

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/715 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580020707.8

[43] 公开日 2008年9月17日

[11] 公开号 CN 101267828A

[22] 申请日 2005.6.21

[21] 申请号 200580020707.8

[30] 优先权

[32] 2004.6.22 [33] US [31] 60/581,958

[86] 国际申请 PCT/US2005/021827 2005.6.21

[87] 国际公布 WO2006/002106 英 2006.1.5

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.22

[71] 申请人 普罗医药公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 D·普拉特 E·佐默

A·科尔约瑟夫

[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

代理人 袁志明

权利要求书5页 说明书22页 附图5页

[54] 发明名称

用于共同递送抗癌药、抗血管生成药和多糖的组合物及方法

[57] 摘要

本申请公开了与一种或多种治疗药联合的化学可溶的配基分支多糖，其分子量为约 50kD 至约 200kD。还公开了使用该多糖联合至少一种抗癌药用于治疗 and 预防恶性肿瘤的方法。另外公开了使用该组合物用于治疗 and 预防血管生成的方法。

1. 药物组合物，它包含多糖和化学治疗剂的组合，其中所述多糖的主链具有众多重复碳水化合物单元，其中每个重复单元包括至少一个酸性和至少一个中性碳水化合物，并且其中所述主链具有至少一个悬挂在其上的分支侧链。

2. 权利要求 1 的组合物，其中所述的多糖具有约 50 kDa 至约 200 kDa 的分子量。

3. 权利要求 1 的组合物，其中所述的主链每二十个酸性碳水化合物包括约一个中性碳水化合物。

4. 权利要求 3 的组合物，其中所述的中性碳水化合物为鼠李糖。

5. 权利要求 1 的组合物，其中所述的酸性碳水化合物为糖醛酸。

6. 权利要求 5 的组合物，其中所述的糖醛酸为半乳糖醛酸。

7. 权利要求 6 的组合物，其中所述的糖醛酸包括羧酸部分。

8. 权利要求 7 的组合物，其中所述的羧酸部分为烷基化或酯化的。

9. 权利要求 8 的组合物，其中所述的羧酸部分包括选自以下的有机基团：甲基、乙酰基、癸基和苄基等。

10. 权利要求 1 的组合物，其中所述的分支侧链通过所述的中性碳水化合物连接到所述的主链。

11. 权利要求 1 的组合物，其中所述的多糖还含有一个或多个疏水性碳水化合物部分。

12. 权利要求 1 的组合物，其中所述的多糖包含聚半乳糖醛酸和鼠李糖主链，其中至少一个分支侧链悬挂在至少一个鼠李糖上。

13. 权利要求 1 的组合物，其中所述的化学治疗剂选自氨基糖苷类、安吡啶、阿那曲唑、门冬酰胺酶、BCG、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、 α 干扰素、伊立替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙立德、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、托泊替康、曲妥单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨等。

14. 权利要求 1 的组合物，其中所述的分支侧链没有次级侧链。

15. 权利要求 1 的组合物，其中所述的分支侧链末端为选自半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖和它们的衍生物的碳水化合物。

16. 权利要求 1 的组合物，其中所述的主链实质上为去酯化的。

17. 权利要求 1 的组合物，其中所述的主链去酯化至小于约 1%。

18. 权利要求 1 的组合物,其中所述的主链去酯化至小于约 0.5%。

19. 权利要求 1 的组合物,其中所述的主链去酯化至小于约 0.25%。

20. 权利要求 1 的组合物,其中所述的主链去酯化至小于约 0.1%。

21. 权利要求 1 的组合物,它还含有次级分支,其中所述的次级分支产生疏水性环境。

22. 权利要求 1 的组合物,其中所述的多糖结合到半乳凝素受体。

23. 权利要求 22 的组合物,其中所述的半乳凝素受体为半乳凝素-3。

24. 治疗受治疗者中癌症的方法,它包括给予需要它的受治疗者有效量的药物组合物,其中所述的药物组合物包含多糖和化学治疗剂,其中所述多糖的主链具有众多重复碳水化合物单元,其中每个重复单元包括至少一个酸性和至少一个中性碳水化合物,并且其中所述主链具有至少一个悬挂在其上的分支侧链。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述的癌症选自肾细胞癌、卡波济氏肉瘤、慢性白血病、乳癌、肉瘤、卵巢癌、直肠癌、咽喉癌、黑素瘤、结肠癌、膀胱癌、肥大细胞瘤、肺癌、乳腺癌、咽鳞状细胞癌、胃肠癌、和胃癌等。

26. 治疗受治疗者中血管生成的方法,它包括给予需要它的受治疗者有效量的药物组合物,其中所述的药物组合物包含多糖和抗血管

生成药，其中所述多糖的主链具有众多重复碳水化合物单元，其中每个重复单元包括至少一个酸性和至少一个中性碳水化合物，并且其中所述主链具有至少一个悬挂在其上的分支侧链。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述的抗血管生成药选自血管生成素(ANG)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、表皮生长因子(EGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、肿瘤生长因子- α (TGF- α)、和肿瘤生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、血小板衍生的内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)、胎盘生长因子(PIGF)、肝细胞生长因子(HGF)、血小板活化因子(PAF)、胰岛素样生长因子(IGF)、白细胞介素-8 (IL-8) 和粒细胞集落刺激因子(GCSF)等。

28. 权利要求 26 的方法，其中所述的药物组合物还包含肿瘤消融剂。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述的肿瘤消融剂选自氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、门冬酰胺酶、BCG、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氟磷酸盐、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷，达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、 α 干扰素、伊立替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙立德、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米磷酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、托泊替康、

曲妥单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨等。

用于共同递送抗癌药、抗血管生成药和多糖的组合物及方法

相关申请

本申请要求享有 2004 年 6 月 22 日提交的序号为 60/581,958 的美国临时申请的优先权和利益。

发明领域

本申请涉及用于治疗恶性癌症和血管生成的组合物及方法。特别地，本发明涉及一种或多种已知化学治疗剂与多糖一起共同给药。

发明背景

多种形式的癌症发病率预期会随着人口老化而增加。例如，前列腺癌为美国男性中最常被诊断出的癌症，以及为男性癌症死亡的主要原因。据预测 2004 年美国将有约 230,110 新前列腺癌病例被诊断和 38,000 例前列腺癌引起的死亡。诊断为前列腺癌的患者大约 50% 具有并非只是影响前列腺的疾病形式。前列腺癌能够转移至骨骼系统，患者一般死于无法抵抗的骨转移性疾病。迄今，对于患有转移性疾病的患者没有有效的治愈性治疗，并且也几乎没有治标的治疗。

肿瘤细胞转移的过程要求细胞脱离原发性肿瘤，侵入基底膜，从肿瘤细胞栓子经过血流，与靶器官的血管内皮相互作用，外渗，并增生形成继发性肿瘤群体。

普遍承认转移级联的许多阶段涉及细胞表面成分例如糖结合蛋白介导的细胞的相互作用，糖结合蛋白包括半乳糖苷结合凝集素（半乳糖凝集素）。静脉内(i.v.)注入同源小鼠尾部静脉之前在体外用抗半乳糖凝集素单克隆抗体处理 B16 黑色素瘤和 uv-2237 纤维肉瘤细胞，导致肿瘤肺群体发育的显著抑制。用半乳糖凝集素-3 cDNA 转染低转移、低半乳糖凝集素-3 表达性 uv-2237-c115 纤维肉瘤细胞，导致转染细胞的转移表型增

加。此外，还确立了人乳头状甲状腺癌中半乳凝素-3表达的水平与肿瘤阶段人结肠直肠和胃癌之间的关联性。单糖例如甲基- α -D-乳糖苷和乳-N-丁糖也显示出抑制 B16 黑色素瘤细胞的转移，而 D-半乳糖和阿拉伯半乳糖抑制 L-1 肉瘤细胞的肝转移。

然而，多数公认的抗癌药为细胞毒性的，这是由于药物非特异递送导致对正常组织的毒副作用。因此，在治疗癌症中，需要能够增强公认抗癌物质的确立的治疗特性，而减少他们不合乎需要的毒性的治疗方法。

发明概述

本发明涉及与一种或多种治疗剂联合的化学可溶的配基分支多糖，其分子量为约 50 kD 至约 200 kD。一方面，本发明涉及使用该多糖联合至少一种抗癌药用于治疗 and 预防恶性癌症的方法。另一方面，本发明涉及使用本发明的组合物用于治疗 and 预防血管生成的方法。

