

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99816315.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/64 (2006.01)

A61K 31/635 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100488512C

[22] 申请日 1999.12.21 [21] 申请号 99816315.5

[30] 优先权

[32] 1998.12.22 [33] US [31] 09/218,288

[86] 国际申请 PCT/US1999/030575 1999.12.21

[87] 国际公布 WO2000/036918 英 2000.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2001.8.22

[73] 专利权人 海洋聚合物技术公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 J·N·沃尔纳基斯 S 芬基斯茨坦

E·R·帕里泽尔

[56] 参考文献

US5641752 1997.6.24

US5541186 1996.7.30

CN86106428 1987.3.18

US5622834 1997.4.22

US5571821 1996.11.5

US5623064 1997.4.22

审查员 牛艳玲

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 2 页 说明书 47 页 附图 17 页

[54] 发明名称

用于治疗细胞增殖性紊乱的组合物及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一些方法和组合物，这些组合物至少包括一种内皮素拮抗剂，优选的是那些与多聚 β -1, 4-N-乙酰葡萄糖胺(p-GlcNAc)多糖基质相结合来治疗癌症和其他增殖性疾病的组合物。内皮素拮抗剂可以是一个肽段或非肽化合物，本发明中的 p-GlcNA 基质包括一种高分子量的聚合体，其单糖组分是以 β -1, 4 形式相连接，并且这些单糖组分不含蛋白质，基本上不含单个的氨基酸，也不含其他的有机及无机污染物。本发明中的组合物和方法可用于抑制肿瘤和其他瘤细胞的生长，和/或用于抑制体内瘤细胞的转移。

1. 一种抗肿瘤组合物, 至少包括一种与多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺结合的内皮素拮抗剂, 其中该多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺包括4, 000—150, 000个以 β -1, 4构象共价连接的N-乙酰葡萄糖胺单糖, 不含蛋白质, 不含其他有机或无机污染物, 其分子量为800KD—30, 000KD。

2. 一种抗肿瘤组合物, 至少包括一种与多聚 β -1, 4—葡萄糖胺结合的内皮素拮抗剂, 其中所述多聚 β -1, 4—葡萄糖胺包括4, 000—150, 000个以 β -1, 4构象共价连接的葡萄糖胺单糖, 不含蛋白质, 不含其他有机或无机污染物, 其分子量为640KD—24, 000KD。

3. 权利要求1或2中的组合物, 其中的内皮素拮抗剂是非特异性的内皮素拮抗剂。

4. 权利要求1或2中的组合物, 其中的内皮素拮抗剂是内皮素受体A特异的内皮素拮抗剂。

5. 权利要求1或2中的组合物, 其中的内皮素拮抗剂是内皮素受体B特异的内皮素拮抗剂。

6. 权利要求1或2中的组合物, 其中的内皮素拮抗剂是以肽为基础的内皮素拮抗剂。

7. 权利要求1或2中的组合物, 其中的内皮素拮抗剂是非肽基的内皮素拮抗剂。

8. 权利要求7中的组合物, 其中的非肽基的内皮素拮抗剂是氨磺酰嘧啶化合物。

9. 权利要求8中的组合物, 其中的氨磺酰嘧啶化合物是Ro61。

10. 权利要求1中的组合物, 其中所述多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺中至少一种N—乙酰葡萄糖胺单糖被脱乙酰化。

11. 权利要求10中的组合物, 其中脱乙酰单糖衍生为乳酸盐。

12. 权利要求10中的组合物, 其中25%—75%的N-乙酰葡萄糖胺单糖被脱乙酰化。

13. 权利要求1、10或11中的组合物, 其中所述多聚 β -1,

4—N—乙酰葡萄糖胺是凝胶形式的。

14. 权利要求 1 或 10 中的组合物，其中所述多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺是簇状、线状、绳状、膜状、纤维状或海绵状的。

15. 权利要求 13 中的组合物，其中内皮素拮抗剂是溶解在所述多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺凝胶中的。

16. 权利要求 2 中的组合物，其中所述多聚 β -1, 4—葡萄糖胺衍生为一种乳酸盐。

17. 权利要求 2 或 16 中的组合物，其中所述多聚 β -1, 4—葡萄糖胺或它的乳酸盐是凝胶形式的。

18. 权利要求 2 中的组合物，其中所述多聚 β -1, 4—葡萄糖胺是簇状、线状、绳状、膜状、纤维状或海绵状的。

19. 权利要求 17 中的组合物，其中的内皮素拮抗剂是溶解在所述多聚 β -1, 4—葡萄糖胺凝胶中的。

20. 权利要求 19 中的组合物，其中的内皮素拮抗剂是 Ro61, 多聚 β -1, 4—葡萄糖胺凝胶浓度是 2%。

21. 至少一种与多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺结合的内皮素拮抗剂在制备一种用于治疗增殖性疾病的药物组合物中的用途，所述多聚 β -1, 4—N—乙酰葡萄糖胺包括 4,000—150,000 个以 β -1, 4 构象共价连接的 N-乙酰葡萄糖胺单糖，不含蛋白质，不含其他有机或无机污染物，其分子量为 800KD—30,000KD。

22. 至少一种与多聚 β -1, 4—葡萄糖胺结合的内皮素拮抗剂在制备一种用于治疗增殖性疾病的药物组合物中的用途，其中所述多聚 β -1, 4—葡萄糖胺包括 4,000—150,000 个以 β -1, 4 构象共价连接的葡萄糖胺单糖，不含蛋白质，不含其他有机或无机污染物，其分子量为 640KD—24,000KD。

23. 权利要求 21 或 22 的用途，其中的增殖性疾病是癌症。

用于治疗细胞增殖性紊乱的组合物及其用途

本专利申请是1998年12月22日提交的、序号为No. 09/218,288的美国专利申请的部分延续,而前述申请又是1995年6月6日提交的、美国专利申请序号为No. 471,290,现在专利号为5,858,350的专利申请的部分延续。前述申请又是1994年12月1日提交的、美国专利申请序号为No. 347,911,现在专利号为美国专利5,623,064的专利申请的部分延续。前述申请又是1993年12月1日提交的、美国专利申请序号为No. 160,569,现在专利号为5,622,834的专利申请的部分延续。上述专利申请在此处全部引入作为参考。

1. 引言

本发明涉及一些方法和组合物,这些组合物至少包括一种内皮素拮抗剂,优选的是那些与多聚 β -1,4--N--乙酰葡萄糖胺(p-GlcNAc)多糖基质相结合来治疗癌症和其他增殖性疾病的组合物。内皮素拮抗剂可以是一个肽段或非肽化合物,本发明中的p-GlcNA基质包括一种高分子量的聚合体,其单糖组分是以 β -1,4构象相连接,并且这些单糖组分不含蛋白质,基本上不含单个的氨基酸,也不含其他的有机及无机污染物。本发明中的组合物和方法可用于抑制肿瘤和其他瘤细胞的生长,和/或用于抑制体内瘤细胞的转移。

2. 发明背景

内皮素是一族含21个氨基酸的肽段,如ET-1,ET-2和ET-3,最初的特征在于他们有效的引起血管收缩及血管生成方面的特性(见,如, Luscher et al., 1995, Agents Actions Suppl. (瑞士)45: 237-253; Yanagisawa et al., 1988, Nature 332:411-415)。这些肽段又似乎与生长剂如BFGF相联系,并且这些肽段经常与他们协同作用(见,如, Halaban, 1996, Seminars in Oncology 23:673-681; Reid et al., 1996, Development 122: 3911-3919; Markewitz et al., 1995, Am. J. Physiol. 268:L192-L200; and Nelson et al., 1996, Cancer Res. 56:663-668)。此外,这些肽段显示出与

细胞剂样的调节特性, 可受激素如胰岛素和血管紧张素 II 及生长剂如 TGF- β 和 TNF- α 的影响(Nelson et al., supra; Suzuki et al., 1989, J. Biochem. 106: 736-741; and Lundblad et al., 1996, Crit. Care Med. 24: 820-826;)。以一种自分泌/旁分泌的方式, 内皮素的活性可通过与两种不同的 G-偶联受体: 内皮素受体 A (ETA)、内皮素受体 B (ETB) 的优先结合来调节(见, 如, Hocher et al., 1997, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35(3): 175-189; Shichiri et al., 1991, J. Cardiovascular Pharmacol. 17: S76-S78)。

内皮素受体有很多激动剂和拮抗剂 (Webb et al., 1997, Medicinal Research Reviews 17 (1): 17-67), 他们已经用于研究内皮素的作用机制。由于内皮素具有较强的引起血管收缩的活性, 因而内皮素拮抗剂 (本领域中又叫 ‘内皮素受体拮抗剂’) 在治疗人类疾病, 尤其是心血管疾病如充血性心力衰竭、动脉硬化、心瓣手术后再狭窄及心肌梗塞 (Mateo et al., 1997, Pharmacological Res. 36 (5): 339-351) 中可能的作用尤其受到了研究。例如, 非肽基的内皮素拮抗剂属于嘧啶磺胺族, 如 Ro 46-2005 和 bosentan, 他们是通过他们的芳香环与内皮素受体相互作用的, 现在也正在对他们进行高血压、血管疾病和充血性心脏衰竭治疗的临床评价。这些拮抗剂都能以不同的亲和力结合到 ETA 和 ETB 上, 并且相对于以肽为基础的拮抗剂, 他们具有优势, 因为他们具有改良的代谢稳定性 (Webb et al., Supra; and Parris et al., supra)。另外, 关于内皮素拮抗剂在治疗肾病例如肝硬化中的肾功能损伤及急性肾衰中的可能作用也有研究 (Gomez-Garre et al., 1996, Kidney Int. 50: 962-972; Hocher et al., supra)。

最近发现, 内皮素及内皮素受体与许多正常和病原细胞的生长过程, 如细胞周期进行、细胞生长及细胞发育有关联 (见, 如, Parris et al., 1997, Vascular Medicine 2: 31-43; Markewitz et al., supra; Morbidelli et al., 1995, Am. J. Physiol. 269: H686-H695; and Battistini et al. 1993, Peptides 14: 385-399)。已经证明, 在内皮细胞、上皮细胞, 及巨噬细胞的正常组织中, ET-1 和 ET-3 具有促有丝分裂的作用及趋化剂的作用 (见, 如, Webb et al., 1997, Medicinal Research Reviews 17 (1): 17-67; and Gomez-Garre et al., supra)。此外, 已经证明, 内皮素与其受体

的结合可引起正常细胞和癌细胞的 DNA 合成、增殖及细胞运动 (Webb et al., supra; Ziche et al., 1995, Cardiovasc. Pharmacol. 26: S284-S286; and Yamashita et al., 1991, Res. Comm. In Chem. Pathol. And Pharmacol. 74 (3): 363-369).

内皮素能调节细胞生长和细胞循环级数, 这一潜在的能力导致了对内皮素表达和/或内皮素受体在癌细胞中存在的一些起始研究. 例如, 已经证明, ET-I 在乳腺癌细胞和胰腺细胞系中过度表达, 引发乳腺癌组织、卵巢细胞系及前列腺肿瘤的增殖 (见, 如, Moriatis et al., 1997, Eur. J. Canc. 33 (4): 661-668; Nelson et al., 1996, Cancer Res. 56: 663-668; Patel et al., 1995, Br. J. Cancer 71: 442-447; Oikawa et al. 1994, Br. J. Cancer 69: 1059-1064; Shichiri et al., Supra; and Yamashita et al. supra). 另外, 已经证明, 与 ET1 和 ET2 有较高亲和力的 ETA 型受体存在于卵巢细胞系 (Moriatis et al., supra) 和乳腺癌组织 (Yamashita et al., supra) 中. 黑素瘤是能表达与内皮素的三种同工型具有相似的亲和力的 ETB 受体的肿瘤中的一种 (Yohn et al., 1994, Biochem. Biophys. Res. Comm. 201 (1): 449-457). 有趣的是, ETB 受体在原发的和复发性的黑素瘤中高度表达, 而在转移性的黑素瘤中的表达要少的多 (Kikuchi et al., 1996, Biochem. Biophys. Res. Comm. 219: 734-739).

虽然这些研究表明内皮素拮抗剂具有可用于癌症治疗的潜在能力, 但目前仍没有任何研究来证明这样的治疗性应用. 实际上, 内皮素在改善增殖性疾病如各种血管增殖性疾病及良性前列腺肥大 (BPH) 中的作用尚不清楚 (Webb et al., supra and Kenny et al., 1997, J. Med. Chem. 40 (9): 1293-1315). 此外, 虽然美国专利 5, 550, 110 和 5, 641, 752 公开了应用特殊的六肽内皮素拮抗剂来治疗癌症, 但实际上在这些公开的内容中没有数据涉及癌症治疗, 也没有指出如何进行这样的治疗, 甚至没有指出这些治疗成功与否 (see also, PCT applications WO 97/37987, 97/08169, WO 96/11927, and WO 94/03483, Canadian patent application 2072395, and United Stated Patent 5, 658, 943).

3. 发明概述

本发明涉及一些用于治疗细胞增殖性紊乱如癌症的方法和组合物。较明确的讲，本发明涉及至少包含一种内皮素拮抗剂的组合物，优选的是那些与多聚 β -1, 4--N--乙酰葡萄糖胺 (p-GlcNAc) 多糖基质相结合来治疗癌症和其他增殖性疾病的组合物。本发明部分基于申请人的如下发现：当一种内皮素拮抗剂在体内给药时，不管是其单独大剂量还是与一种多糖基质联用，肿瘤细胞的生长和/或生长或瘤细胞的转移都显著的受到抑制。

根据本发明的一种优选实施方案，内皮素拮抗剂是一种非肽基的嘧啶磺胺化合物，例如下文图 1 所示：

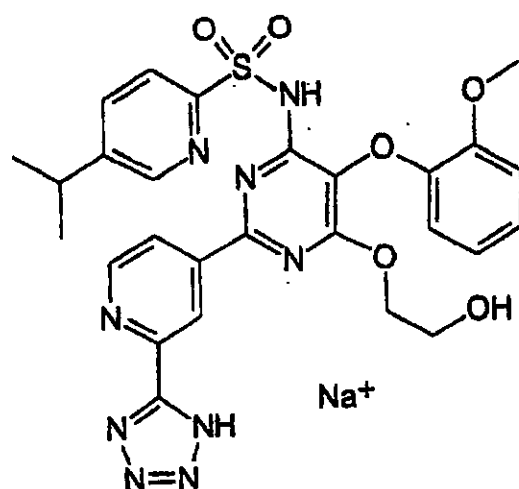


图 1 中的化合物是 5-异丙基-吡啶-2-磺酸[6-(2-羟-乙氧-5-(2-甲氧-苯氧))，-2-[1 氢-四唑-5-基]-吡啶-4-基) 酰胺钠盐 (1: 2)，也叫做“Ro61”，它的分子量大约为 650KD。它是内皮素受体 ETA、ETB 的非特异性的、非肽基的抑制剂。

根据本发明的这种优选实施方案，多糖基质是一多聚- β -1-4-N-乙酰葡萄糖胺 (p-GlcNAc) 多糖基质或其衍生物，正如美国专利 5, 635, 493 中所描述的，这项专利在此处全部引用以作参考。p-GlcNAc 或其衍生物可用于各种重整物 (reformulations)，包括膜、细丝、非织造物、海绵、凝胶和三维基质。按照一种优选实施方案，p-GlcNAc 是以凝胶形式存在，优选的是脱乙酰的，并且能随意的衍生为 p-GlcNAc 乳酸盐，并且与 Ro61 结合用于体内给药。

本发明中的组合物对于药物传递系统是有用的，如缓释药物递

送。本发明中的组合物是对传统药物制剂的改进，因为本发明中的组合物具有，例如较高的效力、较低的毒性以及改进的生物利用度。

本发明中的方法包括对本发明中组合物在体内给药以治疗上有效的剂量来治疗细胞增殖性疾病，如动物的癌症，也包括人的癌症。按照本发明中的优选实施方案，至少一种内皮素拮抗剂，如 Ro61，溶解在脱乙酰 p-GlcNAc-乳酸盐凝胶之中，并且以治疗上有效的剂量对病人体内给药来治疗癌症或其他增殖性疾病或紊乱。本发明的另一优选实施方案包括对内皮素拮抗剂体内给药，较优选的内皮素是非肽基的内皮素拮抗剂如吡啶黄胺类内皮素拮抗剂，来治疗癌症或其他增殖性疾病或紊乱。但本发明中另外一种优选实施方案包括在体内单独 p-GlcNAc 基质给药来治疗癌症或其他增殖性疾病或紊乱。本发明中的方法和组合物能有效的抑制肿瘤和/或其他瘤细胞的生长和/或瘤细胞在体内的转移。

4. 附图简介

图 1. 纯度为 100% 的 p-GlcNAc 的化学结构。"n" 指代约 4, 000 与 150, 000 间的一个整数，大约 4, 000 与 15, 000 间的优选。

图 2. p-GlcNAc 碳水化合物分析的气相色谱—质谱数据。实心正方形表示 p-GlcNAc 是应用 5.1 部分所述的酸处理/中和方法纯化的，见下文。

图 3. 扫描电镜显微图象描述了通过对化学/生物纯化方法稍做变更的酸处理/中和法制备的 p-GlcNAc 膜。放大率：10, 000x。

图 4. 图表描述了 p-GlcNAc 和脱乙酰 p-GlcNAc 的一些可能的衍生物（由 S. Hirano, In "Chitin and Chitosan", 1989, Skjak-Braek, Anthonsen, and Sanford, eds., Elsevier Science Publishing Co., pp. 37-43 改动）。

图 5A 和 5B. 脱乙酰 p-GlcNAc 基质的扫描电镜显微照片。放大率：图 5A: 1000x; 图 5B: 10, 000x。

图 6A 和图 6B. p-GlcNAc 膜的扫描电镜显微照片。p-GlcNAc 膜是按下文例 8 部分所述的方法将其溶解在二甲基乙酰胺/氯化锂中，然后用水将其重新沉淀入纤维状物质中。

图 7. 内皮素受体拮抗剂 Ro61 抑制体内 B16 黑素瘤细胞的增殖。

Ro61 以逐渐增加的浓度加到 96 孔的平板中。其中加入了 C57BL/6 (H-2b) 小鼠的 B16 细胞(闭合圆环)和脾细胞(非闭合圆环)。Ro61 处理的细胞的增殖以未处理的对照组细胞数的百分数来表示。确定三个平行孔的平均值。

图 8. 条形图显示了暴露于多种内皮素拮抗剂中的 B16 黑素瘤细胞相对于对照组的百分比。结果表明暴露于内皮素拮抗剂中的细胞增殖受到抑制。FO 细胞是缺少全长的 ETA 受体的 B16 细胞的对照; 条形图中标记的 ET1 代表一对照, 此处的细胞是暴露于一种已知的内皮素激动剂中。

图 9. 条形图显示了暴露于多种内皮素拮抗剂中的 B16 黑素瘤细胞相对于对照组的百分比。结果表明暴露于内皮素拮抗剂中的细胞增殖受到抑制。FO 细胞是缺少全长 ETA 受体的 B16 细胞的对照; 条形图中标记的 ET1 和 BQ3020 代表对照组, 此处的细胞是暴露于两种已知的内皮素激动剂中。

图 10. ETA 和 ETB 激动剂对 B16 黑素瘤细胞所受的 Ro61 增殖抑制的体外逆转。B16 细胞与激动剂 BQ-3020-[Ac-[Ala¹¹, Ala¹⁵]-内皮素(6, 21)(闭合三角)和激动剂 [Ala^{1, 3, 11, 15}]-内皮素(开放菱形)二者之一、两激动剂(开放小盒)或无任何激动剂(闭合环)共培养, 然后向每孔中加 Ro61。Ro61 处理过的细胞以未受处理的对照组细胞数的百分数来表示。确定三平行孔的平均值。

图 11A 和 11B. Ro61 对 B16 细胞培养的作用效果。40 倍放大率下的 B16 细胞的光学显微照片。图 A: B16 细胞在 96 孔平板上的培养, 完全培养基, 5×10^4 个细胞/孔, 37℃ 下培养 72 小时; 图 B: B16 细胞培养在含 5μM Ro61 的完全培养基。

图 12. Ro61 诱导细胞程序死亡。37℃ 下, 在与普通培养基(对照)或 Ro61 (1μM) 共培养 0、24、48、及 72 小时后, 利用一种荧光素原位细胞死亡检测试剂盒对 B16 细胞进行细胞程序死亡检测。

图 13A 和 13B. Ro61 抑制腹膜内的 B16 癌扩散。图 13A 描述了 IP Ro61 对腹膜内 B16 的癌扩散的抑制作用。将含 5×10^4 个 B16 黑素瘤细胞的 IP 注射雌性 C57BL/6 小鼠体内。第二天每只鼠注入 100μl 下列之一: 每天 6 × HBSS (对照)、每天 × 含 3mg/kg Ro61 的 6 HBSS (低剂量)、含 30mg/kg Ro61 的 6 HBSS (高剂量)。图 13B 显示

Ro61 的 p-GlcNAc 递送的效果。如图 13A 所示, 小鼠为肿瘤所攻击, 第二天进行以 IP、SC 注射 $100\mu\text{l}$ p-GlcNAc 凝胶或 IP 注射 18mg/kg IP (IP+Ro61) 的 $100\mu\text{l}$ p-GlcNAc 凝胶来治疗。7 天后将小鼠杀死, 计算 B16 集落的数目。数值代表了肉眼可见的 B16 集落的数目和每一组的标准差 (除对照 $N=13$ 外, 所有其他组的 $n=11$)

