



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1729012 B

(45) 授权公告日 2013.05.22

(21) 申请号 200380107015.8

A61K 38/21 (2006.01)

(22) 申请日 2003.10.23

A61K 38/20 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/4745 (2006.01)

60/420,960 2002.10.24 US

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.06.20

(56) 对比文件

US 5550110 A, 1996.08.27, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

WO 0067024 A1, 2000.11.09, 全文.

PCT/US2003/033714 2003.10.23

WO 0100198 A2, 2001.01.04, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

US 2002082285 A1, 2002.06.27, 全文.

W02004/037235 EN 2004.05.06

审查员 赵彦豪

(73) 专利权人 伊利诺伊大学评议会

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 A·古拉蒂

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理

有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书39页 附图5页

(54) 发明名称

治疗实体瘤的组合物

(57) 摘要

公开了预防和治疗实体瘤的组合物和方法。本发明组合物和方法可利用内皮缩血管肽 B 激动剂和化疗药物作为活性成分治疗哺乳动物包括人中的实体瘤。或者,本发明组合物和方法可利用内皮缩血管肽 B 拮抗剂和任选的血管生成抑制剂治疗哺乳动物包括人中的实体瘤。

1. 内皮缩血管肽B受体激动剂 IRL1620 用于制造有助于治疗哺乳动物乳腺癌的药物的用途,其中所述内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 与化疗药物联合应用。

2. 权利要求 1 的用途,其中化疗药物选自:阿霉素、喜树碱、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、 α 、 β 、 γ 干扰素、白介素 2、伊立替康、多西他赛、紫杉醇、托泊替康及其混合物。

3. 权利要求 1 的用途,其中哺乳动物是人。

4. 权利要求 1 的用途,其中化疗药物是紫杉醇。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 与化疗药物的联合应用是基本同时给药的。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 与化疗药物的联合应用是依次给药的。

7. 权利要求 6 的用途,其中所述内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 在化疗药物之前给药。

8. 能治疗乳腺癌的组合物,所述组合物包含化疗药物、内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 和任选的赋形剂。

9. 权利要求 8 的组合物,其中化疗药物选自:阿霉素、喜树碱、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、 α 、 β 、 γ 干扰素、白介素 2、伊立替康、多西他赛、紫杉醇、托泊替康及其混合物。

10. 权利要求 9 的组合物,其中化疗药物是紫杉醇。

11. 能治疗乳腺癌的产品,所述产品包括:

(a) 包含内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 的包装组合物;

(b) 提供联合给予 (a) 和化疗药物来治疗哺乳动物乳腺癌说明的插入物;以及

(c) (a) 和 (b) 的容器。

12. 能治疗乳腺癌的产品,所述产品包括:

(a) 包含内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 的包装组合物;

(b) 包含化疗药物的包装组合物;

(c) 提供同时或依次给予 (a) 和 (b) 治疗哺乳动物乳腺癌说明的插入物;以及

(d) (a)、(b) 和 (c) 的容器。

13. 权利要求 12 的产品,其中所述说明指示内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 在化疗药物之前给药。

14. 能治疗乳腺癌的产品,所述产品包括:

(a) 包含内皮缩血管肽 B 受体激动剂 IRL1620 和化疗药物的包装组合物;

(b) 提供给 (a) 治疗哺乳动物乳腺癌说明的插入物;以及

(c) (a) 和 (b) 的容器。

15. 权利要求 11、12、14 中任何一项的产品,其中化疗药物选自:阿霉素、喜树碱、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、 α 、 β 、 γ 干扰素、白介素 2、伊立替康、多西他赛、紫杉醇、托泊替康及其混合物。

16. 权利要求 11、12、14 中任何一项的产品,其中化疗药物是紫杉醇。

治疗实体瘤的组合物

[0001] 有关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2002 年 10 月 24 日申请的美国临时专利申请号 60/420,960 的利益。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过给予治疗有效量的内皮缩血管肽激动剂和化疗药物,或通过给予治疗有效量的内皮缩血管肽拮抗剂,从而预防和治疗哺乳动物中的实体瘤,如乳腺癌。

[0004] 发明背景

[0005] 虽然本说明书涉及乳腺癌,本文公开和要求的发明也可用于大多数实体瘤的预防和治疗,如此后所阐明的。

[0006] 乳腺癌的发病率在过去十年里急剧上升,并且在美国已经成为导致年龄在 40-49 岁之间妇女死亡的单独主要原因。在 2001 年,192,000 个病例和 40,000 例死亡使得乳腺癌最为普遍的癌症之一,并紧接在皮肤癌之后,成为癌症致死的第二主要原因 (Lacey 等, EnvironMol Mutagen, 39(2-3):82-88(2002))。

[0007] 乳腺癌的发生是复杂的过程,涉及多种因素的组合,如环境和基因的因素。一个深入研究的乳腺癌模型是化学诱导的大鼠乳房致癌模型(参考文献 9,18,19,39,54)。大鼠中化学诱导的乳腺癌变模型是最接近人类癌症的模型(40)。

[0008] 一般通过给予 7,12-二甲基苯蒽 (DMBA) (37) 或是 N-甲基亚硝基脲 (MNU) (37) 化学诱导大鼠乳腺癌变。由 DMBA 或 MNU 诱导的肿瘤有着不同的形态特征。具体的说,由 MNU 诱导的肿瘤更多的集中在乳房上而较少出现转移(25)。因此,MNU 经常被选作在大鼠中特异性引发乳腺癌的化学试剂。这些肿瘤可能是良性纤维腺瘤和乳头瘤,或可为恶性的(54)。大鼠有六对乳腺,一对在颈部,两对在胸部,一对在腹部,两对在腹股沟部(4,54)。未交配的大鼠用 MNU 处理后,在胸部比在腹部产生更多的肿瘤(41)。

[0009] 对肿瘤脉管系统的发展已进行了深入的研究。尺寸大于几毫米的肿瘤需要持续的营养供应,因此,有其自身的血管床和血流(10)。从原有血管补充新脉管系统称为“血管生成”。没有来自这些生成血管的持续营养供应,肿瘤会出现缺氧,然后死亡。因此,肿瘤脉管系统已成为相当长时间内癌症治疗的靶标(10)。

[0010] 肿瘤血管的发展与正常脉管系统完全不同,有不同的性质。单层上皮细胞是首先迅速形成的肿瘤血管。推测,响应缺氧条件时肿瘤会分泌某些生长因子,例如血管内皮生长因子 (VEGF),此时这些血管得到补充。这些新形成的肿瘤血管没有平滑肌层或神经分布(29,36,37)。

[0011] 肿瘤也可以整合具有所有自我调节功能的成熟血管(29)。正常组织血管紧张是由许多内源性因素控制的,如 H^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 pO_2 、 pCO_2 、一氧化氮 (NO),以及其它调节物质如内皮缩血管肽 (ET-1) (24,26)。

[0012] ET-1 是一种有力的血管收缩剂,在调节血管收缩中起显著作用(61)。在乳腺癌组织中,在基质成纤维细胞上发现有 ET_B 受体(5,34)。并且发现内皮缩血管肽对成纤维细胞(53)、黑素细胞、血管平滑肌和内皮具有促有丝分裂作用(3,35,52)。研究表明,乳腺癌中

ET-1、ET-3 和 ET_B 受体表达上升 (1)。这表明,ET-1 和 ET-3 都导致 VEGF 增加,这种增加是重要的促血管生成因素 (35)。因此,ET-1 的增加促进肿瘤生长。某些研究报道乳腺癌中 ET-1 水平上升 (1,21,31,33,59,60)。

[0013] 本发明涉及实体瘤组织中内皮缩血管肽拮抗剂和内皮缩血管肽激动剂的全身性血液动力学和血液循环效果。本发明还涉及内皮缩血管肽拮抗剂和内皮缩血管肽激动剂在治疗实体瘤中的应用。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及在实体瘤治疗中给予有需要的个体治疗有效量的内皮缩血管肽激动剂和化疗药物。本发明还涉及在预防和治疗实体瘤如乳腺癌中,给予有需要的个体治疗有效量的内皮缩血管肽拮抗剂。

[0016] 具体地说,肿瘤生长需要血液供应。ET 是血流的强力调节剂。已发现, ET_A 受体使血管收缩, ET_B 受体使血管扩张。与本发明一致,研究表明在乳腺癌组织中有丰富的 ET_B 受体,并且 ET_B 受体拮抗剂可以阻止 ET-1 诱导的乳腺癌组织血流增加。因此,内皮缩血管肽拮抗剂,特别是 ET_B 受体拮抗剂,可用于预防乳腺癌和其它具有 ET_B 受体调节血流的实体瘤的生长。

[0017] 另外,因为 ET_B 受体使血管扩张,我们发现 ET_B 受体激动剂与化疗药物组合,可用于治疗实体瘤,如在乳腺癌中发现的肿瘤。在该实施方案中, ET_B 受体激动剂更有效的将化疗药物传递到乳腺癌,导致疗效提高。

[0018] 因此,本发明的一个方面是提供了治疗实体瘤的方法,包括给予有需要的哺乳动物治疗有效量的内皮缩血管肽激动剂和化疗药物。

[0019] 本发明的另一个方面是提供了组合物,该组合物包含内皮缩血管肽激动剂,尤其是 ET_B 激动剂。这种组合物可用于治疗实体瘤。内皮缩血管肽激动剂可与化疗药物联合应用。具体地说,本发明涉及含有内皮缩血管肽激动剂的组合物,以及联合给予内皮缩血管肽激动剂和化疗药物以治疗实体瘤的方法。

[0020] 本发明的再一方面提供组合物,该组合物包含内皮缩血管肽激动剂、第二种用于治疗实体瘤的药物和赋形剂。

[0021] 本发明的再一方面提供预防和治疗实体瘤的方法,该方法包括给予有需要的哺乳动物治疗有效量的内皮缩血管肽拮抗剂。内皮缩血管肽拮抗剂可以是内皮缩血管肽 B 拮抗剂,也可以是混合的内皮缩血管肽 A/B 拮抗剂。优选该内皮缩血管肽拮抗剂包含特异性内皮缩血管肽 B (ET_B) 拮抗剂。该内皮缩血管肽拮抗剂任选与血管生成抑制剂、放射治疗或二者联合应用。

[0022] 本发明的再一个方面是提供包含内皮缩血管肽拮抗剂、尤其是 ET_B 拮抗剂的组合物,将其给予有需要的个体。该组合物用于预防和治疗实体瘤。

[0023] 本发明的另一个方面是提供组合物,该组合物包含内皮缩血管肽拮抗剂、第二种用于预防或治疗实体瘤的药物和赋形剂。

[0024] 本发明的另一个方面是提供制造用于人类药用的物品,包括 (a) 容器, (b1) 包含内皮缩血管肽激动剂的包装组合物,任选 (b2) 包含第二种实体瘤治疗药物的包装组合物,以及 (c) 包装插入物,包含在实体瘤治疗中同时或依次给予的组合物的使用说明。在一个优选实施方案中,内皮缩血管肽激动剂是 ET_B 受体激动剂,第二种治疗药物是化疗药物。

[0025] 本发明的另一个方面是提供制造用于人类药用的物品,包括 (a) 容器, (b1) 包含内皮缩血管肽拮抗剂的包装组合物,任选 (b2) 包含第二种实体瘤治疗药物的包装组合物,以及 (c) 包装插入物,包含在实体瘤预防或治疗中同时或依次给予的组合物的使用说明。在一个优选实施方案中,内皮缩血管肽拮抗剂是 ET_B 受体拮抗剂,第二种治疗药物是血管生成抑制剂、放射治疗或二者。

[0026] 通过结合附图和下面对本发明优选实施方案的详述,本发明的这些和其它的创新方面是显而易见的。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 包含条形图,表示盐水处理和 MNU 处理的带瘤大鼠中 ET-1 对全身血液动力学的影响。

[0029] 图 2 包含条形图,表示盐水处理和 MNU 处理的大鼠乳腺组织 中 ET-1 对血流和局部血管阻力的影响。

[0030] 图 3 包含曲线图,表示在大鼠盐水处理的乳腺组织和 MNU 处理的肿瘤组织中,ET-1 对灌注、CMBC 和血细胞速度的影响。

[0031] 图 4 包含曲线图,表示在大鼠盐水处理的乳腺组织和 MNU 处理的肿瘤组织中,BQ788 对 ET-1 诱导的灌注、CMBC 和血细胞速度变化的影响。

[0032] 图 5 包含曲线图,表示肿瘤灌注中 IRL1620 对紫杉醇诱导变化的影响。

[0033] 优选实施方案详述

[0034] 本发明涉及预防和治疗实体瘤(包括乳腺癌)的组合物和方法。具体地说,本发明涉及药用组合物,其中包含 (a) 内皮缩血管肽激动剂和任选的化疗药物,或 (b) 内皮缩血管肽拮抗剂和任选的血管生成抑制剂。

[0035] 本发明还涉及生产的物品,其中包含内皮缩血管肽拮抗剂和任选的血管生成抑制剂,单独或共同包装,以及说明使用这些活性药物预防或治疗实体瘤的插入物。

[0036] 另外,本发明还涉及生产的物品,其中包含内皮缩血管肽激动剂和化疗药物,独立或单独包装,以及说明使用这些活性药物治疗实体瘤的插入物。

[0037] 本文公开的一种方法在实体瘤治疗中使用内皮缩血管肽激动剂和化疗药物。可同时或依次给予足量的激动剂和化疗药物,以达到所需治疗效果。

[0038] 本文公开的另一种方法在实体瘤治疗中使用内皮缩血管肽拮抗剂,任选还使用血管生成抑制剂。可同时或依次给予足量的拮抗剂和血管抑制剂,以达到所需治疗效果。

[0039] 对于本文公开的本发明目的,术语“治疗”包括预防实体瘤、减缓实体瘤的进展、缩小或消除实体瘤。因而,术语“治疗”包括 适当的医学治疗性给药和 / 或预防性给药。

[0040] 术语“容器”指任何适合储存、运输、分配和 / 或处理药用产品的容器和封闭体。

[0041] 术语“插入物”指同伴随药用产品的信息,提供给予产品的说明,以及所需的安全性和功效数据,使医生、药剂师和患者根据产品的应用作出基于可靠信息的决定。包装插入物一般被认为是药用产品的“标签”。

[0042] 术语“前药”指在体内快速转变成本发明有用化合物的化合物,如通过水解。关于前药的详细讨论请参见 Higuchi 等, Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14, of the A. C. S. D. Symposium Series 和 Roche(ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1981。

[0043] 内皮缩血管肽是已知可调节血流的血管活性物质,并有促有丝分裂特性。与正常的乳腺组织相比,乳腺癌组织里有高浓度的内皮缩血管肽。与本发明一致,已表明乳腺癌中内皮缩血管肽受体一种亚型(ET_B)也是增加的。内皮缩血管肽作用于ET_B受体,产生血管扩张,增加乳腺癌组织的血流量。重要的是,也已发现ET_B受体拮抗剂可阻止内皮缩血管肽诱导的肿瘤组织血流量增加。

