

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 45/06

A61K 31/495 A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821803.2

[43] 公开日 2004 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 1486193A

[22] 申请日 2001.11.6 [21] 申请号 01821803.2

[30] 优先权

[32] 2000.11.6 [33] US [31] 60/246,233

[32] 2000.11.13 [33] US [31] 60/248,095

[32] 2001.10.19 [33] US [31] 60/345,982

[86] 国际申请 PCT/GB01/04902 2001.11.6

[87] 国际公布 WO02/36135 英 2002.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.7

[71] 申请人 法马马有限公司

地址 西班牙马德里

[72] 发明人 高桥直人 S·维特曼

M·德恩卡西 G·T·费克洛思

R·吉瓦滋 A·格斯彻尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 张广育

权利要求书 1 页 说明书 17 页

[54] 发明名称 有效的抗肿瘤治疗方法

[57] 摘要

ET-743 用于制备一种用于以使用 ET-743 与另一种药物的联合疗法对肿瘤进行有效治疗的药物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. ET-743 在制备一种用于以使用 ET-743 与另一种药物的联合疗法对肿瘤进行有效治疗的药剂中的应用。
2. 一种药物在制备一种用于以使用药物与 ET-743 的联合疗法对
5 肿瘤进行有效治疗的药剂中的应用。
3. 如权利要求 1 或 2 的应用，其中 ET-743 与所述药物的联合是协同性的。
4. 如权利要求 1、2 或 3 的应用，其中 ET-743 形成同一药剂的一部分，或是作为单独的药剂与所述药物同时或不同时给药。
- 10 5. 如前述任一权利要求所述的应用，其中所述联合疗法使用 ET-743 和一种蒽环类抗生素。
6. 如权利要求 5 的应用，其中所述联合疗法使用 ET-743 和阿霉素。
7. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用，其中所述联合疗法使
15 用 ET-743 和铂类抗肿瘤化合物。
8. 如权利要求 7 的应用，其中所述联合疗法使用 ET-743 和顺铂。
9. 如前述任一权利要求所述的应用，其中所述联合疗法使用 ET-743 和地塞米松。
- 20 10. ET-743，及在对肿瘤患者给药中和 ET-743 起协同作用的抗肿瘤药。

有效的抗肿瘤治疗方法

本发明涉及有效的抗肿瘤治疗方法。

- 5 埃克坦纳西丁 (Ecteinascidin) 743, 即 ET743, 是一种得自海产资源的抗癌试剂。

发明背景

读者可以参考 2000.11.23 公开的 W00069441 关于 ET743 治疗癌症的组合物及用途。该文献引用在此作为参考。

- 10 发明概述

根据本发明的一个方面, 我们提供了应用 ET 743 及其它药物的有效的治疗联合。

优选实施方案

- 15 其它药物可形成同一组合物的一部分, 或在同时或不同时作为单独的组合物进行给药。其它药物并不特别限定, 合适的药物包括:

a) 具有抗有丝分裂活性的药物, 特别是那些药靶为细胞骨架成分的药物, 包括微管调节剂如紫杉碱类药物 (如紫杉酚、紫杉醇、taxotere、docetaxel), 鬼臼霉素或长春花属生物碱 (长春新碱、长春碱);

- 20 b) 抗代谢药物如 5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、嘌呤类似物如喷司他丁、甲氧喋呤;

c) 烷化剂如氮芥 (如环磷酰胺或异环磷酰胺);

d) 靶向 DNA 的药物如蒽环类抗生素药物多柔比星、阿霉素、表阿霉素或表柔比星;

- 25 e) 靶向拓扑异构酶的药物如依托泊苷;

f) 激素及激素兴奋剂或拮抗剂, 如雌激素、抗雌激素 (他莫昔芬及相关物质) 和雄激素、氟他胺、亮丙瑞林、戈舍瑞林、环丙孕酮或奥曲肽;

g) 靶向肿瘤细胞信号转导的药物包括抗体衍生物如 herceptin;

- 30 h) 烷化剂如铂类药物 (顺铂、卡铂、奥沙利铂、卡帕) 或亚硝基脲;

i) 影响肿瘤转移的药物, 如基质金属蛋白酶抑制剂;

j) 基因治疗和反义试剂;

k) 抗体治疗剂;

l) 其它来自海产资源的有生物活性的物质, 特别是 didemnins 如 aplidine;

5 m) 类固醇, 特别是地塞米松;

n) 抗炎药物, 特别是地塞米松; 以及

o) 止吐药物, 特别是地塞米松。

作为本专利说明书的一部分, 我们列举了一系列的参考实施例。这些实施例证实了应用 ET-743 与其它药物联合可提高疗效, 并涉及应用 ET-743 的不同的联合。

实施例 1 涉及 ET-743 与阿霉素的联合在无胸腺大鼠体内对鼠和人的肉瘤生长的抑制作用。

实施例 2 表明 ET-743 与阿霉素的联合对软组织肉瘤系 HT-1080 和 HS-18 产生协同的细胞毒作用。

15 这两个实施例表明 ET-743 与蒽环类抗生素类药物 (特别是阿霉素) 的联合有超过加和作用的效果, 比其各自单独使用有更好的抗人肿瘤效果 (在特定的肉瘤试验中), 该效果与给药顺序无关。该结果明确表明其对肿瘤治疗的前景。

