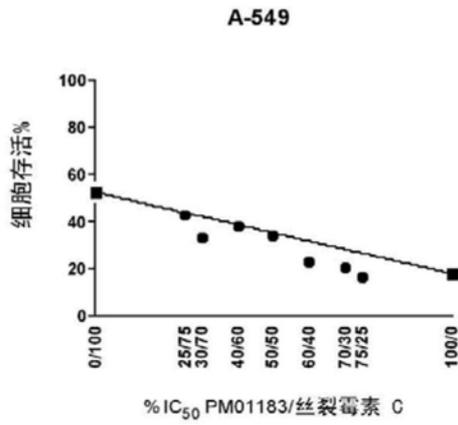


图8

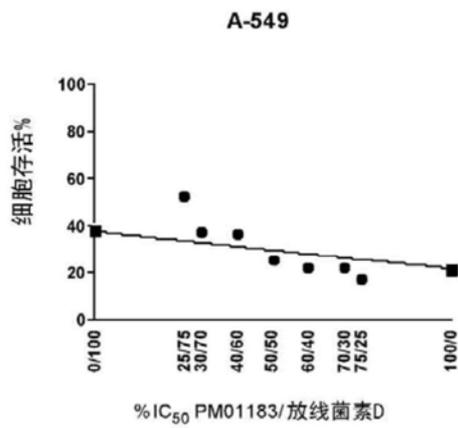


图9

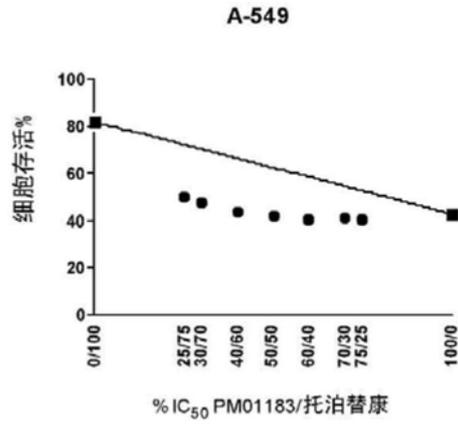


图10

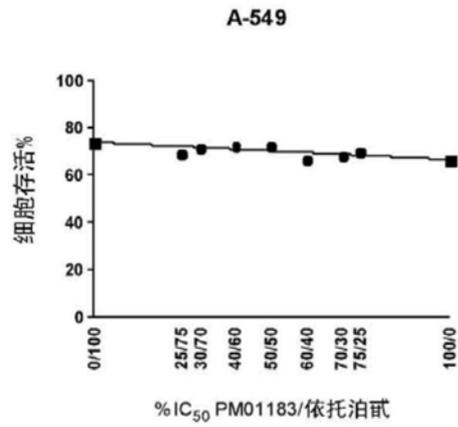


图11

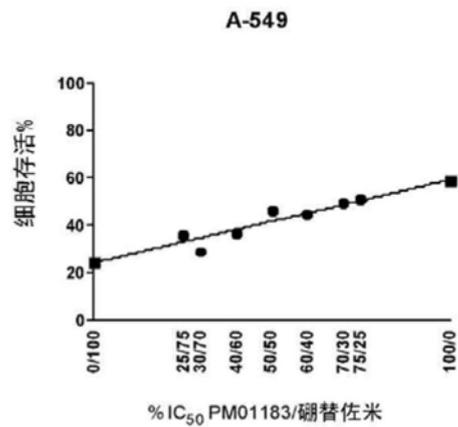


图12

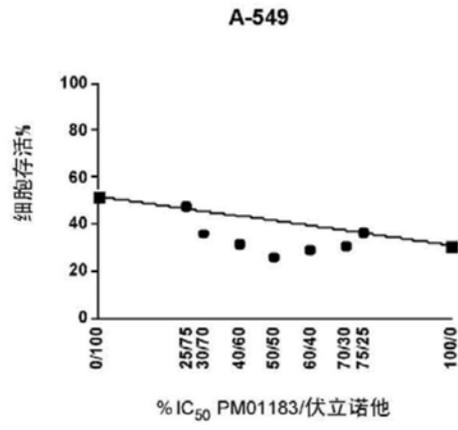


图13

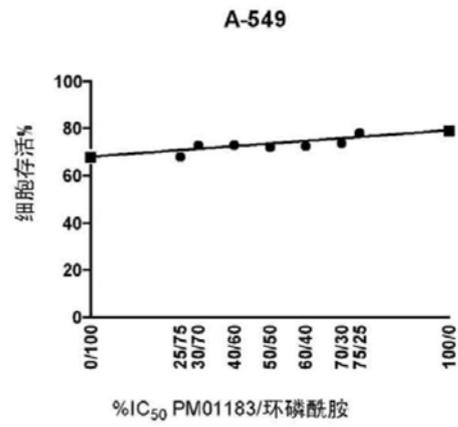


图14

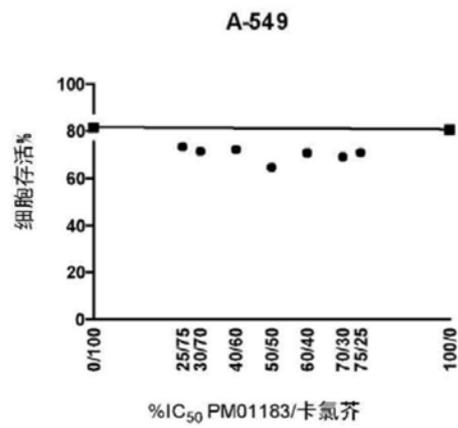


图15

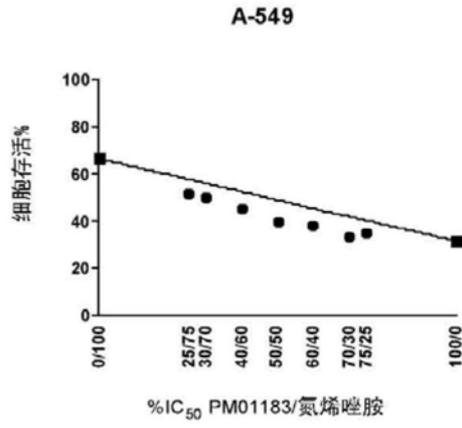


图16

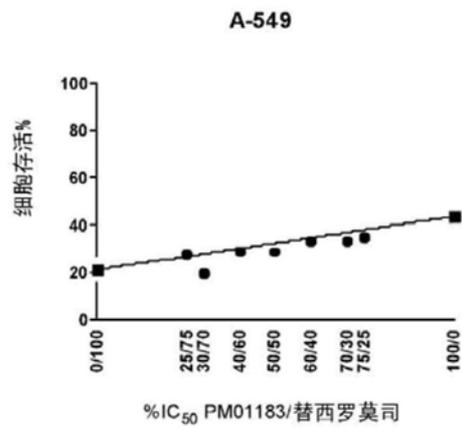


图17

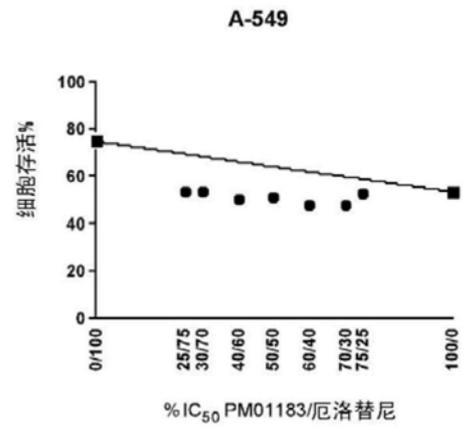


图18

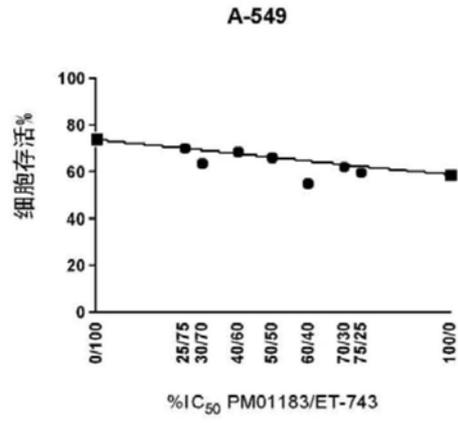


图19

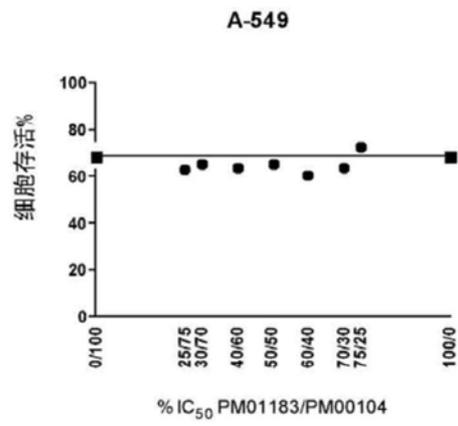


图20

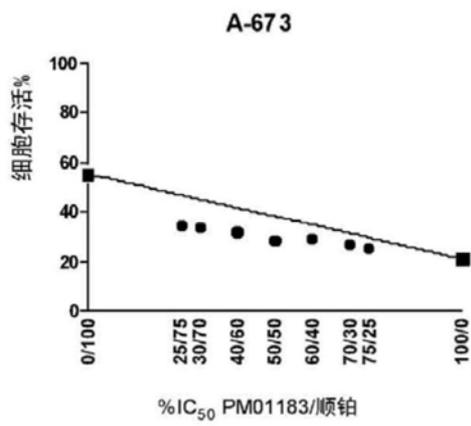


图21

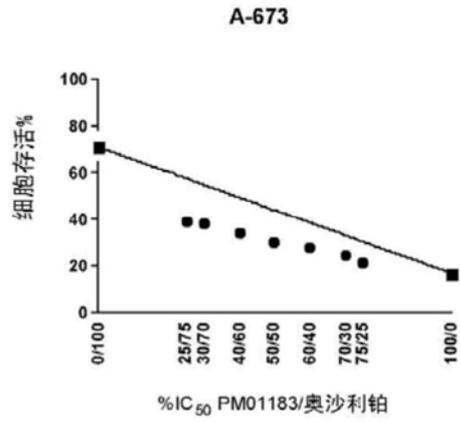


图22

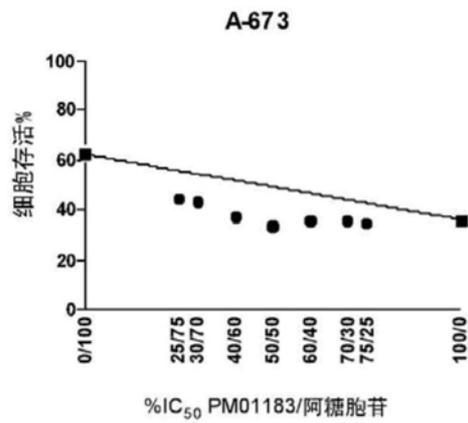


图23

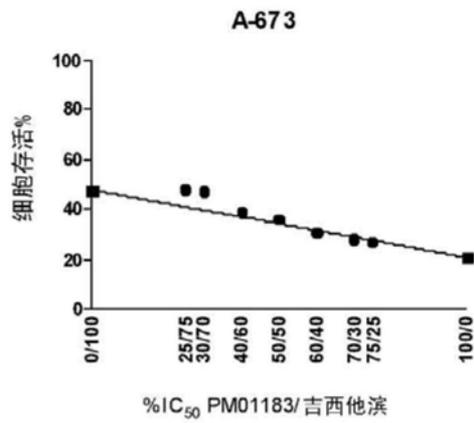


图24

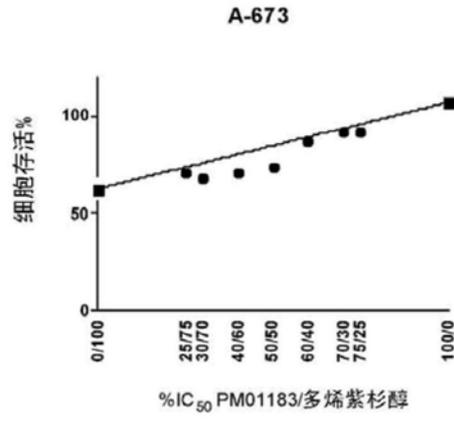


图25

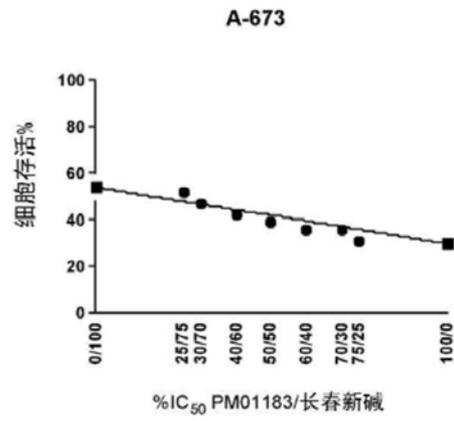


图26

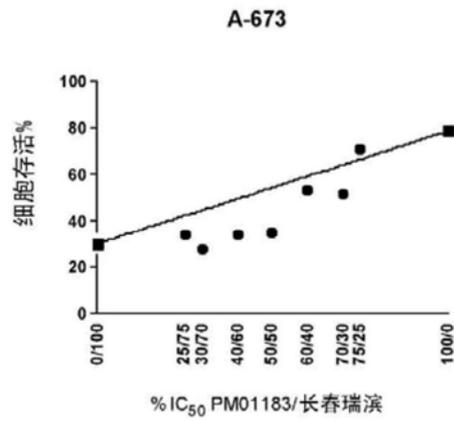


图27

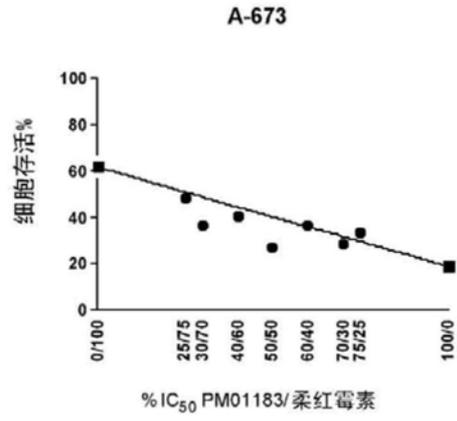


图28

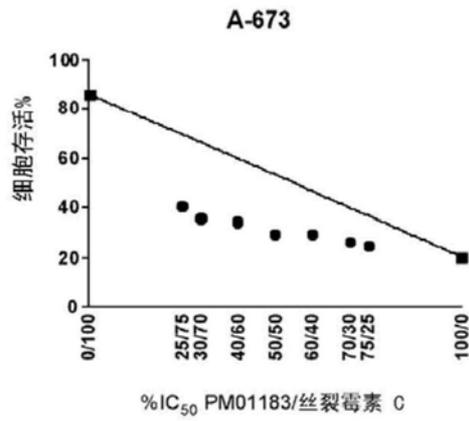


图29

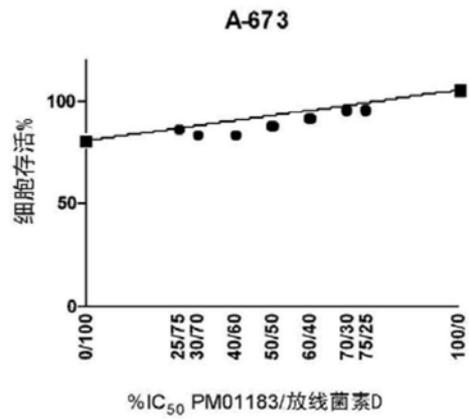


图30

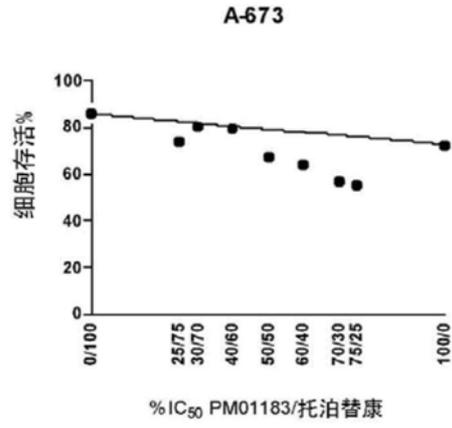


图31

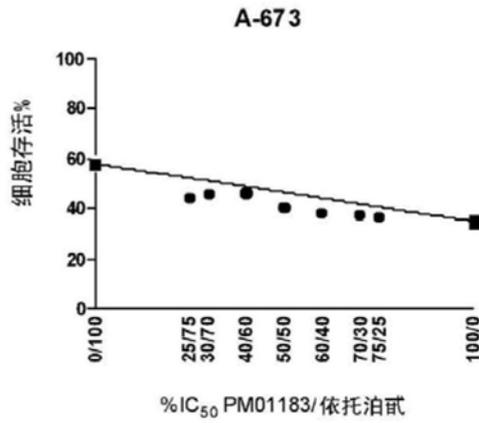


图32

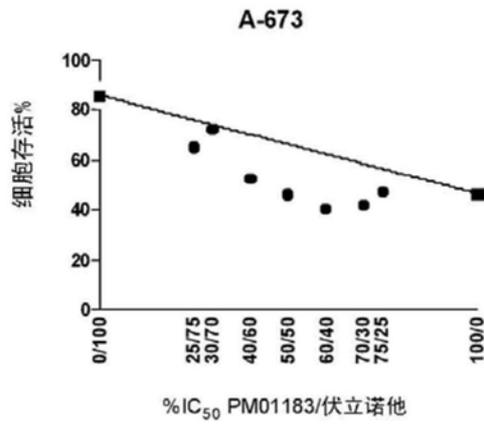


图33

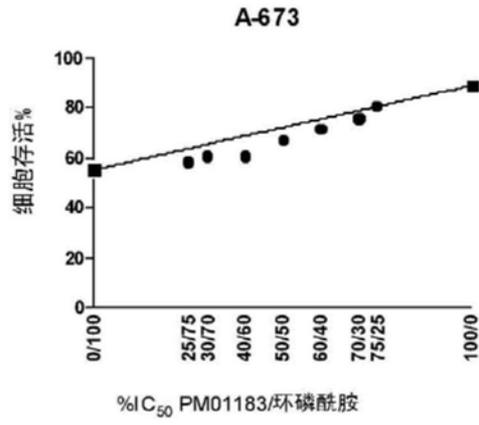


图34

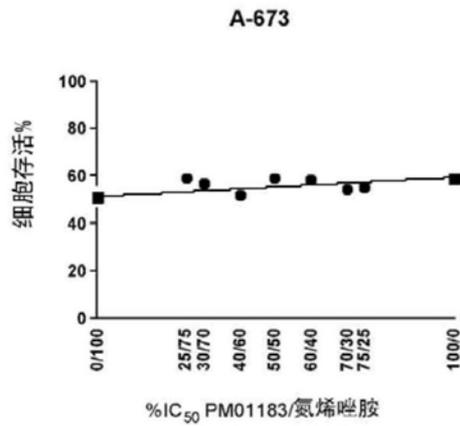


图35

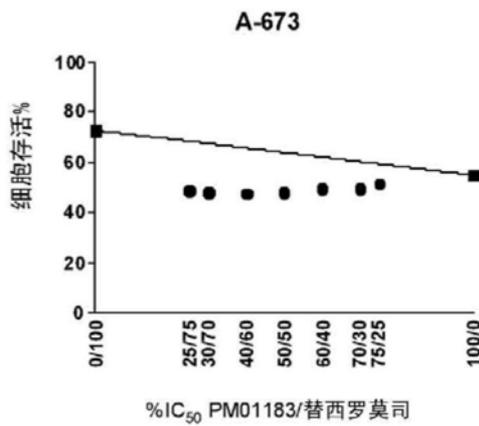


图36

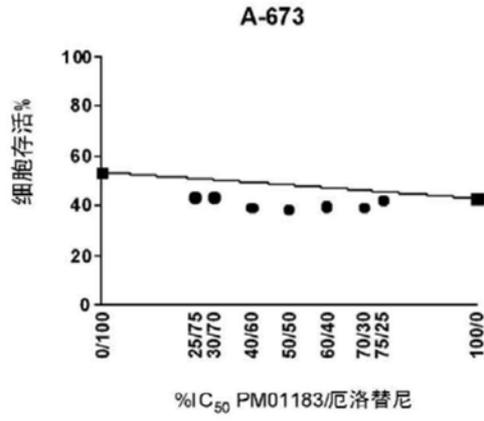


图37

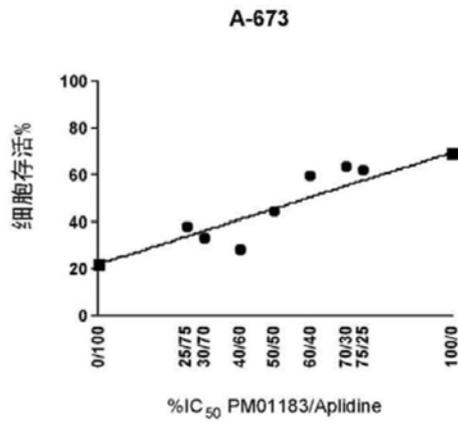


图38

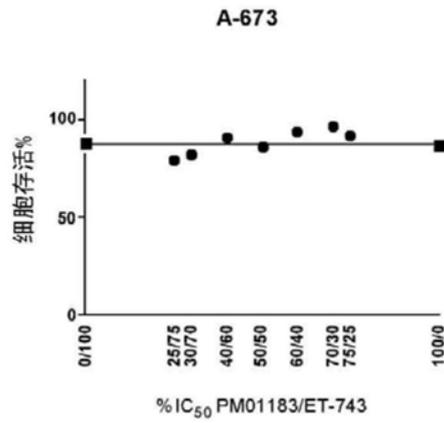


图39

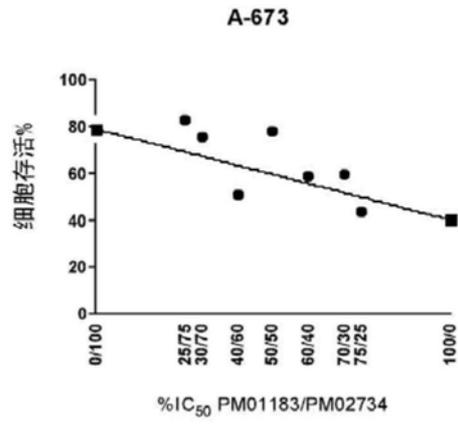


图40

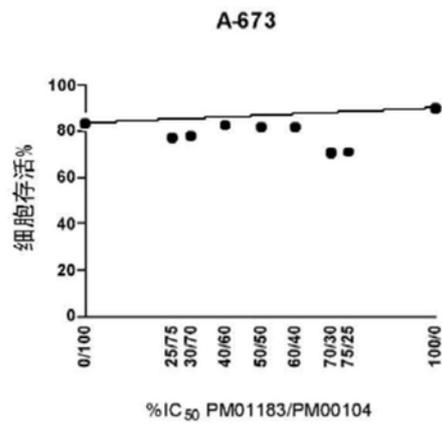


图41

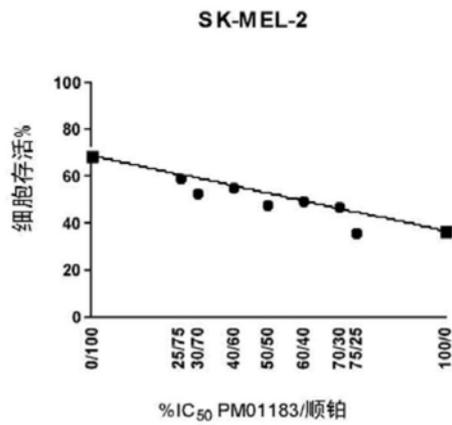


图42

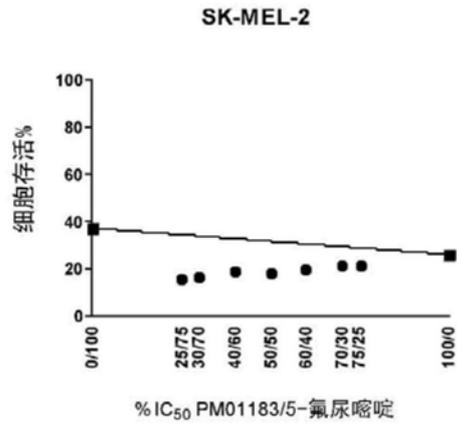


图43

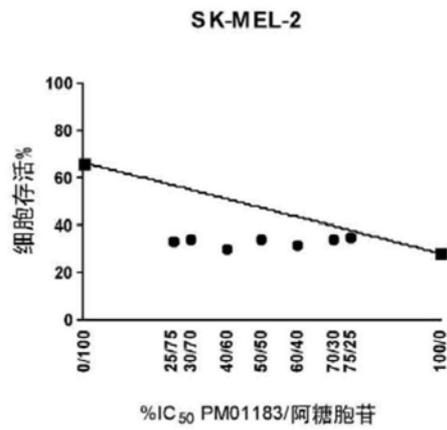


