



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106947 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098143510

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 18 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/343 (2006.01)*

A61K9/70 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/28 美國

61/237,878

(71)申請人：邱紫文 (中華民國) CHIOU, TZYU WEN (TW)

花蓮縣花蓮市中和街 143 號 3 樓

韓鴻志 (中華民國) HARN, HORNG JYH (TW)

臺北市石牌路 2 段 320 之 3 號 8 樓

林欣榮 (中華民國) LIN, SHINN ZONG (TW)

臺中市育德路 2 號

(72)發明人：邱紫文 CHIOU, TZYU WEN (TW)；韓鴻志 HARN, HORNG JYH (TW)；林欣榮 LIN, SHINN ZONG (TW)

(74)代理人：陳展俊

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：18 共 46 頁

(54)名稱

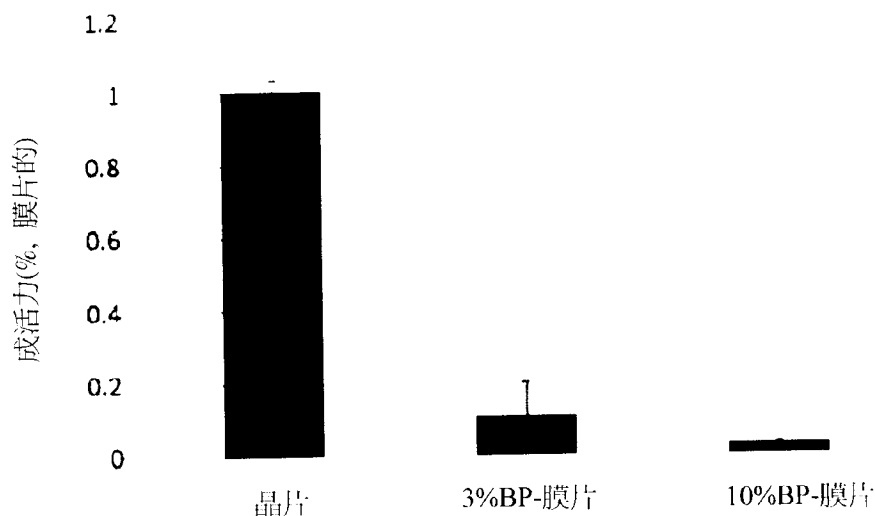
抗癌配方

ANTICANCER FORMULATION

(57)摘要

本發明係有關一種醫藥配方，其含有正亞丁基苯酞及多元酸酐。本發明也揭示此配方用於治療腫瘤的用途。

(A)



(B)

(C)

2

3

(1)

4

1



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106947 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：098143510

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 18 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/343 (2006.01)*

A61K9/70 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/28 美國

61/237,878

(71)申請人：邱紫文 (中華民國) CHIOU, TZYU WEN (TW)

花蓮縣花蓮市中和街 143 號 3 樓

韓鴻志 (中華民國) HARN, HORNG JYH (TW)

臺北市石牌路 2 段 320 之 3 號 8 樓

林欣榮 (中華民國) LIN, SHINN ZONG (TW)

臺中市育德路 2 號

(72)發明人：邱紫文 CHIOU, TZYU WEN (TW)；韓鴻志 HARN, HORNG JYH (TW)；林欣榮 LIN, SHINN ZONG (TW)

(74)代理人：陳展俊

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：18 共 46 頁

(54)名稱

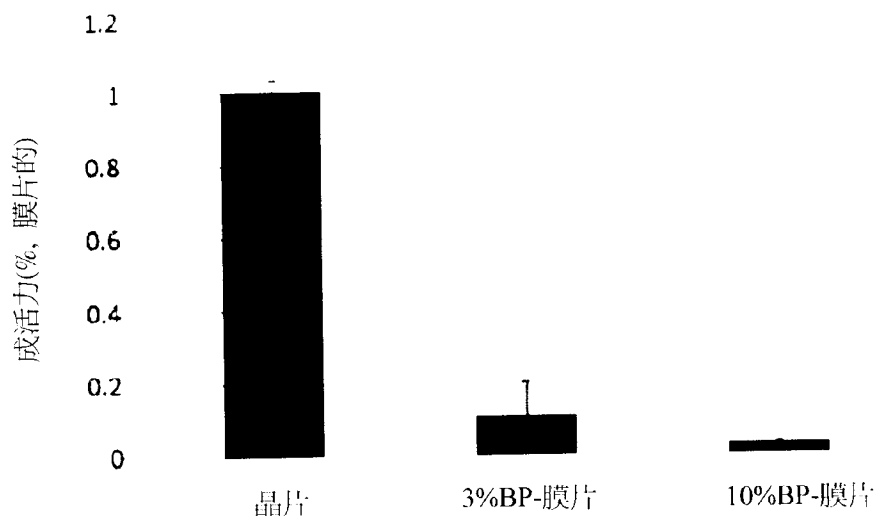
抗癌配方

ANTICANCER FORMULATION

(57)摘要

本發明係有關一種醫藥配方，其含有正亞丁基苯酞及多元酸酐。本發明也揭示此配方用於治療腫瘤的用途。

(A)



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種醫藥配方，其含有正亞丁基苯酞及多元酸酐。本發明也揭示此配方用於治療腫瘤的用途。

【先前技術】

正亞丁基苯酞(Bdph)為從當歸(*Angelica sinensis*)分離出來的化學化合物。其可用於治療各種不同腫瘤，例如多形神經膠胚細胞瘤(glioblastoma multiforme)及乳腺癌。參見，例如，Tsai 等人，*Clin. Cancer Res.* 2005, 11(9): 3475-3484 及 Tsai 等人，*J Neurochem.* 2006, 99(4): 1251-62。然而，以選擇性及持續的方式將正亞丁基苯酞遞送至癌症部位對於其於有效癌症治療方面的用途係重要的。這對於治療腦癌尤其重要，其中該藥物由於血腦障壁(blood brain barrier)而難以達到疾病區域。所以需要研發用於遞送該藥物的有效方式。

【發明內容】

本發明係以一種醫藥配方的發現為基礎，正亞丁基苯酞可從該醫藥配方歷經長時間，例如，多於 30 天，逐漸釋放。

在一方面中，本發明描述一種醫藥配方的特徵，該醫藥配方含有(i)正亞丁基苯酞及(ii)一聚合物，彼等係混合在一起。

該聚合物可為聚(乳酸-共聚合-乙醇酸)、聚葡萄糖胺糖(chitosan)、膠原、水凝膠或多元酸酐，該多元酸酐係由雙(對羧基苯氧基)丙烷、雙(對羧基苯氧基)丁烷、雙(對羧基苯氧基)戊烷、雙(對羧基苯氧基)庚烷、雙(對羧基苯氧基)己烷、雙(對羧基苯氧基)辛烷、間苯二甲酸、1,4-苯二丙酸、十二烷二酸、草酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、癸二酸、鄰苯二甲酸、間苯二甲酸、對苯二甲酸或其混合物製備而成。

該配方之一實例為正亞丁基苯酐與多元酸酐 p(CPP-SA)的混合物，該多元酸酐 p(CPP-SA)係由雙(對羧基苯氧基)丙烷(CPP)與該癸二酸(SA)製備而成。在該多元酸酐中，該雙(對羧基苯氧基)丙烷與該癸二酸之間的比例較佳為 1：2 至 1：10 (例如，1：4)。該正亞丁基苯酐的重量百分比為該配方的 3%至 20% (例如，10%)。該配方可呈粉末、膜片(wafer)、薄片、棒、微球、奈米球、糊或膠的形態。

在另一方面中，本發明描述上述用於治療腫瘤的醫藥配方的特徵。能治療的腫瘤之實例包括，但不限於，多形神經膠胚細胞瘤、肺癌、肝細胞癌、結腸癌、黑色素瘤、乳腺癌、神經胚細胞瘤、畸胎瘤或人類白血病。

而且上述配方在製造有用於治療腫瘤的藥劑時的用途在本發明的範圍以內。

在下文說明中說明本發明的一或更多具體實施例的細節。從此說明及申請專利範圍將使本發明的其他特徵、目

的及優點顯而易見。

【實施方式】

用於實現本發明的正亞丁基苯酐在商業上可，例如，從 Lancaster Synthesis 有限公司(UK)取得。其也可從當歸的氣仿萃取物分離出來。參見，例如，Tsai 等人，Clin. Cancer Res. 2005, 11(9): 3475-3484。

該正亞丁基苯酐化合物，無論用購買或分離的方式，可進一步經由驟沸塔層析法 (flash column chromatography)、高效液相層析法、結晶法或任何其他適合方法加以純化。

用於實現本發明的聚合物可任意從商業上取得或可經由此技藝中習知的方法製備而成。舉例來說，可使二元酸化合物在醋酸酐中迴流而獲得多元酸酐。

該聚合物可為一共聚物。有關一實例，此一共聚物可由二不同聚多元酸酐部分利用熔融聚縮合法製備而成。參見，例如，Domb 等人，Journal of 聚合物 science, 1987, 25: 3373-3386。

所獲得的聚合物可藉由任何適合的方法予以純化而且藉由 NMR、MS 或 FT-IR 來界定其特徵。

為了製備本發明的配方，可於想要的比例(例如，10 重量份的正亞丁基苯酐及 90 重量份的多元酸酐)下混合該亞丁基苯酐與該聚合物，例如，多元酸酐。有關另一實例，可將該亞丁基苯酐與多元酸酐溶於一溶劑(例如，二氯甲烷)

內而且接著移除該溶劑以提供一乾粉。

由此所獲得的混合物可進一步加工成各種不同的形態，例如膜片、薄片、棒、微球、奈米球、糊或膠。舉例來說，可使用一模子把該混合物壓縮成膜片。

在此使用的措辭“醫藥配方”係用於意指一組成，其(i)係適用於投藥給人類或其他哺乳動物或其可經處理，例如，殺菌，使其適用於此投藥，及(ii)包含至少一藥物(例如，正亞丁基苯酞)及上述聚合物之至少其一。此配方可為任何可遞送一藥物的裝置的部分或全部，該裝置包括丸劑、膠囊、凝膠、針劑(depot)、醫藥可植入的裝置(例如，支架(其包括自膨式支架，球囊擴張式支架、塗藥血管支架(drug-eluting stent)及覆膜支架(stent-graft))、移植(例如，主動脈移植)、人造心臟瓣膜、腦脊髓液分流器(cerebrospinal fluid shunt)、起搏點電極(pacemaker electrode)、心律調節器導線及生物吸收性植入體(bioerodable implant)等)，及外部操縱裝置(例如藥物裝置及導管，其包括可釋放藥物的導管，例如，由於加熱該導管尖端的結果)。該醫藥配方也可包括一或更多其他添加物，舉例來說醫藥上可接受的賦形劑、載劑、穿透增強劑、安定劑、緩衝劑或其他以物理方式聯合該藥物的材料，及/或用於增進該給藥形態的遞送性及/或該藥物的功效的聚合物。該配方可為，舉例來說，液體、懸浮液、如錠劑、丸劑、膠囊(包括微膠囊)的固體、乳液、微胞、藥膏、凝膠、乳液、針劑(其包括皮下植入針劑)或在植入裝置，例

如支架等，上的塗層。該配方可舉例來說被施於外部，例如以貼片的形態，或部分施於外部且部分植入的裝置，或完全植入或經皮下注入。

該措辭“藥物”意指在人類或其他哺乳動物體內局部及/或全身具有生物活性的材料。藥物的實例係揭示於 Merck Index、the Physicians Desk Reference 及美國專利案第 6,297,337 號第 11 欄第 16 行至第 12 欄第 58 行，及 US 2003/0224974 的第 0045 段中，在此為了所有目的將其全文併入本文。藥物可舉例來說為用於治療、預防、診斷、治癒或減輕症狀或患病，其包括維他命及礦物質補充劑；影響哺乳動物的構造或機能的物質；前藥，在其被置於生理環境中之後變為生物活性或更具活性的物質；及藥物的代謝物。診斷劑的實例為含有放射線元素的造影劑、含有舉例來說碘、酶及螢光物質等的對比劑。

本發明的配方也可含有適合的添加物。這些添加物可於此配方的任何製備階段時包括於此配方內。為了賦予預期的效果該等添加物在此配方內的想要濃度，如熟於此藝之士所習知，可利用習用方法來分析。

本發明的配方，藉由與流體接觸，釋放出正亞丁基苯酞—抗腫藥劑。因此，本發明亦係關於藉由投予有效量的此配方給有需要的病患而治療腫瘤的方法。此配方中的亞丁基苯酞係以特定時期，例如 20、30、35、40、50、60 天，緩慢且持續釋放至鄰近的組織內。

如此處所用的，該措辭“治療”係定義為投予有效量的

此配方給病患，該病患患有腫瘤、腫瘤徵兆、腫瘤衍生的疾病或症狀或易患腫瘤的體質，以達到治癒、緩和、減輕、醫治或改善腫瘤、腫瘤徵兆、腫瘤衍生的疾病或症狀或易患腫瘤的體質的目的。

“病患”指的是人或非人動物。非人動物的實例包括所有脊椎動物，例如，哺乳物，諸如非人靈長類動物(特別是高級靈長類動物)、狗、齧齒類動物(例如，小鼠或大鼠)、天竺鼠、貓及非哺乳動物類，諸如鳥類、兩棲動物、爬行動物等等。在較佳的具體實施例中，該病患為人類。在另一具體實施例中，該病患為實驗動物或適合當作疾病模型的動物。待治療腫瘤、癌或其他細胞增殖症狀的病患可經由此症狀的標準診斷技術加以辨別。