实施例 3 表明 ET-743 与顺铂协同的细胞毒作用。

20 实施例 4 顺序评估了 ET-743 与化疗药物的联合对一系列人类肿瘤细胞系的作用, 特别是 ET-743 与阿霉素、紫杉酚、SN-38、顺铂和吉西他滨的联合。

25 这两个实施例表明了 ET-743 与铂类抗肿瘤化合物 (特别是顺铂)、与核苷酸类似物吉西他滨, 及与拓扑异构酶 II 抑制剂 (SN-38, 得自前药 CPT-11 的活性物质, CPT-11 是一种喜树碱类药物) 的联合有超过加和作用的效果。这些联合比其各自单独使用有更好的抗人肿瘤效果 (在特定的不同的肿瘤细胞: 卵巢、结肠、肺、乳房、骨肉瘤的试验中), 该效果在某些情况下与给药顺序无关。该结果明确表明其对肿瘤治疗的前景。

30 有趣的是, 协同作用不是明确可预见的: 实施例 4 表明在大多数测试的联合中, 没有观察到协同作用 (实际上, 有些病例还显示拮抗作用)。

实施例 5 涉及 ET-743 与阿霉素或曲美沙特或紫杉醇的联合的评估。

该实施例显示了 ET-743 与蒽环类抗生素（特别是阿霉素）的联合有超过加和作用的效果。这些联合比其各自单独使用有更好的抗人肿瘤效果（在特定的肉瘤的试验中），该效果与给药顺序无关。该结果明确表明其对肿瘤治疗的前景。

实施例 6 至 8 是对前述实施例的补充，特别说明了 ET-743 与阿霉素以及 ET-743 与顺铂的协同作用。

实施例 9 证实本发明所述的联合的不同的效果，其中高剂量的地塞米松可防止 ET-743 的肝细胞毒性。

总之，本发明提供了组合物、治疗方法、制备组合物的方法及相关的实施方案。

本发明还扩展到应用于本发明治疗方法中的化合物，以及这些化合物在制备癌症治疗的组合物中的应用。

因此，本发明提供一种任何患癌症的哺乳动物，特别是人的治疗方法，包括给予患病个体治疗有效量的本发明的化合物，或相应的药物组合物。

本发明还涉及包含可药用载体的药物制剂，其中含有本发明的作为活性成分的一种或多种化合物，以及所述制剂的制备方法。

药物组合物的实例包括任何固体（片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂等）或液体（溶液剂、悬浮剂或乳剂）形式，其组成适于口服、局部或非肠道给药，其可以含有纯化合物或与任何载体或其它有药理活性的化合物的联合。这些组合物在非肠道给药时需要进行灭菌处理。

本发明的化合物或组合物的给药可以是任何合适的形式，如静脉滴注、口服、腹膜内给药和静脉内给药。我们优选的滴注时间不超过 24 小时，更优选是 2-12 小时，最优选是 2-6 小时。在医院内不过夜的短期滴注治疗是特别希望的。然而，如果需要，滴注可在 12-24 小时之间，甚至更长。滴注合适的间隔一般为 2-4 星期。包含本发明化合物的药物组合物可以做成脂质体或纳米颗粒的微胶囊形式的持久释放制剂或其它标准释放形式释放。

化合物合适的剂量根据制剂形式、给药方法及特定的施用位置、患者及所治疗的肿瘤而不同。其它因素如年龄、体重、性别、饮食状

况、给药时间、排泄速率、患者健康状况、药物联合、身体的敏感度及疾病的严重程度也要考虑到。给药可以在最大耐受剂量内持续或周期性实施。

本发明的联合可用于顽固性患者。读者可参考 W00069441 中的
5 ET-743 给药剂量方案，及其它本发明的药用联合的应用资料。

实施例

实施例 1

ET-743 与阿霉素的联合对无胸腺大鼠体内的鼠和人肉瘤的肿瘤生长抑制作用。

10 ET-743 已被证实具有对用先前的包括阿霉素 (Dx) 和异环磷酰胺的化疗难以治愈的软组织和骨肉瘤患者的临床治疗活性。考虑到将 ET-743 与 Dx 联合有潜在的临床价值，我们研究了该联合对鼠纤维肉瘤 UV2237、它的 mdr 耐受亚系 UV2237/ADR 和人类横纹肌肉瘤移植
15 TE671 的作用。ET743 和 Dx 单独使用对鼠 UV2237 纤维肉瘤有效，然而对 UV2237/ADR 和 TE671 无效或基本无效。但是，ET-743 与 Dx 的联合却对以上三种疾病模型均有效。这种协同作用在人类横纹肌肉瘤 TE671 中特别显著，且似乎与给药顺序或联合无关。