图44

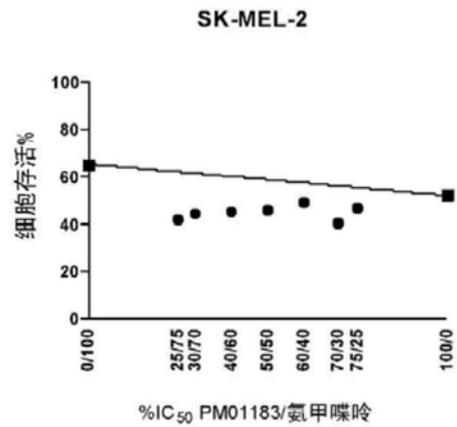


图45

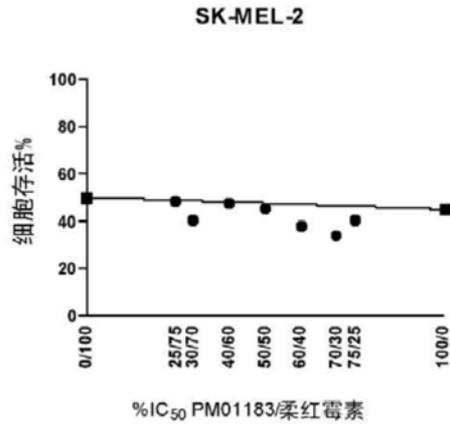


图46

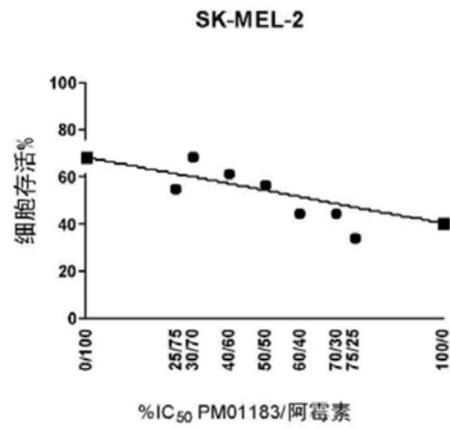


图47

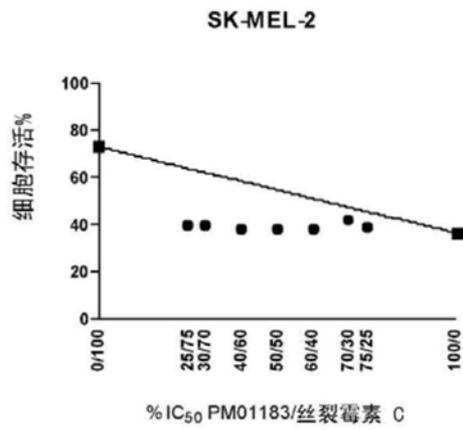


图48

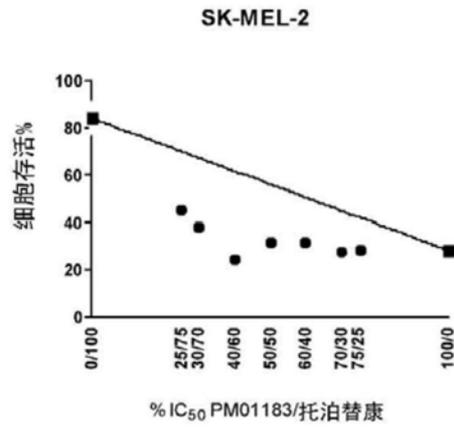


图49

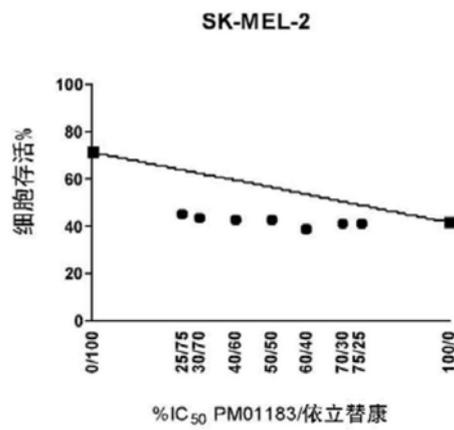


图50

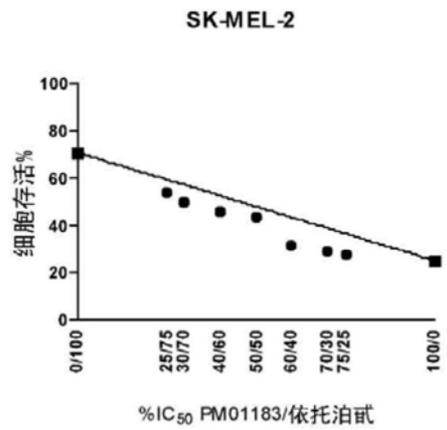


图51

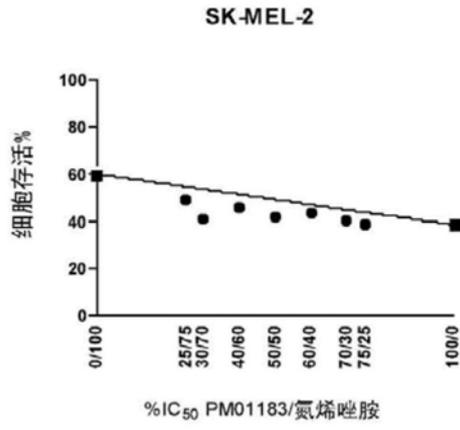


图52

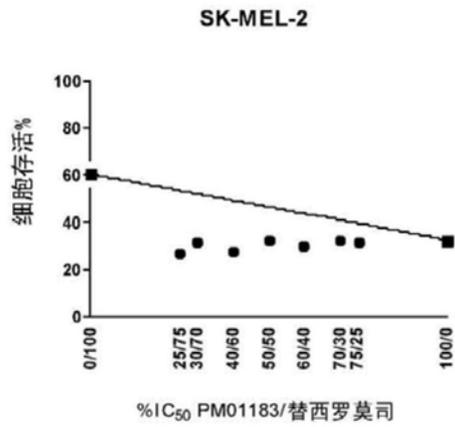


图53

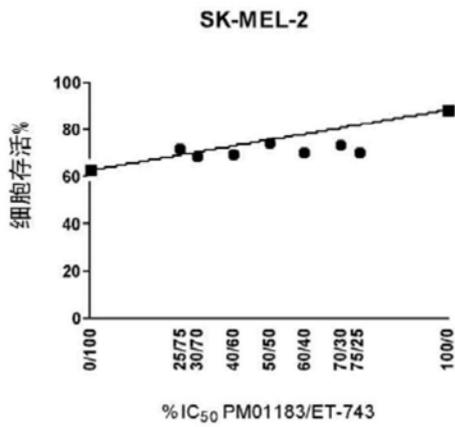


图54

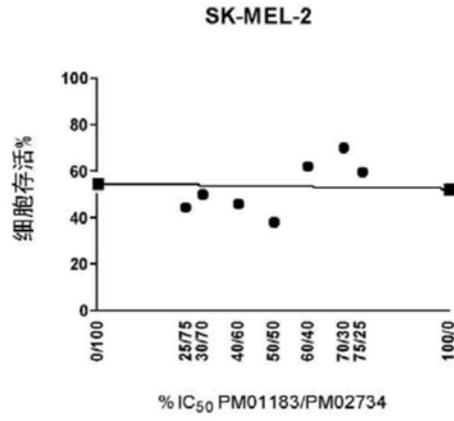


图55

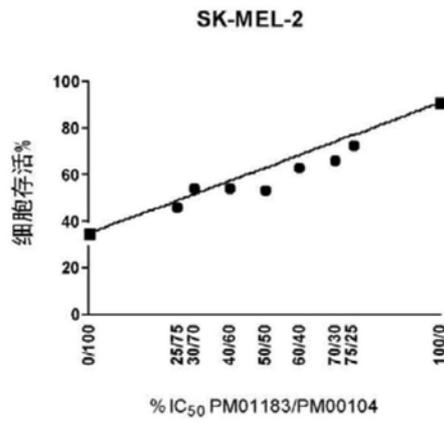


图56

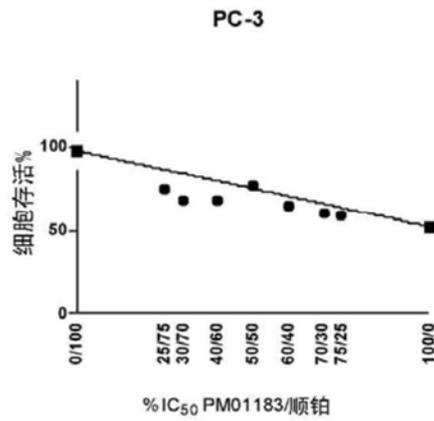


图57

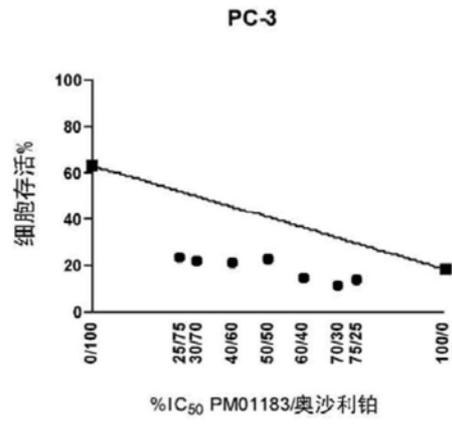


图58

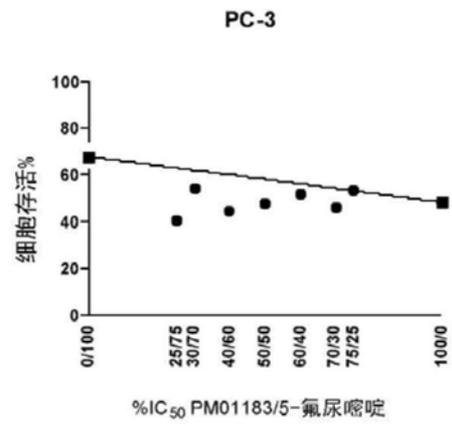


图59

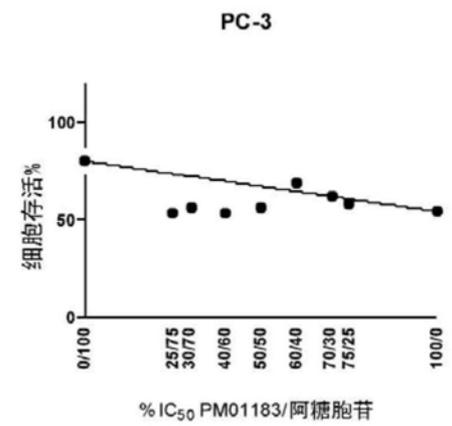


图60

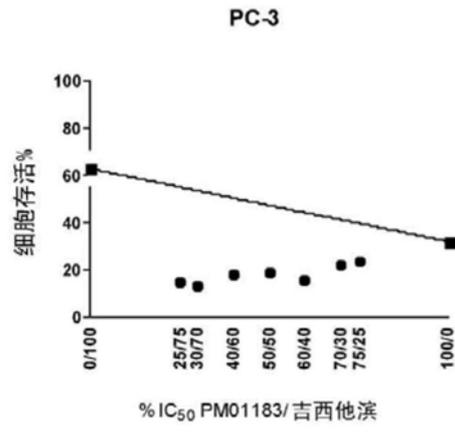


图61

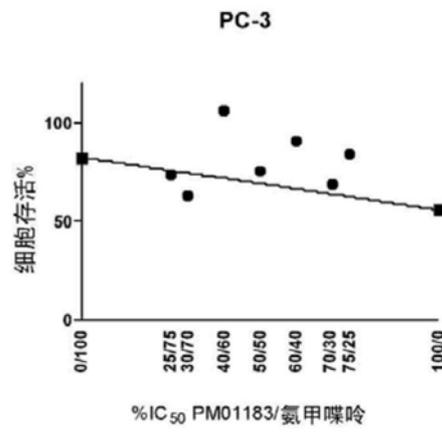


图62

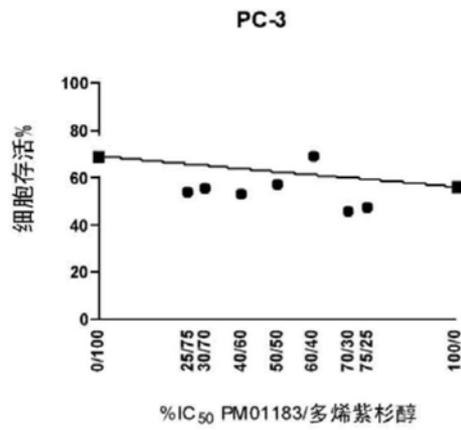


图63

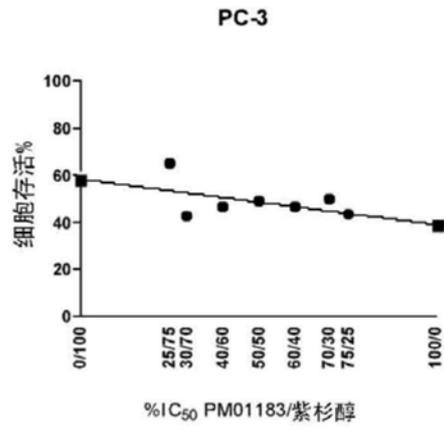


图64

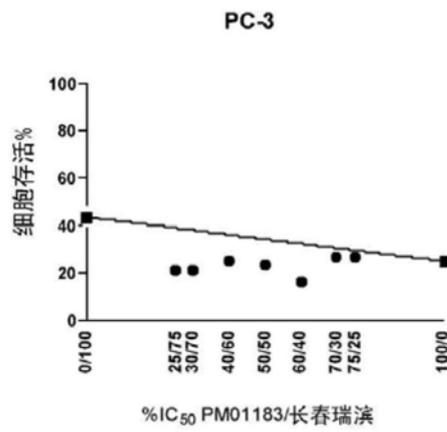


图65

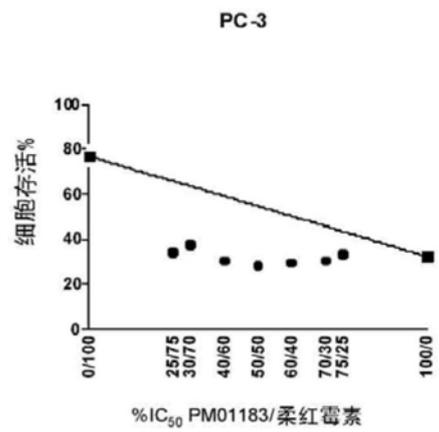


图66

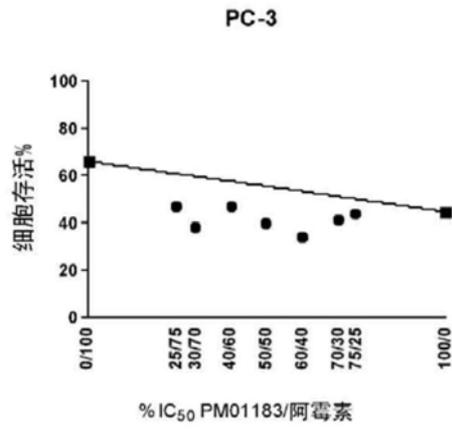


图67

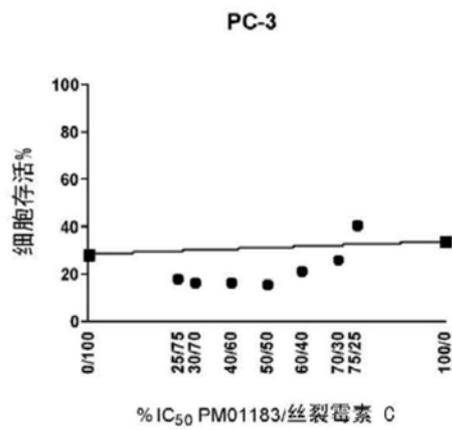


图68

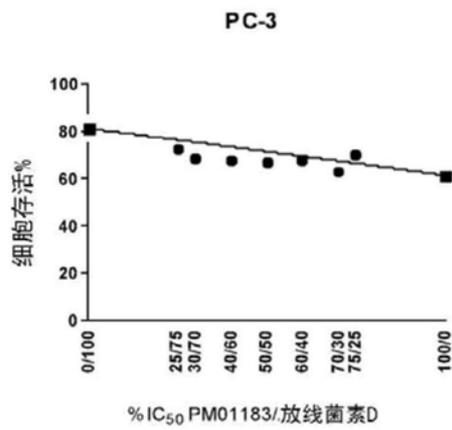


图69

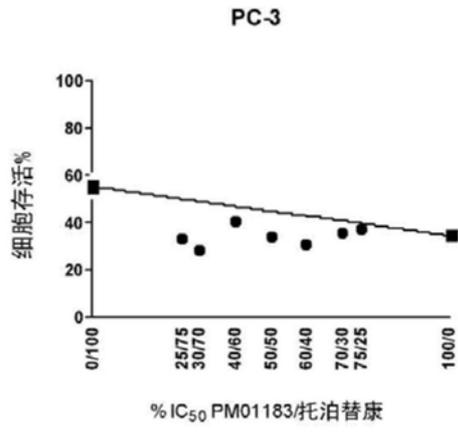


图70

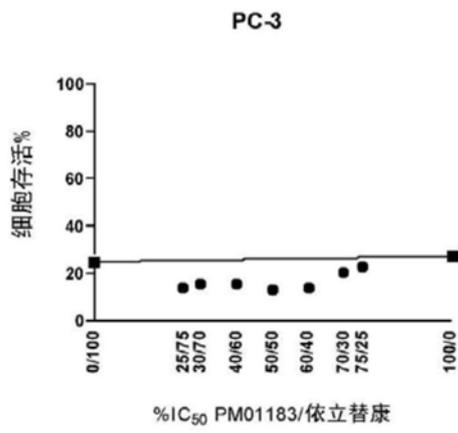


图71

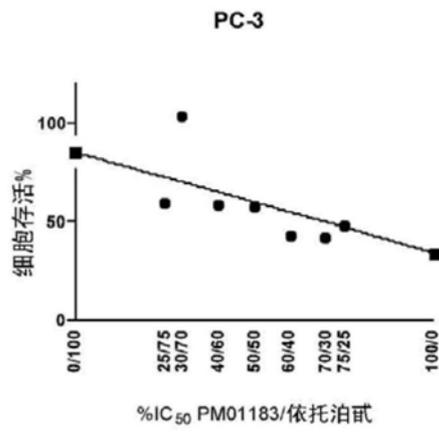


图72

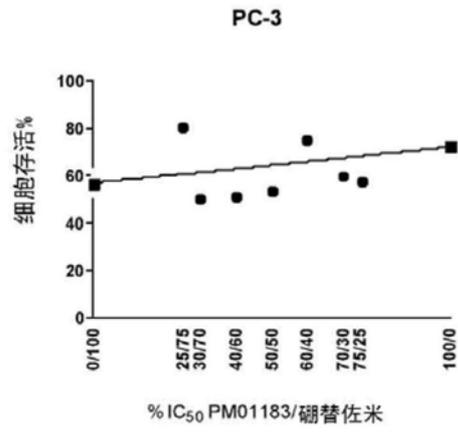


图73

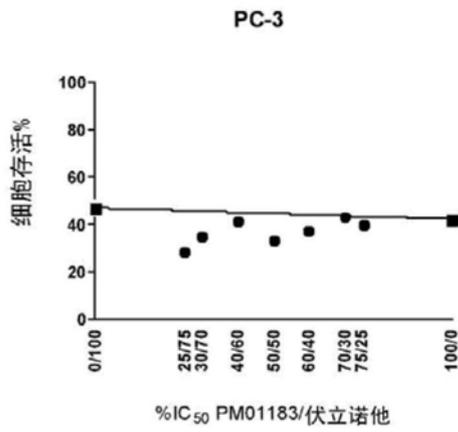


图74

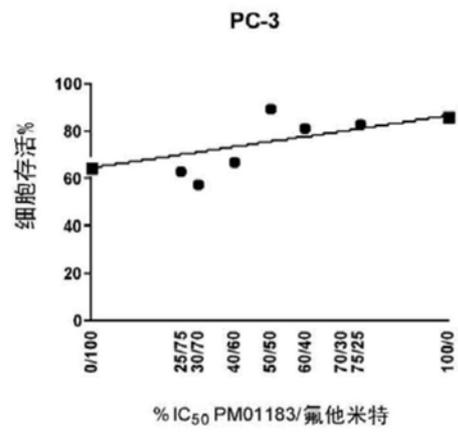


图75

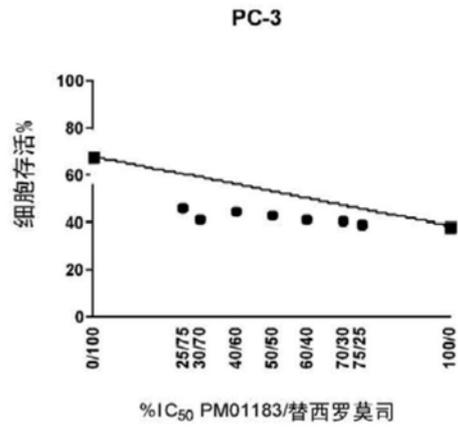


图76

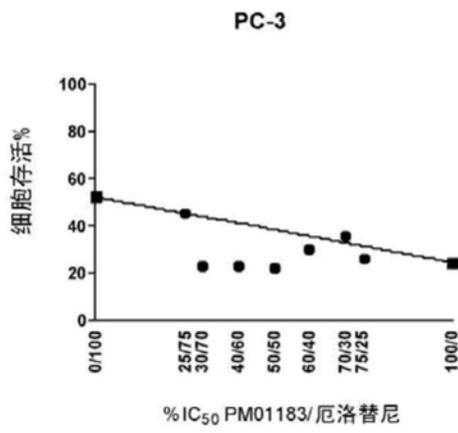


图77

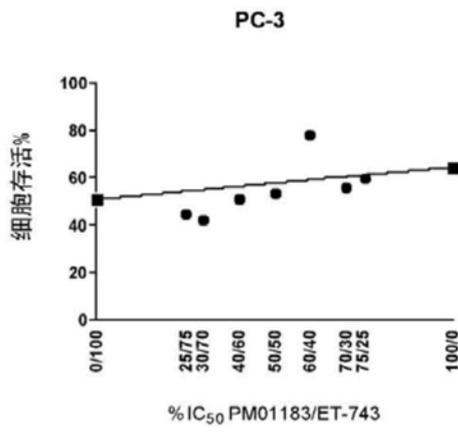


图78

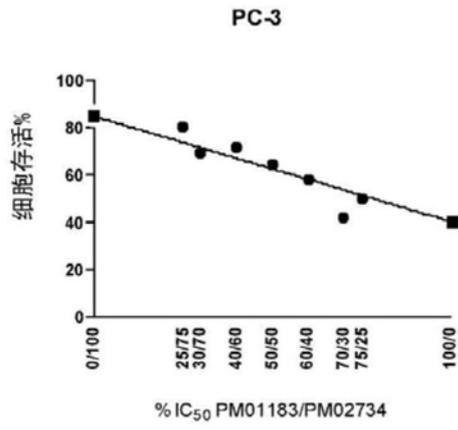


图79

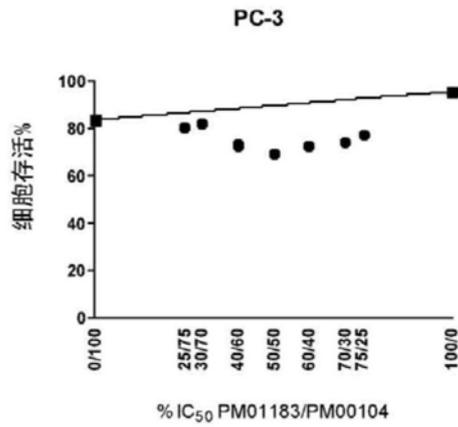


图80