根据本发明，提供配基分支的多糖，它包含：由众多碳水化合物单元制成的生理学上可溶解的聚合物，其中每个碳水化合物单元包括碳水化合物主链。碳水化合物主链可以含有众多重复单元，其中每个重复单元具有至少一个酸性分子和至少一个中性碳水化合物分子。碳水化合物的至少一个支链能够接在主链上，包括多个中性碳水化合物或碳水化合物衍生物。

这种配基分支的多糖的平均分子量为约 50 kD 至约 200 kD，或者约 250 至约 1000 个单糖。主链每 20-25 酸性分子包括约一个中性碳水化合物分子。支链由一个或多个中性碳水化合物分子连接。另外，多糖具有疏水性部分和轻微带负电荷部分（例如糖醛酸）的组合，其能够与一种或多种公认的治疗药物相互作用，有效地递送这些药物至转移癌，在其中它们发挥它们的生物活性。一方面，多糖结构可以具有伸展的碳水化合物配基，其与散布在癌细胞表面上的多种多价凝集素受体相互作用。这些配基扰乱肿瘤表面，并潜在地进一步增强递送化学治疗到肿瘤细胞中。因此，通过与可溶的分支配基多糖共同给药，

公认的抗癌剂被更有效地递送至受影响的患病细胞，并且受到不利影响的健康细胞更加很少。

一方面，酸性分子为盐形式的糖醛酸，例如钾、钠或镁盐形式。另一方面，糖醛酸包括羧酸单元并被烷基化或酯化最高达总单元的10%。例如甲基、乙酰基、癸基、或苜基能够连接到羧酸单元。

在本发明的一个实施方案中，描述了多糖，其中包括酸性分子并包括中性碳水化合物，该酸性分子为半乳糖醛酸，该中性碳水化合物为鼠李糖。本发明的一个方面提供多糖，其中至少一个支链通过鼠李糖分子连接到碳水化合物主链上。

本发明另一个实施方案涉及多糖，其中包括酸性分子，其为含有最高至100个单元的聚半乳糖醛酸，并且中性碳水化合物分子位于每个末端，为鼠李糖。一方面提供多糖，其中至少一个支链通过聚半乳糖醛酸分子和/或鼠李糖分子连接到碳水化合物主链上。

另一个实施方案涉及治疗诊断有癌症的患者或预防诊断有癌症高风险的患者中癌症的方法，它包括以下步骤：将治疗有效量的至少一种公认的抗癌药与本发明多糖结合，产生联合治疗；并将这种联合递送给患者。

另一个实施方案涉及治疗诊断有肿瘤血管生成的患者或预防诊断有血管生成高风险的患者的肿瘤血管生成的方法，它包括以下步骤：将治疗有效量的至少一种公认的抗血管生成药与本发明可溶性分支的多糖结合，产生联合治疗；并将这种联合递送给患者。本发明的一个方面进一步地包括在将这种联合递送给患者之前，将公认的抗癌药与所述联合结合的步骤。

再另一个实施方案涉及预防癌症的患者中肿瘤血管生成的方法，它包括以下步骤：将治疗有效量的至少一种公认的抗癌药、治疗有效量的至少一种公认的血管生成药与本发明可溶性分支的配基多糖结合，产生联合治疗；并将这种联合递送给患者。

附图简述

图 1 显示 20 g/L 美国药典果胶与 10mM H₂O₂、10mM 抗坏血酸、和各为 5mM 的二者的组合的消化，表明消化时间和粘度计测量结果之间线性关系；

图 2 显示碱金属硼水化物 (borohydrate) 中的 β-消除导致控制的链断裂过程，提供粘度丧失和降低的胶凝性质；

图 3a 显示对照“空白 a”的色谱图，图 3b 显示目标多糖，“标准品 B3a”的色谱图；

图 4 显示商用鼠李半乳聚糖分子量的 MALLS 结果；以及

图 5 显示鼠李半乳聚糖的 Zimm 图。

发明详述

本发明涉及化学可溶的配基分支多糖，具有分子量约 50 kD 至约 200 kD。本发明也涉及使用本发明多糖结合至少一种公认的抗癌药治疗和预防恶性癌症的方法。本发明进一步涉及使用本发明多糖结合至少一种公认的抗血管生成药治疗和预防血管生成的方法。

此处使用的缩写为：PS，多糖；EHS，Eaglebreth-HoIm Swarm；DMEM，Dulbecco 氏可溶的分支 Eagle 氏极限必需培养基；CMF-PBS，无 Ca²⁺和 Mg²⁺的磷酸盐缓冲盐水，pH 7.2；BSA，牛血清白蛋白；galUA，吡喃半乳糖基糖醛酸，也称为半乳糖醛酸；和 gal，半乳糖；man，甘露糖；glc，葡萄糖；all，阿洛糖；alt，阿卓糖；ido，艾杜糖；tal，塔罗糖；gul，古洛糖；和 ara，阿拉伯糖；rib，核糖；lyx，来苏糖；xyl，木糖；和 fru，果糖；psi，阿洛酮糖；sor，山梨糖；tag，塔格糖；和 rha，鼠李糖；fuc，岩藻糖；quin，异鼠李糖；2-d-rib，2-脱氧-核糖。当在说明书和附随的权利要求书中使用时，除非上下文另外要求，下列术语将具有所指明的意义：

“给药”指口服、或肠胃外用包括静脉内、皮下、局部、透皮、经粘膜、腹膜内的、和肌内。

“受治疗者”指动物例如哺乳动物，例如人类。本术语也包括患者。

“癌症治疗”指对有发生癌症的高风险的受治疗者以及已经发生肿

瘤的受治疗者的预后治疗。术语“治疗”能适用于减少或预防异常的细胞增殖、细胞集合和细胞分散（转移）至继发的位置。

“癌症”指任何肿瘤性疾病，包括这样的细胞病症，例如，肾细胞癌、卡波济氏肉瘤、慢性白血病、乳癌、肉瘤、卵巢癌、直肠癌、咽喉癌、黑素瘤、结肠癌、膀胱癌、肥大细胞瘤、肺癌、乳腺癌、咽鳞状细胞癌、和胃肠癌或胃癌。

“解聚作用”指发生多糖主链的部分或完全水解作用，例如，当多糖以化学方法处理时，与原始的多糖相比形成了尺寸减小的片段。

“有效剂量”指改善受治疗者的症状或延长遭受癌症或有遭受癌症的高风险的受治疗者寿命的药物的剂量。

“糖”指任何简单的碳水化合物包括单糖、单糖衍生物、单糖类似物、糖，包括在低聚糖或多糖中形成个体单元的那些糖。

“单糖”指单个碳水化合物单元；多聚羟基醛（醛糖）或多聚羟基酮（酮糖）和其衍生物和类似物为这样的实例。

“低聚糖”指直链或支链的单糖，其包括通过糖苷键连接的最多约40个糖单元。

“多糖”指由彼此通过半缩醛或糖苷键连接的约40个至约100,000个糖单元形成的聚合物。多糖可以为直链、单分支的、或多分支的，其中每个分支可以有另外的次级分支，并且单糖可以为标准的D-或L-环状糖，为吡喃糖(6元环)或呋喃糖(5元环)形式，例如分别为D-果糖和D-半乳糖；或它们可以为环状糖衍生物，例如，氨基糖例如D-葡萄糖胺、脱氧糖例如D-岩藻糖或L-鼠李糖、磷酸糖例如D-核糖-5-磷酸、糖酸例如D-半乳糖醛酸、或多衍生糖例如N-乙酰-D-葡萄糖胺、N-乙酰神经氨酸（唾液酸）、或N-硫酸根合-D-葡萄糖胺。

“主链”意思是指多糖的主要链；或者起源于起始多糖的主要链的链，具有通过 α 或 β 糖苷键顺序地连接的糖部分。主链可包含沿着顺序链在多个位置与其连接的另外的单糖部分。

“酯化”指在糖的糖醛酸部分的羧酸位置存在甲基酯或其他的酯基。

“单糖及其衍生物”，在本发明上下文内，指任何标准的和可能的单糖（糖）衍生物，包括但不限于，脱氧单糖、双脱氧单糖、糖醇、糖酸、糖酯、糖醚、卤化糖、氨基糖、磷酸糖、吡喃糖和呋喃糖环状形式、开环形式、糖的磺酸酯、糖苷衍生物、二醇类、glycolenes、酮糖、二酮糖、受保护的糖、缩醛例如亚苄基和缩酮例如亚异丙基、硝基糖、N-乙酰糖、N-乙酰胞壁酸、和抗生素糖例如野苳霉素和二氢野苳霉素。