腫瘤為經由細胞的不正常生長所形成的瘤或病害。其可能為良性瘤或惡性瘤(亦即，癌)。癌指的是一疾病的種類，其中一群細胞展現不受控制的生長、侵害及有時候轉移。能治療的癌的實例包括，但不限於，多形神經膠胚細胞瘤、肺癌、肝細胞癌、結腸癌、黑色素瘤、乳腺癌、神經胚細胞瘤、畸胎瘤或人類白血病。

該措辭“有效量”指的是賦予待治療的病患治療效果的配配方或化合物量。治療方法可於體內或體外進行，單獨或與其他藥物或治療法聯合。在體內方法中，將一化合物或配方投給一病患。一般而言，該化合物或配方係製備於醫藥上可接受的載劑(例如，生理食鹽水)中而且經口或經由靜脈注射投予，或經皮下、肌肉內、鞘內、腹膜內、直

腸內、葉鞘內、鼻內、胃內、氣管內或肺內注射或植入。

較佳地，該配方可經皮下、肌肉內、靜脈內、組織間或顱內植入癌症患者體內。在一具體實施例中，該配方，以各種不同形態，可被植入該癌症部分或其近處而不管該腫瘤有沒有被移除。

所需的劑量取決於投予途徑的選擇；該配方的本質；該患者患病的特質；該病患的體型、重量、表面積、年齡及性別；其他被投予的藥物；及主治醫師的意見。適合的劑量為在 0.01 至 100 mg/kg 的範圍內。所需劑量的變化能綜觀各式各樣可取得的化合物及各種不同投予途徑的效率而預期。

該配方可配合手術或放射線治療一起使用。也可與一或更多其他化學治療藥劑合併。該等化學治療藥劑可為，舉例來說，如拓撲替康 (topotecan) 的喜樹鹼類 (camptothecins)、如都沙辛 (doxorubicin) 的蒽環類抗生素 (anthracycline antibiotics)、如環磷醯胺的烷化劑類或如紫杉醇 (paclitaxel)、帝摩多 (temozolomide) 或卡氮芥 (carmustin) 的抗微管藥劑 (antimicrotubule agent)。

不用進一步闡明，咸相信上述說明已經能適當完成本發明。因此，將下列實施例解釋為僅為例示，而且不會以任何方式限制揭示內容的其餘部分。在此所引用的所有刊物在此以引用方式將其全文併入本文。

實施例 1：聚合物的合成

SA 預聚物

SA 單體由醇再結晶兩次。使 2.7 g SA 單體在 60 ml 醋酸酐中於 135 至 140°C 時在真空(10^{-4} 托耳)之下迴流 30 分鐘。把未反應的醋酸酐移除。使 SA 預聚物在真空之下於 60°C 時乾燥而且接著溶於乾燥甲苯中。將此溶液加至於體積比 1:10 的乾燥乙醚與石油醚的 1:1 v/v 混合物而且使其靜置過夜而使該 SA 預聚物(10:1 v/v)沈澱出來。等該乙醚及石油醚被移除之後，使該 SA 預聚物在真空之下乾燥。

CPP 預聚物

使 3 g CPP 單體以 50 ml 醋酸酐於 150°C 時在真空(10^{-4} 托耳)之下迴流 30 分鐘。冷卻之後，過濾該反應混合物。藉由移除一些未反應的醋酸酐而濃縮濾液而且使該 CPP 預聚物於 0°C 下結晶化。移除剩餘的未反應的醋酸酐。以醚清洗該 CPP 預聚物而且在真空之下乾燥。將 DMF 及乾燥醚(DMF: 乾燥醚=1:9)依序加至該 CPP 預聚物。經過 12 小時之後，移除 DMF 及醚而且再度使該 CPP 預聚物晶體在真空之下乾燥。

p(CPP-SA)共聚物

把比例 20:80 的 CPP 預聚物及 SA 預聚物填入一玻璃試管(2×20 cm)內而且於 180°C 下在一油浴內加熱 1 分鐘。把壓力降至 10^{-4} mmHg。在整個聚合過程中每 15 分鐘消除真空。以二氯甲烷清洗該試管而且接著添加石油醚以使

p(CPP-SA)共聚物沈澱出來，以無水醚清洗該共聚物而且在真空之下乾燥。

藉由 IR 及 ^1H NMR 來定義該 p(CPP-SA)共聚物的特徵。參見圖 1 及 2。在此 IR 光譜研究中，於 1812.76 cm^{-1} 下觀察到酸酐鍵的特徵信號。在此 ^1H NMR 光譜研究中，於 6.9 至 8.2 ppm 下觀察到 CPP 的芳香族部分的特徵信號而且於 1.3 ppm 下測得 SA 的亞甲基部分的特徵信號。再者，根據該 ^1H NMR 光譜研究中的 CPP 及 SA 的特徵峰強度鑑別出該共聚物內的 CPP 及 SA 的比例為 1:4 至 1:5。

Bdph-p(CPP-SA)配方

使 p(CPP-SA)聚合物與 Bdph 混合以提供含有以重量計 3% 或 10% 的 Bdph 的混合物。也製備成含有 97% p(CPP-SA) 及 3% 1,3-雙(2-氯乙基)-1-亞硝基脲(BCNU)的混合物。使該混合物以 10% (w/v) 的濃度溶於二氯甲烷中。使該溶液在真空之下乾燥 72 小時。如 Walter 等人, Cancer Res. 1994, 54(8): 2207-12; Leong 等人, J Biomed Mater Res. 1985, 19(8): 941-55; 及 Storm 等人, J Neurooncol. 2002, 56(3): 209-17 中所說明的，利用不銹鋼模(內徑，13 mm)在 Carver Press 的輕微壓力之下於 200 psi 下壓縮由此所獲得的乾燥粉末以形成 Bdph p(CPP-SA)圓盤(100 mg/圓盤)。

實施例 2：釋放動力學

把 Bdph-p(CPP-SA)圓盤 置於具有 1.0 ml 的 0.1 M 磷

酸鹽緩衝食鹽水(pH 7.4)及 1.0 ml 正辛醇的閃爍瓶內而且於 37°C 下培養。藉由新鮮緩衝液於各不同時間點時替換該溶液。如 Weingart 等人, Int. J. Cancer. 1995, 62(5): 605-9 中說明的, 利用一光譜儀測量於 310 nm 的波長下的吸收度以測量 Bdph 於該緩衝液中的濃度。獲致 Bdph 持續釋放。參見圖 2。

實施例 3：體內控制釋放及細胞毒作用(Cytotoxic effect)

進行分析以檢查 p(CPP-SA)-10% Bdph 對於惡性神經膠質瘤 RG2 的生長抑制作用。據發現該 p(CPP-SA)-10% Bdph 的生長抑制作用與控制組相比為 50%。此外, 在 p(CPP-SA)-10% Bdph 的治療之後觀察經逐漸改變及卸下的培養平板底部的 GBM 腫瘤細胞之形態學(圖 4)。比起未反應的細胞, 大部分卸下的 GBM 細胞在經過 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療之後凋亡(圖 4B & C)。

注意數據係表示成平均值 $\pm$ SD 或 SE (分別為標準偏差及標準誤差)。經由學生氏 t-檢定(Student's t-test)及 Mantel-Cox 檢定來分析統計顯著性。利用 Kaplan-Meier 方法進行存活分析。將 <0.05 的 P 值視為顯著的。

實施例 4：凋亡途徑及由 p(CPP-SA)-Bdph 所誘發的 Nurr 移位

為了確認以寡聚合去氧核苷酸為基礎的微陣列分析的結果, 藉由 RT-PCR 檢查經 Bdph 治療的 RG2 細胞內的孤兒

受體 (orphan receptors) NOR-1、Nurr1 及 Nur77 的表現。利用 Bdph 治療特定時期之後，於二 GBM 細胞株內以時間相依的方式誘發該 Nur77 的 Mrna 表現。從 Bdph 治療之後半小時至該治療之後 6 小時明顯誘發出 Nur77 mRNA 表現(圖 5)。Nur77，其在 Bdph 治療之後被高度誘發出來，據發現與生長抑制及細胞凋亡有牽連，暗示 Nur77 誘發可能是 GBM 細胞內 Bdph-誘發凋亡的初期現象。

為了檢查是否回應 Bdph 而發生 Nur77 的移位，利用對應的 Nur77 特有抗體進行該 Nur77 的免疫螢光檢查定位而且利用螢光顯微鏡來測量。結果顯示 Nur77 在細胞核內比在細胞液內更多許多。經過 Bdph 治療 24 小時之後，把 Nur77 從該細胞核移位至該細胞質(圖 6)。為了進一步確認，藉由西方氏墨漬分析法(Western blot analysis)檢查細胞液及細胞核部分。免疫轉漬法(Immunoblotting)顯示 Nur77 主要位於欠缺 Bdph 治療的細胞核內(圖 7)。

最後，利用西方氏墨漬分析法測定 Bdph-誘發 Nur77 的基因表現所涉及的傳信途徑。如圖 8 所示，經過 Bdph 治療 1 小時之後 JNK、AKT、ERK 顯然均被磷酸化。再者，MTT 分析結果顯示在細胞利用 5 至 20 nM 的 pJNK 抑制劑預處理而且於 RG2 細胞內利用 Bdph 治療之後細胞成活力提高了。

實施例 5：動物研究

從國家實驗室動物中心(台北，台灣)獲得雄性 F344 大

鼠(230 至 260g)及雄性 Foxn1 nu/nu 小鼠(10 至 12 週)。所有程序遵守國立東華大學(花蓮，台灣)的實驗室動物中心及中國醫藥大學附設醫院(台中，台灣)的標準作業程序。於動物實驗中使用 RG2 細胞(大鼠 GBM)及 DBTRG-05MG 細胞(人類 GBM)以監視 p(CPP-SA)-3%或 10% Bdph 配方及 p(CPP-SA)-3% BCNU 的抗腫瘤活性。

同基因 F344 大鼠(6 隻/組)接受 1×10^6 個 RG2 細胞的皮下背部植入體(subcutaneous back implants)。藉由皮下植入體利用 p(CPP-SA)-3%、p(CPP-SA)-10% Bdph 配方、p(CPP-SA)-3% BCNU 或在該腫瘤細胞植入之後從原始注入部位移除的至少 1.5 cm 之單獨聚合物的治療各組內的動物。

此外，Foxn1 nu/nu 小鼠(5 至 6 隻/組)接受 1×10^6 個 DBTRG-05MG 細胞的皮下植入，p(CPP-SA)-3%、p(CPP-SA)-10% Bdph 配方、p(CPP-SA)-3% BCNU 或在該腫瘤細胞植入之後從原始注入部位移除的至少 1.5 cm 之單獨聚合物的皮下植入。

利用測徑器測量腫瘤大小而且將體積計算為 $L \times H \times W \times 0.5236$ 。當腫瘤的體積在大鼠體內超過 25 cm^3 而且在小鼠體內超過 1000 mm^3 時則將動物放棄。利用該日期來計算大鼠及小鼠的最終存活日期。

實施例 6：p(CPP-SA)-Bdph 在動物模型內的治療效果

F344 大鼠及免疫缺陷裸小鼠接受 5×10^4 個 RG2 細胞而

且利用 p(CPP-SA)-3% Bdph、p(CPP-SA)-10% Bdph、單獨 p(CPP-SA) 或 p(CPP-SA)-3% BCNU 做皮下治療。與該 p(CPP-SA)-3% Bdph 治療組、p(CPP-SA)-3% BCNU 治療組及 p(CPP-SA) 治療組 (圖 9A, $p < 0.005$) 相比時, 該 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療組觀察到顯著的抑制效果。

該 RG2 組第 30 日時的平均腫瘤大小為 $2070.79 \pm 784.90 \text{ mm}^3$, 該 p(CPP-SA) 治療組為 $1586.30 \pm 243.69 \text{ mm}^3$, 該 p(CPP-SA)-3% Bdph 治療組為 $346.71 \pm 521.68 \text{ mm}^3$, 該 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療組為 $87.89 \pm 167.44 \text{ mm}^3$, 以及該 p(CPP-SA)-3% BCNU 治療組為 $357.48 \pm 27.30 \text{ mm}^3$ 。

ki-67 的免疫組織化學染色 (immunohistochemical stain), 其指示細胞增殖, 顯示該 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療組明顯減少。此外, 該硫胱氨酸蛋白酶 (caspase) 的免疫組織化學染色, 其指示凋亡, 顯示該 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療組明顯減少。

最後, 在該 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療組的動物體內, 藉由體重及各個不同器官的組織分析來評估時, 沒有觀察到與藥物有關的毒性, 但是在該 p(CPP-SA)-3% BCNU 治療組中觀察到顯著體重喪失 (圖 9B)。

實施例 7: p(CPP-SA)-Bdph 在異種皮移植腫瘤生長方面的治療效果

給裸小鼠注入人類 DBTRG-05MG 細胞而且在第 5 日植

入 p(CPP-SA)-Bdph (0%、3%及 10%)。在該 3%及 10% Bdph-膜片治療組中觀察到腫瘤生長的明顯抑制(圖 10)。控制組在第 39 日時的腫瘤大小平均值為 $1098.46 \pm 170.11 \text{ mm}^3$ ，該 p(CPP-SA)-3% Bdph 治療組為 $605.8 \pm 98.8 \text{ mm}^3$ 而且該 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療組為 $504.4 \pm 38.9 \text{ mm}^3$ (圖 10C； $p < 0.05$)。

