



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1649612 B

(45) 授权公告日 2011.04.06

(21) 申请号 03809495.9

加利娜·亚历山德罗芙娜·热尔图金娜

(22) 申请日 2003.02.28

(30) 优先权数据

2002105392 2002.02.28 RU

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004.10.27

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/RU2003/000072 2003.02.28

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

WO2003/072124 RU 2003.09.04

(56) 对比文件

EP 1020179 A2, 2000.07.19, 权利要求 1-7, 11-13, 15-16 和 20-22, 以及实施例 31, 32 和 37.

(73) 专利权人 制药有限责任公司

地址 俄罗斯联邦莫斯科

审查员 幸颖

(72) 发明人 弗拉迪米尔·叶夫根尼耶维奇·涅博利辛

维拉·安德列芙娜·戈尔布诺娃

伊万·德米特耶维奇·特里斯查林

纳坦·坦弗列维奇·赖赫林

奥古斯特·米哈伊洛维奇·加林

马克·鲍里索维奇·贝奇科夫

伊莲娜·米哈伊洛夫娜·特里斯查林娜

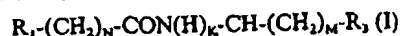
权利要求书 3 页 说明书 35 页

(54) 发明名称

细胞分化的诱导方法

(57) 摘要

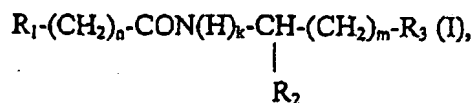
本发明涉及细胞分化的诱导方法, 该方法注射具有下列通式 (I) 的肽衍生物, 用作分化诱导因子。所述肽衍生物用于治疗肿瘤学疾病, 特别是用于使黑瘤生长稳定, 增加黑瘤免疫疗法的效率, 减少化疗的血液学毒性。还公开了所述肽衍



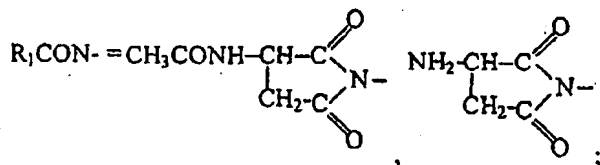
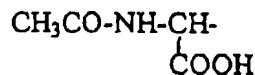
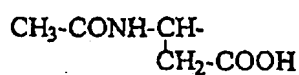
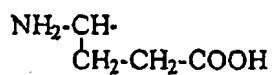
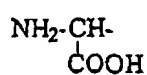
生物的应用。

R₂

1. 下列通式 (I) 肽衍生物或其药学上可接受的盐用于制造治疗黑色素瘤和造血组织增殖的药物的用途,

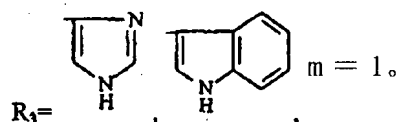


其中 $R_1 = NH_2CH_2-$ 、 $HOOC-CH_2-$ 、 $CH_3CONH-CH_2-$ 、 $CH_3OCO-CH_2-$ 、



$n = 0, 1, 2$; $k = 0, 1$;

$R_2 = H, COOH, COOCH_3$;



2. 如权利要求 1 所指定的通式 (I) 肽衍生物的用途, 所述药物用于与化疗过程联合以减少血液学毒性。

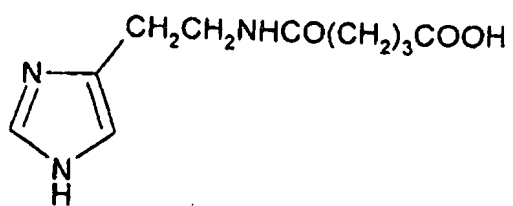
3. 如权利要求 1 所指定的通式 (I) 肽衍生物的用途, 所述药物用于使黑色素瘤和造血组织增殖的生长稳定。

4. 如权利要求 1 所指定的通式 (I) 肽衍生物的用途, 所述药物用于与干扰素联合以增强黑色素瘤和造血组织增殖的免疫疗法的功效。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项的用途, 其中所述肽衍生物选自

化合物	R ₁	n	k	R ₂	m	R ₃
1	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	H ₃ CO-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
3	H ₃ CO-CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
4	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
6	H ₃ CO-CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
7	H ₃ CO-CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
8	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
9	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
11	NH ₂ -CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
12	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
13	H ₃ CO-CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	$\text{CH}_3\text{-CONH-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
15	$\text{R}_1\text{CON-CH}_2\text{CONH-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-C(=O)-N-}$	0	0	H	1	-4-Im
16	$\text{R}_1\text{CON-CH}_2\text{CONH-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-C(=O)-N-}$	0	0	H	1	-4-Im
17	CH ₃ CONH-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
18	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	1	1	H	1	-4-Im
19	CH ₃ OCO-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
20	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)
21	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-3-Ind

6. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述肽衍生物是下式化合物



细胞分化的诱导方法

[0001] 本发明涉及药物,特别是用于治疗癌症疾病,它可用于治疗不同起源的肿瘤。

[0002] 本发明涉及使用肽衍生物作为细胞分化诱导剂诱导细胞分化的方法,特别是它们在抗肿瘤非细胞毒性疗法中的应用。

[0003] 已知在大多数肿瘤细胞中分化能力的缺乏会导致无法控制的肿瘤生长。

[0004] 寻找特异性与非特异性的细胞分化诱导剂因此是新颖的抗肿瘤非细胞毒性疗法之一。

[0005] “细胞分化的诱导”一般是不同物质恢复(或驱动)下列因各种原因而丧失或降低的功能的能力:经过正常的细胞周期、其中生物活性重要物质的合成等。

[0006] 作用机理不与一种特定细胞功能有关并且能够由若干参数导致其分化的物质或化合物可以归属于非特异性分化诱导剂。

[0007] 通过给以类视黄醇或 α -2-干扰素诱导肿瘤细胞分化的方法是已知的(Cancer Res., 40, 2245-3350, 1980)。

[0008] 细胞分化诱导剂聚反式视黄酸(PTRA)被用作延长急性前髓细胞性白血病的诱导或缓解后疗法之后的缓解的成分。受视黄酸衍生物影响的细胞分化引起肿瘤细胞生长的稳定化(Abelev G. I. Differentiation and tumor phenotype in cells of leukoses and lymphomas, The Clinical Oncohematology (ed. M. A. Volkova), Moscow, the Meditsina publishers, 2001, Chapter 11, pages 116-123)。

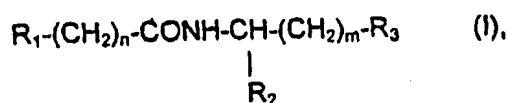
[0009] α -干扰素制备物在治疗黑瘤(黑色素瘤)中作为免疫治疗剂的应用也与肿瘤细胞分化的诱导有关,其中粘连能力得到增强,抗原属性发生改变。干扰素疗法导致肿瘤生长进展减少,以及防止转移的形成和比率(Atzpodien J., Kirchner H. Cancer, Cytokines and cytotoxic cells: interleukin-2 in the immunotherapy of human neoplasms. Klin. Wochenschr, 1990, v. 68, pp. 1-7)。

[0010] 由于细胞毒性化学疗法而导致造血细胞分化损伤的制备物最近已被引入到临床实践中。这些制备物是从骨髓制备的不同细胞因子,例如血液激素类:粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和其他。它们在治疗不同人肿瘤中的应用导致骨髓细胞的成熟加速,防止化疗制备物的血液学细胞毒性(Crawford j., Ozer H., Stoller R. et al. Phase II of clinical investigation of GM-CSF by the patients of SCLC with the dose-intensive the chemotherapy. The New England Journal of Medicine. 1991, v. 325, No. 3, pp. 164-170)。

[0011] 因而,肿瘤细胞分化的诱导是化疗制备物的赘生物生长稳定化、增加免疫疗法效果和纠正血液学毒性的主导机理之一。

[0012] 本发明人已经发现,通式(I)肽衍生物:

[0013]

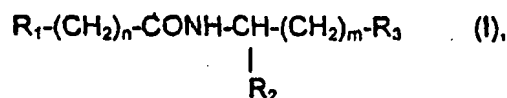


[0014] 是细胞分化的有力诱导剂,可用作癌症疾病非细胞毒性疗法的成分,特别是黑瘤

和造血组织增殖,以及血液纠正剂。

[0015] 式 (I) 化合物

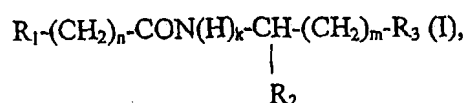
[0016]



[0017] 在国际申请 PCT/RU98/00215 中被公开为具备抗氧化、抗气喘、抗低氧、抗炎、抗病毒、抗菌、脂质调节、抗转移以及其他治疗效果。环状天冬氨酰-组胺和乙酰-天冬氨酰-组胺结构的化合物公开在下列著作中:Kvamme, E.; Reichelt, K. L.; Edminson, P. D.; et al. N-substituted peptides in brain. Fed. Eur. Biochem. Society Meet., [Proc.], 1975, 41, 127-136。

[0018] 本发明涉及诱导细胞分化的方法,包含有效量通式 (I) 化合物

[0019]



[0020] 或其药学上可接受的盐作为活性成分的给药,

[0021] 其中 R_1 是被官能团取代的 C_1-C_3 烃原子团,取代基选自氨基、 C_1-C_5 酰氨基或羧基,羧基可选地被醚化,氨基可选地被酰基取代基取代;或者同时被氨基和羧基取代的 C_1-C_3 烃原子团,氨基可选地被酰基取代基取代,羧基可选地包括在 C_5-C_6 元环状酰亚胺中,该酰亚胺包括 N-末端氨基或 $-CONH-$ 基团的 $-NH-$ 基团;或者被 5-6 元不饱和杂环基团取代的 C_1-C_3 烃原子团,烃原子团可以同时包含可选被酰基取代基取代的氨基;或者

[0022] R_1 是饱和的杂环基团;

[0023] R_2 是氢原子或官能团,选自可以被醚化的羧基;

[0024] R_3 是 5-6 元饱和或不饱和环状或杂环基团,或者氨基或羧基,羧基可选地被醚化;

[0025] $n = 0-4$, $m = 1-4$, $k = 0-1$ 。

[0026] 在优选的实施方式中,本发明涉及细胞分化的诱导方法,包含有效量 4-[N-(2-咪唑-4-基)乙基)氨甲酰基]丁酸 (Dicarbamine ®) 作为活性成分的给药。

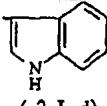
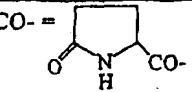
[0027] 优选用在本发明中的通式 (I) 化合物是下式通式 (I) 化合物:

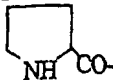
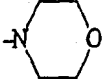
[0028]