在肿瘤 TE671 约 100mg 时单次静脉给药后，肿瘤重量抑制作用值 (TWI) 和 Log10 细胞杀灭水平 (LCK) 值分别是；单独使用 ET-743
20 (0.1mg/kg)，为 46%和 0.132；单独使用 Dx (10mg/kg)，为 50%和 0.33；同时给药 ET-743(0.1mg/kg)和 Dx(10mg/kg)，为 77%和 0.924；先给 ET-743 (0.1mg/kg)，1 小时后给药 Dx (10mg/kg)，为 82%和 1.12；先给 Dx (10mg/kg)，1 小时后给药 ET-743 (0.1mg/kg)，为 75%和 0.85。

25 数据显示 ET-743 和 Dx 的联合对单独使用这些药物无效或基本无效的肿瘤同样有效，这为使用这种联合进行临床研究提供了有力的理论支持。

实施例 2

30 ET-743 和阿霉素对软组织肉瘤系 HT-1080 和 HS-18 产生协同的细胞毒作用。

两种肉瘤细胞系 HT-1080 和 HS-18 用于评估 ET-743 与阿霉素、曲美沙特或紫杉醇的联合的毒性。HT-1080 是对 ET-743 敏感的纤维肉瘤

细胞系 ($IC_{50} = 10\text{pm}$)，HS-18 是对 ET-743 较不敏感的脂肪肉瘤细胞系 ($IC_{50} = 270\text{pm}$)。ET-743 与这些药物按恒定摩尔比联合使用，用 Chou and Talalay 法分析，结论是 ET-743-阿霉素的联合有协同作用，而 ET-743 同曲美沙特或紫杉醇的联合却没有协同作用（温育 72 小时）。

5 在细胞暴露在 ET-743 下 72 小时，并在后 48 小时内加入阿霉素、曲美沙特或紫杉醇温育，同样得到 ET-743 与阿霉素对两种肉瘤细胞系的协同作用。有趣的是，先用紫杉醇而后用 ET-743 的效果比相反的顺序给药效果要好。这些结果促进了阿霉素与 ET-743 联合治疗软组织肉瘤患者的临床实验，因为这两种药物都显示对此种疾病的治疗活性。

10 实施例 3

ET-743 与顺铂协同的细胞毒作用。

ET-743 在许多临床前的实验中显示具有惊人的抗肿瘤活性，并很有希望具有临床活性。ET-743 在小沟内与 N2 鸟嘌呤结合并影响转录的调节 (Minuzzo 等的 PNAS, Vol. 97, 6780-84, 2000)。

15 早期的研究显示错配修复 (MMR) 缺陷细胞与正常细胞一样都对 ET-743 敏感。NER 缺陷细胞对 ET-743 的敏感度是对顺铂的敏感度的 6-8 倍。在 ET-743 和顺铂的不同的修复机理的基础上及由于此种联合的潜在的令人感兴趣的临床应用，我们做了评估 ET-743 和顺铂在几种人肿瘤细胞系中的细胞毒作用的研究。人类卵巢癌 Igrove-1 细胞群、

20 耐受 ET-743 的亚系 (IG/PSC/ET)、人结肠癌 HCT 116 (MMR 缺陷细胞) 和 HCT 11-ch3 (MMR 正常细胞) 细胞系被用于本研究中。

这些细胞用不同浓度的 ET-743 或 cisDDP 单独或联合处理 1 或 24 小时，用比色分析法在经 sulforodhamine B 染色后评估其细胞毒性。在所有细胞系中在 1 小时或 24 小时观察协同作用。有趣的是，在对

25 cisDDP 耐受的 HCT 116 中，ET-743 明显有相反的敏感性，即使在单独应用基本无效的 ET-743 浓度下。这些数据综合起来显示临床研究 ET-743 与 cisDDP 联合的合理性。

实施例 4

ET-743 与阿霉素、紫杉醇、SN-38、顺铂和吉西他滨的联合。

30 评估 ET-743 与阿霉素、紫杉醇、SN-38、顺铂和吉西他滨的联合对一系列人肿瘤细胞系的作用。这些研究是为了确定 ET-743 与标准的化疗药物间的相互作用的性质以及使用顺序对抗肿瘤活性的影响。多

种 ET-743 与标准细胞毒试剂的联合用于一种无模型设计 (Laska. et al. Biometrics 50: 834, 1994), 以描述药物间的相互作用的性质。这些研究表明, 与给药方式无关, 药物间的相互作用呈现出最典型的加和形式。

- 5 当 ET-743 的联合作用于非小细胞肺癌 (先用 SN-38)、骨肉瘤 (先用 ET-743, 后用顺铂)、乳癌 (先用 ET-743, 后用吉西他滨)、结肠癌 (先用 ET-743, 后用 SN-38 及与 SN38 同时使用) 细胞系时显示出药物间的协同作用。观察到加和 / 协同作用的药物间相互作用形式 (先用 ET-743, 后用 SN-38 治疗 NSCL; 先用 SN-38 治疗结肠癌和 NSCL; 10 用 SN-38 同时用顺铂治疗骨肉瘤, 用 SN-38 治疗 NSCL)。当紫杉酚同时用于两种 NSCL 细胞系, 阿霉素用于横纹肌肉瘤细胞系时, 发现拮抗作用。