實施例 8：Bdph 抑制人類多形神經膠胚細胞瘤的遷移及侵襲

利用 BioCoat 細胞基質侵襲艙(matrigel invasion chamber)系統(BD Bioscience, Bedford, MA)檢查 DBTRG-05MG 細胞株的侵襲力。BD 細胞基質本體係由在含有 $8 \mu\text{m}$ 細孔的聚對苯二甲酸乙二酯(PET)膜上層黏蛋白(laminin)、膠原 IV、巢蛋白/內肌動蛋白(nidogen/entaction)及蛋白多醣(proteoglycan)組成。參見圖 12 及 16。在體內遷移分析中，在 Falcon 培養杯(culture insert) (BD Bioscience)上的應用低細孔密度 PET 徑跡蝕刻膜(track-etched membranes)。將該膜置於細胞基質艙(Matrigel chamber)或 Falcon 培養杯的上方孔與下方孔之間。首先使該等細胞再懸浮於含有 10%胎牛血清的 PRMI 1640 內而且播種於該艙的上方孔內(每孔 50,000 個細胞)。於 37°C 下培養 24 小時之後，利用 Liu 著色劑(Handsel 科技股份有限公司，台北，台灣)將透過該膜侵入或遷移的細胞染色而且在顯微鏡之下計數。各實驗重覆進行三次。

用上述系統檢查 Bdph 對於人類多形神經膠胚細胞瘤的遷移及侵襲的影響。據發現 Bdph 以劑量相依的方式抑制人類多形神經膠胚細胞瘤的遷移及侵襲。參見圖 12 至 14。

實施例 9：Bdph 經由壓抑 Axl 而抑制腫瘤遷移及侵襲

利用反轉錄酶(reverse transcriptase)-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)檢查 Bdph 對於 GBM 細胞株內的基因表現圖譜的影響以闡釋 Bdph 對惡性腦瘤起作用的可能機制。據發現該 Axl 受體酪胺酸激酶(RTK)的 mRNA 表現在 dbph 存在的情況之下調降。再者，經由將 pcDNA3.0-Axl 質粒轉染至該 GBM 細胞株內所引起的 Axl 過度表現可能逆轉 Bdph 對於 Axl 媒介的增殖、遷移及侵襲的抑制效果。

另外進行西方氏墨漬分析法以檢查在 Bdph 存在的情況之下該等 GBM 細胞的 Axl 蛋白含量。結果(圖 11)顯示該 Axl 蛋白含量降低了。另外參見圖 15 及 17。

現在已能接受蛋白酪胺酸激酶在細胞增殖及分化的調節中以及在包括人類神經膠質瘤的許多瘤形成的發端中扮演重要的角色。除此之外，據記載腫瘤遷移及侵襲中涉及 Axl。上述結果暗示 Bdph 抑制 Axl 受體酪胺酸激酶的蛋白表現而且藉以抑制該 GBM 細胞株的遷移及侵襲能力。

其他具體實施例

本說明中所揭示的所有特徵可以任何組合合併。用於相同、等效或相似目的的選擇性特徵均可替代此說明書中

所揭示的各特徵。因此，除非另行明確說明，否則所揭示的各特徵僅為等效或相似特徵的基因系列的實例。

從上述說明，熟於此藝之士可輕易確定本發明的基本特徵，而且不會悖離其精神及範圍，可進行本發明的各種不同改變及修飾使其適於各種不同用法及條件。因此，其他具體實施例也在下列申請專利範圍的範圍以內。

【圖式簡單說明】

圖 1 為顯示 p(CPP-SA)共聚物的 ^1H NMR 光譜的圖形。CPP 的芳香族部分的特徵信號於 6.9 至 8.2 ppm 下觀察到。另一 SA 的亞甲基部分的特徵信號於 1.3 ppm 下觀察到。

圖 2 為顯示 p(CPP-SA)共聚物的 FTIR 光譜的圖形。CPP 與 SA 之間的酸酐鍵的特徵信號於 1812.76 cm^{-1} 下觀察到。

圖 3 為顯示 p(CPP-SA)-2% BCNU 膜片 (◆)、p(CPP-SA)-3% Bdph 膜片 (■)及 p(CPP-SA)-10% Bdph 膜片 (▲)的釋放動力學的圖形。在所有配方中均觀察到 Bdph 或 BCNU 的持續釋放。

圖 4A 至 4D 為顯示 p(CPP-SA)-10% Bdph-誘發大鼠惡性神經膠質瘤細胞的生長抑制的圖形及照片，其中 (A)以 10% Bdph-膜片治療大鼠惡性神經膠質瘤細胞株 RG 24 小時。藉由 MTT 分析測定細胞成活力。此數據表示 3 個獨立實驗的具有標準偏差的平均值。* $p < 0.05$ 。(B)利用膜片治療的 RG2 惡性神經膠質瘤細胞的細胞形態學。(C)利用 p(CPP-SA)-3% Bdph 治療 24 小時的 RG2 惡性神經膠質瘤細

胞的細胞形態學。(D)利用 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療 24 小時的 RG2 惡性神經膠質瘤細胞的細胞形態學。

圖 5 為顯示 Bdph-誘發 Nur77 轉錄的照片。以 IC_{50} 濃度的 Bdph 治療大鼠 GBM 細胞(RG2)達到指定時間(0、0.5、1、3 及 6 小時)。以藥物培養之後，收集細胞而且分離出全部 RNA。用 GAPDH 當作內標準物。

圖 6 為顯示 Bdph-誘發 Nur77 從細胞核遷移至細胞質的一組照片，其中以 Bdph (100 μ g/mL)治療 DBTRG-05NG 細胞 24 小時，接著以抗-Nur77 抗體然後對應的 Rhodamine-共軛抗-IgG 二級抗體進行免疫細胞化學染色以顯示 Nur77 蛋白。同時，以 DAPI 把細胞染色以顯示出細胞核。以螢光顯微鏡把螢光影像視覺化。

圖 7 為顯示 Bdph-誘發 RG2 細胞內的 Nur77 核質移位的一組照片。把 RG2 細胞植入 10cm 碟子內而且培養至 90% 聚滿(confluence)。以 Bdph (100 μ g/ml)治療細胞達到不同時期(0、6、12、24 及 48 小時)。獲取細胞而且分離出細胞核及細胞質部分。用西方氏墨漬分析法監視測定細胞核及細胞質的 Nur77 的量。

圖 8 為顯示該 Bdph-誘發生長抑制中的發信途徑的影響的一組照片。依指示以 Bdph (100 μ g/ml)治療 RG2 細胞達到 0 至 180 分鐘的各種不同時期。為 pJNK、pPKC、pAKT、AKT、pERK、ERK、JNK、pp38 及 p38 抗體進行西方氏墨漬分析。用 β -肌動蛋白的表現當作內控制組。

圖 9A 至 9C 為顯示經由同基因大鼠 GBM 模型中的

p(CPP-SA)-Bdph 抑制腫瘤生長的圖形及一組照片。同基因 F344 大鼠(6 隻/組)接受 1×10^6 個 RG2 細胞的皮下背部植入體。把 RG2 細胞(5×10^6)皮下植入 F344 大鼠的後側腹內。在 RG2 細胞移植 5 日之後，僅植入 RG2 細胞的 7 大鼠為控制組(●)而且其他大鼠分別以膜片(□)、3%Bdph-膜片(▲)、10%Bdph-膜片(■)及 3% BCNU-膜片(×)治療。圖 9A 把該腫瘤大小表示成具有標準偏差的平均值。圖 9B 中的體重也表示成具有標準偏差的平均值。圖 9C 於 GBM 組織內進行免疫組織化學染色的分析(於該 RG2 細胞植入之後第 30 日)。該膜片組、3% Bdph-膜片組、10% Bdph-膜片組及 3% BCNU-膜片組的片段的代表性照片。GBM 腫瘤(對於 ki-67 的免疫組織化學染色)、分裂的硫脲氨酸蛋白酶 3 及 Nur77。把該 Ki-67-、分裂的硫脲氨酸蛋白酶 3-或 Nur77-正性細胞染成褐色(400x)。

圖 10A 至 10D 為顯示 p(CPP-SA)-Bdph 抑制異種皮移植人類 GBM 裸小鼠模型中的腫瘤生長的圖形及一組照片。把 DBTRG-05MG 細胞(2×10^6)皮下植入裸 Foxn1 nu/nu 小鼠的後側腹區域內。在 DBTRG-05MG 細胞移植 5 日之後，分別以膜片(◆)、3%Bdph-膜片(■)及 10%Bdph 膜片(▲)治療小鼠。(A)把該腫瘤大小表示成具有標準偏差的平均值。(B)體重也表示成具有標準偏差的平均值。(C)及(D)照片顯示以該膜片、3% Bdph-膜片或 10% Bdph-膜片治療裸小鼠體內的腫瘤。P<0.01.

圖 11 為顯示 Bdph 調降 Axl 蛋白表現的西方氏墨漬法

結果的一組照片。

圖 12 顯示評估腫瘤細胞遷移及侵襲分析的孔杯系統。

圖 13 為顯示 Bdph 以劑量相依的方式抑制腫瘤細胞遷移的一組照片及圖形。

圖 14 為顯示 Bdph 以劑量相依的方式抑制腫瘤細胞侵襲的一組照片及圖形。

圖 15 為顯示藉由 DBTRG 腦瘤細胞內的 Ax1 表現逆轉 Bdph 抑制的腫瘤細胞增殖的圖形。

圖 16 為顯示用於偵測細胞遷移及侵襲的 Oris™ 系統的一組照片及圖形。

圖 17 為顯示 Bdph 抑制的細胞遷移可能以劑量相依的方式被 DBTRG 腦瘤細胞內的 Ax1 表現逆轉的一組照片及圖形。

圖 18 為顯示 BP 抑制的細胞侵襲可能被 DBTRG 腦瘤細胞內的 Ax1 表現逆轉的一組照片及圖形。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

98/43510

※ 申請日：98.12.18

※IPC 分類：

A61K 31/343

(2006.01)

A61K 9/70

(2006.01)

A61P 35/00

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗癌配方

Anticancer Formulation

二、中文發明摘要：

本發明係有關一種醫藥配方，其含有正亞丁基苯酞及多元酸酐。本發明也揭示此配方用於治療腫瘤的用途。

三、英文發明摘要：

This invention relates to a pharmaceutical formulation containing n-butylidenephthalide and a polyanhydride. Also disclosed is use of this formulation to treat tumor.

七、申請專利範圍：

1. 一種醫藥配方，其包含：

正亞丁基苯酞；及

多元酸酐，其係由雙(對羧基苯氧基)丙烷、雙(對羧基苯氧基)丁烷、雙(對羧基苯氧基)戊烷、雙(對羧基苯氧基)庚烷、雙(對羧基苯氧基)己烷、雙(對羧基苯氧基)辛烷、間苯二甲酸、1,4-苯二丙酸、十二烷二酸、草酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、癸二酸、鄰苯二甲酸、間苯二甲酸、對苯二甲酸或其混合物製備而成；

其中該正亞丁基苯酞係與該多元酸酐混合。

2. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥配方，其中該多元酸酐係由雙(對羧基苯氧基)丙烷、雙(對羧基苯氧基)己烷、間苯二甲酸、1,4-苯二丙酸、十二烷二酸、癸二酸或其混合物製備而成。

3. 如申請專利範圍第 2 項之醫藥配方，其中該多元酸酐係由雙(對羧基苯氧基)丙烷及癸二酸的混合物製備而成。

4. 如申請專利範圍第 3 項之醫藥配方，其中該雙(對羧基苯氧基)丙烷與該癸二酸之間的比例為 1：2 至 1：10。

5. 如申請專利範圍第 4 項之醫藥配方，其中該雙(對羧基苯

氧基)丙烷與該癸二酸之間的比例為約 1 : 4 至 1 : 5。

6. 如申請專利範圍第 1 或 5 項之醫藥配方，其中該正亞丁基苯酐的重量百分比為該配方的 3%至 20%。
7. 如申請專利範圍第 6 項之醫藥配方，其中該正亞丁基苯酐的重量百分比為該配方的約 10%。
8. 如申請專利範圍第 7 項之醫藥配方，其中該配方係呈粉末、膜片、薄片、棒、微球、奈米球、糊或膠的形態。
9. 一種醫藥配方的用途，該醫藥配方係用於製造治療病患體內的腫瘤用的藥劑，其中該藥劑依該治療所需包含有效量的該醫藥配方，該醫藥配方含有：(1)正亞丁基苯酐及(2)多元酸酐，其係由癸二酸、雙(對羧基苯氧基)丙烷、雙(對羧基苯氧基)己烷、間苯二甲酸、1,4-苯二丙酸、十二烷二酸或其混合物製備而成，其中該正亞丁基苯酐係與該多元酸酐混合。
10. 如申請專利範圍第 9 項之用途，其中該腫瘤為多形神經膠胚細胞瘤(glioblastoma multiforme)、肺癌、肝細胞癌、結腸癌、黑色素瘤、乳腺癌、神經胚細胞瘤、畸胎瘤或人類白血病。