“抗癌药”，在本申请上下文内，指显示有减少癌症肿瘤或肿瘤细胞的大小、发病率、转移、增殖、发生、或复发的许多化合物中的任一种，包括但不限于：氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、门冬酰胺酶、BCG、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷，达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、 α 干扰素、伊立替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙立德、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、托泊替康、曲妥单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

“抗血管生成药”，在本申请的意义内，指在有肿瘤血管生成的受治疗者中显示抗血管生成效果的任何化合物，并且包括但不限于：血管生成素(ANG)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、表皮生长因子(EGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、肿瘤生长因子- α (TGF- α)和肿瘤生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、血小板衍生的内皮细胞

生长因子(PD-ECGF)、胎盘生长因子(PIGF)、肝细胞生长因子(HGF)、血小板活化因子(PAF)、胰岛素样生长因子(IGF)、白细胞介素-8(IL-8)和粒细胞集落刺激因子(GCSF)。

本发明的一个实施方案中,描述了可溶解的分支的多糖,其具有糖醛酸糖主链或糖醛酯糖主链,平均有约每两个主链单元中一个中性单糖至每二十五个主链单元中一个中性单糖与主链连接。所获得的多糖具有至少一个侧链,其包含大部份中性糖类和糖衍生物,通过约二十至二十五个中性单糖中一个连接到主链。本发明的某些多糖具有至少一个糖类侧链,其还实质上不含有次级糖分支,末端糖包含半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、或其衍生物。在一个方面,可溶解的分支多糖可平均少于每重复单元约1~2个次级分支。另一个方面包括可溶解的配基分支的多糖部分,其中次级分支平均少于每重复单元约0.5~1个。又一个方面,可溶解的分支多糖平均少于每重复单元约0.25~0.5个次级分支。尤其地,可溶解的分支的多糖平均少于每重复单元约0~0.25个次级分支。本发明的其他多糖可具有至少一个糖类侧链,其末端为由阿魏酰基分支的可溶糖。

本发明另一个实施方案中,可溶解的分支多糖主链实质上为去酯化的产生带负电荷的实体。在一个方面,将可溶解的分支多糖主链去酯化至小于约1%。在另一个方面,将可溶解的分支多糖主链去酯化至小于约0.5%。又一个方面,可溶解的分支多糖主链去酯化至小于约0.25%。再一个方面,可溶解的分支多糖主链去酯化至小于约0.1%。

本发明另一个实施方案中,可溶解的分支多糖能由化学修饰天然存在的聚合物而制得。化学修饰之前,天然的多糖分子量可为约40,000~1,000,000,具有多分支的糖类,例如由1至20个单糖如葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖组成的分支。这些分支通过中性单糖例如鼠李糖连接至主链。这些分子可进一步包括一个主链或糖醛酸糖主链的链,其被酯化少至约2%至多达约30%。多分支自身可具有多个糖分支,次级多分支任选地包括中性糖类和中性糖衍生物,因此产生主要疏水性实体。

多糖和抗癌药/抗血管生成药的有效剂量和剂量方案为变量的函数，例如为受治疗者的年龄、体重、医疗史和其他被认为相关的变量的函数。剂量和剂量方案是基于可溶的分支多糖成分和抗癌药/抗血管生成药的分子量（不考虑可消化的载体）。通常的方案可由每千克受治疗者体重约 10 至约 1000 克的每日剂量组成。可溶解的分支多糖和抗癌药/抗血管生成药的剂量还依赖于被治疗的疾病状态或情况以及其他的临床因素例如患者的体重与身体健康状况和给药的方式。根据特定受治疗者中可溶解的分支多糖和抗癌药/抗血管生成药的半衰期，可以每日数次至每周一次给予任一或两种试剂。（应该理解本发明具有人用和兽用两种应用）。本发明方法考虑单次以及多次共同给药，从每 24 小时约 10 ~ 约 1000 g/kg 到每 6 小时约 2.5 ~ 250g/kg，同时给予或者在延长时期内给予。

化学可溶的分支多糖和已知的抗癌药/抗血管生成药可制成用于单独或者共同口服给药的制剂。给药的其他方法包括眼的（包括玻璃体内的或眼内）、鼻的、局部的（包括颊的和舌下的）、皮内的、气管内的、和硬膜外的、透皮的、腹膜内的、颅内的、脑室内的、大脑内的、阴道内的、子宫内的、直肠的和肠胃外的（包括静脉内、椎管内的、皮下或肌内）方法。可选择地，可将可溶解的分支多糖和已知的抗癌药/抗血管生成药掺入植入的生物可降解的聚合物中，使得化合物持续释放(Brem 等, *J. Neurosurg*, (1991), vol.74, pp.441-446, 在此引入其全部教导作为参考)。聚合物被植入于期望药物递送的附近，例如，肿瘤位置附近；或被植入以便可溶的分支多糖缓慢地系统释放。渗透微泵也可用于提供高浓度的可溶的分支多糖通过管状控释至目标部位，例如直接进入该肿瘤的转移生长中或进入该肿瘤的维管联结中。

制剂可以方便地以单位剂型存在并可由常规的制药技术制得。这样的技术包括使活性成分和药物载体和赋形剂结合的步骤。通常，制剂制备如下：密切地和均匀地将活性成分和液体载体，或细粉碎的固体载体，或两者结合，然后，必要的话，使产品成型。

适合的可消化的药物载体包括明胶胶囊，其中多糖以干燥形式装

入胶囊；或片剂，其中多糖与羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、微晶纤维素、丙二醇、硬脂酸锌和二氧化钛和其他适当的粘合剂和添加剂混合。组合物也可制成液体，使用蒸馏水、调味剂和某些糖或甜味剂作为可消化的载体，制备在受治疗者使用时口味令人愉快的组合物。

持续释放基质，当此处使用时，是由材料通常为聚合物制成的基质，聚合物通过酶解或酸/碱水解或通过解离降解。一旦被插体内，酶和体液作用于该基质。期望持续释放基质选自生物相容性材料例如脂质体，聚丙交酯(聚乳酸)，聚乙交酯(羟乙酸聚合物)，聚丙交酯共-乙交酯(乳酸和羟乙酸的共聚物)，聚酐，聚(原)酯，多肽，透明质酸，胶原，硫酸软骨素，羧酸，脂肪酸，磷脂，多糖，核酸，多氨基酸，氨基酸例如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸，多核苷酸，聚乙烯丙烯，聚乙烯吡咯烷酮和硅酮。生物可降解的基质为下列之一的基质：聚丙交酯、聚乙交酯、或聚丙交酯共-乙交酯(乳酸和羟乙酸的共聚物)。

本发明调节转移的治疗组合物可以为固体、液体或气雾剂，并可由任何已知的给药途径给予。固体治疗组合物的实例包括丸剂、乳膏、和可植入的剂量单位。丸剂可以口服给予；治疗乳膏可以局部施用。可植入的剂量单位可以局部施用，例如在肿瘤位置；或者可以为了治疗性血管生成调节组合物的系统释放而被植入，例如皮下植入。液体组合物的实例包括适于皮下、静脉内、动脉内注射的制剂，以及用于局部和眼内给药的制剂。气雾剂的实例包括用于给药至肺的吸入制剂。

适于肠胃外给药的制剂包括水和非水的无菌的注射液，其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和能赋予制剂与计划的接受者血液等渗的溶质；以及水和非水的无菌的混悬剂，其可以包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器中，例如密封安瓿和小药瓶中，并可以在冷冻干燥的(冻干的)条件贮存，其仅仅要求立即使用前添加无菌液体载体，例如注射用水。临时的注射液和混悬液可以由先前描述的那类无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。

可接受的单位剂量制剂为那些包含给药成分的日剂量或单位、日

分剂量、或其适当的部分的制剂。(应当理解,关于正在讨论的制剂类型,除成分,尤其上述提及的成分之外,本发明制剂包括本领域常规的其他的试剂)。任选地,可将细胞毒性剂掺入或以其它方式与血管生长抑素蛋白质,或其生物学功能肽片段组合,提供给患者双重治疗。