这些研究表明在二期临床实验中, ET-743 可以与数个细胞毒试剂联合应用于较宽范围类型的肿瘤治疗中。

15 材料和方法

细胞培养:

- 人类乳房肿瘤细胞系 (MDA-435, MDA-231, T-470)、非小细胞肺肿瘤细胞系 (NCI-H522, NCI-H226, NCI-H23)、结肠肿瘤细胞系 (HCT-116, HT-29, Colo-320)、骨肉瘤肿瘤细胞系 (HOS, U-2, 20 SaOS-2)、横纹肌肉瘤肿瘤细胞系 (RH1, RH30, RD) 在 RPMI-1640 中加入 10% 胎牛血清和 2mM L-谷氨酰胺进行培养。所有原培养物放入 75cm² 烧瓶中在 37℃ 环境为 5%CO₂-95% 空气的湿润培养箱中培养。

IC₅₀ 分析:

- 将预定数目的指数生长的肿瘤细胞接种在 96 孔组织培养皿中, 稳定 24 小时。然后, 含有连续稀释浓度的 ET-743 或标准化疗药剂的药物皿加入到细胞中。细胞做 24 小时培养, 持续 3 天, 而后加入 MTT 持续 4 小时。所得的甲臞结晶用酸 / 醇溶解, 用微板读取器测定吸光率 (570nm 检测波长 / 630nm 对照波长)。结果用和培养基对照比较的肿瘤细胞杀灭百分数表示。

30 联合研究:

为研究药物的联合, 用于描述药物相互作用类型的浓度 (用单个试剂的 IC₅₀ 的百分数表示) 方案如下所述:

药物浓度 (用 IC ₅₀ 的百分数表示)	
ET-743	标准试剂
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

药物联合研究的统计学分析:

- 对每个受试联合 (75:25 - ET-743 / 标准试剂) 和端点 (100:0 - ET-743 和 0:100 - 标准试剂) 进行统计学比较。统计学意义上的显著性差异要求在药物联合 (ET-743 与标准试剂) 的吸光率与两个端点 (单用 ET-743 和标准试剂) 的吸光率上存在不同。如果多数值 (5 个中 > 3) 较之具有统计学意义上的高或低, 则可认为其具有拮抗作用或协同作用。否则就更接近加和的相互作用关系。很难解释相对于端点间的连线有相当大的斜率。如果各个试剂的 IC₅₀ 曲线倾斜一致 (不太可能), 常常就可以确定药物的相互作用类型。

ET-743 与化疗药物的顺序联合		
肿瘤类型 / 细胞系	给药条件 / 试剂	所观察到的药物间作用类型
骨肉瘤		
NOS	24 小时 ET-743 而后 24 小时顺铂 24 小时顺铂而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 顺铂	协同 加和 加和
U2-OS	24 小时 ET-743 而后 24 小时顺铂 24 小时顺铂而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 顺铂	加和 加和 加和
Sa 06	24 小时 ET-743 而后 24 小时顺铂 24 小时顺铂而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 顺铂	加和 加和 加和 / 协同

<u>非小细胞肺癌</u>		
NCB-H226	24 小时 ET-743 而后 24 小时紫杉酚 24 小时紫杉酚而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 紫杉酚 24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时 SN38 而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / SN38	加和 加和 拮抗 加和 / 协同 加和 / 协同 加和
NCB-N522	24 小时 ET-743 而后 24 小时紫杉酚 24 小时紫杉酚而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 紫杉酚 24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时 SN38 而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / SN38	加和 加和 拮抗 加和 / 协同 加和 / 协同 加和
NCB-N23	24 小时 ET-743 而后 24 小时紫杉酚 24 小时紫杉酚而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 紫杉酚 24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时 SN38 而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / SN38	加和 / 拮抗 加和 拮抗 加和 协同 加和 / 协同
<u>乳癌</u>		
MDA-435	24 小时 ET-743 而后 24 小时吉西他滨 24 小时吉西他滨而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 吉西他滨	加和 加和 加和
MDA-231	24 小时 ET-743 而后 24 小时吉西他滨 24 小时吉西他滨而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 吉西他滨	加和 加和 加和
T47-8	24 小时 ET-743 而后 24 小时吉西他滨 24 小时吉西他滨而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 吉西他滨	加和 加和 加和
<u>结肠癌</u>		
MCT-116	24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时同时应用 ET-743 / SN38	协同 加和 加和

NT-29	24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时同时应用 ET-743 / SN38	加和 加和 加和
Colo-320	24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时 ET-743 而后 24 小时 SN38 24 小时同时应用 ET-743 / SN38	加和 加和 / 协同 协同
<u>横纹肌肉瘤</u>		
RN1	24 小时 ET-743 而后 24 小时阿霉素 24 小时阿霉素而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 阿霉素	加和 加和 拮抗
RD	24 小时 ET-743 而后 24 小时阿霉素 24 小时阿霉素而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 阿霉素	加和 加和 加和 / 拮抗
RN30	24 小时 ET-743 而后 24 小时阿霉素 24 小时阿霉素而后 24 小时 ET-743 24 小时同时应用 ET-743 / 阿霉素	加和 加和 拮抗