- 11.如申請專利範圍第 9 項之用途，其中該多元酸酐係由雙(對羧基苯氧基)丙烷、雙(對羧基苯氧基)己烷、間苯二甲酸、1,4-苯二丙酸、十二烷二酸、癸二酸或其混合物製備而成。
- 12.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該多元酸酐係由雙(對羧基苯氧基)丙烷及癸二酸的混合物製備而成。
- 13.如申請專利範圍第 9 項之用途，其中該雙(對羧基苯氧基)丙烷與該癸二酸之間的比例為 1：2 至 1：10。
- 14.如申請專利範圍第 13 項之用途，其中該雙(對羧基苯氧基)丙烷與該癸二酸之間的比例為約 1：4 至 1：5。
- 15.如申請專利範圍第 9 項之用途，其中該正亞丁基苯酐的重量百分比為該配方的 3%至 20%。
- 16.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該正亞丁基苯酐的重量百分比為該配方的約 10%。
- 17.如申請專利範圍第 9 項之用途，其中該癌症為多形神經膠胚細胞瘤。
- 18.如申請專利範圍第 9 或 17 項之用途，其中該藥劑適於

皮下植入、組織間植入或顱內植入該病患體內。

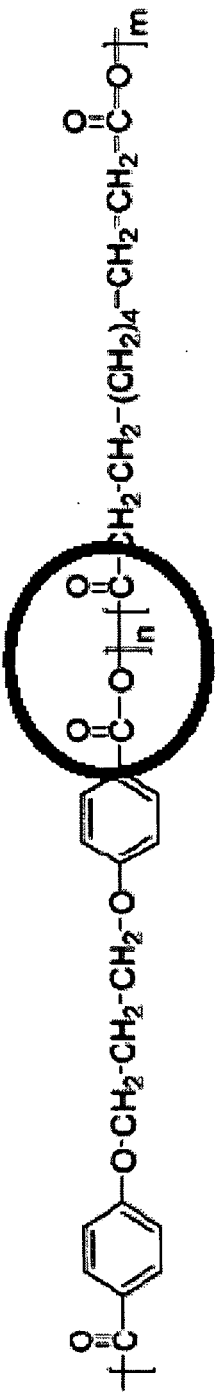
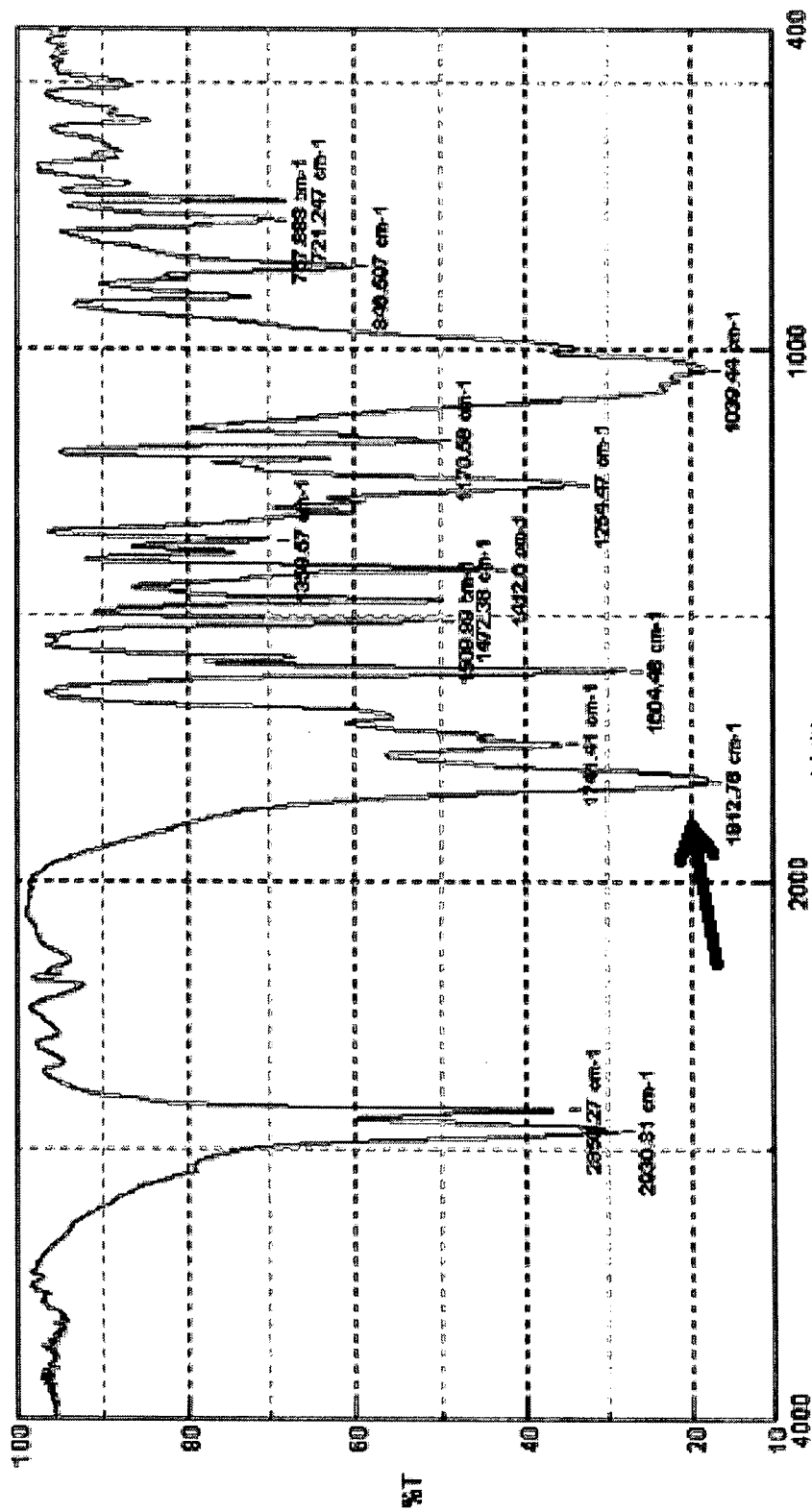


