



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103108636 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201180021324. 8

A61K 33/24(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 25

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/308, 813 2010. 02. 26 US

61/414, 882 2010. 11. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 10. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/026144 2011. 02. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02011/106577 EN 2011. 09. 01

(71) 申请人 尼基制药公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 H·舍巴拉德兰 R·巴尔干

J·古博 S·M·瓦利亚迪

B·开普勒

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 马慧 张广育

(51) Int. Cl.

A61K 31/47(2006. 01)

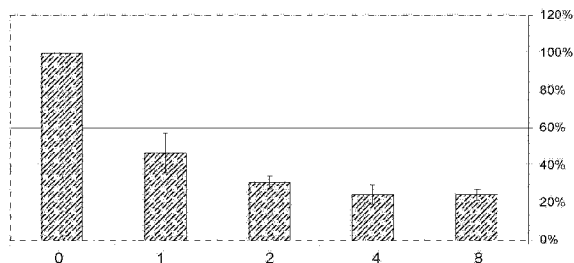
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

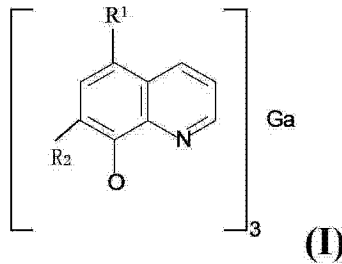
治疗脑癌的方法

(57) 摘要

本发明公开了治疗脑癌的方法和组合物, 包括耐药性脑癌。



1. 通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗脑癌的药物中的应用：



其中 R^1 代表氢、一种卤族元素或磺酸基 SO_3M , 其中 M 是一种金属离子, 且 R^2 代表氢, 或 R^1 是 Cl 且 R^2 是 I 。

2. 权利要求 1 的应用, 所述化合物是三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)。

3. 权利要求 1 和 2 的应用, 其中所述脑癌不是恶性胶质瘤。

4. 权利要求 1-3 中任何一个应用, 其中所述脑癌是星形细胞瘤。

5. 权利要求 1 或 2 的应用, 其中所述脑癌是恶性胶质瘤。

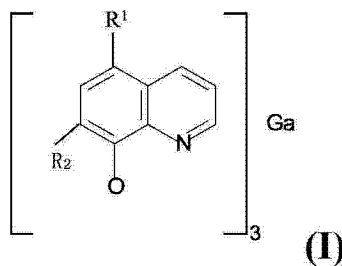
6. 权利要求 1-5 中任何一个应用, 其中所述脑癌是耐药性脑癌。

7. 权利要求 6 的应用, 其中所述脑癌先前用 BCNU 治疗过。

8. 权利要求 6 的应用, 其中所述脑癌先前用替莫唑胺治疗过。

9. 根据权利要求 1-8 中任何一个应用, 其中所述化合物联合替莫唑胺应用。

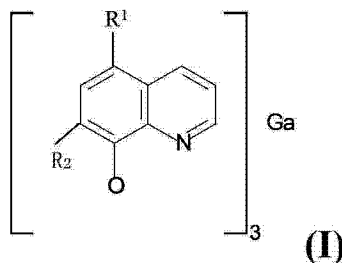
10. 一个药盒包括: 一种有效剂量的通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐, 及有效剂量的替莫唑胺:



其中 R^1 代表氢、一种卤族元素或磺酸基 SO_3M , 其中 M 是一种金属离子, 且 R^2 代表氢, 或 R^1 是 Cl 且 R^2 是 I 。

11. 权利要求 10 的药盒, 其中所述化合物是三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)

12. 一种药物组合物包括: 一种有效剂量的通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐, 及有效剂量的替莫唑胺:



其中 R^1 代表氢、一种卤族元素或磺酸基 SO_3M , 其中 M 是一种金属离子, 且 R^2 代表氢, 或 R^1 是 Cl 且 R^2 是 I 。

13. 权利要求 12 中的药物组合物, 其中所述化合物是三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)。

治疗脑癌的方法

[0001] 交叉引用相关美国专利申请

[0002] 本申请案主张 2010 年 4 月 26 号提交的美国临时专利申请案第 61/308,813 号,和 2010 年 11 月 17 号提交的美国临时专利申请案第 61/414,882 号之权益,两者以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及治疗癌症的药物组分和方法,特别是一种含有三(8-羟基喹啉)合镓(III)的药物组合物,及其使用方法。