用于给予本领域众所周知的治疗剂的其他制剂也可以被使用。

在一个方面,本发明多糖制剂与已知的癌症药物共同给药,其中已知的抗癌药物的治疗剂量为本领域已知的有效抗癌剂量。例如,5-FU可以以 $100 \sim 1000 \text{ mg/m}^2/\text{天}$ 给予或紫杉醇可以以 $50 \sim 300 \text{ mg/m}^2/\text{天}$ 的剂量给予。当抗癌药,例如5-FU和紫杉醇,联合 $20 \sim 300 \text{ mg/m}^2$ 剂量的多糖使用时,在生有肿瘤的动物中观察到的结果最好。特别地,在具有结肠肿瘤的啮齿类动物中,这种联合治疗形式与没有治疗的对照组相比较,观察到有最高达80%的改善。

最近的证据表明,可溶的分支多糖碳水化合物结构可能具有抗血管生成活性,抑制血管生成因子诱导的血管生成,这些是使用CAM测定法、角膜新生血管形成测定法(Gimbrone等,1974, *J.Natl.Cancer Inst.*52:413-427,在此引入其全部教导作为参考)和本领域已知的其他类似的测定法所测定的。因此,可溶的分支多糖与抗血管生成因子和抗癌药的共同给药具有协同作用。

特别地,本方法涉及肾癌、肉瘤、卡波济氏肉瘤、慢性白血病、乳癌、乳腺癌、卵巢癌、直肠癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、黑素瘤、肥大细胞瘤、肺癌、咽喉癌、咽鳞状细胞癌和胃肠癌或胃癌。

本领域技术人员应该理解,本发明方法可以用于其他的癌症。

此处描述的是,使用控制时间、温度和缓冲剂的条件,创造想得到的多糖的化学修饰程序。程序包括过氧化物/抗坏血酸裂开聚合物主链中的糖苷键(参见,实施例1),碱性还原的解聚作用(参见,实施例2),或控制解聚成更小的分支多糖分子(参见,实施例3)。首先的提纯操作为用碱和/或螯合溶液提取多糖除去蛋白质、色素和其他的杂质。

为了证明化学上可溶的分支多糖与公认的抗癌药共同给药的效力,进行了大量的体外(参见,实施例5)和体内(参见,实施例6)试

验。通过使用癌细胞系（其在培养基中正常地聚集，但是在本发明多糖存在下保持分散）显示抑制转移。抑制转移也由转移测定法得到证明，其中 MLL 细胞提高了其细胞表面上半乳凝素-3 的水平，因为半乳凝素-3 与肿瘤内皮细胞粘附相关。

脊椎动物的半乳糖苷-结合凝集素存在于多种组织和细胞中。凝集素根据其大小分成两种丰富的类型。分子量约 14 kD 凝集素被指定为半乳凝素-1 和分子量约 30 kD 那些被指定为半乳凝素-3。半乳凝素-3 表示一系列分子，包括鼠 34 kD(mL-34)和人 31 kD(hL-31)肿瘤相关的半乳糖苷-结合集素，35 kD 成纤维细胞糖结合蛋白(CBP35)，IgE 结合蛋白(cBP)，32 kD 巨噬细胞非整连蛋白层粘连蛋白结合蛋白(Mac-2)，以及大鼠、小鼠和人类形式的 29 kD 半乳糖苷-结合凝集素(L-29)。分子克隆研究显示这些多肽为相同的。

半乳凝素-3 通过活化的巨噬细胞高度表达并在转移细胞中致瘤性转化。许多癌症细胞，包括 MLL 细胞，在其细胞表面上表达半乳凝素-3，并且其表达牵涉肿瘤细胞的转移进程。多肽表达升高与不依赖于贴壁生长、同型聚集和肿瘤细胞肺建群的能力增加相关，这提示半乳凝素-3 促进肿瘤细胞在循环中形成栓塞和增强转移。肿瘤内皮细胞粘附被认为是转移过程中的关键事件。以高亲和力与含聚-N-乙酰乳糖胺序列的低聚糖结合半乳凝素也以特定的糖依赖的方式与层粘连蛋白的碳水化合物侧链结合。层粘连蛋白，基底膜的主要非胶原成分，为载有聚-N-乙酰乳糖胺序列的 N-连接的糖蛋白，并涉及细胞粘附、迁移、生长、分化、侵入和转移。

肿瘤细胞能通过细胞表面半乳凝素-3 与糖蛋白的碳水化合物残基相互作用，并且这可能与其与琼脂糖(D-半乳糖和 L-无水半乳糖的聚合物)半乳糖残基相互作用的能力和提供该半固体培养基中细胞增殖所需要的最小支持的能力相关。抗半乳凝素-3 单克隆抗体能抑制琼脂糖中肿瘤细胞的生长。此外，用小鼠半乳凝素-3 cDNA 转染正常小鼠成纤维细胞导致不依赖贴壁生长。参考实施例 1，在此报道的多糖体内结果与早先在人前列腺癌组织上用半乳凝素-3 完成的研究(美国专

利第 5,895,784 号, 在此引入其全部教导作为参考)一致。

此处描述的多糖, 当与抗癌药联合用于共同给药时, 在人类中抗转移效果中提供递送、靶向和全面正面的改善。

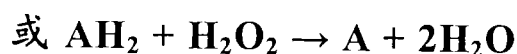
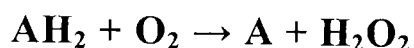
实施例

实施例 1: 通过过氧化物/抗坏血酸的断裂修饰天然存在的多糖

将原始多糖用 U.V. 辐射处理或混悬于 70% 酒精中处理约 48 小时, 以减少微生物污染。随后的所有步骤在半无菌的条件下进行。照射后, 将多糖慢慢溶于蒸馏水中, 并通过苯酚硫酸法测定总碳水化合物的量 (Fidler 等, *Cancer Res.*, (1973), vol. 41, pp. 3642-3956, 在此引入其全部教导作为参考)。

在蒸馏水中使用 20g/L 多糖, 例如美国药典果胶(Pelco)制备溶液, 并用 1 M 琥珀酸钠将 pH 调节至 pH 5.5。然后将多糖溶液在固定的温度, 例如 20°C 下孵育, 并且一起加入 (图 1) 或顺序加入过氧化物和/或抗坏血酸。

10 mM pH 5.5 的 H_2O_2 促进美国药典果胶缓慢地断裂。使特定流动性加倍所需求的一半时间为 15 ± 72 h (图 1)。L-抗坏血酸在相同条件和浓度下引起更快地断裂。然而, 最引人注目的效果是由 5 mM 抗坏血酸和 5 mM H_2O_2 的联用产生的, 其引起甚至更快的断裂。向已经含有恰好 1mM H_2O_2 的多糖溶液中顺序加入抗坏血酸, 引起进一步刺激断裂。加入的抗坏血酸剂量、 H_2O_2 加入后加入的时间、pH 和温度决定断裂的速度和程度。这些因素表明最初反应在断裂过程前进行。pH4.5 产生最短的滞后和最大的断裂速度。因此, 抗坏血酸的增强效果依赖于反应生产的 H_2O_2 或脱氢抗坏血酸:



其中, AH_2 为抗坏血酸; A 为脱氢抗坏血酸

这种方法在过渡金属离子如 Ca^{++} 、 Cu^{++} 或 Fe^{++} 存在下可以进一步提高。最有可能的裂解源为 Fenton 反应 (Halliwell, B. 和 Gutteridge, J.M.C. (1990) *Methods Enzymol.* 186, 1-85, 在此引入其全部教导作为参考), 其产生离子化的 OH, 并要求有 H_2O_2 和还原形式的过渡金属离子。据报道 Cu^+ 比 Fe^{+2} 更有效 60 倍。



大多数多糖样品包含可测量痕量的 ppm 水平的 Fe、Cu 和 Zn。数种商业多糖中的 Cu 和 Fe 的含量相似 (如同在他们的 A 之 C 中报道), 相似分析等级的抗坏血酸含有低 ppm 痕量的 Cu 和 Fe。因此, 当没有故意加入过渡金属时, Fenton 反应仍然是可行的。