化合物 编号	R_1	n	k	R_2	m	R_3
1	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-4-Im
3	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	1	1	H	1	-4-Im
4	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
6	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
7	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	1	1	-COOH	1	-4-Im
8	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-4-Im
9	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
10	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	1	1	-COOH	1	-4-Im
11	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	1	1	H	1	-4-Im

12	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-4-Im
13	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	$\text{CH}_3\text{-CONH-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
15	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{CH}_3\text{CONH-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-C(=O)-N-}$	0	0	H	1	-4-Im
16	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-C(=O)-N-}$	0	0	H	1	-4-Im

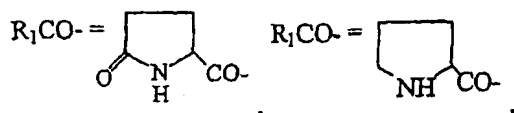
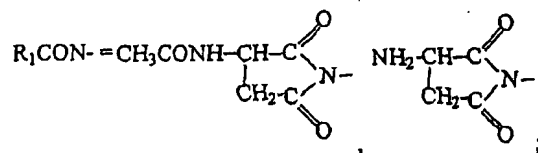
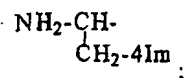
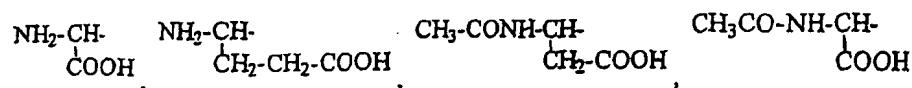
[0029]

17	$\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-4-Im
18	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	1	1	H	1	-4-Im
19	$\text{CH}_3\text{OCO-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-4-Im
20	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)
21	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-3-Ind
22	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-3-Ind
23	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-3-Ind
24	$\text{R}_1\text{CO-}$ 	0	1	H	1	-3-Ind
25	$\text{COOH-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-3-Ind
26	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-3-Ind
27	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-C ₆ H ₅
28	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	 (-Py)
29	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-Py
30	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-Py
31	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	4	-NH ₂
32	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-4Im}$	0	1	H	1	-COOH

33	$\text{R}_1\text{CO-}$ 	0	1	H	1	-4-Im
34	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	
35	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-4Im}$	0	1	H	1	-COOCH ₃
36	$\text{CH}_3\text{CO-NH-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-4-Im
37	$\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2\text{-}$	1	1	-COOH	1	-4-Im
38	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4	1	H	1	-4-Im

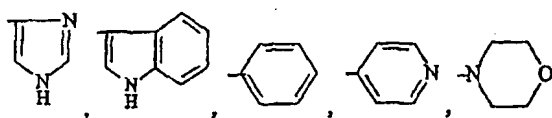
[0030] 更优选用在本发明中的通式 (I) 化合物是这样的通式 (I) 化合物, 其中 $\text{R}_1 = \text{NH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 、 $\text{HOOC-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{CH}_3\text{OCO-CH}_2\text{-}$ 、

[0031]



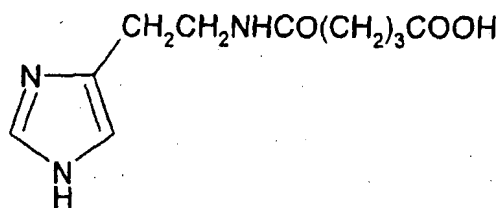
[0032] $n = 0-4; k = 0-1$

[0033] $\text{R}_2 = \text{H}, \text{COOH}, \text{COOCH}_3;$

[0034] $\text{R}_3 =$  $\text{NH}_2, \text{COOH}, -\text{COOCH}_3, m = 1-4.$

[0035] 最优选用在本发明中的化合物是

[0036]



[0037]

(Dicarbamine®).

[0038] 在优选的发明实施方式中,将通式(I)肽衍生物在0.5-5.0mg/kg体重单一剂量下长期给药。

[0039] 在另一种优选的发明实施方式中,将通式(I)肽衍生物与化疗联合给药。

[0040] 优选的发明实施方式还是细胞分化的诱导方法,其中为了使恶性肿瘤生长稳定,特别是黑瘤或造血组织增殖,当化疗的能力已经耗尽时,将通式(I)肽衍生物在0.5-5.0mg/kg体重单一剂量下给药至少15天。

[0041] 将通式(I)肽衍生物与免疫治疗剂干扰素联合给药导致其关于恶性肿瘤细胞的功效增强,特别是黑瘤。

[0042] 另一种优选的本发明实施方式是细胞分化的诱导方法,其中为了增强黑瘤免疫疗法的功效,将通式(I)肽衍生物在0.5-5.0mg/kg体重剂量下给药不少于15天,并且一起给以干扰素。

[0043] 优选的本发明实施方式还是诱导细胞分化的方法,其中为了降低血液学毒性,在化疗过程开始之前、化疗期间和化疗过程与下一细胞毒性疗法过程之间,将通式(I)肽衍生物在0.5-5.0mg/kg体重单一剂量下每日给药。

[0044] 下面提供实施例,阐述优选的本发明实施方式。

[0045] 实施例 1:通式 (I) 肽衍生物对黑瘤 M-6 细胞分化的活性

[0046] 研究是针对体重 20-22 克的 10-12 周龄无胸腺 (裸) 雌性 Balb/C 小鼠进行的 (由隶属于 N. N. Blokhin of the Russian Academy of Medical Sciences (RAMS) 的 Russian Cancer Research Center (RCRC) 繁殖)。预先从原始临床材料获得人黑瘤株,从 RAMS RCRC 的肿瘤株库取得,移植给无胸腺“裸”鼠。将肿瘤用含有活性台盼蓝染剂的 Versen 溶液分解,皮下接种给小鼠,每只小鼠 1.6 百万个细胞。

[0047] 每日利用金属探针将 Dicarbamine 对小鼠胃内给药,剂量为 1.0mg/kg,开始于肿瘤接种前 4 天,之后达 10-11 天 (给药过程多达 15 天)。在最后一次给药后 12、24 和 48 小时内,将小鼠用乙醚麻醉处死。

[0048] 在实验中用到 4 组小鼠:

[0049] 第 1 组 - 对照,没有 Dicarbamine 给药。按照与接受 Dicarbamine 的组相同的期限处死小鼠。

[0050] 第 2 组 - 将 Dicarbamine 给药,在给药终止后 12 小时内处死小鼠。

[0051] 第 3 组 - 将 Dicarbamine 给药,在给药终止后 24 小时内处死小鼠。

[0052] 第 4 组 - 将 Dicarbamine 给药,在给药终止后 48 小时内处死小鼠。

[0053] 测定四种形态学参数,即含有色素的细胞数、具有细胞凋亡迹象 (分化的能力) 的细胞数、有丝分裂 (增殖活动) 的数量和坏死面积,以监测对照组和 Dicarbamine 组动物 M-6 黑瘤的分化和增殖程度。这些参数是动态测定的,利用作为整体迹象的一般肿瘤生长形态图加以校正。为此,从小鼠中取出肿瘤,置于福尔马林中,进行组织学加工,用于光学显微镜检查。所得数据如表 1 所示。

[0054] 表 1

[0055] M-6 黑瘤的形态学参数 (光学显微镜检查)

[0056]

参数 (%)		Dicarbamine 撤除后所经过的时间		
		12 小时	24 小时	48 小时
坏死面积	对照	1-2	2-3	3-5
	Dicarbamine 给药后	6-7	7-9	8-10
有丝分裂	对照	3-5	3-5	3-5
	Dicarbamine 给药后	3-5	3-5	3-5
编程性 细胞死亡	对照	0.1-0.2	0.1-0.2	0.1-0.2
	Dicarbamine 给药后	0.1-0.2	0.2-0.3	0.2-0.3
含有色素 的细胞	对照	1-2	1-2	2-3
	Dicarbamine 给药后	2-3	2-4	3-5

[0057] 所进行的研究允许发明人确定,接种给裸鼠的人黑瘤在第 9 天形成由多形核白细胞组成的肿瘤,生长在连续的视野中,具有显著的基质发育。统计肿瘤中的小坏死部位,与

12 和 24 小时的处死期限（分别为 1-2% 和 2-3%）相比，这些部位在 48 小时后有轻微增加（至多为切片面积的 3-5%）。在全部生长阶段期间，在肿瘤中观察到 3-5% 的有丝分裂。细胞凋亡有轻微表现。很少见到含有色素的细胞，它们的数量在第一天不超过 1-2%，仅在生长 48 小鼠后增加至 2-3%。因而，在此期间黑素生成的强度是显著的。所得特征可以得出结论，黑瘤是一种迅速生长的肿瘤，实际上丧失了细胞凋亡程度基础上、更是在黑素生成的基本功能能力基础上的分化能力。

[0058] 通过计数肿瘤切片中含有黑素的细胞数，在黑素生成强度的基础上评估 Dicarbamine 对黑瘤细胞分化的效果。为此，切除小鼠中的肿瘤，置于戊二醛中，进行组织学加工，用于电子显微镜检查。按照下列方程，计算所制备的切片中反映细胞分化程度的黑素生成强度指数 (MGII)：

[0059] $MGII = NCM \times NM$

[0060] 其中：NCM 是含有黑素体的细胞数；

[0061] NM 是每细胞中黑素体的平均数。

[0062] 利用这种指数进行黑素生成分析，如表 2 所示。

[0063] 表 2

[0064] Dicarbamine 给药后黑瘤细胞中的黑素生成强度对比（电子显微镜检查）

[0065]

参数（绝对值）		Dicarbamine 撤除后所经过的时间		
		12 小时	24 小时	48 小时
含有黑素体的 细胞数（每 500 个细胞）	对照	135.0	144.0	159.0
	Dicarbamine 给药后	175.0	210.0	227.0
每细胞中黑素 体的平均数	对照	19.0	21.0	26.0
	Dicarbamine 给药后	28.0	35.0	42.0
MGII	对照	5.1	6.0	8.2
	Dicarbamine 给药后	9.8	14.7	19.0

[0066] * 从肿瘤接种后第 9 天开始

[0067] 电子显微镜检查试验显示，与对照相比，包含黑素体的肿瘤细胞数和每一细胞中的黑素体数由于 Dicarbamine 的效果而增加。不同观察期的 MGII 指数如下增加：12 小时 -1.9 倍，24 小时 -2.4 倍，48 小时 -2.3 倍。

[0068] 因而，在 Dicarbamine 的 15 天给药过程后，M-6 黑瘤肿瘤细胞分化程度平均增加 2.2 倍，这得到黑素生成强度 (MGII 指数)、包含黑素体的细胞数增加 (1.3 倍) 和黑素体数增加 (1.3 倍) 的支持。

[0069] 实施例 2：Dicarbamine 对所接种的人黑瘤细胞的黑素合成功能的效果

[0070] 按照较高的单一剂量 4.5mg/kg 向如实施例 1 所述皮下接种人黑瘤的小鼠每日 p.o. 给以 Dicarbamine 达 3 周，从肿瘤移植术之时开始。

