

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01812717.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100569228C

[22] 申请日 2001.7.13 [21] 申请号 01812717.7

[30] 优先权

[32] 2000.7.13 [33] NO [31] 20003591

[86] 国际申请 PCT/NO2001/000301 2001.7.13

[87] 国际公布 WO2002/003983 英 2002.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.13

[73] 专利权人 蒂亚梅迪卡有限公司

地址 挪威卑尔根

[72] 发明人 R·伯奇

[56] 参考文献

US6046237A 2000.4.4

审查员 李凤云

[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 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 5 页

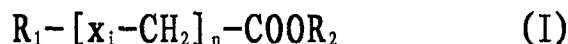
[54] 发明名称

用于治疗癌症的脂肪酸类似物

[57] 摘要

本发明涉及通式(I)脂肪酸类似物或者其盐、前药或络合物在制备用于预防和/或抑制原发性和继发性转移性肿瘤的药物组合物中的用途： $R_1 - [X_i - CH_2]_n - COOR_2$ ，其中 R_1 为：具有一个或多个双键和/或具有一个或多个三键的 $C_1 - C_{24}$ 链烯基，和/或 $C_1 - C_{24}$ 炔基，和/或 $C_1 - C_{24}$ 烷基，或者是被一种或多个选自下列基团在一个或几个位置取代的烷基，所述取代基包括氟、氯、羟基、 $C_1 - C_4$ 烷氧基、 $C_1 - C_4$ 烷基硫、 $C_2 - C_5$ 酰氧基或 $C_1 - C_4$ 烷基，并且其中 R_2 代表氢或 $C_1 - C_4$ 烷基，并且其中 n 为 1 - 12 的整数，并且其中 i 为奇数，其表示相对于 $COOR_2$ 的位置，并且其中 X_i 彼此独立地选自 O、S、SO、 SO_2 、Se 和 CH_2 ，并且条件是至少一个 X_i 不是 CH_2 。

1. 通式(I)脂肪酸类似物或者其盐在制备用于预防和/或抑制神经胶质瘤的药物组合物中的用途:



- 其中 R_1 为:

- 具有一个或多个双键和/或具有一个或多个三键的 C_1-C_{24} 链烯基, 和/或

- C_1-C_{24} 炔基, 和

- 其中 R_2 代表氢, 和

- 其中 n 为 1, 和

- 其中 i 为奇数, 其表示相对于 $COOR_2$ 的位置, 和

- 其中 X_i 彼此独立地选自 O、S、SO、SO₂、Se 和 CH₂, 和

- 条件是至少一个 X_i 不是 CH₂。

2. 如权利要求 1 的用途, 其中化合物为十四烷基硫代乙酸。

3. 如权利要求 1 的用途, 其中化合物为十四烷基硒代乙酸。

4. 如权利要求 1 的用途, 用于抑制神经胶质瘤的生长。

5. 如权利要求 1 的用途, 用于抑制原发性神经胶质瘤侵袭至结缔组织中。

6. 如权利要求 1 的用途, 用于抑制神经胶质瘤的转移性。

用于治疗癌症的脂肪酸类似物

本发明涉及用于治疗 and/或预防癌症的脂肪酸类似物。具体地说, 本发明涉及脂肪酸类似物在治疗和/或抑制原发性和继发性肿瘤中的用途。

发明背景

用本发明改性脂肪酸进行治疗代表了治疗这类疾病的一种新途径。

EP345038 描述了非- β -可氧化的脂肪酸类似物在治疗高脂血症和在降低哺乳动物血液中胆固醇和甘油三酯浓度的用途。

PCT/N095/00195 描述了烷基-S-CH₂COOR 和烷基-SeCH₂COOR, 它们可用于抑制 LDL 氧化改变, 并可用于减少癌症细胞的增殖。然而, 这种增殖性作用是细胞特异性的, 我们发现本发明化合物在其他细胞体系中对细胞的生长或增殖没有影响。

PCT/N099/00135、00136 和 00149 描述了脂肪酸类似物在治疗肥胖症、糖尿病和狭窄中的用途。

业已发现, 上述现有技术所公开的类似物, 即本发明的非- β -可氧化的脂肪酸具有更为广泛的用途。研究表明, 本发明化合物能抑制肿瘤的生长和转移性状态, 并可提高植入(implanted)肿瘤动物的总存活率。