实施例 2: 通过碱性还原解聚作用修饰天然存在的多糖

用例如 3N NaOH 将多糖溶液的 pH 增加到 pH 10。在 5~50°C 下短期孵育 30~60 分钟后, 加入 10 至 20% 乙醇, 将纯化过的多糖沉淀。这除去了伴随多糖的蛋白质和色素。然后将多糖溶解为 20 g/L 并加入酸。例如, 终浓度 0.01~1.0 M 三氟醋酸证明了产生控制的解聚作用。其他的酸或它们的组合, 例如硫酸、HCl、醋酸、丙酸、或甲磺酸, 可以用于缩短水解时间和提高期望结构的分支多糖的产率而没有氧化。

适当的时间间隔后, 例如, 时间过程从 10 分钟至 48 小时, 在温度 15°C 至 121°C 下, 将溶液中和至 pH 3~5, 冷却至 4°C 并离心除去任何不溶解的物质。然后将上清液用 1 N NaOH (例如) 中和至最终 pH 约 6.0~8.0, 并加入 20% 乙醇以回收可溶的多糖。选择多糖与酸的比例、酸的类型、浓度、pH、温度和时间间隔, 产生可溶的分支多糖, 其分子量为 50 kD、60 kD、75 kD、90 kD、105 kD、125 kD、150 kD、175 kD、和最高达 200 kD。

所获得的可溶的分支多糖产物可以进一步用 70% 乙醇或用 100%

丙酮洗涤，得到最终干燥的粉末。此后，将可溶的分支多糖重溶于水中，至按重量计约 5~15% 的终浓度，用于分析鉴别、功效、和/或毒理学研究。可溶的分支多糖可以进一步稀释，用于根据本发明实施方案使用，其中可以提供给细胞 0.01~10% 浓度，取决于期望可溶的分支多糖组成和分子量。

实施例 3：通过控制的解聚作用修饰天然存在的多糖

将多糖溶液的 pH 用例如 3N NaOH 增加到 pH 9。在 5~50℃ 下短期孵育 30~60 分钟后，加入 10% 乙醇，将纯化过的多糖沉淀。这除去了伴随多糖的蛋白质和色素。然后加入还原剂，例如氢硼化钠、硼水化锂、氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠或其他的硼水化盐，以通过糖苷键的碱还原机理产生断裂。这形成大小相当于重复的子单元的片段(美国专利第 5,554,386 号，在此引入其全部教导作为参考)。

改变温度和时间可以缩短水解时间和提高多糖的产率。适当的时间间隔后，例如，时间过程从 30 分钟至 24 小时，在温度 25℃ 至 75℃ 下，将溶液冷却至 4℃ 并离心除去任何不溶解的物质。然后将上清液用 1N HCl (例如) 中和至最终 pH 约 6.0，并加入 20% 乙醇以回收可溶的多糖。选择多糖与还原剂的比例、试剂的类型、浓度、pH、温度和时间间隔，产生可溶的分支多糖，其分子量为 50 kD、60 kD、75 kD、90 kD、105 kD、125 kD、150 kD、175 kD、和最高达 200 kD。

所获得的可溶的分支多糖产物可以进一步用 20~70% 乙醇和最后用 100% 丙酮分级分离，得到最终干燥的粉末。此后，可溶的分支多糖重溶于水中，至按重量计约 5~15% 的终浓度，用于分析鉴别、功效或毒理学研究。可溶的分支多糖可以进一步稀释，供根据本发明实施方案使用，其中可以提供给细胞 0.01~10% 浓度。依期望可溶的分支多糖组成和分子量。

当温度 (或 pH) 增加时，所谓的 β -消除开始(图 2)。碱金属硼水化物的 β -消除导致控制的链断裂过程，提供粘度和胶凝性质丧失，其用来监测反应。

实施例 4: 通过 HPLC/IR-MALLS 定量和分子量

使用多糖 HPLC 洗脱图的双重监测提供多糖的两个重要化学技术指标: 由折光率信号进行定量测量和由多角度激光散射(MALLS)检测器确定绝对分子量。图 3 显示两个色谱图, 用于比较的目的。“空白 a”为对照; “标准品 B3a”显示目标多糖。以 8 mg/mL 注入 30 μ l, 使用的系统如下: 柱: Phenomenex, Polysep GFC, 和 50mM 醋酸盐、0.1 M NaCl、pH 5.0 的流动相, 流速 1 mL/min。此外, 这些色谱图可提供关于多糖分子稳定性和断裂衍生物的数据。

使用凝胶渗透色谱法(GPC)分离技术(也称大小排阻色谱法-SEC)的高效液相色谱法(HPLC)为表征聚合物的已建立完善的技术。GPC 联合多角度激光散射(MALLS)和折光率(RI)检测为强有力的测定聚含碳水化合物绝对分子量的工具。光散射检测的应用消去 GPC 系统耗时的构象依赖校准的必需性。GPC-MALLS 相对于经典 GPC 的另一个优点为除分子量之外, 还可跟踪关于辐射线和溶液中构象的附加信息。

GPC-MALLS 方法的原理是基于大分子比小分子使光线产生更强的散射。色谱法运行期间, MALLS 检测器用位于十五不同角度检测器测量激光束的光散射程度。光散射检测器的输出量与大分子的浓度和分子量的乘法成比例。因此, 光散射峰的形状是不对称的。此外, 它与 RI 峰不一致, 因为 RI 检测器信号只与浓度成比例(图 3)。在任何洗脱时间, 从柱中洗脱出的聚合物分子量可以由 MALLS 和 RI 信号的商计算。制得分子量对洗脱体积的曲线图, 并且可以计算(平均)分子量和分子量分布。

Pro-Pharmaceuticals 和他们的合约 GMP 设施已经适应了 GPC/IR-MALLS 技术, 以在整个 R&D 和扩大规模阶段中定量药品物质和表征分子量平均数和分布; 并最终将它掺入药品物质结构证据中, 作为药品分析操作规程证明书的一部分。

使用 MALLS 对多糖进行分析消除了许多“经典 GPC”干扰 MW 估

算值的因素。GPC分离是基于流体力学体积的不同而不是分子量的不同。分子构象的不同，例如葡聚糖的分支，可以强烈地影响流体力学体积。其次，带正电荷或带负电荷的聚合物的 GPC 洗脱可能是非理想的，因为固定相的斥力或吸引力。相反地，GPC-MALLS 的结果不受这些色谱法缺点的影响，并能够获得绝对分子量。如果聚合物倾向于聚集，在多糖的不同浓度下使用多次测量能够估计绝对分子量。图 4 显示商业鼠李半乳糖分子量的 MALLS 结果。图 5 显示鼠李半乳糖的 Zimm 图。

实施例 5: 体外试验-多糖同抗癌药或进一步联合抗血管生成药

除非另外说明，以下试验均使用本发明可溶的分支多糖进行。测试了不同大小的分子，从 50 kD、60 kD、75 kD、90 kD、105 kD、125 kD、150 kD、175 kD 直到 200 kD。生理溶剂中以 w/v 计的可溶的分支多糖的量在 0.01 % ~ 1% w/v 变化。对照包括单用多糖，不含另外试剂、不溶的分支多糖；半乳糖-、阿拉伯糖-或阿魏酰基-取代的单糖；和单用抗癌药，单用抗血管生成药；抗癌药和可溶的分支多糖；抗血管生成药和可溶的分支多糖；和在含有可溶的分支多糖存在下抗癌药同抗血管生成药。进行 CAM 试验、角膜新生血管形成测定和本领域已知的适当测定(Gimbrone 等, 1974, J. Natl. Cancer Inst. 52:413-427, 在此引入其全部教导作为参考)。

层粘连蛋白粘附试验

已经建立了肿瘤细胞体外经历同型聚集的倾向与它们体内转移的潜在性之间相关性。i.v.注射后 B16 黑色素瘤细胞簇比单细胞产生更多的肺群体。而且，抗-半乳凝素-3 抗体已经显示抑制无唾液酸胎球蛋白诱导的同型聚集(Fidler, I.J., (1970) J. Natl. Cancer Inst., 45:77, 在此引入其全部教导作为参考), 提示细胞表面半乳凝素-3 多肽在它们与糖蛋白侧链相互作用后产生了同型聚集物生成。

在 B16-F1 鼠黑色素瘤细胞粘附试验中，在抗癌药存在下，测试了可溶的分支多糖控制细胞-细胞和细胞-基质相互作用的能力，这包括

测量细胞粘附到涂布基质的层粘连蛋白的变化和无唾液酸胎球蛋白诱导的牵涉半乳凝素-3的同型聚集的抑制。B16-F1系(低肺建群的发生率)来自静脉内注射 B16 黑色素瘤细胞引起的肺转移(Lotan, R.等, *Int.J.Cancer*, (1994), vol.56, pp.1-20, 在此引入其全部教导作为参考)。可试验的其他细胞系包括 UV-2237-10-3 鼠纤维肉瘤细胞、HT 1080 人纤维肉瘤细胞和 A375 人黑色素瘤细胞。