技术背景

[0004] 据估计,仅在美国每年有超过 40,000 新发脑癌患者,每年大约有 13,000 多人死于此病。除了手术和放疗,很少有其它治疗方式。替莫唑胺和亚硝基脲是治疗脑癌唯一可接受的化疗药物,然而如今表现有相当有限的有效性,因此,非常需要治疗脑癌的新药物。

[0005] 美国专利申请案第 2009/0137620 号公布了化合物三(8-羟基喹啉)合镓(III)表现出在黑色素瘤细胞系中有效导致细胞凋亡和细胞死亡。然而,还不知道,这种化合物是否能对治疗脑癌有用,特别是那些对其他抗癌药物有耐药性的脑癌。

发明摘要

[0006] 本发明提供了治疗脑癌的方法。一方面,本发明提供了治疗、预防或延迟脑癌症状的方法,包括使患有脑癌的患者摄入一种治疗上或预防上有效剂量的如下通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))。

[0007] 第二方面,提供了一种治疗、预防耐药性脑癌或延迟其发生的方法,包括使对一种治疗包括亚硝基脲(例如,氯化亚硝基脲)和替莫唑胺中至少一种有耐药性的患者摄入一种治疗上或预防上有效剂量的如下通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))。

[0008] 另一方法,提供了一种治疗、预防脑癌或延迟其发生的方法,包括使需要治疗的脑癌患者同时或先后摄入一种治疗上有效剂量的(1)一种如下通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III)),和(2)替莫唑胺。在具体实施方案中,这种联合用药用于治疗恶性胶质瘤或星形细胞瘤。

[0009] 本发明也提供了使用以下通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))制备药物的方法。

[0010] 本发明的以上所述及其它优势和特点,及其完成方式,在考虑下面有关本发明的详细描述结合所附的表现优选范例性实施方案的例子之后将会更加明了。

[0011] 附图概述

[0012] 图 1 是一个曲线图,显示在源自神经胶质瘤细胞系 U87 的三维肿瘤模型中三(8-羟基喹啉)合镓(III)(MTT 实验)的剂量依赖性生长抑制(HuBiogel, Vivo

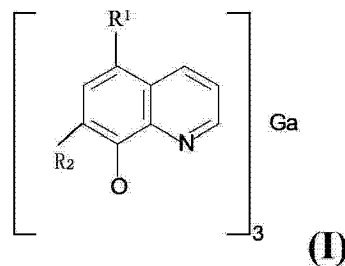
Biosciences, Birmingham, AL)。X 轴是药物浓度,单位 μM 并且 Y 轴是对照百分比;

[0013] 图 2 是一个组合指数图,阐明在恶性胶质瘤细胞系 U251 中,药物三(8-羟基喹啉)合镓(III)和替莫唑胺之间的协同作用。

[0014] 发明详述

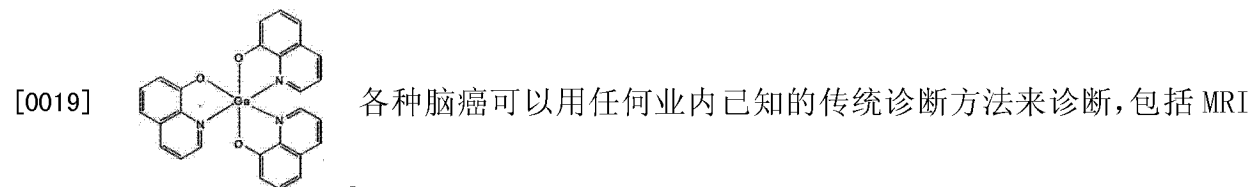
[0015] 本发明在部分程度上是基于这一发现:化合物三(8-羟基喹啉)合镓(III)可以特异性有效治疗脑癌。因此,根据本发明的第一方面,提供了一种治疗脑癌的方法。这种方法包括用治疗有效剂量的通式(I)表示的镓络合物治疗需要治疗的脑癌患者:

[0016]