圖 2

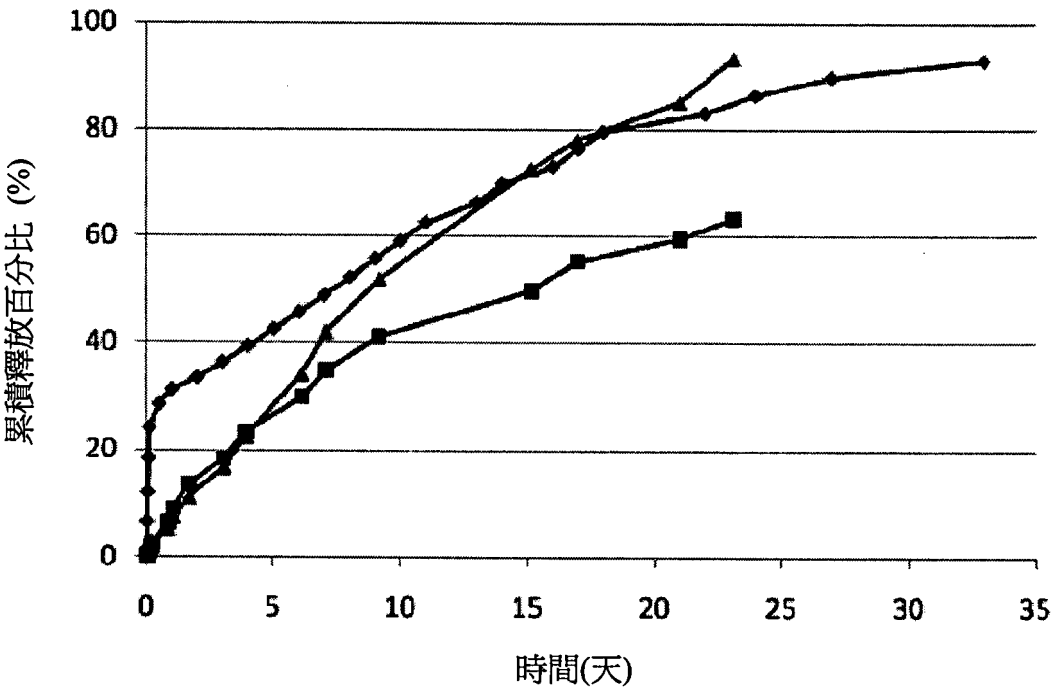


圖 3

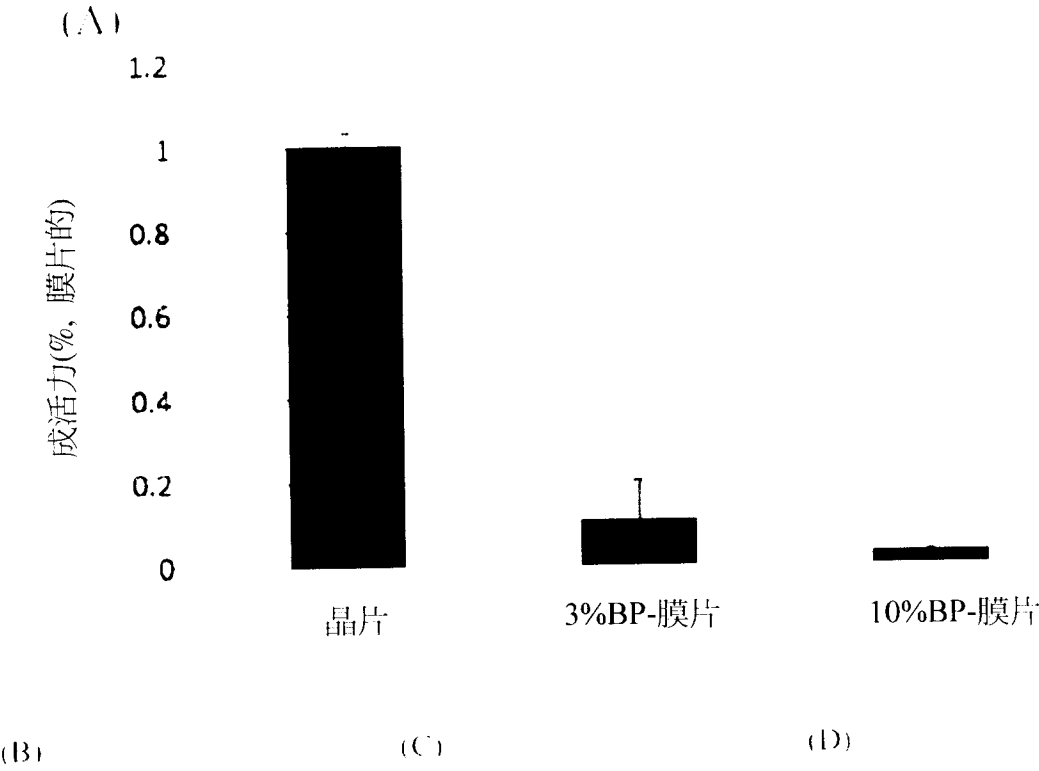


圖 4

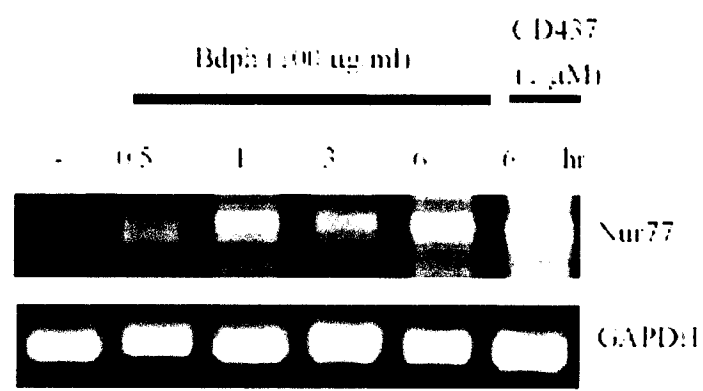


圖 5

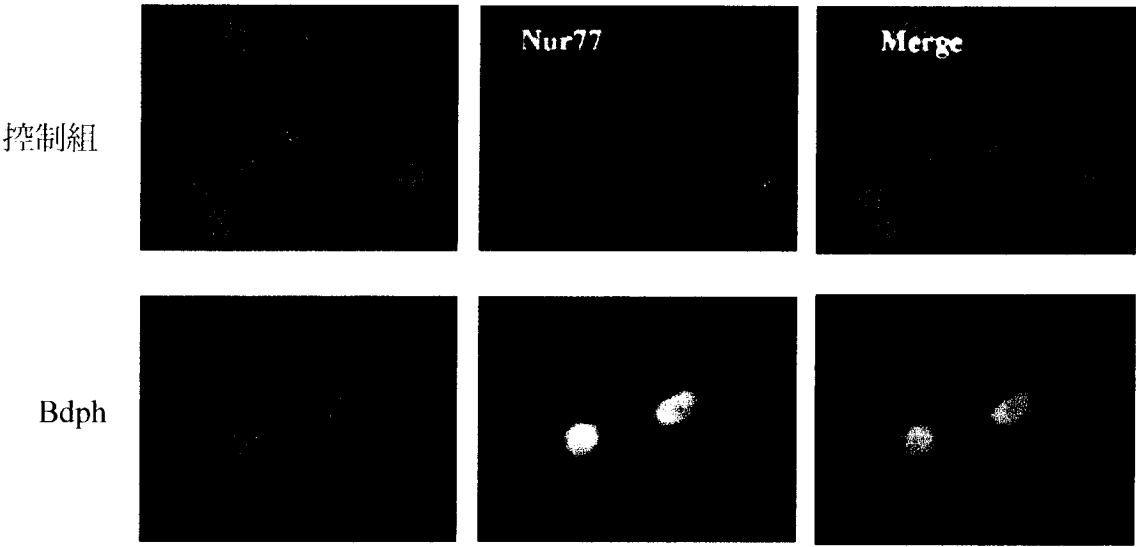


圖 6

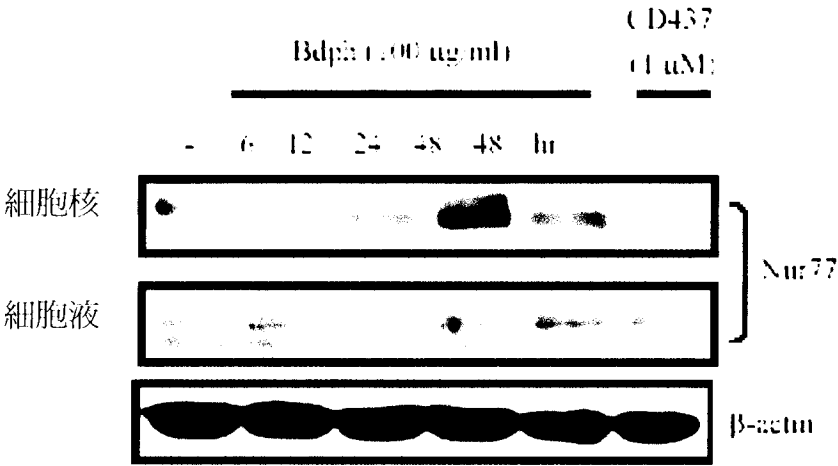


圖 7

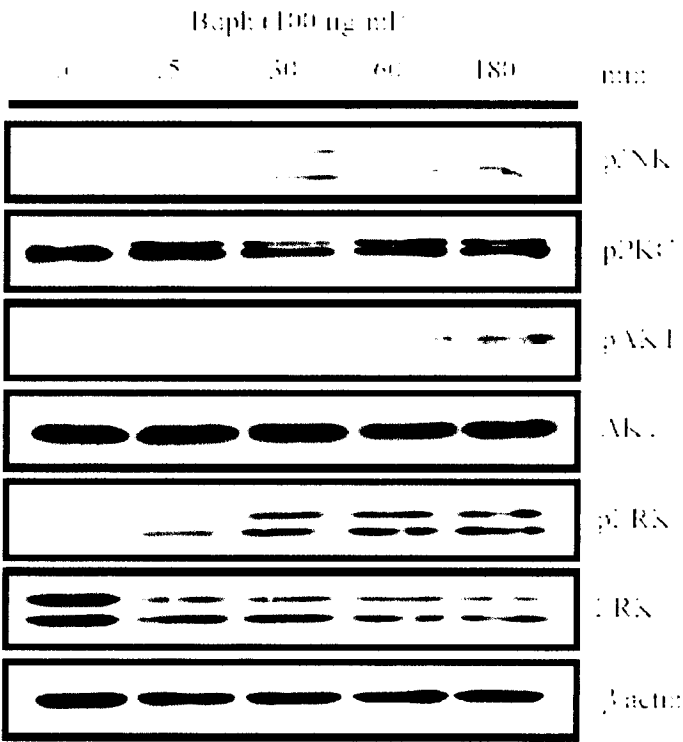


圖 8

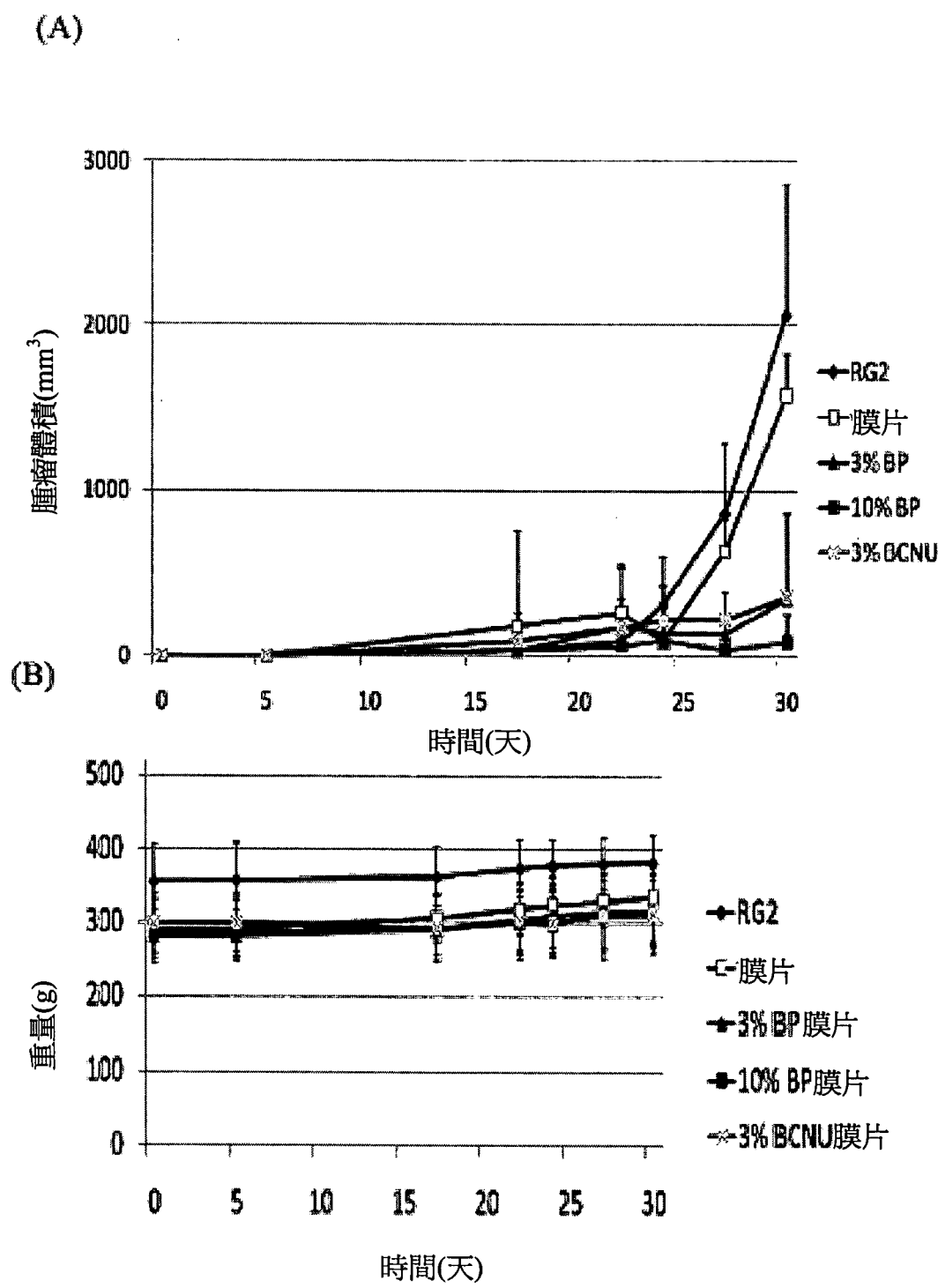


圖 9

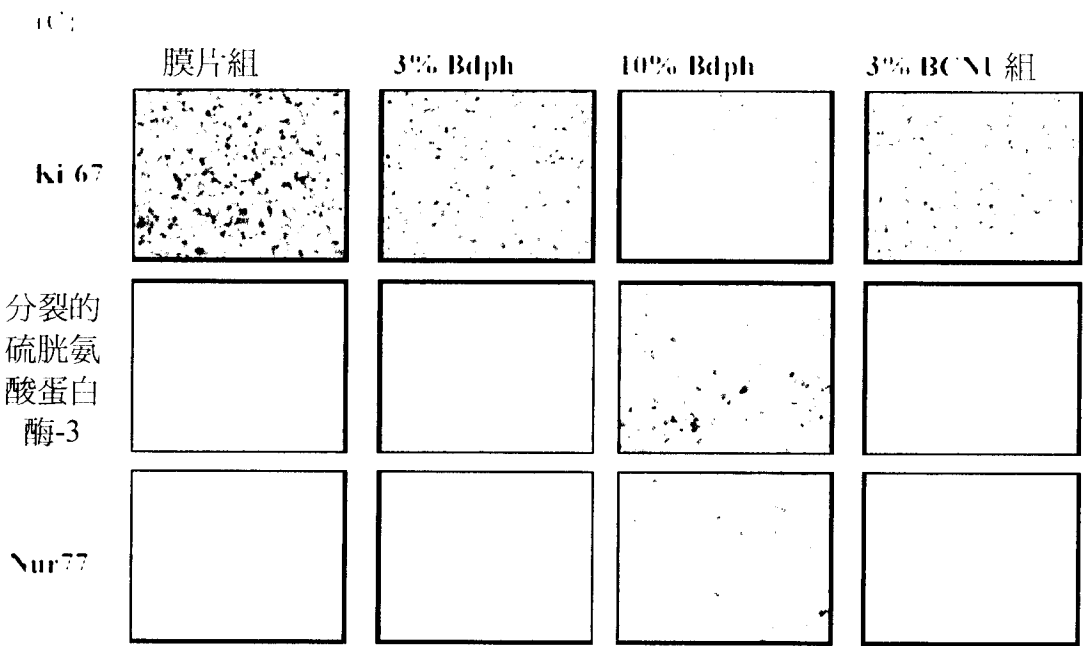


圖 9

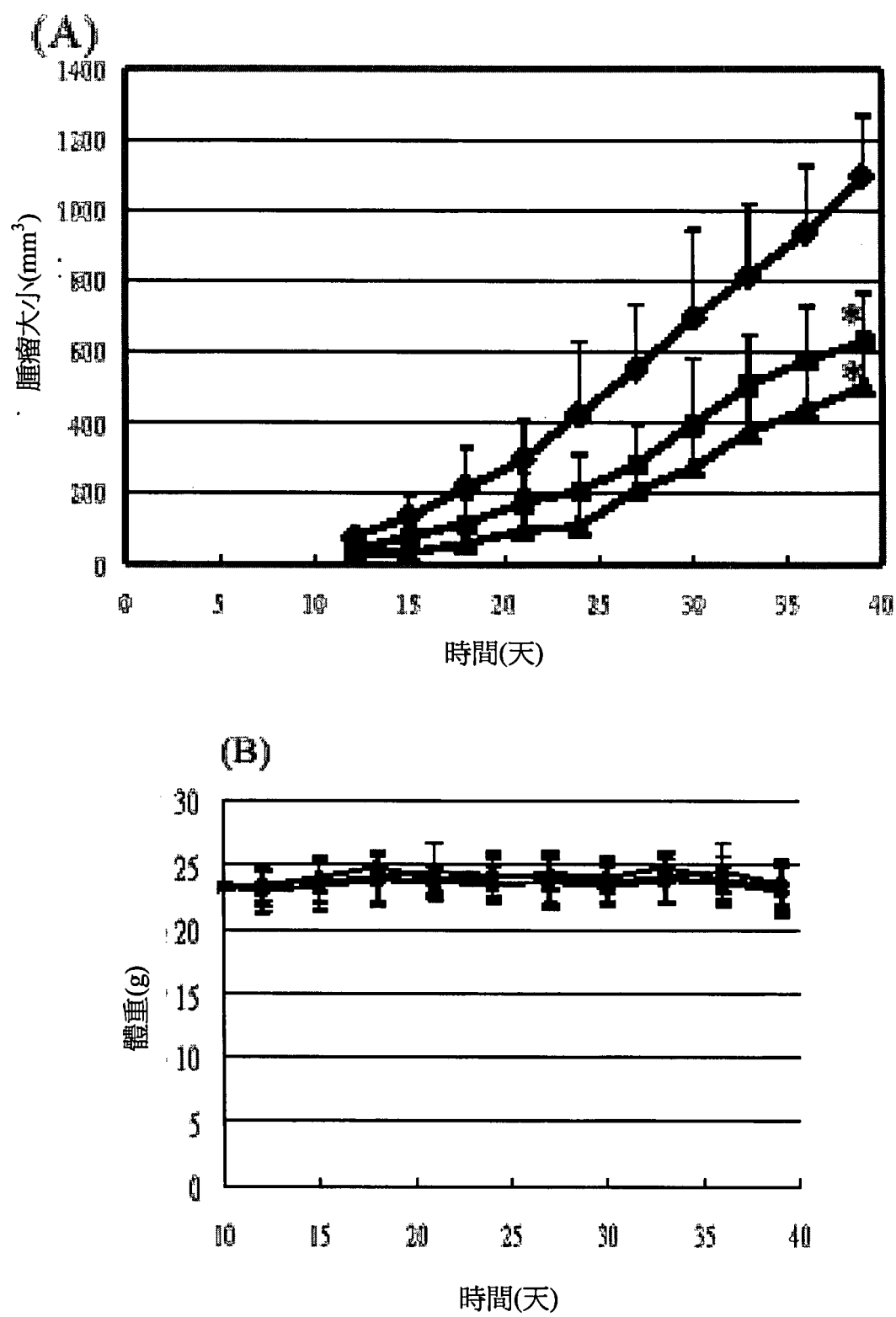


圖 10

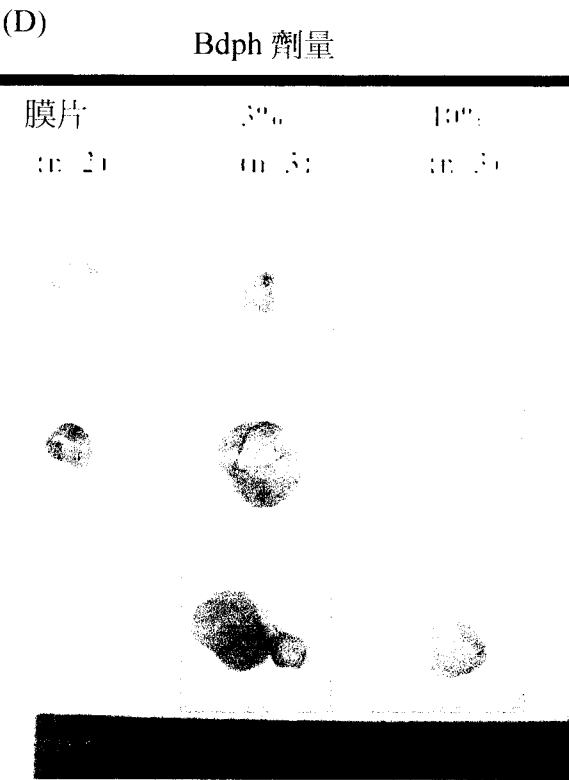
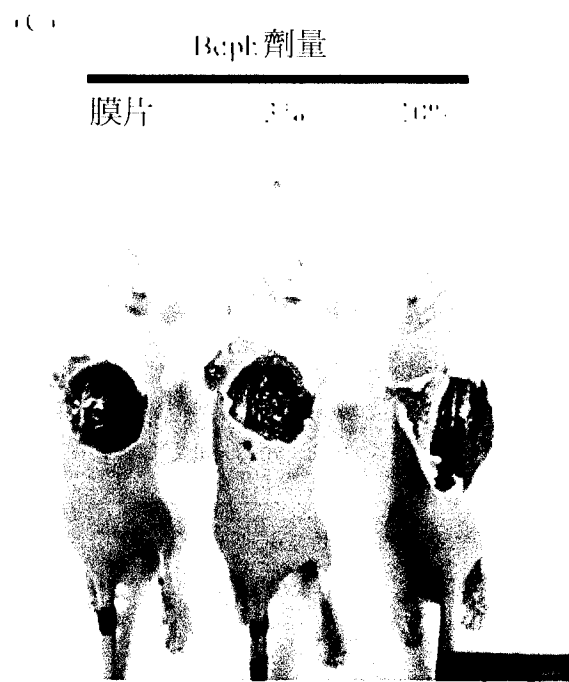