[0044] 由于内皮缩血管肽和ET_B受体在乳腺癌中过量表达,选择性ET_B受体拮抗剂(如BQ788)可用于阻止乳腺癌组织中内皮缩血管肽诱导的血管扩张,切断或减少乳腺癌生长所需的血液供应和营养供应。ET_B拮抗剂可以单独使用,或与抑制肿瘤组织中新血管形成的血管生成抑制剂(如沙利度胺)联合使用。一旦肿瘤组织的血液供应和营养供应减少,肿瘤的生长也降低了。

[0045] 另外,大多数化疗药物具有破坏癌细胞的细胞毒性,但该过程中向人体正常生理系统施加巨大损伤。因此,将化疗药物选择性传递到肿瘤组织具有极大的优势。因此,选择性增加肿瘤血液供应的ET_B受体激动剂可增加化疗药物的传递和效力。因此,ET_B受体激动剂可选择性增加化疗药物(如他莫昔芬)向乳腺癌的传递,并增加化疗药物的效力。

[0046] 更具体地说,肿瘤的血液供应已成为癌症治疗的靶标。已知某些血管活性物质可以调节血流量,包括内皮缩血管肽-1(ET-1)。与正常乳腺组织(即0.12pg/mg组织)相比,乳腺癌组织中ET-1以高浓度存在(即11.95pg/mg组织)(Kojima等, Surg. Oncol., 4(6):309-315(1995);Kurbel等, Med. Hypotheses, 52(4):329-333(1999); Patel等, Mol. Cell Endocrinol., 126(2):143-151(1997); Yamashita等, Cancer Res., 52(14):4046-4049(1992); Yamashita等, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 74(3):363-369(1991))。

[0047] 研究表明,在乳腺癌中ET-1、ET-3和ET_B受体表达增加(III级,与对照的阴性染色相比是强染色)(Alanen等, Histopathology, 36(2):161-167(2000))。同时也发现,ET-1通过刺激ET_B受体使乳腺癌的血流量增加。ET_B受体拮抗剂BQ788完全阻断ET-1诱导的肿瘤血流量增加。由于乳腺癌组织中ET_B受体表达增强,ET_B受体拮抗剂可用于选择性降低乳腺癌的血液供应,而ET_B受体激动剂可用于增加乳腺癌组织的血流量。

[0048] 因此,ET_B受体激动剂和化疗药物的联合应用降低乳腺癌的生长。另外,ET_B受体拮抗剂,单独应用或是与血管生成抑制剂联合应用,都可显著降低乳腺癌的生长。

[0049] 联合给予ET_B受体激动剂和化疗药物也可用于治疗或预防其它的实体瘤,包括但不限于卵巢癌、结肠癌、卡波西肉瘤、乳腺癌和黑素瘤。内皮缩血管肽拮抗剂单独使用或与血管生成抑制剂联合使用,也可用于治疗或预防实体瘤。

[0050] 下表列出了各种实体瘤中ET受体的表达。

肿瘤	ET受体表达	参考文献
卵巢癌	ET _A 和ET _B 受体	Bagnato等, Cancer Res, 1999, 59, 720-727
结肠癌	ET _A 受体在基质中 ET _B 受体在内皮和肌成纤维细胞中	Egidy等, Am J Pathology, 2000, 157, 1863-1874
卡波西肉瘤	ET _A 和ET _B 受体在肿瘤和肿瘤间血管中	Bagnato等, Am J Pathol, 2001, 158, 841-847
乳腺癌	ET _B 受体	Alanen等, Histopathology: 2000, 36(2):161
黑素瘤	ET _B 受体	Kikuchi等, Biochem Biophys Res Comm, 1996, 219, 734-739

[0051] 在本发明的一个实施方案中,联合应用内皮缩血管肽激动剂和化疗药物治疗实体瘤。在该方法中,内皮缩血管肽激动剂、尤其是ET_B激动剂增加富含ET_B受体的乳腺癌的血流量。因此,ET_B激动剂为化疗药物提供选择性靶标,提高该药物的化疗效果。

[0052] 本发明中有用的 ET_B 激动剂包括但不限于 ET-1、ET-2、ET-3、BQ3020、IRL1620、sarafotoxin S6c、[Ala^{1,3,11,15}]ET-1 及其混合物。

[0053] 理论上但不是本文的基础,内皮缩血管肽激动剂刺激 ET_B 受体并且扩张肿瘤血管,因此增加化疗药物向肿瘤中的传递。内皮缩血管肽激动剂也增加实体瘤的血液灌注,因此增加组织的氧化。增强的氧化已知可增强化疗药物的治疗作用。当共同给予时,内皮缩血管肽的促有丝分裂作用也可帮助增加化疗药物的作用。内皮缩血管肽的促有丝分裂作用可改善分裂细胞中化疗药物的整合,从而增加化疗药物的效力。

[0054] 在该实施方案中, ET_B 激动剂与化疗药物联合应用。 ET_B 激动剂提高化疗的治疗益处,包括诱导化疗和术前(新辅助)化疗。另外,在癌症治疗中化疗常做为手术的辅助疗法。辅助性化疗的目的是在原发性肿瘤得到控制时降低复发的危险和增加无病存活。通常当疾病为转移性时化疗作为癌症的辅助治疗。因此,在实体瘤治疗中尤其可在手术后联合应用 ET_B 激动剂和化疗。

[0055] 可用于本发明方法的化疗药物包括但不限于烷基化试剂、抗代谢物、激素及其拮抗剂、放射性同位素、抗体、天然产物及其混合物。例如, ET_B 拮抗剂可以与下药物联合应用: 抗生素,如多柔比星及其蒽环类似物; 氮芥,如环磷酰胺; 嘧啶类似物,如 5- 氟尿嘧啶; 顺铂; 羟基脲; 紫杉醇及其自然和合成衍生物等。作为另一个实例,对于乳腺癌等混合瘤,其中肿瘤包括促性腺激素依赖性和促性腺激素非依赖性的细胞, ET_B 激动剂可与亮丙立得或戈舍瑞林(LH-RH 的合成肽类似物)联合给予。下表列出了可用于本发明方法的化疗药物的实例。

烷化剂	表鬼臼霉素	激素和拮抗剂
氮芥	依托泊苷	肾上腺皮质类固醇 /
氮芥	替尼泊苷	拮抗剂
环磷酰胺	抗生素	泼尼松和等效物
异环磷酰胺	放线菌素 D	地塞米松
美法仑	道诺霉素 (柔红霉素)	氨鲁米特
苯丁酸氮芥	多柔比星 (阿霉素)	孕激素
亚硝基脲	米托蒽醌伊达比星	己酸羟孕酮
卡莫司汀 (BCNU)	博来霉素普卡霉素 (光辉霉素)	醋酸甲羟孕酮
洛莫司汀 (CCNU)	丝裂霉素 C	醋酸甲地孕酮
司莫司汀 (甲基-CCNU)	放线菌素 D	雌激素
乙烯亚胺 / 甲基蜜胺	酶	己烯雌酚
三甲基蜜胺 (TEM)	L- 天冬酰胺酶	炔雌醇 / 等效物
三亚乙基硫代磷酰胺 (塞替派)	生物反应调节剂	抗雌激素
六甲基蜜胺 (HMM)	干扰素 - α	他莫昔芬
磺酸烷基酯	IL-2	雄激素
白消安	G-CSF	丙酸睾酮
三嗪	GM-CSF	氟甲睾酮 / 等效物
达卡巴嗪 (DTIC)	分化剂	抗雄激素
抗代谢药	维 A 酸衍生物	氟他胺
叶酸类似物	放射敏化剂	促性腺激素释放素类似物
甲氨蝶呤	甲硝唑	亮丙立德
三甲曲沙	米索硝唑	非甾体类抗雄激素
嘧啶类似物	去甲米索硝唑	氟他胺
5- 氟尿嘧啶	哌莫硝唑	光敏化剂
氟脱氧尿苷	依他硝唑	血卟啉衍生物
吉西他滨	尼莫唑	Photofrin [®]
阿糖胞苷 (AraC)	RSU 1069	苯并卟啉衍生物
5- 氮杂胞苷	E09	Npe6
2,2' - 二氟脱氧胞苷	RB 6145	初卟啉锡 (SnET2)
嘌呤类似物	SR4233	Pheboride-a
6- 巯基嘌呤	烟酰胺	细菌叶绿素 -a
6- 硫鸟嘌呤	5- 溴脱氧尿嘧啶	茶酞菁
硫唑嘌呤	5- 溴脱氧尿苷	酞菁
2' - 脱氧考福霉素 (喷司他丁)	5- 碘脱氧尿苷	酞菁锌
赤羟基壬基腺嘌呤 (erythrohydroxynonyl- adenine) (EHNA)	溴脱氧胞苷	
磷酸氟达拉滨	其它药物	

[0056]

2- 氯脱氧腺苷 (克拉屈 滨, 2-CdA)	铂配位络合物	
I 型拓扑异构酶抑制剂	顺铂	
喜树碱	卡铂	
托泊替康	蒽二酮 (Anthracenedione)	
伊立替康	米托那明	
天然产物	取代尿素	
抗有丝分裂药	羟基脲	
紫杉醇	甲基胍衍生物	
长春花生物碱 (Vinca alkaloids)	N- 甲基胍 (MIH)	
长春碱 (VLB)	丙卡巴胍	

长春新碱	肾上腺皮质抑制剂	
长春瑞滨	米托坦 (o, p' -DDD)	
Taxotere [®] (多西他赛)	氨鲁米特	
雌莫司汀	细胞因子	
磷酸雌莫司汀	干扰素 (α 、 β 、 γ)	
	白介素 -2	

[0057] 尤其可与 ET_B 激动剂联合应用的化疗药物的实例包括,例如,阿霉素、喜树碱、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、干扰素 (α 、 β 、 γ)、白介素 2、伊立替康、多西他赛、紫杉醇、托泊替康,以及治疗有效类似物和衍生物。

[0058] 在本发明的另一个实施方案中,组合物和方法中使用的内皮缩血管肽拮抗剂可为本领域已知的任何 ET_B 受体拮抗剂。ET_B 受体有力地扩张血管。ET_B 拮抗剂抑制 ET_B 的活性,用于限制血流。

[0059] 用于本发明中的 ET_B 拮抗剂可为选择性 ET_B 拮抗剂或平衡的 ET_A/ET_B 拮抗剂。用于治疗 and / 或预防实体瘤的 ET_B 受体拮抗剂和平衡的 ET_A/ET_B 拮抗剂如本文附录 A-C 所述。其它有用的内皮缩血管肽拮抗剂可在美国专利申请公开号 US 2002/0082285 A1 中找到,通过引用结合到本文中。

[0060] 可用于本发明的 ET_B 拮抗剂的实例包括但不限于阿曲生坦、替唑生坦、波生坦、西他生坦、恩拉生坦、Ro468443、TBC10950、TBC10894、A192621、A308165、SB209670、SB217242、A182086、(s)-Lu302872、J-104132、TAK-044、Sarafotoxin 56c、IRL2500、RES7011、阿塞拉素 (Aselacin) (A、B、C)、Ro470203、Ro462005、磺胺甲噁唑、cochinmicin(I、II、III)、L749329、L571281、L754142、J104132、CGS27830、A182086、PD142893、PD143296、PD145065、PD156252、PD159020、PD160672、PD160874、TM-ET-1、IRL3630、Ro485695、L753037、LU224332、PD142893、LU302872、PD145065、Ro610612、SB217242、BQ788 及其混合物。BQ788 是优选的特异性内皮缩血管肽 B 拮抗剂,为 N-顺-2,6-二甲基哌啶子基羰基-L- γ -甲基亮氨酸-D-1-甲氧基羰基色氨酸-正亮氨酸的钠盐(参见 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4892-4896 (1994))。

[0061] 除传统的内皮缩血管肽拮抗剂外,抑制内源性内皮缩血管肽形成的化合物也可作为本发明中的内皮缩血管肽拮抗剂。这种化合物是有用的,因为它们防止内皮缩血管肽的形成,因此降低了内皮缩血管肽受体的活性。一类这种化合物为内皮缩血管肽转化酶 (ECE) 抑制剂。有用的 ECE 抑制剂包括但不限于 CGS34225 (即 N-((1-((2-(S)-(乙酰基硫代)-1-氧代戊基)-氨基)-1-环戊基)-羰基-S-4-苯基苯基-丙氨酸甲酯)和磷酸二肽 (即 N-(1-吡喃鼠李糖基氧基羟基氧磷基)-亮氨酸-色氨酸)。

[0062] 如下文中更完整的描述,ET_B 受体拮抗剂可与血管生成抑制剂联合应用。如前所述,血管生成是从现有血管上长出新的血管。血管生成抑制剂阻止或是消除新血管的产生。

[0063] 本发明的方法中,任何本领域已知的血管生成抑制剂可与 ET_B 拮抗剂合用。血管生成抑制剂的实例包括但不限于沙利度胺、马立马司他、COL-3、BMS-275291、角鲨胺、2-ME、SU6668、新伐司他、Medi-522、EMD121974、CAI、塞来考昔、白介素 -12、IM862、TNF470、阿瓦斯丁 (avastin)、甲磺酸伊马替尼、曲妥单抗及其混合物。

[0064] 本发明的一种方法中,给予有需要的个体 ET_B 拮抗剂和任选的血管生成抑制剂,通过控制血流量和抑制新血管形成来治疗实体瘤,个体也可用放射治疗和 / 或者放射敏化剂

来进行治疗。

[0065] 本文使用的术语“放射敏化剂”定义为以治疗有效量给予人或其它动物的化合物，以提高细胞对电磁辐射的敏感性和/或促进治疗可使用电磁辐射治疗的疾病。放射敏化剂可以和 ET_B 拮抗剂以及任选的血管生成抑制剂联合给予。

[0066] 本文使用的术语“电磁辐射”和“放射”包括但不限于波长在 10-20nm 到 100 米的放射。本发明的优选实施方案使用以下电磁辐射： γ 射线 (10-20 到 10-13m)、X 射线 (10-12 到 10-9m)、紫外线 (10nm 到 400nm)、可见光 (400nm 到 700nm)、红外放射 (700nm 到 1.0mm) 以及微波放射 (1mm 到 30cm)。

[0067] 当前许多癌症治疗方案都使用电磁辐射 (如 X 射线放射) 活化的放射敏化剂。X 射线活化的放射敏化剂的实例包括但不限于下述：甲硝唑、米索硝唑、去甲米索硝唑、哌莫硝唑、依他硝唑、尼莫唑、丝裂霉素 C、RSU 1069、SR 4233、E09、RB 6145、烟酰胺、5- 溴脱氧尿苷 (BUdR)、5- 碘脱氧尿苷 (IUdR)、溴脱氧胞苷、氟脱氧尿苷 (FUdR)、羟基脲、顺铂及其治疗有效的类似物和衍生物。

[0068] 癌症的光动力学使用可见光作为光敏化剂的放射激活物。光动力放射敏化剂的实例包括但不限于血卟啉衍生物、PHOTOFRIN[®]、苯并卟啉衍生物、NPe6、初卟啉锡 (SnET2)、pheorbide-a、细菌叶绿素 -a、萘酞菁、酞菁、酞菁锌及其治疗有效的类似物和衍生物。