[0017] 其中 R^1 代表氢、一种卤族元素或磺酸基 SO_3M , 其中 M 是一种金属离子,且 R^2 代表氢,或 R^1 是 Cl 且 R^2 是 I,或其药学上可接受的盐。脑癌是一种脑内或中央椎管内的颅内固体肿瘤。在一个实施方案中,治疗脑癌的方法包括用治疗有效剂量的通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐治疗需要治疗的脑癌患者,其中脑癌不是恶性胶质瘤。就是说,本发明针对使用一种有效剂量的通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐制备药物用于治疗确认或诊断为脑癌的脑癌患者,另外所说脑癌不是恶性胶质瘤。

[0018] 在本发明这一方面的各种实施方案中,治疗方法另外也包括一步诊断或确认患者患有脑癌。确认的患者再用或摄入治疗有效剂量的本发明中的化合物,例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III),其化学式为:



扫描、CAT 扫描、PET 扫描、活检等。

[0020] 另外,也意外发现化合物三(8-羟基喹啉)合镓(III)在抗亚硝基脲(例如, bis-chloronitrosourea(BCNU))或替莫唑胺的脑癌细胞系中同等有效。因此,本发明的另一方面是提供了一种治疗耐药性脑癌的方法,包括用有效治疗剂量的通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))治疗确定患有耐药性脑癌的患者。在一个实施方案中,患者患有的脑癌对包括一种亚硝基脲药物例如 BCNU 的一种治疗有耐药性。在另一个实施方案中,患者患有的脑癌对包括替莫唑胺的一种治疗有耐药性。就是说,本发明也针对如何使用通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))制备药物用于治疗耐药性脑癌,例如对亚硝基脲或替莫唑胺有耐药性的脑癌。

[0021] 此处用到的术语“耐药性脑癌”是指要么对抗肿瘤治疗(不包括通式(I)表示的化合物)没有良好反应,要么对抗肿瘤治疗(不包括通式(I)表示的化合物)有良好反应之后

反复或复发。因此,此处用到的术语“对治疗有耐药性的脑癌”是指对治疗无良性反应或对治疗有抗性,或对治疗有良性反应后有反复和复发。

[0022] 因此,在有些实施方案中,本发明的方法中通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))用于治疗曾接受过一种治疗方案治疗的脑癌患者,这种治疗方案包括一种或多种药物例如亚硝基脲(例如,BCNU)和替莫唑胺。例如,本方法用于治疗一个曾接受过一种治疗方案治疗的脑癌患者,这种治疗方案包括一种或多种药物例如亚硝基脲(例如,BCNU)和替莫唑胺,并且其脑癌对治疗方案无反应或对治疗方案有了抗性。在另一个实施方案中,本方法用于治疗一个曾接受过一种治疗的脑癌患者,这种治疗方案包括一种或多种药物例如亚硝基脲(例如,BCNU)和替莫唑胺,但是脑癌已反复或复发,也就是说,脑癌患者曾经接受过一种或多种这种药物的治疗,并且其癌症起初对先前服用的一种或多种药物有反应,但是随后发现有复发。

[0023] 在特定的实施方案中,通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))用于治疗曾接受过亚硝基脲(例如,BCNU)治疗的脑癌患者。

[0024] 在其它具体实施方案中,通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))用于治疗曾接受过替莫唑胺治疗的脑癌患者,即其患有的脑癌表现出对治疗包括替莫唑胺有抗性或治疗后复发。

[0025] 为了发现耐药性脑癌,仔细监测经受过初始治疗患者的抗性特征、无反应性或脑癌复发。这些可以通过监测患者所患癌症对例如包括亚硝基脲或替莫唑胺的初始治疗的反应来完成。癌症对初始治疗的反应、无反应或复发的判断可以通过任何业内使用的适当方法。例如,可以通过评估肿瘤的大小和数目来完成。肿瘤大小或数目的增加,表明肿瘤对化疗无反应、或发生复发。根据在文献 Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216(2000) 中详细描述“RECIST”准则做出判断。

[0026] 根据本发明的另一方面,提供了一种预防或延迟脑癌发生,或预防或延迟脑癌复发的方法,包括用预防有效剂量的通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))来治疗需要预防或延迟的患者。

[0027] 为了预防或延迟脑癌的发生,已接受过治疗并且处于缓解期或稳定期或无进展期的脑癌患者可以接受预防有效剂量的通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))的治疗,来有效预防或延迟脑癌的复发。