细胞以单层生长在 Dulbecco's 氏可溶的分支 Eagle 氏极限必需培养基 (DMEM) 中的塑料上, 其补充了谷氨酰胺、必需氨基酸、维生素、抗生素和 10% 热灭活胎牛血清(FCS 10%)。细胞维持在 37°C 增湿的 7% CO₂、93% 空气的气氛中。为确保可重现性, 所有的实验应该用原种回收后生长不超过六个星期的培养物进行。

层粘连蛋白(EHS 层粘连蛋白)可购自 Sigma, St.Louis, Missouri, 并且根据本发明可溶的分支多糖依照上述的操作制备。无唾液酸胎球蛋白可由胎球蛋白制备, 胎球蛋白可由 Gibco 实验室得到。依照 Spire; Grand Island Biological Co., Grand Island.N.Y.的方法, 在 80°C 下使用 0.05N H₂SO₄ 使胎球蛋白经受缓和的酸水解作用一个小时。通过透析将释放的唾液酸从胎球蛋白中除去。

在 4°C 下在 pH 7.2 无 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的磷酸盐缓冲盐水(CMF-PBS) 中用 EHS 层粘连蛋白(2 g/孔), 将 96-孔板的组织培养孔预先涂渍过夜, 并在室温下用 CMF-PBS 中的 1% 牛血清白蛋白(BSA)将剩余的蛋白结合位置封闭 2 小时。用 CMF-PBS 中的 0.02% EDTA 采集细胞并用无血清的 DMEM 将细胞悬浮。将总计 5x10⁴ 细胞加至的 DMEM 中的每个孔, DMEM 含或不含:1)可溶的分支多糖和抗癌药; 2)不同浓度的可溶的分支多糖与不变剂量的抗癌药; 或 3)不变浓度的可溶的分支多糖与不同剂量的抗癌药。在 37°C 孵育 2 小时 15 分钟后, 用 CMF-PBS 将非粘附细胞洗掉, 用甲醇和将粘附细胞固定并照相, 根据标准程序测定粘附细胞的相对数(Zollner, T.等, *Anti-cancer Research*, (1993), vol.13, pp.923-930, 在此引入其全部教导作为参考)。用亚甲蓝将细胞染色, 接着加入 HCl-乙醇以释放染料, 然后由板阅读器测量光学密

度(650 m)。

用 CMF-PBS 中的 0.02% EDTA 将细胞分离并以 1×10^6 细胞/mL 的浓度将其混悬于 CMF-PBS 中, CMF-PBS 含或不含 20 g/mL 无唾液酸胎球蛋白和 0% ~ 0.5% 可溶的分支多糖或 0% ~ 0.5% 可溶的分支多糖。然后将含 0.5 mL 细胞悬液的等分试样置于硅化玻璃管中并在 37°C 以 80 rpm 搅动 60 分钟。然后用含 1% 甲醛的 CMF-PBS 固定细胞使聚集终止。样品被用于计算单细胞数目, 根据以下方程式计算所获得的聚集: $(1 - N_t/N_c) \times 100$, 其中 N_t 和 N_c 分别表示在测试化合物存在下和在对照缓冲液 (CMF-PBS) 中的单细胞的数目。

结合半乳凝素-3 的多糖

通过无唾液酸胎球蛋白亲和性柱由一步纯化也可以从细菌细胞中提取重组半乳凝素-3。使用前将由乳糖洗脱的重组半乳凝素-3 用 CMF-PBS 深入透析。辣根过氧化物酶(HRP)-缀合兔抗大鼠 IgG+IgM 和 2,2'-连氨基 - 双(3-乙基苯并噻唑啉磺酸, ABTS)底物试剂盒可以购自 Zymed, South San Francisco, CA。如上所述的, B16-F1 鼠黑色素瘤细胞作为培养物生长在 Dulbecco 氏可溶的分支 Eagle 氏极限必需培养基(DMEM)中。

用含 0.5% MCP 和 1% BSA 的 CMF-PBS 涂渍 96-孔板的组织培养孔并干燥过夜。加入用含 0.5% BSA 和 0.05% 吐温 20 的 CMF-PBS(溶液 A), 在 50 mM 乳糖存在或缺失下, 连续稀释的重组半乳凝素-3, 并孵育 120 分钟, 此后将孔引流并用含 0.1% BSA 和 0.05% 吐温 20 的 CMF-PBS(溶液 B)洗涤。将溶液 A 中的大鼠抗半乳凝素-3 加入并孵育 60 分钟, 随后用溶液 B 洗涤并用溶液 A 中的 HRP-缀合兔抗大鼠 IgG+IgM 孵育 30 分钟。洗涤后, 通过加入 ABTS 确定每个孔中缀合的结合酶的相对量。在 405 nm 测量水解程度。

用 CMF-PBS 中的 0.02% EDTA 将细胞分离并以 1×10^3 细胞/mL 将其混悬于完全 DMEM 中, DMEM 含或不含: 1) 可溶的分支多糖和抗癌药; 2) 不同浓度的可溶的分支多糖与不变剂量的抗癌药; 或 3) 不变

浓度的可溶的分支多糖与不同剂量的抗癌药。在 37°C 将细胞孵育 30 分钟，然后以 1:1(v/v) 与 45°C 下预热的 1% 琼脂糖的蒸馏水 - 完全的 DMEM(1:4, v/v) 的溶液混合。然后将混合物的 2-L 等分试样置于直径为 6-cm 皿中的 1% 琼脂糖预制层上面。在 37°C 将细胞孵育 14 天，并在加入 2.6% 戊二醛 (gluteraldehyde) 的 CMF-PBS 固定后，使用反相显微镜测定形成群体的数目。

也可以进行利用可溶的重组半乳凝素-3 和抗-Mac-2 单克隆抗体的竞争性结合试验，以比较它们(或缺少它们的)对细胞粘附至层粘连蛋白的影响，因此提供部分洞察可溶的分支多糖联合抗癌药在这点上是如何能起作用的。

半乳凝素-3 异型的聚集转移试验

MAT-LyLu (MLL) 亚系为快速生长的不良分化的腺癌细胞系。研究了在可溶的分支多糖存在或缺失下铬标记的 MLL 细胞对大鼠主动脉内皮(RAE)细胞的汇合单层的粘附。首先，将 MLL 和 RAE 细胞生长于用 10% 胎牛血清补充的 RPMI 1640 培养基中。使 RAE 细胞在组织培养孔中生长到汇合。在 37°C 下将总计 2.4×10^6 MLL 细胞与 5 $\text{CiNa}_5\text{CrO}_4$ 在 2 mL 含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)的无血清培养基中孵育 30 分钟。广泛地洗涤后，将每孔 1×10^3 MLL 细胞一式四份加至 RAE 细胞单层。

在 4°C 下在缺失或存在独立改变浓度的组合可溶的分支多糖和抗癌药下 MLL 细胞附着 90 分钟，然后将其评价如下。在冷磷酸盐缓冲盐水中将细胞洗 3 次，除去非结合的细胞，然后在 37°C 用 0.1 N NaOH 溶解 30 分钟，此时使用 β -射线计数器测定每个孔中的放射性。监测在缺失或存在独立改变浓度的可溶的分支多糖联合抗癌药下，MLL 细胞与 RAE 细胞的汇合单层附着的时间过程。

可选择地，在本试验的另一种变体中，通过荧光法监测 MLL 细胞对 RAE 细胞的粘附。首先，为了荧光标记细胞，将 1×10^5 MLL 在 0.1% FITC 中孵育 30 分钟。广泛地洗涤后，将细胞加至含 RAE 细胞单层

的 0.5% BSA 中。添加独立改变浓度的可溶的分支多糖和抗癌药的联合达 30 或 60 分钟。然后将培养物洗涤，除去非粘附细胞，并以荧光测量结果为基础评价粘附水平或非粘附。