[0071] 在肿瘤抑制术后 3 周内处死动物。处死时的肿瘤体积平均为 150mm^3 。处死后, 切除小鼠肿瘤, 用 Versen 溶液分解, 分离细胞部分, 在光学显微镜检查期间计算 Goryaev 腔中含有色素的细胞数。

[0072] 所进行的研究显示, 含有黑素的细胞的对照平均数为 39.14 ± 8.72 , 试验组为 108.42 ± 11.91 , 也就是说合成黑素的细胞数显著 ($p < 0.01$) 增加 3 倍。

[0073] 因而, 在使用不同剂量 Dicarbamine 所进行的系列试验中, 在黑素生成强度的基础上, 获得统计学上显著的增强人黑瘤细胞分化诱导作用的效果。

[0074] 数据列在表 3 中。

[0075] 表 3

[0076] 由 Dicarbamine 诱导的人黑瘤细胞黑素生成强度

[0077]

肿瘤编号	对照	肿瘤编号	试验
	含有黑素的细胞数		含有黑素的细胞数
1	32	1	95
2	35	2	111
3	29	3	95
4	42	4	110
5	46	5	130
6	36	6	106
7	54	7	111
平均	39.14	平均	108.42*
标准偏差	8.72	标准偏差	11.91

[0078] * $p < 0.01$

[0079] 实施例 3: Dicarbamine 对所接种的人黑瘤 Me1-6 生长动力学的效果

[0080] 研究是针对体重 20-22 克的 10-12 周龄无胸腺 (裸) 雌性 Balb/C 小鼠进行的 (由隶属于 RAMS 的 RCRC 繁殖)。预先从原始临床材料获得人黑瘤株 Me1-6, 从 RAMS RCRC 的肿瘤株库取得, 移植给无胸腺“裸”鼠。

[0081] 向两组小鼠每日 p. o. 给以单一剂量 1.5mg/kg 和 4.5mg/kg 的 Dicarbamine 达 3 周, 从肿瘤发育之时开始从肿瘤移植术后第 15 天至 36 天)。

[0082] 在移植术后第 18、25、33、39、46 和 53 天进行肿瘤的测量。在肿瘤生长动力学的基础上评估 8 周 Dicarbamine 的效果, 按照下式计算肿瘤体积“V”:

[0083] $V = \pi * L * s * h (\text{mm}^3)$

[0084] 其中 L 是长度的 mm 数, s 是宽度的 mm 数, h 是高度的 mm 数。

[0085] 然后计算肿瘤体积之间的比例 V_t/V_{t-1} , 以百分比表示, 按照 Student 法进行统计学处理, 以计算统计学上的显著性差异。所得数据如表 4 所示。

[0086] 所得数据显示,与对照相比,最大肿瘤质量增益延迟了 7 天。与对照组相比,接受单一剂量 4.5mg/kg Dicarbamine 的小鼠组移植术后第 25 天相当于 45mg/kg Dicarbamine 给药 10 天,此时见到肿瘤生长速率有统计学上的显著性差异。这组的平均肿瘤体积增加了 $166.0 \pm 93.0\%$,而对照组中该参数为 $329.0 \pm 88.9\%$ ($p < 0.015$)。

[0087] 实施例 4:Dicarbamine 与化疗的组合对接种移植给无胸腺小鼠的人 M-6 黑瘤生长的效果

[0088] 按照实施例 3 所述技术进行研究。将 Dicarbamine 按照单一剂量 4.5mg/kg 每日 p.o. 给药 3 周,从肿瘤出现之时开始(从第 15 天至第 36 天)。在联合治疗组中,也将 Dicarbamine 按照单一剂量 4.5mg/kg 每日给药 3 周(第 15 天至第 36 天),联合由抗肿瘤细胞抑制剂顺铂 6mg/kg i.v.(第 25 天)和 Aranoza 40mg/kg i.p.(第 27 天)的单一给药。细胞抑制疗法开始于平均肿瘤体积为 $200 \pm 62\text{mm}^3$ 之时。在移植术后第 18、25、33、39、46 和 53 天,测量肿瘤体积,计算 V_t/V_{t-1} 值,以百分比表示。所得数据如表 5 所示。

[0089] 表 5

[0090] 抗肿瘤细胞抑制剂与 Dicarbamine 的化疗组合对人 M-6 黑瘤生长动力学的效果

[0091]

小鼠 组别	治疗方案		肿瘤接种后不同天数的 Mtm (%)				
	剂量(mg/kg) 单次/疗程	给药天 数	25 天	33 天	39 天	46 天	53 天
对照	生理盐水 p.o.	15-36	329.0 ± 88.9	132.9 ± 57.3	21.9 ± 12.6	10.5 ± 8.1	3.8 ± 0.3
顺铂	6mg/kg i.v.	25	$413.0 \pm$	177.0 ± 46.0	62.04 ± 30.1	21.2 ± 18.7	18.2 ± 12.7
Aranoza	40mg/kg i.p.	27	276.0				
Dicarbamine	4.5/94.5mg/kg p.o.	15-36	$166.0 \pm$ 93.0^{**}	$276.0 \pm$ 104.0	39.8 ± 27.3	19.6 ± 17.5	4.2 ± 22.5
Dicarbamine	4.5/94.5mg/kg p.o.*	15-36	$182.0 \pm 60.0^{**}$	191.0 ± 71.0	24.5 ± 17.4	28.7 ± 9.8	8.0 ± 30.6
顺铂	6mg/kg i.v.	25					
Aranoza	40mg/kg i.p.	27					

[0092] *- 每日 ;** - $p < 0.05$

[0093] 从所列数据可以看出,Dicarbamine 在所用给药途径中在最初阶段延缓肿瘤生长,第 25 天的肿瘤质量增益为 $166.0 \pm 93.0\%$,比对照组的增益 $329.0 \pm 88.9\%$ 减少了。因而,再现了 Dicarbamine 对黑瘤生长的效果结果(见实施例 3)。Aranoza 与顺铂的联合化疗在所示制度中似乎是无效的,也就是说肿瘤增益在此期限高于对照值($413.0 \pm 276.0\%$)。这证实了所用 Mel-6 人黑瘤株对给定化疗方案不存在敏感性。向该无效的化疗方案引入 Dicarbamine 导致肿瘤质量增益在第 25 天有统计学上的显著性($p < 0.05$)减少,为 $182.0 \pm 60.0\%$,这证实了它在没有化疗效果存在下的情况下的功效。

[0094] 实施例 5: 当干扰素给药时通式 (I) 肽衍生物对黑瘤细胞增殖能力的效果

[0095] 研究了 Dicarbamine 以及 α -干扰素 (Introne ® , IN) 对黑瘤细胞增殖能力的效果。应当注意, Dicarbamine 本身能够延缓黑瘤细胞的增殖活动, 而不改变它们的存活。

[0096] 研究是针对在组织培养物中以单层方式生长的两种连续细胞培养物进行的, 即鼠 B-16 黑瘤细胞和人 M-5 黑瘤细胞。IN 的给药浓度为 70-700IU/ml。将 Dicarbamine (D) 转移至储备溶液中 ($1.000 \mu\text{M}$), 通过 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径过滤器除菌, 然后稀释至 0.01 和 $1.0 \mu\text{M}$ 浓度。

[0097] 在初始细胞增殖速率 (IRCP) 的基础上评估制备物对细胞的效果。该指数 (IRCP) 通常被称为集落速率生长, 是这样测定的, 计数“试验”皿 (含有制备物) 和“对照”皿 (没有制备物) 中感染后前几天期间微集落中的细胞数, 分析其中的 50 个集落。每一“点”包括不少于三个含有生长中的细胞集落的 Petri 皿, 其中加入特定浓度的研究用制备物。

[0098] 按照下式计算集落的生长速率 (%):

[0099] $(\text{试验皿中细胞数} / \text{集落 (平均值)} - 1) / (\text{对照皿中细胞数} / \text{集落} - 1) \times 100\%$

[0100] 计算每“点”的微集落中的细胞数。根据“试验”皿与“对照”皿之间所生长的集落数之比测定细胞存活率, 借助细胞存活率判断制备物在选定浓度范围内的毒性。试验结果如表 6 所示。

[0101] 表 6

[0102] Dicarbamine 和 α -干扰素对鼠 B-16 黑瘤和人 M-5 黑瘤细胞增殖活动的效果

[0103]

制 备 物	IN	与制备物接触下列期限时的初始细胞增殖速率 (相对于对照而言的%细胞/集落)								
	浓度 IU/ml	48 小时			72 小时			96 小时		
		无 D	0.01	1.0	无 D	0.01	1.0	无 D	0.01	1.0
		$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$	$\mu\text{M D}$
M-5 的对照		100.0	84.2	69.0	100.0	73.6	50.0	100.0	70.2	49.1
IN	7.0	111.3	79.1	54.7	94.8	49.1	36.9	73.0	46.9	33.3
	70.0	53.7	40.5	30.7	51.9	34.9	24.5	48.8	31.7	23.9
B-16 的对照		100.0	52.9	44.6	100.0	61.0	43.6	-	-	-
IN	70.0	-	-	-	50.2	-	26.1	-	-	-
	700.0	38.0	24.9	21.5	29.8	22.0	16.0			

[0104] 从上表可以看到, 在 M-5 黑瘤的对照中, IRCP 指数保持在 100% 的水平达 96 小时。

[0105] 在加入 7.0 IU/ml α -干扰素的 M-5 细胞样本中, IRCP 指数在 48 小时增加至 111.3%, 在 76 和 96 小时仅分别减慢至 94.8 和 73.0%。当加入 70 IU/ml α -干扰素时, IRCP 指数在 48 小时减慢至 53.7%, 在 72 小时减慢至 51.9%, 在 96 小时减慢至 48.8%。也就是说, 70 IU/ml α -干扰素的最大抑制效果达到 50% IRCP。

[0106] 当加入 $0.01 \mu\text{M}$ Dicarbamine 时, IRCP 指数在 48 小时减慢至 82.4%, 在 72 小时

减慢至 73.6%，在 96 小时减慢至 70.2%，当加入 $1\mu\text{M}$ Dicarbamine 时，IRCP 指数在 48 小时减慢至 69.0%，在 72 小时减慢至 50.0%。

[0107] 因而，Dicarbamine 的最大抑制效果也达到 IRCP 的 50%，这是在 $1.0\mu\text{M}$ 制备物浓度下获得的。

[0108] 在 B-16 黑瘤试验中，当加入 70IU/ml α -干扰素时，IRCP 指数在 72 小时减慢至 50.0%，当加入两种所示浓度的 Dicarbamine 时，IRCP 指数在 48 小时分别减慢至 52.9 和 44.6%，在 72 小时分别减慢至 61.0 和 44.6%。仅当加入 700IU/ml α -干扰素时，IRCP 指数才显著减少至 38.0 和 29.8%。。