[0028] 另外,意外发现三(8-羟基喹啉)合镓(III)和替莫唑胺联合使用在引发恶性胶质瘤细胞凋亡方面有显著协同作用。因此,本发明也提供了一种联合治疗方法,其中在同一个治疗方案中一起使用替莫唑胺和通式(I)表示的化合物(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))。也就是说,本发明提供了一种治疗、预防和延迟脑癌发生的方法,包括为需要治疗的脑癌患者同时或先后摄入(1)一种有效治疗剂量的通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐(例如,三(8-羟基喹啉)合镓(III))和(2)替莫唑胺。一种有效剂量的附加药物,例如贝伐单抗、亚硝基脲或甲基苄肼,也可以选择性地包含在联合治疗中供脑癌患者摄入。在具体实施方案中,联合治疗用于治疗多形性成胶质细胞瘤(GBM)或间变型星形细胞瘤。在最佳实施方案中,镓络合物是三(8-羟基喹啉)合镓(III)或其药学上可接受的盐。

[0029] 本发明的各方面可用于各种脑部恶性肿瘤,包括但不限于,听神经瘤、星形细胞瘤(例如,纤维性星形细胞瘤、低级星形细胞瘤、间变型星形细胞瘤)、多形性成胶质细胞瘤

(GBM) 及其它神经胶质瘤 (脑干胶质瘤、视神经胶质瘤、室管膜细胞瘤、混合胶质瘤、少突神经胶质瘤、和亚室管膜瘤)、脊索瘤、中枢神经系统淋巴瘤、颅咽管瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、垂体瘤、原始神经外胚层肿瘤 (PNET)、神经鞘瘤、松果体瘤和横纹肌样瘤。

[0030] 此处用到的短语“用...治疗...”或其释义意思是使患者摄入一种化合物或在患者体内引起一种化合物的形成。

[0031] 根据本发明的方法,可以单独使用一种有效治疗剂量的通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)) 或联合一种或多种其它抗癌药物治疗脑癌患者。

[0032] 这种通式 (I) 表示的制药化合物可以通过静脉注射或口服或其他适当的方式摄入,摄入量根据患者的总体重从 0.1mg/kg 到 1000mg/kg。按照预定的时间间隔摄入有效成分,例如,一天 3 次。应该了解以上设定的剂量范围只是示范,不是为了限制在本发明规定的范围。活性化合物的治疗有效量可以随各种因素变化,包括但不限于,使用化合物的活性、活性化合物在患者体内的稳定性、需治疗的病情的严重程度、患者的体重、摄入路径、机体吸收、分布和排泄活性化合物的难易、患者的年龄和敏感性、以及类似的专业人士所熟知的因素。摄入量可以随时间和各种因素的变化进行调整。

[0033] 根据本发明,提供了一种使用通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)) 制备药物的方法,用于单独或联合替莫唑胺治疗脑癌。这种药物可以是口服或注射形式,例如,适合静脉、皮下或肌肉注射。注射形式通常为业内熟知,例如溶于缓冲液或悬浮液中。

[0034] 根据本发明的另一方面,提供的药物试剂盒(或药盒),包括包含在一个容器中的单位剂型的通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)),另外根据本发明中的方法撰写使用试剂盒的说明书,例如,治疗、预防、或延迟脑癌的发生,或预防或延迟脑癌的复发,或治疗耐药性脑癌。在一个实施方案中,提供的药物试剂盒(或称药盒)包括包含在一个分隔开的容器中的,(1) 单位剂型的通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III));和 (2) 单位剂型的替莫唑胺。就像专业人士熟知的那样,单位剂型中治疗化合物的量是由本发明的方法中用于患者的剂量所确定的。在试剂盒中,通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)) 可以表现为某种含量的片剂,例如,每片 1mg。用于联合治疗并包含在药盒中的替莫唑胺可以是以任何业内常规已知或常用剂型,例如,片剂、胶囊、粉针剂等。另外,药盒还包含根据本发明的联合疗法撰写的使用药盒的说明书。

[0035] 根据本发明的另一方面,提供的药物组合物包括一种有效剂量的 (1) 通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)) 和 (2) 替莫唑胺。这种药物组合物可以以任何药学上可接受的剂型,包括但不限于,片剂、胶囊剂、粉针剂、溶液或悬浮液等。包含在组合物中的药量可以变化并取决于患者摄入量。例如,组合物中可以包含含量从 1mg 到大约 1000mg 的通式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐 (例如,三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)),和含量可以是 5mg, 20mg, 100mg, 140mg, 180mg 或 250mg 的替莫唑胺。