图 14. 皮下的 B16 黑素瘤攻击之后, 经 Ro61 处理的 C57BL/6 小鼠的肿瘤延缓出现。将含 5×10^4 个 B16 黑素瘤细胞 SC 注射入雌性 C57BL/6 体内。第二天, 将这些小鼠随机分为四组: 一组未经处理 ($\blacktriangle$); 一组只进行单独 p-GlcNAc 的 IP 注射 ($\circ$); 一组每天进行在 HBSS 中含 3mg/kg Ro61 的 IP 注射 (共 6 天) ($\square$); 一组进行含 18mg/ml Ro61 的 p-GlcNAc 的 IP 注射 ($\blacksquare$); 3 周内对小鼠体内肿瘤的出现进行监控 (4 组的 n 都为 10)。

图 15. 应用下文所述的癌病模型来描述各种内皮素拮抗剂对 B16 肿瘤集落的抑制作用。F10 代表未处理的 B16 对照组细胞; BQmix 代表 ETA 拮抗剂 BQ123 和 ETB 拮抗剂 BQ788 的混合物; BQmix/gel 代表 BQ123、BQ788 与下文所述的 p-GlcNAc 凝胶的混合物; Ro61 是下文所述的非特异性的 ETA/ETB 内皮素拮抗剂; Ro61/gel 是 Ro61 与 p-GlcNAc 的结合物; GRGDS/GEL 是 ETA/ETB 肽类拮抗剂 GRGDS 与 p-GlcNAc 的结合物。

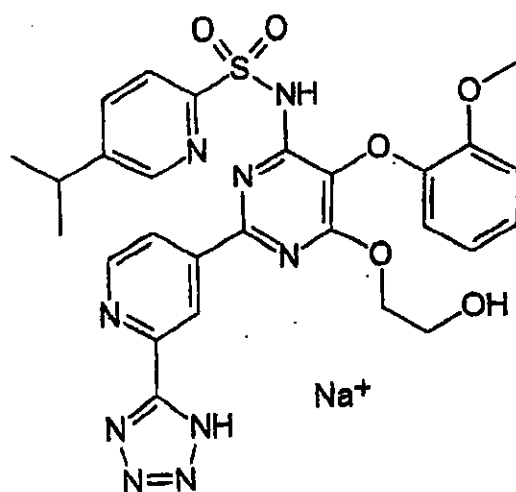
图 16. 经过腹膜内 B16 黑素瘤细胞攻击后, Ro61 处理过的 C57BL/6 小鼠的长期存活。在 C57BL/6 小鼠体内注射 B16 细胞。小鼠随机分为四组: (a) 未经处理 (闭合方块); (b) 仅只 $100\mu\text{l}$ p-GlcNAc 凝胶处理 (十字形); (c): 每天 $100\mu\text{l}$ 含 3mg/kg Ro61 的 HBSS (闭合三角); 或 (d) $100\mu\text{l}$ 含 18mg/kg Ro61 的 p-GlcNAc 凝胶 (开放方块)。每天对小鼠进行监控, 当确定其垂死时, 将其处以安死术。

图 17A 和 17B. 经 Ro61 处理的 (图 17A) 和未经 Ro61 处理的 B16 细胞在 40 倍放大率下的显微照片: 10^{-7}M Ro61, 10^5 个细胞。

5. 发明详述

本发明涉及一些方法和组合物, 这些组合物至少包括一种内皮素拮抗剂, 优选的是那些与多聚 β -1, 4--N--乙酰葡萄糖胺 (p-GlcNAc)

多糖基质相结合的组合物,以及应用这些组合物来治疗癌症和其他增殖性疾病的方法。本发明中的内皮素拮抗剂可以是特异的或非特异的 ETA 或 ETB 受体,或是一个以肽为基础的或一种非肽基的化合物。根据本发明中的一种优选实施方案,其中的内皮素拮抗剂是一种非肽基的、非特异的内皮素拮抗剂。根据另一优选实施方案,其内皮素拮抗剂是一种非肽基的的氨磺酰嘧啶 (pyrimidyl sulfonamide) 化合物,如下图 1 所示的 ro61 化合物。



根据本发明,至少一种单独的或与一种或多种抗肿瘤剂结合的内皮素拮抗剂是共价的或非共价的附着或结合到 p-GlcNAc 上, p-GlcNAc 在下文 5.1 部分有详述。按照本发明的一种优选实施方案,至少一种内皮素拮抗剂,如 Ro61,是溶解在脱乙酰 p-GlcNAc 凝胶中以形成本发明中的一种内皮素拮抗剂 (“EA”) / p-GlcNAc 组合物。按照进一步的优选实施方案,这种脱乙酰 p-GlcNAc 与乳酸衍生成一种 p-GlcNAc-乳酸盐。

此处定义的名词“内皮素拮抗剂”包括内皮素受体拮抗剂“EA/p-GlcNAc 组合物”包括一些组合物,其中至少一种内皮素拮抗剂是共价连接到 p-GlcNAc 上,或非共价结合到 p-GlcNAc,或与 p-GlcNAc 混合,或封装在 p-GlcNAc 之中。此外,本发明中的组合物也可包括其他的抗肿瘤剂,他们可与内皮素拮抗剂结合来抑制肿瘤和其他瘤细胞的生长和/或转移。此处定义的“抗肿瘤剂”包括任何能够抑制肿瘤细胞、癌细胞或其他种类的瘤细胞生长的化合物。

本发明部分是基于申请人的发现:单独的或与本文所述的 p-

GlcNAc 结合的内皮素拮抗剂能够在体内抑制癌细胞的增殖,降低癌细胞的转移,和/或在体内延长荷有肿瘤细胞的动物的存活(见下文举例部分 12 到 16)。此外,本发明中的 p-GlcNAc 单独也具有在体内癌细胞生长和转移的抑制作用。

因此,按照本发明中的方法,以治疗上有效的剂量在病人体内来给药包含本发明中的 EA/ p-GlcNAc 组合物的药用组合物,从而治疗癌症或其他增殖性疾病。本发明中另一优选实施方案包括体内给药内皮素拮抗剂,例如,用氨磺酰嘧啶内皮素拮抗剂来治疗增殖性疾病,以及另一方案包括将下文所述的 p-GlcNAc 在体内给药以治疗增殖性疾病。

仅仅为了描述方便,我们将发明详述分为以下几部分:(1)本发明中的方法和组合物中的 p-GlcNAc。(2)本发明中的方法和组合物中的内皮素拮抗剂;(3)本发明中的组合物的优选制剂;及(4)本发明中方法和组合物的应用。

5.1 本发明中的组合物中的 p-GlcNAc

本发明中的方法和组合物中用到的 p-GlcNAc 多糖基质包括一种高分子量的聚合物,其平均分子量在大约 800KD 与 30,000KD 之间,这个分子量范围是由凝胶渗透层析测得的,这样一个分子量范围代表了含有 4,000 到 150,000 个以 β -1,4-构象相连的 N-乙酰葡萄糖胺单糖的一类 p-GlcNAc,大约有 4,000 到 15,000 个 N-乙酰葡萄糖胺单糖是优选的(图 1)。

p-GlcNAc 的可变性是很低的,但其纯度很高,二者皆可由物理和化学标准来证明。这些标准包括化学结构式和非多糖污染物。第一,用两种不同纯化方法制备的 p-GlcNAc 的化学结构式数据如下表 I 所示。可以发现,在实验误差范围内,用两种方法制备的 p-GlcNAc 的化学结构式与 p-GlcNAc 的结构式公式相同。第二,仍如表 I 所示,制备的 p-GlcNAc 不含可检测到的蛋白质污染物,基本上不含其他有机污染物如氨基酸,基本上也不含无机污染物如灰份和金属离子(本发明中的 p-GlcNAc 可能与纯的 p-GlcNAc 中的碳、氢、氮和氧的理论值偏离 2%)。因此,此处多用的“基本上不含有机污染物”和“基本上不含无机污染物”指 p-GlcNAc 中碳、氢、氮氧的分布值与理论

值相差不超过 2%，并且优选的是本发明中含有如表 I 所例示的 p-GlcNAc MATS 的实验数据（允许百分偏差存在）的 p-GlcNAc。此外，P-GlcNAc 显示了很低的结合水百分含量。

表 I

化学分析数据（%重量比）纯 p-GlcNAc 的理论值

碳	- 47.29
氢	- 6.40
氮	- 6.89
氧	- 39.41
蛋白质	- 0.00

p-GlcNAc 簇的实验数据

（对每一种类型的膜所进行的实验批数大于 30 次）

	<u>机械力法</u>		<u>化学/生物法</u>	
	<u>Normalized¹</u>	<u>% 偏差</u>	<u>Normalized¹</u>	<u>% 偏差</u>
碳	47.21 ± 0.08	-0.17	47.31 ± 0.11	+0.04
氢	6.45 ± 0.08	+0.78	6.34 ± 0.08	-0.94
氮	6.97 ± 0.18	+0.87	6.94 ± 0.16	+0.73
氧	39.55 ± 0.36	+0.36	39.41 ± 0.10	0.00
	<u>平均值</u>		<u>平均值</u>	
蛋白质	0.00		0.00	
灰份	1.30		0.98	
水份	2.0		1.2	

¹ 未加工的分析数据规格化以用来说明样品中灰份和水分的含量。

本发明中的组合物的 P-GlcNAc 显示了一个与图 2 所示 P-GlcNAc 基本相似的碳水化合物分析特征。P-GlcNAc 最基本的单糖是 N-乙酰葡萄糖胺。此外，P-GlcNAc 不含有单糖葡萄糖胺。P-GlcNAc 的其他物理特征在美国专利 5,635,493 中有详述，这项专利在此引用以做参考。

本发明中的 P-GlcNAc 展示了较高的生物利用度，这可由多种技

术来确定,其中包括,但并不局限于这些程序如洗提实验、肌肉的培植或经皮内或全身注射入供试动物体内。可见,如在此引入作为参考的美国专利 5, 635, 493。

可由微藻类,优选硅藻,来制备和纯化 P-GlcNAc。可作为 P-GlcNAc 制备出发材料的硅藻包括,但并不局限于圆筛藻属 (*Coscinodiscus*)、小环藻属 (*Cyclotella*)、海链藻属 (*Thalassiosira*) 中的各个种,优选的是海链藻属。

圆筛藻属中,可用的硅藻属种类包括但不局限于 *concinnus* 和 *radiatus* 种。小环藻属类中的硅藻可包括,但并不局限于 *caspia*, *cryptica*, 和 *meneghiniana* 等种。可用做本发明中 P-GlcNA 的出发材料的海链藻属类的硅藻包括,但并不局限于 *nitzschoides*, *aestivalis*, *antarctica*, 并基海链藻 (*decipiens*), 高心列海链藻 (*eccentrica*), *floridana*, *fluviatilis*, 鼓涨海链藻 (*gravidia*), *guillardii*, *hyalina*, 极小海链藻 (*minima*), 诺氏海链藻 (*nordenskioldii*), *oceanica*, *polychorda*, 假微型海链藻 (*pseudonana*); 圆海链藻 *rotula*, *tubifera*, *tumida*, 和威氏海链藻 (*weissflogii* species), *fluviatilis* 和 威氏海链藻 (*weissflogii*) 是优选的。从如 the Bigelow Laboratory for Ocean Sciences 的培养收集物, 及 Center for Collection of Marine Phytoplankton 处得到上述的硅藻属生物 (McKown Point, West Boothbay Harbor, Maine, 04575)。利用在此引作参考的美国专利 5, 635, 493 中所述的方法和营养培养基可培养所有的这些硅藻属生物。

用多种不同的方法,可由如上述的硅藻属培养物中制得 P-GlcNA 纤维。按照机械力方法,可使培养物受一定的机械力,从而可从硅藻属生物细胞内分离到 P-GlcNA 纤维。这样的机械力可包括,但并不局限于如由胶体研磨、超声装置或泡沫发生器产生的剪切力,以及由如涡旋混合器产生的切割力。

随后,将得到硅藻属细胞悬浮物与 p-GlcNAc 纤维分离开。例如,悬浮物可经一系列的离心步骤,得到清晰的上清液,此上清液中含有,如果有,也很少的可见的絮状物质,从而将 p-GlcNAc 纤维从细胞中分离出来。离心步骤中,固定角度的转子和大约 10℃ 左右的温

度是优选的。速度、时间及总共所需的离心步骤可因如所用的特殊转子等的改变而改变，但对本领域的普通技术人员来讲，这些参数值的确定是很显然的。

随后，应用本领域中的技术人员熟知的技术来浓缩上清液中的 p-GlcNAc 纤维。这些技术包括，但并不局限于抽气和过滤装置。最后，将浓缩过的 p-GlcNAc 纤维用如去离子蒸馏水、盐酸、乙醇或其他合适的溶剂，其中优选的溶剂为，如乙醇，来洗涤，所有的有机和无机物质都能溶解在这些溶剂中。下文例 6 部分举出一例来说明 p-GlcNAc 纯化方法的应用。

按照化学/生物法，p-GlcNAc 纤维是通过加入生物和化学剂将其从硅藻属细胞中分离出来。例如，用可削弱硅藻属细胞的细胞壁从而导致 p-GlcNAc 纤维释放，但又不改变其结构的化学药品来处理硅藻属培养物。这些化学药品包括，但并不局限于氢氟酸 (HF)。另一种方法，可用能改变生物生长过程的生物剂来处理成熟的硅藻培养物，抑制 p-GlcNAc 纤维的合成，进而将已有的 p-GlcNAc 纤维释放出来。例如，这些生物剂可包括，但并不局限于多氧菌素-D，它是 N-乙酰葡萄糖胺-p-转移酶的抑制剂。

经上述的这些化学和生物剂处理后，硅藻属培养物中的细胞便与含 p-GlcNAc 的纤维分离开来。例如，处理后的硅藻培养物的内容物可分为截然不同的两层。上层主要含 p-GlcNAc 纤维，而下层主要是细胞体。上部的 p-GlcNAc 纤维层可虹吸出，留下下层的细胞物质。随后，将虹吸出的 p-GlcNAc 纤维层进一步用不损伤 p-GlcNAc 纤维的去垢剂处理，以除掉蛋白和其它不必要的物质。这些去垢剂包括，但并不局限于，十二烷基硫酸钠 (SDS)。

当酸处理如 HF 处理用于从硅藻属细胞体中分离 p-GlcNAc 纤维时，可包含一步纤维分散步骤。这个步骤包括，但并不局限于，应用机械力来使纤维分散，例如使纤维承受涡旋混合器的转动这一步。

另外，在一任选步骤中，可在进一步用去垢剂处理法纯化之前中和酸处理过的悬浮液。一般来讲，中和步骤将会使悬浮液的 pH 值由约 1.8 变为约 7.0，这一步可由添加适当体积的 1M Tris (pH 8.0) 或添加适当体积的氢氧化钠 (NaOH) 来实现。一般来讲，中和能产生纯的 p-GlcNAc 纤维，这些纤维基本上较用此处所讨论的其他纯化方法

所得的纯 p-GlcNAc 纤维都要长。

随后，纯化的 p-GlcNAc 纤维可用本领域的技术人员熟知的技术，如抽吸和过滤装置，进行浓缩。最后，将浓缩过的 p-GlcNAc 纤维用如去离子蒸馏水、盐酸、乙醇或其他合适的溶剂，其中优选的溶剂为，如乙醇，进行一系列的冲洗，有机和无机物质都能溶解在这些溶剂中。下文例 7 部分举出一例来证明这一纯化方法的应用。

虽然以微球藻，优选硅藻为出发材料制备的 p-GlcNAc 经这些方法纯化后都能得到很纯的、无掺杂的、晶体状的 p-GlcNAc，但每一种方法生产的 p-GlcNAc 都具有特异的和有利的特征。例如，经由机械力纯化的 p-GlcNAc 产生了一种 p-GlcNAc 膜，这种膜为细胞黏附到 p-GlcNAc 上提供了上好的底材。相对于机械力法，化学/生物法有较高的平均产量。此外，应用化学/生物法的酸处理/中和变化生产出了极长的 p-GlcNAc 纤维，有的长度竟超过 100 μ m，p-GlcNAc 聚合物所含分子分子量高达 20-30 $\times 10^3$ KD。

应用化学/生物纯化法的酸处理/中和变化制备的、本发明中的方法和组合物中用到的 p-GlcNAc 的电镜显微照片结构如图 3 所示。p-GlcNAc 纤维纯化常常形成如图 3 所示的构造。

5.1.1 p-GlcNAc 的衍生

利用一系列可控制的条件和程序，可将本发明中完全乙酰化的 p-GlcNAc 衍生为一系列的不同化合物。见图 4，图表中描述了其中的一些化合物。这些衍生物可包括，但并不局限于，部分或完全脱乙酰的 p-GlcNAc，这些脱乙酰的 p-GlcNAc 已经通过下文将详细描述的化学和/或酶法修饰过。按照本发明的一种优选实施方案，其 p-GlcNAc 是 100%脱乙酰的。

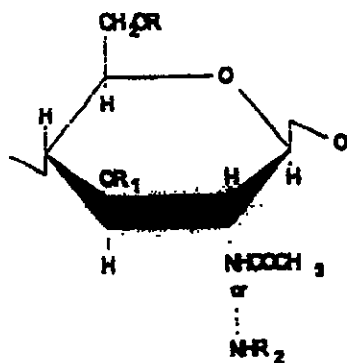
此外，p-GlcNAc 或其脱乙酰衍生物可通过磺化、磷酸化和/或硝酸化进一步衍生。此外，如下文所详述的，O-磺酰、N-酰基、O-烷基、N-烷基、脱氧卤、N-亚烷基、N-亚芳基及其他衍生物可由本发明中的 p-GlcNAc 或脱乙酰 p-GlcNAc 来制备。本发明中的脱乙酰 p-GlcNAc 也可用于制备一系列的有机盐和/或金属螯合物。

按照本发明中的一种优选实施方案，p-GlcNAc 的一或多个单糖单位可脱乙酰形成一类多聚- β -1, 4-N-乙酰葡萄糖胺。此类所有单糖

单位都脱乙酰化的多聚- β -1, 4-N-乙酰葡萄糖胺, 也即 100%脱乙酰衍生物, 分子量大约为 640—24, 000KD, 其中 640—2, 400KD 优选。具有这样一个分子量范围的一类多聚- β -1, 4-N-乙酰葡萄糖胺含有大约 4, 000—150, 00 个以 β -1, 4-构象共价结合的葡萄糖胺单糖。

p-GlcNAc 可用碱处理脱乙酰以生产含有游离氨基的葡萄糖胺。这个水解过程可通过浓缩的氢氧化钠或氢氧化钾溶液在较高的温度下实现。见如下文举例部分 8。另一种方法, 可用使用脱乙酰基酶, 通过酶解程序来脱乙酰化。对本领域中的技术人员来讲, 这种脱乙酰基酶酶解程序是众所周知的, 可据美国专利 5, 219, 749 中所示进行, 这项专利在此处全文引用以做参考。

此外, 本发明中的 p-GlcNAc 的一或多个单糖单位可衍生为含有至少一个磺基, 另外, 它也可进行硫酸化或硝酸化, 如下所示:



此处, R 和/或 R_1 取代 H, 和/或 R_2 取代 $-\text{COCH}_3$, 可以是硫酸根 ($-\text{SHO}_3$), 或磷酸根 ($-\text{P}(\text{OH})_2$), 或硝酸根 ($-\text{NO}_2$),

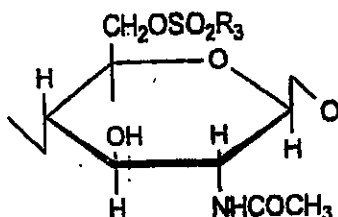
下述是制备这些化合物的方法。应用这些方法之前, 首先, 最好是将出发材料在液氮中冷冻干燥并将其粉碎。

例如, p-GlcNAc 硫酸盐衍生物可由一个两步的过程来制得。第一步, 从本发明中的 p-GlcNAc 和/或 p-GlcNAc 衍生物来制备 O-羧甲基 p-GlcNAc, 这种制备是通过, 例如应用 Tokura 等所述的那些技术来制备的 (Tokura, S. et al., 1983, Polym. J. 15:485)。第二步为磺化步, 这一步可按照 Schweiger 所描述的、本领域中的技术人员熟知的技术, 通过如 N, N-二甲基-甲酰胺-三氧化硫来进行 (Schweiger, R. G., 1972, Carbohydrate Res. 21:219)。最终产品可以钠盐的形式分离出来。

例如, 可利用如 Nishi 等所述的、本领域中的技术人员熟知的技术来制备 p-GlcNAc 磷酸盐衍生物 (Nishi, N. Et al., 1986, in "Chitin in Nature and Technology, Muzzarelli et al., eds. Plenum Press, New York, pp. 297-299). 简单来讲, p-GlcNAc/甲磺酸混合物可在约 0-5℃ 下, 用五氧化二磷 (与混合物等量, 约 0.5-4.0M) 搅拌处理。这样的处理大约要用 2 小时。随后, 最终产物经本领域中的技术人员熟知的标准方法沉淀和洗涤。例如, 这种样品可用溶剂如醚沉淀, 离心, 用溶剂如醚、丙酮或甲醇来洗涤, 令其干燥。

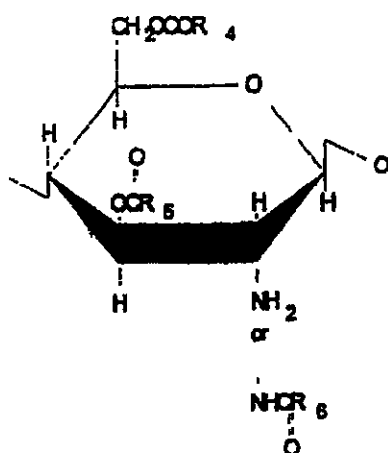
例如, 可利用如 Schorigin 和 Halt 所述的、本领域中的技术人员熟知的技术来制备 p-GlcNAc 硝酸盐衍生物 (Schorigin, R. And Halt, E., 1934, Chem. Ber. 67:1712). 简单来讲, p-GlcNAc/或 p-GlcNAc 衍生物可用浓缩的硝酸处理以形成一种稳定的硝酸盐产品。

本发明中 p-GlcNAc 的一或多个单糖单位含有磺酰基, 如下所示:



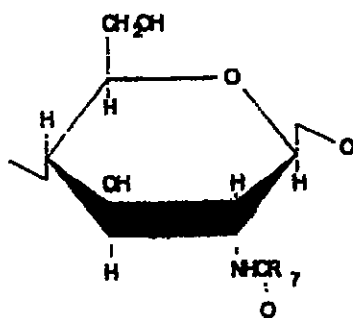
此处, R₃ 可以是一烷基、芳基、烯基或炔基。这样的衍生物可用众所周知的方法, 如 Kurita 等所述的方法 (Kurita, K. et al., 1990, Polym. Prep [Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.] 31:624-625) 来制备。简单来讲, p-GlcNAc 的水合碱溶液可与甲苯磺酰氯的氯仿溶液反应, 随后这个反应可在低温下顺利进行。

本发明中 p-GlcNAc 的一或多个单糖中, 或者 p-GlcNAc 的脱乙酰衍生物中可含有一或多个 O-酰基, 如下所示:



此处, R4 和/或 R5 取代 H, 可为一烷基、烯基或炔基部分; R6 可为一烷基、烯基或炔基部分. 这样的衍生物可由如 Komai 所述的、本领域中的技术人员熟知的方法来制得 (Komai, T. et al., 1986, in "Chitin in Nature and Technology", Muzzarelli et al., eds., Plenum Press, New York, pp. 497-506). 简单来讲, p-GlcNAc 可在甲磺酸中与一些合适的酰氯之任一种发生反应来生产 p-GlcNAc 衍生物, 这些衍生物包括, 但并不局限于, 己酰基、辛酰基、lancyl 或苯甲酰基衍生物.