[0109] 因而，所进行的试验显示， α -干扰素和 Dicarbamine 抑制 M-5 黑瘤和 B-16 黑瘤细胞生长的水平为 40.0-50.0%，这是分化诱导剂所特有的。仅在 α -干扰素浓度增加 100 倍的情况下才获得更强的对 IRCP 指数的效果。

[0110] 向 M-5 细胞联合加入 70.0IU/ml α -干扰素和 Dicarbamine 显示，在所有情况下 IRCP 指数在所记录的期限分别降低至 30.7-24.0-31.0%。当联合使用 700IU/ml α -干扰素和两种浓度 Dicarbamine 时，获得最强的对 B-16 黑瘤的效果：IRCP 指数在 48 小时分别降低至 24.9 和 29.8%，在 72 小时分别降低至 22.0 和 16.0%。

[0111] 因而，Dicarbamine 类似于 α -干扰素减缓鼠 B-16 黑瘤和人 M-5 黑瘤细胞增殖，不显示毒性（根据存活指数）。正如所给出的实施例所示，Dicarbamine 的效果是分化诱导剂所特有的，与已知分化诱导剂 α -干扰素的组合对黑瘤细胞具有加和特征。这种效果导致肿瘤生长抑制作用的强化，是提高黑瘤免疫疗法功效的象征。

[0112] 5.2：肽衍生物对黑瘤细胞增殖能力的效果

[0113] 研究是针对在组织培养物中以单层方式生长的鼠 B-16 黑瘤的连续细胞培养物进行的。选择 α -干扰素作为对比制备物，给药浓度为 70IU/ml。

[0114] 将供试化合物转移至储备溶液中 ($1,000\mu\text{M}$)，通过 $0.22\mu\text{m}$ 孔径滤器除菌，然后稀释至 $100\mu\text{M}$ 浓度。

[0115] 在初始细胞增殖速率 (IRCP) 的基础上评估化合物对细胞的效果。该指数是这样测定的，计数“试验”皿（含有制备物）和“对照”皿（没有制备物）中感染后前几天期间微集落中的细胞数，分析其中的 50 个集落。

[0116] 按照下式计算集落的生长速率 (%)：

[0117] $(\text{试验皿中细胞数} / \text{集落 (平均值)} - 1) / (\text{对照皿中细胞数} / \text{集落} - 1) \times 100\%$

[0118] 计算每“点”的微集落中的细胞数。根据“试验”皿与“对照”皿之间所生长的集落数之比测定 B-16 细胞存活率，借助细胞存活率判断毒性。试验结果如表 7 所示。

[0119] 表 7

[0120] $100\mu\text{M}$ 肽衍生物和 70IU/ml α -干扰素对鼠 B-16 黑瘤细胞增殖活动的效果

[0121]

化合物	与制备物接触下列期限时的初始细胞增殖速率 (相对于对照而言的%细胞/集落)	
	48 小时	72 小时
对照	2.52=100%	3.49=100%
干扰素	29.6±2.3	27.4±2.1
Dicarbamine	30.8±2.8	28.2±2.2
1	26.6±2.7	26.6±2.8
2	25.5±1.9	25.5±1.7
3	35.6±2.9	35.6±2.9
4	38.3±3.5	38.3±3.5
5	32.4±2.6	32.4±2.3
6	29.3±2.7	29.3±2.2
7	38.8±2.7	38.8±2.8
8	21.4±1.5	16.9±0.9
9	27.1±1.7	17.2±1.3
10	35.9±3.6	23.1±1.6
11	21.5±1.9	20.7±1.8
12	28.7±2.1	20.3±1.9
13	44.9±4.0	18.9±1.4
14	33.8±3.5	19.9±1.8
15	39.7±2.5	29.8±2.3
16	41.3±4.0	28.9±2.5
17	39.7±2.1	26.6±2.1
18	42±3	39±3
19	21±1	41±5
20	44±3	42±4
21	42±4	28±2

[0122] 与对照的差异是显著的 ($p < 0.01$)。

[0123] 表7所列数据显示,肽衍生物抑制B-16黑瘤细胞集落生长的水平为50.0-70.0%,这是分化诱导剂所特有的。

[0124] 实施例6:在Dicarbamine给药后不同期限肿瘤细胞的细胞周期分布

[0125] 试验是针对所接种的B-16黑瘤进行的。在制备物给药后不同期限DNA含量的基础上研究Dicarbamine对肿瘤细胞分布的效果。从肿瘤接种后第6天开始历时10天,每日向小鼠胃内给以0.5mg/kgDicarbamine。在接种后第10、12、16和18天,也就是分别在Dicarbamine给药后第5和7天以及在Dicarbamine 10-天给药终止后第2和4天,处死动

物,用于随后的肿瘤材料研究。

[0126] 试验结果显示, Dicarbamine 导致分裂间期肿瘤细胞比例 (IIG¹) 的显著增加 ($\approx 25\%$)。在恒定的增殖中细胞比例 ($\approx 30\%$) 中, 注意到 IIG² 细胞比例有所增加 (12-14%)。因此, 正常基质细胞 (IG¹) 在样本中的比例代偿性降低。所述变化在 5-10 次 Dicarbamine 给药后最突出。

[0127] Dicarbamine 的过程给药导致肿瘤细胞群的动态重排。注意到合成周期 (S-相) 细胞的抑制作用伴有准备增殖的细胞或增殖中细胞 (G² 相) 的比例的代偿性降低。同时发生肿瘤细胞在固定相 G¹ 中的蓄积。

[0128] 通过降低增殖活动水平, Dicarbamine 促进细胞在固定 (非增殖) 细胞周期中的蓄积。它能够延缓肿瘤生长, 促进细胞向更加分化状态的转变。

[0129] 实施例 7: Dicarbamine 关于环磷酰胺及其与顺铂和卡铂组合的血液学毒性的功效

[0130] 针对第一代雄性小鼠杂合体 F₁ (CBA×C₅₇BI) 研究 Dicarbamine 的血液矫正效果。

[0131] 7.1: 使用 4 组动物研究 Dicarbamine 对环磷酰胺 (CPH) 血液学毒性的效果:

[0132] 第 1 组 - 每日 0.5mg/kg Dicarbamine, 开始于 CPH 给药前 5 天直至 200mg/kg CPH 单一给药后 5 天;

[0133] 第 2 组 - 200mg/kg CPH 单一给药;

[0134] 第 3 组 - 完整的对照;

[0135] 第 4 组 - 每日 0.5mg/kg Dicarbamine, 历时 10 天。

[0136] 所得数据如表 8 所示。

[0137] 表 8

[0138] 在环磷酰胺和环磷酰胺与 Dicarbamine 作用下小鼠外周血中的总白细胞数

[0139]

组	环磷酰胺给药后不同天数的总白细胞数 (以千个/mm ³ 计)						
	3	5	7	10	13	17	21
1	2.80±0.22	7.96±1.10	13.38±1.54	11.88±1.92	13.30±1.48	12.40±1.76	12.90±2.60
2	1.06±0.44	4.38±0.77	10.50±3.02	6.44±0.60	12.20±3.02	12.20±1.80	11.86±1.32
3	16.50±8.20	16.10±3.20	14.80±3.30	15.80±1.90	14.90±2.70	16.90±4.70	14.70±2.80
4	15.70±4.30	15.30±7.80	17.30±5.10	15.70±3.80	12.50±3.52	17.80±4.70	16.30±3.90

[0140] 所得数据显示, Dicarbamine 与 CPH 的联合使用减少后者的血液毒性效果, 加速恢复血液参数。

[0141] 7.2: 在研究 Dicarbamine 对 CPH 与铂衍生物组合的血液毒性作用的效果时, 每日将 Dicarbamine 向小鼠胃内给药 20 天, 单一剂量为 0.5mg/kg。在从开始 Dicarbamine 给药过程第 5 天, 将细胞抑制性制备物腹膜内给药一次。细胞抑制性制备物的剂量如表 10 和 11 所示。

[0142] 研究 Dicarbamine 当联合 CPH 和顺铂或卡铂给药对小鼠外周血白细胞数的效果的结果分别如表 9 和 10 所示。

[0143] 表 9

[0144] Dicarbamine 对环磷酰胺与顺铂组合的血液毒性的效果

[0145]

细胞抑制性 制备物	Cdi static preparation 剂量(mg/kg)	细胞抑制性制备物给药后不同天数的总白细胞数 (以千个/mm ³ 计)					死亡 期限 (天)
		0	3	5	7	21	
Dicarbamine	200	11.30±	2.32±	6.60±	10.40±	12.30±	8; 16
CPH	8	2.30	0.49	0.90	1.54	1.56	
顺铂	8	2.30	0.33	0.77			3; 4; 7
CPH	200	11.30±	1.20±	4.32±	6.24± 1.15	10.80± 1.02	
Dicarbamine	100	11.30±	4.14±	11.40±	14.90±	11.80±	no
CPH	4	2.30	0.60	1.10	1.32	1.32	
顺铂	4	2.3		0.66	0.88		no
CPH	100	11.3±	2.65± 0.66	4.74±	8.05±	12.0± 1.4	
Dicarbamine	50	11.30± 2.30	6.70± 1.15	17.00± 5.17	14.50±	12.40±	no
CPH	2				2.00	0.99	
顺铂	2	2.30		0.99	1.15	1.54	no

[0146] 所列数据显示,在第 5 天,在接受最大剂量细胞抑制性制备物以及 Dicarbamine 的小鼠组中,白细胞数已经达到比生理学标准的下限,在第 7 天,实际上恢复至原始水平。仅就试验的 21 天而言,没有观察到 Dicarbamine 恢复。在接受最大剂量细胞抑制性制备物而无 Dicarbamine 的小鼠中,注意到在试验的第 3、4 和 7 天有动物死亡。在接受最大剂量细胞抑制性制备物以及 Dicarbamine 的动物中,注意到仅在第 8 和 16 天有被延迟了的死亡。

[0147] 表 10

[0148] Dicarbamine 对环磷酰胺与卡铂组合的血液毒性的效果

[0149]

细胞抑制性 制备物	Cytostatic preparation 剂量(mg/kg)	细胞抑制性制备物给药后不同天数的总白细胞数 (以千个/mm ³ 计)					死亡 期限 (天)
		0	3	5	7	21	
Dicarbamine	200	11.50±	3.10±	12.80±	15.30±	12.30±	10
CPH 顺铂	30	2.80	0.70	1.37	1.26	0.89	
CPH	200	11.30±	1.18±	4.60±	7.54±	12.60±	3
顺铂	30	2.30	0.49	0.60	0.77	1.28	
Dicarbamine	100	11.50±	4.04±	10.40±	14.80±	11.80±	no
CPH 顺铂	15	2.80	0.44	1.59	1.76	1.34	
CPH	100	11.30±	2.74± 0.49	6.48±	10.50±	13.20±	no
顺铂	15	2.30		0.60	1.38	1.50	
Dicarbamine	50	11.30± 2.30	6.60± 0.77	10.90± 1.21	11.20±	10.90±	no
CPH 顺铂	7.5				1.20	1.28	
CPH	50	11.50±	3.94±	8.72±	10.80±	11.20±	no
顺铂	2	2.80	1.04	1.98	2.40	0.99	