癌症

在开发更有效的用于癌症治疗的新化学治疗剂的过程中, 需要考虑诸多因素, 例如细胞毒性、肿瘤细胞增殖、侵袭和转移。典型地, 常规抗癌剂可单独由它们的细胞毒性而得到确认。

当在肿瘤细胞群丛中出现具有选择性生长特性的变异细胞时, 便

认为有肿瘤发生，肿瘤发展的一个最终阶段是出现转移性表现型。在转移期间，肿瘤细胞会侵入血管，对抗循环的宿主的免疫防御而生存，然后溢出，并植入和生长于远离原发性肿瘤的部位。肿瘤细胞侵入附近组织并定居其他器官的能力是导致癌症相关死亡的主要原因。

术语“转移”包括可导致临床问题的许多显型性状，这些临床问题常常会使患者因癌症死亡。细胞会因失去粘着性和在构成的组织中的受限位置而进入邻近的部位，逐步形成侵入和溢出血管的能力，并会在非正常区域或环境中增殖。这种生长模式的变化伴有生化改变的积聚，其能促进转移性的进程。

迄今为止，对涉及转移性级联的内在机理知之甚少。在某些情况下，某些肿瘤细胞转移的可能性增大可能是由于对癌基因表达的增加，这些癌基因在正常时负责控制细胞的各种功能，包括分化、增殖、细胞运动和信息传递。另外，研究表明那些能调制信号转导途径的物质可抑制肿瘤的转移行为，同时还推测具有表面相关效应的化合物例如调节细胞膜的化合物可能与引起转移的进程有关。

癌症是组织不适当积聚而导致的疾病。当肿瘤组织的体积危害重要器官的功能时，临床上通常会出现这种紊乱。与人们通常认知相反的是，人的恶性病症通常并不是由细胞迅速增殖所导致的疾病。事实上，大多数普通癌症细胞的增殖比任何正常组织中的细胞还要缓慢。研究证实，重要器官中肿瘤组织相对缓慢的积聚对大多数死于癌症患者而言是致命的。

化学治疗剂均具有一个特征：相对与正常细胞而言，它们通常可更有效地杀死或损害恶性细胞。然而，从其损害正常细胞这一点来说，它们具有潜在的毒性。

目前，几乎所有用途的化学治疗剂均可干扰 DNA 合成，干扰 DNA 和 RNA 合成前体的供给，或干扰有丝分裂。此类药物可最有效地对抗循环细胞。经任何单一药物或几种药物联用治疗后的细胞死亡的机理是复杂的，并可能包括不止一个途径。由于大多数临床上可检测出的肿瘤主要由非循环细胞组成，因此化疗并不是总能很有效地根除癌症。

癌症治疗策略是将肿瘤细胞由非循环隔室(compartment)转移至循环隔室。几种能促进这种转移的方法构成组合模式治疗的基础。手术是用来减小肿瘤大小的最常见手段,这有利于使癌症细胞再进入细胞循环中。待完全除去原发性肿瘤后,在远端部位仍残有显微镜可见的转移。由于它们体积很小,微转移主要由循环细胞组成。仍残留在原发性肿瘤部位的少数细胞也可能再进入细胞循环。这样,剩余的癌症细胞通常对化疗敏感。单用放射疗法或化疗也可减小肿瘤体积,这样可使细胞复原(recruit)到循环细胞隔室。

因此,组合药物疗法是大多数目前所用化疗的基础。组合化疗利用了多种药物的不同作用机理和细胞毒性。

然而,尽管化学治疗剂可更有效地杀死或损害恶性细胞(相对于正常细胞),但是其对正常细胞也有损害的事实表明它们具有潜在的毒性。因此,为了使化疗更优效,患者必需具备优良的生理状态。

癌症治疗需要抑制许多因素,这包括肿瘤细胞增殖、癌症细胞向身体其他部位的转移性播散、侵袭、肿瘤导致的新血管形成,并需要增强宿主免疫应答和细胞毒性。通常,可根据其对肿瘤细胞的细胞毒性来选择常规的癌症化疗剂。然而,一些抗癌剂对患者的免疫系统有不利效应。不幸的是,对于绝大多数常规抗肿瘤剂来说,其有效剂量与毒性剂量的差值(即治疗指数)非常低。这样,如果能开发出这样的癌症疗法或治疗将是有利的:它对可导致侵袭性癌症的生长、发展和转移的因素能提供非细胞毒性保护作用。