[0069] 总的来说，因为生长因子如内皮生长因子 (VEGF)、血管活性物质如内皮缩血管肽 (ET-1) 和细胞因子产生的改变，乳腺癌中血管的结构、生长和功能与正常乳腺组织有显著的不同。ET-1 在乳腺癌血管生成中的作用还没有充分了解。研究表明，乳腺癌中前 ET-1、前 ET-3 和 ET_B 受体的表达增加。但是，还不清楚乳腺癌中 ET-1 诱导的血管反应是否存在变化。因此，研究了在带乳腺癌大鼠中 ET-1 对全身性血液动力学和局部循环的影响。

[0070] 通过研究第一次表明，ET-1 通过刺激 ET_B 受体而使乳腺癌的血流量增加。 ET_B 受体拮抗剂 BQ788 完全阻断 ET-1 诱导的肿瘤血流增加。因为乳腺癌组织中 ET_B 受体表达增强， ET_B 受体拮抗剂可用于选择性降低肿瘤组织的血液供应。

[0071] 类似地， ET_B 受体激动剂增加肿瘤组织的血液供应，因此有助于向肿瘤组织给予化疗药物。因此，实体瘤如乳腺癌的治疗中可联合给予 ET_B 受体激动剂和化疗药物。另外，大多数化疗药物具有破坏癌细胞的细胞毒性。但是，该过程中化疗药物向人体正常生理系统施加巨大损伤。因此， ET_B 受体激动剂选择性增加肿瘤的血液供应，增加化疗药物的传递和效力。

[0072] 在乳腺癌的治疗中， ET_B 受体拮抗剂可单独使用，或与血管生成抑制剂联合应用。血管生成抑制剂阻止肿瘤生长所必需的新血管形成。因此，将血管生成抑制剂与选择性减少乳腺癌组织血液供应的 ET_B 受体拮抗剂联合应用，显著降低肿瘤的生长。

[0073] 因此， ET_B 受体激动剂与化疗药物联合应用降低实体瘤的生长。另外，单独使用 ET_B 受体拮抗剂或将其与血管生成抑制剂联合应用，显著降低实体瘤的生长。

[0074] 材料和方法

[0075] 动物

[0076] 使用体重在 180-200 克的雌性 Sprague Dawley 大鼠 (Harlan Co., Madison, WI)。所有的大鼠三只一笼，处于控温室内 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$)，湿度为 $50 \pm 10\%$ 人工光照 (06:00-18:00)。动物饮水和进食不受限制。动物适应环境至少四天后进行试验。

[0077] 药物

[0078] N-甲基亚硝基脲 (MNU) 购自 Ash Steven Inc., Detroit, MI。BQ788 (N-顺-2,6-二甲基哌啶子基羰基-L-γ-甲基亮氨酸-D-1-甲氧基羰基色氨酸-正亮氨酸)、IRL1620 和内皮缩血管肽-1 (ET-1) 获自 American Peptide Company Inc., Sunnyvale, CA。将 BQ788 溶于盐水, ET-1 溶于 0.1% 白蛋白。

[0079] 研究 IRL1620 和紫杉醇影响乳腺癌灌注的方法

[0080] 给予雌性 Sprague Dawley 大鼠 MNU (50mg/Kg, 腹膜内注射) 或盐水 (1ml/Kg, 腹膜内注射)。当肿瘤直径达到 2-4 厘米开始进行血流试验。动物分为以下几组:

[0081] (i) 正常大鼠, 注射盐水后 15 分钟注射紫杉醇 (3mg/kg) (N = 4);

[0082] (ii) 正常大鼠, 注射 RL1620 (3nmol/kg) 后 15 分钟注射紫杉醇 (3mg/kg) (N = 4);

[0083] (iii) 带瘤大鼠, 注射盐水后 15 分钟注射紫杉醇 (3mg/kg) (N = 4);

[0084] (iv) 带瘤大鼠, 注射 RL1620 (3nmol/kg) 后 15 分钟再在注射完紫杉醇 (3mg/kg) (N = 4)。

[0085] 手术准备

[0086] 大鼠用乌拉坦麻醉 (1.5g/kg, 腹膜内注射) (Sigma Chemicals, ST. Louis, MO)。将左侧股静脉插套管 (PE 50 管料, Clay Adams, Parsipanny, NJ) 用于给药。左侧股动脉插套管, 用于提取参照血样。右侧股动脉插套管, 连接到 Gould P23 ID 压力传感器, 通过 7PI 前置放大器在 Grass P7D 多道记录仪 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) 上记录血压。使用 7P4B Grass 血流速度仪 (Grass Instrument Co., Quincy, MA), 通过血压信号触发记录心跳速度 (HR)。

[0087] 用激光多普勒流量计 (LDF) 测量乳腺血液灌注

[0088] 使用激光多普勒流量计测量大鼠乳腺的血液灌注。剃光大鼠乳头附近的毛, 切开乳腺周围的皮肤。将标准型号的光纤探针固定于乳腺动脉, 并将其与 Periflux PF2b 4000 激光多普勒流量计 (PerimedKB, Stockholm, Sweden) 连接。时间常数设定为 1.5 秒, 带宽设定为 4KHz。

[0089] 统计分析

[0090] 所有数据表示为平均值 ± SEM。依次使用方差分析和 Duncan 测试分析数据。当 $p < 0.05$ 的水平被认为是显著的。

[0091] 结果

[0092] IRL1620 和紫杉醇对乳腺癌灌注的影响

[0093] 给予盐水或 IRL1620 以及紫杉醇后, 没有观察到正常大鼠乳腺组织血流量的变化。注射 IRL1620 后 (36.3%, $p < 0.05$) 和给予紫杉醇之后 (51.9%, $p < 0.05$), 可观察到肿瘤组织中的血流量与基线之间有显著差异 (参见附图 5)。

[0094] IRL1620 和紫杉醇对血压的影响

[0095] 在正常大鼠和带瘤大鼠中, 给予盐水或 IRL1620 以及紫杉醇之后, 没有观察到血压的变化。

[0096] 将 ET-1 灌注入大鼠的实验方案

[0097] 研究下列分组的动物, 评估正常和带瘤大鼠中 ET-1 的灌注对全身性血液动力学和乳腺组织血流量的影响:

[0098] (i) 盐水处理的大鼠中 ET-1 灌注 30 分钟 (50ng/kg/ 分钟) (N = 6) ;

[0099] (ii) MNU (50mg/kg, 腹膜内注射) 处理的大鼠中 ET-1 灌注 30 分钟 (50ng/kg/ 分钟) (N = 6)。

[0100] 研究下列各组, 评估正常和带瘤大鼠中, ET_B 受体在 ET-1 灌注诱导的全身性血液动力学和乳腺组织血流量变化中所起的作用:

[0101] (i) 盐水处理的大鼠中 BQ788 灌注 20 分钟 (0.5 μmol/kg), 然后 ET-1 灌注 30 分钟 (50ng/kg/ 分钟) (N = 5) ;

[0102] (ii) MNU (50mg/kg, 腹膜内注射) 处理的大鼠中 BQ788 灌注 20 分钟 (0.5 μmol/kg), 然后 ET-1 灌注 30 分钟 (50ng/kg/ 分钟) (N = 5)。

[0103] 研究前三个月, 通过腹膜内注射的方式进行 MNU 和盐水处理。处理后四周开始, 定期触诊大鼠。一旦肿瘤达到最佳大小 (即直径为 4-8 毫米), 开始进行试验。分别在基线、开始灌注 ET-1 (50ng/kg/ 分钟) 后 30、60 和 120 分钟时测定全身性血液动力学和局部循环的参数。因为 ET-1 灌注进行 30 分钟, 30 分钟的数据表明 ET-1 的效果, 60 和 120 分钟的数据表明 ET-1 效果的持续情况。

[0104] 手术准备

[0105] 大鼠用乌拉坦麻醉 (1.5g/kg, 腹膜内注射) (Sigma Chemicals, ST. Louis, MO)。将所有手术区的毛剃净并用酒精擦净。将左侧股静脉插套管 (PE 50 管料, Clay Adams, Parsipanny, NJ) 用于给药。左侧股动脉插套管 (PE 50 管料), 以用回收泵 (withdrawal pump) (22 型, Harvard Apparatus, South Natick, MA) 提取微球体研究中的参照血样。右侧股动脉插套管, 连接到 Gould P23 ID 压力传感器, 通过 7PI 前置放大器在 Grass P7D 多道记录仪 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) 上记录血压。使用 7P4B Grass 血流速度仪 (Grass Instrument Co., Quincy, MA), 通过血压信号触发记录心跳速度 (HR)。暴露右颈动脉, 将 PE 50 管沿颈总动脉插入左心室。通过用 Statham P23 DC 压力传感器 (Grass Instrument Co., Quincy, MA) 在 Grass 多道记录仪上记录压力, 确认套管存在于左心室。当套管到达左心室时, 舒张压下降到零。为了保持血液中 PO₂、pCO₂ 和 pH 常数, 同时为了防止呼吸对血压和 HR 的影响, 通过插入与啮齿动物通气仪 (683 型, Harvard Apparatus, South Natick, MA) 相连的气管内套管, 使动物保持恒定速率的人工呼吸。

[0106] 全身性血液动力学和局部循环的测定

[0107] 按照文献 (13, 16, 47) 所述的方法进行全身性血液动力学和区域血液循环的测定。每次测量时, 将 ⁴⁶Sc (钪)、¹¹³Sn (锡)、¹⁴¹Ce (铈) 或 ⁹⁵Nb (铌) (New England Nuclear Corporation, Boston, MA, USA) 标记的约 100,000 个微球体 (直径 15 ± 1 μm) 在 0.2ml 盐水中的充分混合悬浮液注入左心室, 并用 0.3ml 盐水冲洗 15 秒。为计算血流量, 从右股动脉按 0.5ml/ 分钟的速度抽出动脉血。在注射微球体前 5-10 秒开始取血, 持续 90 秒。在实验结束时, 用过量戊巴比妥钠杀死动物。所有组织和器官被解剖、称重并放入小瓶中。在 Packard Minaxi Auto-Gamma 5000 系列 γ 计数器中计数标准品、血样和组织的放射性, 并用当前窗口区分同位素能量。计算下列参数: (1) 心输出量 (CO) ((注入的放射性 × 动脉血提取速度) / 动脉血样品的放射性), (2) 心搏量 (SV) (CO/HR), (3) 总外周阻力 (TPR) (平均动脉压 (MAP)/CO), (4) 局部血流量 ((组织中的放射性 × 动脉血提取速度) / 动脉血样品的放射性), 以及 (5) 局部血管阻力 (MAP/- 局部血流量)。使用文献 (45) 中所述的计算

机程序来计算数据。

[0108] 用激光多普勒流量计 (LDF) 测量乳腺血液灌注

[0109] 如文献 (50,51) 所述的方法,使用激光多普勒流量计测量大鼠乳腺的血液灌注。剃净大鼠乳头附近的毛。在乳腺周围的表皮上切开约 6 厘米宽 4 厘米长的 lambeau。将标准型光纤探针放到 lambeau 的表面,然后用双面胶带固定到组织上。将 lambeau 置于金属容器中,绑好以防移动,然后连接到 Periflux PF2b 4000 激光多普勒流量计 (Perimed KB, Stockholm, Sweden) 上。时间常数设定为 1.5 秒,带宽设定为 4KHz。

[0110] 统计分析

[0111] 所有数据表示为平均值 $\pm$ SEM。依次用方差分析和 Duncan 测试分析数据。 $p < 0.05$ 的水平被认为是显著的。

[0112] 结果

[0113] 正常和带瘤大鼠中 ET-1 对全身性血液动力学的影响

[0114] 正常 (盐水处理) 大鼠中基线全身性血液动力学参数为 MAP : 111.1 ± 4.8 mmHg ; CO : 268.6 ± 17.6 ml/min ; SV : 0.87 ± 0.06 ml ; TPR : 419.6 ± 24.37 mmHg $\cdot$ min/ml ; HR : 312.5 ± 20.2 次/分钟。正常大鼠 ET-1 灌注后,在 30 分钟时观察到 MAP 的显著上升 (14.5% ; $p < 0.05$) ,120 分钟时下降 (17.8% ; $p < 0.05$) 。TPR 在 120 分钟时上升 (49.2% ; $p < 0.05$) 。ET-1 灌注后,CO 在 60 分钟和 120 分钟时下降 (分别为 22.9% 和 42.5% ; $p < 0.05$) 。SV 在 60 分钟和 120 分钟时下降 (分别为 20.9% 和 36% ; $p < 0.05$) 。HR 没有观察到显著的变化 (图 1)。

[0115] 带瘤大鼠 (MNU 处理) 中基线全身性血液动力学参数与正常大鼠类似。带瘤大鼠 ET-1 灌注后,MAP 在 30 分钟 (19.1% ; $p < 0.05$) 和 60 分钟 (15.3% ; $p < 0.05$) 时观察到有显著的上升。给予 ET-1 后,TPR 在 30 分钟 (73.9% ; $p < 0.05$) 、60 分钟 (39.7% ; $p < 0.05$) 和 120 分钟 (71.4% ; $p < 0.05$) 时上升。CO 在 30 分钟、60 分钟和 120 分钟时下降 (分别为 29.4%、16.7% 和 36.1% ; $p < 0.05$) 。SV 在 30 分钟、60 分钟和 120 分钟时显著下降 (分别为 31.1%、17.9% 和 32.1% ; $p < 0.05$) 。HR 没有观察到变化 (图 1)。

[0116] 正常和带瘤大鼠乳腺组织中 ET-1 对局部血流量和血管阻力的影响

[0117] 给予 ET-1 后,盐水处理的正常大鼠没有观察到乳腺组织血流量变化。在正常大鼠的乳腺组织中,灌注 ET-130 分钟后,即 60 分钟时观察到血管阻力显著下降 (18.6% ; $p < 0.05$) (图 2)。

[0118] 带瘤 (MNU 处理) 大鼠和正常 (盐水处理) 大鼠乳腺组织中的血流量和局部血管阻力明显不同。给予 ET-1 60 分钟后,与正常的大鼠相比,60 分钟时带瘤大鼠乳腺组织的血流量显著上升 (153% ; $p < 0.05$) 。带瘤大鼠的血管阻力在基线 (102% ; $p < 0.05$) 和给予 ET-1 后 60 分钟时 (147% ; $p < 0.05$) 与正常的大鼠有显著差别。

[0119] 用 LDF 测量正常和带瘤大鼠乳腺组织中 ET-1 对血液灌注的影响

[0120] 图 3 表示正常大鼠和带瘤大鼠乳腺组织中灌注、移动血细胞浓度 (CMBC) 和红细胞速度 (RBC) 的变化。给予 ET-1 后正常大鼠乳腺组织的血液灌注没有变化。与正常大鼠相比,给予 ET-1 后 30 分钟时带瘤大鼠乳腺组织中的灌注显著上升 (176% ; $p < 0.05$) 。带瘤大鼠中,这种灌注上升在给予 ET-1 后 60 分钟和 120 分钟回到基线。

[0121] 与正常大鼠相比,给予 ET-1 后 60 分钟时带瘤大鼠中 CMBC 显著上升 (54% ; p

< 0.05)。给予 ET-1 后第 120 分钟时 CMBC 回到基线。与正常大鼠相比,给予 ET-1 后 30 分钟时 RBC 速度显著上升 (252% ; $p < 0.05$)。给予 ET-1 两小时 (120 分钟) 后, RBC 速度回到基线。