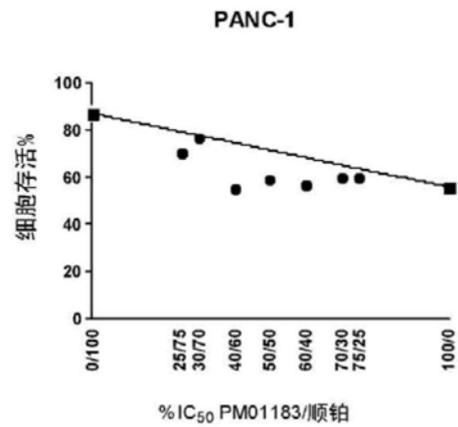


图81

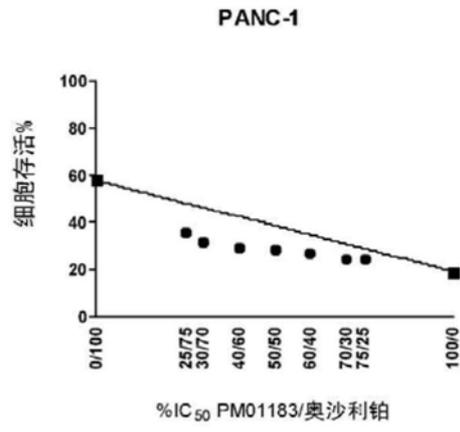


图82

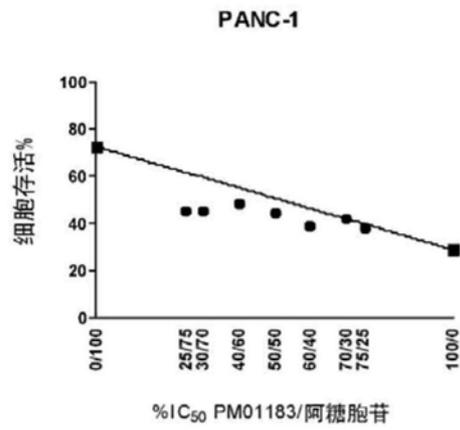


图83

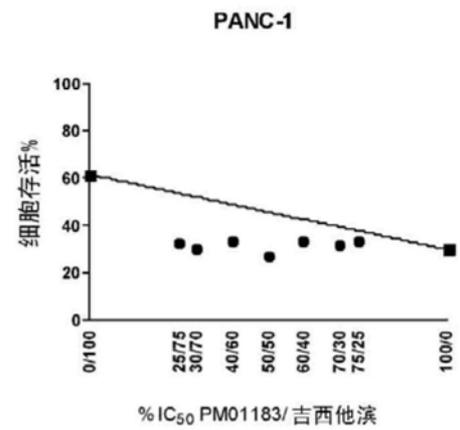


图84

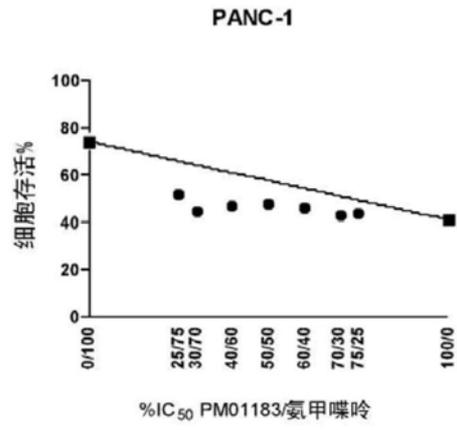


图85

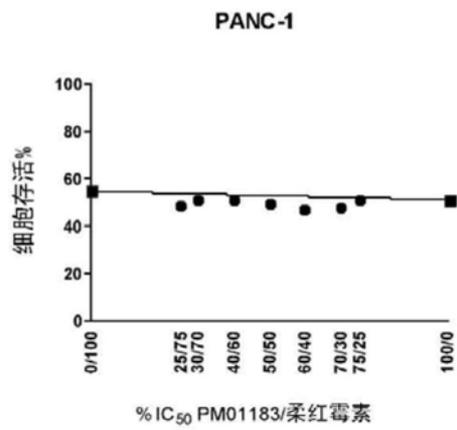


图86

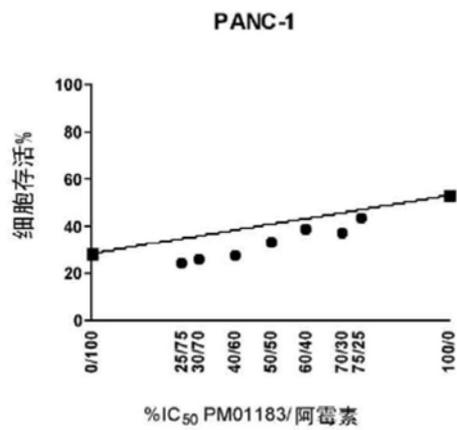


图87

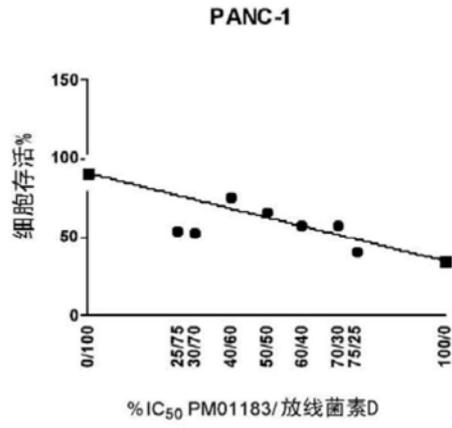


图88

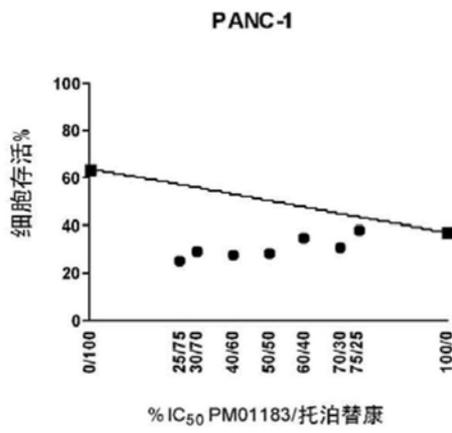


图89

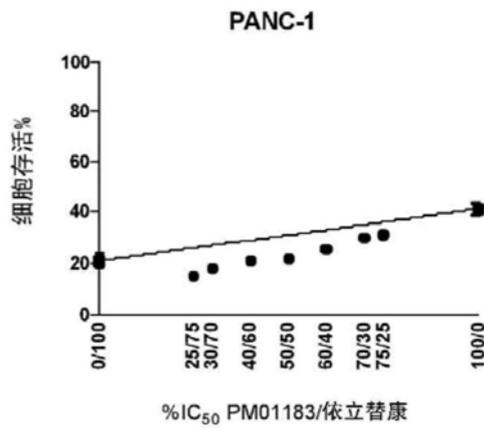


图90

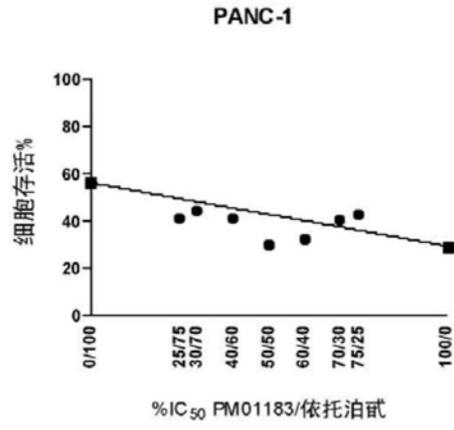


图91

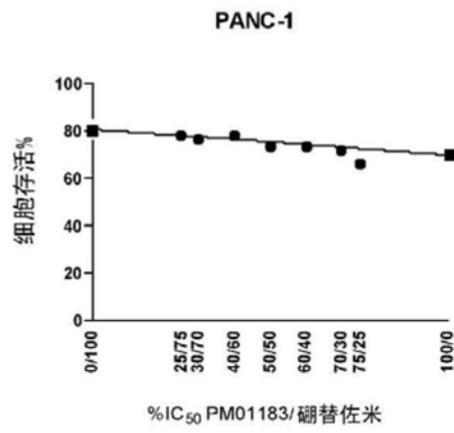


图92

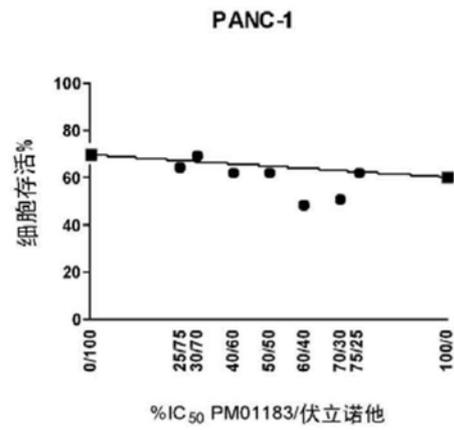


图93

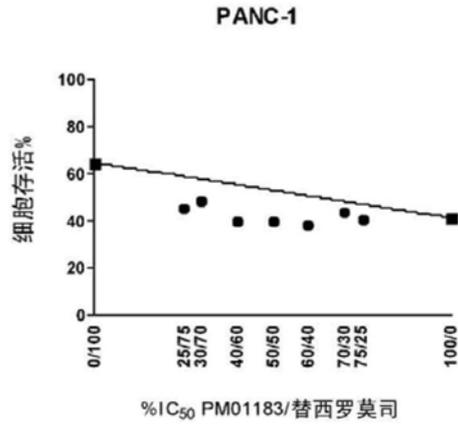


图94

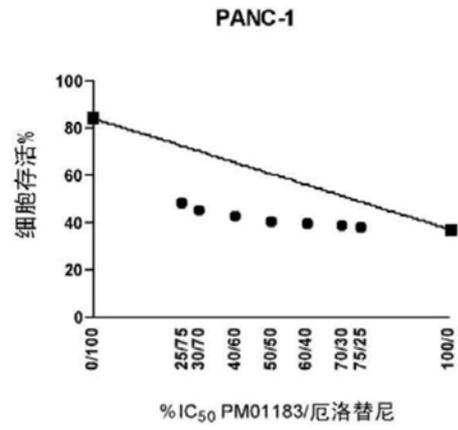


图95

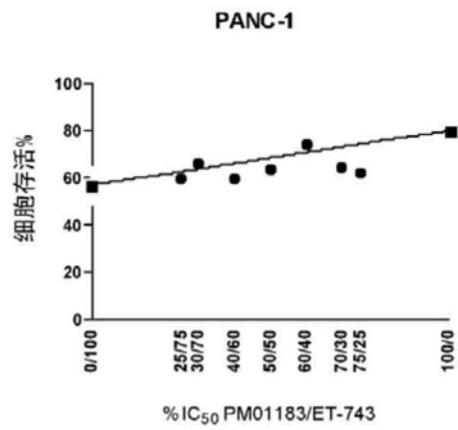


图96

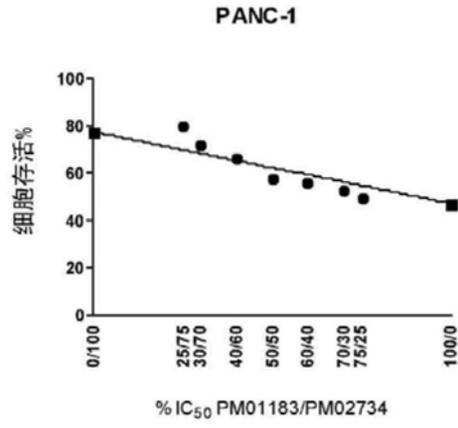


图97

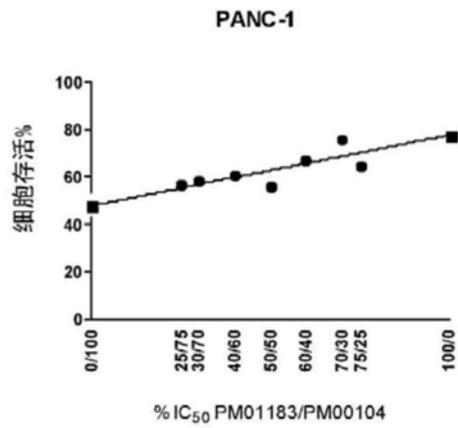


图98

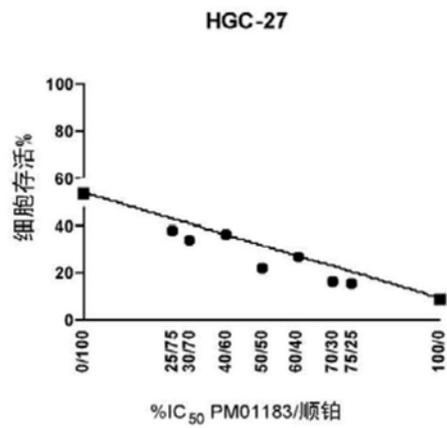


图99

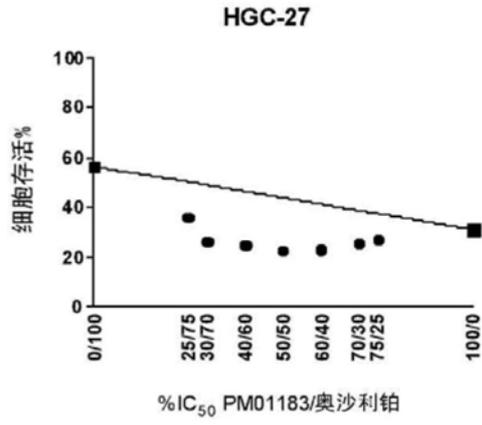


图100

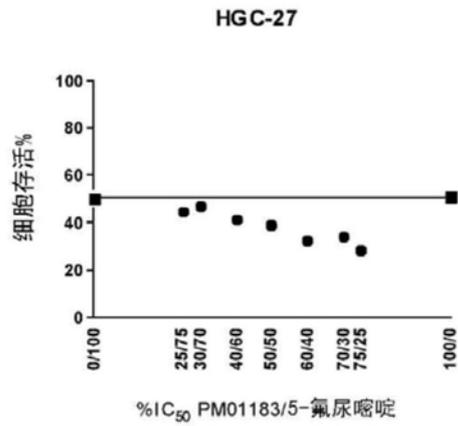


图101

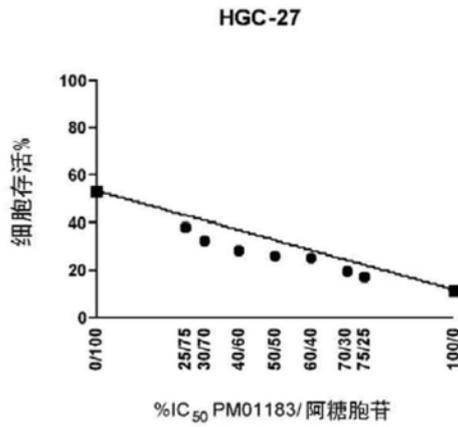


图102

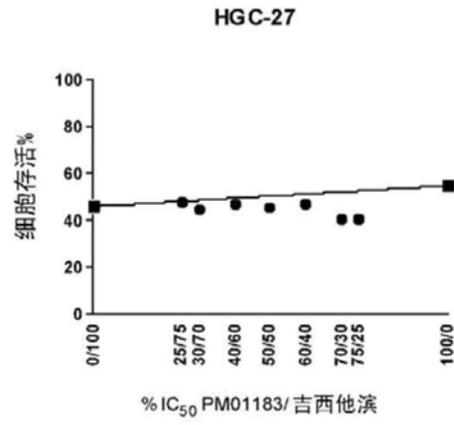


图103

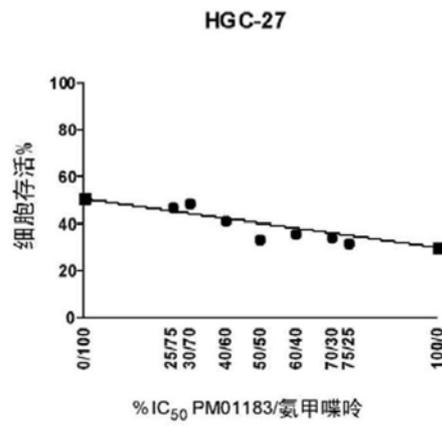


图104

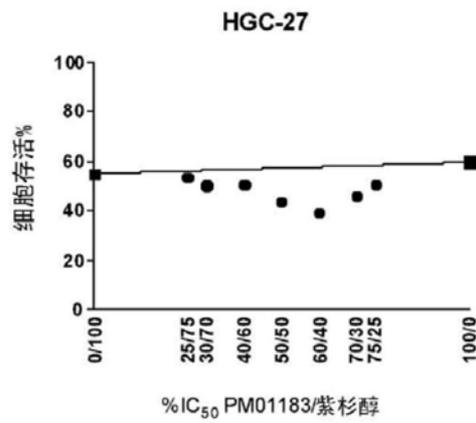


图105

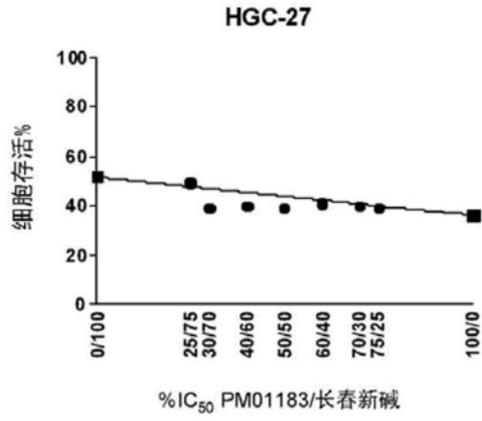


图106

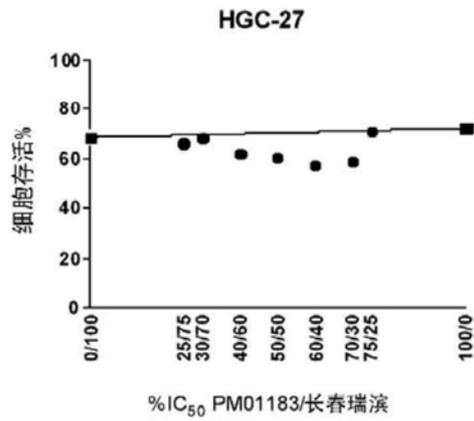


图107

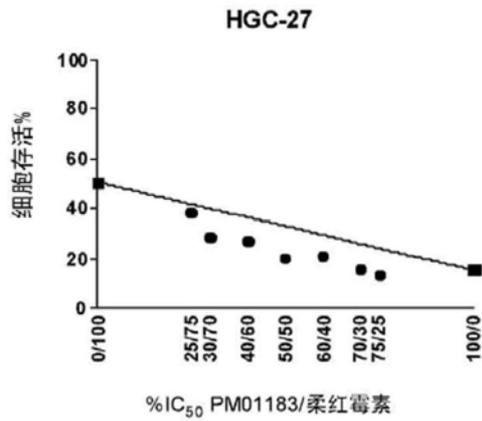


图108

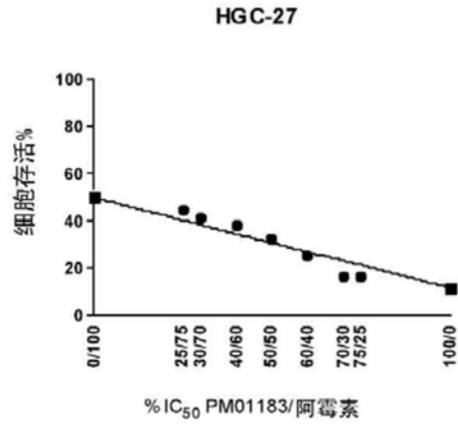


图109

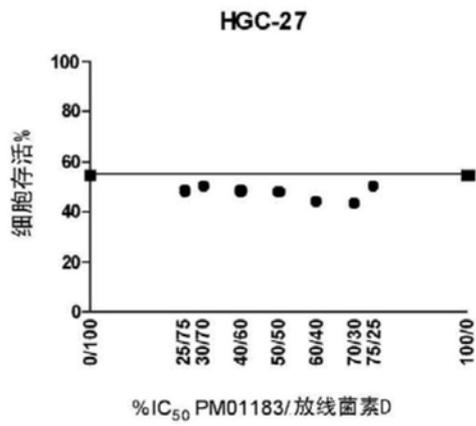


图110

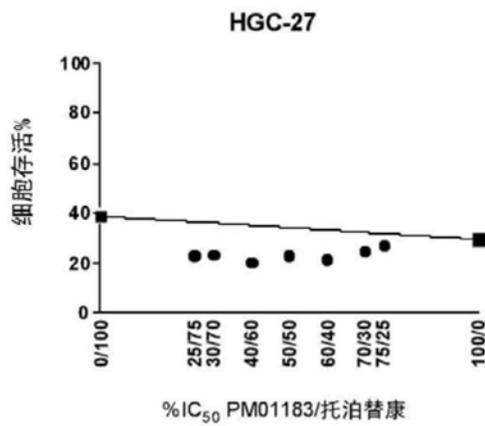


图111

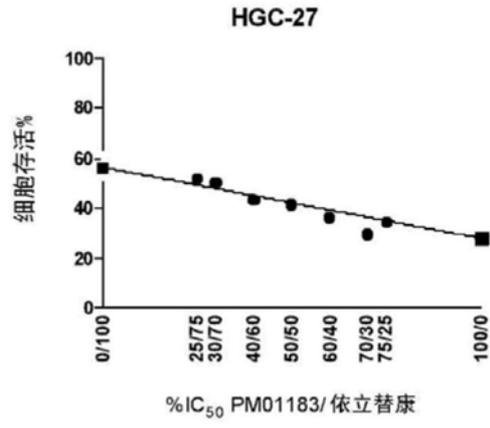


图112

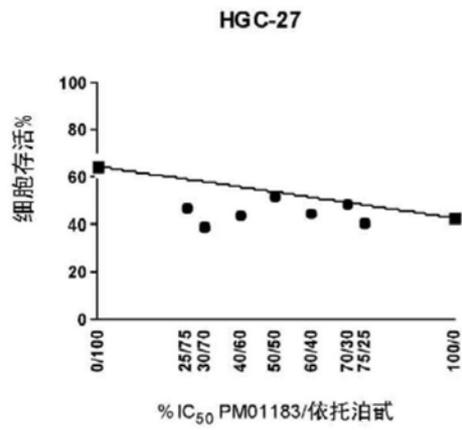


图113

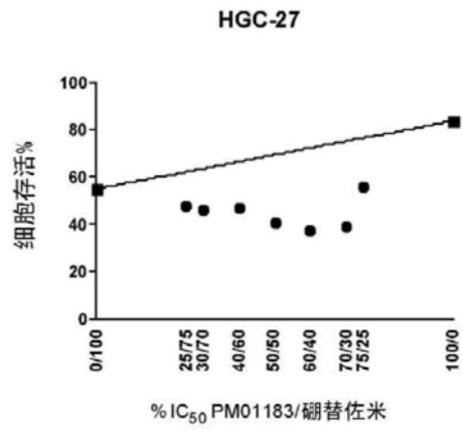


图114

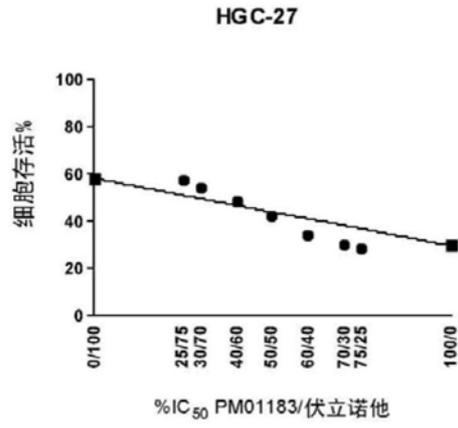


图115

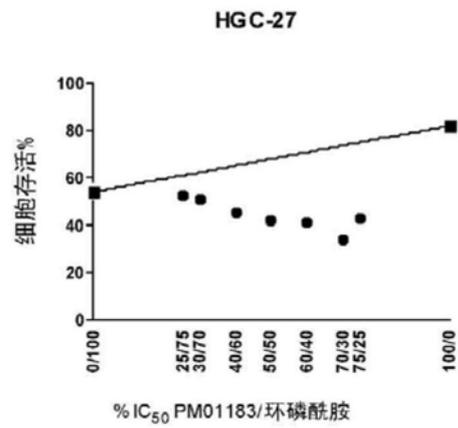


图116

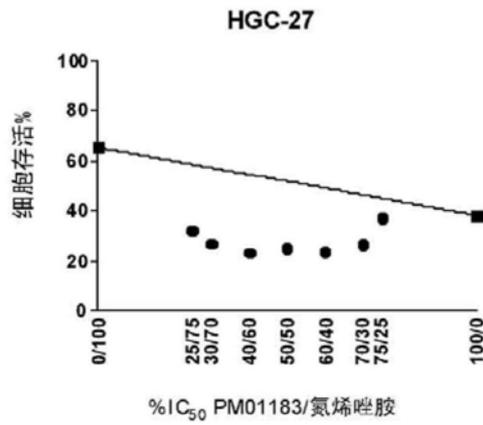