圖 10

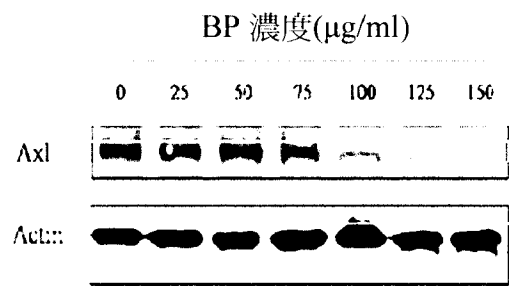


圖 11

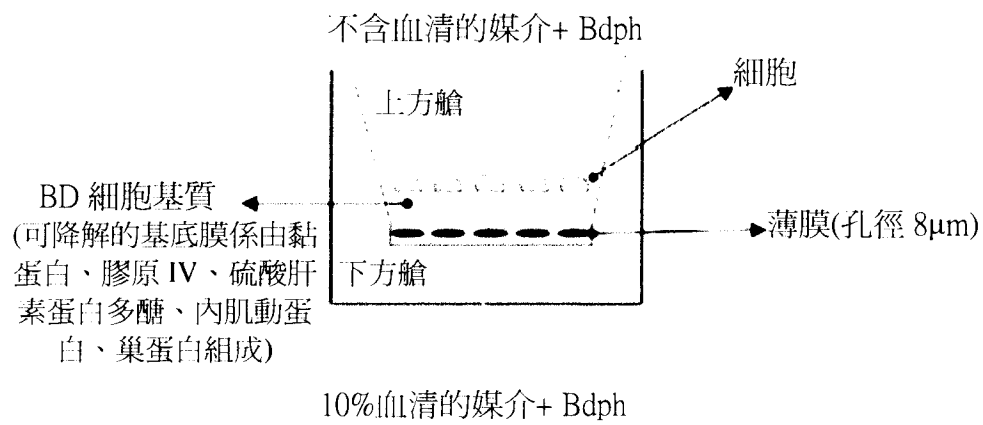


圖 12

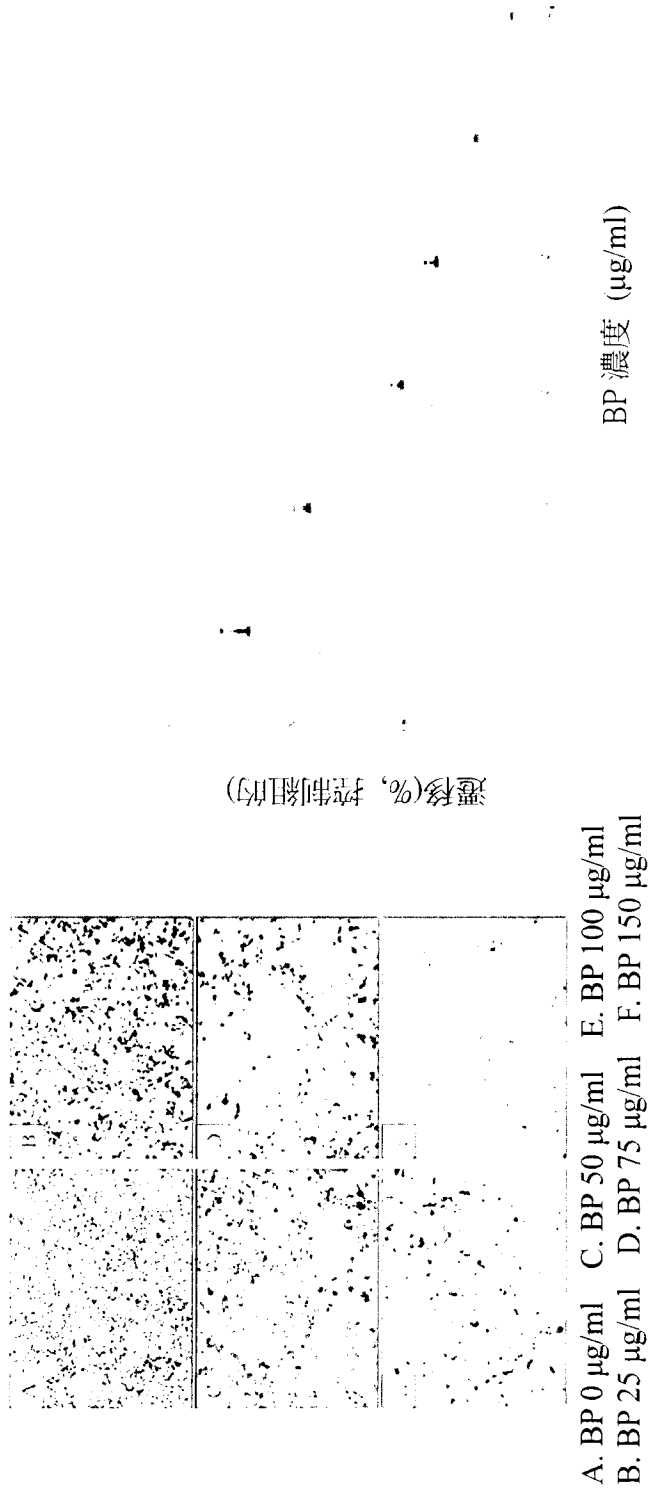


圖 13

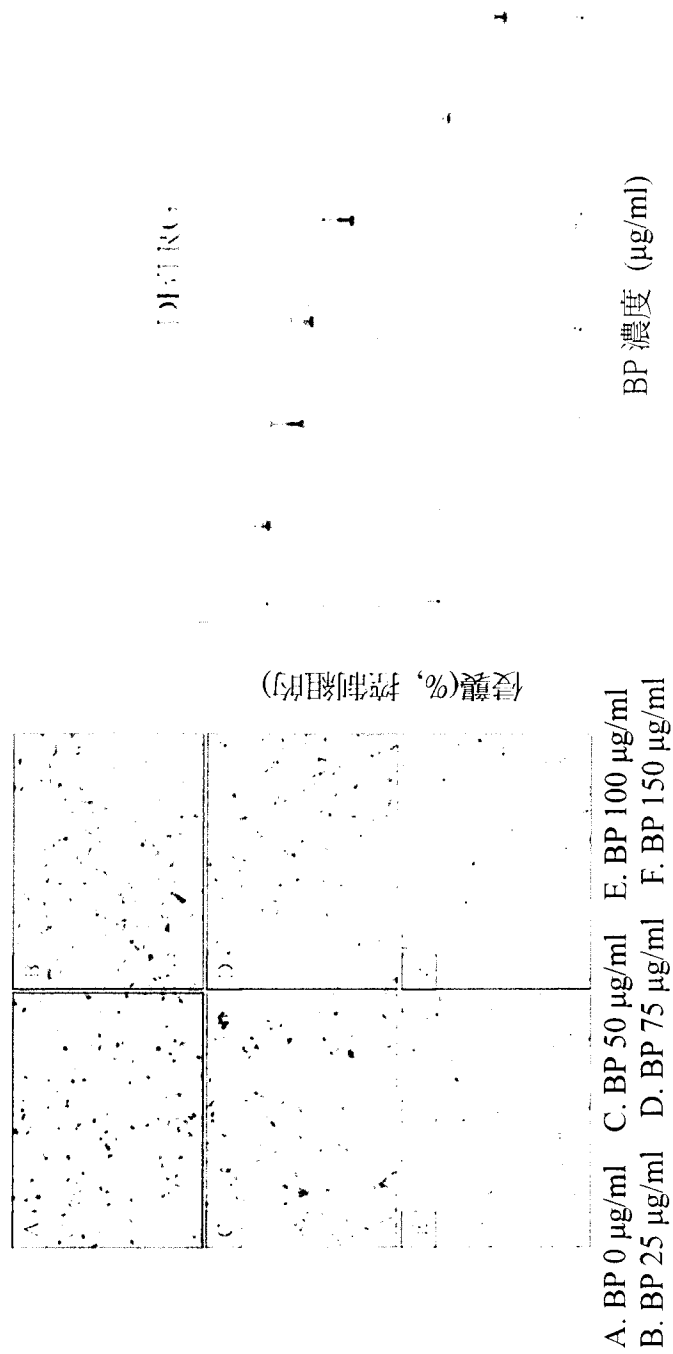


圖 14

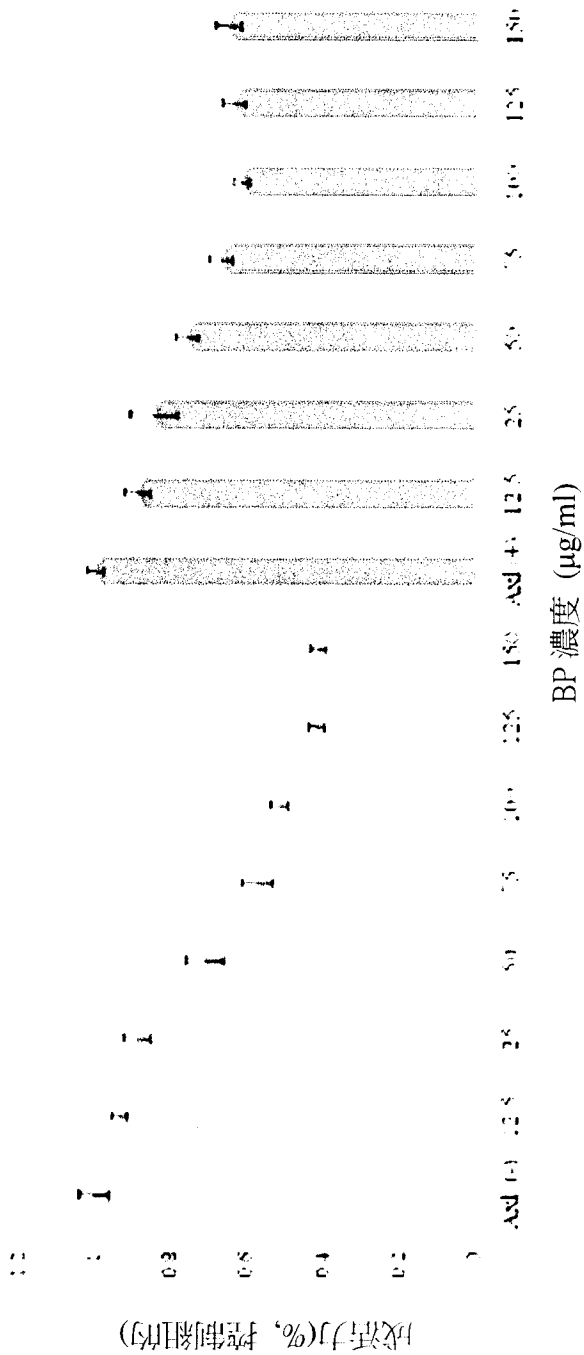


圖 15

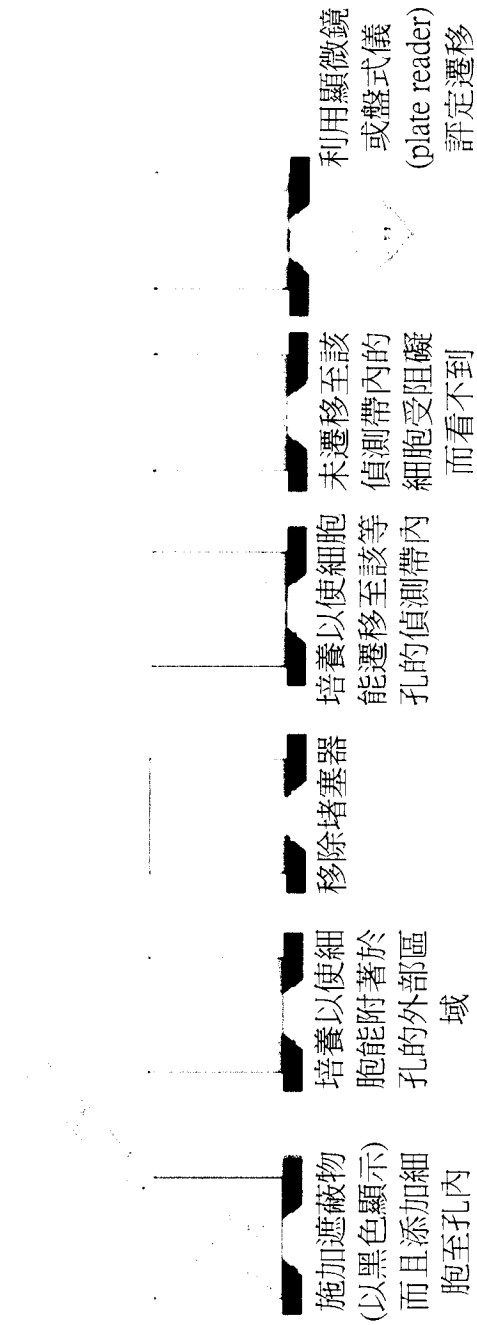


圖 16

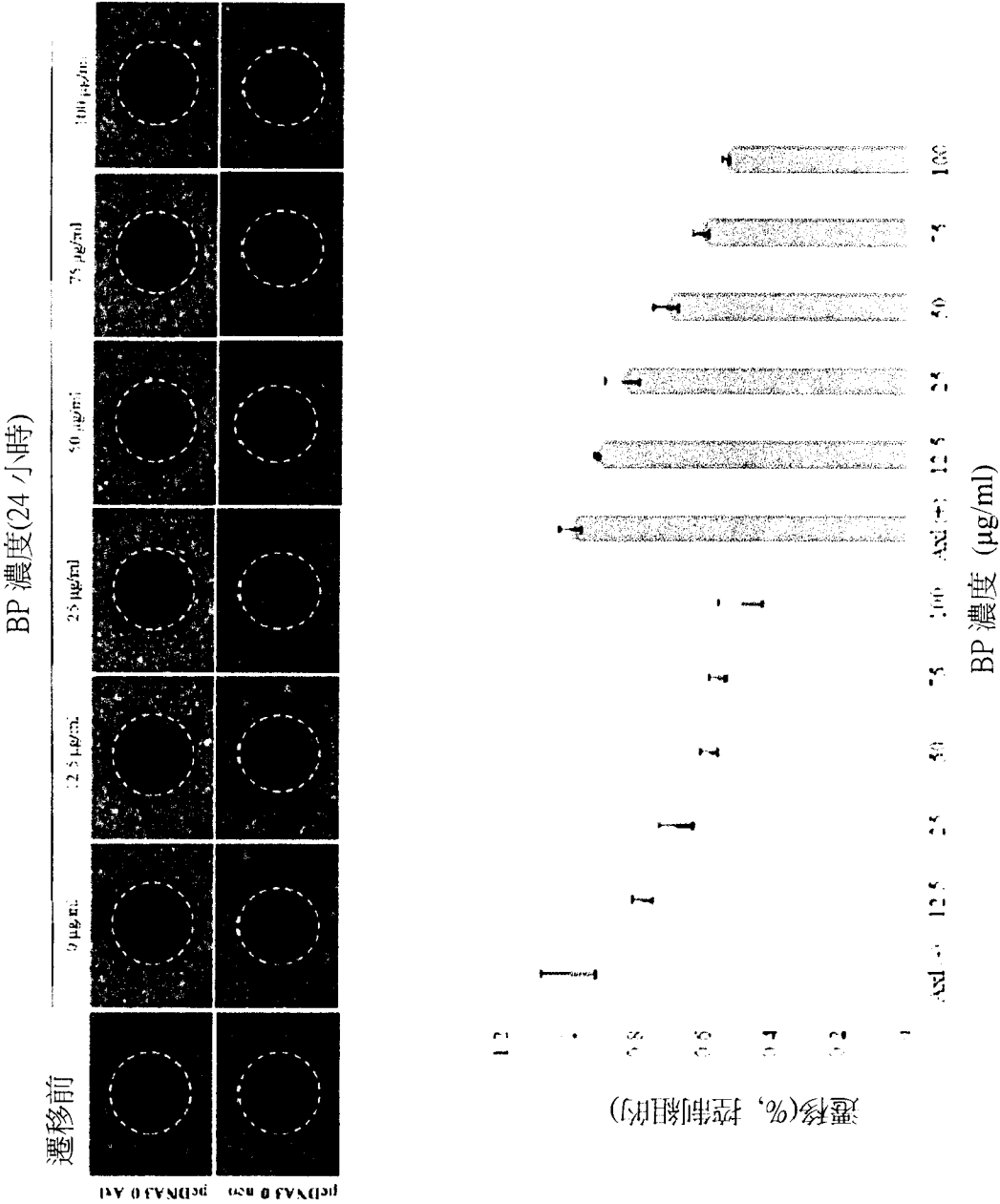


圖 17

BP 濃度(t=24 小時)

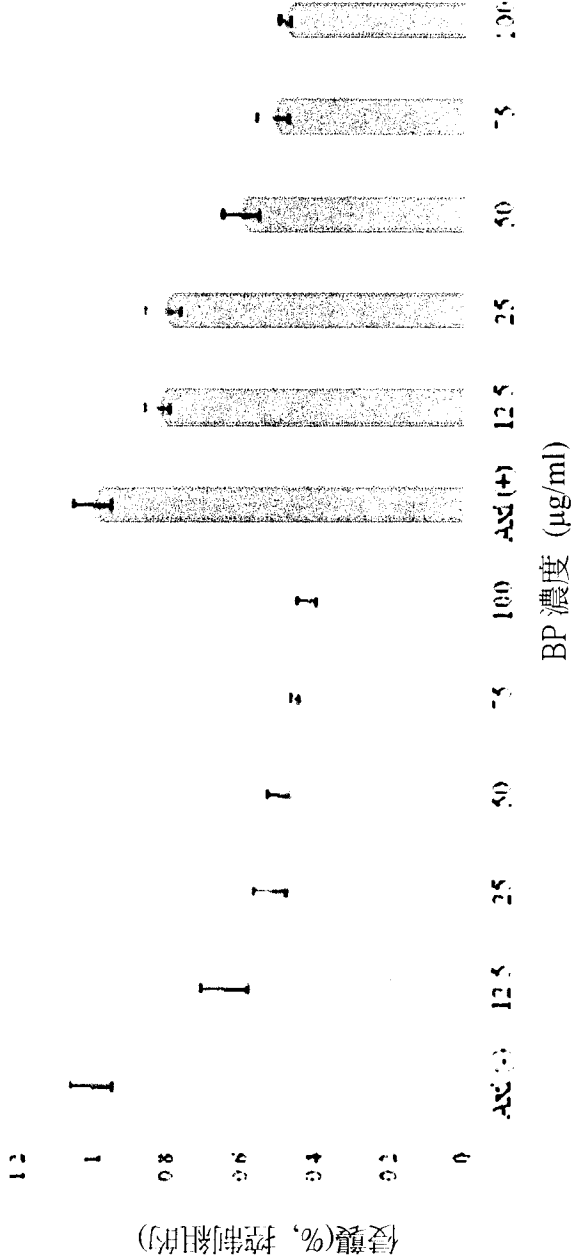
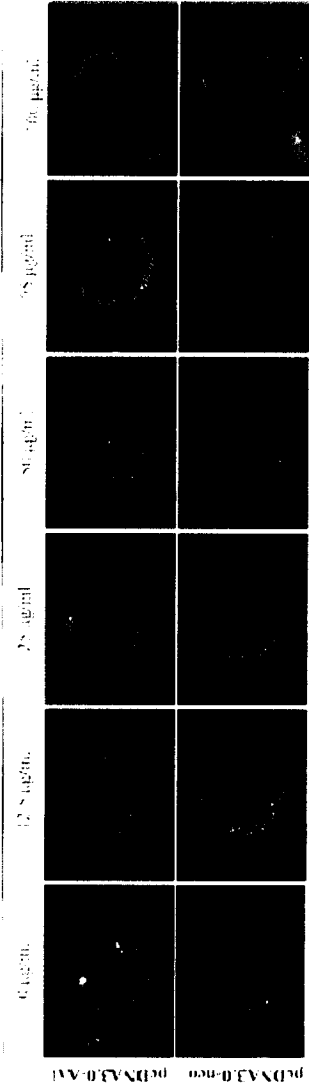


圖 18

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 4A-4D ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

[無]

的及優點顯而易見。

99年4月8日修正
補充

【實施方式】

用於實現本發明的正亞丁基苯酐在商業上可，例如，從 Lancaster Synthesis 有限公司(UK)取得。其也可從當歸的氣仿萃取物分離出來。參見，例如，Tsai 等人，Clin. Cancer Res. 2005, 11(9): 3475-3484。

該正亞丁基苯酐化合物，無論用購買或分離的方式，可進一步經由驟沸塔層析法 (flash column chromatography)、高效液相層析法、結晶法或任何其他適合方法加以純化。

用於實現本發明的聚合物可任意從商業上取得或可經由此技藝中習知的方法製備而成。舉例來說，可使二元酸化合物在醋酸酐中迴流而獲得一多元酸酐。

該聚合物可為一共聚物。有關一實例，此一共聚物可由二不同聚多元酸酐部分利用熔融聚縮合法製備而成。參見，例如，Domb 等人，Journal of Polymer science, 1987, 25: 3373-3386。

所獲得的聚合物可藉由任何適合的方法予以純化而且藉由 NMR、MS 或 FT-IR 來界定其特徵。

為了製備本發明的配方，可於想要的比例(例如，10 重量份的正亞丁基苯酐及 90 重量份的多元酸酐)下混合該亞丁基苯酐與該聚合物，例如，多元酸酐。有關另一實例，可將該亞丁基苯酐與多元酸酐溶於一溶劑(例如，二氯甲烷)

內而且接著移除該溶劑以提供一乾粉。