结论概述

这些研究表明，不管应用 ET-743 和标准化疗药物的顺序如何，所观察到的最典型的药物间的相互作用是加和型。

当 NC1-H552 和 NC1-H23 NSCL 细胞系先用 SN-38，骨肉瘤 HOS 先用 ET-743 加顺铂，T-470 乳腺癌细胞系用吉西他滨，结肠癌 HCT-116 用 SN-38，及对 Colo-320 结肠肿瘤细胞系共用 SN-38 时观察到协同作用。

当 NC1-H226 和 NC1-H23 NSCL 细胞系共用紫杉酚以及横纹肌肉瘤 RHI 肿瘤细胞系应用阿霉素时观察到拮抗作用。

10 实施例 5

ET-743 和其它抗肿瘤药剂的相互作用

虽然 ET-743 目前用于人类癌症的临床实验中，ET-743 的抗肿瘤活性机理并没有完全阐明。本实验的目的是用 Chou 和 Talalay 的联合指数 (CI) 法评估 ET-743 和其它抗肿瘤试剂 (阿霉素; DXR; 曲美沙特; TMTX 和紫杉醇; 紫杉酚) 的相互作用的性质。为了更好地了解 ET-743 如何用于临床，本实验应用 SRB 测定法检测 ET-743 和三种其

它抗肿瘤试剂联合在对两种软组织肉瘤细胞系 HT-1080 和 HS-18 的不同给药方案下的细胞毒性。DXR 是唯一的与 ET-743 联合后产生与给药顺序无关的协同作用的试剂。共同应用 ET-743 和 DXR 则在两种细胞系中都产生协同作用。

- 5 在该给药方案下的 CI 值 (平均值) 为: 在 HT-1080 细胞中相应 50、75、90 和 95% 的细胞杀灭水平分别为 0.86、0.83、0.84 和 0.85, 在 HS-18 细胞中相应 50、75、90 和 95% 的细胞杀灭水平分别为 0.89、0.74、0.64 和 0.60。在 DXR 之前应用 ET-743 24 小时的给药顺序对两种细胞系都是最有效的方案; 它在两种细胞系中直到约 90% 细胞杀灭水平都得到一致较低的 CI 值。在 ET-743 前应用紫杉醇也是有效的方案。这些结果表明 ET-743 和 DXR 的联合应在治疗软组织肉瘤上有进一步临床研究的价值。

材料和方法

化学试剂

- 15 ET-743 是由 Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, 西班牙马德里) 提供, 并制成 2mM 二甲基亚砷储备溶液。紫杉醇和 DXR 是从 Sigma 化学公司 (St. Louis, MO) 获得的。TMTX 是由 Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich) 提供的。

细胞培养

- 20 软组织肉瘤细胞系 HT-1080 和 HS-18 是在含有 10% 胎牛血清的 RP<I-1640 中单层培养的。

SRB 细胞毒检测

- 25 药物的细胞毒性是通过 SRB 细胞毒检测在 96 孔微量滴定板中进行的。将细胞接种到两排孔中 (每孔 5000 个细胞), 放入不同浓度的药物。细胞用 50% TCA 溶液固定 1 小时, 每孔加入 0.4% SRB (Sigma)。培养 30 分钟后, 用 1% 醋酸洗涤板, 在 570nm 下在 Biowhitaker 微量滴定读取器 2001 上读数。用不含药物的细胞的孔和只含药物不含有细胞的孔分别作阳性及阴性对照。

同时应用 ET-743 和 DXR、TMTX 或紫杉醇

- 30 细胞如前所述接种到 96 孔板中。细胞用七种不同浓度的单用的药物或联合的摩尔比 1:100 (ET-743: 其它药物) 的药物处理。72 小时后, 用 SRB 检测法测定细胞生长的抑制情况。

按顺序给药 ET-743 和 DXR、TMTX 或紫杉醇

用以上相同的装置，我们将细胞用三种不同的分别代表 ET-743、DXR、TMTX 和紫杉醇的 IC_{25} 、 IC_{50} 、 IC_{75} 的浓度的药物处理。用 ET-743 或药物联合预处理 24 小时后，各孔分别加入第二种药物处理 48 小时。

5 用 SRB 检测法测定细胞生长的抑制情况。

细胞周期分析

10 指数生长的细胞用或不用药物处理数小时。收集细胞并用冰冷的 70% 甲醇固定。用先前描述过的 propidium iodide 作 DNA 染色。一万个染色的细胞在 Becton Dickinson 荧光活化细胞分选装置 (FACS) 上作分析。

判断协同作用和拮抗作用，及 Isobolograms 的计算

用 Chou-Talalay 公式计算 CI 值，同时考虑药物的效力 (D_m 或 IC_{50}) 和剂量-效果曲线的形状 (m 值)。一般的经典 isobologram ($CI = 1$) 的公式如下：

$$15 \quad CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

其中分母上的 $(Dx)_1$ 和 $(Dx)_2$ 为 $(D)_1$ (ET-743) 和 $(D)_2$ (另一种药物) 单用给出 X% 抑制的剂量 (或浓度)，而分子上的 $(D)_1$ 和 $(D)_2$ 是联合 ET-743 和另一种药物也达到 X% 抑制 (即等效) 时的剂量。 $CI < 1$ ， $CI = 1$ ， $CI > 1$ 分别表示协同作用、加和作用和拮抗作用。