本发明涉及预防和/或治疗原发性和转移性肿瘤的方法,其中包括用本发明脂肪酸类似物治疗患有癌症的患者。

癌症的两个本质特征是侵袭性和转移性。一个极端是对基膜的微侵袭标志着瘤转化成为癌症,而一个极端是转移通常会导致死亡。

原发性肿瘤在一定进程时会侵袭到底层结缔组织,肿瘤细胞产生的各种介体会促进这种侵袭。未侵入基膜的肿瘤细胞以及被限制在上皮组织中的肿瘤细胞被称为原位癌。

另一方面,当附着有淋巴细胞和血小板的循环肿瘤细胞被毛细血

管捕获并且肿瘤细胞膜与毛细内皮相互作用时,可能形成转移。毛细内皮接点缩回,并且肿瘤细胞配体与内皮和基膜上的受体结合。然后,肿瘤细胞释放出胶原酶 IV,它能破坏胶原 IV,一种底层基膜的主要成分。通过与糖蛋白层粘连蛋白和纤维结合素结合,通过释放破坏基质的蛋白酶并分泌能动和趋化因子,有助于侵袭亚毛细管(subcapillary)结缔组织。然后,肿瘤细胞会增殖并合成血小板凝集因子,例如血栓素和前凝血质,这会在细胞周围沉积纤维蛋白卵袋(cocoon)。这种卵袋可保护微转移免受宿主免疫系统的攻击。

本发明组合物和方法可预防和/或治疗癌症包括但不限于:人肉瘤和癌,例如癌,例如结肠癌,胰腺癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,纤维肉瘤,粘液肉瘤,脂肉瘤,软骨肉瘤,骨源性肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,淋巴管内皮肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,Ewing 氏肿瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝细胞瘤,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎性癌,Wilm 氏肿瘤,子宫颈癌,睾丸肿瘤,肺癌,小细胞肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜细胞瘤,松果体瘤,成血管细胞瘤,听神经瘤,少突神经胶质瘤,脑膜瘤,黑素瘤,成神经细胞瘤,成视网膜细胞瘤;白血病,例如急性淋巴细胞白血病和急性髓母细胞瘤(原粒细胞、早幼粒细胞、myelomonocytic、单核细胞和红白血病);慢性白血病(慢性中幼粒细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病);和真性红细胞增多症,淋巴瘤(Hodgkin 氏病和非 Hodgkin 氏疾病),多发性骨髓瘤,巨球蛋白血症和重链病。这类癌症的特定示例见下面部分的描述。

我们发现,本发明化合物能减小各种球状体(spheroid)的平均直径,并降低 BT4Cn 肿瘤的肿瘤体积。另外,植入肿瘤的大鼠经 TTA 治疗后基本上提高了其总存活率。

因此,可证实本发明脂肪酸类似物对肿瘤的生长、侵袭和转移具有显著的效力。

在本发明化合物中,对十四烷基硫代乙酸(TTA)进行了最为详尽的研究,并发现其在各种体外和体内试验体系中表现出有益的效应。

发明详述

本发明公开了能以非细胞毒性浓度治疗和/或预防癌症的改性脂肪酸类似物。

本发明涉及通式(I)脂肪酸类似物或者其盐、前药或络合物在制备用于预防和/或抑制原发性和继发性转移性肿瘤的药物组合物中的用途:



- 其中 R_1 为:

- 具有一个或多个双键和/或具有一个或多个三键的 C_1-C_{24} 链烯基, 和/或

- C_1-C_{24} 炔基, 和/或

- C_1-C_{24} 烷基, 或者是被一种或多个选自下列的取代基在一个或几个位置取代的烷基, 所述取代基包括氟、氯、羟基、 C_1-C_4 烷氧基、 C_1-C_4 烷基硫、 C_2-C_5 酰氧基或 C_1-C_4 烷基, 和