[0122] 用 LDF 测量正常和带瘤大鼠乳腺组织中 BQ788 对 ET-1 诱导血液灌注变化的影响

[0123] 附图 4 分别表示正常和带瘤大鼠中, BQ788 对 ET-1 诱导血液灌注、CMBC 和 RBC 速度变化的影响。给予 BQ788 或 ET-1 灌注后, 正常大鼠乳腺组织的血液灌注没有显著变化。但是, BQ788 预处理大鼠中 ET-1 灌注后 30 分钟和第 60 分钟时, 带瘤大鼠乳腺瘤组织中的灌注显著降低 (分别为 $25.5 \pm 5.7\%$ 和 $25.17 \pm 2.8\%$; $p < 0.05$)。带瘤大鼠中, BQ788 预处理减少 ET-1 诱导的灌注增加。BQ788 预处理大鼠中, 给予 ET-1 后正常大鼠和带瘤大鼠的乳腺组织血液灌注没有区别。

[0124] 带瘤大鼠的基线 CMBC 显著高于正常大鼠的基线 CMBC (42.4% ; $p < 0.05$)。但是, BQ788 灌注后, 正常大鼠和带瘤大鼠的 CMBC 之间没有差别。另外, 这两组之间也没有观察到 RBC 速度的差别。

[0125] 上述实验表明了 ET-1 对盐水处理大鼠和 MNU 处理带瘤大鼠全身性血液动力学和乳腺组织血流量的影响。已知 ET-1 通过促进 VEGF 的产生来刺激血管生成。研究表明, 在许多癌症组织中 ET-1 增加, 如乳腺癌 (60)、乳腺叶状肿瘤 (59)、前列腺癌 (31)、肝癌 (21) 以及某些脑膜瘤 (33)。上述实验表明了乳腺癌中 ET-1 诱导的血管响应改变。这些实验中使用的的方法是公认的放射性微球体技术, 以研究全身性血液动力学和局部血液循环 (12-15)。

[0126] ET-1 是强力血管收缩剂 (61)。ET-1 属于约 21 个氨基酸长度的多肽家族。至少有三种 ET 受体存在, 就是我们所知道的 ET_A 、 ET_B 和 ET_C 。 ET_A 对 ET-1 有很高的亲和性, 但 ET_B 对 ET-1 和 ET-3 的亲性和性相当 (2, 17, 42)。ET-1 有复杂的心血管作用。当给予于麻醉和通气的大鼠时, 可以观察到血压立即下降后持续升高 (22)。已经发现 ET_A 受体对应于血管收缩反应, ET_B 受体对应于 ET-1 的血管扩张作用。给予 ET-1 会导致皮肤肿瘤的血流量增加, 这可能是由于 ET_B 的血管扩张作用 (6)。大鼠乳腺癌的血流量可出现类似的结果, 因为乳腺癌中 ET-1 和 ET_B 的含量上升。

[0127] 灌注 50ng/kg/分钟 的 ET-1 会诱导血压的两阶段反应, 即突然但短暂的下降, 然后持续上升。这些结果与先前的研究吻合 (20、30、38、56)。在正常大鼠和带瘤大鼠中, ET-1 都会产生很明显的加压反应, 同时伴随 SV 和 CO 显著下降。在正常大鼠和带瘤大鼠中, TPR 都显著增加, 这可解释所观察到的加压反应。

[0128] 与正常大鼠的血流量相比, 带瘤大鼠乳腺瘤组织的基线血流量较高。在先期研究中也观察到了这种现象, 理论上是但不基于以下推论, 这种情况是由于肿瘤中新血管的再生 (55)。与正常大鼠的乳腺组织相比, 给予 ET-1 之后乳腺癌的血流量明显增加。激光多普勒流量计显示乳腺癌的血液灌注增加, 这确认了给予 ET-1 之后所观察到的乳腺癌组织中血流量增加。理论上是但不基于以下推论, 血管灌注的增加是由于 RBC 速度或是 CMBC 增加, 或是二者都增加。在 ET-1 灌注结束时可以观察到 RBC 速度的增加, 而在 ET-1 灌注完成 30 分钟后观察到 CMBC 速度的增加。

[0129] 另外, 理论上是但不基于以下推论, 响应 ET-1 的血流量增加是由于 ET_B 介导的血管扩张。研究发现, 乳腺癌组织中 ET-1 和 ET_B 受体表达大量增加 (1, 60)。与本发明一致, 已经发现给予 BQ788 可以阻止 ET-1 诱导的肿瘤组织血流量增加。BQ788 (即 N-顺-2,6-二

甲基哌啶子基羰基-L-γ-甲基亮氨酸-D-1-甲氧基羰基色氨酸-正亮氨酸)是特异性 ET_B 受体拮抗剂。BQ788 抑制与 ET_B 受体的结合, IC₅₀ 值为 1.2nM。

[0130] BQ788 用于测定 ET_B 受体在 ET-1 诱导的乳腺癌血管扩张过程中的作用。结果显示, ET-1 诱导乳腺癌血管扩张反应是通过 ET_B 受体介导的。与平滑肌细胞相比, 内皮细胞中 ET_B 受体的表达明显较高, 并且受各种生长因子和细胞因子的控制 (49)。正常乳腺组织中 ET_B 受体水平比 ET_A 受体高 (1), 理论上是但不基于以下推论, 患乳腺癌期间 ET_B 受体的过度表达有助于保持肿瘤组织的血流量。

[0131] 随着肿瘤生长, 会生长出新血管来供应营养。新生血管可与原先存在于肿瘤中的血管整合, 也可产生新的血管 (7)。研究表明, 新血管与正常血管系统相比有着不同的物理性质。与正常血管不同, 这些血管没有任何平滑肌层和神经分布, 仅仅由单层内皮细胞组成。

[0132] 总的来说, 本发明的实验清楚地显示, ET-1 的灌注使乳腺癌组织血流量增加和血管阻力下降, 并且 ET_B 受体拮抗剂 (如 BQ788) 可以阻止这种血流量增加。

[0133] 在大鼠乳腺癌中所观察到的血流量增加是由于 ET_B 受体的增加。因此, 阻断这些受体可以降低肿瘤的血流量。这些发现在临床方面的重要性就是 ET_B 受体拮抗剂在降低乳腺癌的血液供应中起重要作用, 因此可以预防和 / 或降低乳腺癌和常见实体瘤的生长。

[0134] 因此, 这些实验结果清楚地显示, ET_B 拮抗剂 (如 BQ788) 可以预防或治疗实体瘤。ET_B 拮抗剂任选与血管生成抑制剂组合, 以加强 ET_B 拮抗剂的作用。

[0135] ET_B 拮抗剂、任选的血管生成抑制剂、ET_B 激动剂和化疗药物 (下面统称为“活性成分”) 可配制在适当的赋形剂中, 用于口服或是胃肠外给药。这种赋形剂是本领域熟知的。这种组合中活性成分的量一般占总重量的约 0.1% - 约 75%。

[0136] 含有活性成分的药用组合物适合给予人和其它哺乳动物。一般这种药用组合物是消毒过的, 不合给药时会导致不良反应的毒性物质、致癌物质或致突变物质。给予这种药用组合物可在实体瘤生长开始之前、之中或之后进行。

[0137] 本发明的方法可以通过使用上述活性成分来完成, 或使用其生理学可接受的盐、衍生物、前药或溶剂合物。活性成分可作为纯化合物给予, 或作为含有任一种或多种实体的药用组合物给予。

[0138] 活性成分可通过任何合适的途径给予, 例如口服、口颊、吸入、舌下、直肠、阴道、通过腰椎穿刺的池内、经尿道、鼻、经皮 (即透皮) 或胃肠外 (包括静脉内、肌内、皮下和冠内) 给药。胃肠外给药可用针和注射器进行, 或使用高压技术进行, 如 POWDERJECT[®]。

[0139] 药用组合物还包含治疗有效量的活性成分, 以达到其预期目的。更具体的说, “治疗有效量”是能有效预防实体瘤的发生、减慢或阻止其发展或降低其大小的剂量。治疗有效量的决定在本领域技术人员的能力范围之内, 尤其是根据本文提供的详细公开。

[0140] “治疗有效量”指达到所需效果的活性成分的量。这种活性成分的毒性和疗效可通过细胞培养或动物实验中的标准药用方法来测定, 如测定 LD₅₀ 值 (总数 50% 致死的剂量) 和 ED₅₀ 值 (总数 50% 治疗有效的剂量)。毒性和疗效的剂量比就是治疗指数, 表达为 LD₅₀ 值和 ED₅₀ 值之间的比。优选高的治疗指数。获得的数据可用于制定人类的使用剂量范围。活性成分的剂量优选在范围之内, 该范围包括几乎没有或没有毒性的 ED₅₀ 浓度。剂量可根据使用的剂型和给药途径在该范围内变化。

[0141] 具体剂型、给药途径和剂量由具体医师根据患者的状况确定。剂量大小和间隔时间可个别调整,以提供足以维持治疗或预防效果的活性成分水平。

[0142] 给予的药用组合物的量取决于治疗对象、对象体重、疾病的严重程度、给药方式和处方医生的判断。

[0143] 具体地说,作为乳腺癌的治疗性或预防性治疗给予人类时,普通成人患者(70 千克)的活性成分口服剂量一般是每日约 10-200 毫克,一般每日分两到三次服用。因此,对于典型的成年患者,每个药片或胶囊包含在合适药学可接受赋形剂或载体中的约 0.1-50 毫克活性成分,给予一剂或多剂,每日一次或多次。静脉注射、口颊或舌下给药的剂量按需要一般为每剂约 0.1-10mg/kg。在实际操作中,由医师决定最适合个体患者的实际剂量范围,并且剂量随具体患者的年龄、体重和反应而变化。上述剂量为一般情况的范例,但个别情况下可给予更高或更低的剂量,这也在本发明的范围之内。

[0144] 可单独给予活性成分,或与药用载体混合给予,载体根据预期的给药途径和标准药学实践选择。本发明的药用组合物可按常规形式用一种或多种生理学可接受载体配制,载体包括赋形剂和助剂,有助于活性成分加工为可药用的制剂。

[0145] 这些药用组合物可通过传统方式生产,例如通过常规混合、溶解、制粒、制糖衣、乳化、装胶囊、捕获或冷冻干燥等程序。合适的制剂取决于所选的给药途径。当口服给予治疗有效量的活性成分时,组合物一般为片剂、胶囊、散剂、溶液剂或酏剂的形式。当以片剂的形式给药时,组合物还可包含固态载体,如明胶或辅料。片剂、胶囊和散剂含有约为 5% - 约 95% 的活性成分,优选约 25% - 约 90% 的活性成分。当以液态形式给药时,可加入液态载体,如水、石油、动物油或植物油等。液态形式的组合物还可含生理盐溶液、葡萄糖或其它糖类溶液、或乙二醇。当以液态形式给药时,组合物含约 0.5% - 约 90% (重量) 的活性成分,优选约 1% - 约 50% 的活性成分。

[0146] 当治疗有效量的活性成分通过静脉内、皮肤或皮下注射给药时,组合物为无热原、胃肠外可接受水溶液的形式。这种胃肠外可接受溶液具有应注意的 pH、等渗性和稳定性等,其制备是本领域技术人员熟知的。用于静脉内、皮肤或皮下注射给药的优选组合物一般还含有等渗赋形剂。

[0147] 适当的活性成分容易与本领域熟知的药学可接受载体组合。这种载体能使活性成分形成片、丸、糖锭、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆、悬浮液等,用于待治疗患者口服。用于口服的药用制剂通过以下步骤获得:将活性成分添加到固体赋形剂中,任选研磨所得混合物,加入合适的助剂,如果有需要再加工颗粒混合物,获得片剂或糖锭内核。合适的赋形剂包括,例如填充剂和纤维素制品。如果需要,可加入崩解剂。

[0148] 活性成分也可配制用于通过注射胃肠外给药,如通过快速浓注或连续灌注。注射剂型可为单位剂量形式,如在安瓿或多剂量容器中,加入了防腐剂。组合物可采用悬浮液、溶液或油性或水性载体中乳液的形式,并且含有成型剂 (formulatory agents),如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0149] 用于胃肠外给药的药用组合物包括水可溶形式活性成分的水溶液。另外,可将活性成分的悬浮液制成合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油或合成的脂肪酸酯。水性注射悬浮液可含有增强悬浮液粘度的物质。悬浮液还可任选含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度从而制备高浓度溶液的试剂。或者,本发明组合物在使用之前

可为粉末形式,以与合适的载体,如无菌无热原水组合。

[0150] 活性成分也可制成直肠组合物,如栓剂或保留灌肠剂,例如含有常规栓剂基质。除前述的制剂外,活性成分也可制成长效制剂。这种长时间作用制剂可通过植入(如皮下或肌肉内)或肌肉注射的方式给药。因此,例如,活性成分可与合适的以下物质配制:聚合或疏水材料(如可接受油中的乳液)、离子交换树脂或微溶衍生物(如微溶盐)。

[0151] 具体地说,活性成分可口服、口颊或舌下给药,以含赋形剂(如淀粉或乳糖)的片剂形式、单独或与赋形剂混合在胶囊或卵剂(ovules)中、含有矫味剂或着色剂的酏剂或悬浮液等形式。这种液体制剂可用药学可接受的添加剂,如悬浮剂制备。活性成分也可胃肠外注射,如静脉内、肌肉内、皮下或冠内注射。对于胃肠外给药,活性成分优选为无菌水溶液的形式,其中也可含有其它物质,例如盐或单糖(如甘露醇或葡萄糖),使溶液与血液等渗。

[0152] 对于兽用,活性成分按照通常兽用实践,以合适的可接受制剂形式给药。兽医容易决定最适合具体动物的剂量范围和给药途径。

[0153] 如上所述,已发现单独使用 ET_b 拮抗剂或将其与血管生成抑制剂联合使用,都能用于治疗或预防实体瘤。

[0154] 与 ET_b 拮抗剂相似,给予有效量的血管生成抑制剂以起到预期的作用。可通过任何合适的方式给予血管生成抑制剂,一般使用含有血管生成抑制剂的组合物。

[0155] 血管生成抑制剂可与 ET_b 拮抗剂同时给予,或在给予 ET_b 拮抗剂之前或之后给予。 ET_b 拮抗剂和任选的血管生成抑制剂可与实体瘤的放射治疗和任选的放射敏化剂联合给予。

[0156] 在另一实施方案中,通过给予治疗有效量的 ET_b 激动剂和化疗药物治疗实体瘤。可如前所述给予 ET_b 拮抗剂和血管生成抑制剂的方式给予 ET_b 激动剂和化疗药物。

[0157] 参考文献

- [0158] 1. K. Alanen et al., Histopathology, 36 :161 (2000).
- [0159] 2. H. Arai et al., Nature, 348 :730 (1990).
- [0160] 3. T. Asano et al., J. Neurooncol, 18 :1 (1994).
- [0161] 4. E. B. Astwood et al., Am J. Anat., 61 (1937).
- [0162] 5. P. A. Baley et al., J. Clin. Invest, 85 :1320 (1990).
- [0163] 6. K. M. Bell et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., 26 :s222 (1995).
- [0164] 7. D. J. Chaplin et al., Semin. Radiat. Oncol., 8 :151 (1998).
- [0165] 8. A. Cruz et al., J. Vasc. Res., 38 :536 (2001).
- [0166] 9. T. L. Dao et al., J. Natl. Cancer Inst., 71 :201 (1983).
- [0167] 10. J. Folkman, Cancer Res., 46 :467 (1986).
- [0168] 11. K. Goto, Biol. Pharm. Bull., 24 :1219 (2001).
- [0169] 12. A. Gulati et al., Am J. Physiol., 273 :H827 (1997).
- [0170] 13. A. Gulati et al., Life Sci., 55 :827 (1994).
- [0171] 14. A. Gulati et al., Crit. Care Med., 24 :137 (1996).
- [0172] 15. A. Gulati et al., J. Lab. Clin. Med., 126 :559 (1995).
- [0173] 16. A. Gulati et al., Alcohol, 6 :9 (1989).
- [0174] 17. S. Hori et al., Endocrinology, 130 :1885 (1992).