[0150] 所列数据(表 10)显示,在使用 Dicarbamine 以及致死剂量卡铂和环磷烷的情况下,外周血中的白细胞数和动物死亡的期限与表 9 所列数据相似。

[0151] 因而,当使用致死剂量的细胞抑制性制备物时,Dicarbamine 在全部所研究的过程中抑制白细胞减少症的形成,它加速恢复总白细胞数,延迟小鼠死亡的期限。

[0152] 7.3:在研究通式(I)肽衍生物对 CPH 与卡铂组合的血液学毒性作用的效果时,将化合物每日向小鼠胃内给药 10 天,剂量为 0.5mg/kg。在供试化合物给药开始后第 5 天,向小鼠腹膜内注射 200mg/kg CPH 和单一剂量 15mg/kg 卡铂。然后,继续 5 天供试化合物的给药。

[0153] 在供试化合物开始给药之前,从小鼠尾巴抽取血液,计算总白细胞数。在环磷酰胺与卡铂给药后第 3、5 和 7 天,也从小鼠尾巴抽取血液,计算总白细胞数。每组包括 15 只动物。

[0154] 作为对照组,小鼠仅接受细胞抑制性制备物。

[0155] 表 11 所列数据显示通式(I)肽衍生物抑制白细胞减少症的形成,加速恢复总白细胞数。

[0156] 表 11

[0157] 通式(I)肽衍生物对环磷酰胺与卡铂组合的血液学毒性作用的效果

[0158]

化合物编号	在细胞抑制性制备物给药后不同天数的外周血中总白细胞数(以千个/mm ³ 计)			
	0	3	5	7
1	13.3±3.5	3.3±1.0*	10.0±1.3*	11.6±2.5*
2	13.8±3.5	3.18±0.82*	9.1±0.5*	11.9±2.5*
3	15.5±3.2	4.18±2.0	19.2±1.9	17.5±1.7*
4	15.3±2.7	3.02±0.83	9.62±3.84	16.1±0.15
5	12.1±1.4	2.1±1.04	10.5±2.08	15.26±1.23
6	14.2±1.1	3.04±1.61	14.56±2.65	25.68±3.1*
7	13.7±1.1	3.14±0.62	13.7±0.57	16.58±2.9
8	12.9±2.5	3.98±0.78	10.8±0.57	16.16±0.85
9	13.2±3.0	5.04±0.20*	8.64±1.97	19.38±1.8
10	12.9±1.9	5.18±1.97*	19.76±3.22*	21.82±3.74*
11	14.8±2.3	3.32±1.3	10.28±1.35	17.56±2.6
12	12.8±0.8	3.56±0.12	20.66±3.7*	17.4±2.8
13	14.9±0.6	2.66±0.21	25.7±4.1*	32.1±4.87*
14	13.8±0.5	2.66±0.23	16.24±2.3	28.9±3.65*
15	12.7±0.7	3.76±0.14	26.4±5.8*	27.6±4.12*
16	12.6±0.6	3.9±0.23	15.44±1.3	24.9±4.31*
17	13.4±0.8	3.36±0.27	17.6±3.1	26.1±3.97*
CPH+C	16.1±3.5	1.14±0.55	4.31±1.3	8.3±0.58

[0159] * 显著性 $p \leq 0.05$

[0160] 7.4:Dicarbamine 对细胞分化的效果得到在环磷酰胺与 Dicarbamine 组合的影响下与单独给以 Dicarbamine 相比小鼠外周血微分数研究的支持。

[0161] 使用两组小鼠。第一组给以 Dicarbamine, 在 CPH 给药之前 5 天的剂量为 0.5mg/kg, 在 CPH 给药之后 5 天的剂量为 200mg/kg。第二组小鼠给以单独的 CPH, 剂量为 200mg/kg。研究结果如表 12 和 13 所示。

[0162] 表 12 和 13 所列数据显示, 由于成熟形式的爆发而发生回收外周血, 这确认了 Dicarbamine 的分化效果。尤其在第 3 和 5 天根据外周血数和骨髓细胞构成见到这一点(表 12 和 13)。在 Dicarbamine 组中, 外周血缺乏髓细胞和嗜中性白细胞, 在没有 Dicarbamine 的组中, 存在这些构成要素(表 12)。

[0163] 实施例 8: 受肽衍生物影响, 皮下接种的小鼠 Friend 成红细胞增多(FEB) 的速率和尺寸的减少

[0164] 研究是针对雄性小鼠杂合体 100BDF₁ 进行的, 将动物分组, 每组 10 只小鼠。使用直系 DBA₂ 小鼠用于体内继代移植 FEB。

[0165] 从隶属于 RAMS N. N. Blokhin 的 GU RCRC 肿瘤株库获得 Friend 成红细胞增多株, 使用 3-8 代皮下接种物腹膜内继代移植两次。使用 1×10^6 个细胞的 0.3ml 1999 培养基悬液进行 Thr 接种。

[0166] 利用探针, 将供试化合物的溶液每日向小鼠胃内给药, 从肿瘤接种后第 3 天至第 7 天。

[0167] 在肿瘤生长抑制率(TGI, %)和平均寿命(ALS)的基础上评估治疗功效。借助普遍接受的标准 T/C(%)测定寿命的增加, 它是试验组与对照组 ALS 之比。在平均肿瘤体积

变化动力学的基础上计算肿瘤生长速率 V_t/V_1 。

[0168] 关于肽衍生物对肿瘤大小和肿瘤生长速率的效果的研究数据分别如表 14 和 15 所示。

[0169] 所得结果显示,肽衍生物导致皮下接种的 FEB 的生长抑制,直至疗法终止后 19 天。所述效果开始于在单一剂量 1.5mg/kg 化合物给药终止后不久,直至第 13 天仍保持显著水平 ($p < 0.05$)。肿瘤生长速率在撤除化合物后一周期间变得稳定。

[0170] 从所进行的研究可以确定,通式 (I) 化合物对 FEB 皮下结节的形成具备抑制效果。从所得数据可以认为供试化合物可用于人造血组织增殖的治疗。

[0171] 实施例 9:Dicarbamine 和 2 α -干扰素 (Reaferon) 对 Friend 成红细胞增多肿瘤细胞的效果

[0172] 经由脾细胞皮下接种给 DBA₂ 雌性小鼠,研究 Friend 成红细胞增多。

[0173] 进行 4 组试验。

[0174] 第 1 组 - 没有治疗的对照动物,给以生理盐水;

[0175] 第 2 组 - 每日 s. c. 给以 100 千 IU/kg Reaferon,从接种后第 3 天至第 7 天;

[0176] 第 3 组 - p. o. 给以单一剂量 4.5mg/kg Dicarbamine,从接种后第 3 天至第 7 天;

[0177] 第 4 组 - 按照相似的方案同时给以 Dicarbamine 和 Reaferon。

[0178] 在治疗终止或生理盐水给药终止后第 3、7 和 14 天处死动物,获取光学显微镜检查用材料,在第 7 和 14 天获取电子显微镜检查用材料。

[0179] 就组织学检查而言,将肿瘤块固定在 10% 中性福尔马林中,包埋到石蜡中;将所得切片用苏木精-曙红染色,利用高碘酸 Schiff 反应检查糖原(多糖)含量,根据 Brachet 检查 RNA 含量,还检查脂质和铁。在 Polivar 光学显微镜 (Austria) 中进行切片的观察和照相。

[0180] 就电子显微镜检查而言,将肿瘤块固定在 2.5% 戊二醛溶液和 1% 四氧化钍中,包埋到 EPON-812 中。在 LKB-III ultratome (Sweden) 上制备 semi-thick 和 ultra-thick 切片。将所得 semi-thick 切片用甲苯胺蓝染色,在光学显微镜中进行观察。将 ultra-thick 切片另外用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色;在 JEOL 1200EX-II 电子显微镜 (Japan) 中进行切片的观察和照相。

[0181] 在电子显微镜检查期间计算不同类型细胞(胚细胞、淋巴细胞和粒性白细胞)的分化百分比,用于定量评估。

[0182] 在组织学检查期间评估细胞有丝分裂和细胞凋亡百分比以及坏死面积。

[0183] 组织学检查

[0184] 第 1 组:没有治疗的对照动物

[0185] 组织学检查发现,肿瘤细胞是大的、多形的,它们的核是明亮的,细胞质是适度发育的。细胞大小偶尔有波动,统计个别较小的细胞,但是大细胞代表了细胞的主体。

[0186] 肿瘤细胞连续向外生长。在个别肿瘤中,统计包围肿瘤细胞保留区域的坏死部位。坏死面积没有超过切片表面的 10-15%。

[0187] 在大多数肿瘤细胞中,RNA 的 Brachet 反应明显突出,很少微弱或不存在(在个别小细胞中)。

[0188] 高碘酸 Schiff 反应具有扩散特性,与铁的反应仅在个别细胞中呈阳性。

[0189] 在大细胞中的肿瘤中,统计有丝分裂(多达1-1.5%)和具有细胞凋亡迹象的细胞(多达0.5%)。

[0190] 随着肿瘤生长,坏死面积增加至切片表面的20-30%,有丝分裂的数量增加(多达1.5-2%),细胞凋亡活动没有变化。大型多形细胞的数量在所有期限下都显著占优势。

[0191] 第2组:Reaferon 给药

[0192] 肿瘤具有通常的组织结构。正如对照组,在大型多形细胞中见到较小的具有深染色核的细胞。

[0193] 第14天,坏死面积为切片表面的40-50%,有丝分裂活动为0.5-1%,第7天,细胞凋亡增加至1-2%,但是第14天降低至1-1.5%。

[0194] 第3组:Dicarbamine 给药

[0195] 注意到具有深染色核的小肿瘤细胞数量有所增加。大型多形细胞数量显著占优势。与第1组图形相比,坏死面积没有显著变化。有丝分裂活动也停留在对照图形的限度内。在第3和7天,细胞凋亡的比率显著降低(第7天降至 $0.1 = 0.5\%$)。

[0196] 第4组:Dicarbamine 与 Reaferon 的同时给药

[0197] 与第2组的变化相比,坏死面积和有丝分裂活动没有显示显著的变化。第3天,细胞凋亡降低至0.2-0.5%,在第7和14天为0.5%(同对照)。

[0198] 胚型大型多形细胞在肿瘤中显著占优势。

[0199] 电子显微镜检查

[0200] 第1组:没有治疗的对照动物

[0201] 在电子显微镜检查期间,在肿瘤中主要见到胚型大型多形低分化细胞。这些细胞中的核为圆形或者略微不规则的形状,偶尔有不平坦的表面。在其中通常见到染色质的扩散分布,注意到仅有一些生成位于边缘的异染色质。核通常占据细胞质的大部分,其中核糖体、单线粒体、偶尔还有略微粗糙的内质网结构占优势。胚细胞占全部肿瘤群的90-95%。