由此所獲得的混合物可進一步加工成各種不同的形態，例如膜片、薄片、棒、微球、奈米球、糊或膠。舉例來說，可使用一模子把該混合物壓縮成膜片。

在此使用的措辭“醫藥配方”係用於意指一組成，其(i)係適用於投藥給人類或其他哺乳動物或其可經處理，例如，殺菌，使其適用於此投藥，及(ii)包含至少一藥物(例如，正亞丁基苯酞)及上述聚合物之至少其一。此配方可為任何可遞送一藥物的裝置的部分或全部，該裝置包括丸劑、膠囊、凝膠、針劑(depot)、醫藥可植入的裝置(例如，支架(其包括自膨式支架，球囊擴張式支架、塗藥血管支架(drug-eluting stent)及覆膜支架(stent-graft))、移植(例如，主動脈移植)、人造心臟瓣膜、腦脊髓液分流器(cerebrospinal fluid shunt)、起搏點電極(pacemaker electrode)、心律調節器導線及生物吸收性植入體(bioerodable implant)等)，及外部操縱裝置(例如藥物裝置及導管，其包括可釋放藥物的導管，例如，由於加熱該導管尖端的結果)。該醫藥配方也可包括一或更多其他添加物，舉例來說醫藥上可接受的賦形劑、載劑、穿透增強劑、安定劑、緩衝劑或其他以物理方式聯合該藥物的材料，及/或用於增進該給藥形態的遞送性及/或該藥物的功效的聚合物。該配方可為，舉例來說，液體、懸浮液、如錠劑、丸劑、膠囊(包括微膠囊)的固體、乳液、微胞、藥膏、凝膠、乳液、針劑(其包括皮下植入針劑)或在植入裝置，例

如支架等，上的塗層。該配方可舉例來說被施於外部，例如以貼片的形態，或部分施於外部且部分植入的裝置，或完全植入或經皮下注入。

該措辭“藥物”意指在人類或其他哺乳動物體內局部及/或全身具有生物活性的材料。藥物的實例係揭示於 Merck Index、the Physicians Desk Reference 及美國專利案第 6,297,337 號第 11 欄第 16 行至第 12 欄第 58 行，及 US 2003/0224974 的第 0045 段中，在此為了所有目的將其全文併入本文。藥物可舉例來說為用於治療、預防、診斷、治療或減輕症狀或患病，其包括維他命及礦物質補充劑；影響哺乳動物的構造或機能的物質；前藥，在其被置於生理環境中之後變為生物活性或更具活性的物質；及藥物的代謝物。診斷劑的實例為含有放射線元素的造影劑、含有舉例來說碘、酶及螢光物質等的對比劑。

本發明的配方也可含有適合的添加物。這些添加物可於此配方的任何製備階段時包括於此配方內。為了賦予預期的效果該等添加物在此配方內的想要濃度，如熟於此藝之士所習知，可利用習用方法來分析。

本發明的配方，藉由與流體接觸，釋放出正亞丁基苯酞—抗腫瘤藥劑。因此，本發明亦係關於藉由投予有效量的此配方給有需要的病患而治療腫瘤的方法。此配方中的亞丁基苯酞係以特定時期，例如 20、30、35、40、50、60 天，緩慢且持續釋放至鄰近的組織內。