图117

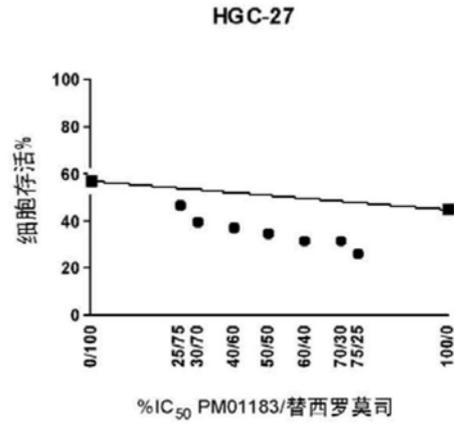


图118

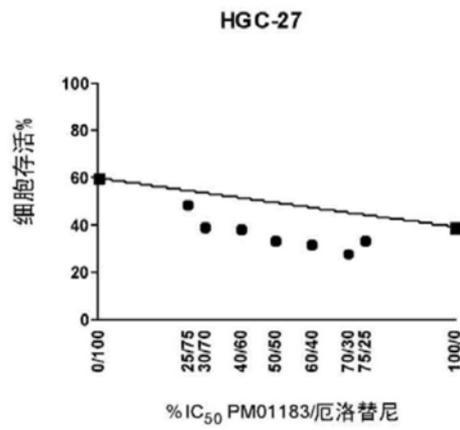


图119

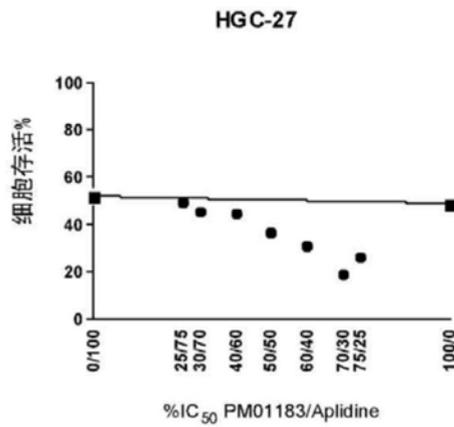


图120

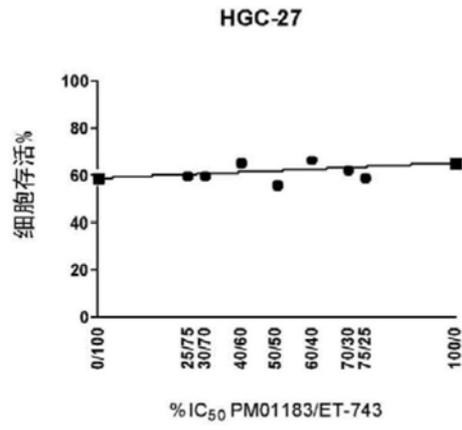


图121

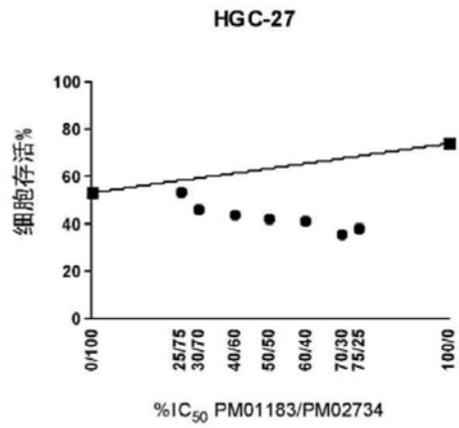


图122

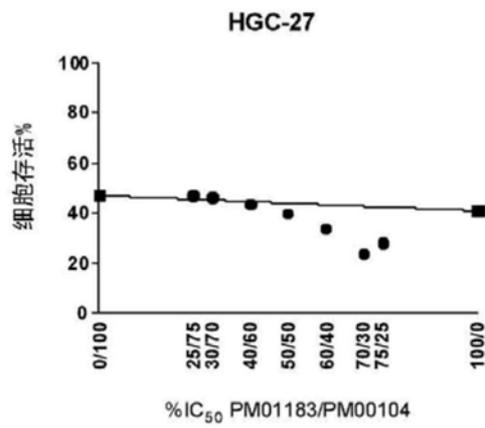


图123

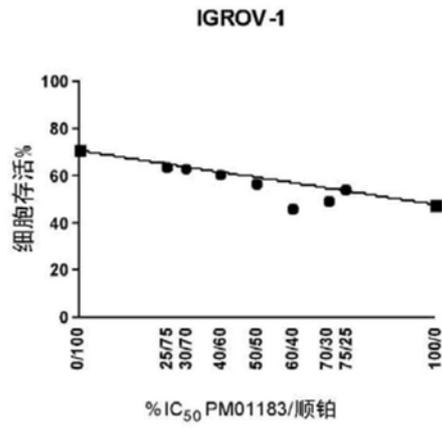


图124

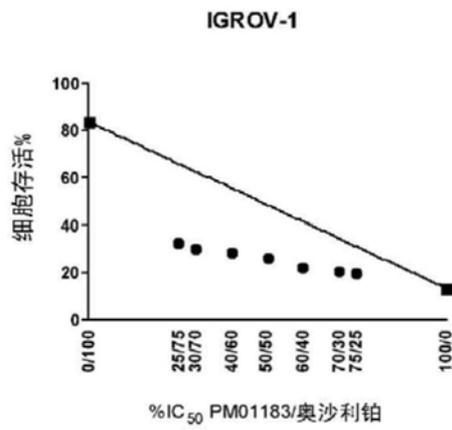


图125

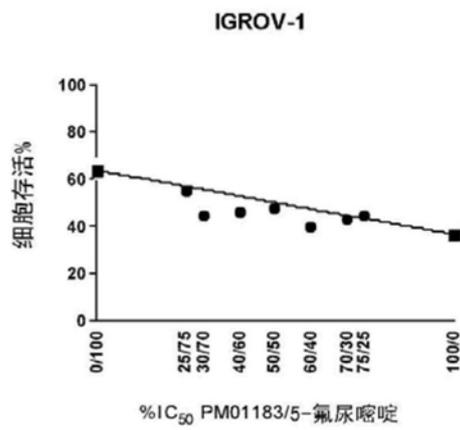


图126

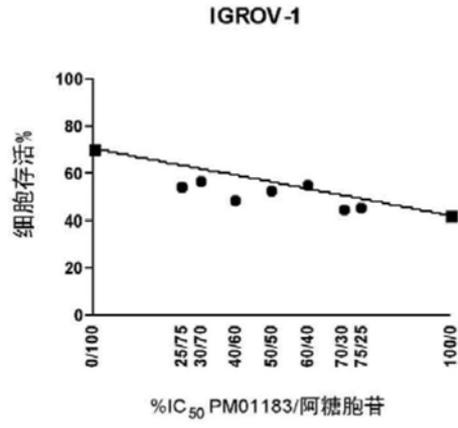


图127

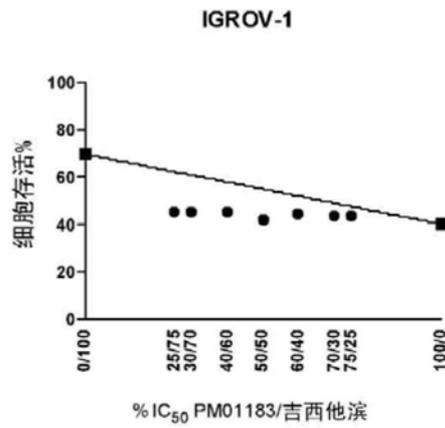


图128

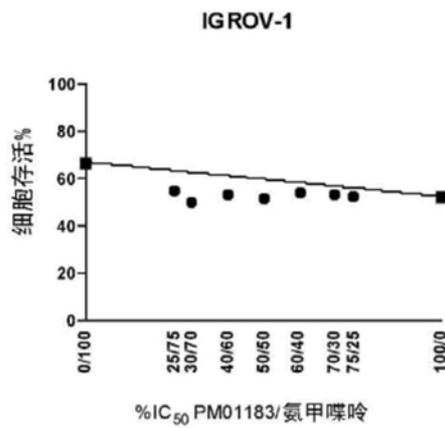


图129

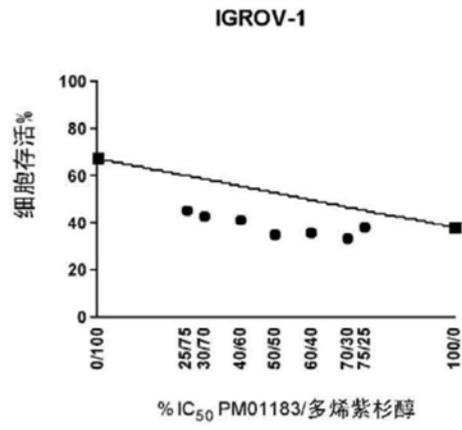


图130

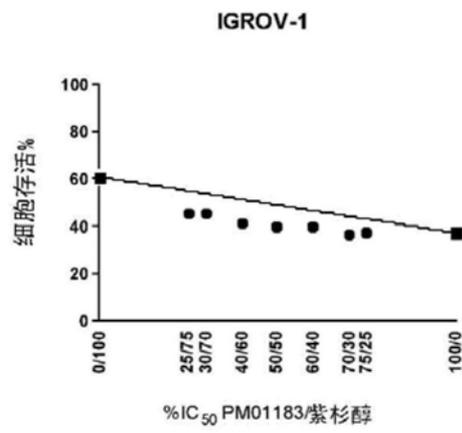


图131

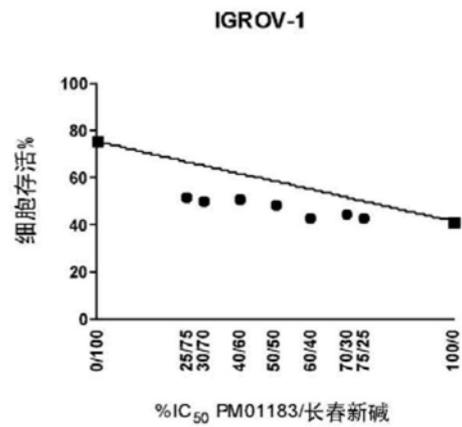


图132

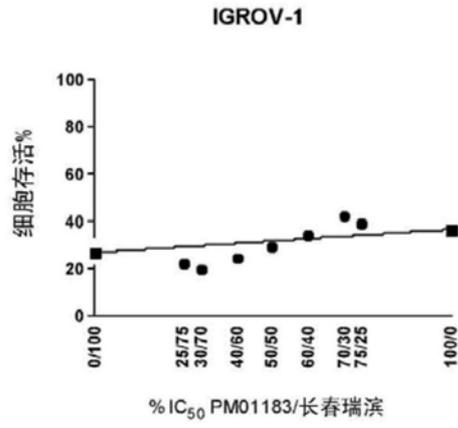


图133

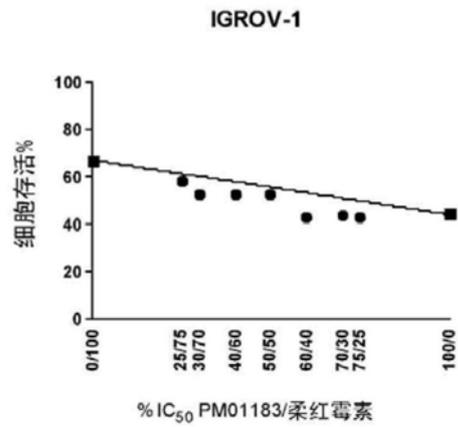


图134

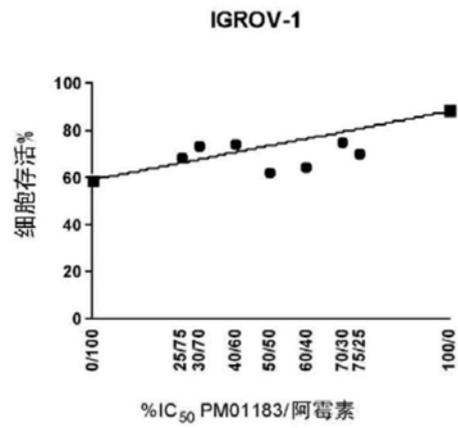


图135

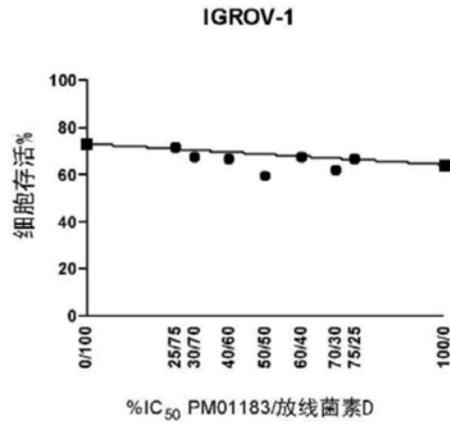


图136

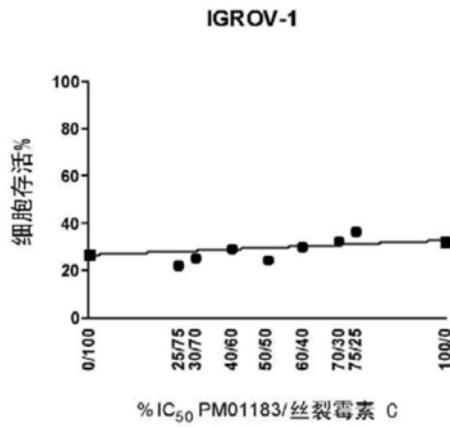


图137

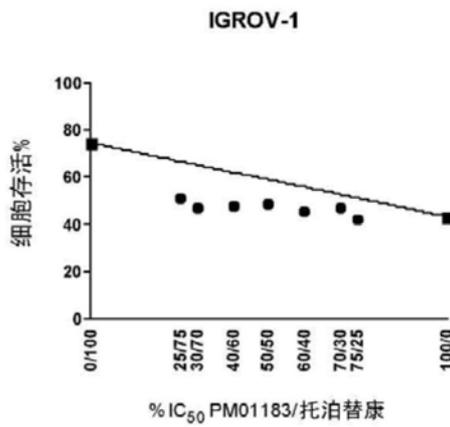


图138

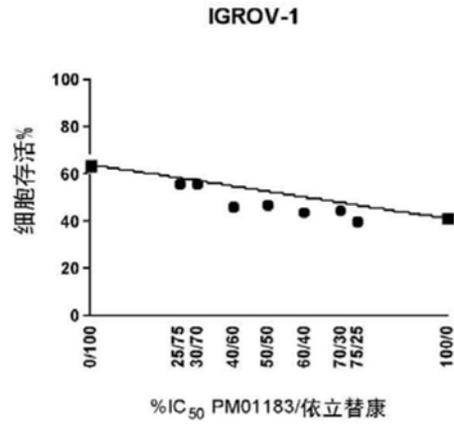


图139

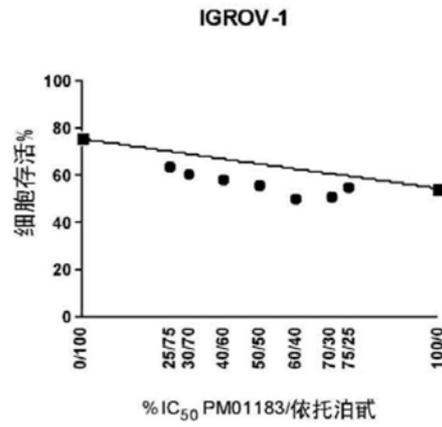


图140

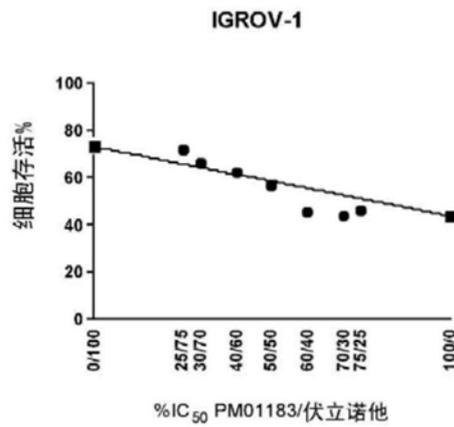


图141

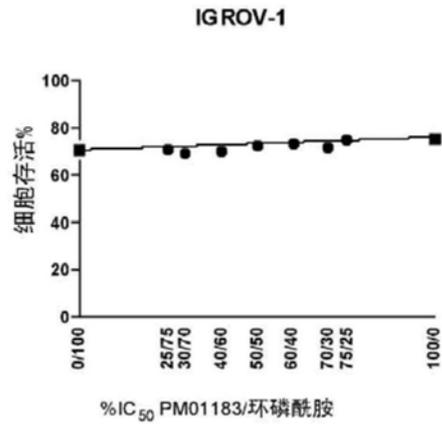


图142

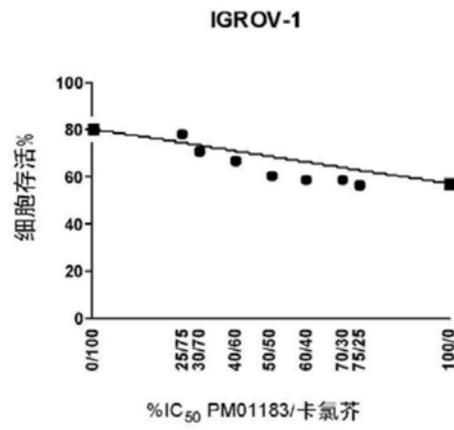


图143

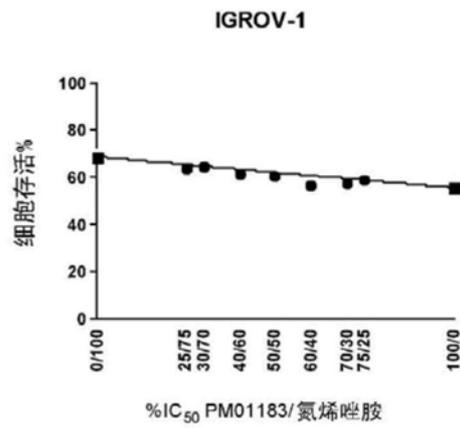


图144

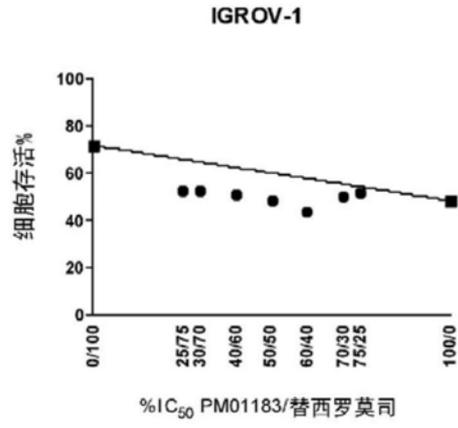


图145

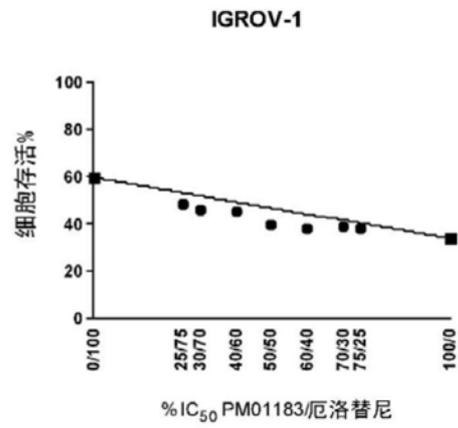


图146

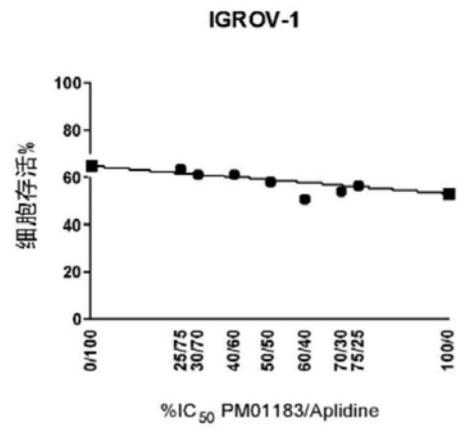


图147

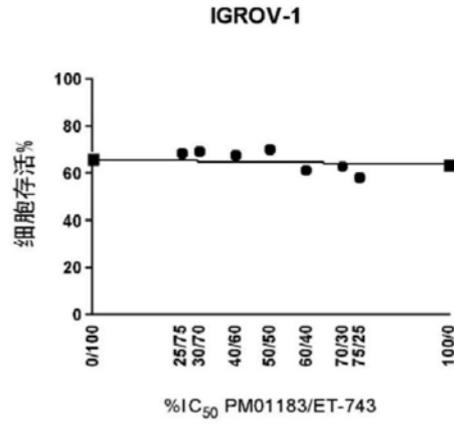


图148

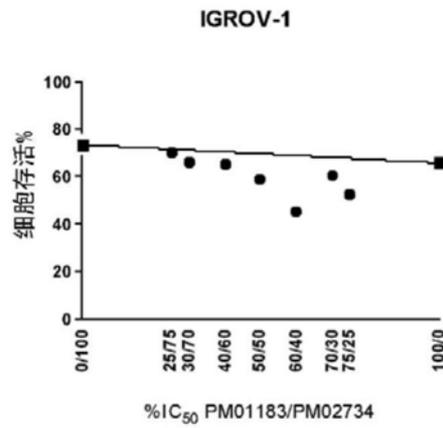


图149

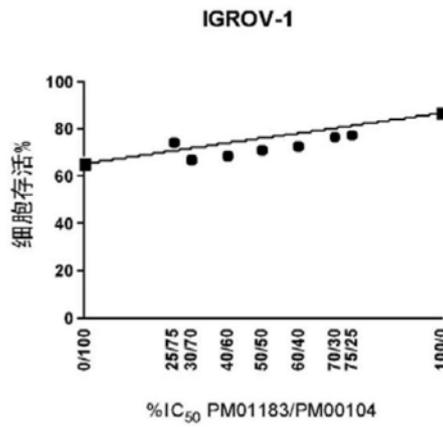


图150

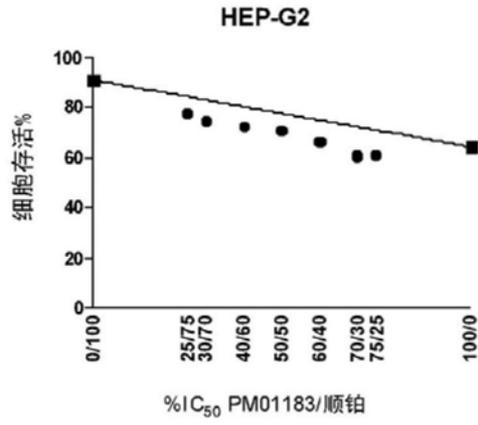


图151

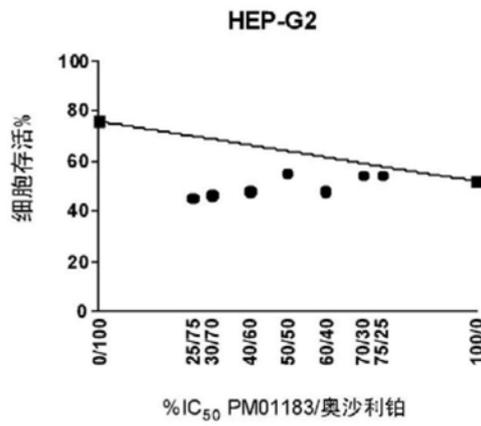


图152