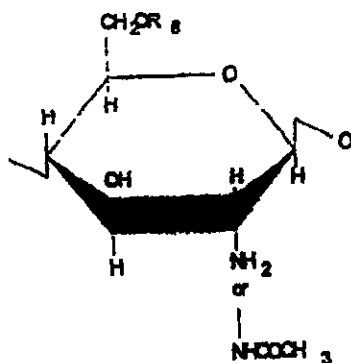
本发明中, 脱乙酰 p-GlcNAc 的一或多个单糖可含有 N-酰基, 如下所示:



此处 R7 可为一烷基、烯基或炔基部分. 这样的衍生物可由如 Hirano 等所述的、本领域中的技术人员熟知的方法来制得 (Hirano, S. et al., 1976, Carbohydrate Research 47:315-320). 脱乙酰基 p-GlcNAc 可溶于多种有机酸的水溶液. 在甲醇-乙酸水溶液中, 选

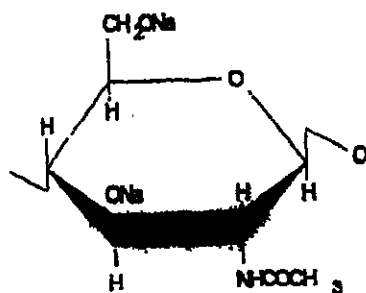
定的羧酸酐添加到这样的含有 p-GlcNAc 的溶液中，结果得到了 N-酰基 p-GlcNAc 衍生物。对可控制释放的药物传送系统的产物来讲，N-酰基 p-GlcNAc 是优选的衍生物。

本发明的 p-GlcNAc 或其脱乙酰 p-GlcNAc 衍生物的一或多个单糖可含有 O-烷基，如下所示：



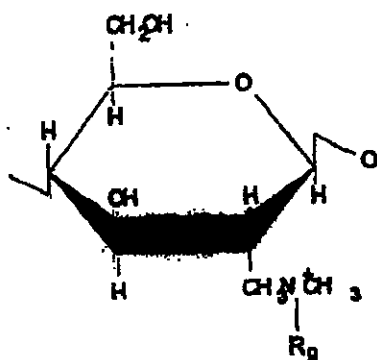
此处 R8 可为一烷基、烯基或炔基部分。这样的衍生物可由如 Maresh 等所述的、本领域中的技术人员熟知的方法来制得 (Maresh, G. et al., in "Chitin and Chitosan," Skjak-Braek, G. et al., eds., 1989, Elsevier Publishing Co., pp. 389-395)。简单来讲，脱乙酰 p-GlcNAc 可分散在二甲氧基乙烷 (DME) 中，并且可与过量环氧丙烷反应。这个反应在 40-90℃ 的高压灭菌锅中进行，反应时间可为 24 小时。随后的混合物可用水稀释、过滤。DME 可由蒸馏法去除。最后，终产物可由冷冻干燥分离得到。对可控制释放的药物传送系统的产物来讲，O-烷基 p-GlcNAc 及其脱乙酰基衍生物是优选的。

本发明中 p-GlcNAc 的一或多个单糖单位可为其碱性衍生物，如下所示：



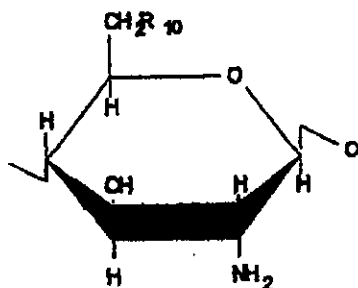
这样的衍生物可用本领域中的技术人员熟知的技术制得。例如，可用 Noguchi 等所述的一种方法 (Noguchi, J. et al., 1969, Kogyo Kagaku Zasshi 72:796-799) 来制备。简单来讲，在真空中，p-GlcNAc 可在 0℃ 下浸泡于 NaOH (优选浓度为 43%) 中约 2 小时。多余的 NaOH 可由，如在蓝式离心分离机中离心和通过机械挤压来除去。

本发明的脱乙酰 p-GlcNAc 衍生物的一或多个单糖单位可含有 N-烷基，如下所示：



此处 R₉ 可为一烷基、烯基或炔基。这样的衍生物可利用如 Maresh 等所述的方法 (Maresh, G. et al., in "Chitin and Chitosan," Skjak-Brack, G. et al., eds. 1989, Elsevier Publishing Co., pp. 389-395) 来制得。也可由上文所述的生产 N-烷基 p-GlcNAc 衍生物的方法来制备。

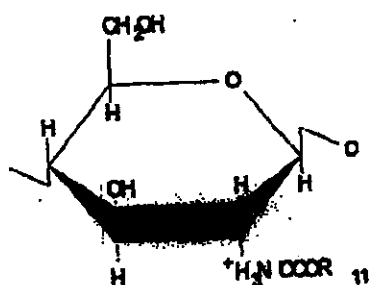
本发明的脱乙酰 p-GlcNAc 衍生物的一或多个单糖单位可含至少一种去氧卤衍生物，如下所示：



其中 R₁₀ 可以是 F, Cl, Br 或 I, I 是优选的。这样的衍生物可以退回本领域技术人员熟知技术来制备。例如采用 Kurita 等人所述方

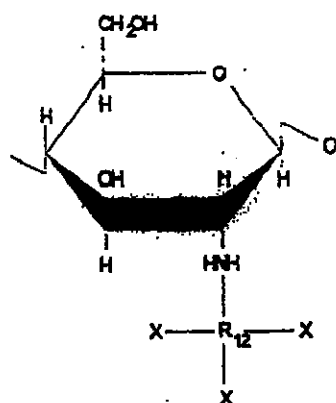
法 (Kurita, K. et al., 1990, Polym. Prep. [Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.] 31:624-625)。简言之, 用甲苯磺酰化 p-GlcNAc 与卤化钠在二甲基亚砜中反应, 生成脱氧卤代衍生物。p-GlcNAc 甲苯磺酰化可通过碱性 p-GlcNAc 的水溶液与甲苯磺酰氧的氯仿溶液反应来实现。这个反应在低温下可顺利进行。

本发明中, 脱乙酰 p-GlcNAc 衍生物的一或多个单糖单位可形成盐, 如下所示:



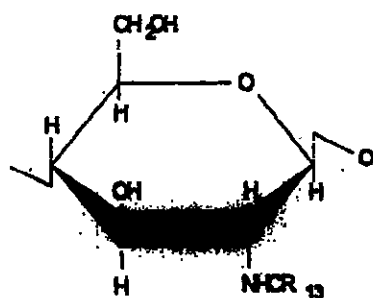
此处, 此处 R11 可以是烷基、烯基或炔基部分。这样的衍生物可由本领域中的技术人员熟知的技术制备。例如, 可由 Austin 和 Sennett 所述的程序来制备 (Austin, P.R. and Sennett, S., in "Chitin in Nature and Technology," 1986, Muzzarelli, R.A.A. et al., eds. Plenum Press, pp. 279-286)。简单来讲, 脱乙酰 p-GlcNAc 悬浮在有机介质, 例如乙酸乙酯或异丙醇中, 向此溶液中加入有机酸如甲酸、乙酸、乙二醇酸或乳酸。此混合物反应一段时间 (如 1-3 小时)。反应和干燥温度可在约 12-35℃, 其中 20-25℃ 优选。随后, 这些盐通过过滤分离, 用新鲜介质冲洗, 剩余的介质蒸发掉。

本发明的脱乙酰 p-GlcNAc 衍生物的一或多个单糖单位可形成金属螯合物, 如下所示:



此处 R12 是一金属离子，尤其是一种过渡态金属；X 是由氨基和脱乙酰 p-GlcNAc 中存在的氨基上的氮的电子形成的配价键。

本发明中，脱乙酰 p-GlcNAc 衍生物的一或多个单糖单位可含有 N-亚烷基或 N-亚芳基，如下所示：



此处，此处 R13 可以是烷基、烯基烷基或芳基部分。这样的衍生物可由本领域中的技术人员熟知的技术制备。例如，可由 Hirano 等所述的程序来制备 (Hirano, S. et al., 1981, J. Biomed. Mat. Res. 15:903-911)。简单来讲，脱乙酰 p-GlcNAc 的 N-替代反应可通过羧酸酐和/或芳基醛来进行，以产生酰基-和/或亚芳基衍生物。

此外，p-GlcNAc 或其脱乙酰衍生物可承受可控制的水解条件，在这种水解条件下，p-GlcNAc 可生成具有均一性、不连续分子量和其他物理特征的分子。这样的水解条件包括，如利用溶菌酶来进行处理。为了控制水解程度，可将 p-GlcNAc 暴露于溶菌酶中，但其时间各不相同。此外，作为溶菌酶处理过的 p-GlcNAc 脱乙酰的程度函数，控制 p-GlcNAc 的水解速度。脱乙酰作用的条件如上文所述。脱乙酰程度约在 20-90% 时，p-GlcNAc 分子脱乙酰越充分，在特定时间内

p-GlcNAc 分子水解的就越充分。水解作用和/或脱乙酰处理可能引发除降低分子量之外的物理特征改变。过长时间的水解会引起 p-GlcNAc 的液化。

此外，热变性可改变 p-GlcNAc 的晶体结构。p-GlcNAc 产物晶体结构的这种改变可能具有有利的影响，如对 p-GlcNAc 的反应性。

此外可能形成包括 p-GlcNAc 和/或 p-GlcNAc 衍生物在内的杂种。除 p-GlcNAc 和/或 p-GlcNAc 衍生物外，此杂种还含有许多天然的和或合成的物质。例如，杂种可由 p-GlcNAc 和/或 p-GlcNAc 衍生物加上一或多种胞外 (ECM) 基质组分形成。这些胞外基质组分可包括，但并不局限于胶原、纤连蛋白、粘多糖和/或肽聚糖。杂种也可由 p-GlcNAc 和/或 p-GlcNAc 衍生物加一或多种合成的物质，如聚乙烯。p-GlcNAc/聚乙烯或 p-GlcNAc 衍生物/聚乙烯杂种可通过热連結杂种组分通过，如高压灭菌来生成。

本发明中，优选使用的 p-GlcNAc 衍生物是脱乙酰 p-GlcNAc 盐衍生物，如 p-GlcNAc-乳酸盐衍生物，尤其是 p-GlcNAc-乳酸盐凝胶衍生物。此处所用到的名词“p-GlcNAc-乳酸盐”指半乳酸功能性的附着到部分和全部的脱乙酰 p-GlcNAc 上。这些 p-GlcNAc-乳酸盐衍生物可由上述的方法制得（如由通过用乳酸衍生化），并且按下文举例部分 10 所述，利用丙烯基乙二醇和水将其制成凝胶。可生产出具有高及低粘度的 p-GlcNAc-乳酸盐衍生物，使之能够通过剪裁 p-GlcNAc 来满足特定的利益需要。例如，较低粘度的 p-GlcNAc 可通过通过注射器或通过喷雾器传递。

如下文 5.3 部分较详述的，上文所述的 p-GlcNAc 和/或其衍生物能够通过共价或非共价连接到，或结合到感兴趣的药物或分子如内皮素拮抗剂上来进一步衍生。

5.1.2 p-GlcNAc 的再形成

将本发明中用到的、上文描述过的 p-GlcNAc、其脱乙酰衍生物和/或它们的衍生物溶解，随后再形成多种形态和构造。

p-GlcNAc 溶液可通过二甲基乙酰胺 (DMA) /氯化锂处理得到。通过搅拌，p-GlcNAc 易于溶解在含有 5%LiCl (按 DMA 的重量) 的 DMA 溶液中。水溶性的 p-GlcNAc 衍生物，例如 p-GlcNAc 盐，如乳酸盐

或羧甲基衍生物可溶解在水中。至少约有 75% 已脱乙酰化的 p-GlcNAc 可置于溶液中，例如微酸溶液，如 1% 的乙酸。水不溶性的 p-GlcNAc 衍生物可置于有机溶剂中的溶液中。

p-GlcNAc 在 DMA: HCL 溶液中与苯基异氰酸盐 (carbanilate) 的衍生作用可用于生产苯基氨基甲酸酯。此外，p-GlcNAc 在 DMA: LiCl 中与甲苯-p-磺酰氯化物的衍生作用可用于生产甲苯-p 磺酸盐。

随后，将溶液中的 p-GlcNAc、其脱乙酰衍生物和/或它们的衍生物沉淀，并将他们再形成各种形态，这些形态包括，但并不局限于簇状 (mat)、线形、微球体、微珠、膜状、纤维状、粉状、海绵状和凝胶。此外，可形成超薄 (厚度小于 1 微米)、均一的膜。此外，也可制备药物制剂如丸剂、片剂和胶囊。

利用如纯的 p-GlcNAc 不溶于溶液，如水和乙醇，优选乙醇溶液这个事实，这种再形成就可以完成。用传统的方法如注射，将例如含 DMA/LiCl 的 p-GlcNAc 混合物导入这样的水或乙醇溶液，优选乙醇溶液中，在溶液中就会产生再沉淀作用，从而溶解的 p-GlcNAc 实现了再形成。将 p-GlcNAc 膜再形成成为一种纤维状物质中的过程在下文举例部分 9 有示例。在水溶性 p-GlcNAc 衍生物的再形成中，这个过程可通过在有机溶剂如乙酸乙酯或异丙醇中再沉淀完成。至少约 75% 已脱乙酰的 p-GlcNAc 的再形成可通过在碱溶液中再沉淀来完成。水不溶性的 p-GlcNAc 衍生物可通过在水溶液如水中再沉淀来完成。

p-GlcNAc 膜和三维 p-GlcNAc 基质可通过一些方法来制备，这些方法可在 p-GlcNAc 膜或 c 基质中形成可控制的平均孔径。在形成膜或基质之前，通过改变所用的 p-GlcNAc 量，以及添加约 5%--40% 特定量的溶剂，如甲醇或乙醇，优选乙醇，来控制 p-GlcNAc 膜和基质的孔径。一般来讲，溶剂百分含量越大，平均孔径越小。

按照本发明中的一种优选的再形成方案，p-GlcNAc-乳酸盐衍生物形成凝胶的程序在下文举例部分 10 中有详述。

5.2 本发明中的组合物中的内皮素拮抗剂

本发明中的方法和组合物中所用到的内皮素拮抗剂包括，但并不局限于以肽为基础的内皮素拮抗剂、非肽基的皮素拮抗剂、ETA 特异性的、ETB 特异性的内皮素拮抗剂或非特异性的内皮素拮抗剂。在本

发明的方法和组合物中,所用到的以肽为基础的内皮素受体拮抗剂的例子包括 BQ123 (Cyclo(-D-Trp-D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-), BQ153, BQ238, BQ485, BQ610, BQ788, BQ928, TAK-044, FR139317 (全氢氮杂-1-基羧基-L-亮氨酸-(1-甲基)-D-色氨酸-[3-(2-吡啶基)-D-丙氨酸)、RES-701-1 (Novabiochem)、PD142893 (乙酰-(3,3-二苯基-D-丙氨酸)-L-Leu-L-Asp-L-Ile-L-Ile-L-Trp)、PD145065, CP170687, Ac-DBbg16-LEU-Asp-Ile, IRL-1038 ([半胱氨酸 11-半胱氨酸 15]-内皮素-1 (11-21)), GRGDS 五肽和 ET-1 [Dpr1-Asp 15], 其中的一些肽段可商购,例如,从 the American Peptide Company, Sunnyvale CA or Calbiochem-Novabiochem Company, San Diego CA. 等公司购买。

在本发明的方法和组合物中,所用到的非肽基的内皮素受体拮抗剂的例子包括 Ro 61-0612, Ro 61-1790, Ro 42-2005, Ro 46-2005, Ro 46-8443, Ro 47-0203 (本领域中又叫做 bosentan), PD 155080, PD 156707, SB 209670, SB 217242, L-744,453, L-749,329, L-754,142, CGS 27830, BMS 182874, LU135252, S-1039, mA386, A-127722, TBC11251, Nz-精氨酸-3-(isoxazdylsulfamoyl)-2-噻吩甲酰胺,和 EQ 123. 见上文如., Webb 等和 Ohlstein 等, 一些已知的内皮素拮抗剂的结构。

按照本发明,优选非肽基的内皮素拮抗剂,因为他们表现出了较以肽为基础的拮抗剂有利的药物动力学性质,例如较高的代谢稳定性和较好的生物利用度。按照本发明的一种优选实施方案,所使用的内皮素拮抗剂是 Ro61, 如上文图 1 所示。

5.3 本发明的组合物中优选的制剂

按照本发明中的一种优选实施方案,上文描述过的一种内皮素拮抗剂 (“EA”) 是共价或非共价连接或结合到 p-GlcNAc、或其一种或多种衍生物、或它的制剂上,这些上文都有描述。按照一种实施方案,至少一种内皮素拮抗剂是以共价、或非共价或其它的方式结合到脱乙酰 p-GlcNAc 上,或以这些方式与其混合。其它的可与本发明中 EA/ p-GlcNAc 组合物联合使用的抗肿瘤剂在下文中讨论。

通过一些方式,例如,通过可作为特定长度化学间隔臂的双功能交联剂进行的化学连接,可将内皮素拮抗剂或其他抗肿瘤剂共价连接到脱乙酰 p-GlcNAc 暴露在外的伯胺上。这些技术对于本领域中的技术人员来讲是熟知的,并且与如 Davis 和 Preston 的方法(Davis, M. and Preston, J. F. 1981, Anal. Biochem. 116:404-407)及 Staros 等的方法(Staros, J. V. et al., 1986, Anal. Biochem. 156:220-222)相似。例如,肽类化合物的羧酸残基在连接到完全脱乙酰的或部分脱乙酰的 p-GlcNAc 上时先被激活,随后交联到 p-GlcNAc 上。活化作用可通过一些方式,如添加一种溶液如碳二亚胺 EDC(1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺)到溶有肽段的磷酸缓冲溶液中。优选的是此溶液中额外含有一些试剂如硫代(sulpho)-NHS(N-羟基-硫代-琥珀酰亚胺)以增加偶联。通过与一种高 pH 值的缓冲溶液,如碳酸盐缓冲溶液(pH 9.0-9.2)混合,已活化的肽段就可交联到脱乙酰 p-GlcNAc 上。

通过改变用来将分子连接到 p-GlcNAc 上的连接物分子(如双功能交联化合物)的长度,连接分子的生物活性就可以得到维持。对要求维持生物活性恒定的待连接的某一特定连接分子来讲,其连接物的长度是可如例行公事性的确定的。例如,已通过应用一特定长度的连接物完成连接的分子的活性(例如,生物活性的治疗效用水平),可应用众所周知的检测方法检测到,这种方法是对已连接分子特异的。此外,为了保持已连接分子的生物活性,有必要使用一种可被一种适当的、天然存在的酶切割的连接物以释放已连接的分子。也可用本领域中的技术人员常用的检测方法检测已连接的特定分子生物活性的保持力,以此来确定它仍保持着的可接受的活性水平(如生物活性的治疗效用水平)。

另外,利用本领域中的技术人员熟知的技术,以肽为基础的或非肽基的内皮素拮抗剂单独或与其它抗肿瘤剂相结合,与 p-GlcNAc 或其衍生物混合或非共价连接以生成本发明中的组合物。例如,所选的一或多个分子,如内皮素拮抗剂,可与 p-GlcNAc 悬浮物、或与完全与部分脱乙酰的 p-GlcNAc 溶液、或与完全与部分脱乙酰的 p-GlcNAc 盐溶液如与 p-GlcNAc-乳酸盐溶液(部分或完全脱乙酰)、或与任何 p-GlcNAc 衍生物溶液相混合。此混合物可随意的进行冷冻干燥。冷

冻干燥后,大概通过疏水作用、静电作用、或其它非共价相互作用,这些分子可非共价的键合到 p-GlcNAc 基质上. 这样的 p-GlcNAc 制剂很容易制备. 此外, 这样的制剂可通过多种分子来有效的完成制备, 这些分子具有很宽的物理特征和水溶性, 可由最疏水的分子到最亲水的分子. 这些分子粘合到 p-GlcNAc 上后, 就可以应用本领域中的技术人员熟知的检测方法来确定已粘合分子的可接受的活性水平 (如生物活性的治疗效用水平).