- 其中 R_2 代表氢或 C_1-C_4 烷基, 和

- 其中 n 为 1-12 的整数, 和

- 其中 i 为奇数, 其表示相对于 $COOR_2$ 的位置, 和

- 其中 X_i 彼此独立地选自 O、S、SO、SO₂、Se 和 CH₂, 和

- 条件是至少一个 X_i 不是 CH₂。

本发明优选的实施方案涉及化合物十四烷基硫代乙酸(TTA)和十四烷基硒代乙酸(TSA)。

具体地说, 本发明涉及上述化合物在抑制肿瘤生长、侵袭性和转移性中的用途。

本发明另一方面涉及预防和/或抑制原发性和继发性转移性肿瘤的方法, 所述方法包括将有效量的通式(I)脂肪酸类似物或者其盐、前

药或络合物给予有此需要的哺乳动物的步骤:



- 其中 R_1 为:

- 具有一个或多个双键和/或具有一个或多个三键的 C_1-C_{24} 链烯基, 和/或

- C_1-C_{24} 炔基, 和/或

- C_1-C_{24} 烷基, 或者是被一种或多个选自下列的取代基在一个或几个位置取代的烷基, 所述取代基包括氟、氯、羟基、 C_1-C_4 烷氧基、 C_1-C_4 烷基硫、 C_2-C_5 酰氧基或 C_1-C_4 烷基, 和

- 其中 R_2 代表氢或 C_1-C_4 烷基, 和

- 其中 n 为 1-12 的整数, 和

- 其中 i 为奇数, 其表示相对于 $COOR_2$ 的位置, 和

- 其中 X_i 彼此独立地选自 O、S、SO、SO₂、Se 和 CH₂, 和

- 条件是至少一个 X_i 不是 CH₂。

所述治疗包括将治疗有效浓度的药物给予对该治疗有需要的哺乳动物, 所给予的脂肪酸类似物在施用期间在哺乳动物血液中基本上持续地保持其治疗有效浓度。

附图简述

附图 1 表示 TTA 对的 D-54Mg 球状体的球体直径的影响。

附图 2 表示 TTA 对 GaMg 球状体的球体直径的影响。

附图 3 表示各种浓度的 TTA 对 D-54Mg 球状体的球体直径的影响。

附图 4 表示 TTA 对皮下植入的 BT4Cn 肿瘤生长的影响。

附图 5 表示 TTA 对颅内植入 BT4Cn 肿瘤的大鼠存活的影响。

施用本发明化合物

可采用适宜的技术(包括经非肠道、鼻内、口服或经皮肤吸收), 将本发明化合物以药用药物形式直接给予哺乳动物。可经局部或全身给药。例如, 具体的给药途径可取决于动物的病史。

示例性非肠道给药包括: 经皮下、肌内、静脉内、动脉内和腹膜

内给药。

如上所述，需根据治疗上的多种考虑来确定适宜的给药剂量。通常，每一经非肠道施用的剂量中每种化合物的总药用有效量优选约为 5-1000 mg/kg/天(患者体重)。对于 TTA, 其剂量优选为 100-500 mg/kg/天，而对于 TSA, 其剂量优选为 10-100 mg/kg/天。

连续给药时，本发明化合物可典型地每天注射 1-4 次，或经皮下连续输注，例如用微型泵。也可采用静脉内用袋装溶液。

在一个经非肠道给药的实施方案中，可将具有所需纯度的本发明化合物与可药用载体混合，配制成单位剂量的注射形式(溶液、混悬液，或乳剂)，所述载体在其所用的剂量和浓度时应对接受者无毒性，并应与制剂中的其他成分相容。

通常，将本发明化合物与液体载体和/或细粉状固体载体均匀且紧密地接触，可制得所述制剂。然后，如有必要，可将产品制成所需形状的制剂。载体优选为非肠道载体，更优选与接受者血液等渗的溶液。示例性载体赋形剂包括水、盐水、林格溶液和右旋糖溶液。也可采用非水性赋形剂，例如固定油和油酸乙酯以及脂质体。

载体中可适当地含有少量添加剂，例如可提高等渗性和化学稳定性的材料。这类材料在其所用的剂量和浓度时应对接受者无毒性，其中包括：缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、醋酸和其他有机酸及其盐；抗氧化剂例如抗坏血酸；免疫球蛋白；亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸；单糖，二糖，并其他糖类包括纤维素及其衍生物，葡萄糖，甘露糖或糊精；螯合剂例如 EDTA；糖醇例如甘露醇或山梨醇；抗衡离子(counterions)例如钠；和/或非-离子型表面活性剂例如多乙氧基醚、泊洛沙姆或 PEG。