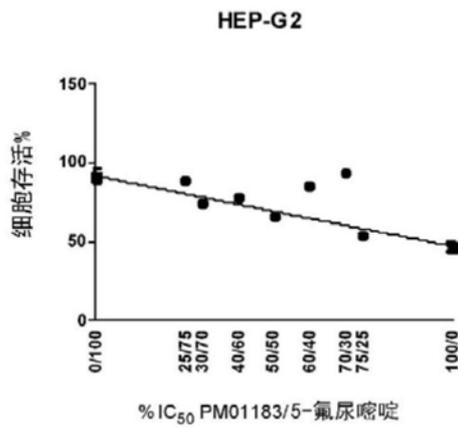


图153

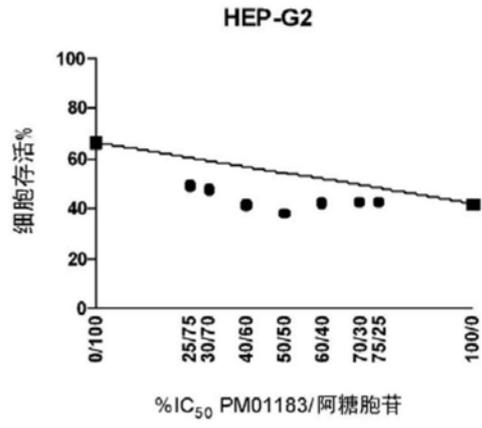


图154

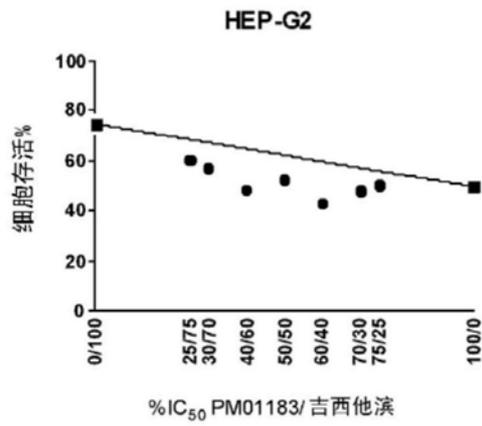


图155

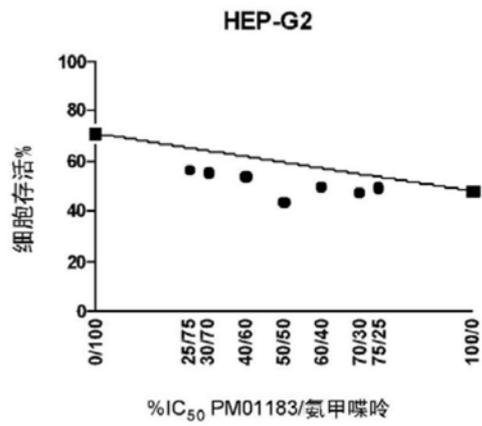


图156

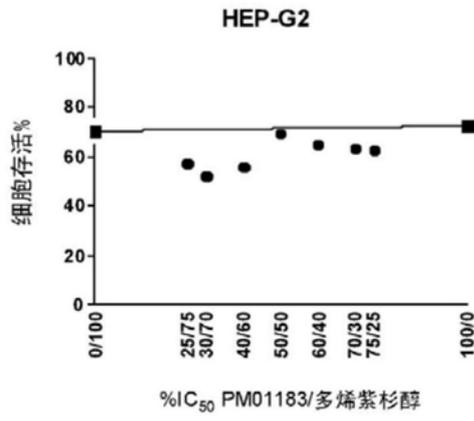


图157

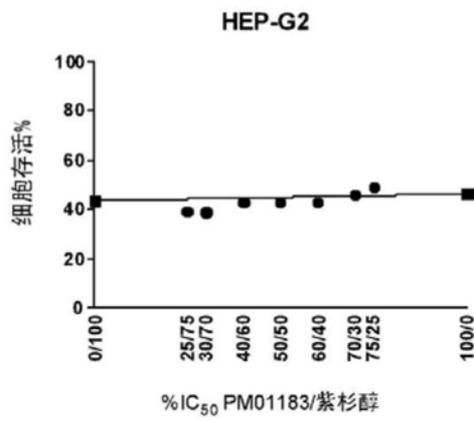


图158

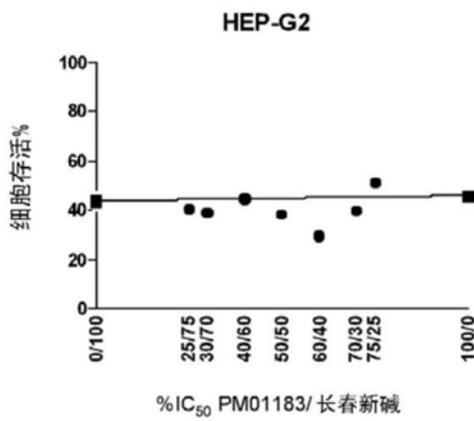


图159

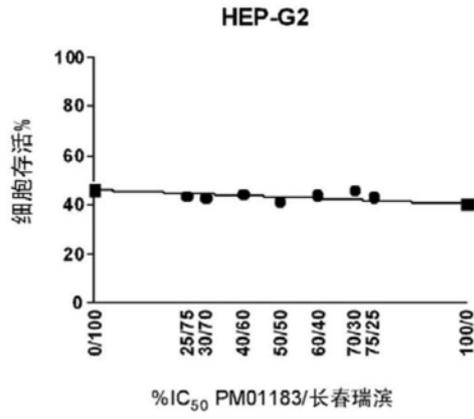


图160

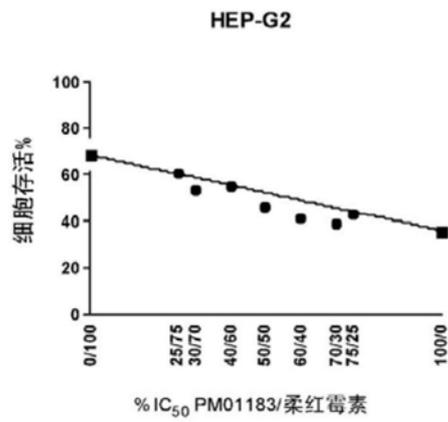


图161

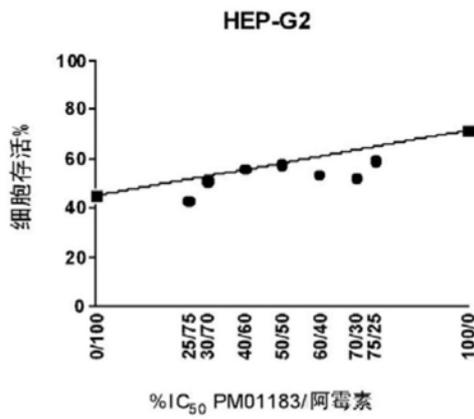


图162

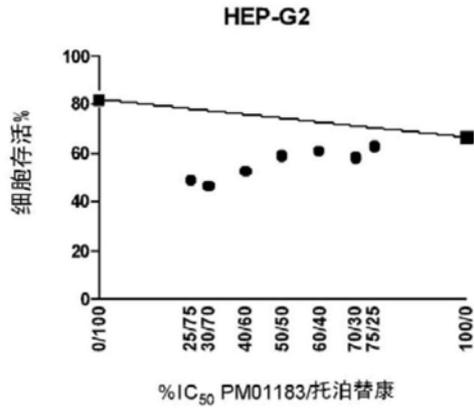


图163

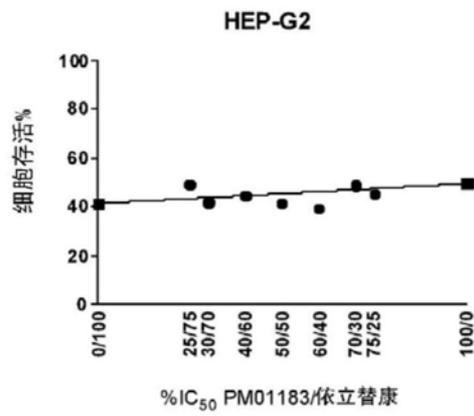


图164

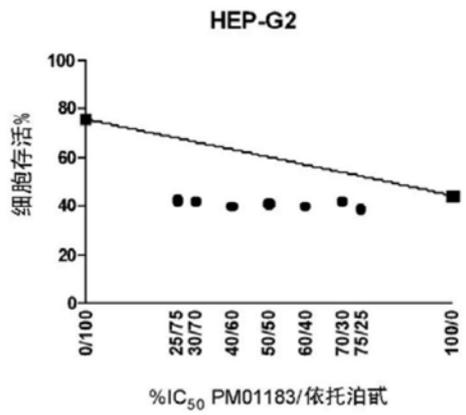


图165

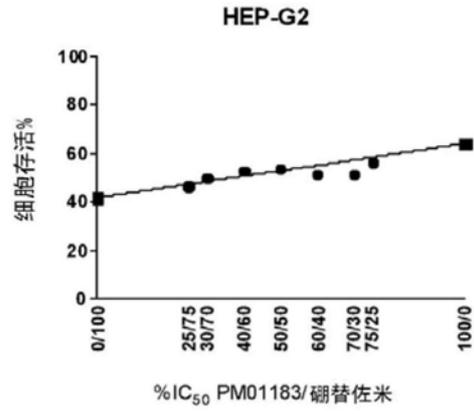


图166

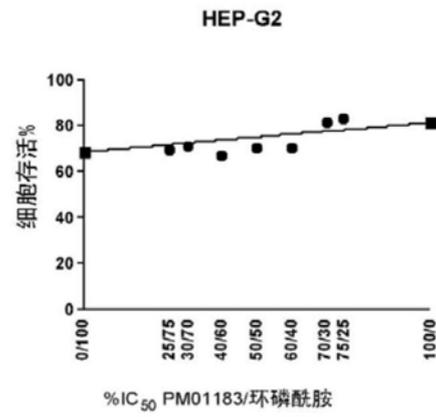


图167

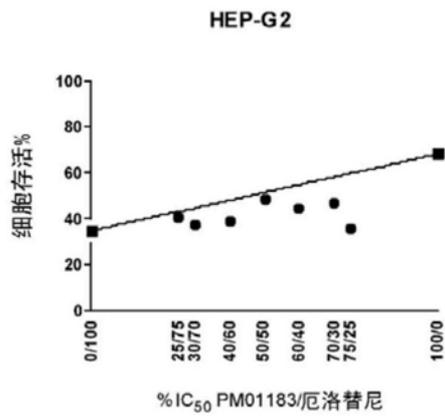


图168

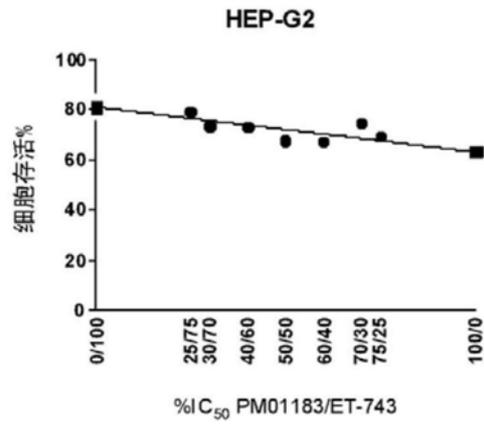


图169

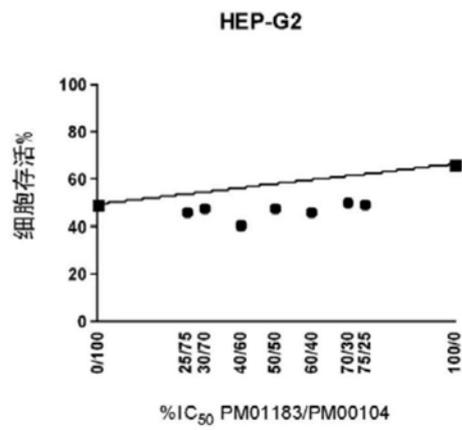


图170

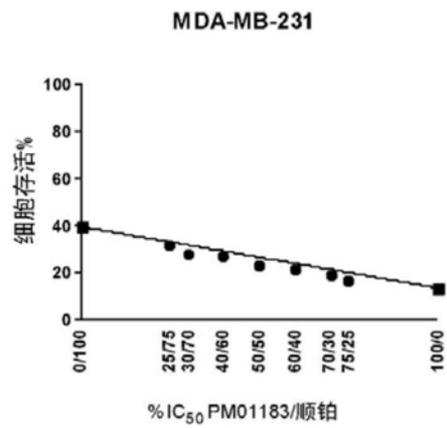


图171

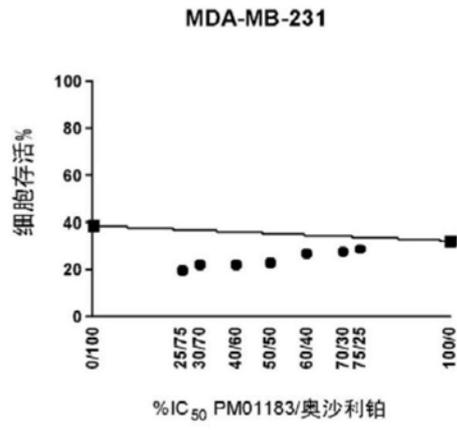


图172

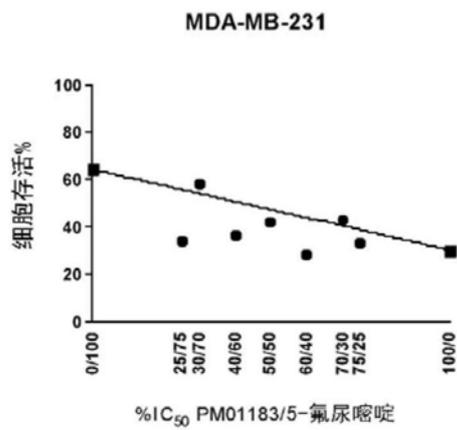


图173

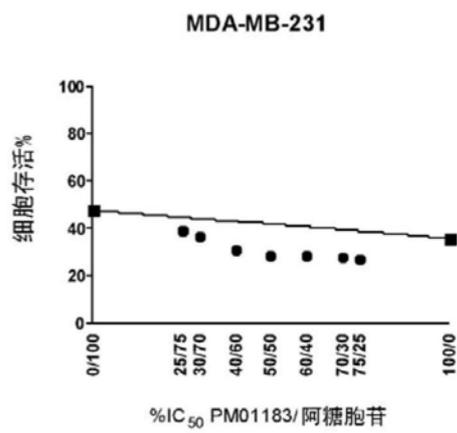


图174

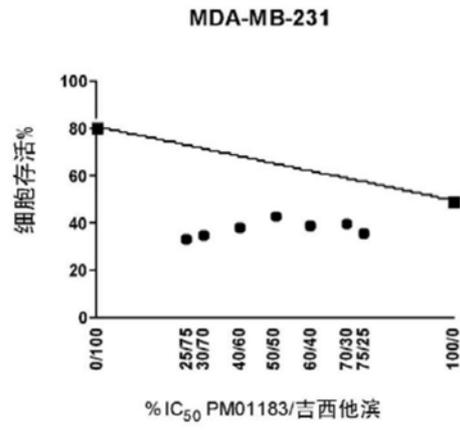


图175

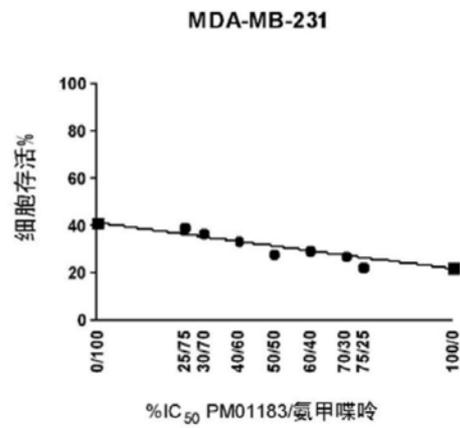


图176

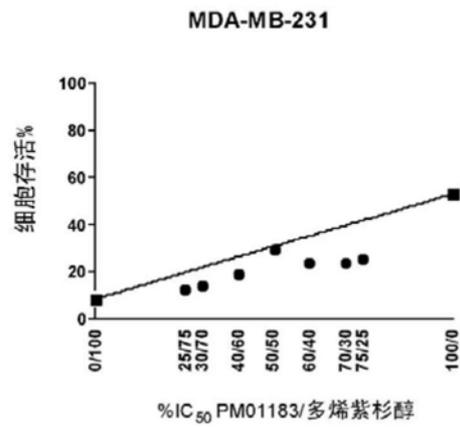


图177

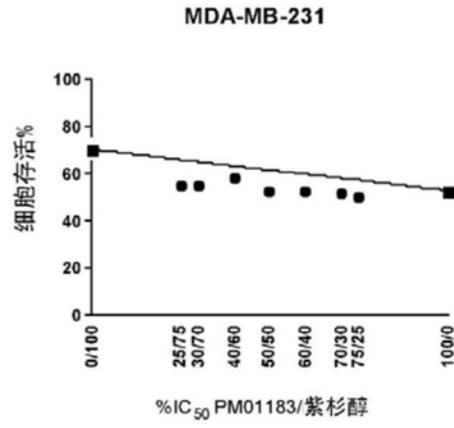


图178

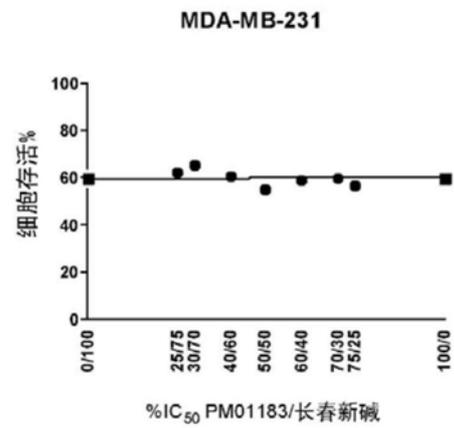


图179

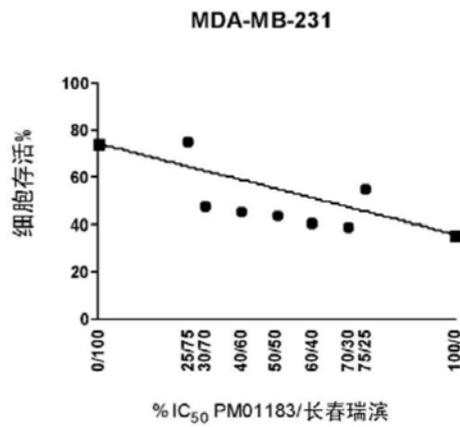


图180

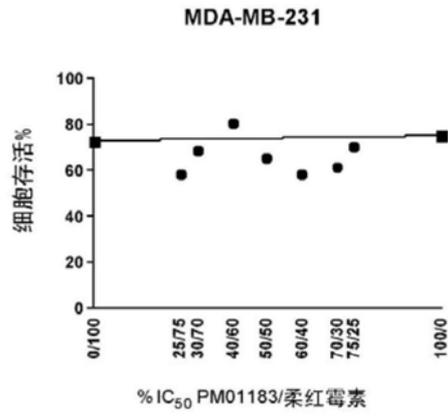


图181

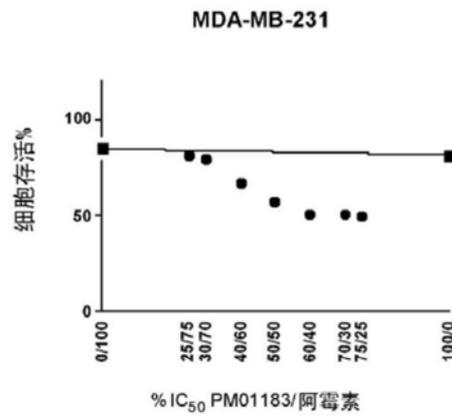


图182

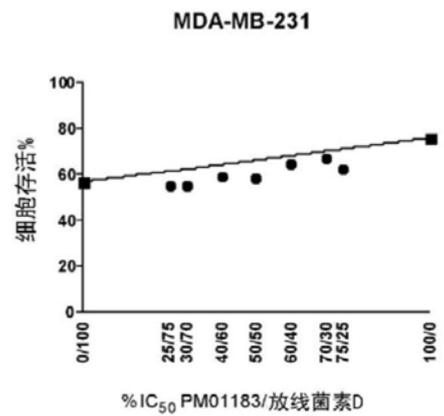


图183

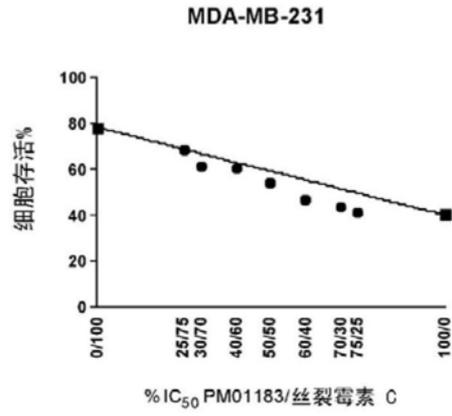


图184

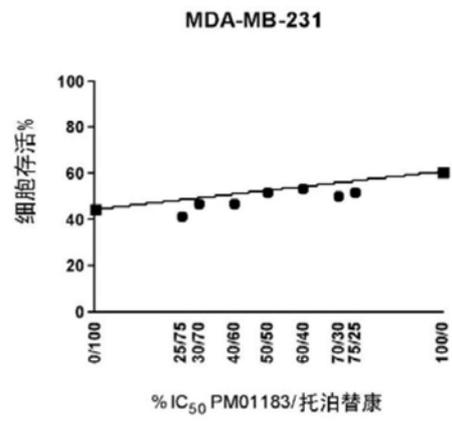


图185

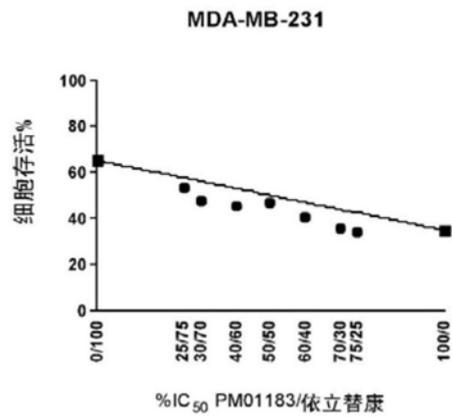


图186

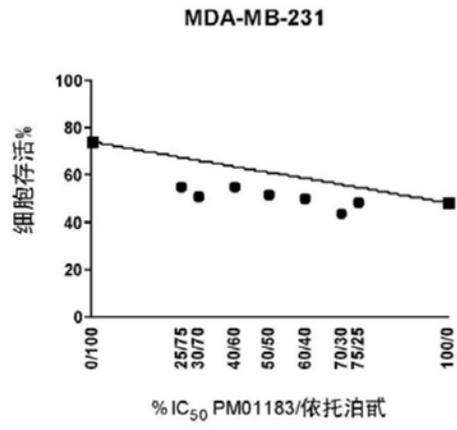


图187

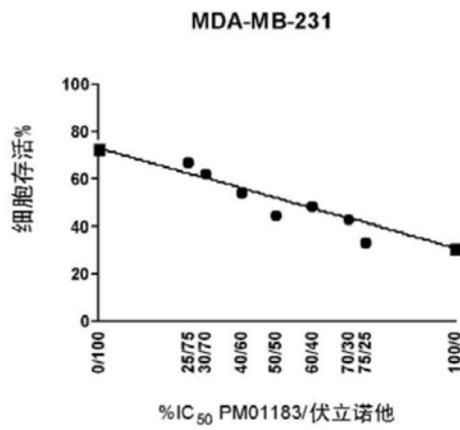


图188