[0036] 实施例 1

[0037] 为了检测三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III) (“药物”) 活性,用恶性胶质瘤细胞系进

行 MTT 实验。在 96 孔板中种植细胞 (2×10^3 cells in $100 \mu\text{l}$ /well) 24 小时后收获。将药物加于另外 $100 \mu\text{l}$ 生长培养基中并用培养的细胞孵育 3 小时, 然后更换细胞培养基以去除药物。初始孵育 72 小时后, 根据产品说明书 (EZ4U, Biomedica, Vienna, Austria) 通过 MTT 实验测定细胞死亡。检测细胞系且 IC_{50} (50% 生长抑制时药物浓度) 值概括如表 1。三 (8- 羟基喹啉) 合镓 (III) 可以有效诱导表 1 中所有细胞系的细胞死亡, IC_{50} 值从大约 $0.3 \mu\text{M}$ 到 $2.5 \mu\text{M}$ 。亚硝基脲药物 BCNU 对抑制细胞系的历史数据如表 1。说明三 (8- 羟基喹啉) 合镓 (III) 可以有效对抗 U87 细胞系, 此细胞系比较耐 BCNU。另外, 三 (8- 羟基喹啉) 合镓 (III) 对 T98G 细胞系有效, 此细胞系已证明耐替莫唑胺。参考 Kanzawa et al., J. Neurosurg., 99:1047-1052 (2003)。

[0038] 表 1

细胞系	药物 IC_{50} (μM)	BCNU (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BCNU 引起白细胞 郁滞百分比 %)*
ACHU	0.3	
T98G	2.0	37.5±8.6
U87	0.94	18.5±8.2
U373	2.5	30.4±8.6

[0040] * 来源于 Bowles et al., J. Neurosurg., 73:248-253 (1990) 的历史数据

[0041] 实施例 2

[0042] 在来源于神经胶质瘤细胞系 U87 的三维肿瘤模型中, 检测化合物三 (8- 羟基喹啉) 合镓 (III)。具体地, 胰蛋白酶化细胞, 洗涤, 台盼蓝计数。通过混合 20,000 细胞 / $10 \mu\text{l}$ HuBiogel (4mg/mL) 准备肿瘤珠子 (参照美国专利申请系列 No. 10/546, 506, 通过引用并入本文)。 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 培养箱中, 在盛有足够培养基 (10%FBS) 的多孔板中孵育 3-D 肿瘤珠子 72 小时。用各种浓度的溶于介质 (DMSO 终浓度 0.2-0.3%) 的待测化合物三 (8- 羟基喹啉) 合镓 (III) 或对照 (DMSO) 处理迷你肿瘤。通过去除培养基并替换成含有药物化合物或 DMSO 的培养基来重复药物治疗。第 3 天, 进行 MTT 实验和钙荧光素乙酰氧基甲酯法活细胞染色 (5 珠子 / 测定设置)。

[0043] 在活细胞染色 / 图像分析中, 三 (8- 羟基喹啉) 合镓 (III) 展现出剂量依赖性肿瘤杀伤效率, 并且有效抑制肿瘤增值活性。参看图 1。用 MS-Excel 程序进行数据统计分析 (平均值, T- 检验, GI-50)。T- 检验如下表 2 所示。平均 GI-50 (生长抑制 50% 所需药物浓度) 是 $0.94 \mu\text{M}$ 。

[0044] 表 2

[0045]

t-检验	浓度 (μM)			
	8	4	2	1
HuBiogel (对照 vs 试验)	1.12672E-11	7.18966E-10	3.82139E-11	3.60697E-06
	对照 vs 8 μM	对照 vs 4 μM	对照 vs 2 μM	对照 vs 1 μM

[0046] 实施例 3 耐替莫唑胺和 BCNU 人恶性胶质瘤细胞系中三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III)