对于口服药用组合物，可采用以下载体物质：例如水、明胶、树脂、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、滑石、油类、聚烯烃二醇(polyalkene glycol)、矿脂等。所述药用制剂可为单位剂型，其中还可含有有治疗价值的其他物质或常规药用辅料，例如防腐剂、稳定剂、乳化剂、

缓冲剂等。药物制剂可为常规的固体形式例如片剂、胶囊剂、糖衣丸、安瓿等，常规的剂型例如干粉针剂(dry ampoule)以及栓剂等。

另外，本发明化合物可适当地与其他疗法组合，用于对抗或预防癌症。

参考以下实施例，将更加充分地理解本发明。然而，这些实施例对本发明的范围并无限制。

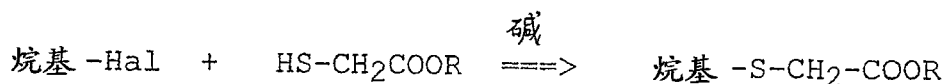
实验部分

实施例 1. 化合物的制备和表征

合成 3-取代的脂肪酸类似物

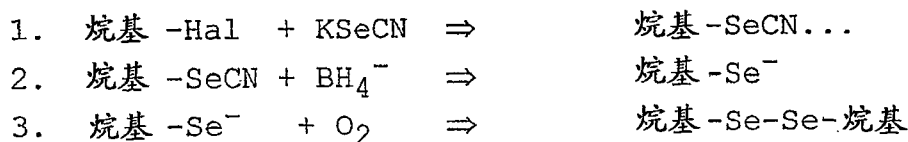
按以下基本方法，制备本发明所用的化合物，其中取代基 $X_{i=3}$ 为硫原子或硒原子：

X 为硫原子：按以下基本方法，制备本发明所用的硫取代化合物：

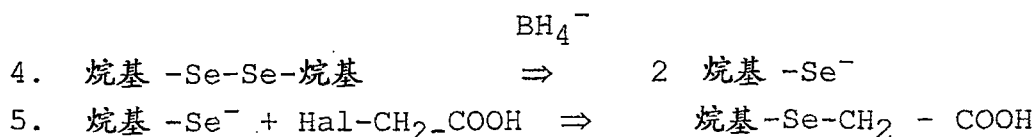


硫-化合物，即十四烷基硫代乙酸(TTA)， $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH})$ ，按 EP-345038 方法制备。

X 为硒原子：按以下基本方法，制备本发明所用的硒取代化合物：



小心地从乙醇或甲醇中结晶，对该化合物进行纯化。



最终的化合物，例如当烷基是十四烷基时， $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}\text{-Se-CH}_2\text{-COOH}$ (十四烷基硒代乙酸 (TSA)) 可通过从乙醚和己烷中结晶而纯化。

可按专利申请 PCT/N099/00135 和 N020001123 中的方法合成本发明的其他化合物。

实施例 2

TTA 的毒性研究

按英国 Corning Hazleton (欧洲) 执行的 GLP 规范，对狗进行了为期 28 天的毒性研究。通常，经口服给予高达 500 mg/kg/天剂量的 TTA 是可以耐受的。施用高剂量的动物中的一些与脂类相关参数降低。这与 TTA 的药理学活性相符。50 或 500 mg/天/kg 剂量水平未发现毒性迹象。

Covance Laboratories 有限公司 (英国) 已进行的致突变活性实验表明，TTA 和 TSA 在鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌菌株中未引起突变。另外，TTA 在对小鼠淋巴瘤细胞和 L5178Y 的实验中未发现致突变活性。

实验中，受试化合物在鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌中的浓度 3-1000 mg/平板 (TTA)、2-5000 mg/平板 (TSA)。在小鼠淋巴瘤细胞和 L5178Y 的浓度为 2.5-50 mg/ml。