此外, 利用本领域中的已知方法, 可将单独的或与其他抗肿瘤剂结合的内皮素拮抗剂封装到 p-GlcNAc 之中. 例如, 完成胶囊封装的方法包括 Hwang 等所列的程序 (Hwang, C. et al. In Muzzarelli, R. et al., eds., 1985, "Chitin in Nature and Technology", Plenum Press, pp. 389-396), 这种方法已在此处全文引用作为参考. 胶囊封装也可通过其他方式完成, 例如, 可按照对上文已提到的化学/生物纯化法的酸处理/中和变化法修改后的方法进行. 不是将 p-GlcNAc 溶液的 pH 值升高到约中性范围 (即大约 7.4), 而是可以在纯化完成后将其 pH 升至大约 9.0, 就可以创造一种碱性 pH 环境. 在较碱性的 pH 条件下, p-GlcNAc 或其衍生物呈现一种更加三维或开放的空间构象. 随着 pH 的降低, 分子的空间构想回复到一种更加结实的、紧凑的构象. 因此, 一种有益的化合物或药物, 例如内皮素拮抗剂, 可在高 pH 条件下添加到 p-GlcNAc 溶液中, 随后降低 p-GlcNAc 悬浮液的 pH 值, 因此此有益药物就被“俘获”或封装在 p-GlcNAc 基质中. 这些分子进行胶囊封装之后, 就可以应用本领域中的技术人员熟知的检测方法检测已胶囊封装分子的活性, 从而确定这些胶囊封装分子所保持的可接受的生物活性水平 (如生物活性的治疗效用水平).

下文举例部分 10 列出了本发明中的一种 EA/ p-GlcNAc 组合物制备的例子, 在此处这种内皮素拮抗剂是与一种 p-GlcNAc 凝胶混合在一起的. 此外, 可用一些方法来制备 EA 组合物 (不含伴随的 p-GlcNAc), 例如, 将内皮素拮抗剂溶解在 PBS、HBSS 中或按生产手册所述, 并将溶液调至所需浓度.

本发明中的组合物, 包括 EA/ p-GlcNAc 组合物, 可制备出来以作为药用组合物给药, 给药方式可以是吸入或吹入 (经由嘴或鼻),

或口服，或口腔给药、或非肠道、或肠道给药。按照一种优选实施方案，本发明中的 EA/ p-GlcNAc 组合物是以下文举例部分 10 中所述的凝胶形式、通过注射给药的。在此处的优选实施方案中，药用组合物包括内皮素拮抗剂，例如，非肽基的内皮素拮抗剂，如氨磷酰嘧啶的给药来治疗增殖性疾病如癌症，这些组合物也包括药用有效剂量的内皮素拮抗剂与药理上可接受的载体的结合物。

对于口服给药来说，药用组合物可有多种形式，如片剂、胶囊等。这些形式是用传统的方法，加入药用条件可接受的赋形剂或载体，如粘合剂（如预明胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素）、填充剂（如乳糖、微晶体纤维素或磷酸氢钙）、润滑剂（如硬脂酸镁、滑石、硅石）、崩解剂（如土豆淀粉或甘醇酸淀粉钠），或润湿剂（如十二烷基磺酸钠），来制备的。p-GlcNAc 可作为赋形剂、载体或填充剂的替代物或补充物。利用本领域中熟知的方法可给片剂加一层 p-GlcNAc 封装。

口服给药用液体剂可有多多种形式，例如溶液、糖浆或悬浮液，或者它们也可以干产物形式存在，服用前添加水或其他合适的载体物质。这些制剂是应用传统方法、添加药用条件可接受的添加剂，如悬浮剂（如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或已氢化的可食性脂肪）、乳化剂（如卵磷脂或阿拉伯树胶）、非水合介质（如杏仁油、油基酯、乙醇或分馏过的植物油）以及防腐剂（如甲基或丙基-p-水杨酸盐或山梨酸），来制备的。这些制剂也可含有合适的缓冲用盐类、增味剂、色素及甜味剂。

5.4 本发明中的方法和组合物的应用

本发明中的组合物的生物医学应用包括他们在内皮素拮抗剂及其它药用剂，如其他抗肿瘤剂的药物传送系统中的应用。与已知的药物制剂相比，本发明中含有 p-GlcNAc 的制剂提供了额外的益处，包括如增强的效力、降低的毒性及提高的生物利用度。实际上，应用以本发明中的 p-GlcNAc 为基础的药物传送系统有许多好处。例如，传统的注射给药普遍适用于蛋白质和其他许多药物。然而，重复给药导致血液中药物浓度不稳定，影响病人的舒适及合作。口服给药就较为有利，因为它允许不同剂量的药物释放，并且带给病人较少的不适。

然而，蛋白质和其它化合物在胃中能变性和降解。

然而，通过应用本发明中含 p-GlcNAc 的组合物就可以完成一种改良的口服给药方式，因为一旦给药后，含 p-GlcNAc 的组合物就会为药物提供一种保护环境。例如，p-GlcNAc 保护肽类的内皮素拮抗剂免于遭受胃中的酸性和酶解环境。一旦化合物到达能有效将其吸收进入血液的肠区，p-GlcNAc 体系就通过扩散和/或封装降解的方式将化合物释放出来。本发明中的 p-GlcNAc 体系可用于，如传递蛋白质及其他多种化合物。对于这样的口服传递方法来讲，封装有 p-GlcNAc 衍生物的脂质体或 p-GlcNAc 衍生物-藻酸盐胶囊是优选的。

此外，一旦本发明中的组合物导入病人体内，p-GlcNAc 就随时间而降解，从而将连接的或包含的化合物逐步释放到病人血液中，从而提供了一种可控制的、缓慢释放的药物传递方法。

可制备到具有可预测的生物降解率的脱乙酰或部分脱乙酰 p-GlcNAc。例如，脱乙酰的百分率影响 p-GlcNAc 降解的速度。一般来讲，脱乙酰百分率越高，生物降解越快，吸收也越快。因而，p-GlcNAc 生物降解程度及在体内重吸收的速度在 p-GlcNAc 的制备过程中就可以控制。

p-GlcNAc 物质具有如此的可控制的生物降解速度，因而可制成膜状、凝胶状、海绵状、微球状、纤维状等形状。按照本发明的一种优选实施方案，可利用具有可预测的生物降解率的脱乙酰 p-GlcNAc 或部分脱乙酰的 p-GlcNAc 来制备。

应用本领域中的技术人员熟知的标准程序，可通过多种途径将 p-GlcNAc/药物组合物传送到病人体内。例如，这样的传递方式可以是位置特异性的、口的、鼻的、静脉的、皮下的、皮内的、经皮的、肌肉的、腹膜内的给药。关于位置特异的传递，给药方法包括但并不局限于注射、移植、anthroscopic, laparoscopic 等。对这些位置特异的传递方法来讲，p-GlcNAc 膜和/或凝胶以及其微球体、海绵状物是优选的。

如上文所指出的，本发明中组合物中的 p-GlcNAc 可制备成膜状、凝胶状、海绵状、微球体、纤维状等。在人体内，这些 p-GlcNAc 产品不需任何缝合物帮助就可粘着和成形到软、硬组织上。例如，p-GlcNAc 物质可应用于普通的或较小的侵入性手术如腹腔镜手

术。

按照本发明中的一种优选实施方案，p-GlcNAc 是以凝胶形式存在的，从而内皮素拮抗剂和/或其他抗肿瘤剂能够溶解或卷入在其中。作为治疗性药物传送体系，p-GlcNAc 基凝胶和膜具有多种应用，例如提供位置特异性的缓释传送体系，将药物直接送至肿瘤或肿瘤手术后的空区。手术后，这样一种固定的缓释组合物能作为重要的起始防御程序。此外，对于完全不能或部分不能施行手术的肿瘤，如某些脑瘤来讲，这样的抗肿瘤药物传递体系具有特殊的用处。

因此，以本发明中的 EA/ p-GlcNAc 组合物为治疗性药物传送体系有益于治疗癌症和其他增殖性疾病。这些组合物可额外包括其他的抗肿瘤剂，这些抗肿瘤剂可连接到或封装在本发明的 p-GlcNAc 中以产生一种协同作用。这样的抗肿瘤剂对于本领域中的技术人员来讲是熟知的，他们包括，但并不局限于下列种类的和特殊的化合物：烷化剂、抗代谢物剂、抗肿瘤的抗生素、长春花生物碱、表鬼白脂素，亚硝基脲、酶、合成物质、激素治疗用的生物制剂以及侦察性药物。

这些烷化剂包括，但并不局限于氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、thiotepa 及百消安。

抗代谢物剂可包括，但并不局限于甲氧嘌呤、5-氟尿嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (ara-C)、5-氟胞苷、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、及磷酸氮达拉滨。抗肿瘤抗生素可包括但并不局限于阿霉素、道诺霉素、更生霉素、博来霉素、丝裂霉素 C、普卡霉素、伊达北星、米托蒽醌。长春花生物碱、表鬼白脂素可包括，但并不局限于长春新碱、长春碱、去乙酰长春碱、表鬼白毒吡喃葡萄糖苷及表鬼白毒噻吩糖苷。

亚硝基脲包括亚硝基脲氮芥、环己亚硝基脲、甲基罗氮芥及链脲霉素。酶类包括，但并不局限于 L-天冬氨酸。合成物质可包括，但并不局限于 dacrabazine、六甲蜜胺、羟基脲、朱托坦、procabazine、顺氯氮铂及卡铂。

激素治疗药物包括，但并不局限于皮质类固醇（醋酸可的松、羟化可的松、强的松、脱氢皮质醇、甲基脱氢皮质醇及地塞米松）、雌激素（二乙基己烯雌酚、雌二醇、酯化雌激素、共轭雌激素、chlorotiasene）、孕酮（醋酸甲羟孕酮、己酸羟基孕酮、乙酸甲地孕酮）、抗雌激素（它莫西芬）、芳香酶抑制剂（氨基导眠能）、雄性

荷尔蒙（丙酸睾酮、甲基睾酮、氟羟甲睾酮、睾内酯）、抗雄性激素物质（氟他胺）、LHRH类似物（醋酸leuprolide），以及前列腺癌的内分泌物质（酮康唑）。

生物制剂可包括，但并不局限于干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子以及生物响应修饰物。

研究性药物可包括，但并不局限于烷化剂如尼莫司汀、AZQ、BZQ、cyclodisome、DADAG、CB10-227、CY233、DABIS马来酸盐、福莫司汀、EDMN、hepsulfam、六甲蜜胺、马磷酰胺、MDMS、PCNU、螺莫司汀、TA-077、TCNU和temozolomide；抗代谢物如阿西维辛、氟胞苷、5-氟-去氧胞嘧啶、A-TDA、苯亚甲基葡萄糖、卡贝替姆、CB3717脱氧鸟苷甲磺酸盐、DODOX、doxifluridine、DUP-785、10-EDAM、法扎拉滨、氟达拉滨、MZPES、MMPR、PALA、PLAC、TCAR、TMQ、TNC-P及piritrexim；抗肿瘤抗体如AMPAS、BWA770U、BWA773U、BWA502U、Amonafide、m-AMSA、CI-921、Datelliptium、朱托基胺、吡罗噻酮、Aclarubicin、Cytarhodin、表柔比星、依索比星、伊达比星、碘基阿霉素、发波霉素、Menaril、吗啡代萘环类抗生素、Pirarubicin、及SM-5887；微管纺锤体抑制剂如Amphethinile、新萘酰胺和紫杉醇；烷基溶血磷脂如BM41-440、ET-18-OCH₃及六环磷酰胆碱（Hexacyclophosphocholine）；金属化合物如硝酸镓、CL286558、CL287110、Cycloplatin、DWA2114R、NK121、Iproolatin、奥沙利铂、Spiroplatin、Spirogermanium及钛化合物；以及新颖的化合物，如Aphidoicolin甘氨酸盐、咪唑酮氨硫脲、BSO、Caracemide、DSG、Didemnin、B、DMFO、Elsamicin、Espertatrucin、乙酸黄酮、HMBA、HHT、ICRF-187、碘代脱氧尿嘧啶核苷、药薯（Ipomeanol）、Liblomycin、Lonidamine、LY186641、MAP、MTQ、Merabarone、SK&F104864、苏拉明、，太利苏霉素、表鬼白毒噻吩糖胺、THU和WR2721；以及托瑞米芬、Trilosane和zindoxifene。

可作为放射增强物的抗肿瘤药物是优选的，例如在手术时和手术后的放射治疗中。这样的药物包括如化学治疗剂5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、顺铂及其衍生物、紫杉醇、阿霉素、放线菌素博来霉素、道诺霉素以及methamycins。

本发明中的 EA/GlcNAc 组合物与两种或多种其他抗肿瘤剂结合使用,就可收到额外的协同效果,例如与硫鸟嘌呤及胞阿糖胞苷联用来改进急性非淋巴细胞白血病的治疗方法,与它莫西芬和顺氯氨铂连用来改进乳腺癌的治疗方法,与前列腺素和顺氯氨铂连用来改进乳腺癌和前列腺癌的治疗方法.本发明中的 EA/p-GlcNAc 或 EC/p-GlcNAc 衍生物制剂也可用于与本领域中的技术人员熟知的其他抗癌药物的增效性连用中.

此外,鉴于 p-GlcNAc 多聚体具有一些特性和特征,使它们有可能制备和传送那些迄今为止难于制备和传送的药物,因而应用本发明中含 p-GlcNAc 的组合物是值得的.例如,用于治疗乳腺癌的微管纺锤体抑制剂紫杉醇是疏水的,他需要添加多氧乙基化的蓖麻油来增溶它,以使其作为液体浸剂来进行静脉传送.紫杉醇的疏水性质使得他可作为一种理想的化合物与 p-GlcNAc 多聚体物质连用,从而制备局部可控制释放传送的制剂.美国专利 5,635,493 的第 23 部分介绍了这种 p-GlcNAc/紫杉醇制剂,这篇专利已在此处引用作为参考.另外的 p-GlcNAc 抗肿瘤体系靶目标包括,但并不局限于皮肤的、GI 道的、胰腺的、肺的、乳房的、尿道的以及子宫里的肿瘤,及 HIV 相关的 Kaposi's 恶性肿瘤.

因为本发明中的 p-GlcNAc 物质自身是免疫中性的,他们在人体内不引起任何免疫应答,因而这些如上所述的 p-GlcNAc 发明物可以不产生任何免疫应答的方式来传递药物,其中这些发明物包括能载有已固定化的药物的 p-GlcNAc 膜、3D 多孔基质和/或凝胶在内.许多情况下,某些额外的物质如天然的藻酸盐和合成的多聚体可与 p-GlcNAc 结合来构建这样的发明物.例如,一种聚合体的迟滞释放药物传送体系能由与 A.Polk(Polk, A. et al., 1994, J. of Pharmaceutical Sciences, 83 (2): 178-185)所示的方法相似的方法来制得.在这样的程序中,脱乙酰 p-GlcNAc 在氯化钙存在下,与藻酸钠反应生成含有待传送药物的微囊体,一段特定时间之后,这些药物就会在适当的条件下释放出来.

与以 p-GlcNAc 为基础的体系连用,应用本领域中的技术人员熟知的技术就可以程式化的确定上述药物和药剂有效的治疗用剂量.治疗上有效的剂量指的是足以用来改善此处所述的疾病和/或过程症状

的化合物的量。

在细胞培养物上或在实验动物身上,可用标准的治疗程序来确定药物的毒性和治疗效率,例如确定其 LD_{50} (50%实验物致死的剂量)和 ED_{50} (对 50%实验物有治疗效用的剂量)。毒性和治疗效力间的剂量比率是一治疗指数,可用 LD_{50}/ED_{50} 来表示。表现出较大的治疗指数的化合物是优选的。虽然可以使用有毒副作用的化合物,但应该仔细设计运送体系将这些化合物靶定到受疾病侵袭的组织处,从而减小对未感染细胞的损伤,因而也就降低了副作用。

用从细胞培养检测和动物研究所得到的数据可确定人体用药的剂量范围。这些化合物的优选剂量范围是在其循环浓度范围之内,此循环浓度包括具有小毒力或没有毒力的 ED_{50} 。给药剂量可在其范围内变化,这依赖于所用的药剂形式和所用的给药路线。对于本发明中的方法中用到的化合物来讲,最初可用细胞培养检测来估计其有效的治疗剂量。通过动物模型可以确定某种药物的剂量,以此来得到其循环血浆浓度范围,这个范围包括 IC_{50} (也即可获得症状最大抑制半数的供试化合物的浓度),用细胞培养检测的方法也可得到这个范围。这些信息可以用来更准确的确定用于人体的有效剂量。血浆中的药物水平可以测量,例如通过高效液相色谱。按照一种优选实施方案,本发明中组合物所用到的内皮素拮抗剂的剂量范围约是 1mg/kg — 100mg/kg 。

此外,上文所列的许多抗肿瘤药物的剂量对于本领域中的技术人员来讲是熟知的,并且能轻易的从 the PHYSICIANS DESK REFERENCE, Medical Economics Data Publishers; REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Co.; GOODMAN & GILMAN, THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, McGraw Hill Publishers, THE CHEMOTHERAPY SOURCE BOOK, Williams and Wilkens Publishers 等概略,在线服务如 the Cancer Lit@, U.S. National Cancer Institute database, 及药物研究报告如, "A MultiCenter Randomized Trial of Trial of Two Doses of Taxol" Nabholz, J.M., Gelmon, K., Bontenbal, M. et al. Medical Education Services Monograph - 1994 Bristol-Myers Squibb Company Publication; "Randomized Trial of Two Doses of Taxol

in Metastatic Breast Cancer: An Interim Analysis" Nabholz, J.M., Gelmon, K., Bontenbal, M., et al. 1993, Proc. Am. Clin. Oncol., 12:60. Abstract 42. 中查到。

在使用本发明中的组合物中的抗肿瘤药物时,其每日剂量可能低于、等于或高于对病人实施系统治疗时开具的日剂量。例如,在对移植入异常的 HT29 结肠癌肿瘤的 scid 鼠所做的实验表明,用只有标准剂量(300-450mg/m² 剂量给药 5 天)50%的 5-氟脲嘧啶来治疗人结肠癌,就可以降低 80%-90%的异位 HT29 结肠癌肿瘤的数量。与静脉注射对照组动物相比,用 p- GlcNAc 膜作为药物传送基质进行 5-氟脲嘧啶给药了显著降低减少 50%肿瘤体积所需的剂量。在美国专利 5, 635, 493 举例部分 21 中有相关的详细数据,这项专利已在此处引用作为参考。当要求较高剂量时,人体也可耐受这种高剂量,因为药物是传送到肿瘤所在的局部区域,因而其他的组织,包括血细胞,是不易暴露给药物的。

一些抗肿瘤剂是 vesicant, 这些药剂包括放线菌素 D、道诺霉素、阿霉素、雌莫司汀、二氯甲基二乙胺、丝裂霉素 C、长春碱、长春新碱、和长春地辛; 而另一些抗肿瘤药物是刺激物,他们包括卡莫司汀、decarbazine、依托泊苷、mithrmycin、链唑霉素和替尼泊苷。vesicant 和刺激物可引起一些不利的副作用,包括组织溢出和组织兴奋,同时伴随着疼痛、红肿及其他症状。此外,这些副作用也可引起组织坏死。本发明中那些可用于局部的、可控制释放的抗肿瘤药物之中的 p- GlcNAc 膜和凝胶物质具有创伤治疗特性。由于本发明中含 p- GlcNAc 组合物的 p- GlcNAc 成分具有积极治疗的效用,因此,与由本发明中的 p- GlcNAc 膜和凝胶制剂传送的发泡剂或刺激物接触的正常组织不仅不易损伤,反而会加快治愈的速度。

6. 实施例: 利用机械力纯化方法纯化 p- GlcNAc

在这一部分中, p- GlcNAc 是用上文 5. 1 部分所述的机械力技术来纯化的。

6.1 材料和方法/结果、

硅藻培养条件: 硅藻 *Thalassiosira fluviatilis* 的培养完全

按照美国专利 5, 635, 493 中所述的程序, 这项专利已在此处引用作为参考。

SEM 程序: 此处所用的 SEM 技术如下: 在 10KV 的促进电压下, 应用工作距离为 15mm 的 Zeiss962 器械. 人造偏光板型号: 55p/n(u4), 可用于所要求的各种放大率. 样品外壳 (100 埃) 和 100 埃的 aupd.