[0202] 除了胚细胞以外,还统计不同成熟程度的淋巴细胞,即成淋巴细胞、淋巴细胞(大、中、小)。这些细胞中的核是圆形的、卵形的,经常具有不平坦的表面,它们包含大量蓄积方式的异染色质,统计核仁。细胞质是适度发育的,它包含大量核糖体;几乎没有其他细胞器,偶尔统计有密集的颗粒。

[0203] 粒性白细胞具有嗜中性白细胞的小颗粒特征,嗜曙红细胞在细胞质中不太常见。细胞中的核是有节段的或者具有深的凹陷。偶尔能够见到在细胞质中具有颗粒的细胞、不规则的核和伸出的胞质膜(单核细胞)。在肿瘤中统计到自由移动的红细胞。

[0204] 肿瘤中主要是大型胚细胞占优势(多达90-95%)。据统计淋巴样细胞在4-8%范围内,粒细胞占1-2%。

[0205] 在移入后随着肿瘤生长,注意到不同细胞类型之间的比例没有显著变化。

[0206] 第2组:Reaferon 给药

[0207] 不同类型肿瘤细胞的一般超微结构得以保留。

[0208] 大型胚细胞的数量没有降低,淋巴样细胞占到4-8%,粒性白细胞占到1-2%。在肿瘤中存在个别的红细胞。

[0209] 第3组:Dicarbamine 给药

[0210] 不同类型肿瘤细胞的超微结构仍然跟以前一样。它们的数量比例变化和分化水平

多少有所升高。大型胚型细胞的数量降低至 70-80%，淋巴细胞和粒细胞的数量分别增加至 18-25% 和 2-5%。在肿瘤中存在个别的红细胞。

[0211] 在处置终止后第 7 天统计最常见的变化。

[0212] 第 4 组:Reaferon 和 Dicarbamine 给药

[0213] 不同类型肿瘤细胞的超微结构实际上相当于上述(见第 1 组)。

[0214] 大型胚型细胞的数量在 70-80% 范围内波动。淋巴细胞的数量达到 18-25%，白细胞的数量停留在 2-5% 的水平。在其他细胞中统计有红细胞。

[0215] 如同前面几组,所见到的变化在第 7 天最突出。

[0216] 因而,每日向 Friend 成红细胞增多小鼠口服给以 4.5mg/kg Dicarbamine 5 天确实导致不成熟肿瘤细胞主要向形成粒细胞以及红细胞样谱系细胞方向分化。

[0217] 与对照动物的肿瘤相比,当使用 Dicarbamine 时,不成熟肿瘤细胞的数量从 90-95% 降低至 70-80%,也就是降低了 15-20%,淋巴细胞的数量从 4-8 增加至 18-25%,也就是增加了 4 倍。

[0218] 粒细胞谱系细胞的数量也有不太显著的增加(从 1-2% 至约 2-5%)。

[0219] 应当注意到,在处置终止后第 7 天见到最常见的变化。在处置终止后第 14 天,这些变化变得稳定。

[0220] 100 千 IU/kg Reaferon 皮下给药 5 天导致肿瘤坏死面积增加在处置终止后第 7 天从对照组的 15-20% 至试验组的 40-50%,在第 14 天从 20-30% 至 40-50%)。有丝分裂的比率多少有所减少(从 1.5-2% 至 0.5-1%),具有细胞凋亡迹象的细胞的数量有所增加(在处置终止后第 7 天从 0.5% 至 1-2%)。肿瘤细胞的分化实际上没有变化。

[0221] 在 Dicarbamine 和 Reaferon 在相同剂量和相同期限下同时给药中,见到每种制备物效果的总和。观察到单独 Dicarbamine 所特有的增强不成熟胚细胞分化的效果,以及在给以单独 Reaferon 所见到的坏死面积增加和有丝分裂数量减少。

[0222] 因而,已经确认, Dicarbamine 能够增强 Friend 成红细胞增多的不成熟肿瘤造血细胞向不同方向的分化,特别是形成淋巴样和髓样谱系肿瘤细胞。

[0223] Dicarbamine 对细胞分化的效果代表了它的一般性质,正如前面在黑瘤研究实施例中所观察到的。

[0224] 实施例 10: Dicarbamine 在化疗期间关于卵巢癌患者骨髓与外周血造血细胞的保护效果的电子显微镜检查

[0225] 在以前涉及 Dicarbamine 对骨髓作用机理的研究中,发现所给定的制备物在试验条件下通过减少正常造血细胞的细胞凋亡,保护动物骨髓免于环磷酰胺的不利细胞毒性效果。

[0226] 针对 10 名 III-IV 期卵巢癌患者的骨髓穿刺活组织检查样本和外周血也获得相似的数据。

[0227] 将患者分为相等的两组:第 I 组 - 患者接受单独的化疗,第 II 组 - 患者接受化疗以及 Dicarbamine 给药。

[0228] 第 I 和 II 组患者在疗法第一天接受 600mg/m² 环磷酰胺和 400mg/m² 卡铂;重复该疗程,间隔 3-4 周。一名患者的化疗过程平均包括 6 个没有 Dicarbamine 的疗程和 5.7 个伴有 Dicarbamine 的疗程。

[0229] 第 II 组患者接受化疗以及 Dicarbamine, 按照单一剂量 100mg 给药, 开始于第一疗程前 5 天, 然后直至相同剂量下一疗程的开始。在两个疗程之间使用 Dicarbamine 的持续时间平均为 24.5 天。平均总剂量为 2.5 克。

[0230] 在化疗开始之前和伴有或没有 Dicarbamine 的疗程结束时采集患者的穿刺活组织检查用骨髓和电子显微镜检查用外周血。

[0231] 将新鲜的骨髓穿刺活组织检查样本放置在载物板上, 用搅拌杆搅拌多次, 直至获得小的密集片段。将后者固定在 2.5% 戊二醛溶液中, 另外固定在 1% 四氧化钼溶液中; 用 pH7.4 磷酸盐缓冲液洗涤后, 在递增浓度的醇中脱水, 包埋到环氧树脂 EPON-812 的混合物中。在 LKB-III Ultratome (Sweden) 上制备 semi-thick 和 ultra-thick 切片。将 semi-thick 切片用亚甲基或甲苯胺蓝染色, 使 ultra-thick 切片与乙酸双氧铀与柠檬酸铅的水溶液对比。

[0232] 将包含肝素的外周血在 3,000rpm 下离心 1 小时。然后在表面上倒上 2.5% 戊二醛溶液, 成膜 10-15 分钟, 除去膜, 然后如上所述进行处理。

[0233] 在光学显微镜 Polivar (Austria) 中观察薄切片, 在电子显微镜 JEOL-1200-CX-11 (Japan) 中观察半薄切片。

[0234] 1、在化疗和 Dicarbamine 给药开始之前的对照研究 - 第 I 和 II 组患者

[0235] 在骨髓穿刺活组织检查中见到不同成熟程度和分化方向的造血细胞, 一部分细胞具有空泡形成和营养不良的迹象。

[0236] 存在大型的未分化胚细胞, 具有狭窄的细胞质边缘, 主要包含核糖体。在这些细胞中, 具有扩散性染色质和个别核仁的圆形 - 卵形核占据细胞质的主要部分。

[0237] 一部分细胞以不同的类型和分化程度向白细胞的粒细胞谱系分化。

[0238] 见到具有圆形 - 卵形核的前髓细胞与髓细胞, 细胞质中的扩散性染色质包含不同量的特殊颗粒。红细胞和更成熟的粒细胞经常位于这些细胞周围。

[0239] 经常见到更加分化的粒细胞, 即带状嗜中性白细胞和节段性嗜中性白细胞。在它们的细胞质中存在嗜中性白细胞、嗜曙红细胞和嗜碱细胞所特有的不同类型特殊颗粒。

[0240] 不同分化程度 (小、中、大 - 成淋巴细胞的) 淋巴样细胞排列在粒细胞中。

[0241] 统计有多种成熟红细胞, 经常具有不同的形状, 以及正成红细胞, 包含核和血小板。

[0242] 2、环磷烷和卡铂化疗后的骨髓 - 第 I 组

[0243] 在不同类型的保守性造血细胞 (粒细胞、淋巴细胞、正常红细胞、红细胞、血小板) 中, 在化疗过程之后采集的骨髓穿刺活组织检查样本中统计有营养不良和低度成熟的迹象。

[0244] 在胚细胞的细胞质中含有核糖体, 它经常形成空泡。核是大的, 具有扩散的染色质或异染色质的蓄积, 偶尔有不规则的形状, 具有向内突出的部位。

[0245] 前髓细胞和髓细胞中特殊颗粒的数量是不显著的, 细胞质经常具有突出的营养不良性改变。

[0246] 在带型和节段型的保守性粒细胞中, 也观察到营养不良性改变和不显著量的特殊颗粒。这些颗粒也经常发生营养不良性改变和形成空泡。

[0247] 保守性正成红细胞经常是不规则形状的, 具有细胞质的过程和设计。

[0248] 应当注意到,在穿刺骨髓活组织检查样本中,尤其在粒细胞中,统计有具有细胞凋亡迹象的细胞。在这类细胞中,注意到异染色质的着边、核与细胞质片段化的迹象核细胞凋亡体的生成。

[0249] 3、环磷烷和卡铂化疗以及 Dicarbamine 给药之后的骨髓 - 第 II 组

[0250] 在经历化疗以及 Dicarbamine 给药的患者的穿刺骨髓活组织检查中,统计不向分化程度与类型的造血细胞(粒细胞、淋巴细胞、血小板、正成红细胞)。

[0251] 胚型细胞是大的,它们含有圆形的核,具有扩散性染色质和个别的核仁,它们的细胞质是狭窄的,在其中见到核糖体、个别的线粒体和偶尔的单一原始密集颗粒。

[0252] 存在很多前髓细胞和髓细胞,包含圆形或卵形的核,具有扩散性或凝聚性染色质;它们的细胞质包含相当大量的特殊颗粒,既有原始的(黑暗者),也有不太成熟的(更加成熟者)。

[0253] 还经常统计有带状和节段状白细胞。它们具有凹陷的(豌豆样)或有节段的核,在它们的细胞质中有丰富的主要为嗜中性白细胞类型的特殊颗粒,不太常见具有结晶样结构的嗜曙红细胞类型。