20 $(Dx)_1$ 或 $(Dx)_2$ 可以很容易地用 Chou 和 Chou et al 中值效应公式计算出来：

$$Dx = D_m [fa / (1-fa)]^{1/m} \quad (B)$$

其中 D_m 是中效剂量，得自中效坐标图上的 X 轴的截距的反 log 值，该坐标图 X 轴是 $\log(D)$ ，Y 轴是 $\log[fa / (1-fa)]$ ，或

25 $D_m = 10^{-(Y \text{ 轴截距}) / m}$ ， m 是中效坐标图的斜率。Chou 和 Chou 的计算机软件可自动计算出 m ， D_m ， Dx 和 CI 值。从 $(Dm)_1$ ， $(Dx)_2$ 和 $D_1 + D_2$ ，可以很容易地在公式 A 的基础上自动计算 isobolograms。

对于两种试剂保守的相互间非排他的 isobolograms，在公式 A 中加入第三项

$$30 \quad (D1) (D2) / (Dx)_1 (Dx)_2 \quad (C)$$

为简单起见，第三项通常省略，因此呈现出相互排他的假定或经典的 isobologram。在 2、3 的结果中， CI 值是从经典 (相互排他的)

计算方法算出的。

结果 1

四种药物对 HT-1080 和 S18 的细胞毒性			
对人软组织肉瘤细胞的 IC ₅₀			
		HT-1080	HS-18
ET-743	(nM)	0.01	0.27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70000
紫杉醇	(nM)	1.3	10

该表显示 HT-1080 和 S18 细胞系对 ET-743 的敏感度均高于其它抗肿瘤试剂。

每种试剂在约 IC ₅₀ 剂量上处理 24 和 72 小时后 对 HS-18 细胞的细胞周期分布的影响					
药物	剂量	HR	%G1	%S 期	%G2-M
对照			76.3	11.2	12.5
ET-743	270pM	24	32.4	47.6	20.0
		72	86.7	8.4	4.9
DXR	225nM	24	10.1	64.9	25.0
		72	1.3	63.8	34.9
TMTX	70uM	24	44.2	53.8	1.9
		72	35.5	57.6	7.0
紫杉醇	10nM	24	32.8	52.5	15.5
		72	23.5	58.7	26.2

每种试剂在约 IC ₅₀ 剂量上处理 24 和 72 小时后 对 HT-1080 细胞的细胞周期分布的影响					
药物	剂量	HR	%G1	%S 期	%G2-M
对照			47.5	35.8	16.7
ET-743	10pM	24	42.6	36.1	21.3
		72	83.1	10.2	6.7
DXR	25nM	24	36.1	17.5	46.4
		72	46.2	5.3	48.5
TMTX	6nM	24	31.9	56.8	11.3
		72	32.0	53.7	14.4
紫杉醇	1.3nM	24	45.4	37.3	17.3
		72	86.0	9.0	5.0

结果 2 表明了分别对 HT-1080 和 HS-18 细胞同时应用 ET-743 和一种抗肿瘤药物如 DXR、TMTX 或紫杉醇的 1-100 摩尔比的联合的 CI 值。当使用 ET-743 和 DXR 处理细胞时，CI 值均小于 1，显示了在两种细胞系中的协同作用。在 HT-1080 细胞中相应的 CI 值（平均）在 50、75、90 和 95% 的细胞杀灭水平分别为 0.86、0.83、0.84 和 0.85，在 HS-18 细胞中在 50、75、90 和 95% 的细胞杀灭水平分别为 0.89、0.74、0.64 和 0.60。这个结果说明同时应用 ET-743 和 DXR 产生协同的细胞毒效果。相反，当使用 ET-743 和 TMTX 或紫杉醇处理细胞时，观察到的是拮抗的细胞毒作用。

对两种细胞系先用 ET-743 24 小时而后使用 DXR 48 小时得到 CI 曲线图。在两种细胞系中，先用 ET-743 而后用 DXR 处理产生协同的细胞毒作用，HT-1080 在 80% 细胞杀灭水平的 CI 值为 0.64 ± 0.12 ，HS-18 在 88% 细胞杀灭水平的 CI 值为 0.24 ± 0.06 。相反，先用 DXR 而后用 ET-743 处理（结果 3a，较低的数值）初看起来有好的 CI 值，然而，HT-1080 在 80% 细胞杀灭水平的 CI 值为 1.00 ± 0.03 ，表明两种试剂只产生加和作用，而且，在两种细胞中，峰值杀灭分数的 CI 值不如中值杀灭分数的值。