- [0175] 18. C. Huggins et al., Proc Natl Acad Sci U S A 45 :1294 (1959).
- [0176] 19. C. Huggins et al., Science, 137 (1962).
- [0177] 20. A. Inoue et al., Proc Natl Acad Sci U S A 86 :2863 (1989).
- [0178] 21. S. Kar et al., Biochem Biophys Res Commun 216 :514 (1995).
- [0179] 22. T. Kuwaki et al., Jpn J Physiol, 40 :827 (1990).
- [0180] 23. P. Lissoni et al., J Biol Regul Homeost Agents, 15 :140 (2001).
- [0181] 24. T. F. Luscher et al., The endothelium :modulator of cardiovascular function, CRC Press, Boca Raton, pg. 61 (1990).
- [0182] 25. D. Macejova et al., Endocr Regul, 35 :53 (2001).
- [0183] 26. A. Matsuura et al., Hypertension, 32 :89 (1998).
- [0184] 27. T. Matsuura et al., Br J Pharmacol, 122 :81 (1997).
- [0185] 28. T. Matsuura et al., Jpn J Pharmacol, 71 :213 (1996).
- [0186] 29. J. Mattsson et al., Tumor vessel innervation and influence of vasoactive drugs on tumor blood flow. In, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, pg. 129 (1979).
- [0187] 30. T. Miyauchi et al., Hypertension, 14 :427 (1989).
- [0188] 31. J. B. Nelson et al., Cancer Res, 56 :663 (1996).
- [0189] 32. Y. Okuda et al., Life Sci, 63 :477 (1998).
- [0190] 33. U. Pagotto et al., J Clin Invest, 96 :2017 (1995).
- [0191] 34. K. V. Patel et al., Cancer Treat Res, 83 :369 (1996).
- [0192] 35. A. Pedram et al., J Biol Chem, 272 :17097 (1997).
- [0193] 36. H. S. Reinhold, In vivo observations of tumor blood flow. In, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, pg. 115 (1979).
- [0194] 37. A. E. Rogers et al., Chemically induced mammary gland tumors in rats : modulation by dietary fat. Alan R. Liss, Inc., New York 255 (1996).
- [0195] 38. P. Rohmeiss et al., Am J Physiol, 258 :H337 (1990).
- [0196] 39. I. H. Russo et al., J Natl Cancer Inst. 61 :1439 (1978).
- [0197] 40. J. Russo et al., Lab Invest, 62 :244 (1990).
- [0198] 41. J. Russo et al., Lab Invest, 57 :112 (1987).
- [0199] 42. T. Sakurai et al., Nature, 348 :732 (1990).
- [0200] 43. D. Salani et al., Am J Pathol, 157 :1537 (2000).
- [0201] 44. D. Salani et al., Am J Pathol, 157 :1703 (2000).
- [0202] 45. P. R. Saxena et al., Comput Programs Biomed, 12 :63 (1980).
- [0203] 46. J. F. Secombe et al., Vasoactive factors produced by the endothelium. Landes, Austin, pg. 40 (1994).
- [0204] 47. A. C. Sharma et al., Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 22 : 593 (1994).
- [0205] 48. G. Singh et al., Life Sci, 54 :1901 (1994).
- [0206] 49. P. J. Smith et al., J Cardiovasc Pharmacol, 31 :S158 (1998).

- [0207] 50. C. W. Song et al., Int J Radiat Oncol BiolPhys, 18 :903(1990).
- [0208] 51. C. W. Song et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys, 17 :1041(1989).
- [0209] 52. Y. Takagi et al., Biochem Biophys Res Commun, 168 :537(1990).
- [0210] 53. N. Takuwa et al., J Biol Chem, 264 :7856(1989).
- [0211] 54. M. J. van Zwieten, The rat as animal model in breast cancer research. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pg. 206(1984).
- [0212] 55. P. W. Vaupel, Blood flow, oxygenation, tissue pH distribution, and bioenergetic status of tumors. Ernst Schering, Research Foundation Lecture 23, Berlin(1994).
- [0213] 56. H. Vierhapper et al., Circulation, 81 :1415(1990).
- [0214] 57. B. A. Warren, The vascular morphology of tumors. In, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, pg. 26(1979).
- [0215] 58. T. Watanabe et al., J Hypertens, 19 :731(2001).
- [0216] 59. J. Yamashita et al., Cancer Res, 52 :4046(1992).
- [0217] 60. J. Yamashita et al., Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 74 :363(1991).
- [0218] 61. M. Yanagisawa et al., Nature, 332 :411(1988).
- [0219] 可对本发明如前所述进行修改和变化,而不脱离本发明的精神和范围,因此,只有后面的权利要求所示的内容是限制条件。

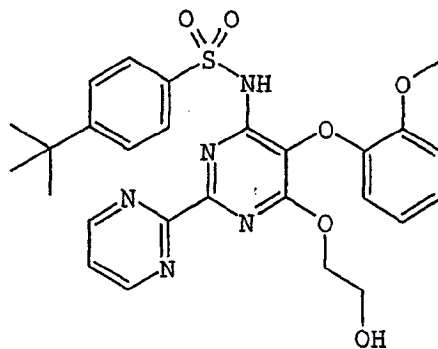
[0220]

附录 A

[0221]

平衡的 ET_A 和 ET_B 拮抗剂

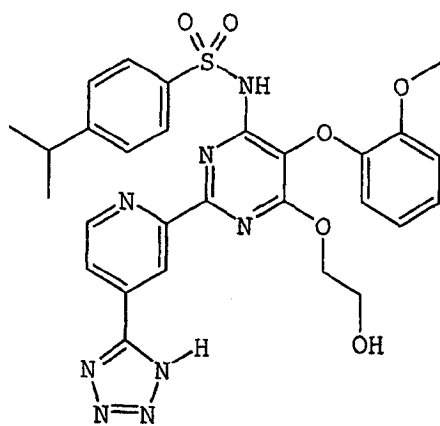
[0222]



[0223] 波生坦

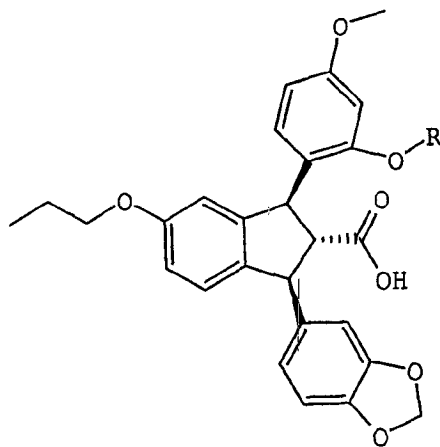
[0224] 1

[0225]

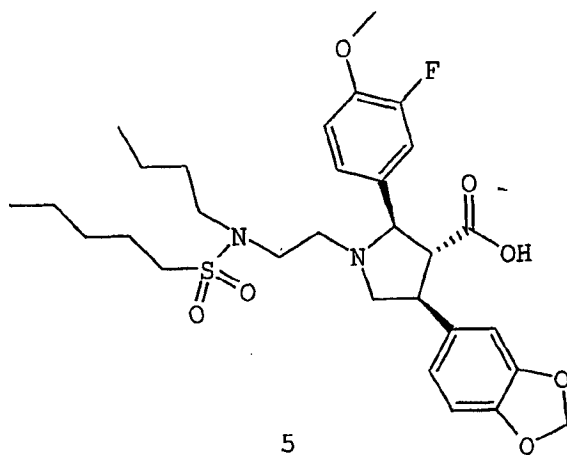


2

[0226]

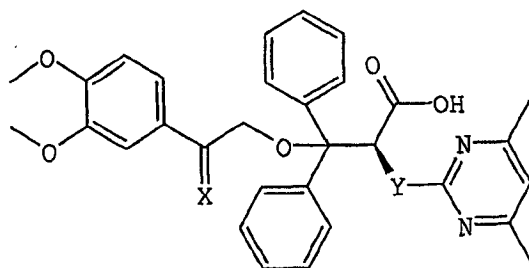
[0227] 3 R = CH₂CO₂H SB209670[0228] 4 R = CH₂CH₂OH SB217242

[0229]



5

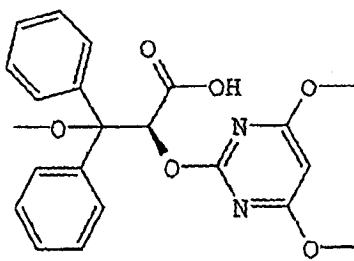
[0230]



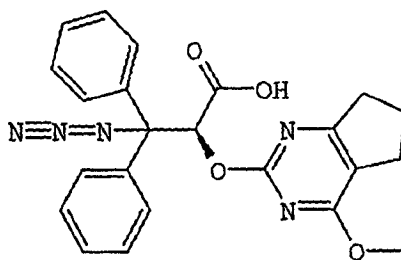
[0231] 6 $X = H_2$, $Y = CH_2$ S-LU 302872

[0232] 7 $X = O$, $Y = O$

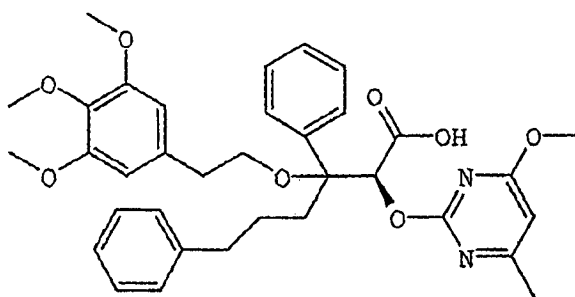
[0233]



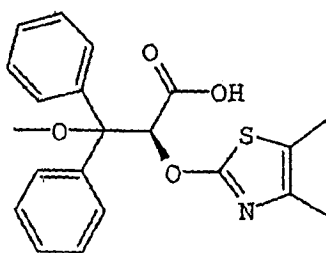
8



9

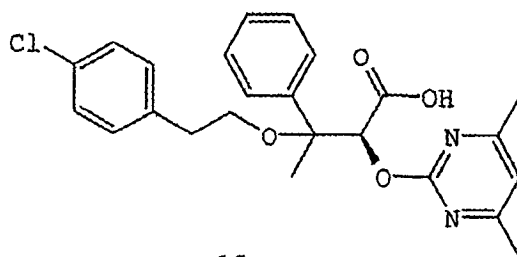


10



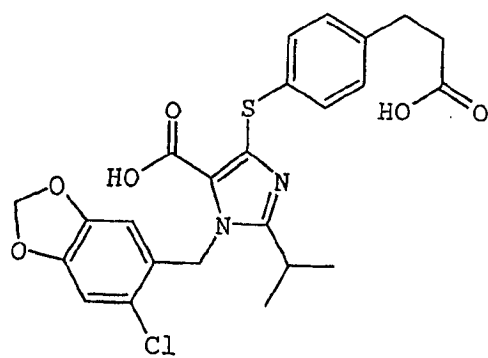
11

[0234]

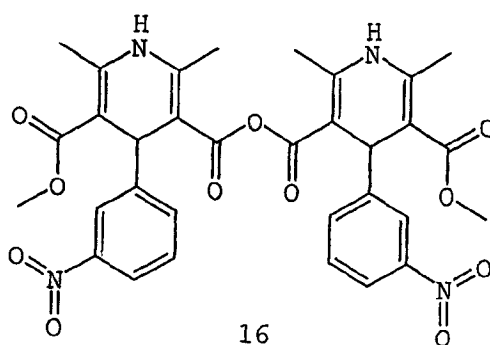


12

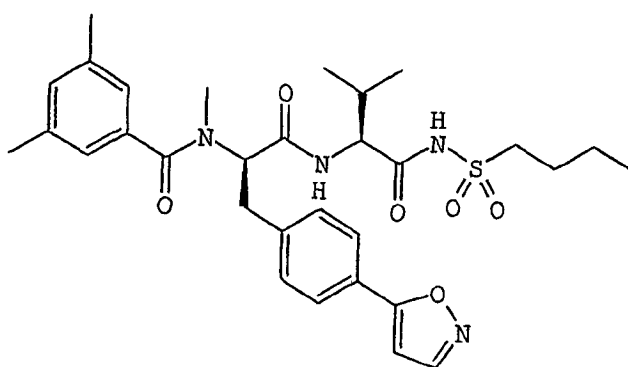
[0235]



15

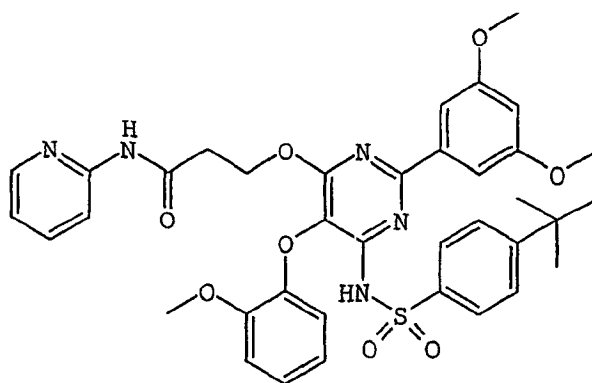


16



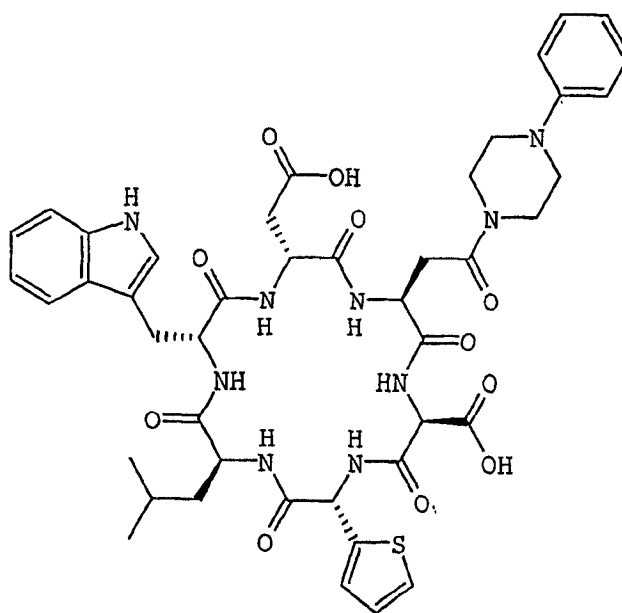
17

[0240]