在这些实验中，均未发现 TSA 和 TSA 有致突变活性。

在培养的中国仓鼠卵巢细胞中，对 TSA 和 TTA 进行了染色体畸变实验，结果表明在实验剂量水平 (12-140 mg/ml) 未导致畸变。

因此，本发明化合物潜在地可用作药物化合物。

实施例 3

TTA 对球状体生长的影响

将 3×10^6 细胞接种到涂有 10 ml (KB/KJT=20 ml) 0.75%-琼脂 DMEM 溶液 (KB/KJT=3%) 的 80cm^2 组织培养烧瓶底部, 获得多细胞的肿瘤球状体。保温 7 天后, 在立体显微镜下用巴斯德吸管挑选出直径为 100-300 μm 的球状体。用其目镜中配有校准十字线的倒置显微镜测定球状体的大小。

为了比较不同脂肪酸类似物对肿瘤球状体生长的影响, 将 D-54Mg 和 GaMg 球状体分别移至涂有 0.5 ml 0.75% DMEM-琼脂的 16 mm 24 孔碟中。D-54Mg 和 GaMg 为人细胞系。D-54Mg 细胞系源于混合性恶性 (anaplastic) 神经胶质瘤, 由 Dr. Darell D. Bigner (Duke 大学, Durham, 北卡罗来纳州) 惠赠。GaMg 细胞系由我们实验室培植 (establish), 并有许多详细的描述 (Bjerkvik 等, *Anticancer research* 1998: 8 卷, 797-803 页)。将球状体分成 5 组, 每组 4 个球状体。其中有 4 组用不同脂肪酸类似物处理, 脂肪酸的终浓度为 100 或 250 μM 。第五组 (对照) 不进行任何处理。涂盖的悬浮液体积为 1.0 ml。每隔一天, 用其目镜中配有校准十字线的倒置相差显微镜测定两个正交直径, 以确定球状体的大小。实验进行 14 天。

实验结果如附图 1-3 所示。脂肪酸在 14 天中一直暴露于球状体中。未向对照组 (—▲—) 中补充脂肪酸。数值以平均 $\pm$ SD 表示。

附图 1 表示 250 μM TTA (—■—) 和 PA (—◆—) 对 D-54Mg 球状体平均球体直径 (μm) 的影响。

附图 2 表示 250 μM TTA (—■—) 和 PA (—◆—) 对 GaMg 球状体平均球面径 (μm) 的影响。

为了研究 TTA 对球状体生长的剂量依赖效果, 将两种细胞系的 24 个肿瘤球状体分成 6 组, 给予 0、50、100、150、200-250 μM 的 TTA。该实验在 SF-X 培养基 (来自 Costar 公司, Mass, 美国) 中进行, 结果见附图 3。

实施例 4

细胞迁移

通过测定已经附于塑料表面上的细胞从球状体中迁移的能力研究了脂肪酸类似物对细胞迁移的影响。将直径为 200-300 μ m 的 GaMg 和 D-54Mg 球状体分别移至 16 mm 24-孔碟中。然后向 1.5 ml DMEM 中加入各种浓度的不同脂肪酸类似物。培养 3 天后,样品用 4%甲醛固定于 PBS 中,并用 96%乙醇中的 2%结晶紫染色。然后,用 Kontron 形态测定系统(Kontron 公司,Eching,德国)测定生长晕(outgrowth)的大小。在该分析中,采用了加有血清的培养基(DMEM),这是由于胶质瘤细胞在 SF-X 培养基中与塑料表面的附着相对松散一些。浓度为 100 μ M 的 TTA 强劲地抑制了 GaMg 和 D-54MG 细胞的迁移能力(未给出数据)。

实施例 5

TTA 对皮下植入的 BT4Cn 肿瘤生长的影响

Mail Norwegian 褐家鼠, BD IX, 购自 Gades 研究所, Haukeland 医院, Bergen, 挪威。成对置于鼠笼饲养,并维持 12 小时的光-暗循环,温度为 20 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C。在实验期间,体重为 250-400 g。褐家鼠饲以商品标准的粒状食物,并随意供给自来水。试验组用 TTA 处理,而对照组用棕榈酸盐和/或羧甲基纤维素(CMC)处理。

口胃(oro-gastric)插管法给予 TTA。TTA 和 PA 悬浮于 0.5%(w/v)羧甲基纤维素钠中,最终贮备液浓度为 75 mg/ml。动物每天给药一次,剂量为 300 mg/kg 体重。