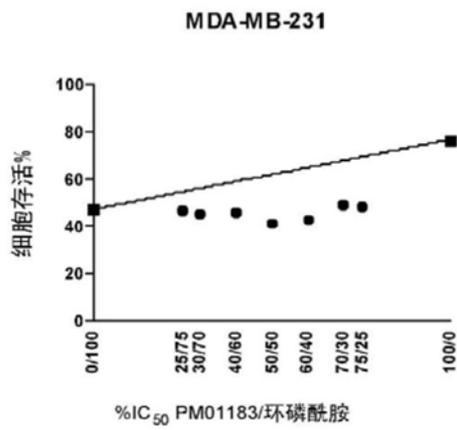


图189

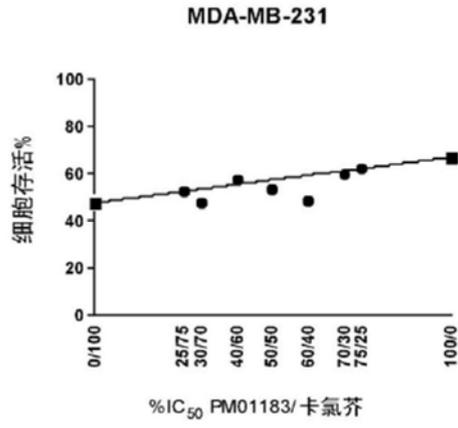


图190

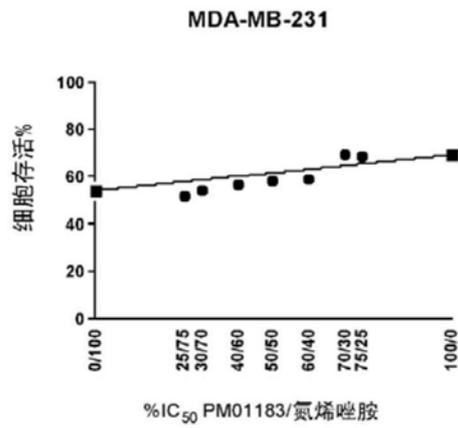


图191

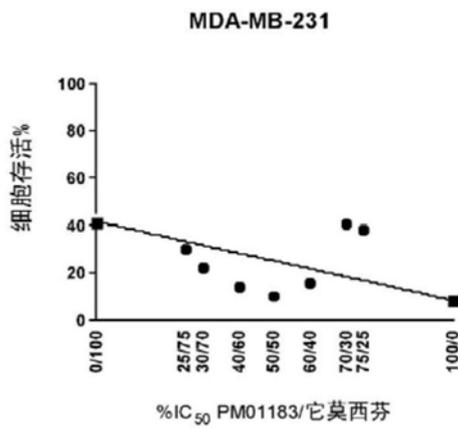


图192

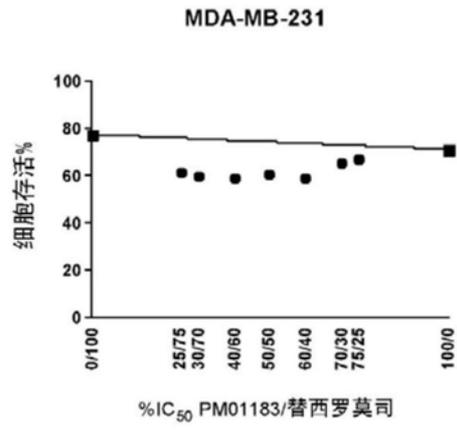


图193

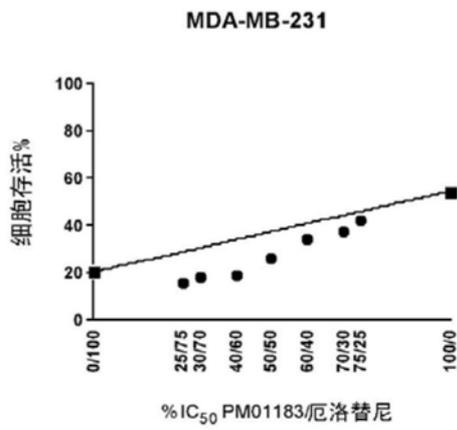


图194

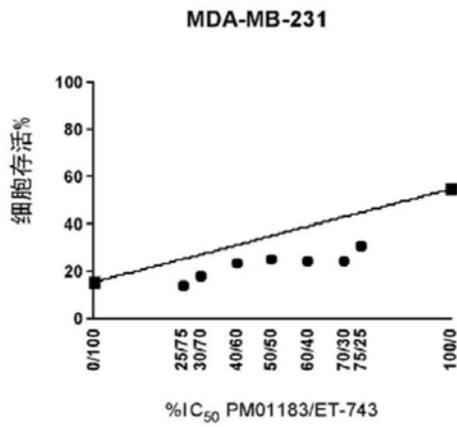


图195

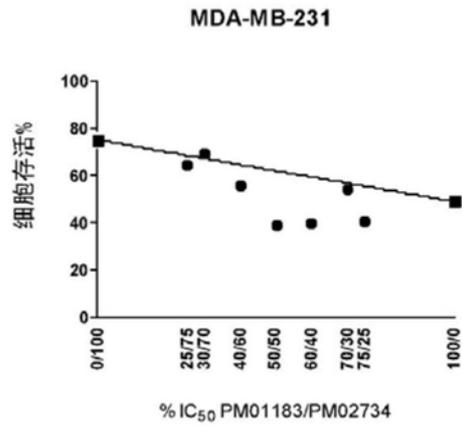


图196

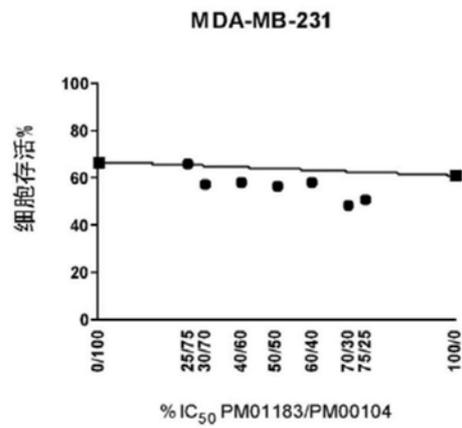


图197

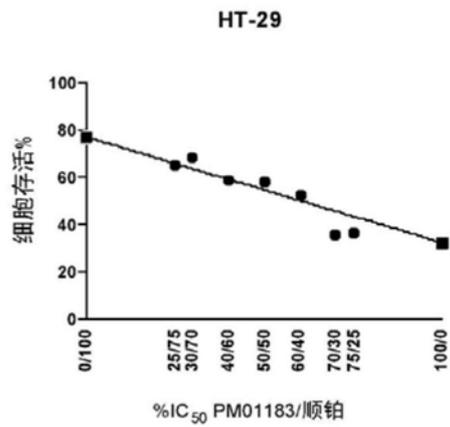


图198

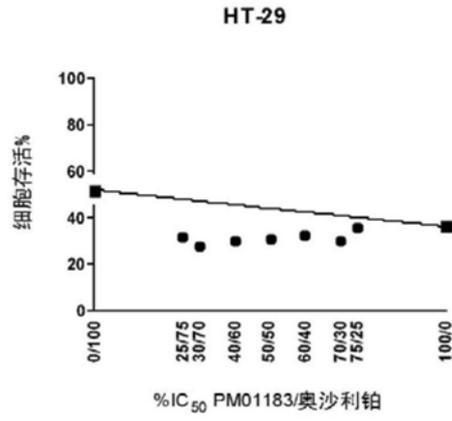


图199

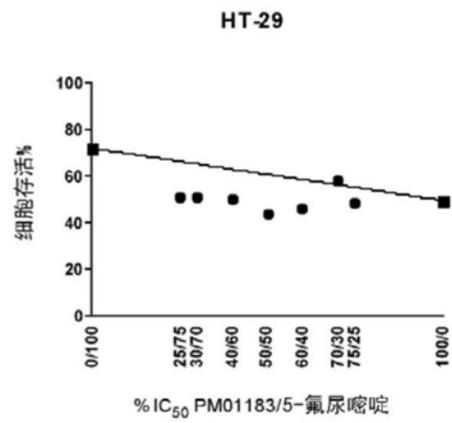


图200

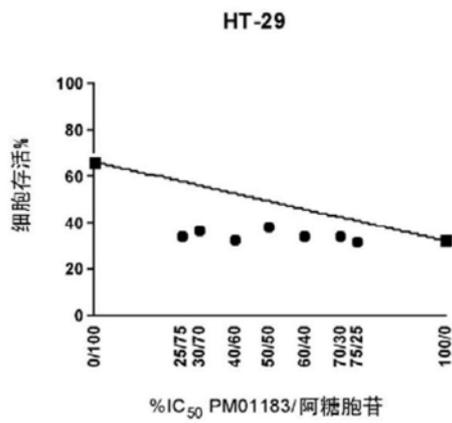


图201

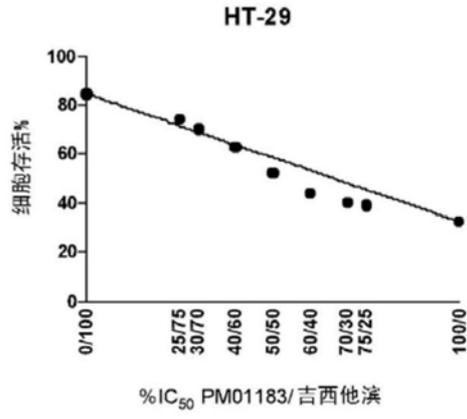


图202

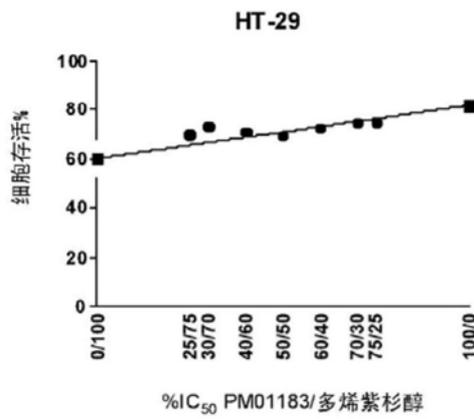


图203

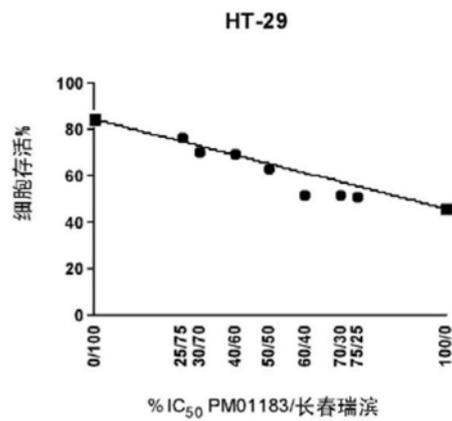


图204

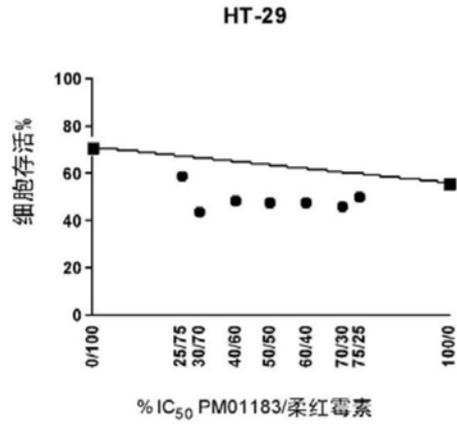


图205

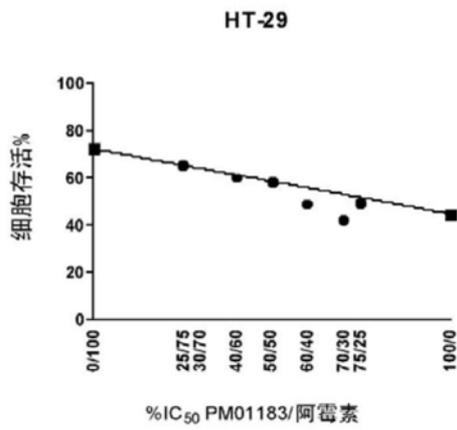


图206

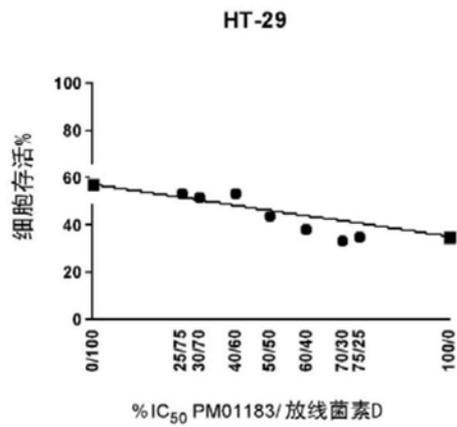


图207

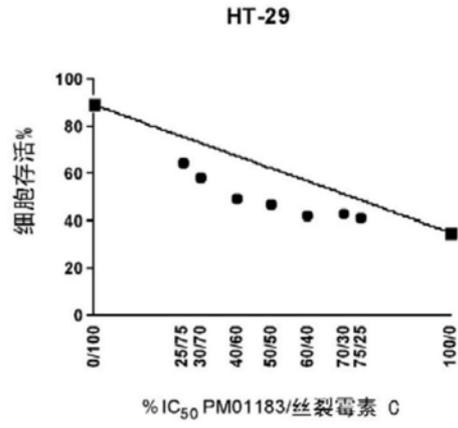


图208

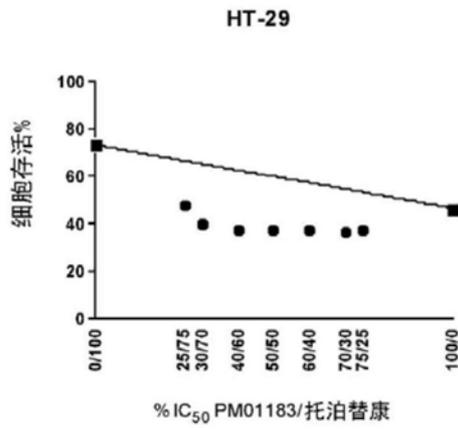


图209

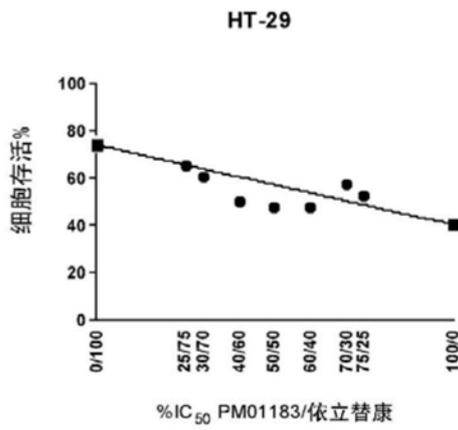


图210

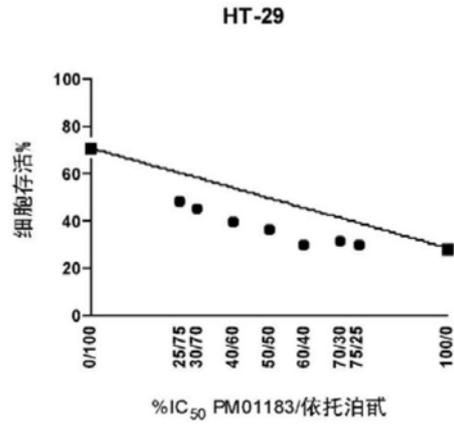


图211

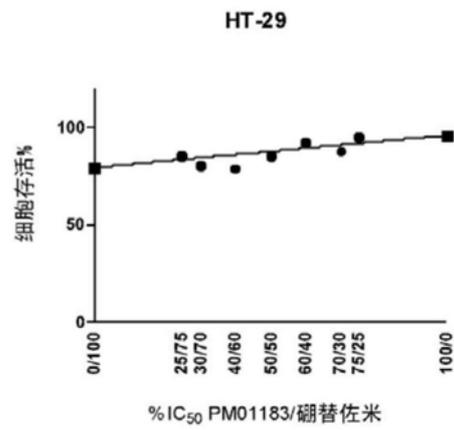


图212

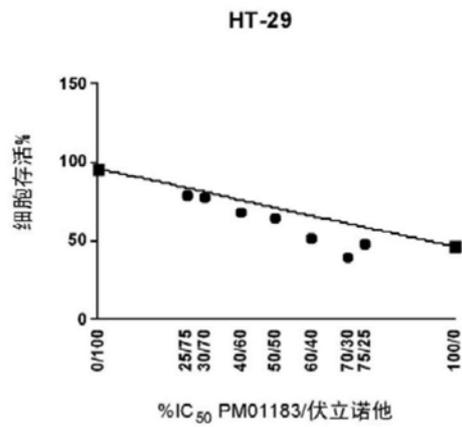


图213

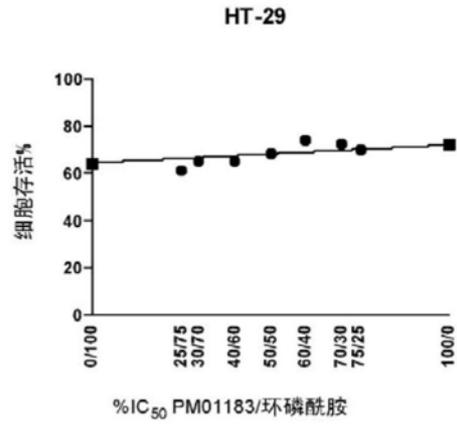


图214

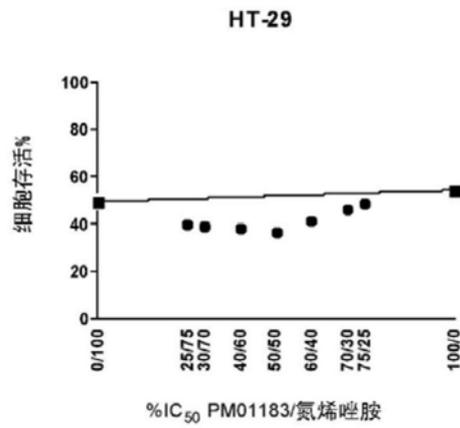


图215

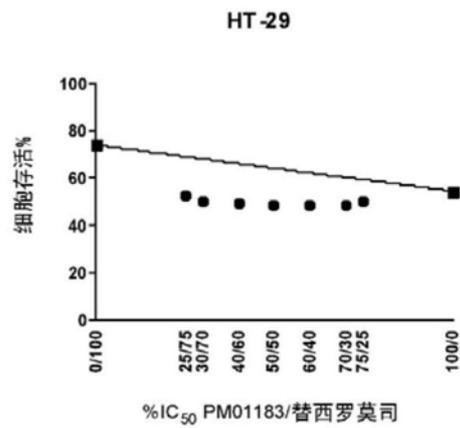


图216

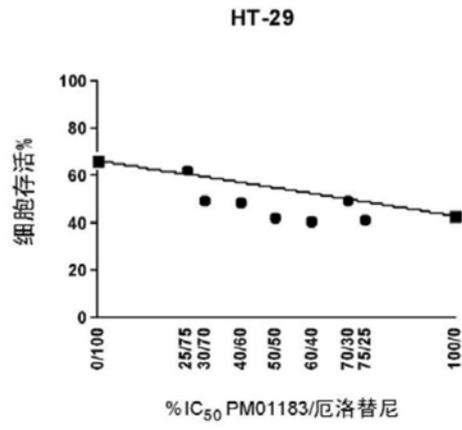


图217

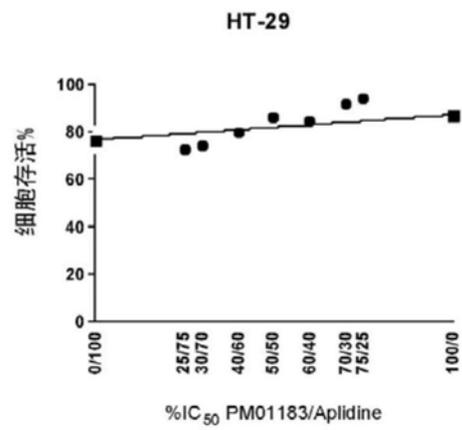


图218

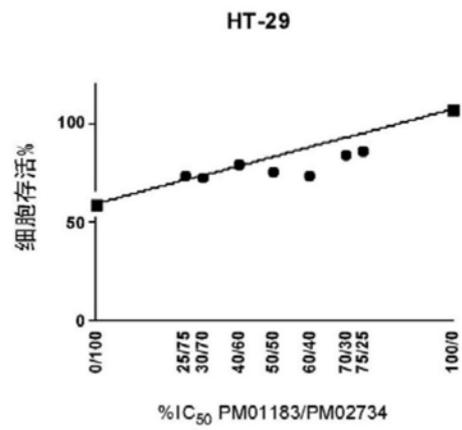


图219

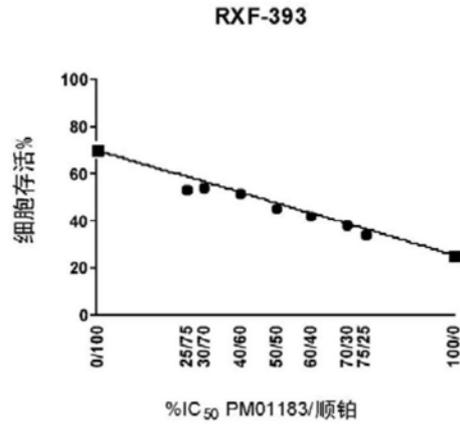


图220

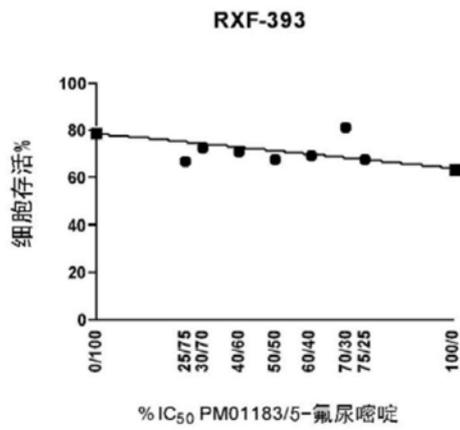


图221

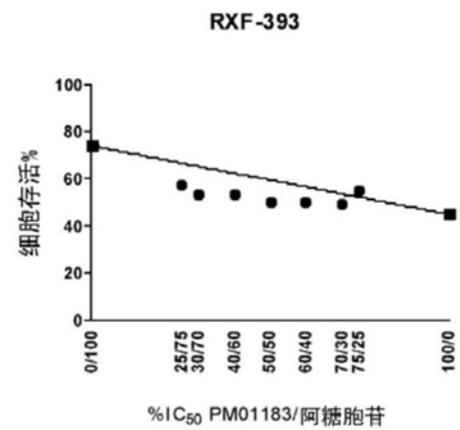


图222

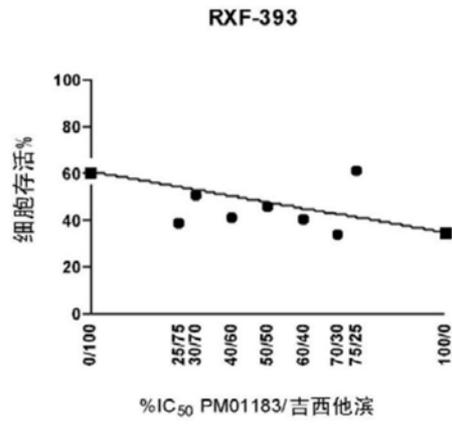


图223

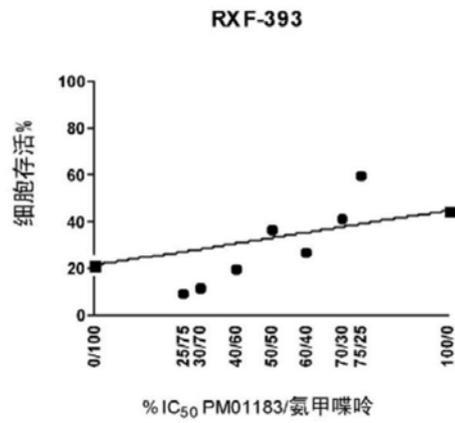


图224