18

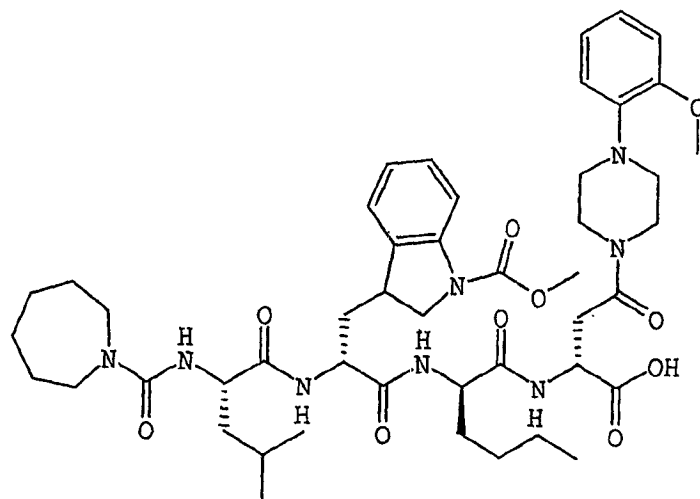
[0241]



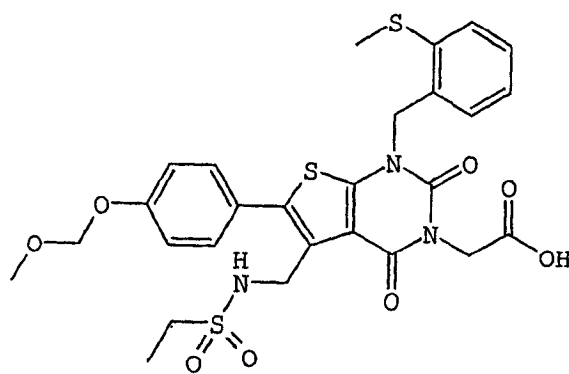
[0242] TAK-044

[0243] 19

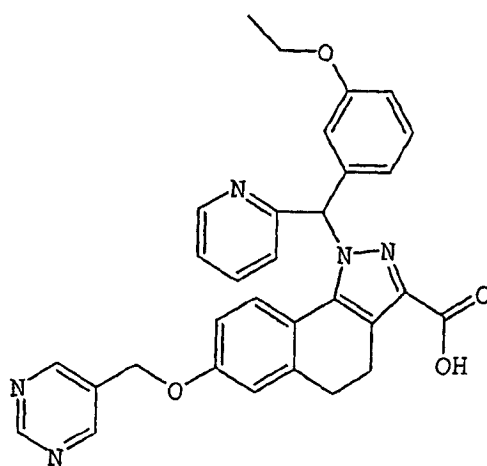
[0244]



20



21



22

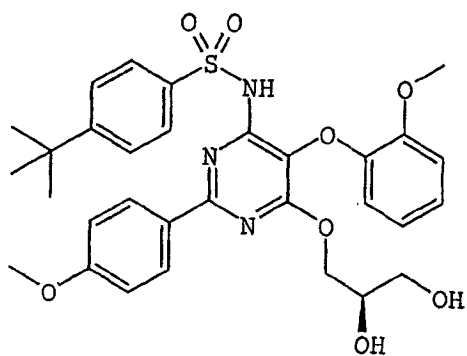
[0245]

附录 B

[0246]

选择性 ET_B 拮抗剂

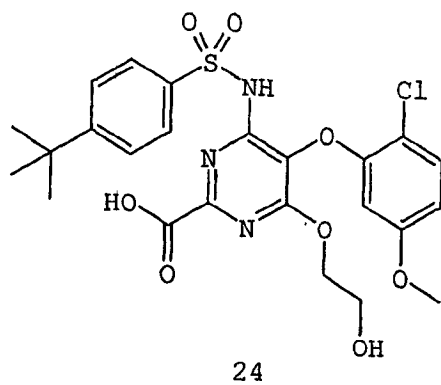
[0247]



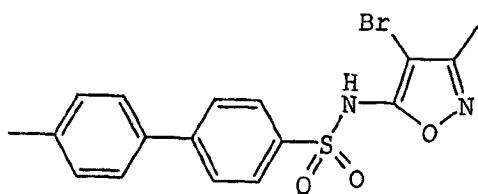
[0248] Ro 46-8443

[0249] 23

[0250]



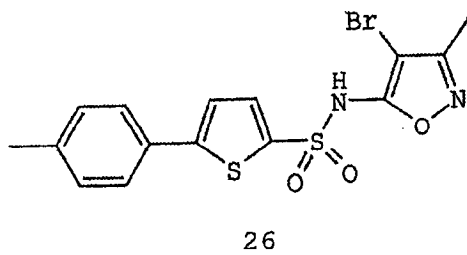
[0251]



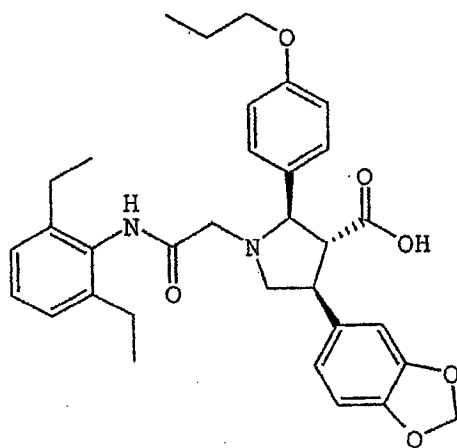
[0252] TBC10950

[0253] 25

[0254]



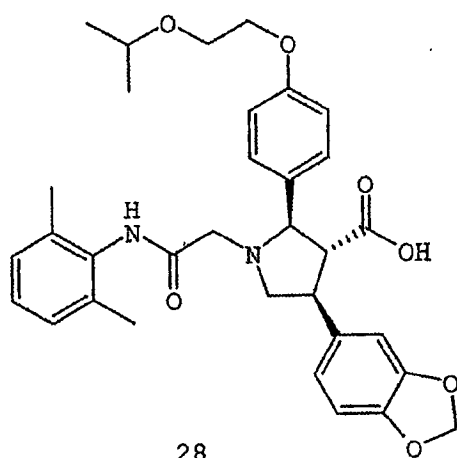
[0255]



[0256] A192621

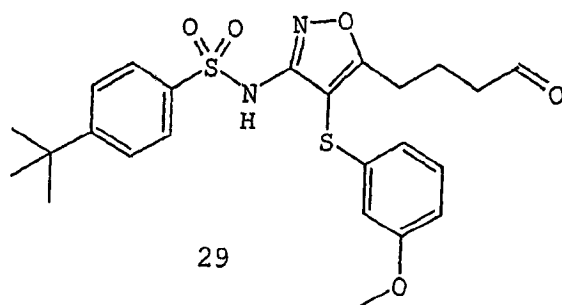
[0257] 27

[0258]



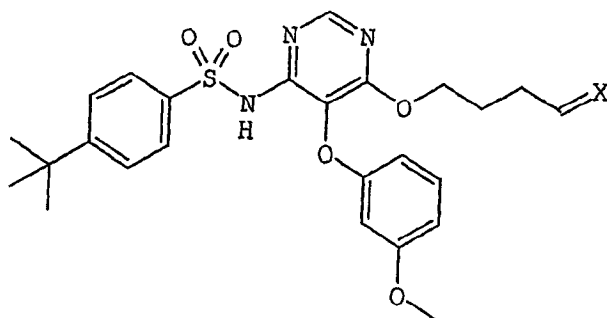
28

[0259]



29

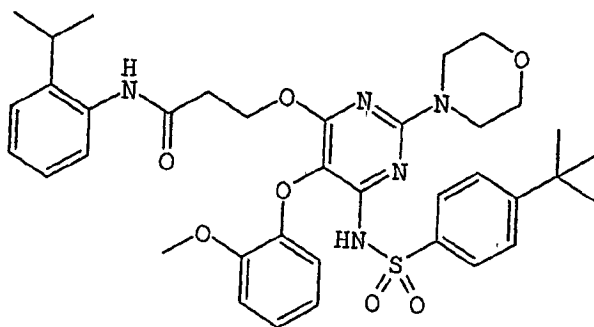
[0260]



[0261] 30 X = O

[0262] 31 X = NNHCO-3- 吡啶

[0263]



32

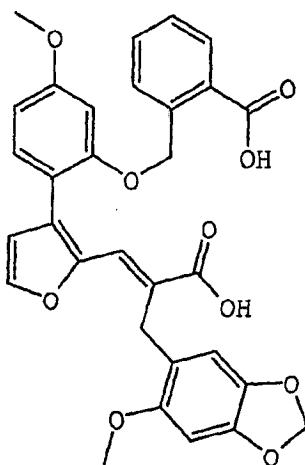
[0264]

附录 C

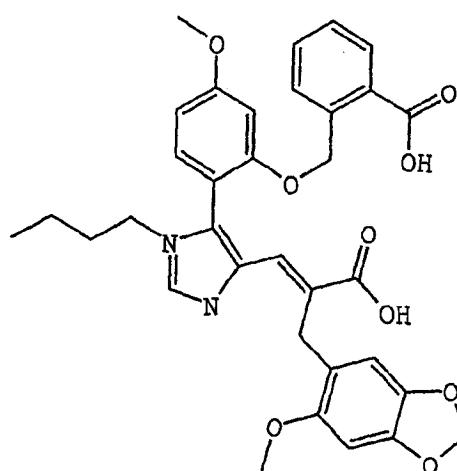
[0265]

其它 ET 拮抗剂

[0266]

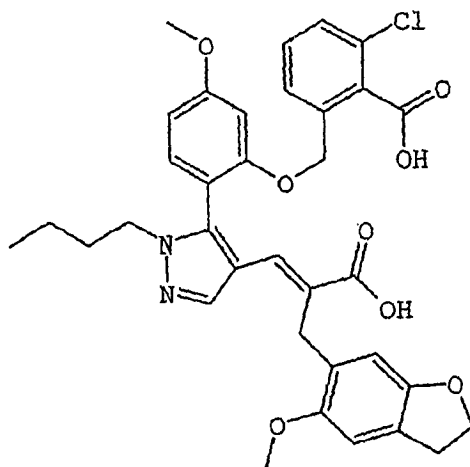
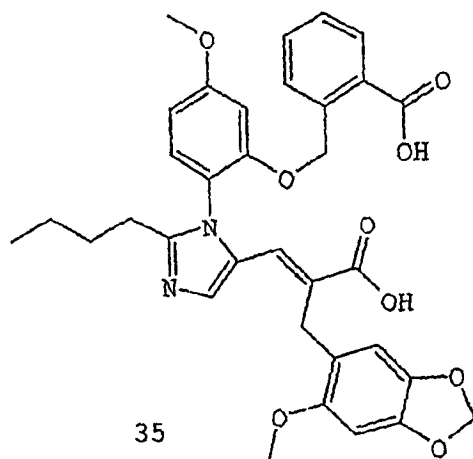


33

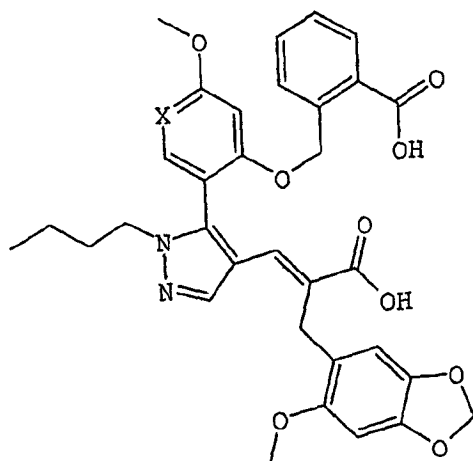


34

[0267]



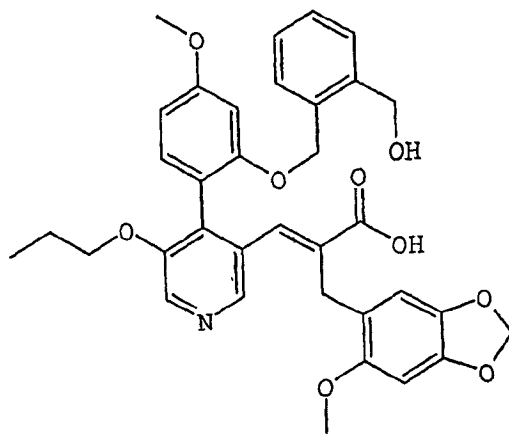
[0268]



[0269] 37 X = C

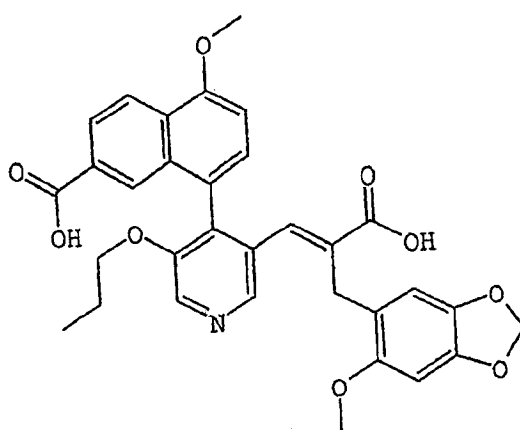
[0270] 38 X = N

[0271]

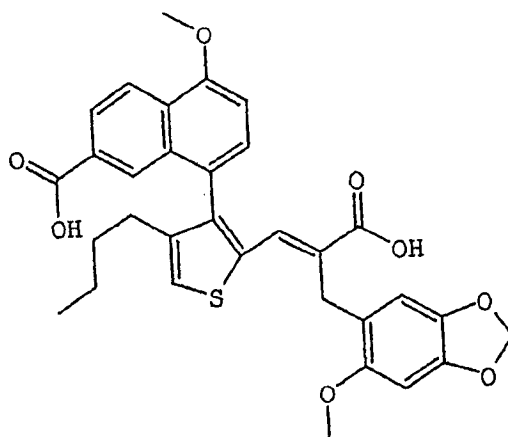


39

[0272]

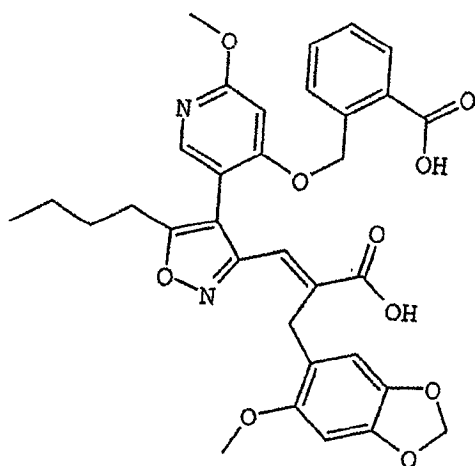


40

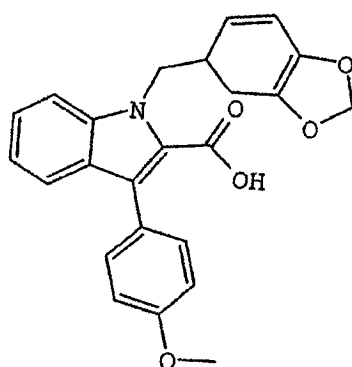


41

[0273]