[0047] 活性

[0048] 在人恶性胶质瘤细胞系 U251 (耐 BCNU, 参看 Beljanski et al., Anticancer Res., 13(6A):2301-8(1993)) 中检测三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III) 和替莫唑胺。具体地说, 用恶性胶质瘤细胞系 U251 进行 ATCC 的 MTT 细胞增殖分析[®]。本研究中储用培养物可以生长到 70-80% 覆盖率。使用 ATCC 的 MTT 细胞增殖分析试剂盒 (Catalog No. 30-1010K), 进行体外检测实验, 估测三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III) 和替莫唑胺抗细胞系增殖活性。培养物保持在 37° C 加湿处理的 5%CO₂/95% 空气环境中。用 1,000 μM 三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III) 和替莫唑胺或其 4x 梯度浓度 (250 μM, 62.5 μM, 等) 处理细胞。在 72 小时处理后去除每孔中的 100 μl 培养基, 并向每孔中加入 10 μl MTT 试剂。平板在 37° C 孵育 4 小时, 然后加入 100 μl 去污剂。平板在黑暗中室温孵育过夜, 用 **SoftMax**[®] Pro (version 5.2, Molecular Devices) 读板器读板。吸光值分析如下: 用 **SoftMax**[®] Pro (version 5.2, Molecular Devices) 将吸光值转换成对照百分比并绘制其针对待测药物浓度的曲线图来计算 IC₅₀。计算对照百分比前, 从所有孔中减去平板的空白信号均值。通过用无药物空白均值 (11 列数值; 细胞 + 介质对照) 乘以 100 为每个检测孔划分吸光度值计算对照百分比数值。用 4- 参数方程式分析化合物浓度对对照百分比的曲线图以获取 IC₅₀ 值和描述 S 型剂量反应曲线的其它参数。

[0049] 通过如下四参数对数方程曲线拟合数据, 估算检测试剂的 IC₅₀ 值:

$$Y = \frac{Top - Bottom}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^n} + Bottom$$

[0051] 其中“Top”是对照吸光度最大百分比 (100%), “Bottom”是在最高试剂浓度时对照吸光度最小百分比 (低至 0), Y 是对照吸光度百分比, X 是待测试剂浓度, IC₅₀ 是相比对照可以抑制 50% 细胞生长的试剂浓度, n 是曲线斜率。

[0052] 三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III) 在 U251 细胞系中的 IC₅₀ 值是 4.04 μM, 而替莫唑胺的 IC₅₀ 值是 283 μM, BCNU 的 IC₅₀ 值是 53.7 μM。因此, 三 (8-羟基喹啉) 合镓 (III) 在耐替莫唑胺或 BCNU 的恶性胶质瘤细胞中是有效的。

[0053] 实施例 4

[0054] 联合研究

[0055] 在如实施例 3 中描述的条件下, 培养人恶性胶质瘤细胞系 U251。定期亚培养细胞以维持在指数生长期。在 EC₅₀ 种板这天, 在同一时间处理细胞并接种到 96 孔细胞处理培养板中。用胰蛋白酶溶液处理, 使细胞从细胞培养瓶上脱离下了, 移至无菌锥形管中室温 350xg 离心 5 分钟。沉淀的细胞重悬在完全培养基中, 并用 Neubauer **Bright-Line**[®] 细胞

计数器和台盼蓝活性染色计数。根据先前确定的针对每种细胞系 72 小时 96 孔板实验的种植密度,用完全培养基稀释细胞重悬液(基于活细胞数)以获得一个最终重悬密度(cells/ml)。这种用于 EC₅₀ 测定的组织培养处理平板种植密度为 1.5x 10³ 细胞/孔,在 5%CO₂,95% 湿润空气环境中 37° C 孵育过夜使细胞贴壁。

[0056] 待测药物准备:对于每种单独的或联合的待测药物,在 1.5ml 微量离心管中配制最高浓度混合物(2x 最终处理浓度),然后直接转移到处理稀释模板的第一个孔中。

[0057] 三(8-羟基喹啉)合镓(III)由尼基制药公司提供,替莫唑胺由先灵公司制造并储存在琥珀色玻璃小瓶中。室温下储存在暗处,并且用封口膜封闭避免接触光和潮气。称量替莫唑胺(20.7mg),加入 149 μL 100%DMSO 制备成浓度为 400mM 白色絮状悬液,在不加热的超声水浴中短暂声处理(约 10-20 秒)。