[0254] 细胞质中,不同分化程度的淋巴细胞包含线粒体、粗内质网结构、偶尔有单一颗粒形式的单一包涵物。

[0255] 粒细胞类型的细胞、淋巴细胞经常构成致密的蓄积。

[0256] 与红细胞一起,统计有不同分化程度和相对普通形状的正成红细胞。

[0257] 极少统计有具有细胞凋亡迹象的细胞。

[0258] 在研究外周血造血细胞时,见到与以前关于骨髓要素所述相同的组成规律。

[0259] 在联合化疗(环磷酰胺+卡铂)之前与之后和化疗以及 Dicarbamine 给药期间对卵巢癌患者所进行的骨髓与外周血造血细胞的对比电子显微镜检查确立了免于所用制备物细胞毒性影响的保护效果机理。

[0260] 研究显示,用在本项工作中的化疗制备物对粒细胞、淋巴样细胞和红细胞样谱系的不同造血细胞类型发挥突出的细胞毒性效果。

[0261] 这种细胞毒性效果以细胞质营养不良性改变和在骨髓细胞(和分别外周血)中发育的特殊颗粒死亡的形式表示。

[0262] 所述障碍尤其涉及早期分化节段的粒细胞,在更低程度上还涉及淋巴样细胞,也就是胚细胞、前髓细胞、髓细胞、成淋巴细胞的生成,它们牵涉红细胞样谱系,以及导致造血细胞的功能性分化形式的不充分蓄积。

[0263] 进而发现,在粒细胞谱系要素中,遗传性编程性细胞死亡、即细胞凋亡增强了。

[0264] 营养不良变化和细胞凋亡一般导致白细胞减少、中性白细胞减少、血小板减少和其他造血状态障碍的形成和有限的化疗能力。

[0265] 基于所进行的研究,确认 Dicarbamine 保护骨髓(分别和外周血)造血细胞免于所用化疗制备物的细胞毒性效果,促进年轻形式向成熟细胞要素的分化,和减少细胞凋亡事件。

[0266] 作为所发现的 Dicarbamine 效果的结果,在化疗期间的患者的骨髓中,发生年轻(胚)型造血细胞的蓄积,尤其重要的是,它们向功能性形式的分化增强了。

[0267] 因而,在化疗条件下,刺激骨髓造血细胞、尤其是粒细胞谱系细胞的分化,和防止

细胞凋亡的生长,是 Dicarbamine 的保护效果机理。

[0268] 实施例 11:Dicarbamine 关于减少卵巢癌化疗血液学毒性的功效

[0269] 在 13 名 III-IV 期卵巢癌患者中研究 Dicarbamine 的效果,他们按照下列方案经历 77 个化疗过程:400mg/m² 卡铂 i. v. 逐滴一次+600mg/m² 环磷烷 i. v. 逐滴一次;在 28 天中重复这些过程。每日饭后口服给以 100mg Dicarbamine,开始于第一过程之前 5 天,然后持续三周。给药的持续时间为 26 天,疗程剂量为 2600mg。在第二化疗过程之前 5 天再次给以 Dicarbamine,给药持续 21 天。在两个化疗过程期间 Dicarbamine 摄取的总持续时间为 52 天。

[0270] 在接受 77 个 Dicarbamine 化疗过程的 13 名患者中评估血液学毒性(白细胞减少、中性白细胞减少、血小板减少),与一组 7 名接受 25-27 个没有 Dicarbamine 的化疗过程的患者(对照)进行对比。

[0271] 在进行化疗(对照)之前和之后多次动态评估造血参数,以及在试验组中在 Dicarbamine 给药之前和之后动态评估这些参数。下面列出按照所示方案接受有或没有 Dicarbamine 的化疗的个别患者的造血参数。

[0272] 8.1:患者接受没有 Dicarbamine 的化疗

[0273] 51 岁女性,诊断:III 期卵巢癌;按照治疗方案她接受第一化疗过程:600mg/m² 环磷烷和 400mg/m² 卡铂一次。

[0274] 完整的血液分析,化疗过程 1

[0275]

参数, 测量单位	化疗过程 1 开始 之前	化疗过程 1 之后 5 天	化疗过程 1 之后 2 周	化疗过程 1 之后 3 周
白细胞 $10^9/l$	4.5	3.8	2.2	2.0
嗜中性白细胞 $10^9/l$	2.9	2.4	0.9	0.8
血小板	168	160	154	150

- [0276] 由于中性白细胞减少, 第二治疗过程推迟 7 天。
- [0277] 按照如下治疗方案, 第二化疗过程 :600mg/m² 环磷烷 +400mg/m² 卡铂一次, 没有 Dicarbamine。
- [0278] 完整的血液分析, 化疗过程 2

[0279]

参数, 测量单位	化疗过程 2 开始之前	化疗过程 2 之后 5 天	化疗过程 2 之后 2 周	化疗过程 2 之后 3 周
白细胞 $10^9/l$	3.5	3.3	2.0	2.1
嗜中性白细胞 $10^9/l$	2.2	2.0	0.8	0.9
血小板	178	170	154	150

[0280] 由于中性白细胞减少, 第三过程推迟。

[0281] 63 岁女性, 诊断: IV 期卵巢癌, 转移至右腹股沟淋巴结, 腹水; 按照如下治疗方案她接受第一化疗过程: $600\text{mg}/\text{m}^2$ 环磷烷 + $400\text{mg}/\text{m}^2$ 卡铂一次, 没有 Dicarbamine。

[0282] 完整的血液分析, 化疗过程 1

[0283]

参数,测量单位	CT过程1开始之前	CT过程1之后5天	CT过程1之后2周	CT过程1之后3周
白细胞 10 ⁹ /l	5.0	3.9	2.1	2.0
嗜中性白细胞 10 ⁹ /l	3.2	1.7	0.9	1.0
血小板	160	150	151	152

- [0284] 由于白细胞减少和中性白细胞减少,第二治疗过程推迟 4 天。
- [0285] 按照如下治疗方案,进行第二化疗过程 :600mg/m² 环磷烷 +400mg/m² 卡铂一次,没有 Dicarbamine。
- [0286] 完整的血液分析,化疗过程 2
- [0287]

参数,测量单位	CT过程2开始之前	CT过程2之后 5天	CT过程2之后 2周	CT过程2之后 3周
---------	-----------	------------	------------	------------

白细胞 $10^9/l$	3.7	2.9	2.0	2.2
嗜中性白细胞 $10^9/l$	2.2	1.8	0.9	0.9
血小板	166	160	140	155

[0288] 由于中性白细胞减少,第三过程推迟。

[0289] 8.2:患者接受化疗以及 Dicarbamine

[0290] 51 岁女性,诊断:III 期卵巢癌;按照如下治疗方案她接受第一化疗过程:600mg/ m^2 环磷烷和 400mg/ m^2 卡铂,在治疗第 1 天。每日给以 100mg Dicarbamine,开始于化疗过程 1 之前 5 天,然后持续 21 天。过程 2 之前的 Dicarbamine 疗法周期为 26 天。

[0291] 完整的血液分析,化疗与 Dicarbamine 过程 1

[0292]

参数, 测量单位	开始 Dicarbamine 给药之前	开始 CT 过程 1 之前	Dicarbamine 摄取终止之后	CT 过程 2 之后
	第 0 天	第 5 天	第 21 天	第 33 天
白细胞 $10^9/l$	5.9	5.5	4.7	4.0
嗜中性白细胞 $10^9/l$	4.2	4.0	3.3	2.9
血小板	170	164	160	158

[0293] 按照如下治疗方案,如期进行化疗过程 2:600mg/ m^2 环磷烷和 400mg/ m^2 卡铂一次,在进行第一化疗过程之后 28 天 +Dicarbamine。在过程 2 之前 5 天给以 100mg Dicarbamine,然后每日给药持续 21 天。Dicarbamine 摄取的总持续时间(2 个化疗过程)为 52 天。

[0294] 完整的血液分析,化疗过程 2

[0295]

参数, 测量单位	开始 Dicarbamine 给药之前	开始 CT 过程 1 之前	Dicarbamine 摄取终止之后	CT 过程 3 之后
	CT 过程 1 之后第 28 天	第 33 天	第 54 天	第 61 天
白细胞 $10^9/l$	4.9	5.0	4.2	4.2
嗜中性白细胞 $10^9/l$	3.2	3.3	3.1	3.0
血小板	180	170	160	160

[0296] 如期给以第三 CT 过程。

[0297] 75 岁女性,诊断:III 期卵巢癌;按照如下治疗方案她接受化疗与 Dicarbamine:600mg/ m^2 环磷烷和 400mg/ m^2 卡铂,在治疗第 1 天。每日给以 100mg Dicarbamine,开始于 CT 过程 1 之前 5 天,然后持续 21 天。过程 2 之前的 Dicarbamine 疗法周期为 26 天。

[0298] 完整的血液分析,化疗与 Dicarbamine 过程 1

[0299]

参数, 测量单位	开始 Dicarbamine 给药之前	开始 CT 过程 1 之前	Dicarbamine 摄取终止之后	CT 过程 2 之后
	第 0 天	第 5 天	第 21 天	第 33 天
白细胞 $10^9/l$	7.4	7.2	6.6	5.2
嗜中性白细胞 $10^9/l$	5.7	5.0	5.2	3.8
血小板	174	165	162	167

[0300] 按照如下治疗方案,如期进行化疗过程 2:600mg/m² 环磷烷和 400mg/m² 卡铂一次,在进行第一化疗过程之后 28 天+Dicarbamine。在过程 2 之前 5 天给以 100mg Dicarbamine,然后每日给药持续 21 天。Dicarbamine 摄取的总持续时间(2 个化疗过程)为 52 天。

[0301] 完整的血液分析,化疗过程 2

[0302]

参数, 测量单位	开始 Dicarbamine 给药之前	开始 CT 过程 1 之前	Dicarbamine 摄取终止之后	CT 过程 3 之后
	CT 过程 1 之后第 28 天	第 33 天	第 54 天	第 61 天
白细胞 $10^9/l$	7.8	8.2	7.6	7.2
嗜中性白细胞 $10^9/l$	5.2	6.0	6.2	5.8
血小板	165	160	162	157

[0303] 按期给以第三 CT 过程。

[0304] 65 岁女性,诊断:IV 期卵巢癌;按照如下治疗方案她接受化疗与 Dicarbamine:600mg/m² 环磷烷和 400mg/m² 卡铂,在治疗第 1 天。每日给以 100mg Dicarbamine,开始于 CT 过程 1 之前 5 天,然后持续 21 天。过程 2 之前的 Dicarbamine 疗法周期为 26 天。

[0305] 完整的血液分析,化疗与 Dicarbamine 过程 1

[0306]

参数, 测量单位	开始 Dicarbamine 给药之前	开始 CT 过程 1 之前	Dicarbamine 摄取终止之后	CT 过程 2 之后
	第 0 天	第 5 天	第 21 天	第 33 天
白细胞 $10^9/l$	6.6	5.9	5.5	5.0
嗜中性白细胞 $10^9/l$	5.0	4.2	4.4	3.4
血小板	170	172	166	164