如此處所用的，該措辭“治療”係定義為投予有效量的

此配方給病患，該病患患有腫瘤、腫瘤徵兆、腫瘤衍生的疾病或症狀或易患腫瘤的體質，以達到治癒、緩和、減輕、醫治或改善腫瘤、腫瘤徵兆、腫瘤衍生的疾病或症狀或易患腫瘤的體質的目的。

“病患”指的是人或非人動物。非人動物的實例包括所有脊椎動物，例如，哺乳物，諸如非人靈長類動物(特別是高級靈長類動物)、狗、齧齒類動物(例如，小鼠或大鼠)、天竺鼠、貓及非哺乳動物類，諸如鳥類、兩棲動物、爬行動物等等。在較佳的具體實施例中，該病患為人類。在另一具體實施例中，該病患為實驗動物或適合當作疾病模型的動物。待治療腫瘤、癌或其他細胞增殖症狀的病患可經由由此症狀的標準診斷技術加以辨別。

腫瘤為經由細胞的不正常生長所形成的瘤或病害。其可能為良性瘤或惡性瘤(亦即，癌)。癌指的是一疾病的種類，其中一群細胞展現不受控制的生長、侵害及有時候轉移。能治療的癌的實例包括，但不限於，多形神經膠胚細胞瘤、肺癌、肝細胞癌、結腸癌、黑色素瘤、乳腺癌、神經胚細胞瘤、畸胎瘤或人類白血病。

該措辭“有效量”指的是賦予待治療的病患治療效果的配配方或化合物量。治療方法可於體內或體外進行，單獨或與其他藥物或治療法聯合。在體內方法中，將一化合物或配方投給一病患。一般而言，該化合物或配方係製備於醫藥上可接受的載劑(例如，生理食鹽水)中而且經口或經由靜脈注射投予，或經皮下、肌肉內、鞘內、腹膜內、直

腸內、葉鞘內、鼻內、胃內、氣管內或肺內注射或植入。

較佳地，該配方可經皮下、肌肉內、靜脈內、組織間或顱內植入癌症患者體內。在一具體實施例中，該配方，以各種不同形態，可被植入該癌症部分或其近處而不管該腫瘤有沒有被移除。

所需的劑量取決於投予途徑的選擇；該配方的本質；該患者患病的特質；該病患的體型、重量、表面積、年齡及性別；其他被投予的藥物；及主治醫師的意見。適合的劑量為在 0.01 至 100 mg/kg 的範圍內。所需劑量的變化能綜觀各式各樣可取得的化合物及各種不同投予途徑的效率而預期。

該配方可配合手術或放射線治療一起使用。也可與一或更多其他化學治療藥劑合併。該等化學治療藥劑可為，舉例來說，如拓撲替康 (topotecan) 的喜樹鹼類 (camptothecins)、如都沙辛 (doxorubicin) 的蒽環類抗生素 (anthracycline antibiotics)、如環磷醯胺的烷化劑類或如紫杉醇 (paclitaxel)、帝摩多 (temozolomide) 或卡氮芥 (carmustin) 的抗微管藥劑 (antimicrotubule agent)。

不用進一步闡明，咸相信上述說明已經能適當完成本發明。因此，將下列實施例解釋為僅為例示，而且不會以任何方式限制揭示內容的其餘部分。在此所引用的所有刊物在此以引用方式將其全文併入本文。

實施例 1：聚合物的合成

SA 預聚物

SA 單體由乙醇再結晶兩次。使 2.7 g SA 單體在 60 ml 醋酸酐中於 135 至 140°C 時在真空(10^{-4} 托耳)之下迴流 30 分鐘。把未反應的醋酸酐移除。使 SA 預聚物在真空之下於 60°C 時乾燥而且接著溶於乾燥甲苯中。將此溶液加至於體積比 1:10 的無水乙醚與石油醚的 1:1 v/v 混合物而且使其靜置過夜而使該 SA 預聚物(10:1 v/v)沈澱出來。等該乙醚及石油醚被移除之後，使該 SA 預聚物在真空之下乾燥。

CPP 預聚物

使 3 g CPP 單體以 50 ml 醋酸酐於 150°C 時在真空(10^{-4} 托耳)之下迴流 30 分鐘。冷卻之後，過濾該反應混合物。藉由移除一些未反應的醋酸酐而濃縮濾液而且使該 CPP 預聚物於 0°C 下結晶化。移除剩餘的未反應的醋酸酐。以醚清洗該 CPP 預聚物而且在真空之下乾燥。將 DMF 及無水乙醚(DMF: 無水乙醚=1:9)依序加至該 CPP 預聚物。經過 12 小時之後，移除 DMF 及乙醚而且再度使該 CPP 預聚物晶體在真空之下乾燥。

p(CPP-SA)共聚物

把比例 20:80 的 CPP 預聚物及 SA 預聚物填入一玻璃試管(2×20 cm)內而且於 180°C 下在一油浴內加熱 1 分鐘。把壓力降至 10^{-4} mmHg。在整個聚合過程中每 15 分鐘消除真空。以二氯甲烷清洗該試管而且接著添加石油醚以使

p(CPP-SA)共聚物沈澱出來，以無水乙醚清洗該共聚物而且在真空之下乾燥。

藉由 IR 及 ^1H NMR 來定義該 p(CPP-SA)共聚物的特徵。參見圖 1 及 2。在此 IR 光譜研究中，於 1812.76 cm^{-1} 下觀察到酸酐鍵的特徵信號。在此 ^1H NMR 光譜研究中，於 6.9 至 8.2 ppm 下觀察到 CPP 的芳香族部分的特徵信號而且於 1.3 ppm 下測得 SA 的亞甲基部分的特徵信號。再者，根據該 ^1H NMR 光譜研究中的 CPP 及 SA 的特徵峰強度鑑別出該共聚物內的 CPP 及 SA 的比例為 1:4 至 1:5。

Bdph-p(CPP-SA)配方

使 p(CPP-SA)聚合物與 Bdph 混合以提供含有以重量計 3% 或 10% 的 Bdph 的混合物。也製備成含有 97% p(CPP-SA) 及 3% 1,3-雙(2-氯乙基)-1-亞硝基脲(BCNU)的混合物。使該混合物以 10% (w/v) 的濃度溶於二氯甲烷中。使該溶液在真空之下乾燥 72 小時。如 Walter 等人, Cancer Res. 1994, 54(8): 2207-12; Leong 等人, J Biomed Mater Res. 1985, 19(8): 941-55; 及 Storm 等人, J Neurooncol. 2002, 56(3): 209-17 中所說明的，利用不銹鋼模(內徑，13 mm)在 Carver Press 的輕微壓力之下於 200 psi 下壓縮由此所獲得的乾燥粉末以形成 Bdph p(CPP-SA)圓盤(100 mg/圓盤)。

實施例 2：釋放動力學

把 Bdph-p(CPP-SA)圓盤 置於具有 1.0 ml 的 0.1 M 磷

酸鹽緩衝食鹽水(pH 7.4)及 1.0 ml 正辛醇的閃爍瓶內而且於 37°C 下培養。藉由新鮮緩衝液於各不同時間點時替換該溶液。如 Weingart 等人, Int. J. Cancer. 1995, 62(5): 605-9 中說明的, 利用一光譜儀測量於 310 nm 的波長下的吸收度以測量 Bdph 於該緩衝液中的濃度。獲致 Bdph 持續釋放。參見圖 2。

實施例 3：體內控制釋放及細胞毒作用(Cytotoxic effect)

進行分析以檢查 p(CPP-SA)-10% Bdph 對於惡性神經膠質瘤 RG2 的生長抑制作用。據發現該 p(CPP-SA)-10% Bdph 的生長抑制作用與控制組相比為 50%。此外, 在 p(CPP-SA)-10% Bdph 的治療之後觀察經逐漸改變及卸下的培養平板底部的 GBM 腫瘤細胞之形態學(圖 4)。比起未反應的細胞, 大部分卸下的 GBM 細胞在經過 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療之後凋亡(圖 4B & C)。

注意數據係表示成平均值 $\pm$ SD 或 SE (分別為標準偏差及標準誤差)。經由學生氏 t-檢定(Student's t-test)及 Mantel-Cox 檢定來分析統計顯著性。利用 Kaplan-Meier 方法進行存活分析。將 <0.05 的 P 值視為顯著的。

實施例 4：凋亡途徑及由 p(CPP-SA)-Bdph 所誘發的 Nurr 移位

為了確認以寡聚合去氧核苷酸為基礎的微陣列分析的結果, 藉由 RT-PCR 檢查經 Bdph 治療的 RG2 細胞內的孤兒

胞的細胞形態學。(D)利用 p(CPP-SA)-10% Bdph 治療 24 小時的 RG2 惡性神經膠質瘤細胞的細胞形態學。

圖 5 為顯示 Bdph-誘發 Nur77 轉錄的照片。以 IC_{50} 濃度的 Bdph 治療大鼠 GBM 細胞(RG2)達到指定時間(0、0.5、1、3 及 6 小時)。以藥物培養之後，收集細胞而且分離出全部 RNA。用 GAPDH 當作內標準物。

圖 6 為顯示 Bdph-誘發 Nur77 從細胞核遷移至細胞質的一組照片，其中以 Bdph (100 μ g/mL)治療 DBTRG-05NG 細胞 24 小時，接著以抗-Nur77 抗體然後對應的 Rhodamine-標記的-IgG 二級抗體進行免疫細胞化學染色以顯示 Nur77 蛋白。同時，以 DAPI 把細胞染色以顯示出細胞核。以螢光顯微鏡把螢光影像視覺化。

圖 7 為顯示 Bdph-誘發 RG2 細胞內的 Nur77 核質移位的一組照片。把 RG2 細胞植入 10cm 碟子內而且培養至 90% 聚滿(confluence)。以 Bdph (100 μ g/ml)治療細胞達到不同時期(0、6、12、24 及 48 小時)。獲取細胞而且分離出細胞核及細胞質部分。用西方氏墨漬分析法監視測定細胞核及細胞質的 Nur77 的量。

圖 8 為顯示該 Bdph-誘發生長抑制中的發信途徑的影響的一組照片。依指示以 Bdph (100 μ g/ml)治療 RG2 細胞達到 0 至 180 分鐘的各種不同時期。為 pJNK、pPKC、pAKT、AKT、pERK、ERK、JNK、pp38 及 p38 抗體進行西方氏墨漬分析。用 β -肌動蛋白的表現當作內控制組。

圖 9A 至 9C 為顯示經由同基因大鼠 GBM 模型中的

p(CPP-SA)-Bdph 抑制腫瘤生長的圖形及一組照片。同基因 F344 大鼠 (6 隻/組) 接受 1×10^6 個 RG2 細胞的皮下背部植入體。把 RG2 細胞 (5×10^6) 皮下植入 F344 大鼠的後側腹內。在 RG2 細胞移植 5 日之後，僅植入 RG2 細胞的 7 大鼠為控制組 (●) 而且其他大鼠分別以膜片 (□)、3%Bdph-膜片 (▲)、10%Bdph-膜片 (■) 及 3% BCNU-膜片 (×) 治療。圖 9A 把該腫瘤大小表示成具有標準偏差的平均值。圖 9B 中的體重也表示成具有標準偏差的平均值。圖 9C 於 GBM 組織內進行免疫組織化學染色的分析 (於該 RG2 細胞植入之後第 30 日)。該膜片組、3% Bdph-膜片組、10% Bdph-膜片組及 3% BCNU-膜片組的片段的代表性照片。GBM 腫瘤 (對於 ki-67 的免疫組織化學染色)、分裂的硫脲氨酸蛋白酶 3 及 Nur77。把該 Ki-67-、分裂的硫脲氨酸蛋白酶 3-或 Nur77-正性細胞染成褐色 (400x)。

圖 10A 至 10D 為顯示 p(CPP-SA)-Bdph 抑制異種皮移植人類 GBM 裸小鼠模型中的腫瘤生長的圖形及一組照片。把 DBTRG-05MG 細胞 (2×10^6) 皮下植入裸 Foxn1 nu/nu 小鼠的後側腹區域內。在 DBTRG-05MG 細胞移植 5 日之後，分別以膜片 (◆)、3%Bdph-膜片 (■) 及 10%Bdph 膜片 (▲) 治療小鼠。(A) 把該腫瘤大小表示成具有標準偏差的平均值。(B) 體重也表示成具有標準偏差的平均值。(C) 及 (D) 照片顯示以該膜片、3% Bdph-膜片或 10% Bdph-膜片治療裸小鼠體內的腫瘤。P<0.01.

圖 11 為顯示 Bdph 調降 Axl 蛋白表現的西方氏墨漬法

結果的一組照片。

圖 12 顯示評估腫瘤細胞遷移及侵襲分析的孔杯系統。

圖 13 為顯示 Bdph (簡稱 BP) 以劑量相依的方式抑制腫瘤細胞遷移的一組照片及圖形。

圖 14 為顯示 Bdph 以劑量相依的方式抑制腫瘤細胞侵襲的一組照片及圖形。

圖 15 為顯示藉由 DBTRG 腦瘤細胞內的 Axl 表現逆轉 Bdph 抑制的腫瘤細胞增殖的圖形。

圖 16 為顯示用於偵測細胞遷移及侵襲的 Oris™ 系統的一組照片及圖形。

圖 17 為顯示 Bdph 抑制的細胞遷移可能以劑量相依的方式被 DBTRG 腦瘤細胞內的 Axl 表現逆轉的一組照片及圖形。

圖 18 為顯示 BP 抑制的細胞侵襲可能被 DBTRG 腦瘤細胞內的 Axl 表現逆轉的一組照片及圖形。