为了处理可溶的分支多糖与半乳凝素-3 的结合，应用了酶联免疫吸附测定法。这确定了重组半乳凝素-3 是否能够以剂量依赖性方式结合被固定的可溶的分支多糖，以及结合（如果它发生）是否能够被乳糖阻断。如此测定法的结果可用于评价根据本发明的联合抗癌药共同给予的可溶的分支多糖对同型聚集的抑制效果。

为了测定与抗癌药联合的可溶分支多糖对在 0.5% 琼脂糖上的 MLL 集落生成的效果，首先用含 0.02% EDTA 的无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 (CMF)-PBS 将 MLL 细胞从培养单层中分离，并以 4×10^3 细胞/mL 将其混悬于完全的 RPMI 中-含或不含不同浓度的可溶的分支多糖。在 37°C 将细胞孵育 30 分钟，然后以 1:1(v/v) 与预热至 45°C 的含 1% 琼脂糖的 RPMI 1:4(v/v) 的溶液混合。其次，将该混合物的 2-mL 等分试样置于直径为 6-cm 的皿中的 1% 琼脂糖预制层上面。在 37°C 将细胞孵育 8 天，固定，计数并照相。相差显微照片被制得，用来展现在有或没有 0.1% (w/v) 可溶的分支多糖与抗癌药的组合下 MLL 细胞生长。

在体外可以进行类似的实验，以研究可溶的分支多糖联合抗癌药对培养单层中 MLL 细胞生长速率的影响，并且结果可以与体内实验获得的结果进行比较。以这种方式，也可以得到关于可溶的分支多糖/抗癌药共同治疗是否导致细胞毒性的信息。也可以研究在软琼脂中在可溶的分支多糖和抗癌药存在下，其他的肿瘤细胞形成集落的能力，其他的肿瘤细胞包括 B16-F 黑素瘤，UV-2237 纤维肉瘤，HT 1080 人纤维肉瘤和 A375 人黑素瘤。实验可以用类似于上面关于 MLL 细胞所述的方法实现。

实施例 6: 体内试验-多糖同抗癌药或进一步联合抗血管生成药

前列腺癌的 Dunning(R3327)大鼠前列腺腺癌模型是 Dunning 从在雄性大鼠中发现的自发存在的腺癌发展的(Dunning, W., Natl. Cancer

Inst. Mono., (1963), vol. 12, pp.351-369, 在此引入其全部教导作为参考)。由原发肿瘤发展了几个亚系, 其具有不同的分化和转移性质 (Isaacs, J.等, Cancer Res., (1978), vol.38, pp.4353-4359, 在此引入其全部教导作为参考)。将 1×10^6 MLL 细胞注入大鼠大腿内, 导致动物在约 25 天内续发于压倒性的原发肿瘤负担而死亡 (Isaacs, J.等, The Prostate, (1986), vol.9, pp.261-281; 和 Pienta, K., 等, The Prostate, (1992), vol.20, pp.233-241, 在此引入其全部教导作为参考)。在肿瘤细胞接种后约 12 天原发的 MLL 肿瘤开始转移; 在这个时间之前通过切肢除去原发性肿瘤导致动物治愈。如果在 12 天后进行切除术, 大多数的动物在 40 天内死于肺和淋巴结转移瘤 (Isaacs, J.等, The Prostate, (1986), vol.9, pp.261-281, 在此引入其全部教导作为参考)。

为了研究对这些肿瘤的自发转移瘤的影响, 在长期的基础上, 在饮用水中口服给予大鼠可溶的分支多糖, 联合已知的抗癌药。在第 0 天首先将 1×10^6 MLL 细胞射入大鼠后肢。在第 4 天, 当原发性肿瘤达到大约 1 cm^3 大小时, 在连续的基础上将 0.01%, 0.1%, 或 1.0% (w:v) 可溶的分支多糖和抗癌药加至大鼠的饮用水中。在第 14 天, 将大鼠麻醉并通过切除后肢除去原发性肿瘤。然后跟踪观察大鼠至第 30 天, 此时处死所有组的大鼠并解剖分析。监测对照和治疗动物的可观察的毒性。

在第 30 天, 将肺取出, 用水清洗并在布安氏液中固定过夜。比较患肺转移瘤的大鼠数目与对照组中患肺转移瘤的大鼠数目并记录。通过在解剖显微镜下计数测定 MLL 肿瘤群体的数目。也监测了可溶的分支多糖/抗癌药共同治疗的效果, 其为饮用水中浓度的函数。

整个研究中, 监测治疗动物的明显毒性和体重增加, 并将结果与没接受多糖的对照组比较。对照和治疗组的每日摄水均保持在 30 ± 4 ml/大鼠。也监测并记录了整个治疗期中治疗动物和对照动物的毛发质地、总体行为和粪便颜色。

对照和治疗动物适当地增加了体重, 并与单用抗癌药对照治疗相比, 可溶的分支多糖/抗癌药治疗动物中没有发现可观察的另外毒性。

当与单用抗癌药、单用多糖、单独的单糖残基、或无多糖或无抗癌药的治疗的动物相比时，喂以如上所述的可溶的分支多糖联合抗癌药的动物减少了患肺转移瘤的大鼠数目。关于淋巴结疾病，可以观察相似类型的效果。

在类似的实验中，在其饮用水中口服给予大鼠抗癌药、抗血管生成药和可溶的分支多糖的联合剂。除了需要另外的对照(例如可溶的分支多糖和抗癌药；可溶的分支多糖和抗血管生成药；在可溶的分支多糖缺失下抗癌药和抗血管生成药；单独抗癌药；单独抗血管生成药；和单独的可溶分支多糖)之外，实验方案和操作与上面关于只有抗癌药和多糖的给药所述的类似。

对照和共同治疗的动物适当地增加了体重，并且与单用抗癌药或单用抗血管生成药的对照治疗相比，可溶的分支多糖/抗癌药/抗血管生成药治疗动物中没有发现可观察的另外毒性。当与单用已知抗癌药、单用抗血管生成药、单用多糖、单独的单糖残基或无多糖、或什么也没有的治疗的动物相比时，在喂以可溶的分支多糖联合已知抗癌药和抗血管生成药的动物中减少了患肺转移瘤和显示血管生成迹象的大鼠数目。关于淋巴结疾病，可以观察相似类型的效果。

设计本实例治疗以显示治疗动物的改良方法，其使用无毒的口服给药的分支多糖联合公认的抗癌药，或联合抗癌药和公认的抗血管生成药，用于预防自发的癌症转移和相关的血管生成。

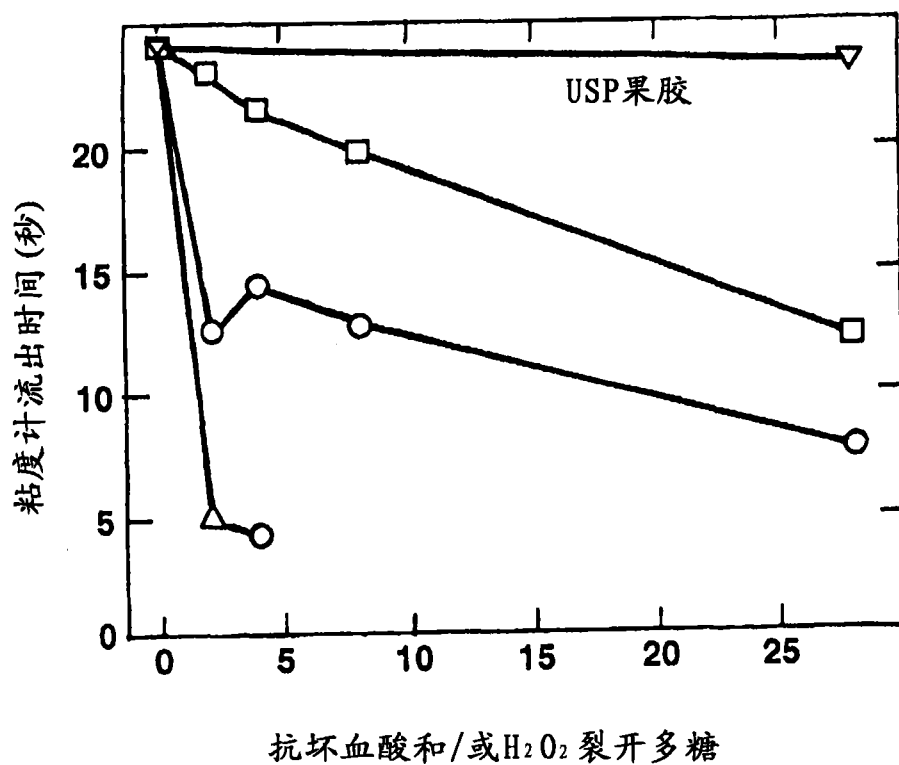
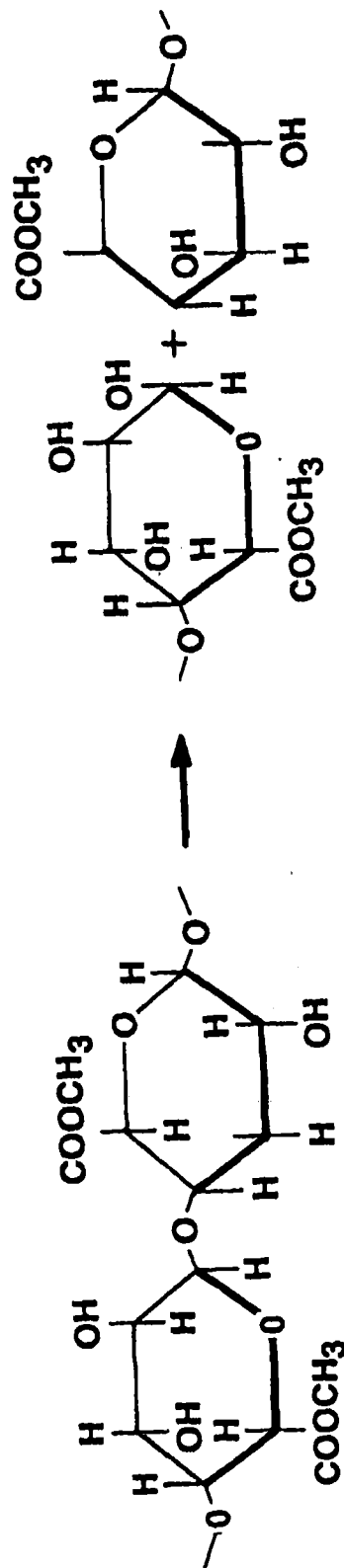