(a) 样品制备: 在初步固定时, 在不含血清的 Eagle's DMEM 中用戊二醛来代替生长培养基. 通过几种改变来保证从生长培养基到固定化介质的完全转化. 在室温下固定半小时. 将盖玻片转移到一干净小瓶中, 这个小瓶装有 pH7.2 的、含有 2% 戊二醛的 0.1M 甲次磷酸钠和 0.1M 蔗糖. 室温下, 在此小瓶中进行时长 1.5 小时的进一步固定.

p- GlcNAc 纯化的步骤: 利用上文 5.1 部分所述的机械力技术将 p- GlcNAc 从硅藻培养基中纯化出来. 特别指出的是, 将培养物加入到涡旋混合器中, 在高速下进行三次短时间的涡旋混合, 利用这种方式将 p- GlcNAc 纤维从硅藻细胞体中分离出来. 三次混合总共用时 1 秒. 利用 Sorvall GS-4 型固定转子, 10℃ 下, 将混合后的悬浮液离心 20 分钟, 转速 3500rpm. 轻轻倒出上清液, 再离心, 转速 4000rpm, 其余条件同上. 再离心一次, 轻轻倒出上清液, 然后在 10℃ 下 4000rpm 离心一次. 第三次离心的最终上清液是清的, 如果有的话, 也是很少的可见的絮状物漂浮在其中. 将清澈的上清液轻轻倒入配有 0.8 μ m 孔径的 Supor-800 聚醚砜滤膜的 Buchner 过滤器中, 然后抽气, 纤维悬浮液中的液体透过, 纤维状物质留在了膜上. 收集到的纤维在 70℃ 下用 1 升去离子蒸馏水冲洗. 当几乎所有的水都排干之后, 在 70℃ 下, 再在抽气条件下, 用 1 升 1N 的 HCl 冲洗. 当几乎所有的酸溶液都排干时, 再在抽气条件下, 70℃ 时用 1 升去离子蒸馏水冲洗. 当几乎所有的水都排干时, 在真空中, 室温下用 1 升 95% 乙醇冲洗. 将附有白色纤维膜的滤膜从过滤器中取出, 然后在 58℃ 的烘箱中烘干 20 分钟, 将烘干后的纤维膜及其支持物放在干燥器中干燥 16 小时.

按照这种方法, 从 1000 毫升硅藻培养物中可生产出 6.85 毫克 p- GlcNAc.

7. 例: 利用化学/生物纯化法纯化 p- GlcNAc

在这一部分中, p- GlcNAc 是利用上文 5.1 部分所述的两种化学

/生物技术来纯化的。简单来讲，一种情况下，p- GlcNAc 是经 HF 酸处理的，另一种情况下是经酸处理/中和法来处理的。

7. 1 材料和方法/结果

硅藻培养条件：硅藻 *Thalassiosira fluviatilis* 的培养完全按照美国专利 5, 635, 493 中所述的程序，这项专利已在此处引用作为参考。

SEM 程序：此项研究所用技术如上文所述。

纯化步骤：首先，用 HF 酸处理进行 p- GlcNAc 的纯化。特别指出，室温下，在通风橱中，每 1000ml 原始硅藻细胞培养物中加入 2.42ml 49% (29N) HF 溶液，从而配成 0.07M 的 HF 溶液。然后剧烈振荡 30 秒，使得液面上产生持久稳固的泡沫。容器静置 5-6 小时，使得较重的颗粒沉淀下去。静置后，液面上形成了一层泡沫，液体分成了两层：第一层深绿色，位于容器的底部；第二层为较浅的灰绿色雾状层，大约占液体总体积的 85-90%。在真空抽气条件下，用毛细玻璃管小心将泡沫层吸出。然后将灰色雾状上清液小心吸出，以免将含有主要细胞体的黑色底层弄乱，随后将上清液转移到另一单独的塑料容器中。将灰色雾状上清液静置 16 个小时。此液体起初是几乎无色、轻灰色，但并不透明。静置 16 小时之后，仍有少量泡沫在液体之上，少量的绿色物质沉到了容器的底部。此时的液体颜色较浅，但仍不透明。象前面那样将泡沫虹吸出。然后将剩余液体的主体部分虹吸出，剩下沉淀在容器底部的绿色物质。分离出的液体含有绝大多数的 p- GlcNAc 纤维和一些杂质。

在这一程序随后的步骤中，为了将硅藻释放出的蛋白和其他不必要的物质从含有 p- GlcNAc 纤维的液体中除去，所以用十二烷基硫酸钠 (SDS) 冲洗细胞残余物和 p- GlcNAc 纤维的悬浮液。明确指出的是，加入必需体积的 20% SDS 使得最终的 SDS 的最终浓度为 0.5%。盛此悬浮液的容器密封，将其安全的至于摇床的水平位置上，在每分钟 100 次的速度下振荡 24 小时。震荡一开始，悬浮液中就有大量的絮状物质出现，并且相当多的泡沫堆积在容器的前面部分。SDS 冲洗的最后，容器中的物质转移到配有孔径为 0.8 微米的 Supor-800 聚醚砜滤膜 (Gelman, inc) 的 Bunchner 滤器中。经过抽滤后，液体中的 p-

GlcNAc 纤维就收集到了膜上。

收集到膜上的 p- GlcNAc 纤维进行进一步的洗涤。首先, 利用 3 倍于原始悬浮液的热去离子蒸馏水 (70℃) 洗涤 p- GlcNAc 纤维。利用一喷嘴喷射去离子蒸馏水, 将收集在 Buchner 滤器的滤膜上的 p- GlcNAc 纤维簇转移到涡旋混合器中, 进行 10 次短促的涡旋混合将 p- GlcNAc 簇碎裂。将解团的纤维转移到配有上述聚酚砜滤膜的 Buchner 过滤漏斗中, 然后将液体抽滤掉。将收集到的 p- GlcNAc 纤维用 1000ml 1N 的热盐酸溶液 (70℃) 洗涤, 随后进一步用 1000ml 热去离子蒸馏水洗涤。最后, 在室温下用 1000ml 95% 的乙醇溶液洗涤, 过滤后干燥。p- GlcNAc 膜和支持他的滤膜一同 58℃ 的烘箱中烘干 20 分钟。然后将 p- GlcNAc 膜与支持他的滤膜放入干燥器中干燥 16 小时。

第二种方法, p- GlcNAc 是利用上文所述的酸处理/中和方法纯化的。需要指出的是, 直到 SDS 洗涤这一步, p- GlcNAc 纯化都是按照前面所述的步骤进行的; 在 SDS 洗涤这一步, 通过添加 2.9M 的 Tris 溶液将溶液的 pH 值中和至约 pH7.0 左右。虽然, 平均起来从每升硅藻培养物中可提取到约 60mg p- GlcNAc, 但用这种特殊方法从每升硅藻培养物中可得到 20.20 毫克 p- GlcNAc。用酸处理/中和方法得到的 p- GlcNAc 膜的显微照片如图 3 所示。

8. 例: p- GlcNAc 的脱乙酰化

将一种 p- GlcNAc 膜悬浮在 50%NaOH 水溶液中。悬浮液在 80℃ 下加热 2 小时。将形成的脱乙酰 p- GlcNAc 膜烘干, 然后在扫描电子显微镜下研究, 如图 5 所示。

9. 例: p- GlcNAc 的再形成

一种 p- GlcNAc 膜 (16.2mg) 溶解在 1ml 含有 5%LiCl 的二甲基乙酰胺溶液中。将此含 p- GlcNAc 的溶液转到注射器中, 向里面挤入 50ml 纯水来沉淀 p- GlcNAc 纤维。在电子显微镜下对这些 p- GlcNAc 纤维进行研究, 如图 6 所示。

10. 例: 本发明中的一种 EA/ p- GlcNAc 组合物的制备

Ro-0612/001 (此处也即指 "Ro-61") 是一种非特异性的、非肽

基的内皮素拮抗剂，其结构如上文式 1 所示。其盐存在形式的化学名称是 5-异丙基-吡啶-2-磺酸[6-(2-羟基-乙氧基)-5-(2-甲氧基-苯氧基)]，-2-[2-(1-氢-四唑-5-基)-吡啶-4-基]嘧啶 4-基酰胺钠盐 (1: 2)，分子量为 649.59。它在水中的溶解度大于 3%。对 ETA 受体来讲，Ro61 的结合抑制能力 (IC_{50}) 是 1-20nM；对 ETB 受体来讲，其结合抑制能力是 20-30nM；其功能性抑制能力 (PA_2)，对 ETA 来讲是 9.5，而对 ETB 来讲是 7.7。他的体内给药建议剂量是 1-30mg/kg iv 或 ip。其体外给药建议剂量是 10^{-9} - 10^{-5} M。

本发明中的组合物中用到的 Ro61 最初是瑞士 Allschwil 的 Acetelion Ltd 提供的冷冻干燥粉末。将此粉末悬浮于无菌水中，用无菌盐酸调其 pH 值至 4.0。此外，Ro61 可用本领域中已知的技术来合成。

p- GlcNAc 纤维浆通过如下方法制备：由上文例 7 所述的生物/化学法制备的 p- GlcNAc 重新悬浮在去离子蒸馏水中，搅拌至形成浓度约为 1mg/ml 的纤维悬浮液或纤维浆。此纤维浆在 60℃ 烘箱中烘干 2 小时形成 p- GlcNAc 聚合体纤维膜。此膜在 80℃ 下，此膜在 40% NaOH 溶液中脱乙酰基 2 小时。当此膜达到 100% 脱乙酰基时，用去离子蒸馏水洗涤至 pH7.0。

如美国专利 5, 623, 064 中所述，在乳酸存在下，将洗涤后的脱乙酰 p- GlcNAc 膜转化为 p- GlcNAc 乳酸盐，这项专利在此处已引用作为参考。简单来讲，将脱乙酰的 p- GlcNAc 悬浮在有机介质如 2-丙醇（含 10% 的水）中以润湿所有的脱乙酰 p- GlcNAc 物质。通过搅拌加入适量的 50% 乳酸水溶液。乳酸必须是试剂级的，并且必须进行分析以确定可利用的（如非脱酯的）乳酸的确切浓度。这一步一般是通过用 0.1N 的 NaOH 滴定至酚酞变色终点（pH7.0）来完成的。在室温下将此混合物搅拌至少 2 小时。稍微加热可加快反应的速度。可用延长反应时间或增加 50% 乳酸的量两种方法来保证反应进行完全。随后，将此悬浮液滤过配有无灰定量滤纸的 Buchner 过滤漏斗，然后将以膜形式存在的 p- GlcNAc 物质用无水 2-丙醇洗涤。在通风橱中将此膜干燥 2 小时，然后将其放入烘箱中 40℃ 过夜。

将 p- GlcNAc 乳酸盐膜溶解在去离子蒸馏水中配成所需浓度，如重量比为 2% 的 p- GlcNAc 乳酸盐溶液，然后在此溶液中加入 Ro61，

从而制备成注射用的 EA/p- GlcNAc 凝胶。调整凝胶中 Ro61 的最终浓度, 使得每只小鼠所服用的 200 μ l 凝胶样品中含有 3mg/ml 的 Ro61。将试剂级丙二醇 (2-丙烯基二醇) 随意添加到 p- GlcNAc 溶液中, 使丙二醇终浓度在 1-10% 之间。一些情况下, 可加入防腐剂以防止细菌和/或真菌的污染。按照其他方案, 如上所述可制得凝胶中 p- GlcNAc 乳酸盐浓度为 0.1---4.0%。p- GlcNAc 乳酸盐浓度增加, 这些制剂的粘度升高, 以至凝胶中可含有 0.5% 或 0.5% 以上浓度的 p- GlcNAc 乳酸盐。

11A. 例: B16 作为一种对内皮素响应的模型肿瘤

经评估确定将 B16 细胞作为对内皮素响应的模型肿瘤体系。B16 细胞, 也即来自鼠黑素瘤细胞系 (起源为纤维蛋白原细胞) 的细胞, 是取自 the American Type Culture Collection (Rockville MD) 的冷冻库存。这些细胞培养在完全培养基 (CM) 中: 添加 10% 热失活的胎儿牛血清 (Summit Biotechnologies, Ft. Collins CO) 的 RPMI 1640 (Irvine Scientific, Santa Ana CA), 青霉素 50 单位/ml, 链霉素 (50ug/ml), 2 mM 谷氨酸盐, 0.1 mM MEM 非基本氨基酸 (Gibco BRL, Gaithersburg MD), 1 mM 丙酮酸钠和 0.05 mM 2-巯基乙醇 (Sigma Immunochemicals, St. Louis MO)。这些细胞在加湿的 2% CO₂ 培养器中 37 $^{\circ}$ C 下培养, 每两天调整其细胞浓度为 1×10^5 个细胞/ml。

对 B16 细胞进行的内皮素水平和内皮素受体 (ETR) 表达分析步骤如下: 利用放射形配基和对 ET1 特异的抗体进行竞争性的放射性免疫测定 (RPA 545, Amersham, Milford Ma), 以此来测定 B16 培养上清液中的 ET1 水平。在经磁分离之后, 结合态的和自由态的 ET 与第二抗体相体系反应。通过计算结合态配基/对照 (B/Bo) 的百分比来确定一标准曲线。基于血浆峰型标准 (4-20 fmol/ml) 可知这一提取程序的回收率是 $75 \pm 5\%$ 。ET 放射性免疫测定的测试间偏差是 10%, 测试内偏差是 9%。

应用这种方法, 在一次实验中, 培养 24 小时的 B16 培养上清液中 ET1 基线水平是 1.269 fmol/ml。相对于对照组, 向培养基中分别添加 10 μ M 的 ETA 激动剂、ETB 激动剂或两者均添加, 则 B16 细胞分别增殖生长 137%、117% 和 164%, 相应的 ET1 水平分别是 34.01、1.158

和 34.01 fmol/ml. 随后的实验中, 培养 24 小时的 B16 培养上清液中 ET1 基线水平是 597 ± 58 fmol/ml, 分别添加 $10 \mu\text{m}$ 非选择性的激动剂 (ET1)、选择性 ETB 受体激动剂 (BQ3020)、或两者都添加, 则 B16 细胞分别增殖生长 154%、116% 和 141% (见下文表 1)。这些数据表明鼠 B16 黑素瘤细胞表达能对特定内皮素拮抗剂的激动剂作出响应的 ETR。

表 1

	配体 (受体)	相对于未处理 对照组的增殖 百分数
激动剂	ET1 (ETA>ETB)	154 (± 20.9)
	BQ 3020 (ETB)	116 (± 0.8)
	ET1 + BQ 3020	141 (± 4.1)

此外, 通过免疫荧光染色法确定了 B16 细胞表达内皮素受体, 这种染色法是通过利用 Pharmingen 的带有抗细胞质内皮素受体抗体的细胞内流氏细胞计数试剂盒来完成的, 也即直接与受体的细胞质区 (Research Diagnostics Inc., Flanders.NJ) 和绵羊抗鼠 IgG 同型抗体对照组 (Sigma Immunchemicals, St.Louis MO) 反应。按照这一方法, 在 Pharmingen 试剂盒中的 Cytotfix/Cytoperm 缓冲液中冲洗 B16 细胞, 并且在透性溶液 (含 0.1% Triton X 100 的 0.1% 柠檬酸钠溶液) 中培养 20 分钟。然后 B16 细胞与主要的抗内皮素受体或同型对照组的抗体 4℃ 下在暗中共培养 30 分钟, 冲洗, 再与第二种 FITC 标记的抗体 (鼠抗绵羊 IgG) 共培养 30 分钟。利用装配有 100 瓦汞灯和 40x plan-neufluar na1.3 物镜的 Axioplan 研究用显微镜 (Carl Zeiss Inc. Jena Germany) 进行观察和拍照。

免疫荧光染色实验表明 B16 黑素瘤细胞表达了可检测水平的 ETA 和 ETB 受体。

利用 ET-1¹²⁵ 进行的结合检验也表明 B16 细胞表达了 ET 受体。这些检验按如下步骤进行: 大动脉血管平滑肌细胞命名为 A10 细胞, B16 和 CHO 细胞分别以 2×10^6 个细胞/ml 的浓度各自悬浮在装有结合缓

冲液(50 mM Tris/HCl - pH =7.4, 5 mM EDTA, and 0.5% BSA)的管中。A10 用做 ETA 的正对照组, 而 CHO 用做负对照组, CHO 细胞不结合任何标记的 ET1, 这与这种细胞系中不含 ETR 这一情况一致。

将 21 μ l(3-^[125I]碘化酪氨酸)内皮素-1(ET1-I, 由 Amersham Life Science Inc, Arlington Heights, IL 提供)三等分, 分别加入每一支试管中, 使其最终浓度为 10^{-12} M。然后将标记后的细胞等分到微量离心管中, 并且每管分别加入 18 μ l 未标记的 ET1(终浓度为 10^{-8} M)或 HBSS。将这些微量离心管中的溶液混合, 然后每一样品等分为 300 μ l 的等份, 将其置于石英管中, 37 $^{\circ}$ C 下振荡 2.5 小时。共培养后, 离心管在 10, 000rpm 下离心 6 分钟, 通过涡旋混合将细胞沉淀重新混合在 300 μ l 结合缓冲液中, 并且用结合缓冲液冲洗两次。冲洗后, 细胞重新悬浮在 500 μ l 1N NaOH 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡 10 分钟, 并且将其置于闪烁管中, 然后在 Packard Cobra Auto-gamma 5000 Series (Model 5002) γ -计数体系 (Packard Instrument Co., Meridea, CT) 中计数。

这些 ET1 粘合检验结果表明 B16 细胞表达 ETR, 如下表 2 所示:

表 2
ET1 与 B16 肿瘤细胞的结合

	A10	B16	CHO
ET1 结合*	53885 ($\pm$ 2555)	25605 ($\pm$ 3801)	119 ($\pm$ 91)
在竞争物存在下的 ET1 的结合**	1135 ($\pm$ 120)	1398 ($\pm$ 691)	346 ($\pm$ 259)

结果以平均 cpm 每 10^6 个细胞 ($\pm$ SEM) 表示。

* 加入的 ET1-I¹²⁵ 浓度为 10^{-12} M

** 竞争物是未标记的 ET1, 浓度为 10^{-6} M

11B. 例: Ro61 在体内对黑素瘤细胞增殖的抑制

正常的脾细胞不能显示出如上述免疫荧光所检测到的可见水平的 ETR。鉴于脾细胞培养和分离简便, 因此将他们用做对照来评估 Ro61 对细胞增殖的作用效果。脾细胞取自 6-8 周的雌性 C57BL/6

(H-2b) 鼠(Jackson Laboratories, Bar Harbor MA), 方法如下: 取出脾脏, 置于 CM 中, 用 3 cc 的注射器活塞使其细胞分散. 细胞悬浮液滤过 $70\mu\text{m}$ 的过滤器, 将红血球用氯化铵裂解液(混合 9 份 8.3g/l 的氯化铵、1 份 20.59g/l 的 Tris, 使用前 pH 7.65) 裂解. 然后冲洗这些脾细胞, 重新悬浮在 CM 中.

如上所述, Ro61 冷冻粉末是购自 Acetelion Ltd, Allschwil, Switzerland, 应用增殖检验来评估 Ro61 在体内对 B16 细胞增殖的作用效果. 较明确的讲, HBSS 中的 Ro61 以逐渐增加的浓度加入 96 孔的培养盘中. 然后将 B16 细胞和上述的对照脾细胞加入到每一孔中, 使其浓度为 10^5 个细胞/孔, 培养 72 小时. 应用非放射性细胞增殖测量中使用的 CellTiter 96 试剂盒(Promega, Madison WI)来检测细胞的增殖, 方法如下: 简单的讲, 细胞与 15ml MTT 染料(来自 Promega kit)共培养 4 小时就有可见的甲臆晶体形成. 室温下, 晶体在 50ml 溶解/停止液(来自 Promega kit)中溶解 30 分钟, 570nm 波长下测量其 OD 值. 630nm 下的背景 OD 值自动扣除. 确定三个孔的平均值. 同时也用 40 倍分辨率的光学显微镜记录细胞的增殖与死亡.

Ro61 对 B16 黑素瘤细胞的抑制作用如图 7 所示. Ro61 处理过的细胞的增殖是以未处理的对照细胞的百分数来表示的. 确定三孔的平均值. 从图 7 中可以看出, Ro61 抑制 B16 细胞(闭合环)的增殖, 但并不影响正常脾细胞(开环)的生长. 此外, 当 Ro61 以逐渐增加的浓度添加到培养的细胞中时, 就可以观察到剂量依赖型的抑制现象. 在浓度为 $0.1\mu\text{M}$ (相对于对照有 22% 被抑制), 最高 $10\mu\text{M}$ 时, 可以观察到这种现象. 显微镜下, Ro61 浓度最高时, B16 细胞不再是正常的、象纤维原细胞一样的纺锤状的, 而是圆形的, 并且稀少的很难看见(见图 17A-17B). 与此相反, 即使在 Ro61 的最大添加浓度 ($10\mu\text{M}$) 下, 脾细胞只是受到很小的影响.

我们还发现, 在剂量依赖的方式下 ($p < 0.001$), B16 细胞培养上清液中的内皮素水平增加(从在 50nm Ro61 下的 $513 \pm 27 \text{ fmol/l}$ 到在 $5\mu\text{M}$ Ro61 下的 $954 \pm 31 \text{ fmol}$). 这与 Ro61 阻断 ETR, 导致受体介导的反馈环中断相一致.