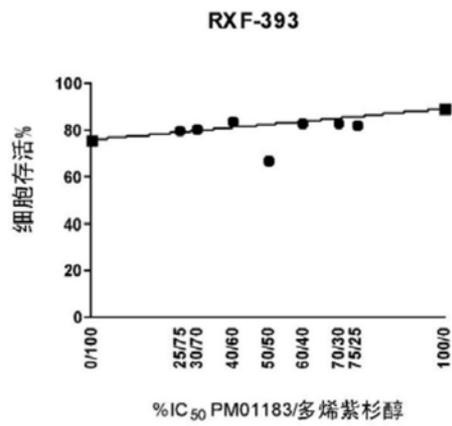


图225

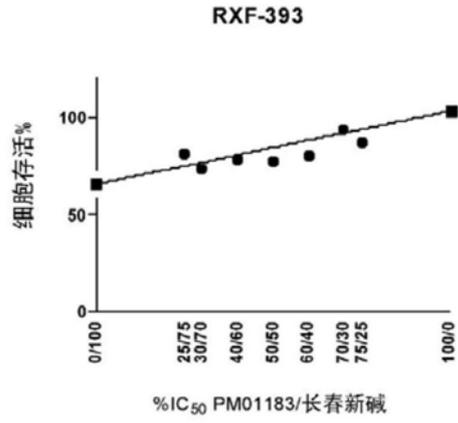


图226

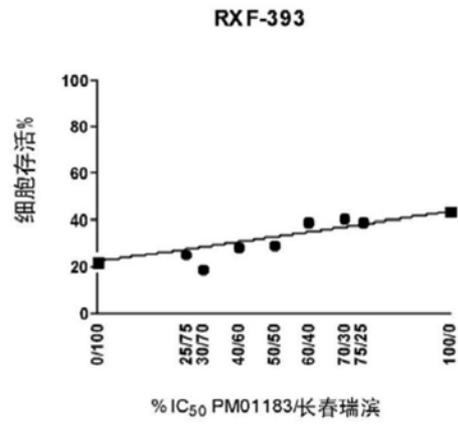


图227

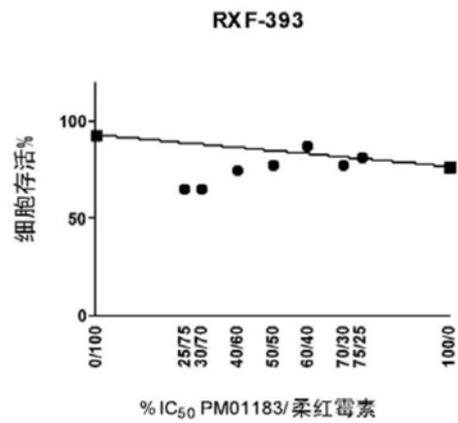


图228

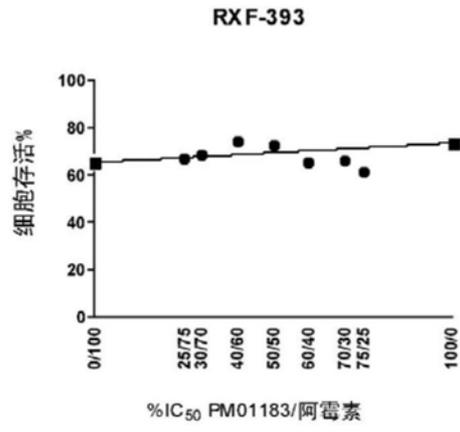


图229

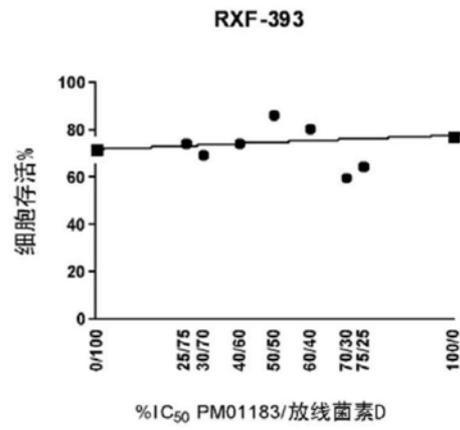


图230

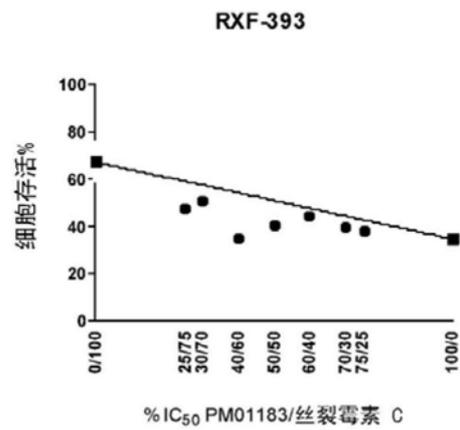


图231

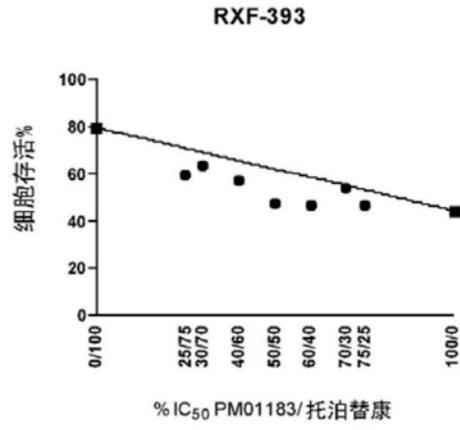


图232

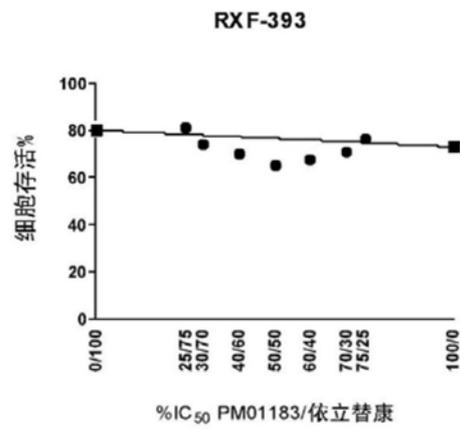


图233

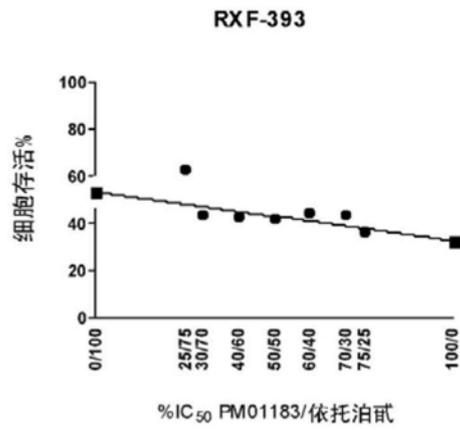


图234

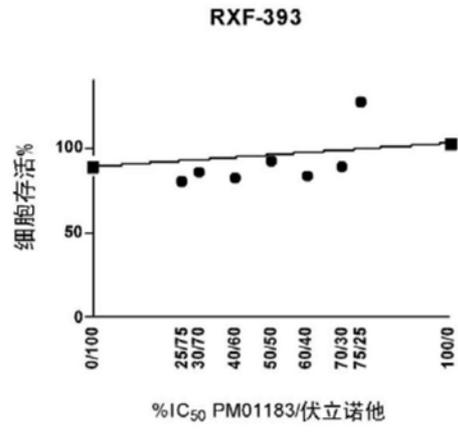


图235

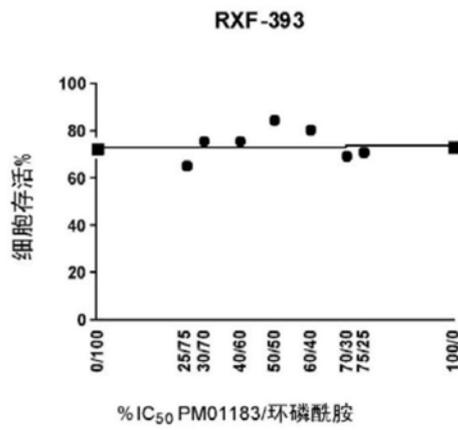


图236

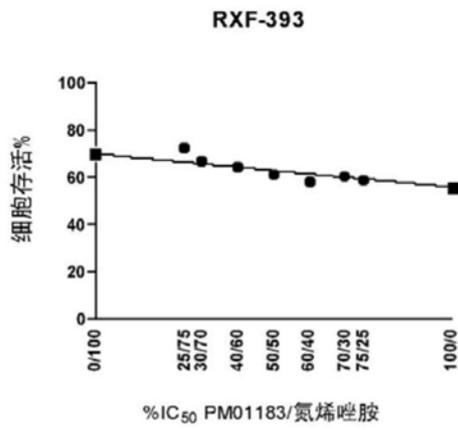


图237

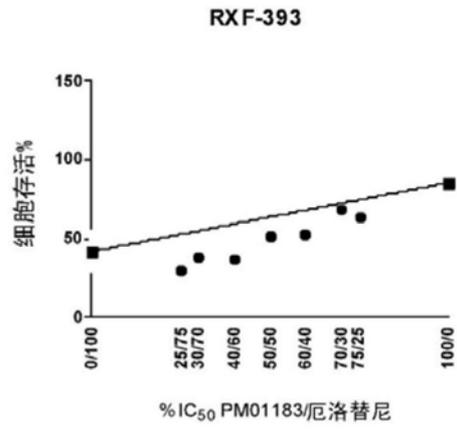


图238

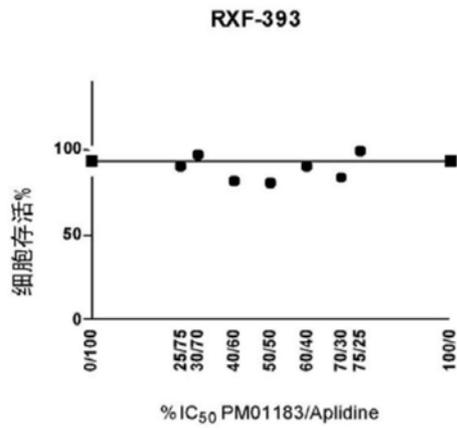


图239

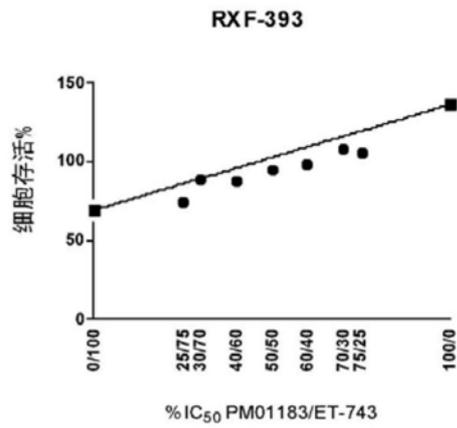


图240

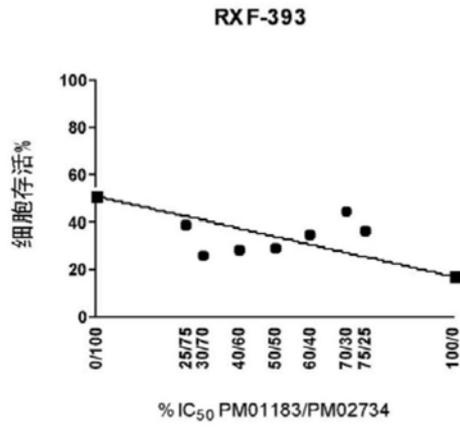


图241

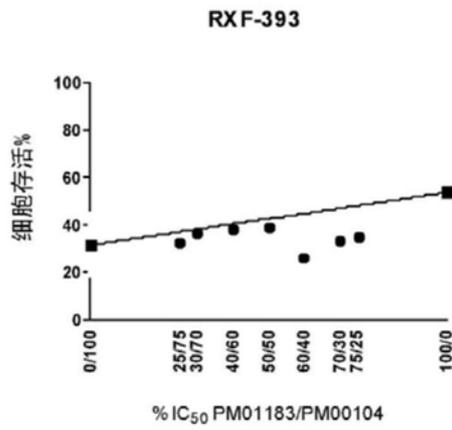


图242

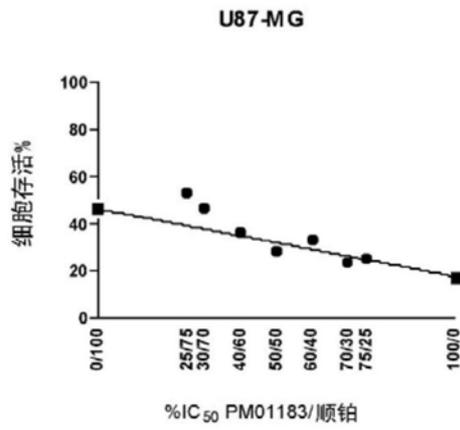


图243

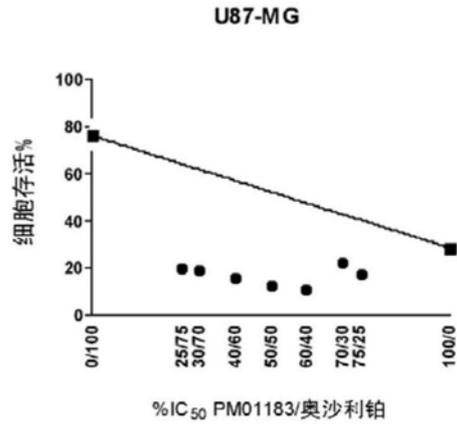


图244

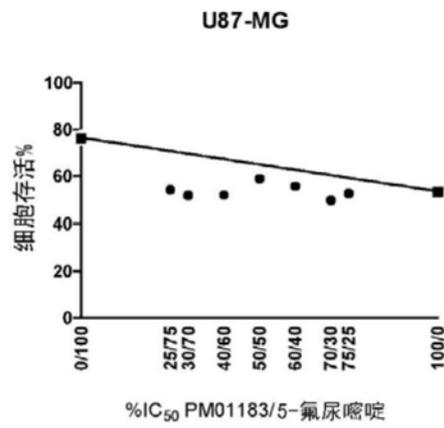


图245

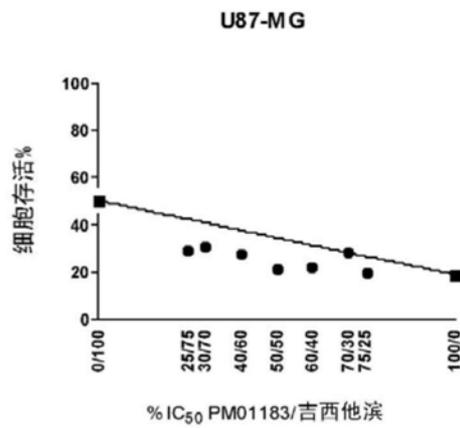


图246

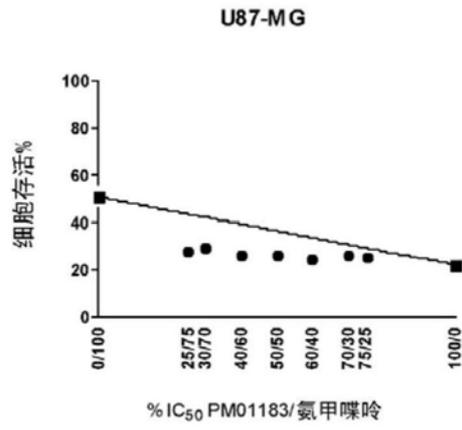


图247

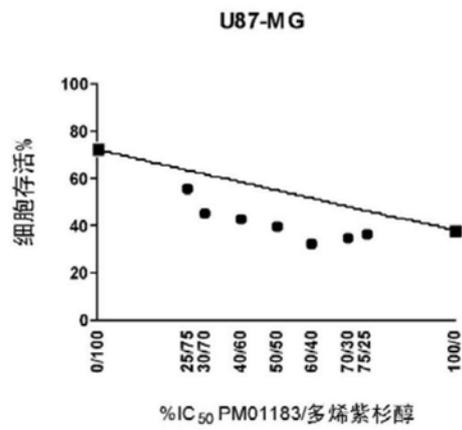


图248

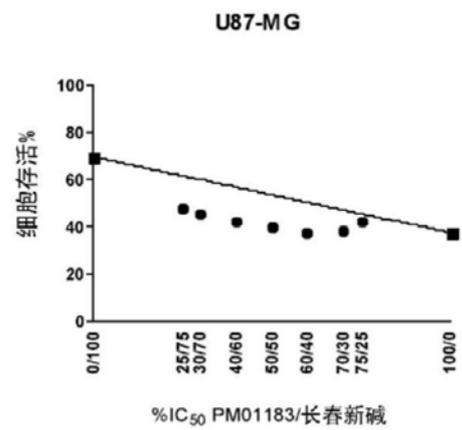


图249

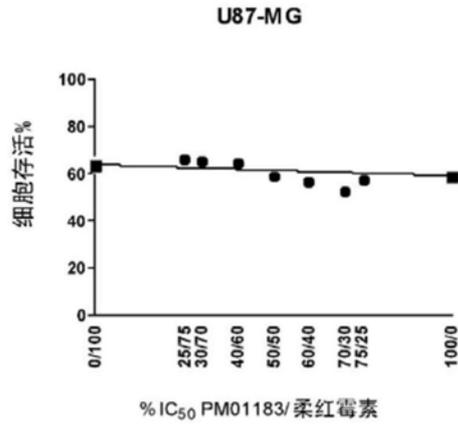


图250

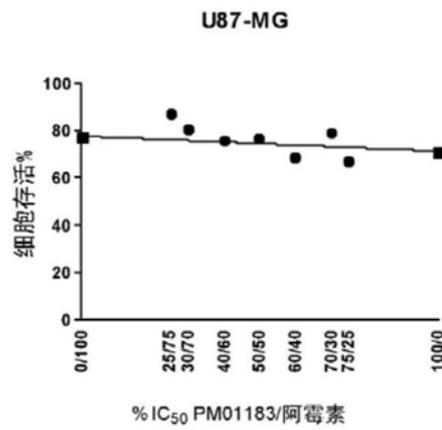


图251

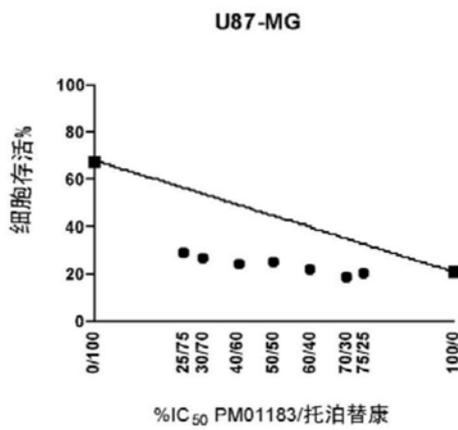


图252

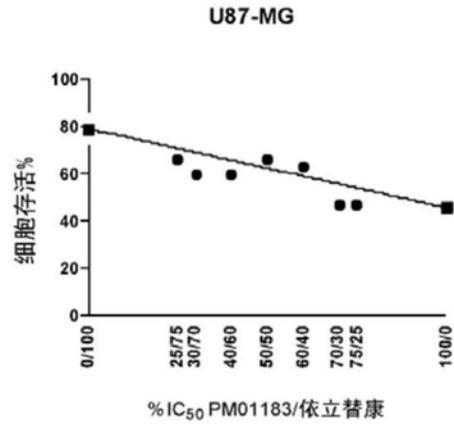


图253

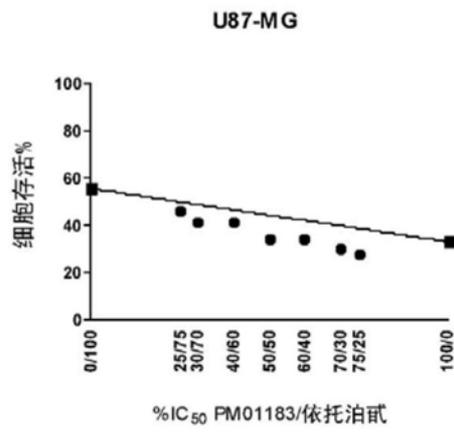


图254

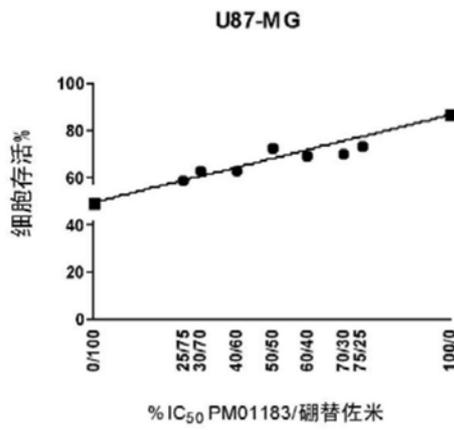


图255

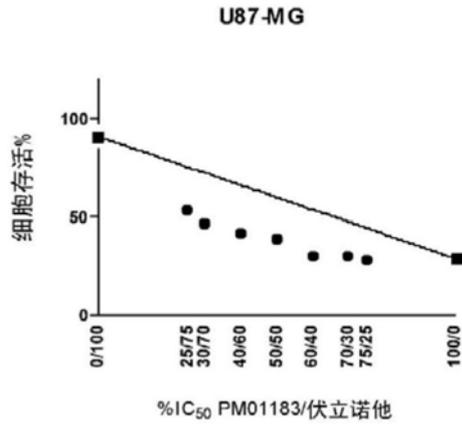


图256

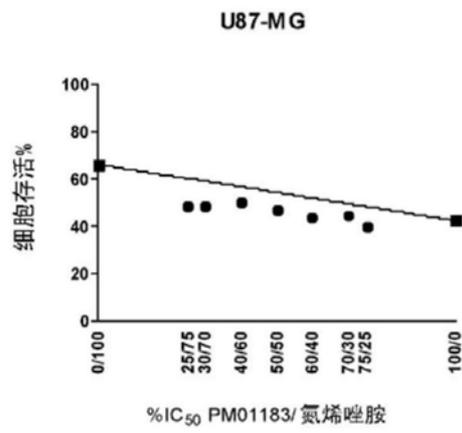


图257

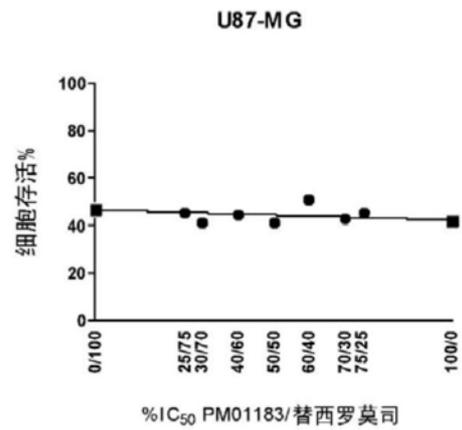


图258

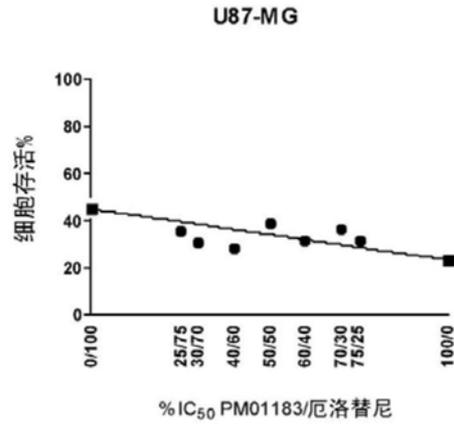


图259

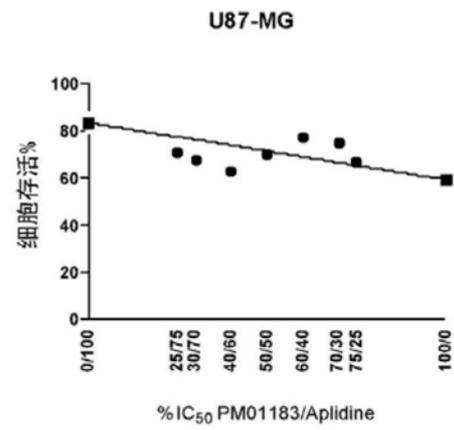


图260