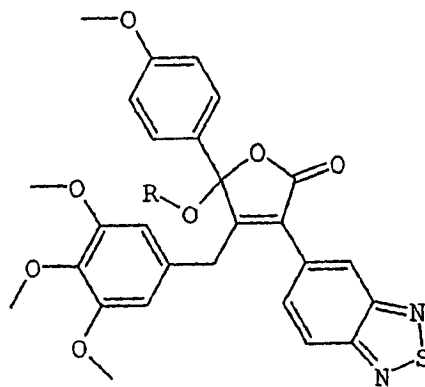


42



43

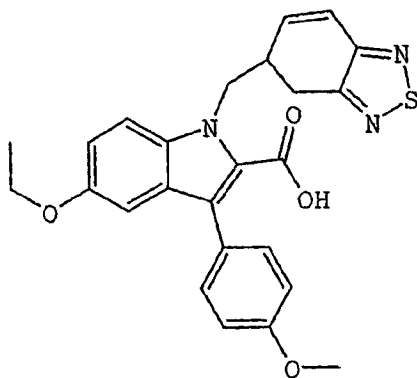
[0274]



[0275] 44 R = H

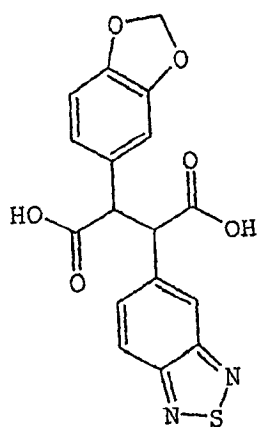
[0276] 45 R = CONHCH₂CO₂C₂H₅

[0277]

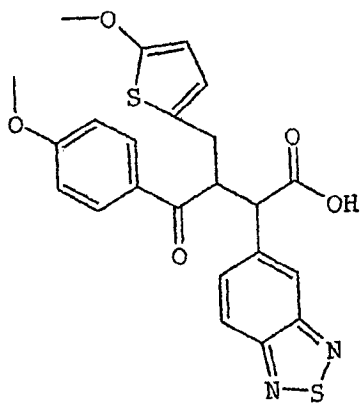


46

[0278]

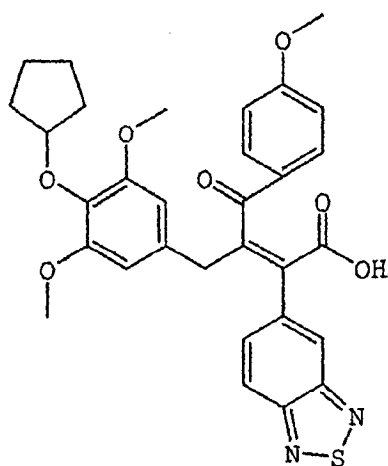


47

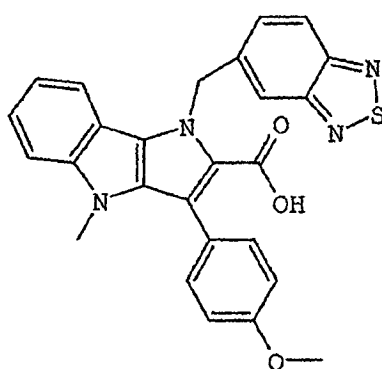


48

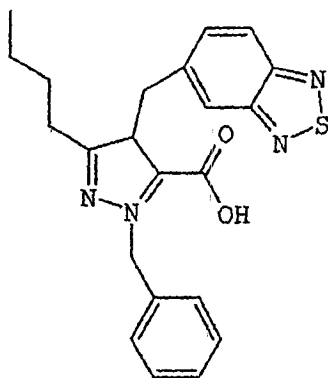
[0279]



49

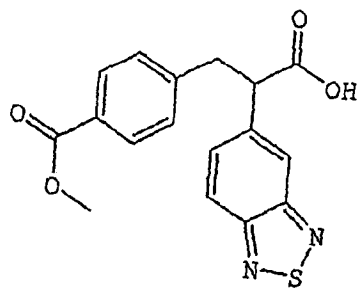


50

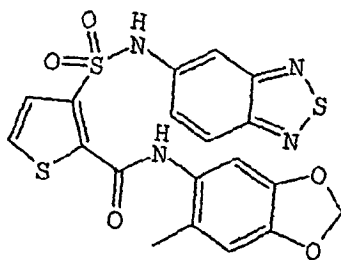


51

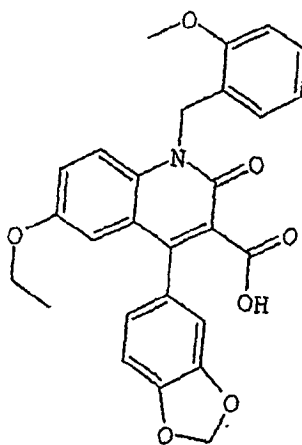
[0280]



52

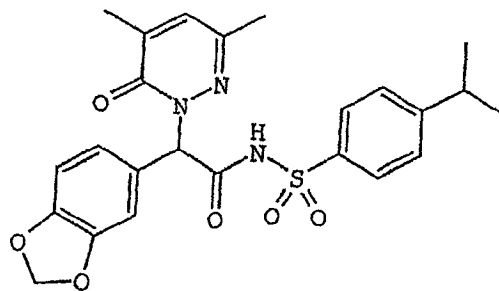


53

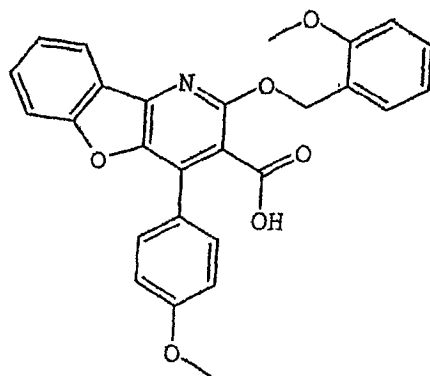


54

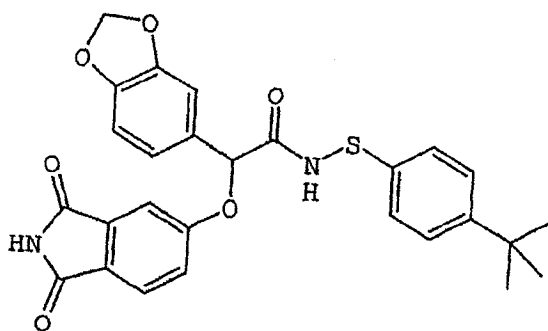
[0281]



55

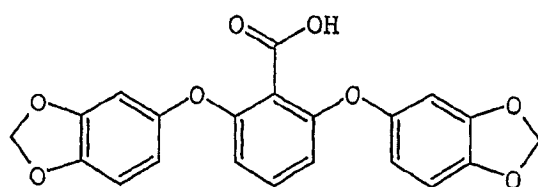


56

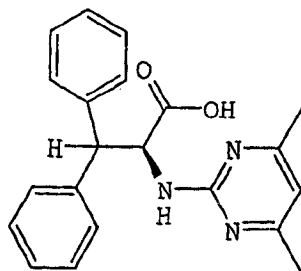


57

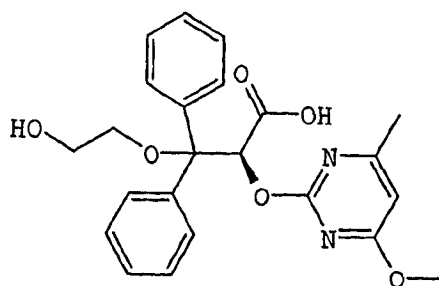
[0282]



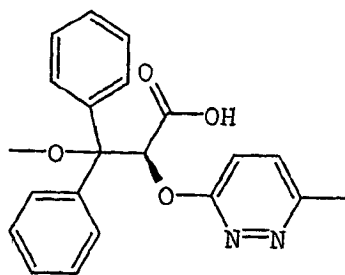
58



59

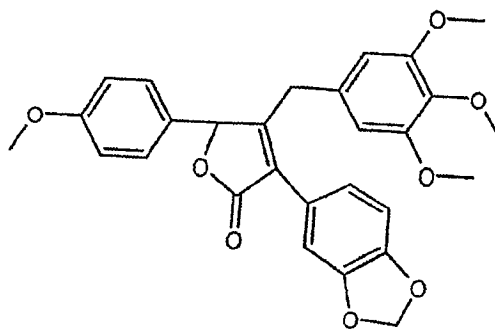


60

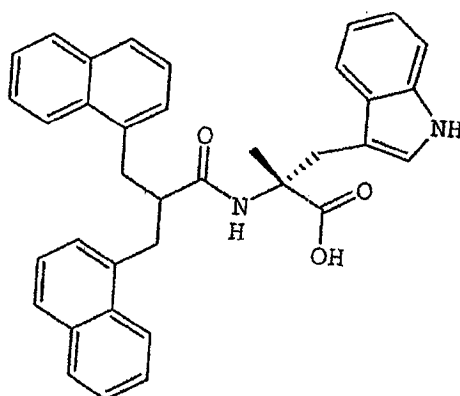


61

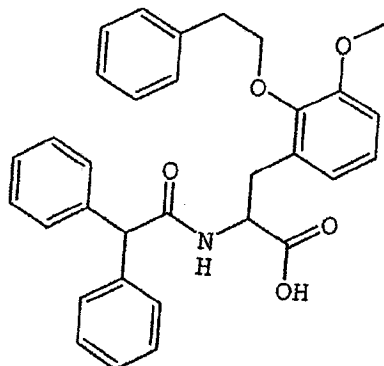
[0283]



62

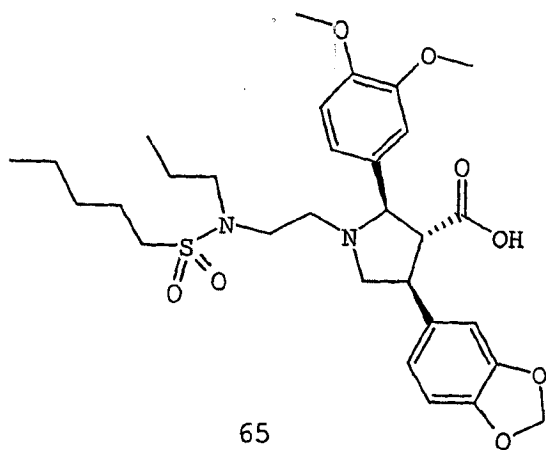


63

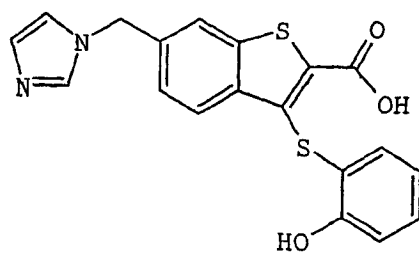


64

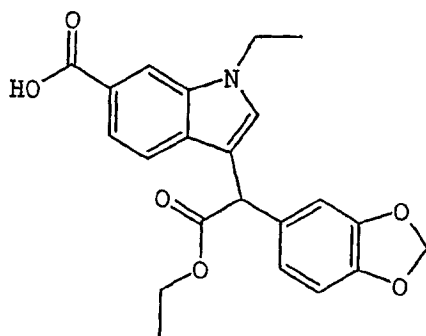
[0284]



65

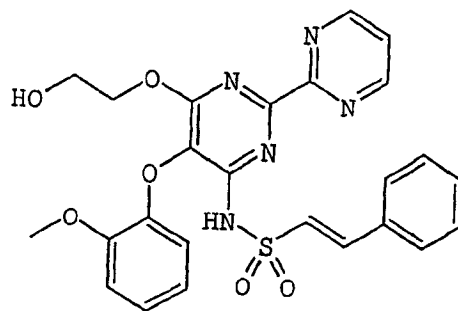


66

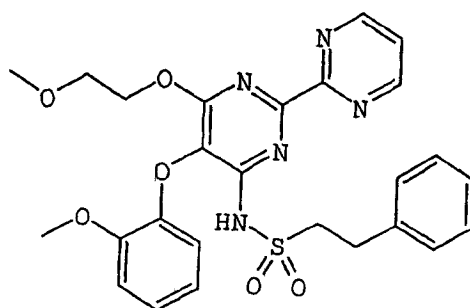


67

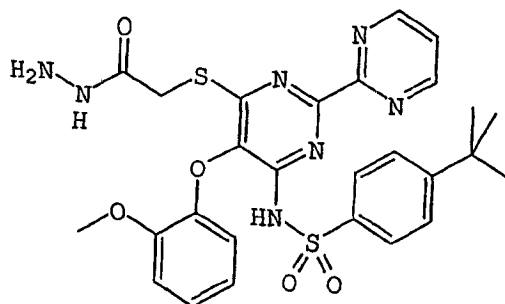
[0285]



68

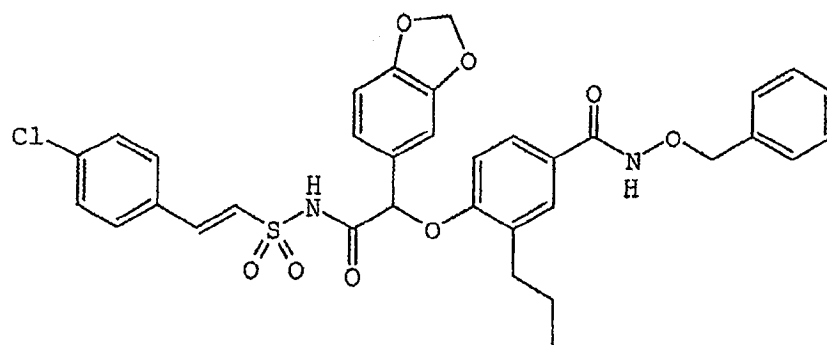


69

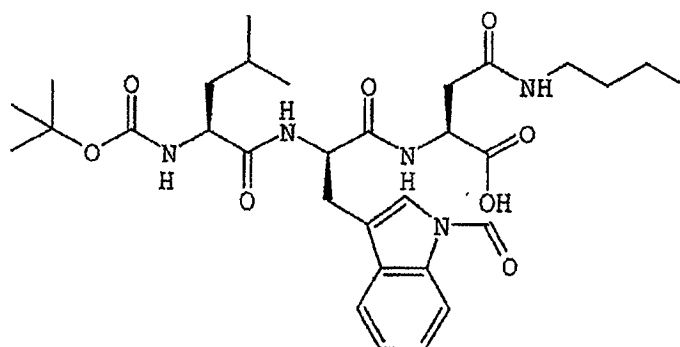


70

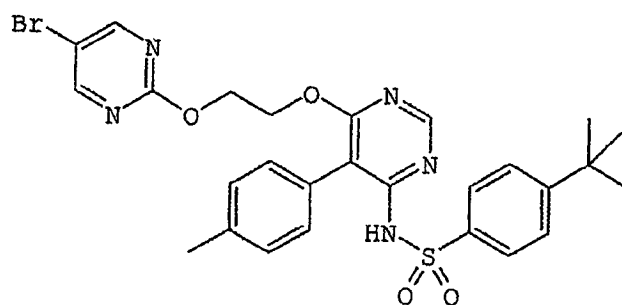
[0286]