既然 Ro61 这种 ET 抑制剂能抑制 B16 细胞的增殖, 因此, 确定一

下添加特异于 ETA 或 ETB 的、以肽为基础的激动剂, 是否会逆转这种效果, 也即他们是否与 Ro61 竞争受体结合位点, 是有意义的。将激动剂 BQ-3020- [Ac-[Ala^{11,15}]-内皮素 (6,21), 也即 BQ3020 (Novabiochem, catalog no. A1 4534) 和激动剂 [Ala^{1, 3, 11, 15}] 内皮素 (Sigma Immunochemicals, St. Louis MO, catalog no.: E6877) 悬浮在 HBSS 中待用。在添加任一单独激动剂、两种激动剂、不加任何激动剂四种情况下, 5×10^4 个 B16 细胞共培养, 随后加入不同浓度的 Ro61。

如图 10 所示, 添加 ET 受体激动剂防止了 Ro61 对 B16 细胞抑制作用的发生。Ro61 处理过的细胞的增殖是以未处理的对照组的百分数来表示的。确定三孔的平均值。首先, 如图 10 (Ro61 浓度为 0) 中 Y 轴所指, 添加 BQ3020 激动剂 (闭合三角)、添加 ET-1 激动剂 (开放菱形)、添加两种激动剂 (开放箱形) 的孔中诱导产生了 B16 细胞增殖。相对于对照对 BQ3020 激动剂的增殖是 137%, ET-1 是 117%, 二者结合是 164%。

图 10 进一步揭示, 添加这些激动剂也抵消了浓度逐渐增加的 Ro61 产生的抑制作用。例如, 添加浓度为 10nm 的 ET1 就完全逆转了 1nm Ro61 产生的抑制作用, 在 Ro61 浓度为 $5 \mu\text{m}$ 时可降低 50% 的抑制作用。BQ3020 激动剂可以显著的逆转 $5 \mu\text{m}$ Ro61 产生的抑制作用 ($5 \mu\text{m}$ 下只有 12% 的增殖作用受抑制)。观察到的现象中, 最显著的是添加两种激动剂产生的逆转作用, 他们甚至能逆转添加 $0.1 \mu\text{m}$ Ro61 引导的增殖作用 (相对于对照增殖 123%) 这些剂量依赖的结果定义了一种可被 ETR 拮抗剂抑制的小鼠 B16 细胞的内皮素受体介导的增殖应答。

在其他实验中, 利用上文所述的细胞增殖检测方法, 检测 Ro61 分别与 ETA 拮抗剂 BQ123、ETB 拮抗剂 BQ788 (二者都由 the American Peptide Co., Sunnyvale, CA 提供) 共存时对 B16 细胞增殖的抑制作用, 此处 Ro61 对 ETB 的亲合力大约高出对 ETA 亲和力的十倍。BQ123、BQ788、BQ123+BQ788, 或 RO61-0612/001 (每种浓度都是 $10 \mu\text{m}$) 的培养显著抑制了 B16 细胞的增殖 (相对于对照分别为 16, 18, 19, 和 50%; $p=0.001$, 见下表 3)。

表 3

	配体 (受体)	相对于未处理 对照组的增殖 百分数
拮抗剂	BQ 123 (ETA)	84 ($\pm$ 6.6)
	BQ 788 (ETB)	82 ($\pm$ 1.9)
	BQ123 + BQ 788	81 ($\pm$ 4.5)
	Ro 61 (ETA>ETB)	50 ($\pm$ 4.8)

在上文所述的其他增殖检测中,检测了多种内皮素拮抗剂,以确定他们对 B16 细胞增殖的抑制作用。将与表达截短的 ETA mRNA、进而产生出不完整的 ETA 受体的 B16 对照细胞——称为 F0 与, B16 细胞在动物体内传代 16 代的表达了一种野生型的、全长的 ETR 相比较。已如图 8 和 9 中所示,相对于 F0 对照组和内皮素拮抗剂对照组 ET1 和 BQ3020,浓度为 10^{-6} M 的内皮素拮抗剂 IRL、BQ123、BQ610、BQ485、BQ788、RES 全都抑制 B16 细胞的增殖。

12. 例: Ro61 诱导 B16 黑素瘤肿瘤的程序性死亡

体内研究表明 Ro61 治疗不仅有助于抑制细胞增殖,并且他含有显著影响细胞死亡和坏疽的组分。实际上, Ro61 处理过的 B16 细胞形态改变与细胞程序性死亡相一致(见图 11)。

因此,研究了 Ro61 对 B16 细胞程序性死亡的作用。在含有或不含 $1\mu\text{M}$ Ro61 的情况下,将 B16 细胞放入 25ml 的培养烧瓶中令其生长, 37°C 下,在 5% CO_2 培养器中培养 72 小时。利用 Situ Cell Death Detection Kit(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)中的荧光素来检测程序性死亡或细胞死亡,具体如下:简单的讲,用胰蛋白酶作用细胞,然后用含有 1%牛血清白蛋白的 PBS 冲洗。用含 4%多聚甲醛的 PBS 固定 30 分钟后,在冰上用含 0.1%TRITON X100 的 0.1%柠檬酸钠溶液透化处理细胞 2 分钟。然后冲洗细胞并且在 37°C 下,用 TUNEL 反应混合物(Boehringer 试剂盒)标记 1 小时,冲洗。应用 Coulter EPICS XL 流动血细胞计数器(Coulter, Miami FL)分析

荧光。相对于正对照进行测定，这一正对照是在室温下利用 100ug/ml 的 DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 诱导双链 DNA 断裂 10 分钟。

如图 12 所示，内皮素拮抗剂 Ro61 诱导培养的 B16 黑素瘤细胞程序性死亡。例如，与对照组 ($p=0.0007$) 相比，向 B16 细胞中添加 1 μ M Ro61 可显著增加程序性死亡的细胞的百分数。在生长的第 24 小时，甚至到第 72 小时，利用上述的 TUNEL 检测方法仍能检测到程序性死亡的细胞增加的百分值。B16 细胞与 Ro61 共培养后，作用时间对其影响不大；然而，相对于未处理的对照组，Ro61 处理的细胞程序性死亡增加非常显著 (12.7%，95%置信区间：11.7%-13.8%)。这些结果表明 ETR 拮抗剂能诱导通过 ETR 介导的程序性死亡细胞信号出现。因此，程序性死亡至少部分有助于抑制观察到的细胞的裂解和死亡。

13. 例：利用本发明中的一种 EA/p-GlcNAc 或一种内皮素拮抗剂体内抑制腹膜内癌扩散

Ro61 在体内对 B16 细胞有惊人的效果，这导致了进一步的研究，来评价 ETR 拮抗作用对体内肿瘤生长的影响，这种评价利用一种侵略性的腹膜 (IP) B16 黑素瘤细胞转移/癌扩散模型来。按照这一模型，向雌性 C57BL/6 鼠腹膜内注射含有 100 μ l 含 5×10^4 个 B16 细胞的 HBSS。一天后，给他们注入 100 μ l 单独的 HBSS (未处理)、含 3mg/kg Ro61 的 HBSS (每日给药)、含 30mg/kg Ro61 的 HBSS (每日给药)、单独的 p-GlcNAc 凝胶 (2%)、或含 18mg/kg Ro61 的 p-GlcNAc (2%)。

用含有仅只 3mg/kg Ro61 或 30mg/kg Ro61 的 HBSS 处理的动物组每天都接受 IP 注射，而其他的所有动物组只接受一次注射。本实验中所用的凝胶是利用上文例 10 所示的方法制备的，仅仅减去添加 Ro61 一步。本实验中所用的 Ro61/ p-GlcNAc 也是用上文例 10 中详述的方法制备的。七天后将鼠杀死，评估腹膜内存在的疾病。更具体的讲，在解剖显微镜下计算每个动物腹膜表面、肠系膜、肝、脾、胰腺的肿瘤集落。对腹膜和消化器官进行拍照，并且通过 H 和 E 及黑色素染色进行肠系膜、肝、脾、胰腺脂肪及腹膜部分的组织学分析。

图 13A 表明，接受每日给药以低浓度的 Ro61，如给药 6 天，每

天 3mg/kg(总共 18mg/kg)的老鼠没有表现出显著降低肿瘤转移数或每只动物的肿瘤集落。(此处所用的名词转移指按照上述的癌扩散模型,在体内注入 B16 黑素瘤细胞的老鼠腹膜和消化器官检测到的肿瘤集落)。

与此相反,每天注入 30mg/kg 高剂量的 Ro61,连续注射 6 天(总共剂量为 180mg/kg)的鼠中,7 天后平均肿瘤群显著降低。

此外,如图 13B 所示,相对于进行了 IP 注射、但未进行任何处理的对照组,仅只 p-GlcNAc 凝胶就能减少肿瘤集落的平均数目,但当进行皮下注射(SC)时对肿瘤生长没有显著影响。图 13 也表明,仅仅给药以一剂(18mg/kg)含有 p-GlcNAc 凝胶的 Ro61 导致了肿瘤集落数目的最大减少(群体平均数 $=2.7 \pm 1.4$)。相对于高剂量 Ro61 ($p=0.001$)和仅只 p-GlcNAc 凝胶 IP ($p=0.02$), p-GlcNAc/ Ro61 组合物显著降低了肿瘤群的数目。低剂量 Ro61 处理组及仅只 p-GlcNAc SC 组与未处理的对照组没有明显区别。

为了确定 Ro61 是否不仅具有由 p-GlcNAc 产生的局部治疗作用,而且具有系统的治疗作用,我们调查了皮下注射(SC) IP Ro61 处理对 B16 黑素瘤模型的作用效果。雌性的 CS57BL/6 鼠,在肺膜皮下注射含在 100 μ l HBSS 中的 5×10^4 个黑素瘤细胞 24 小时后,向这些动物进行如下的处理(100 μ l, IP): HBSS(每天 X 6 天),含在 HBSS 中的 30mg/kg Ro61, p-GlcNAc 凝胶(一次给药),或含在 p-GlcNAc 凝胶中的 18mg/kg Ro61(一次给药)。注射后(所有组中的 $n=10$),对动物组中的肿瘤出现和生长进行为期三周的监控。

如图 14 所示, B16 黑素瘤的 SC 模型表明,所有接受 HBSS 中的 IP Ro61 处理的动物在 17 天时全部产生了肿瘤,然而此处肿瘤出现却有一明显的延迟(相对于未处理的对照组中 15 天时 100%的荷瘤,接受含在 HBSS 中的 IP Ro61 处理的动物只有 50%荷瘤)。Ro61 与 p-GlcNAc 结合处理延缓了肿瘤的出现(13 天时只有 50%产生肿瘤),其效果与有 10%不含肿瘤的动物推迟 21 天进行肿瘤注射的结果一样,这表明在肿瘤外的区室持续释放 Ro61 能显著影响 B16 黑素瘤细胞的生长。未处理的对照组和 IP p-GlcNAc 组间在肿瘤出现及其生长上没有区别。

利用上述的癌转移模型,对其他多种内皮素拮抗剂对肿瘤群形成

的影响作了评估。在这些实验中，给动物注射了一剂 100 μ l 的样品，每种样品中含有 14.3mg/ml 的药物和药物混合物。如图 15 所示，与未处理的对照组 B16 细胞相比，与 Ro61 相同浓度的 BQ123(ETA 拮抗剂)和 BQ788(ETB 拮抗剂)混合物将肿瘤集落显著的降低到一种与 Ro61 所示的降低程度相似的程度。进一步，如上文所述将 BQ 混合物与 p-GlcNAc 结合使用，则肿瘤集落会进一步降低，直至与用 Ro61 和 p-GlcNAc 结合处理几乎相等的程度。最后，与 Ro61/p-GlcNAc 相比，商业购买的五肽 GRGDS(American Peptide Co.)与 p-GlcNAc 结合使用时表现出了在肿瘤群数上的更大降低(见图 15 中的最后一柱形)，而这种五肽 GRGDS 是混合的 ETA/ETB 拮抗剂。

14. 例：利用本发明中的一种内皮素拮抗剂或 EA/ p-GlcNAc 组合物处理的，

B16 黑素瘤攻击后的 C57BL/6 鼠的长期存活

我们还进行了体内长期存活实验，以此来评估内皮素的拮抗治疗。结果如图 16 所示。向雌性 C57BL/6 鼠腹膜注射含在 100 μ l HBSS 中的 5×10^4 个 B16 细胞。实验鼠随机分为 4 组来接受下列的一种处理：
(a) 未进行任何处理(闭合箱状)；(b) 仅仅 100 μ l p-GlcNAc 凝胶(十字)；(c) 每天 100 μ l 含有 3mg/ml Ro61 的 HBSS(闭合三角形)；或(d) 100 μ l 含有 3mg/ml Ro61 的 p-GlcNAc 凝胶(开放箱状)。每天对实验动物进行监控，并且出于人道原因将垂死的动物杀死。

有必要指出的是 B16 黑素瘤是一种极端的恶性肿瘤，注射 19-20 天后实验动物的存活率为 0%。如图 10 中所示，仅仅注射 p-GlcNAc 将实验鼠的死亡延迟了 5 天的时间，但没有提高实验动物的存活率。然而，将 p-GlcNAc 和 Ro61 在低剂量下结合使用(3mg/ml)也延迟了死亡，并且在注射 33 天后 33% 的实验动物没有肿瘤出现的迹象。每天仅仅注射同样低剂量的 Ro61 不影响实验鼠的存活。

15. 结果讨论

此处进行的研究直接证明，不管是在体内还是体外，抑制内皮素与其受体的结合能影响鼠黑素瘤细胞系的正常增殖。例如，内皮素拮

抗剂 Ro61 是 ETA 和 ETB 受体的抑制剂, 它与 ETA 的亲合力大约高出与 ETB 的 10 倍. 这与我们的实验中 Ro61 对黑素瘤细胞增殖的剂量依赖性抑制有很大的关系, 添加与 ETB 激动剂相反的 ETA 激动剂所产生的较强抵消作用也与此有较大联系. 此外, 此处列出了其他多种可以抑制黑素瘤细胞增殖的内皮素拮抗剂, 包括对 ETA 和 ETB 特异的拮抗剂如 BQ123, BQ485, BQ610, BQ788, RES 和 IRL.

较为引人注意的是已证明黑素瘤细胞能表达高水平的 ET 受体, 并且较正常脾细胞易受内皮素拮抗剂的抑制, 而正常脾细胞含有很低的膜 ET 受体. 因此, 此处的证据表明内皮素拮抗剂如 Ro61, BQ123, BQ485, BQ610, BQ788, RES 和 IRL 对培养的肿瘤细胞具有抗增殖作用, 他们对肿瘤细胞生长的抑制作用是通过与内皮素受体的结合来调节的, 而这些内皮素受体可对特异于 ETA 和/或 ETB 的肽激动剂作出响应.

此外, 我们的研究表明, 仅仅内皮素拮抗剂或内皮素拮抗剂与此处所述的 p-GlcNAc 结合使用就显著降低了体内的癌转移. 而且, 本发明中的 EA/ p-GlcNAc 组合物, 例如 Ro61 /p-GlcNAc 戏剧性的增加了体内荷有肿瘤细胞的实验动物的存活率. Ro61 的作用包括一种程序性死亡作用机制, 这与已知的内皮素作用机制和他们的信号转导机制并不矛盾.

Ro61 的药物动力学研究表明他在体内代谢相对较快, 如在 2-4 小时内; 然而, 当 Ro61 与本发明中的 p-GlcNAc 聚合体结合后, Ro61 就保持在凝胶中缓慢释放, 并且能够被探测到, 例如在至少 48 小时的时候. 进而, 如果凝胶中内皮素拮抗剂的浓度增加, 拮抗剂保留在凝胶中可达 72 小时 (数据未给出). 因而, 通过改变内皮素拮抗剂在本发明中 p-GlcNAc 凝胶中的浓度就可以得到所需的缓慢释放, 从而提高治疗增殖性疾病的作用效果.

最后, 如下表 4 所示, 其他能表达 ETA 受体的细胞也与此处所述的内皮素拮抗剂 Ro61 作用, 也即当暴露于内皮素拮抗剂时表现出细胞增殖受抑制的现象.

在不同的细胞类型中, 当如 ETA 受体存在时, 这些数据与内皮素拮抗剂对细胞增殖的作用效果相联系. 例如, 这些结果表明如果一种肿瘤, 如胰腺、乳腺、前列腺肿瘤, 能表达 ETA 受体, 就可以用此处

所公开的对 ETA 敏感的内皮素拮抗剂来治疗。

表 4

		ETA	Ro61 effect
负对照	CHO	NO	NO (5/5)
黑素细胞 黑素瘤	melanocyte	YES	YES (2/2)
	B16 F10	YES	YES (5/5)
	MEL 501	NO	NO
	MEL 888	YES	YES (2/3)
胰腺癌	ASPC 1	YES	YES (5/5)
	ASPC4	NO	NO (5/5)
	CAPAN 1.	NO	NO (4/5)
	PANC 1	YES	YES (4/5)
	BXPC3	YES	YES (3/4)
乳腺癌	MDA 231	NO	NO (3/3)
	MDA 453	YES	YES (3/3)
前列腺癌	DUI 45	NO	NO (5/5)
	LN CAP	NO	NO (5/5)

此处所示的明确的实施方案是用来说明本发明的个别方面，但本发明并不局限于这些范围，功能性的等价方法也包括在本发明之中。事实上，在此处所描述和表明的之外，利用前面的描述和伴随的图表，本发明中的种种变化对于本领域中的技术人员来讲是再明显不过了。这些变化将会包括在附加的权利要求中。