[0058] 用 MTT 细胞增殖分析试剂盒(ATCC catalog#30-1010K)估测待测药物的抗恶性细胞增殖活性。处于指数增长期的细胞按照结果显示的密度种植在 96 孔培养处理板中,除了一列用作只加空白培养基的孔,所有孔都加入 0.1mL 完全培养基。在进行待测药物处理之前,孵育细胞过夜使其贴壁。用完全培养基(适当情况下加入 1%DMSO)连续稀释待测药物并向每孔中加入 0.1mL 体积,得到总终体积为 0.2mL/孔(使用 DMSO 时,DMSO 终浓度 0.5%)。细胞在待测药物中处理 72 小时。待测药物处理后,从每个平板的所有孔中小心吸除 0.1mL 培养液上清并向每孔中加入 0.01mL MTT 试剂。将平板放回孵育器保持 4 小时。孵育期过后,向每孔中加入试剂盒中提供的去污剂(0.1mL)。平板包裹着塑料袋中防止蒸发,可以放在室温黑暗环境中过夜。第二天用 SpectraMAX Plus 读板器(Molecular Devices)检测 570nm 处吸光值。

[0059] 用 **SoftMax®** Pro(version 5.2, Molecular Devices) 将吸光值转换成对照百分比,并绘制其针对待测药物浓度的曲线图来计算 EC₅₀。计算对照百分比前,从每个孔中减去平板空白信号均值。通过用无药物空白均值(11 列数值;细胞+介质对照)乘以 100 为每个检测孔划分吸光度值,计算对照百分比数值。用 4-参数方程式分析化合物浓度对对照百分比的曲线图以获取 EC₅₀ 值和描述 S 型剂量反应曲线的其他参数。

[0060] 用 **CompuSyn®** 软件分析联合数据,计算联合指数(CI)值来评估协同性。根据对照百分比(来源于 **SoftMax®** Pro)用公式:1-(对照百分比/100),计算分数效应(Fa)。剂量,分数效应和联合实验中待测药物摩尔比输入到 **CompuSyn®** 软件中,用于计算协同作用是否存在。**CompuSyn®** 给出一个联合指数(CI)值,其能评估化合物影响细胞增殖的等级。CI 值小于 1 表明存在协同作用,CI 值大于 1 表明拮抗作用。CI 值接近 1 表明有附加效应。参考 Chou, Pharmacol. Rev., 58(3):621-81(2006)。在 U251 细胞系中,三(8-羟基喹啉)合镓(III)和替莫唑胺联合,CI 值为 0.812,表明是协同联合。图 2 是一个联合指数曲线图,阐述在恶性胶质瘤细胞系 U251 中三(8-羟基喹啉)合镓(III)和替莫唑胺之间的附加协同活性。

[0061] 说明书中提及的所有论文和专利申请书是领域内技术人员对本发明相关的认识水平的体现。所有的论文和专利申请书在此通过相同程度的引用结合到文中,好像每篇单个的论文或专利申请书都是特定的和单独的提及而通过引用结合到文中。仅仅提及论文和专利申请书不一定表示承认它们是先于本申请的在先技术。