[0307] 按照如下治疗方案,如期进行化疗过程 2:600mg/m² 环磷烷和 400mg/m² 卡铂一次,在进行第一化疗过程之后 28 天+Dicarbamine。在过程 2 之前 5 天给以 100mg Dicarbamine,然后每日给药持续 21 天。Dicarbamine 摄取的总持续时间(2 个化疗过程)为 52 天。

[0308] 完整的血液分析,化疗过程 2

[0309]

参数, 测量单位	开始 Dicarbamine 给药之前	开始 CT 过 程 1 之前	Dicarbamine 摄取终止之后	CT 过程 3 之后
	CT 过程 1 之后第 28 天	第 33 天	第 54 天	第 61 天
白细胞 $10^9/l$	5.6	5.8	5.7	5.5
嗜中性白细胞 $10^9/l$	3.0	3.2	3.4	3.2
血小板	170	170	176	165

[0310] 按期给以第三 CT 过程。

[0311] 8.3:接受化疗和接受或不接受 Dicarbamine 的患者血液学毒性的对比数据,如表 16 和 17 所示

[0312] 表 16

[0313] 接受化疗没有 Dicarbamine 的患者具有血液学毒性的人数(%)

[0314]

毒性 类型	CT 过 程数	根据 WHO 的血液学毒性程度					
		0	I	II	III	IV	III+IV
白细胞减少	26	3	5	12	5	1	6
		11.5%	19.2%	46.1%	19.2%	3.8%	23.07%
中性白细胞减少	26	7	0	8	6	5	11
		26.9%		30.7%	23.07%	19.2%	42.3%
血小板减少	25	10	3	7	4	1	5
		40.0%	12.0%	28.0%	16.0%	4.0%	20.0%

[0315] 表 17

[0316] 接受化疗与 Dicarbamine 的患者具有血液学毒性的人数(%)

[0317]

毒性 类型	CT 过 程数	根据 WHO 的血液学毒性程度					
		0	I	II	III	IV	III+IV
白细胞减少	77 100%	6 7.7%	18 23.3%	43 55.8%	10 12.9%	0	10 12.9%
中性白细胞减少	67 100%	21 31.3%	12 17.9%	23 34.3%	5 7.4%	6 8.9%	11 16.4%
血小板减少	76 100%	27 35.5%	32 42.1%	10 13.1%	6 7.8%	1 1.3%	7 9.1%

[0318] 所得数据显示,没有使用 Dicarbamine 达到有限的 III-IV 阶段血液学毒性(表 16),白细胞减少为 23.0%,中性白细胞减少为 42.3%,血小板减少为 20.0%。

[0319] 在接受 Dicarbamine 的患者组中,白细胞减少、中性白细胞减少和血小板减少的发生率显著降低(表 17)。血液学毒性中,白细胞减少降低至 12.9%,即 1.8 倍,中性白细胞减少降低 2.6 倍,血小板减少降低 2.2 倍。因而,Dicarbamine 的使用导致所列种类血液学毒性都有减少。

[0320] 下列数据支持这样的事实,Dicarbamine 的给药没有降低细胞抑制剂疗法的功效,而是相反在一定程度上增强所达到的效果。

[0321] 按照上述方案,在两个有或没有 Dicarbamine 的化疗过程之后评估患者的治疗功效。功效是按照公认的参数评估的:CR-完全消退;PR-部分消退;SB-稳定化;和 Progr.-进展。

[0322] 所得数据列在表 18 中。

[0323] 表 18

[0324] 按照方案环磷烷+卡铂与 Dicarbamine 治疗患者的功效

[0325]

患者组	患者人数	CR	PR	SB	Progr.
化疗	6 100.0%	2 33.3%	1 16.6%	2 33.5%	1 16.6%
化疗+Dicarbamine	15 100.0%	4 26.6%	7 46.6%	2 13.5%	2 13.3%

[0326] [0324] 所列数据显示,在接受没有 Dicarbamine 的化疗的患者组中,肿瘤生长控制率(CR+PR)达到 49.9%。在接受化疗与 Dicarbamine 的患者组中,治疗功效为 73.2%。

[0327] 因而,在治疗接受化疗的患者时使用 Dicarbamine,导致主要种类血液学毒性的减少,而不降低治疗功效。

[0328] 上列试验与临床数据明显证实通式(I)肽衍生物作为非特异性分化诱导剂的功效,当使用肽衍生物以及骨髓抑制剂时,化疗减少中性白细胞减少的程度和数量,单独使用导致鼠造血组织增殖和分化中鼠与人黑瘤的生长稳定化,包括没有化疗功效存在的情况。

[0329] 通式(I)肽衍生物对肿瘤生长的效果显示与肿瘤细胞增殖活动延迟和分化程度升高有关,特别是黑瘤细胞的黑素合成能力和 Friend 成红细胞增多前体细胞的分化诱导。

[0330] 临床研究揭示了通式(I)肽衍生物在采用不同联合化疗方案治疗癌症患者时显

著降低血液学毒性的性质。因而,当利用铂制备物(环磷烷)以及肽衍生物治疗患有卵巢癌的患者时,有限的中性白细胞减少和血小板减少的程度降低了 2-3 倍。与此同时,治疗功效没有降低。

[0331] 表 4

[0332] Dicarbamine 对裸鼠 M-6 人黑瘤生长的效果

[0333]

表 4
Dicarbamine 对裸鼠 M-6 人黑瘤生长的效果

接种后天数	对照 n=7				Dicarbamine 1.5 mg/kg				Dicarbamine 4.5 mg/kg			
	n=10				n=10				n=10			
	M+m				M+m				M+m			
	V	%			V	%		p**	V	%		P
18 天	66.2+2.8	100			21.8+12.8	100			91.9+54.4	100		
25 天	266.0+69.4	329.0+88.9			77.5+46.4	302.0+186.0		0.82	266.0+198.0	166.0+93.0		0.015
33 天	582.0+127.4	132.9+57.3			342.0+142.0	428.0+313.1		0.11	852.0+495.0	276.0+104.0		0.011
39 天	701.0+123.5	21.9+12.6			435.0+187.0	23.2+22.1		0.92	1129.0+600.0	39.8+27.3		0.169
46 天	778.0+148.4	10.5+8.1			662.0+417.0	23.9+31.0		0.45	1354.0+735.0	19.6+17.5		0.276
53 天	821.0+221.8	3.8+10.3			783.0+423.0	18.6+54.0		0.43	1550.0+780.0	4.2+22.5		0.538

*平均值与标准偏差

**显著性计算是仅对肿瘤体积变化百分比数据而进行的。

表 12
在环磷酰胺与 Dicarbamine 组合的影响下,小鼠外周血白细胞组成的动力学

所生成的要素	第 1 组									
	环磷酰胺给药后天数									
	3	5	7	10	13	17	21			
髓细胞	0	0	0.4/54±0.4	0	0	0	0			
年轻的	0	0	1.4/188±148	0.4/48±3	0	0	0			
带状	3.2/89±16	4.6/370±13	4.8/660±223	5.7/620±260	2.2/293±146	1.6/198±150	2.7/286±214			
有节段的	10.4/290±210	17.6/1400±	31.4/4200± 960	27/3200±450	24/3190+440	19.6/2430±545	18.8/2444±585			
嗜曙红细胞	1.2/34±15	1.2/95.5±44	0	0	1.2/290±73	2.6/322±93	1.4/182±72			
单核细胞	6.2/172±62	7.2/570±17	5.4/724±74	5.2/690±130	4.6/612±219	5.4/60±150	4.0/520±143			
淋巴细胞	75.6/2120±310	69.4/5520±	56.2/753 0± 1250	65.4/7780±450	67.8/9017±580	70.8/8780±545	73.8/9594±585			
第 2 组										
髓细胞	0	0.6/26±5	0	0	0	0	0			
年轻的	0.4/4±1	1.6/70±24	0.6/63±12	0.4/26±5	0	0	0			
带状	1.2/13±3	4.2/184±48	3.6/378±41	3.2/206±71	2.2/268±134	1.6/195±67	1.4/167±67			
有节段的	5.2/55±0.6	16/700±240	35.2/3700±705	23.7/1494±390	18.2/2220±470	20.2/2460±37	19.6/2330±714			
嗜曙红细胞	0.4/4±1	0.4/17±5	0	1.0/64±35	1.4/170±134	1.4/170±79	1.6/190±130			
单核细胞	4.649±17.5	6.4/280±48	4.8/504±115	5.4/350±160	3.8/464±134	4.4/537±134	4.6/547±65			
淋巴细胞	88.2/935±23	71/3110±217	55.8/6860±750	65.8/4240±708	75.0/9150±402	71.6/8740±604	71.6/8520±785			

表格列举%/绝对量, 以 mm³表示

表 13
在环磷酰胺和环磷酰胺与 Dicarbamine 组合的影响下，鼠骨髓的细胞构成

组 No	环磷酰胺给药后的天数							
	3	5	7	10	13	17	21	
1	14.5±3.43	21.55±1.92	32.35 ±3.57	33.8±3.85	32.6±5.22	28.25±3.02	30.4±2.75	
2	8.2±1.65	13.05±2.75	25.22±2.75	27.9±2.75	30.15±6.6	25.0±3.16	26.55±4.53	

*细胞数，以百万个表示

表 14
肽衍生物对 Friend 成红细胞增多小鼠肿瘤大小的效果

化合物	每日给以单一剂量 (mg/kg) 达 5 天	在疗法终止后不同天数的平均肿瘤体积			肿瘤生长抑制率 %		
		8	13	19			
对照	-	342[139÷545]	706[457÷961]	777[199÷1355]			
1	1.5	157[73÷241]	284[197÷371]	318[136÷500]	54	60*	63
2	1.5	130[68÷192]	367[105÷629]	367[105÷629]	62	48	57
对照 **	-	249[150÷348]	678[373÷983]	645[385÷905]	-	-	-
3	1.5**	77[52÷102]	219[104÷334]	368[193÷543]	69*	68*	43
Dicarbamine	1.5	96[37÷155]	150[87÷213]	290[103÷477]	61	78*	55
	4.5**	129[67÷191]	300[130÷470]	485[1354÷835]	62	58	38

注：*与对照的差异是显著的， $p < 0.05$

**第二次试验

表 15
肽衍生物对 Friend 成红细胞增多小鼠肿瘤生长速率的效果

化合物	每日给以单一剂 量 (mg/kg) 达 5 天	在肿瘤接种后不同天数的相对肿瘤体积以及每日 Dicarbamine 摄取 V_t/V_i			肿瘤生长抑制率 %		
		8	13	19			
对照	-	1.0	2.0	2.3			
1	1.5	1.0	1.8	2.0	54	60**	63
2	1.5	1.0	2.8	2.8	62	48	57
对照 ***	1.5	1.0	2.72	2.59	-	-	-
3	1.5***	1.0	2.8	4.78	69**	68**	43
Dicarbamine	1.5	1.0	1.56	3.0	61	78**	55
	4.5***	1.0	2.3	3.76	62	58	38

注: *p<0.05
**第二次试验