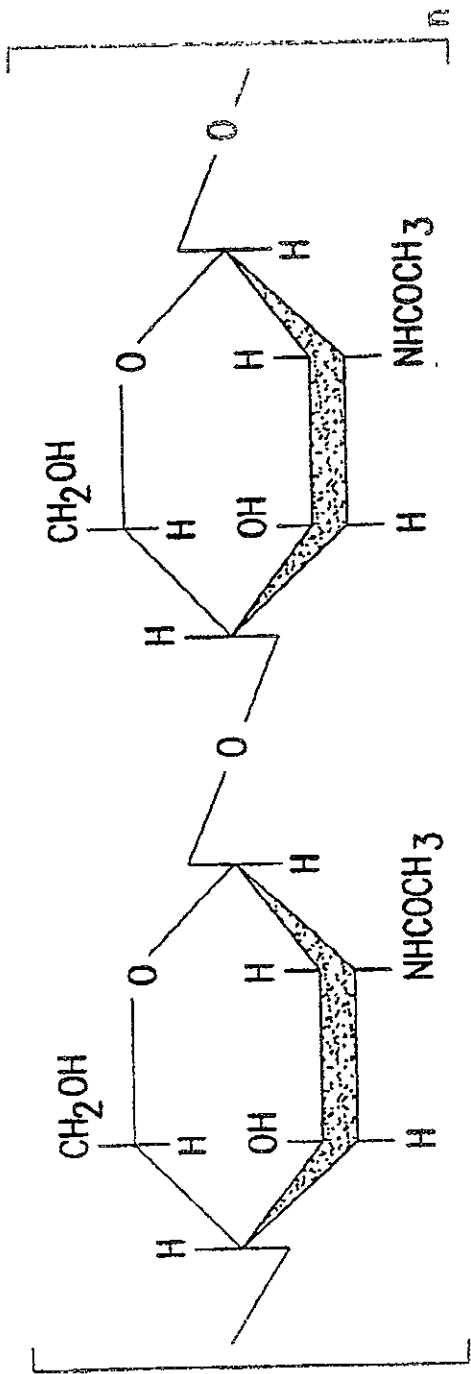


图 1

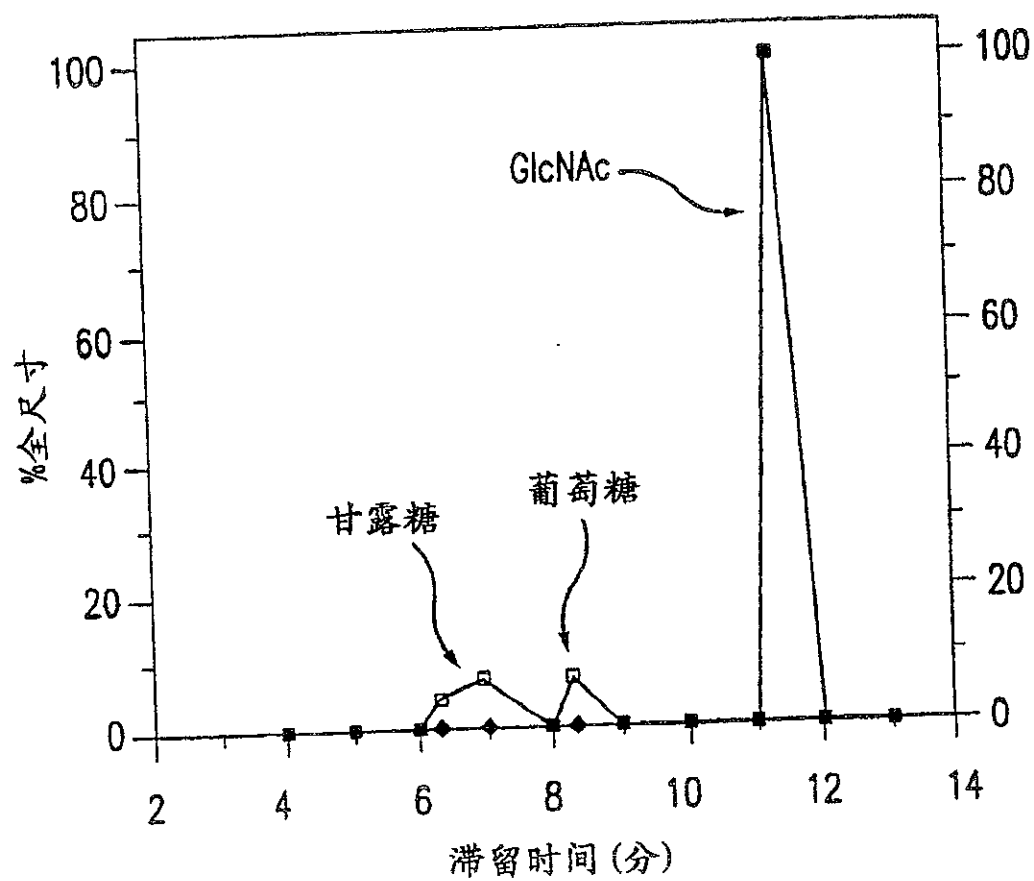


图 2



图 3



图 5A

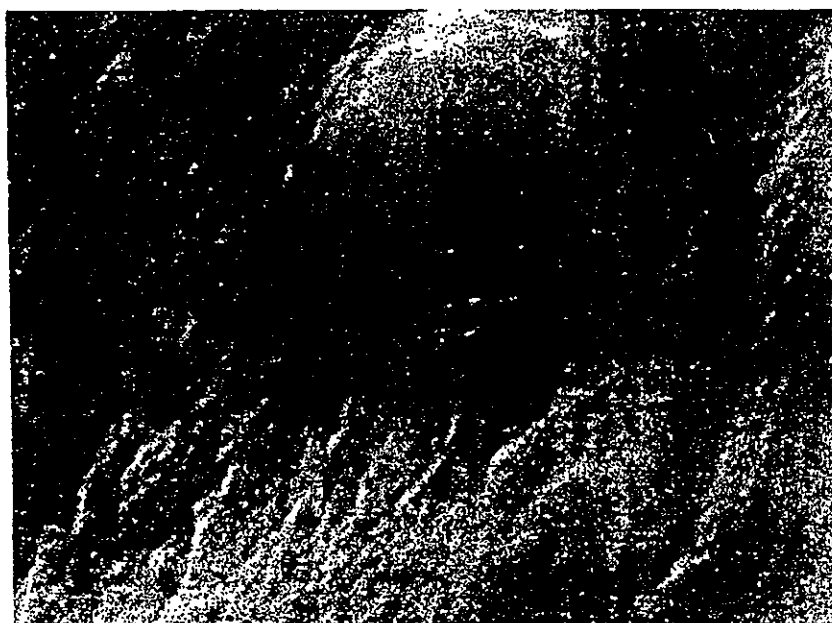


图 5B

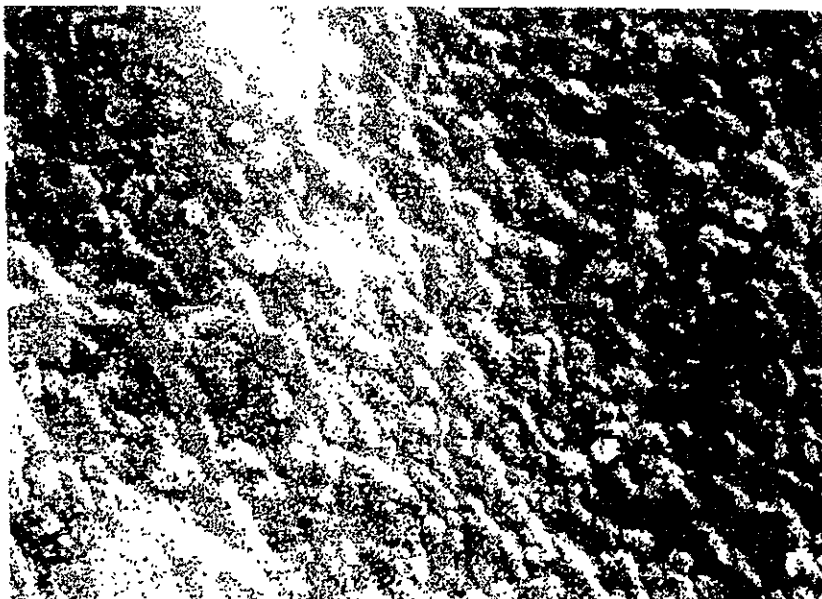


图 6A

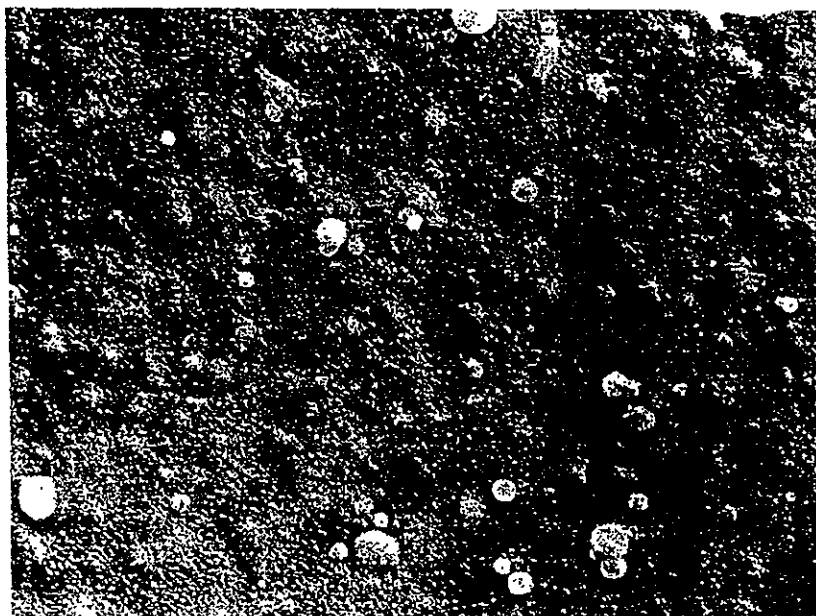


图 6B

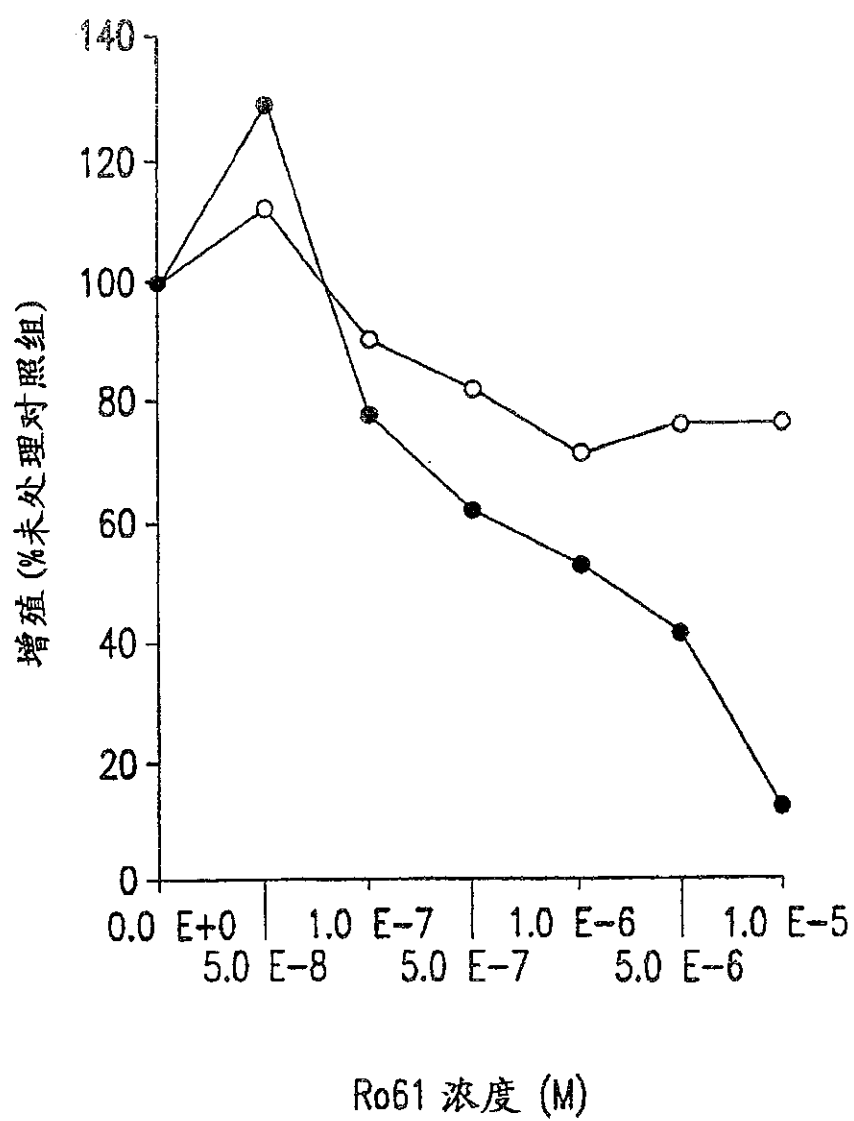


图 7

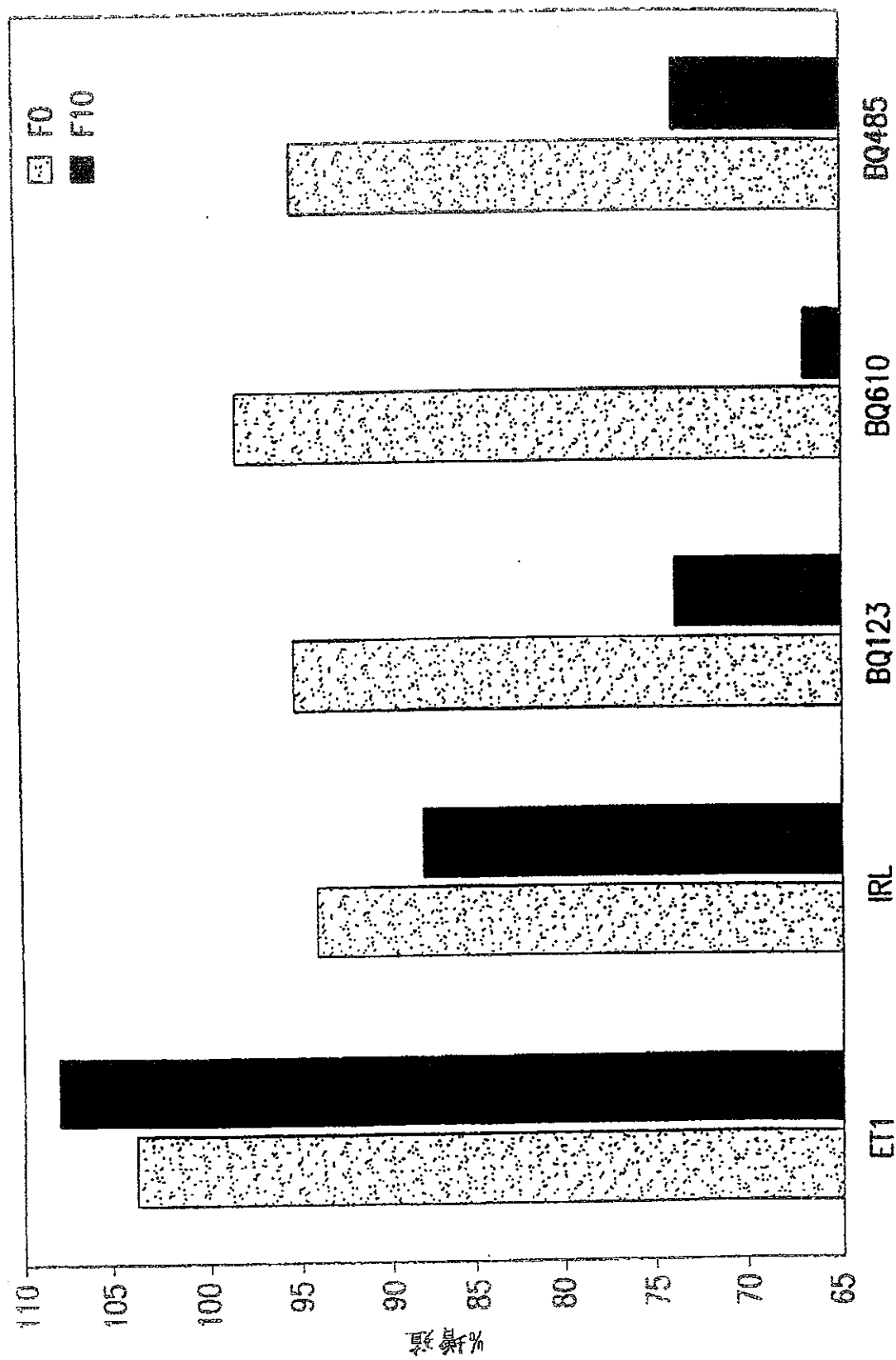


图 8

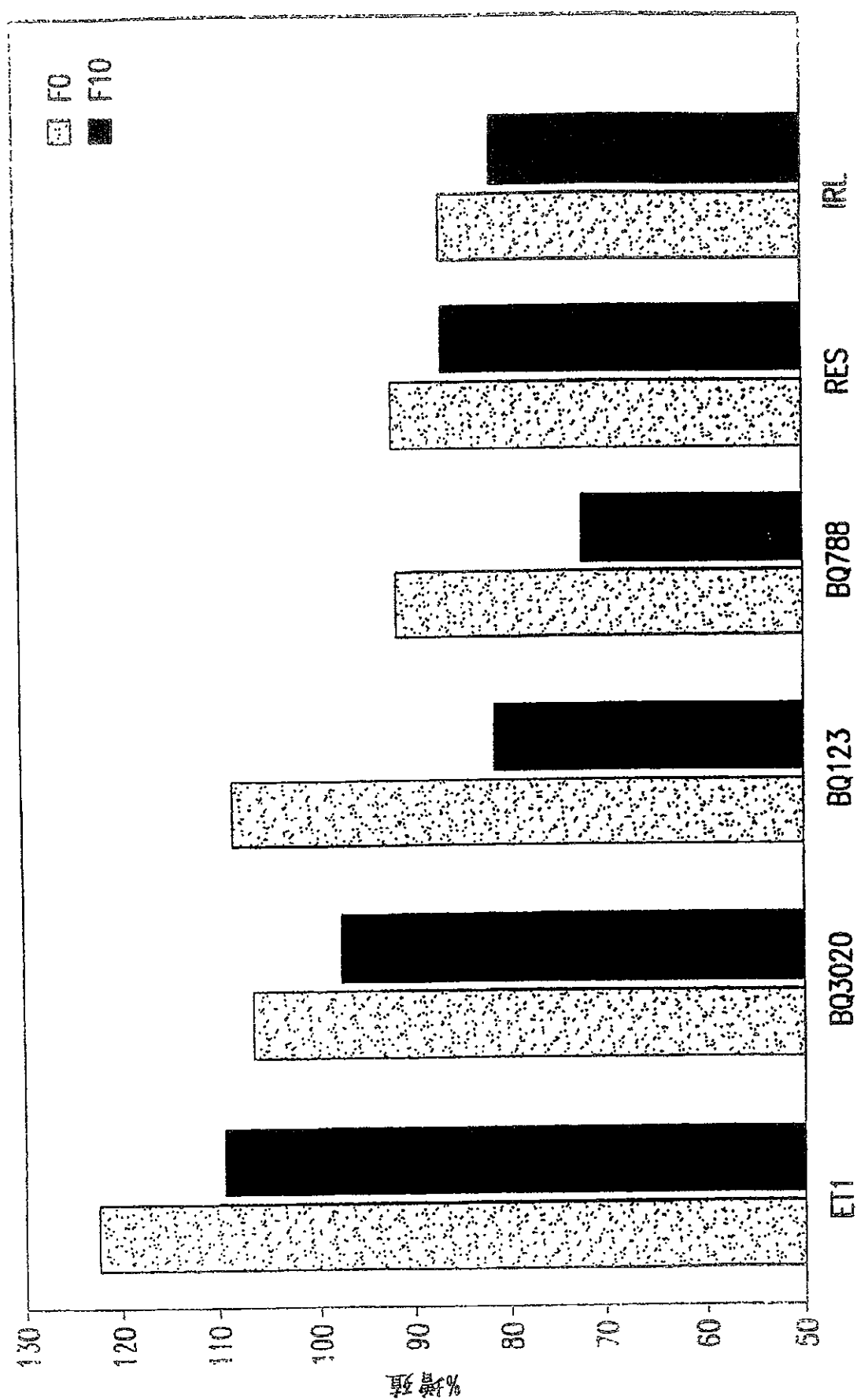


图 9

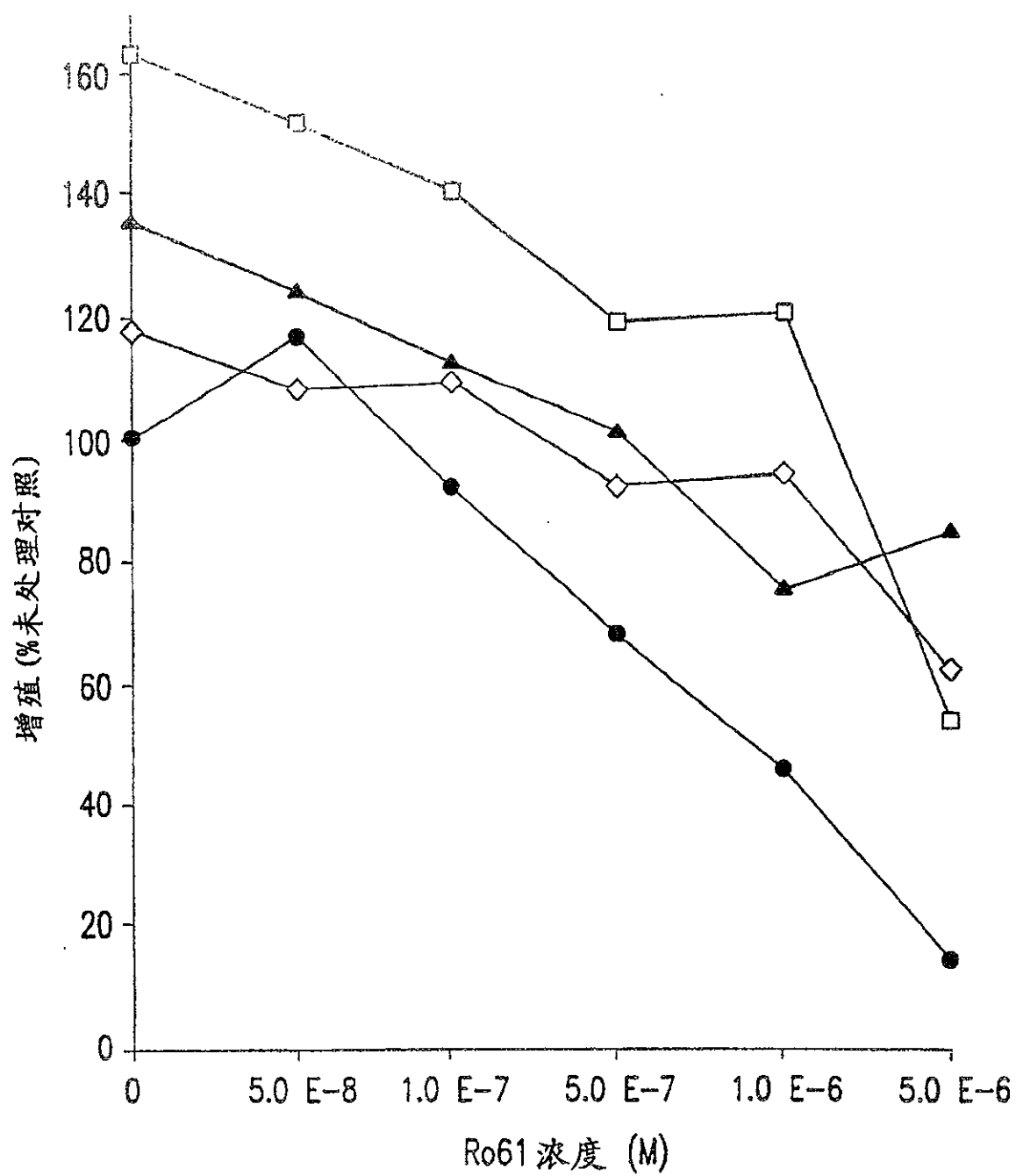


图 10

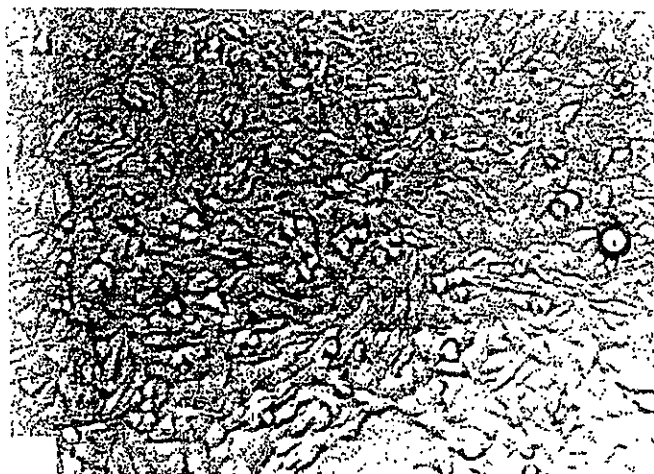