[0062] 尽管前述的发明为了清楚的理解通过图示和例子的方式而描述的相当详细,但显

然一些改变和修正可以在附加的权利要求范围内实行。

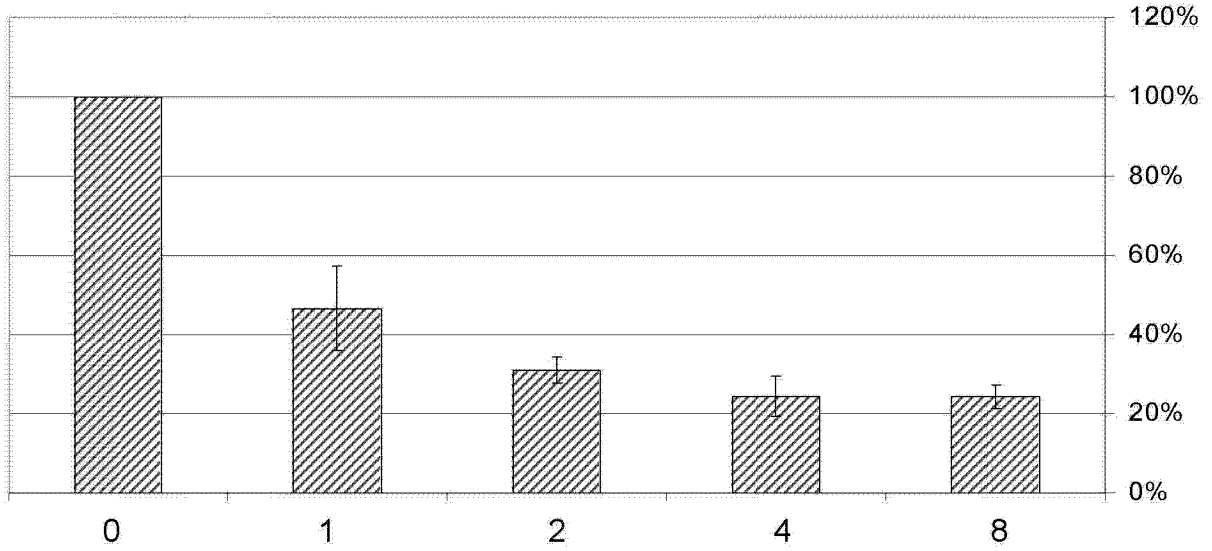


图 1

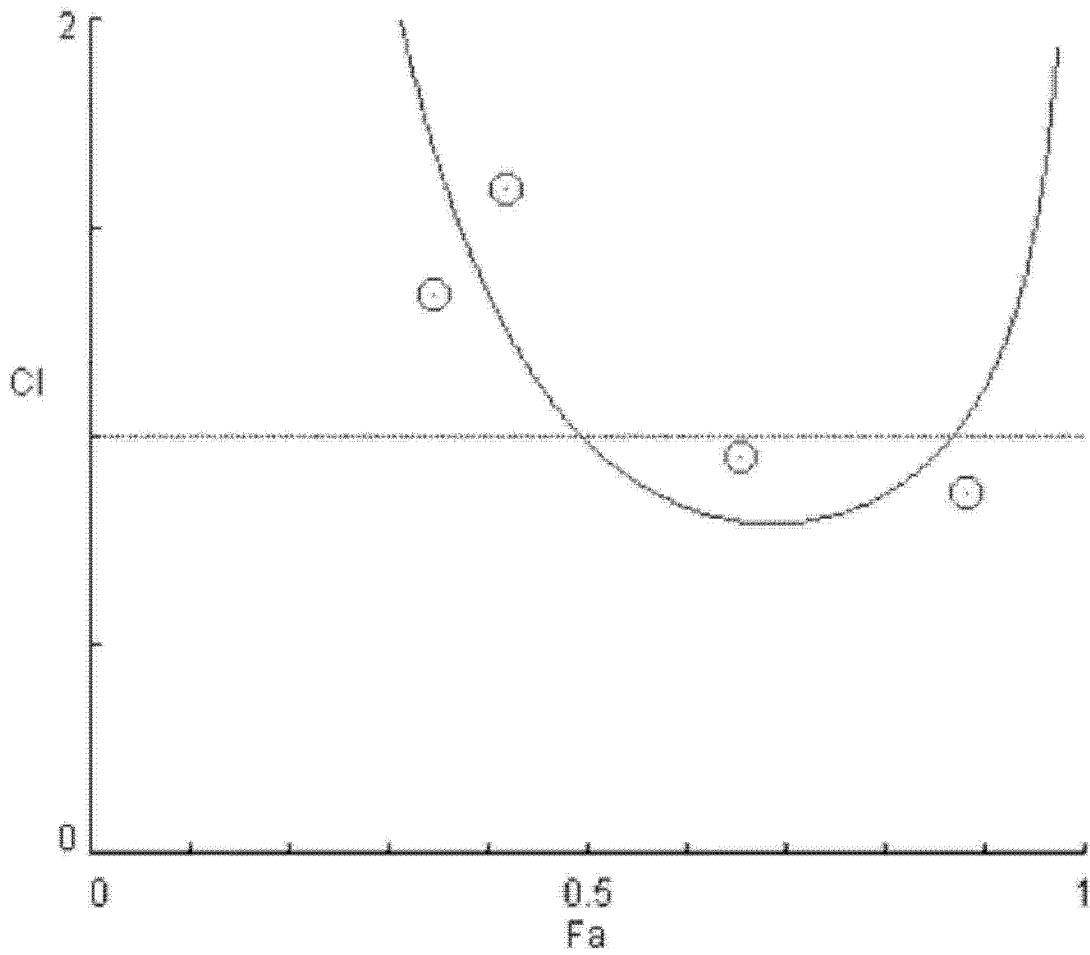


图 2