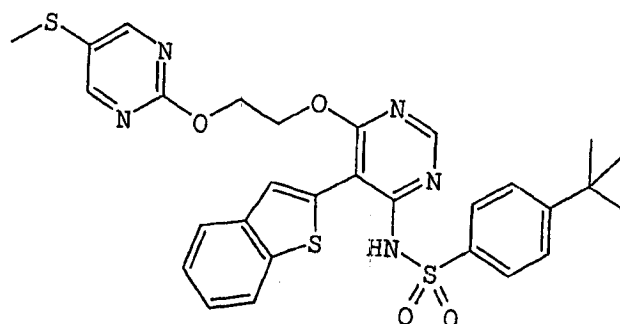
71



72



73



74

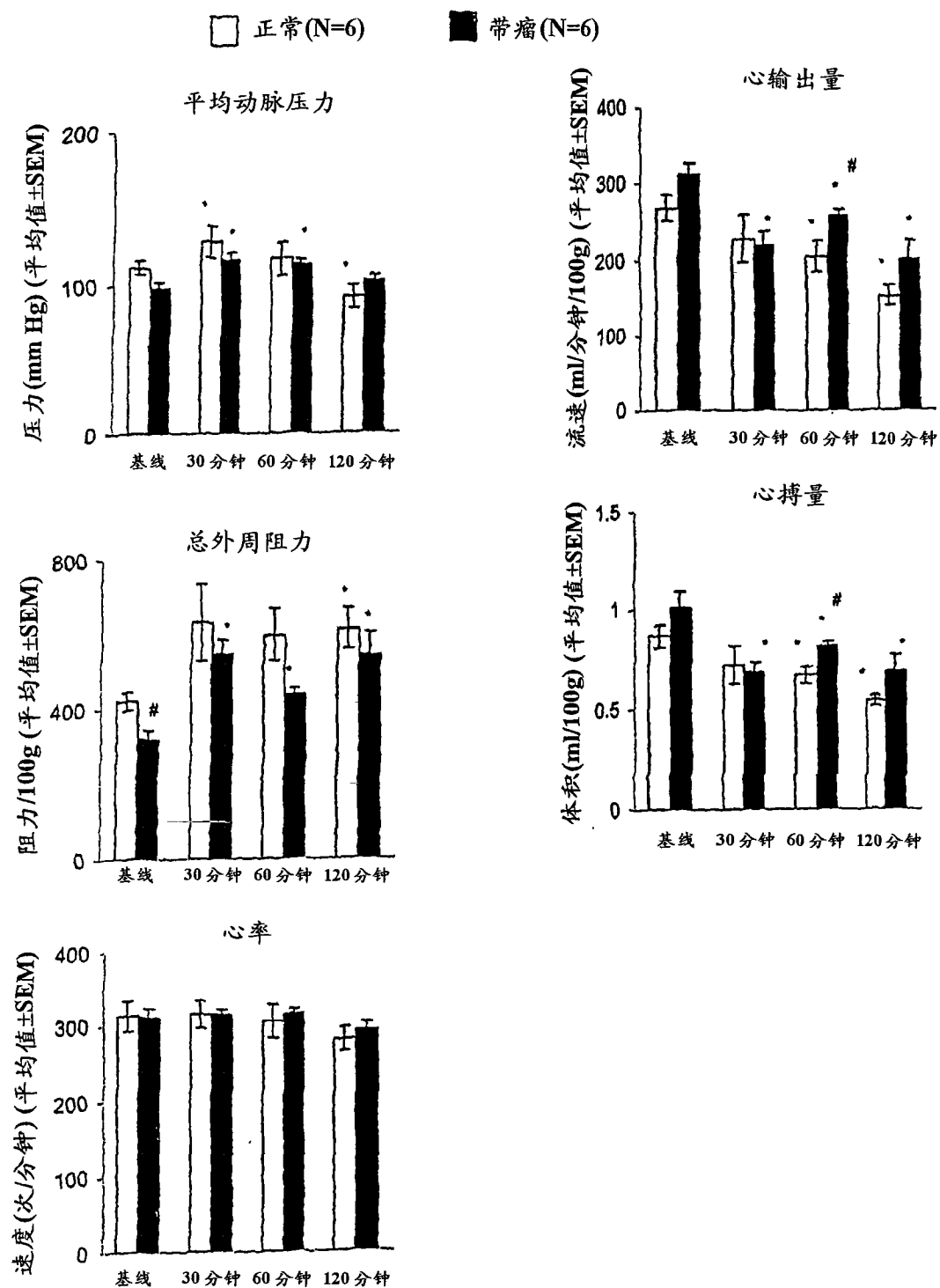


图 1

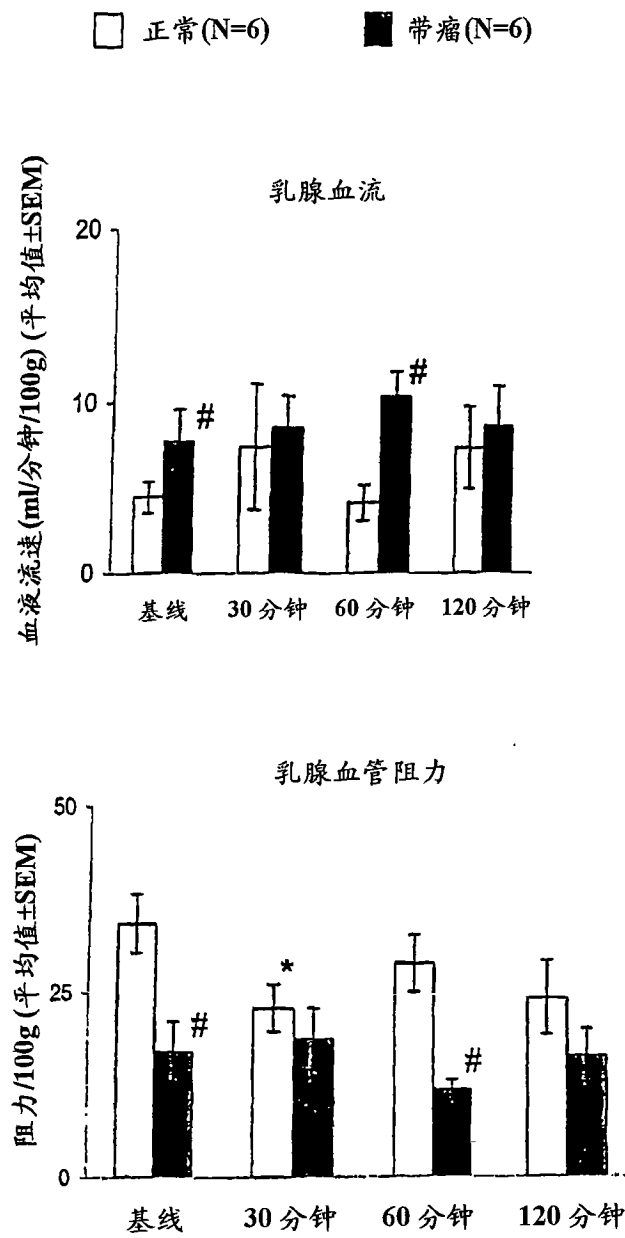


图 2

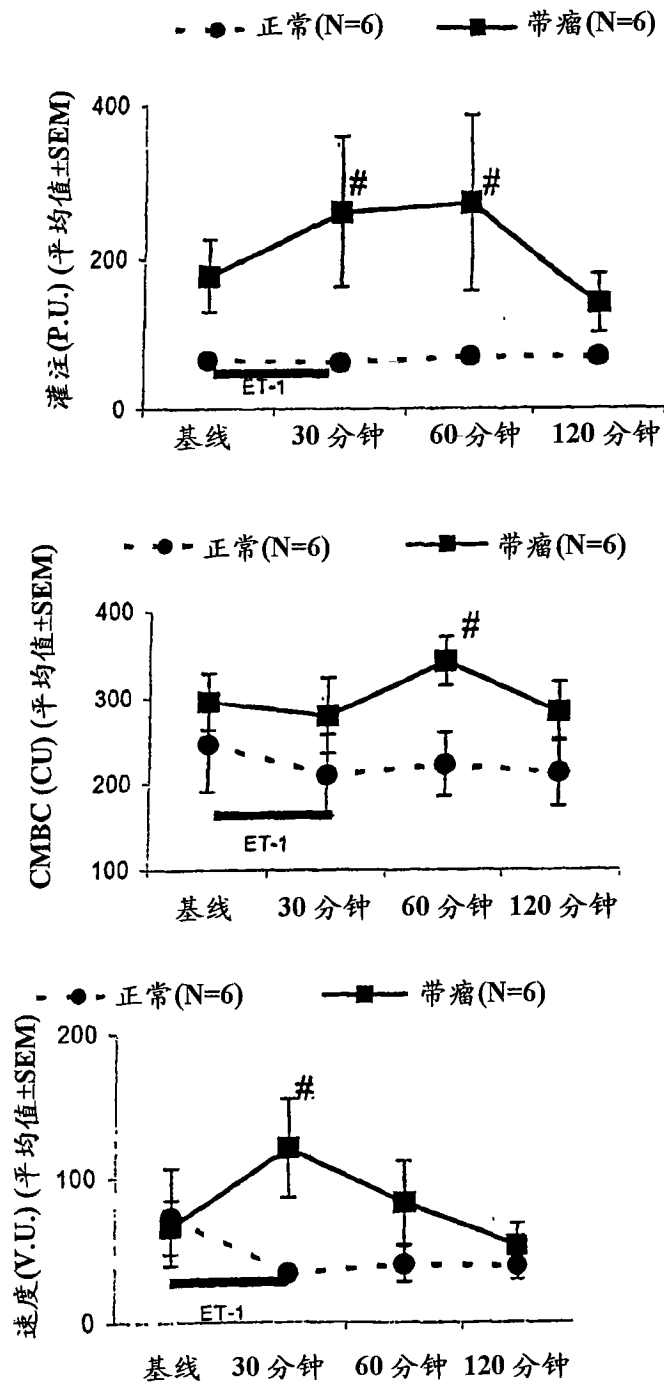


图 3

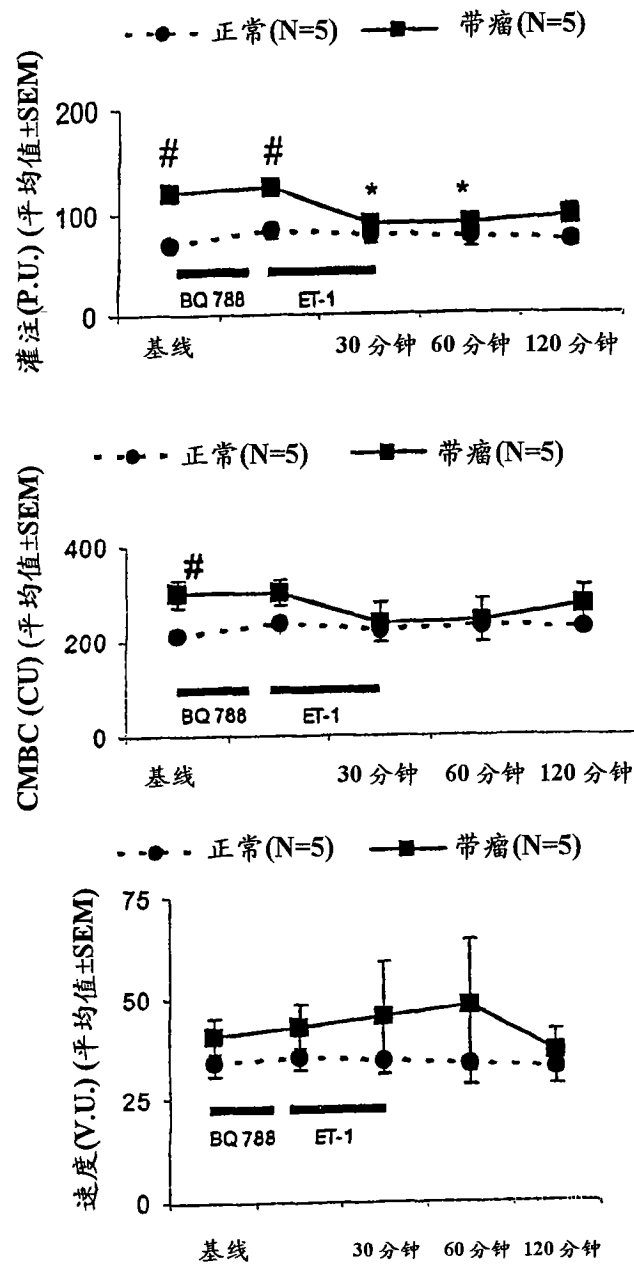


图 4

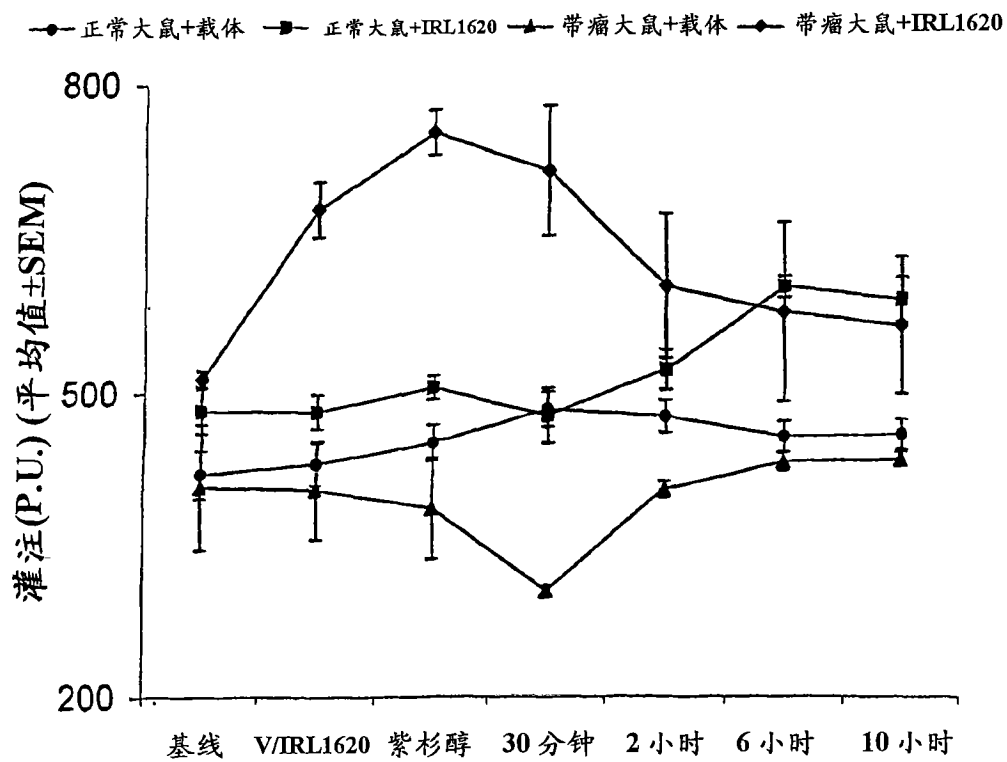


图 5