图 11A

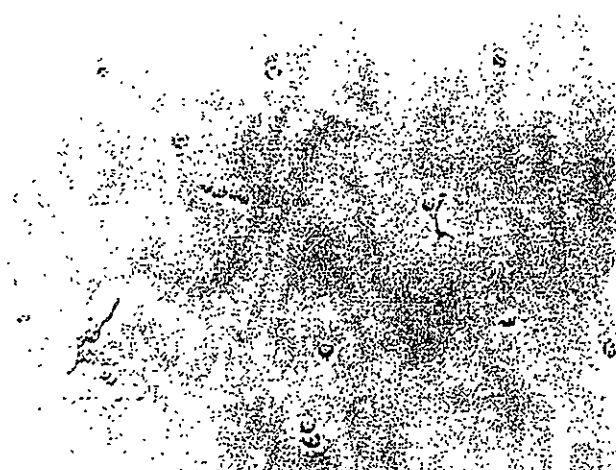
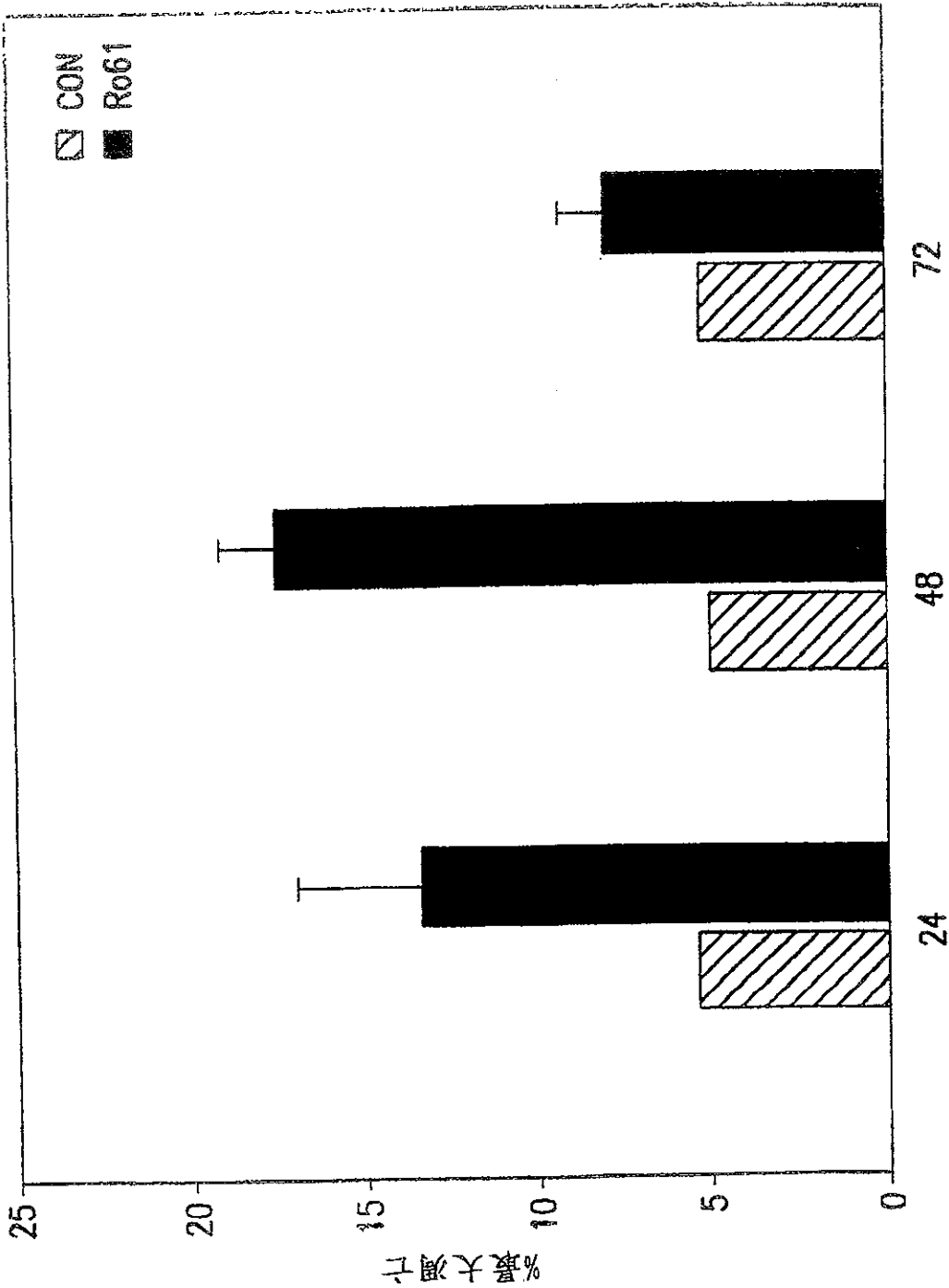


图 11B



培养小时数
图 12

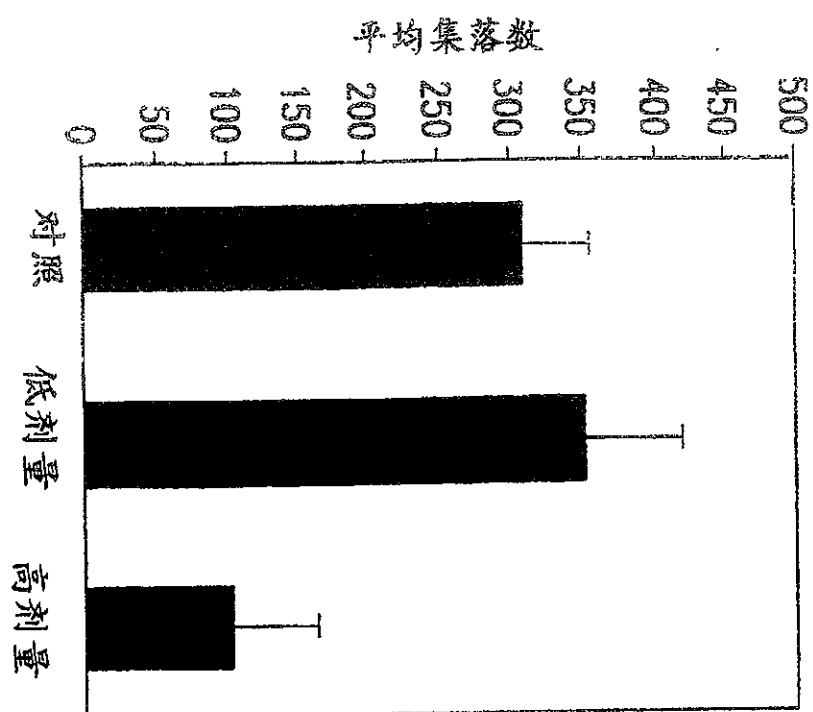


图 13A

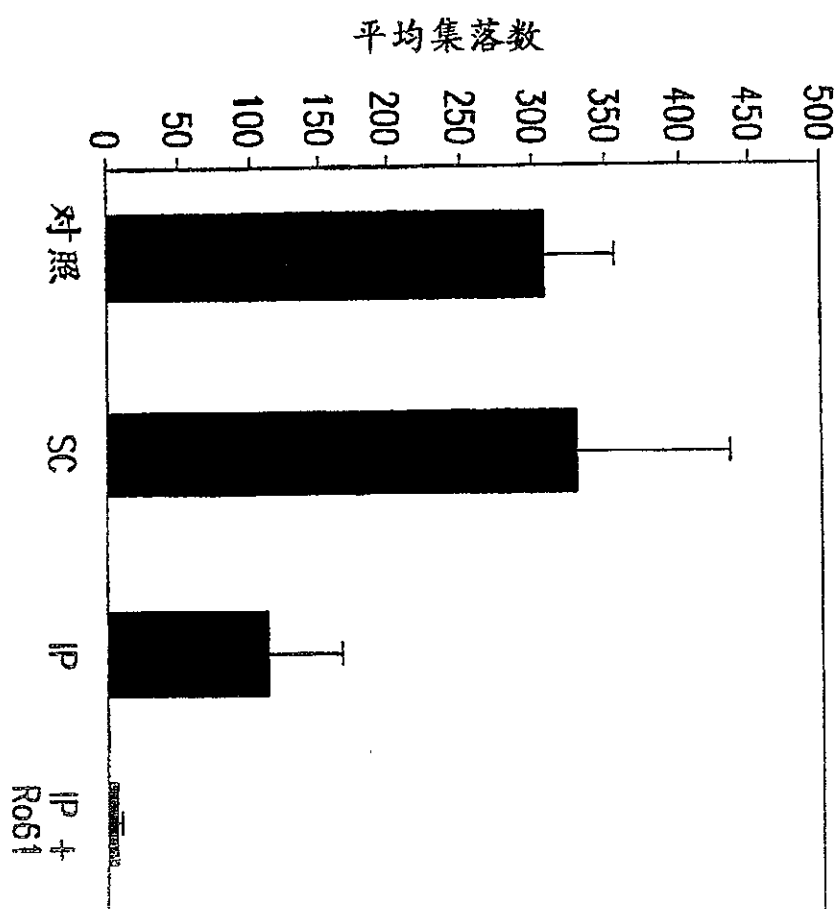


图 13B

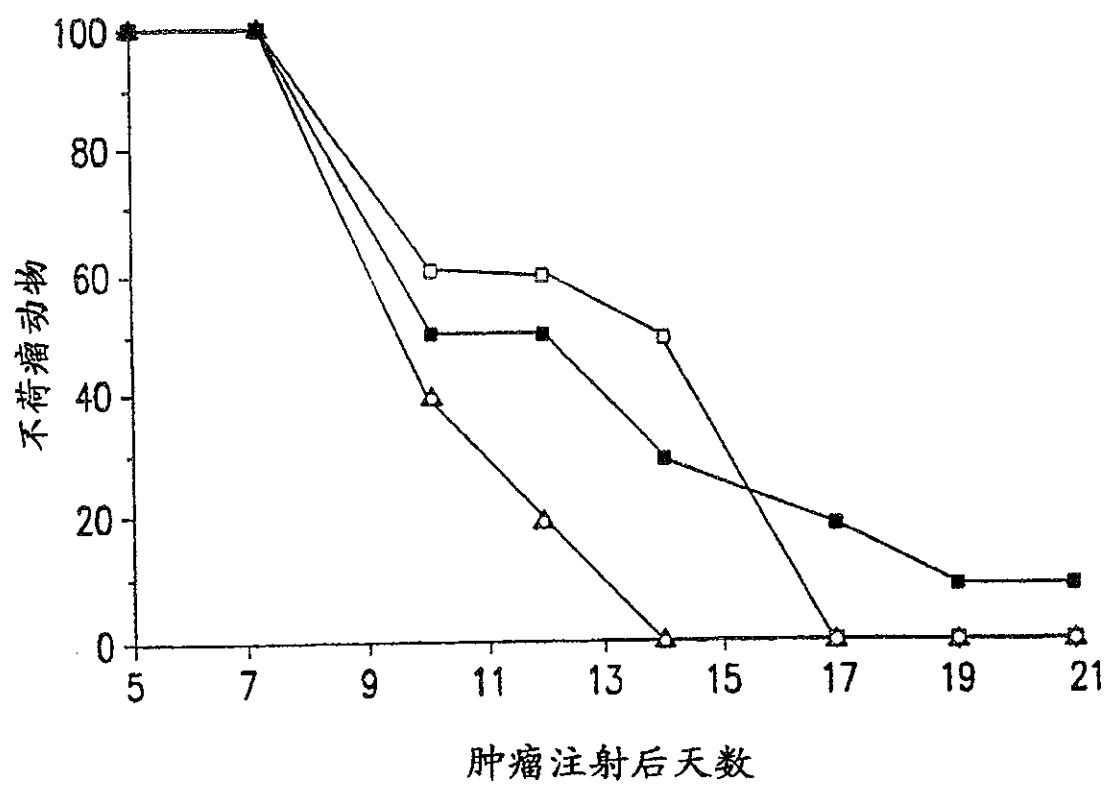


图 14

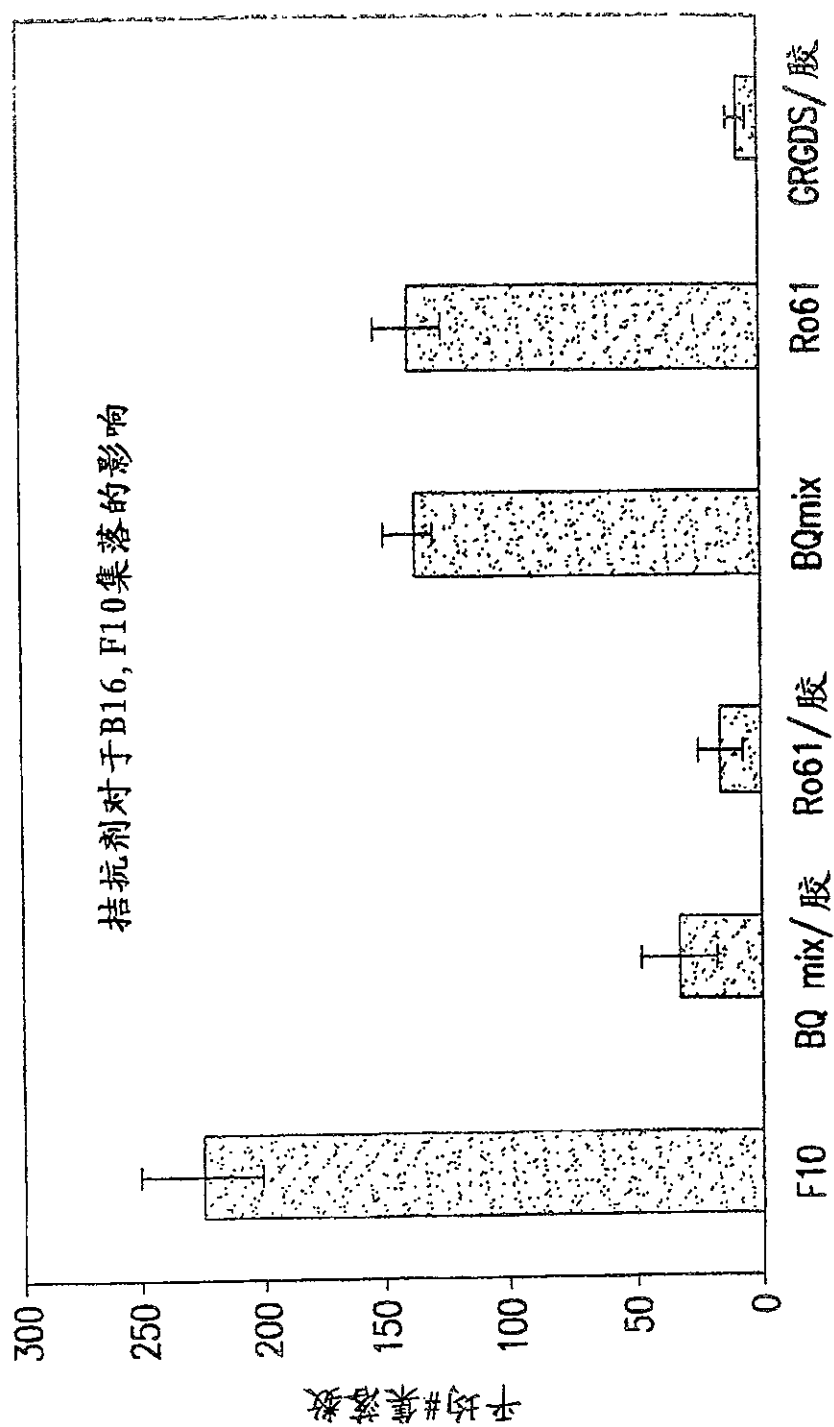
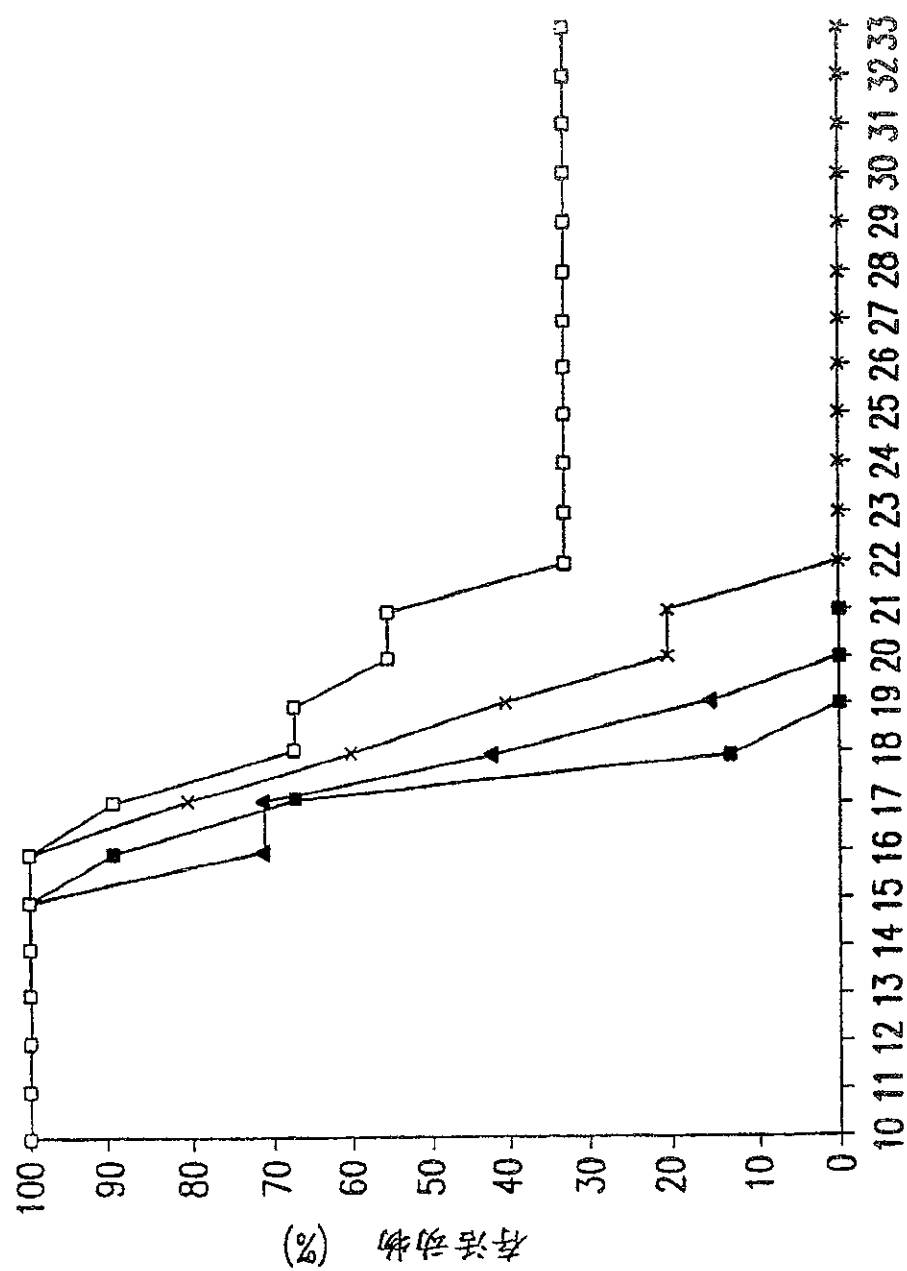


图 15



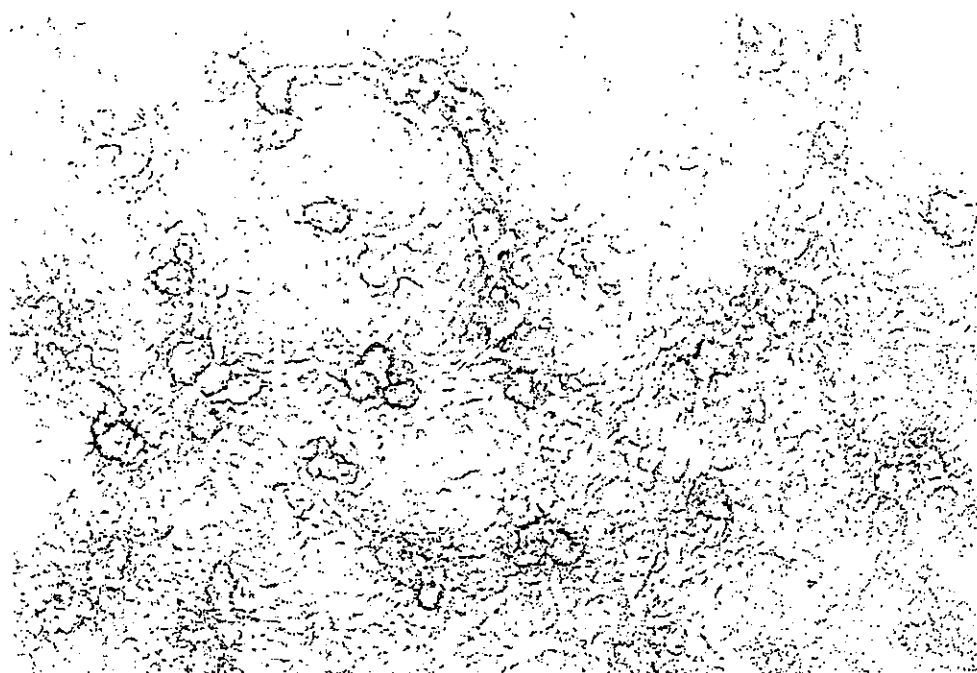
B16注射后天数

图 16



B16 10^{-5} 细胞 RO 10^{-7} M

图 17A



B16 10^5 细胞无 RO

图 17B