图1



β -消除

图2

样品ID: 标准品B3a (灵敏度: 170 mv FS)

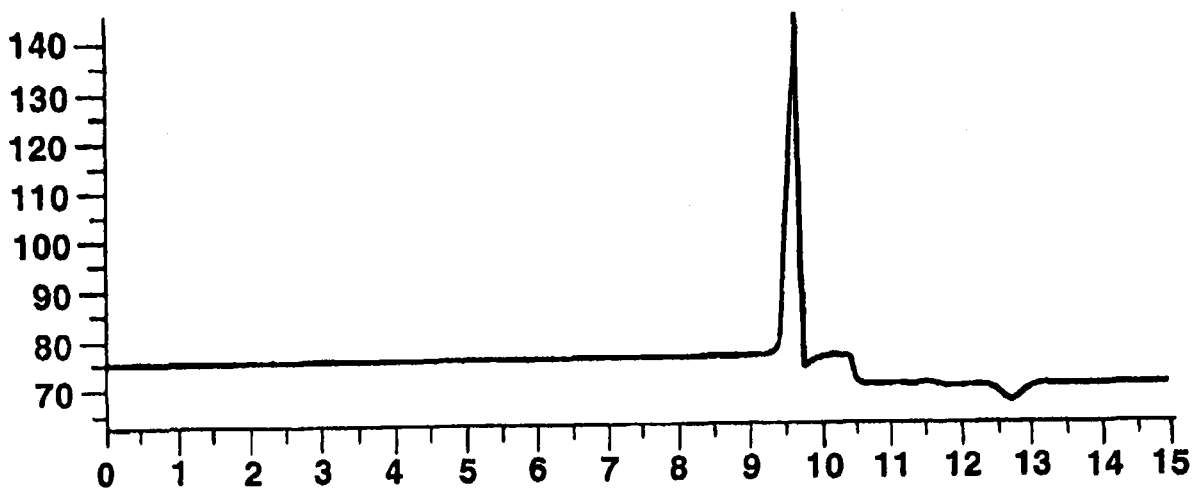


图 3a

样品ID: 空白A (灵敏度: 150 mv FS)

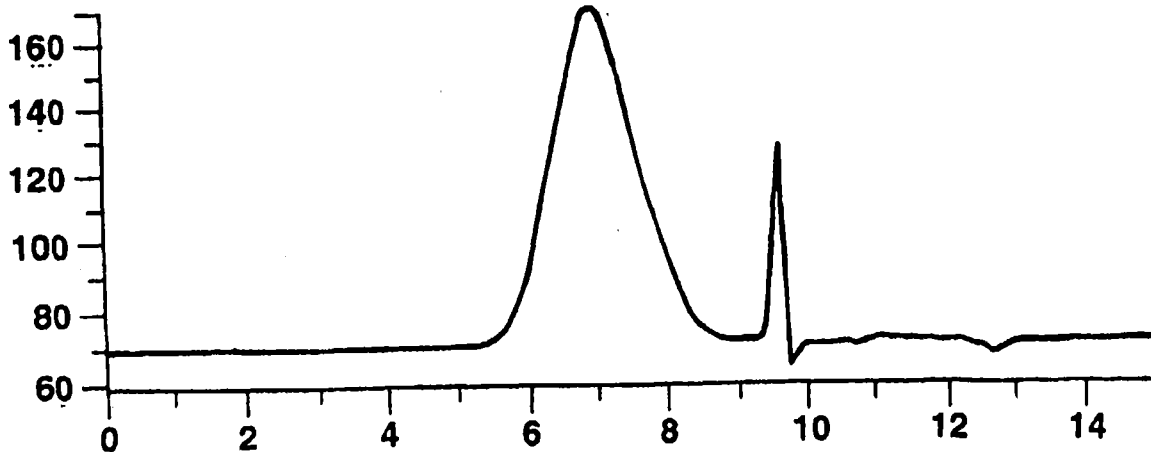


图 3b

样品ID#	dn/dc 值	使用的点	分子量 (K)
2933-001-00003	0.127	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 和 0.75	244
	0.127	0.2, 0.3, 0.4, 0.5 和 0.75	238
	0.134	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 和 0.75	220
	0.134	0.2, 0.3, 0.4, 0.5 和 0.75	213

图 4

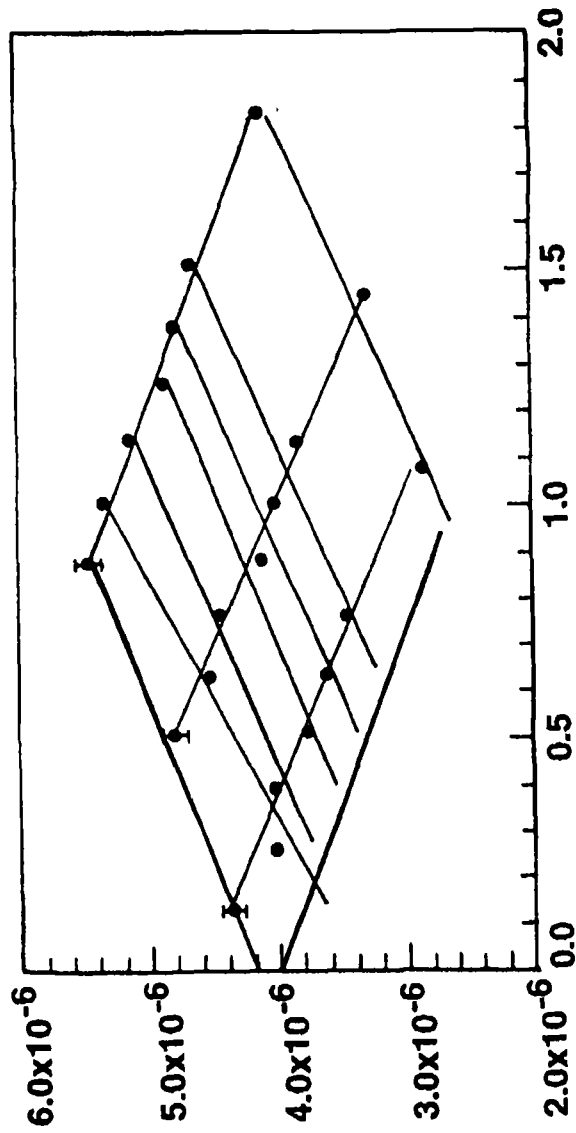


图5