当先用 ET-743 而后用 TMTX 处理细胞时，HT-1080 细胞的 CI 值接

近 1 或大于 1, 表明此两种试剂产生拮抗或加和作用。相反, HS-18 的 CI 值均小于 0.6, 说明此两种试剂产生协同作用。当先用 TMTX 而后使用 ET-743 处理时, 在 HT-1080 和 HS-18 两种细胞中都显示加和作用。

先用紫杉醇而后使用 ET-743 处理产生协同的细胞毒作用。当先用紫杉醇而后用 ET-743 处理细胞时, HT-1080 在 89% 细胞杀灭水平的 CI 值为 0.92 ± 0.06 , HS-18 在 78% 细胞杀灭水平的 CI 值为 0.38 ± 0.13 。

总结

ET-743 具有很高的抗人类软组织肉瘤细胞的活性, 特别是对恶性纤维肉瘤细胞系 HT-1080。

DXR 在与 ET-743 联合时产生与给药顺序无关的协同作用, 然而, 先用 ET-743 而后应用 DXR 对两种细胞系更为有效。

先用紫杉醇而后应用 ET-743 也对人类软组织肉瘤细胞有效, 但共同使用却有拮抗作用。

15 实施例 6

在体内化疗药物与 ET-743 联合治疗实体瘤。

已经描述了几种 ET-743 的独特的活性机理, 包括附着于 DNA 的小沟, 鸟嘌呤 N2 的烷基化, MDR1 基因的转录抑制作用 (Jin et. al., PNAS97, 6775, 2000; Minuzzo et. al., PNAS97, 6780, 2000) 和拮抗核受体 SXR 的活化 (Synold et al., Nature Med 7, 584, 2001)。作为单一试剂, ET-743 在体内对几种人类肿瘤细胞株包括黑色素瘤 (MEXF 989)、NSCL (LXFL 529)、卵巢瘤 (HOC 22) 和乳癌 (MX-1) 达到完全抑制肿瘤生长的作用 (Hendriks et. al., Ann Oncol 10, 1233, 1999)。ET-743 与药物联合以交替机理产生治疗效果, 可以减少任一种药物的毒性, 或增强药物对耐药或复发癌症的治疗效果。

几种试剂包括阿霉素 (DOX; 8mg / Kg)、顺铂 (DDP; 12mg / Kg) 和长春碱 (VINB; 6mg / Kg) 在 ET-743 (0.2mg / Kg) 预处理 1 小时前或后给药对一种或多种以下肿瘤进行评估: 软骨肉瘤 (CSHA)、骨肉瘤 (OSA-FH)、纤维肉瘤 (SW684)、卵巢瘤 (MRI-H-1834)、NSCL (LX-1) 和肾瘤 (MRI-H-121), 活性定义为 $<50\%T/C$ 。在中空纤维 (HF) 模型中, 在使用 ET-743 1 小时前使用 DOX, 比单用 ET-743 对软骨肉瘤 (6%对 10%)、纤维肉瘤 (33%对 48%)、骨肉瘤 (20%对 34%) 有更

好的效果。对骨肉瘤异种移植物有 17%对 43%的相似的结果。对 DDP 的中空纤维模型的研究表明先用 ET-743 而后应用 DDP 比单用 ET-743 对卵巢瘤 (28%对 100%)、软骨肉瘤 (15%对 19%) 有更好的治疗效果, 而对骨肉瘤有等效的活性 (36%T/C)。异种移植物的数据表明先用 ET-743 而后应用 DDP 比单用 ET-743 更为有效 (35%对 66%)。一个例外是 NSCL, 单用 ET-743 没有活性 (62%T/C), 而先用 DDP 而后应用 ET-743 产生完全的抑制作用 (<1%T/C)。在肾异种移植物中单用 ET-743 很有效果 (22%T/C), 但先用 ET-743 而后应用 VINB 也能产生完全的抑制作用 (<1%T/C)。对其它标准试剂在乳癌、肾癌、黑色素瘤和胃部肿瘤异种移植物的研究正在进行当中。

实施例 7

在人类横纹肌肉瘤中 ET-743 和阿霉素 (DOX) 的联合的临床前活性和生物学分布。

ET-743 是一类具有抗肿瘤活性的新的抗肿瘤试剂中最早被发现者。ET-743 对使用 DOX 和异环磷酰胺难治的肉瘤患者显示出活性。考虑到其是一种具有潜力的有效药物, 我们做了如下研究: (1) ET743/DOX 联合对于人类横纹肌肉瘤 TE671 的临床前抗肿瘤活性; 和 (2) 药物间的可能的相互作用和药物在裸鼠以及肿瘤异种移植物中的生物学分布。

体外实验: 每种药物或药物联合施用 1 小时后的药效通过 clonogenic 分析进行评估。单独使用 ET-743 或 DOX 显示对 TE671 细胞的抗肿瘤活性。根据 isobologram 分析法和联合指数 (Combination Index) 获得的药物联合至少对几种包括 TE671 在内的肿瘤细胞系有加和的作用。