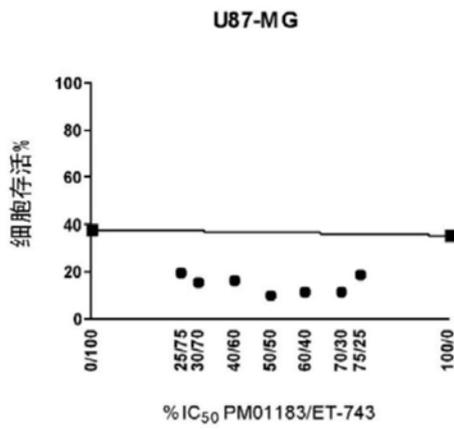


图261

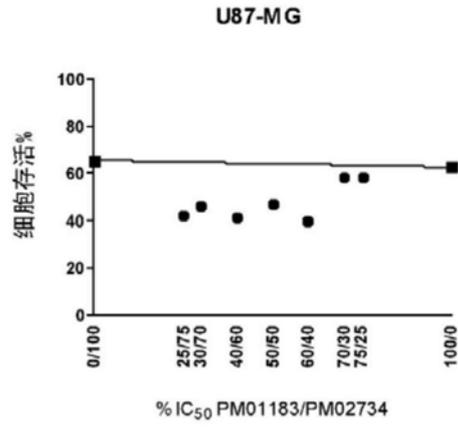


图262

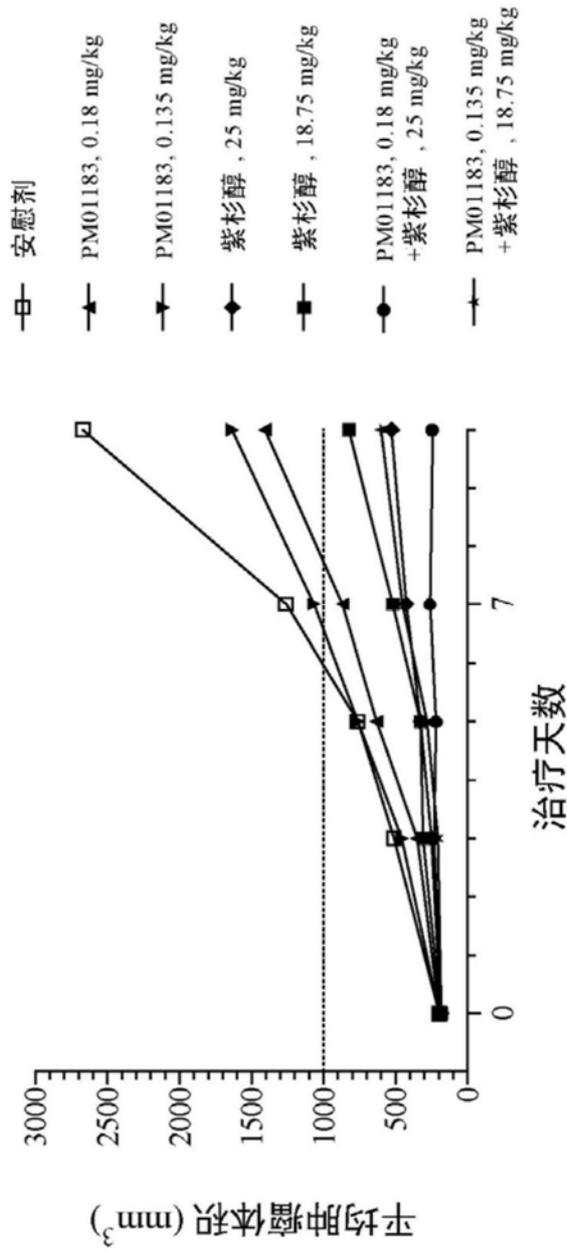


图263

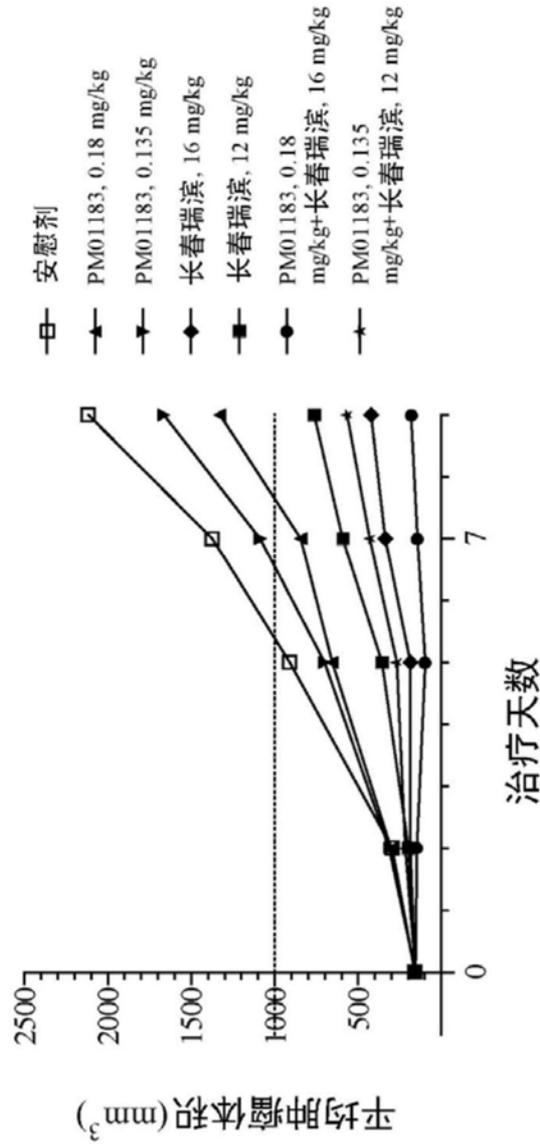


图264

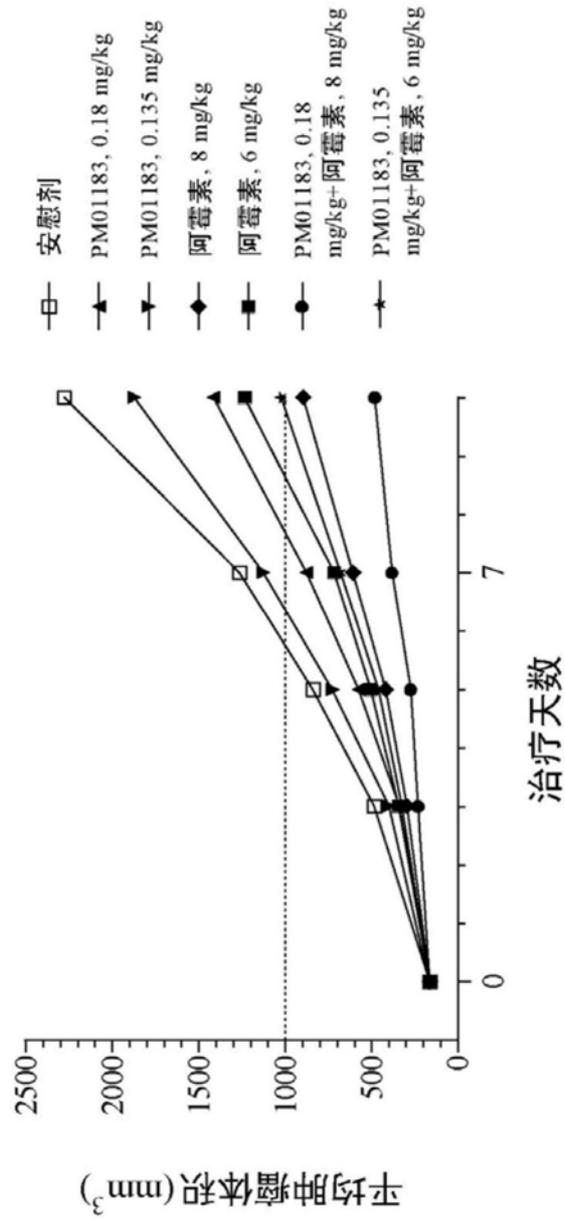


图265

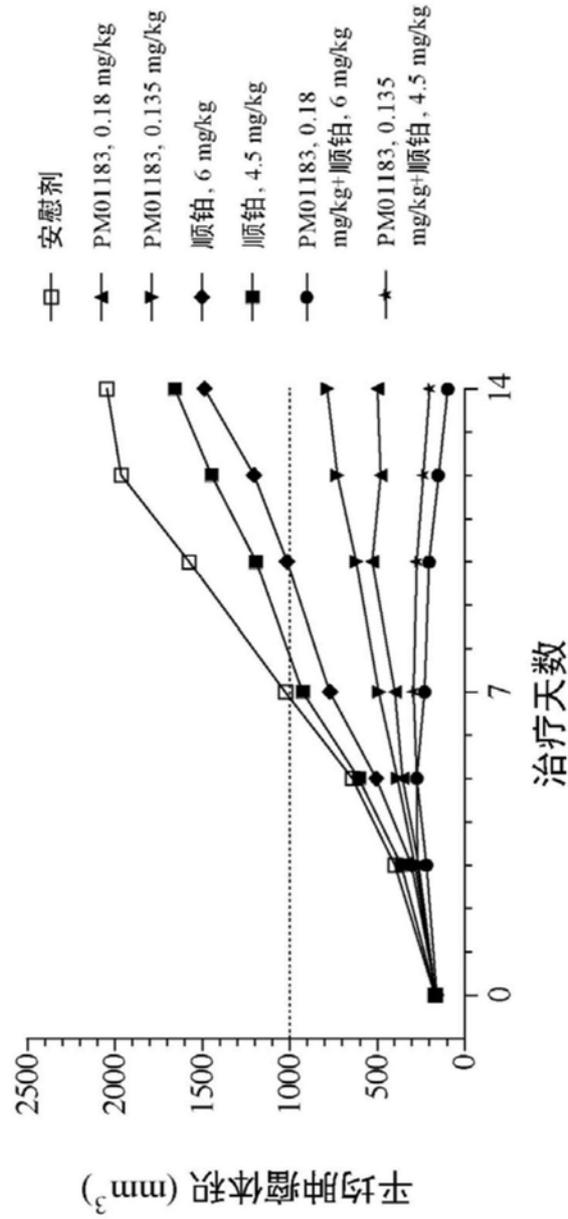


图266

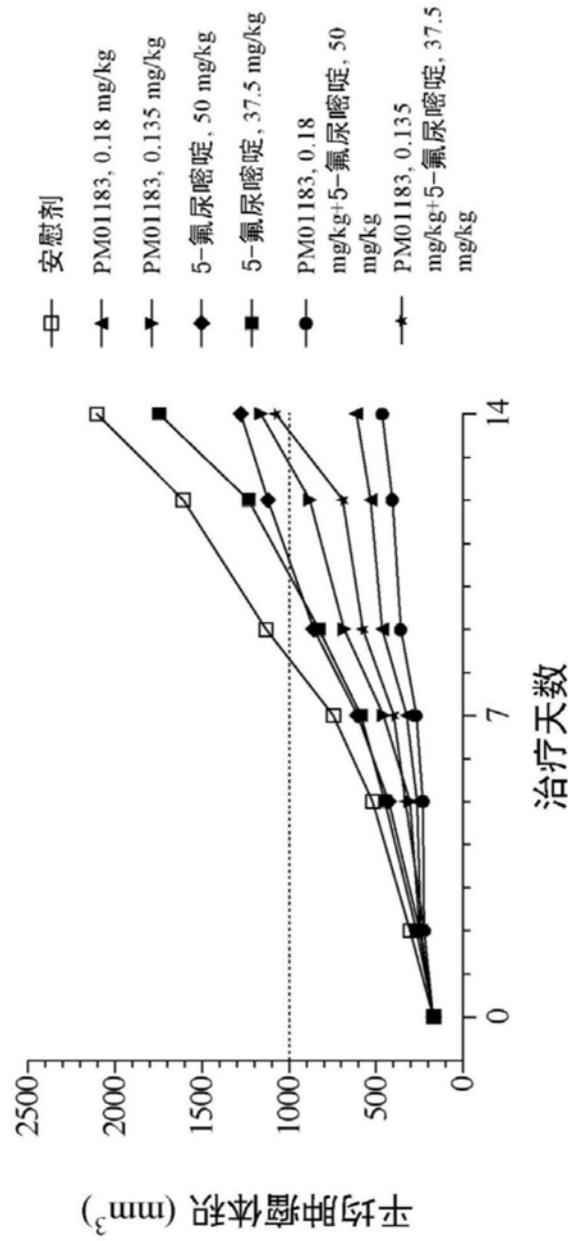


图267

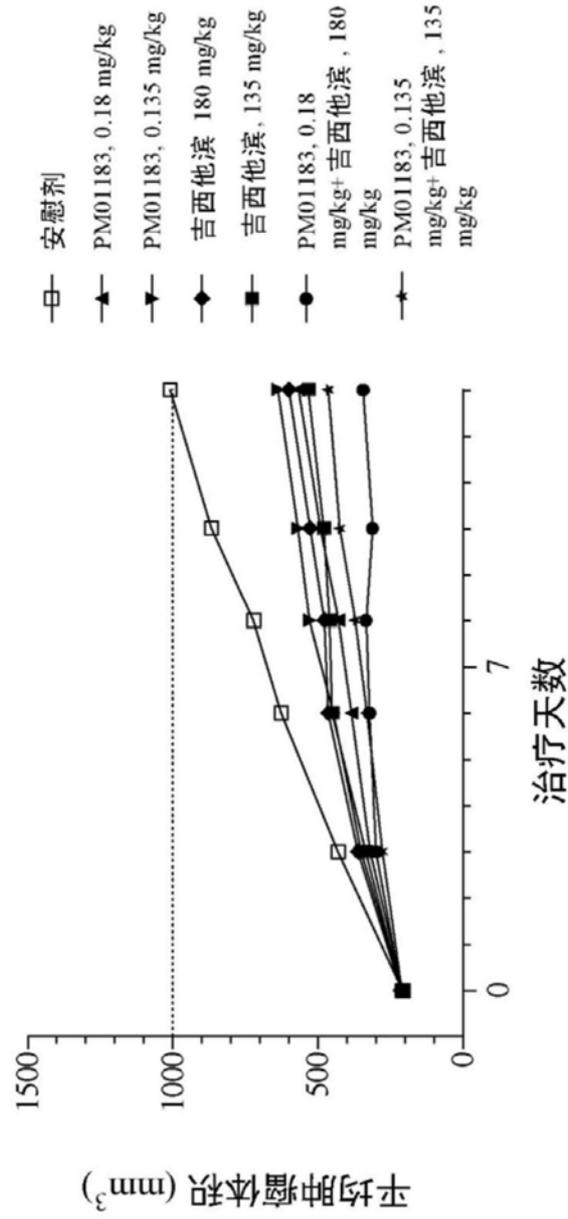


图268

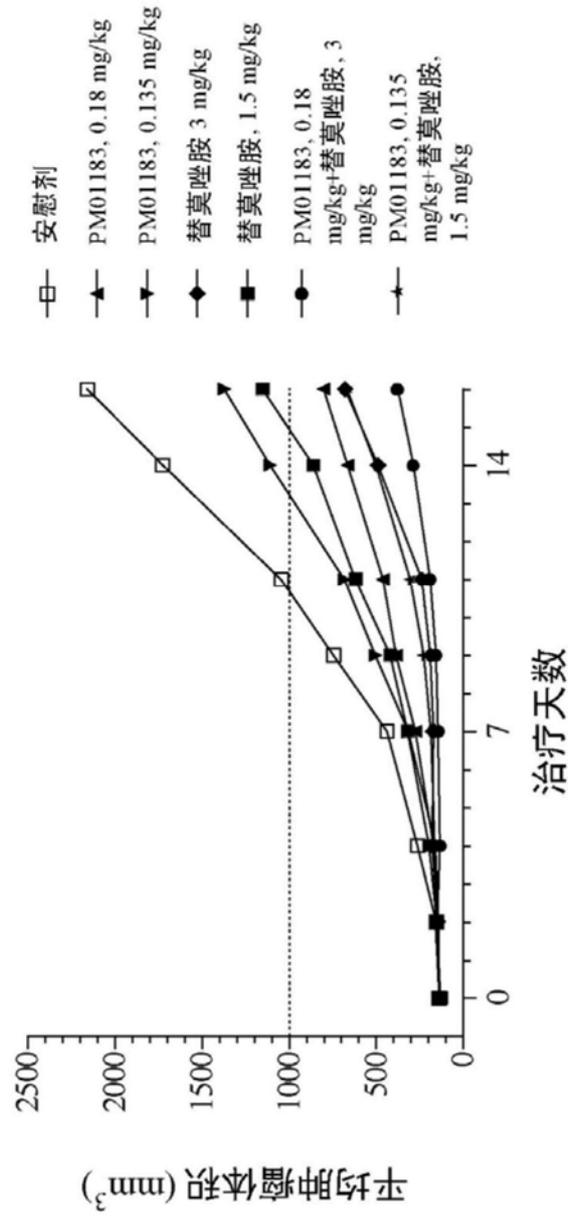


图269

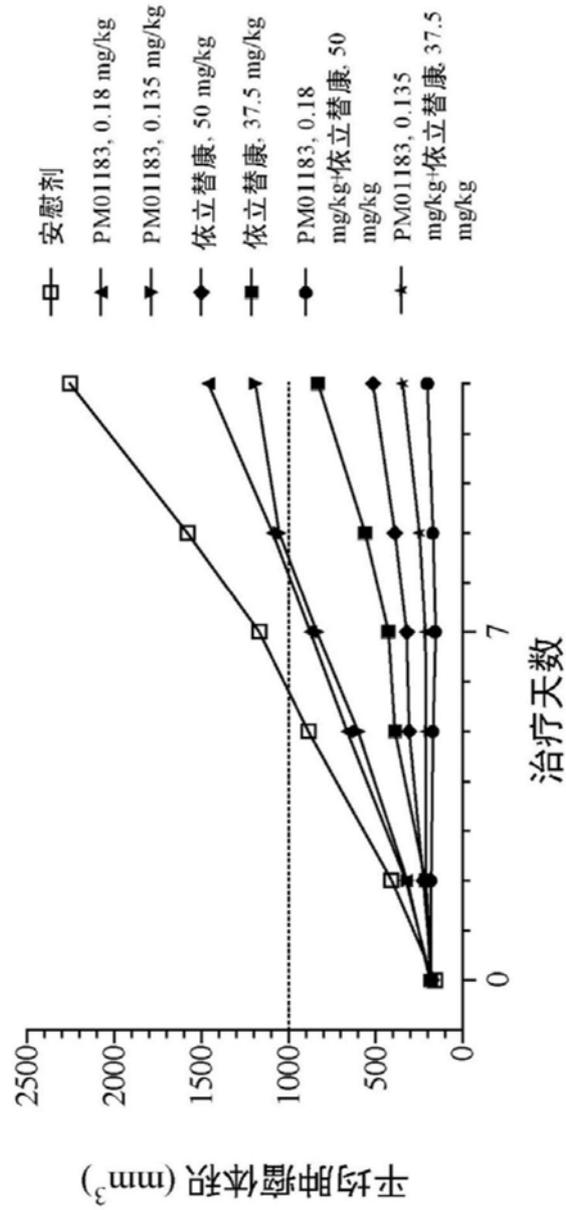


图270

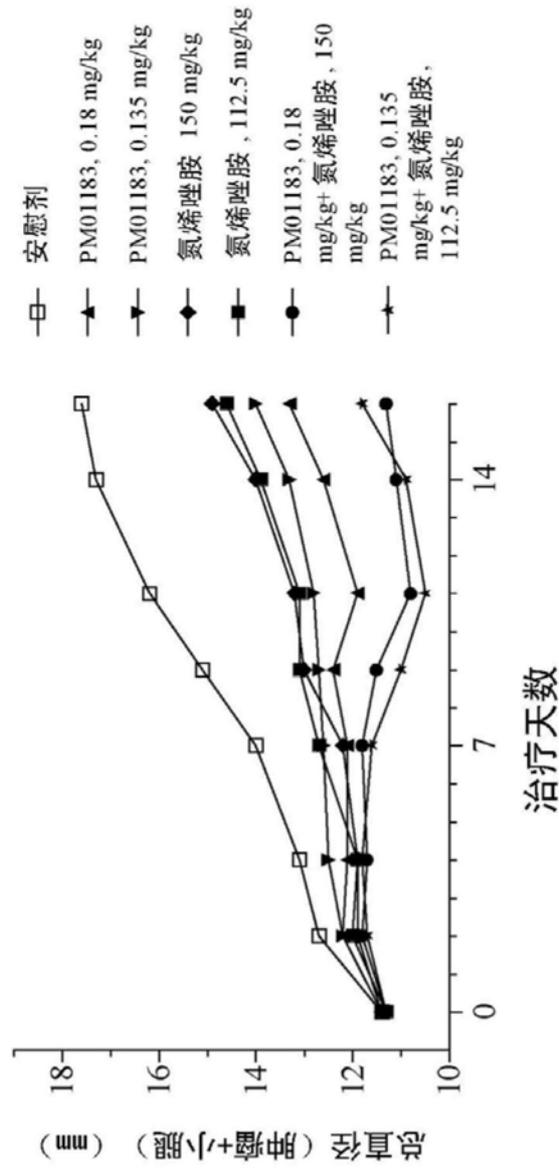


图271

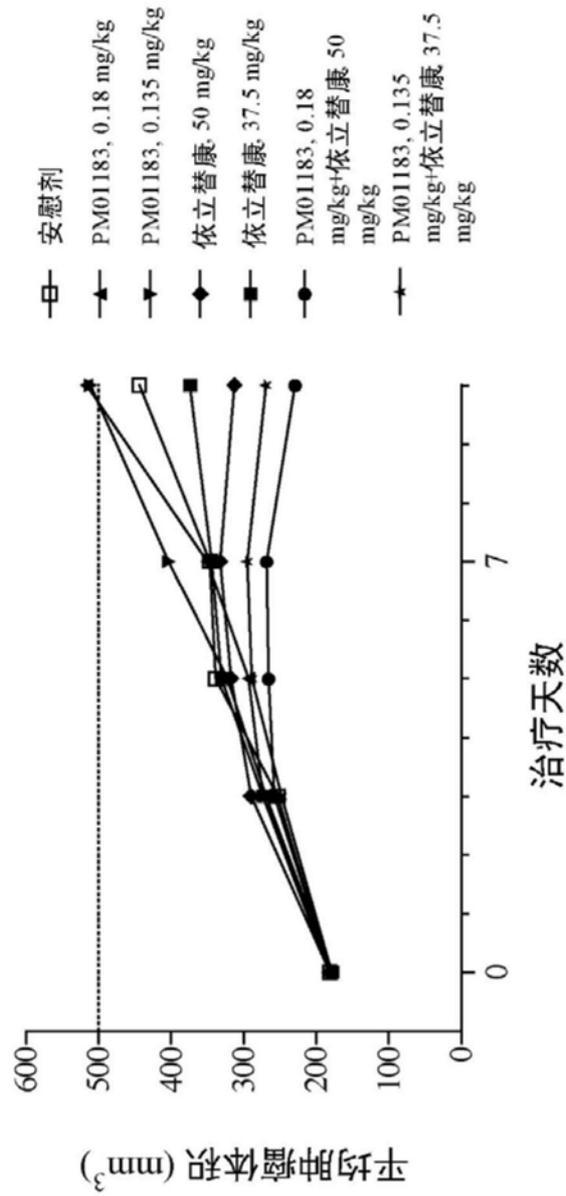


图272

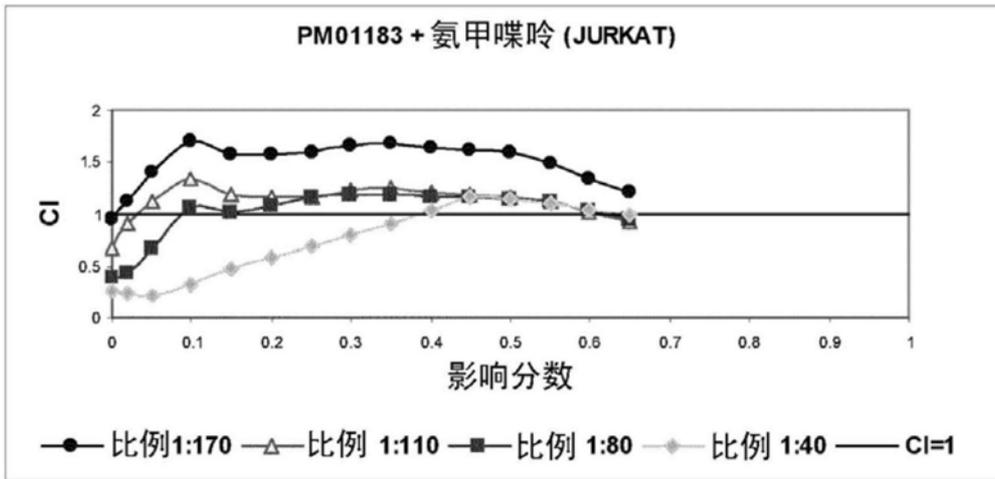


图273

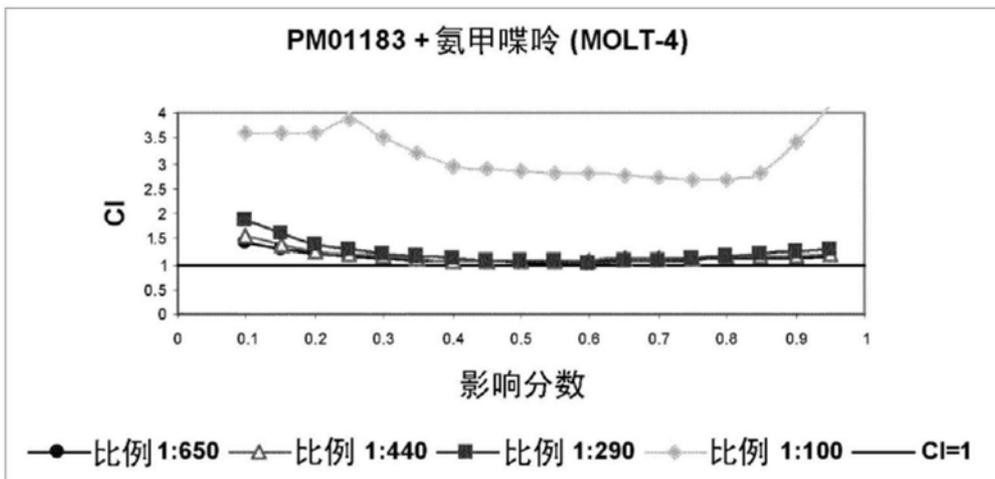


图274

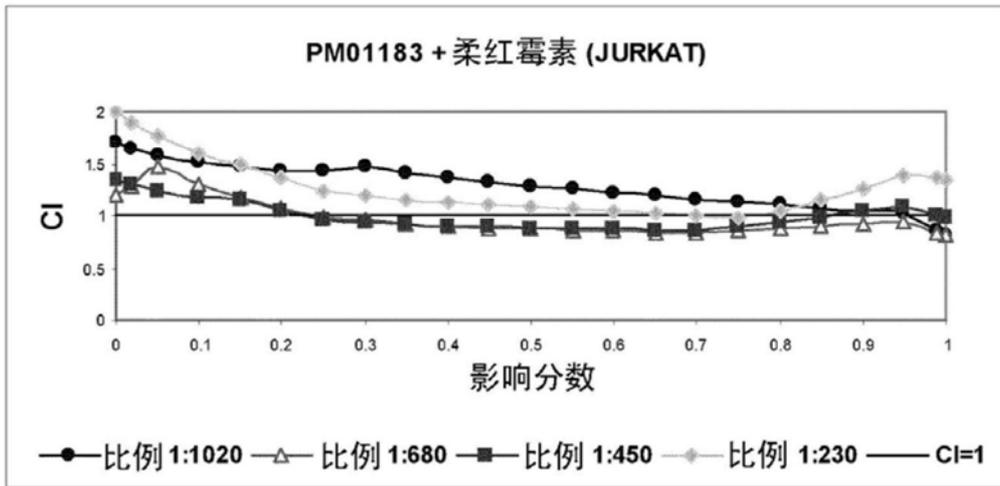


图275

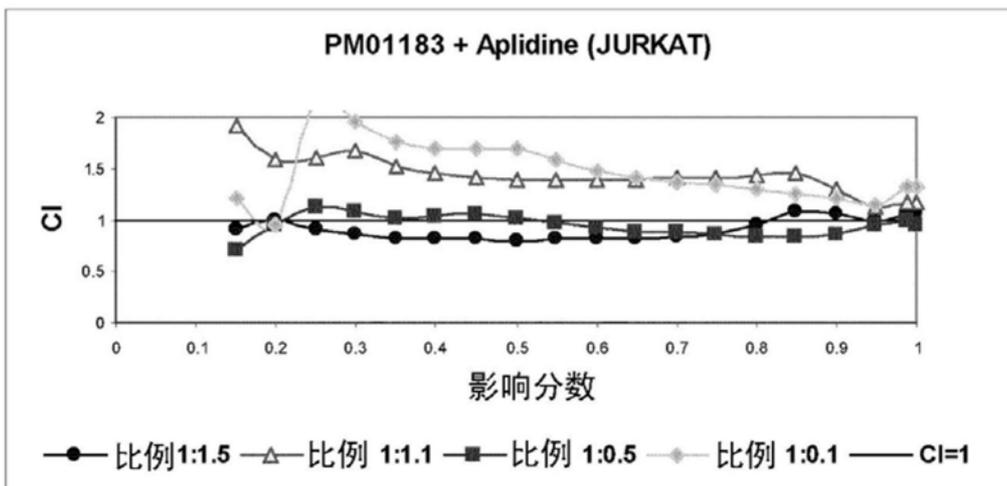


图276

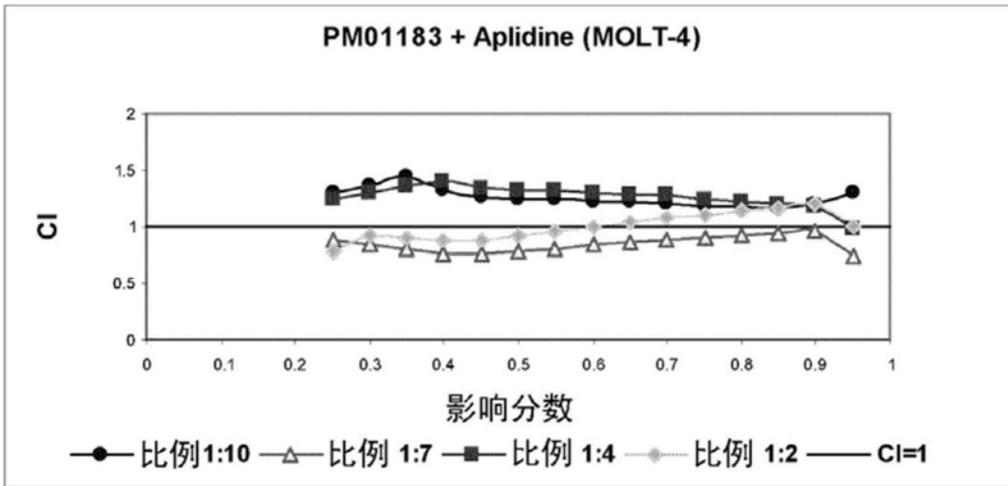


图277

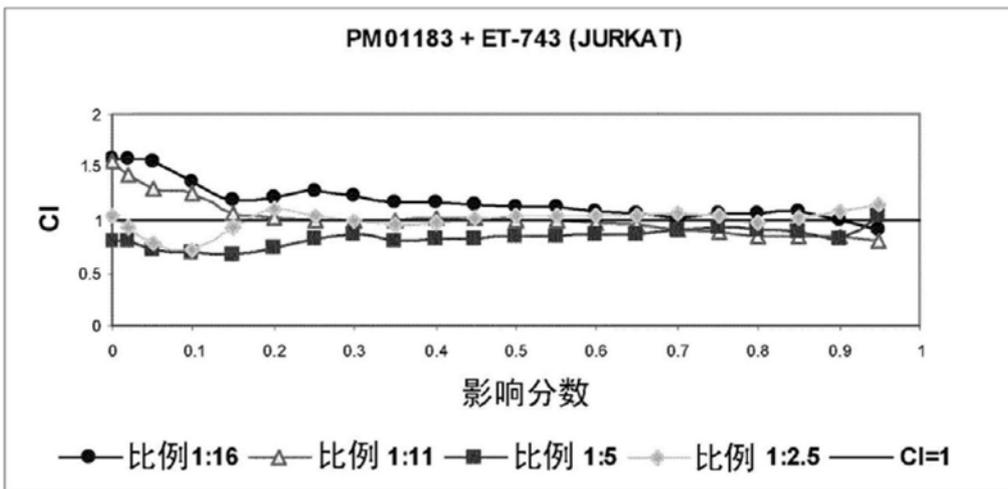


图278

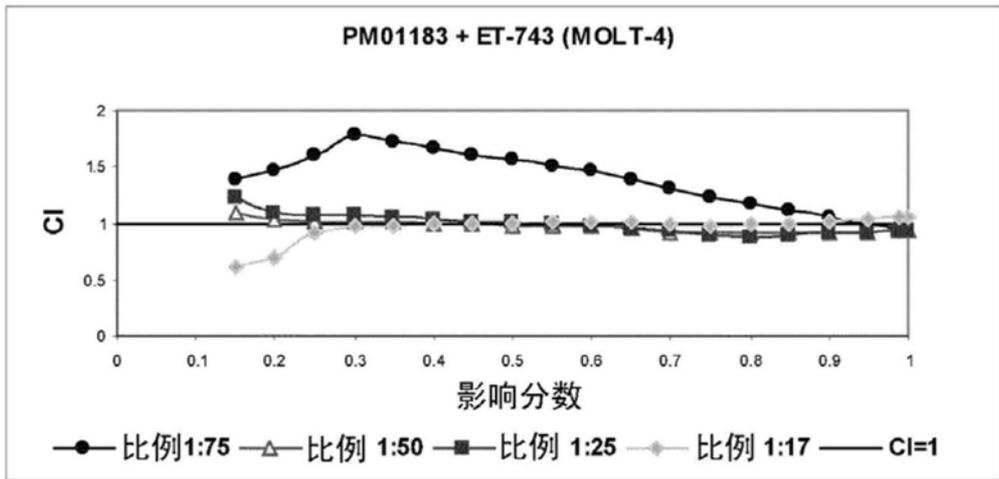


图279

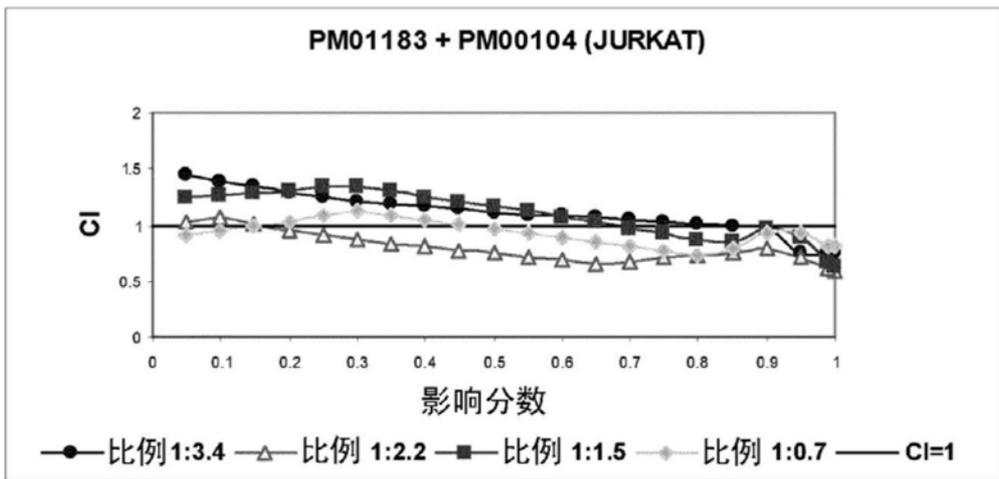


图280

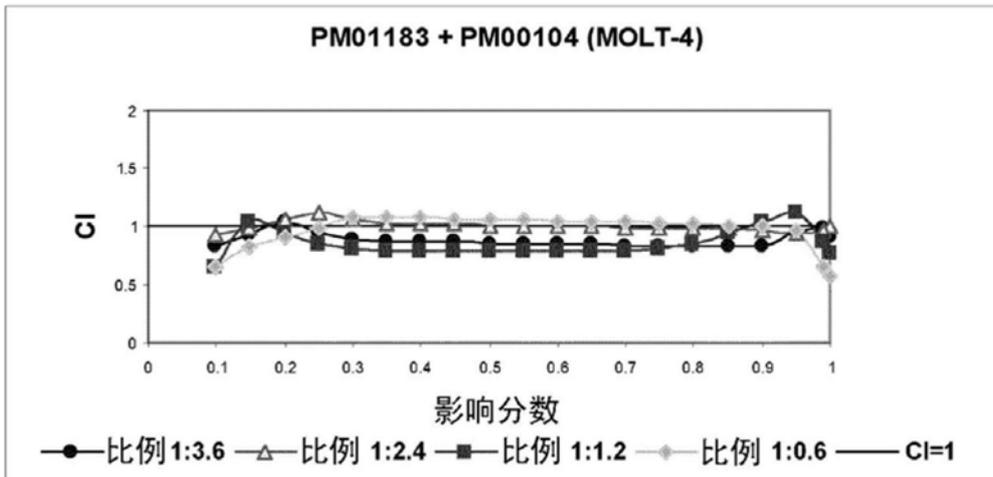


图281

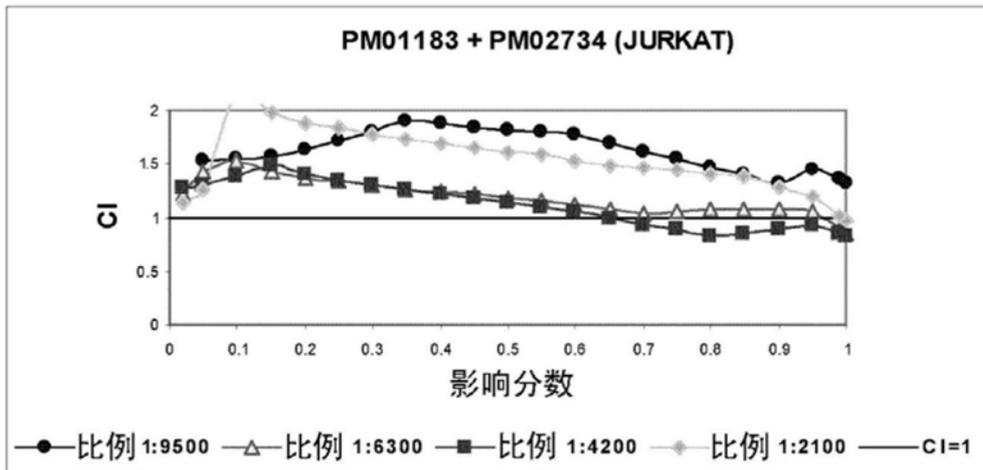


图282

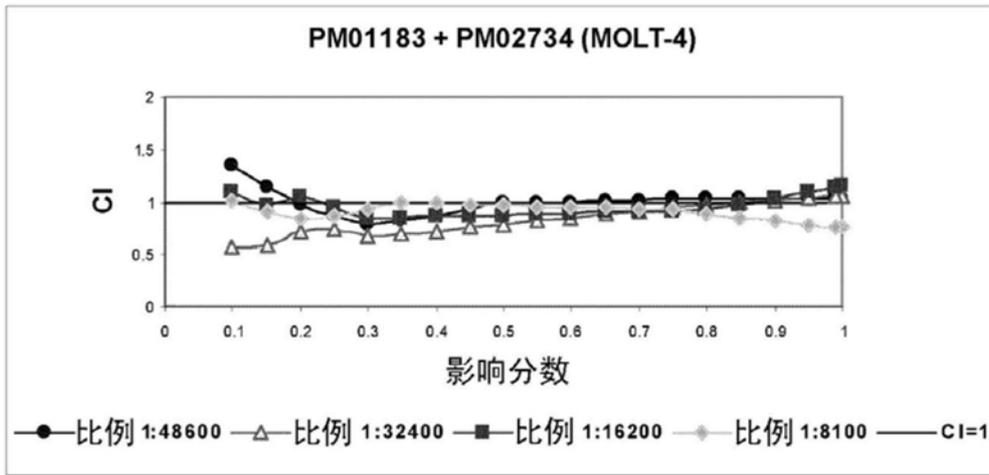


图283

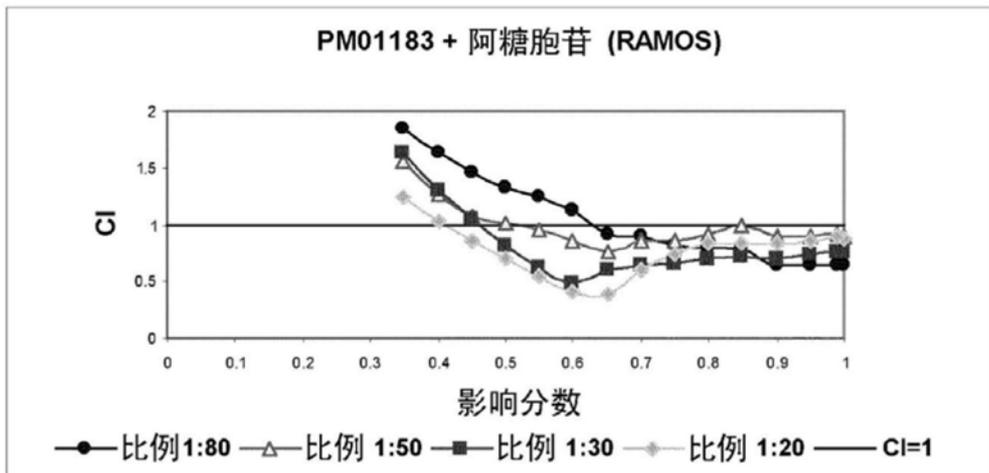


图284

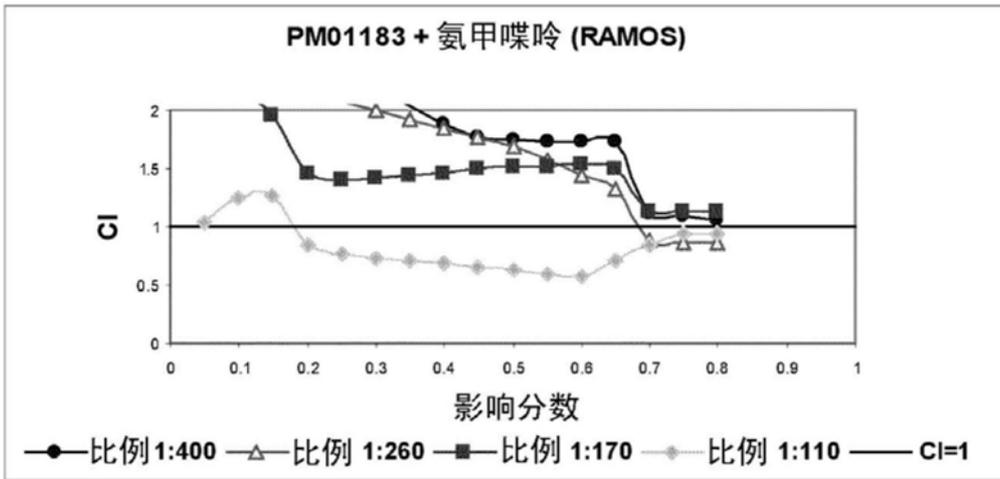


图285

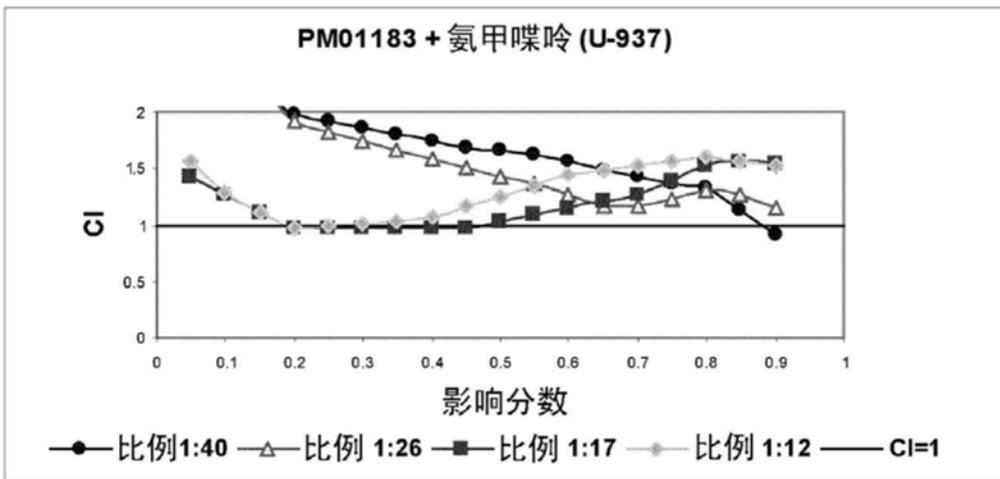


图286

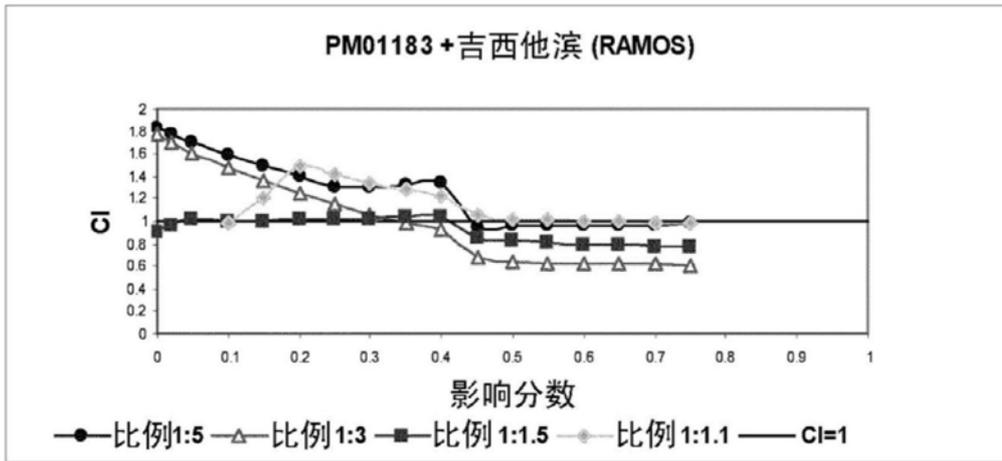


图287

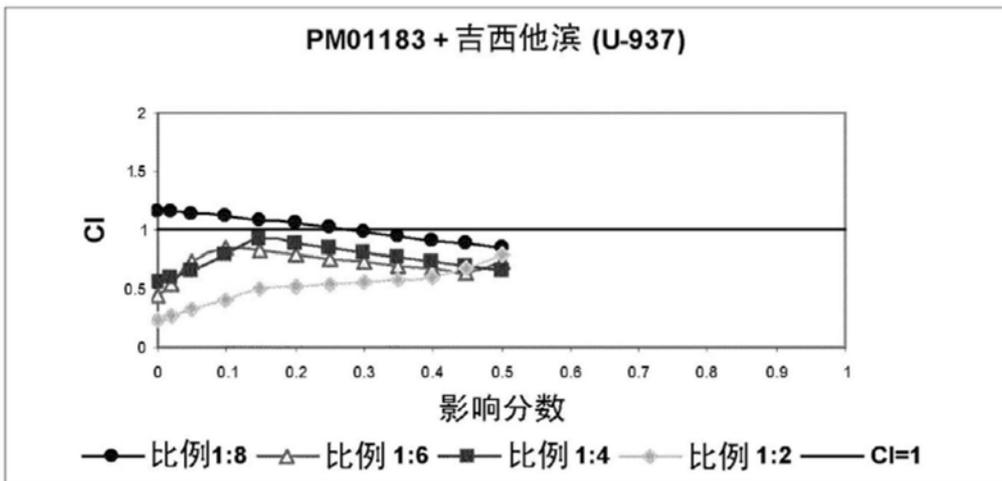


图288

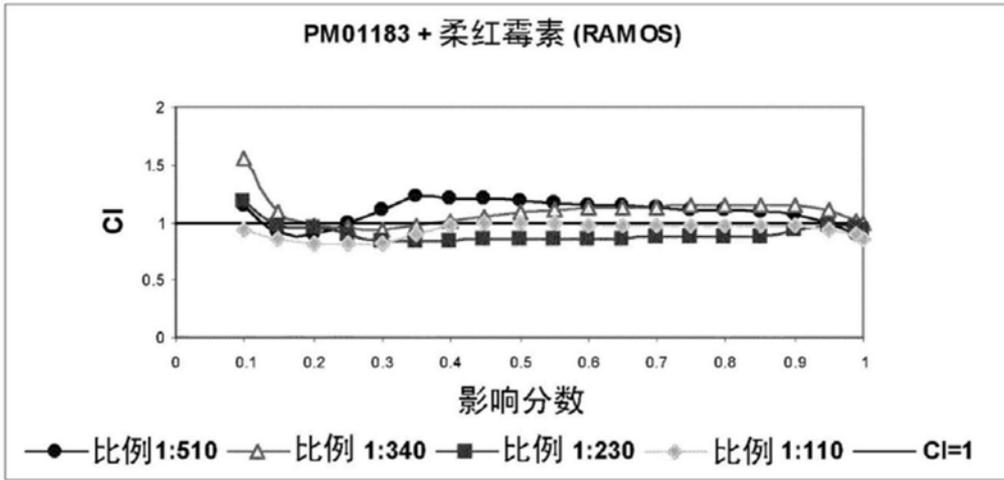


图289

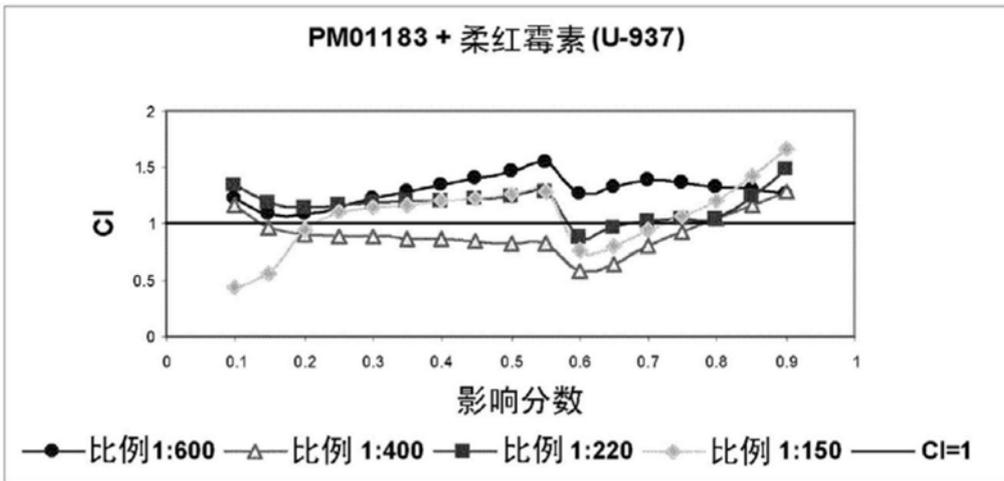


图290

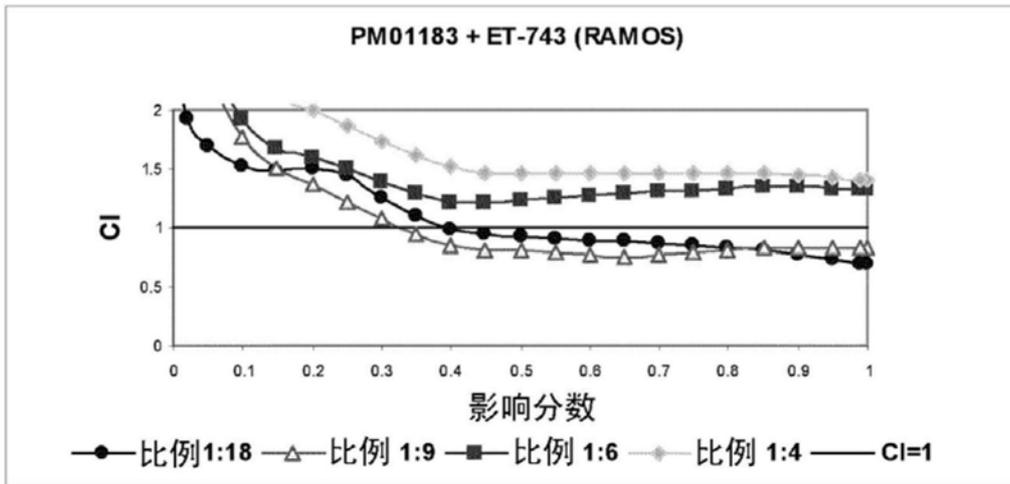


图291

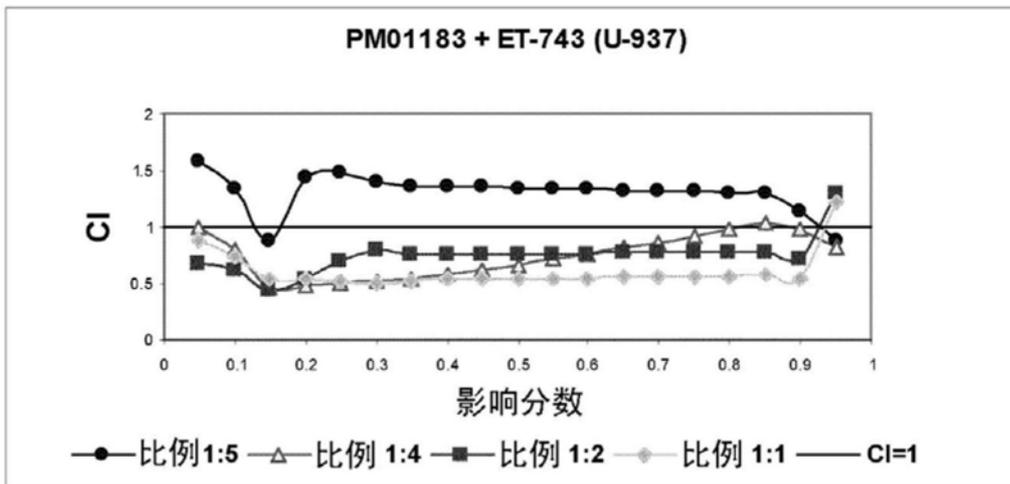


图292

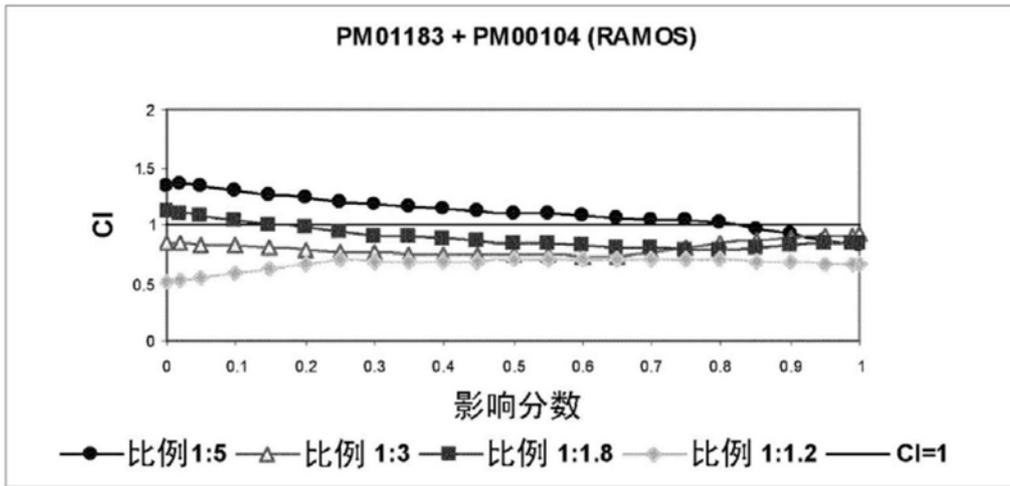


图293

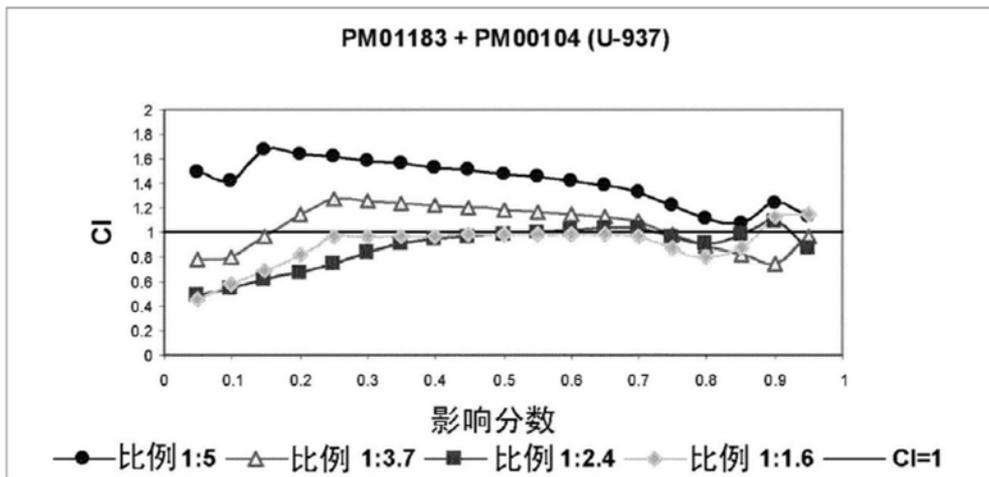


图294

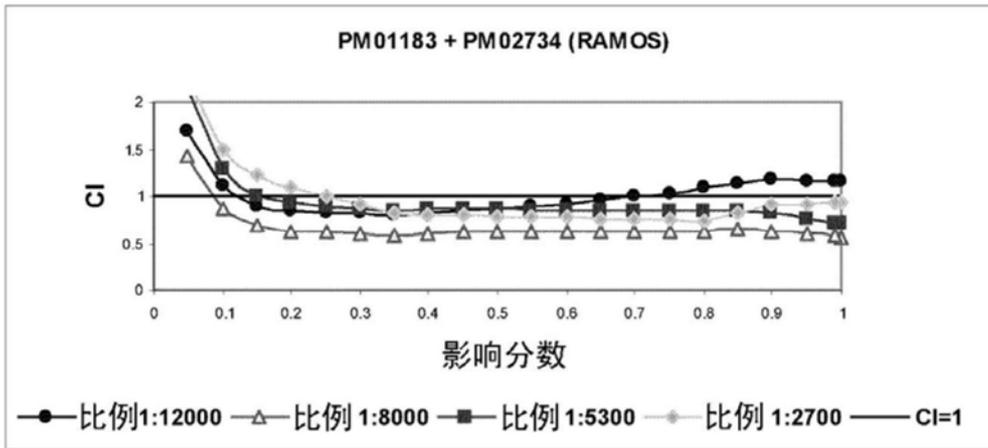


图295

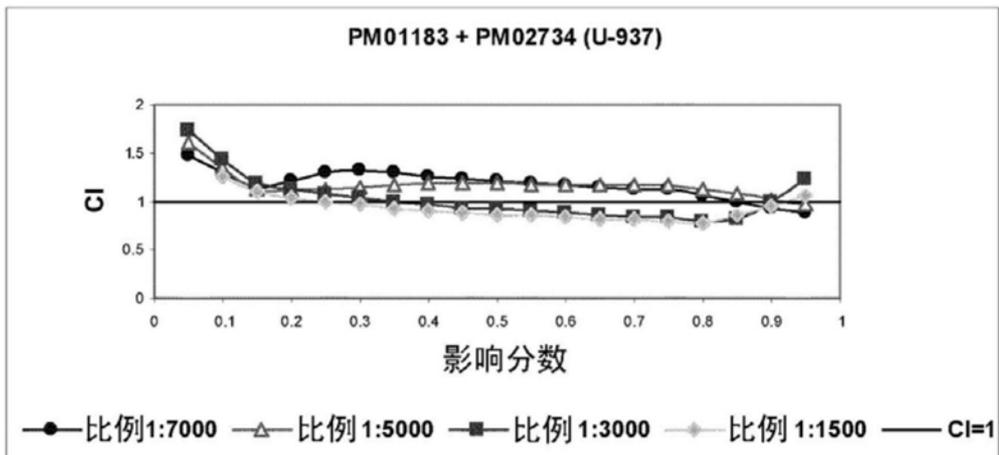


图296