体内实验: 对异种移植瘤重量大约为 100mg 的裸鼠静脉单次给药 (ET-743, 0.1mg/Kg; DOX, 10 mg/Kg) 处理。肿瘤重量的抑制 / Log10 细胞杀灭值对于单用 ET-743 为 46% / 0.132, 对于单用 DOX 是 50% / 0.33, 对于同时使用 ET-743 和 DOX 是 77% / 0.924, 对于先用 ET-743 一小时后使用 DOX 的联合是 82% / 1.12, 以及对于先用 DOX 一小时后使用 ET-743 的联合是 75% / 0.85。协同作用还在鼠纤维肉瘤 UV2237 和其耐受多种药物的 UV2237 / ADR 亚系上观察到。

这些数据表明 ET-743 / DOX 具有协同作用, 并在迄今所研究的情

形中似乎与给药顺序或联合无关。DOX单独应用或与ET-743联合应用时，DOX在血浆及肿瘤中的浓度均没有显著的差异。单独应用ET-743或与DOX联合应用的药代动力学(PK)研究正在进行当中。在横纹肌肉瘤TE671中，ET-743和DOX的联合在体外表现出加和作用，而在体内表现出协同作用。DOX的药代动力学形式不受共同应用的ET-743的影响。这些数据为在早期临床实验中使用这种联合提供了依据。

实施例 8

ET-743和顺铂(DDP)在体内和体外对抗人类肉瘤和卵巢癌细胞系显示出协同作用

我们在这里表明了ET-743在体内和体外均增强了DDP的活性。在一些包括人类肠癌(HCT116)、卵巢癌(Igrov-1, A2780)及其耐药亚系(Igrov-1/PSC-ET和1A9)、横纹肌肉瘤(TE671)的癌细胞群中，单独应用较低浓度的ET-743可以提高DDP的活性至少两倍。相当于ET-743 IC30/IC50的浓度产生加和或协同作用。这些结果导致了应用异种移植模型对ET-743的有效药物联合进行体内研究。

在部分对ET-743或DDP敏感的皮下，移植的TE671中，两种药物的联合所产生的抗肿瘤效果远大于在它们各自的MTD水平单独应用任一种药物的效果。卵巢肿瘤1A9通常对ET-743和DDP单独使用时有耐受作用，而联合应用产生高于50%的肿瘤生长抑制作用。原位移植的人类卵巢癌HOC8，会在带腹水的腹膜腔内产生小瘤，对ET-743有耐受性，对DDP部分敏感，联合应用时，即使是在ET-743的剂量是0.05mg/Kg(1/4MTD)时也使存活率急剧增加，并不引起明显的细胞毒性反应。剂量为0.15mg/Kg的ET-743明显提高存活率，但同时也增加了由失重表明的毒性，增加幅度明显比用每种药物治疗后观察到的高。

这些发现可以对使用ET-743和DDP联合治疗肉瘤和卵巢癌设计临床实验提供有力的理论依据。正在进行体内和体外研究以阐明ET-743和DDP在对这些类型的癌症的协同作用的机理。

30

实施例 9

高剂量地塞米松(dex)在大鼠中对ET-743的肝细胞毒性的保护

ET-743, 一种得自海产被囊动物的药剂, 目前已进入二期临床实验。它具有治疗肉瘤的临床活性, 初步的数据表明其有治疗乳癌和卵巢癌的活性。然而, 表现为可逆的转氨基作用的肝细胞毒性在多数治疗患者中发生, 而表现为胆汁郁积的肝细胞毒性在少数患者中发生。

5 在多数敏感动物如大鼠中, ET-743 的毒性表现为肝细胞坏死和胆管炎症。由于地塞米松有抗炎活性, 我们研究了其在 ET-743 诱导的大鼠肝损伤的疗效。雌性 Wistar 大鼠接受单次静脉给药的 ET-743 (40 μ g/kg)。一些大鼠预先在给药 ET-743 24 小时前分别以 1、5、10 或 20mg/kg 的剂量口服了地塞米松。肝病变和血浆碱性磷酸酶 (ALP)、

10 天冬氨酸氨基转移酶 (GOT) 和总胆红素 (TB) 的浓度在 ET-743 给药三天后评估。利用常规的肝组织切片通过光学显微法检查。

在用 ET-743 处理两天后, 单独应用 ET-743 的大鼠的肝脏显示出胆管炎症, 胆管上皮细胞有明显的质变, 肝区出现坏死。血浆的 ALP 和 GOT 水平两天后有显著上升。ET-743 给药第二天后胆汁郁积造成明显的血浆 TB 浓度的上升。而在预先用 10 或 20mg/kg 地塞米松处理的大鼠未发生 ET-743 诱导的组织病变和血浆 ALP、GOT 和 TB 水平的升高。

15

1 mg/kg 的地塞米松只有很少的保护作用, 5 mg/kg 的地塞米松有中等的保护作用。在 ET-743 之前每天接受地塞米松 (50mg/kg) 共三天的大鼠的血浆 ET-743 水平相比单独使用 ET-743 的大鼠并没有减少。而且, ET-743 对植入小鼠的黑色素瘤 B16 的治疗活性并不因地塞米松的使用而受到妨碍。这些发现表明高剂量的地塞米松加入 ET-743 治疗方案可以改善其在癌症患者体内的肝细胞毒性。

20