大鼠用 0.2 ml Hypnorm-咪唑唑仑/100g 体重麻醉,并经皮下在大鼠颈部注射 5×10^6 个肿瘤细胞(在 1ml NaCl 中),以向其体内植入肿瘤。3-4 周后,取出肿瘤并切成 2 $\times$ 2mm 的组织切片。组织切片供在腿部皮下(s.c.)肿瘤。大鼠用麻醉 0.2 ml Hypnorm-咪唑唑仑/100g 体重麻醉,切一皮肤切口,移入组织切片,并在皮肤切口下约 1 cm 处植入肿瘤。肿瘤生长 2 周。对大鼠的处理包括经口胃插管法或直接注入肿瘤。

测定肿瘤(腿部)的体积。

附图 4 表示 PA(—◆—)和 TTA(—■—)对皮下植入的 BT4Cn 肿瘤

生长的影响。

实施例 6

TTA 对颅内植入 BT4Cn 肿瘤的大鼠存活的影响

按实施例 5 的描述饲养和处理 Mail Norwegian 褐家鼠, BD IX。经灌胃插管法给予 TTA。

经定向移植术植入肿瘤。

大鼠用 0.4 ml Equithesin/100 g 体重麻醉。作一皮肤切口, 用 H_2O_2 除去血液, 并用牙钻环锯头颅骨 (skull)。

钻孔定位于冠状缝后的 3.3 mm 和矢状缝侧的 2.5 mm 处。

按上述方法(部分 5.3)收集细胞并进行计数, 然后用 DPBS 稀释成终浓度为 20,000 细胞/ μ l。取 2 μ l 细胞悬浮液, 用 Hamilton 注射器(配有锥尖 0.7 mm 针头)在 2.8 mm 深处注入。皮肤用钢环闭合, 然后将动物送回各自鼠笼。

附图 5 表示 PA 和 TTA 对颅内植入 BT4Cn 肿瘤的大鼠存活的影响。

图1

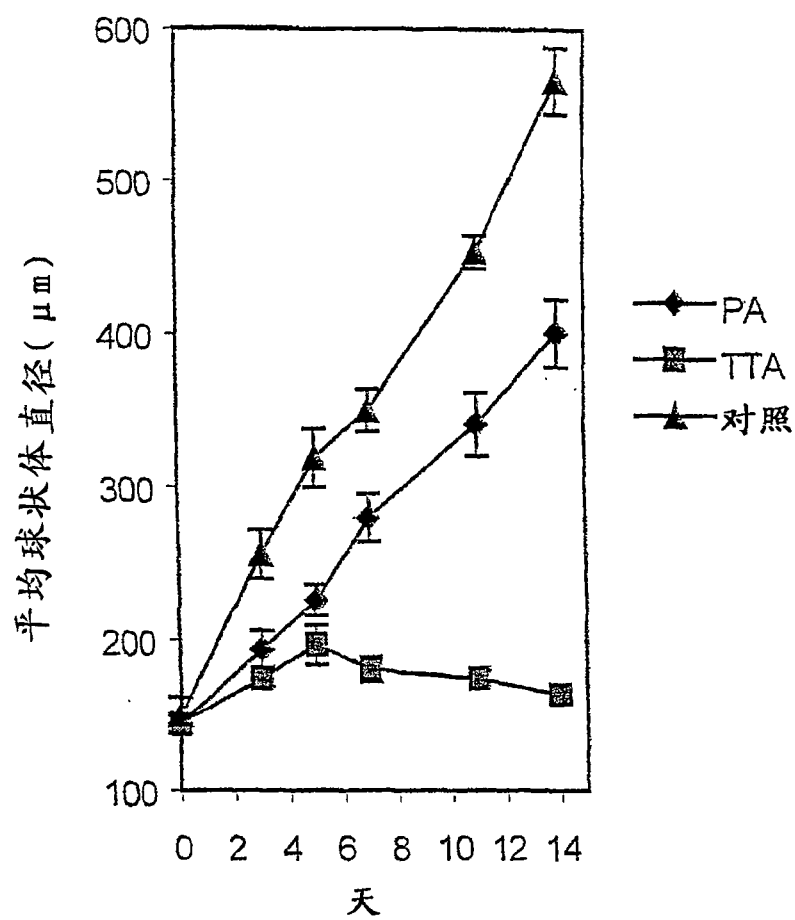


图 2

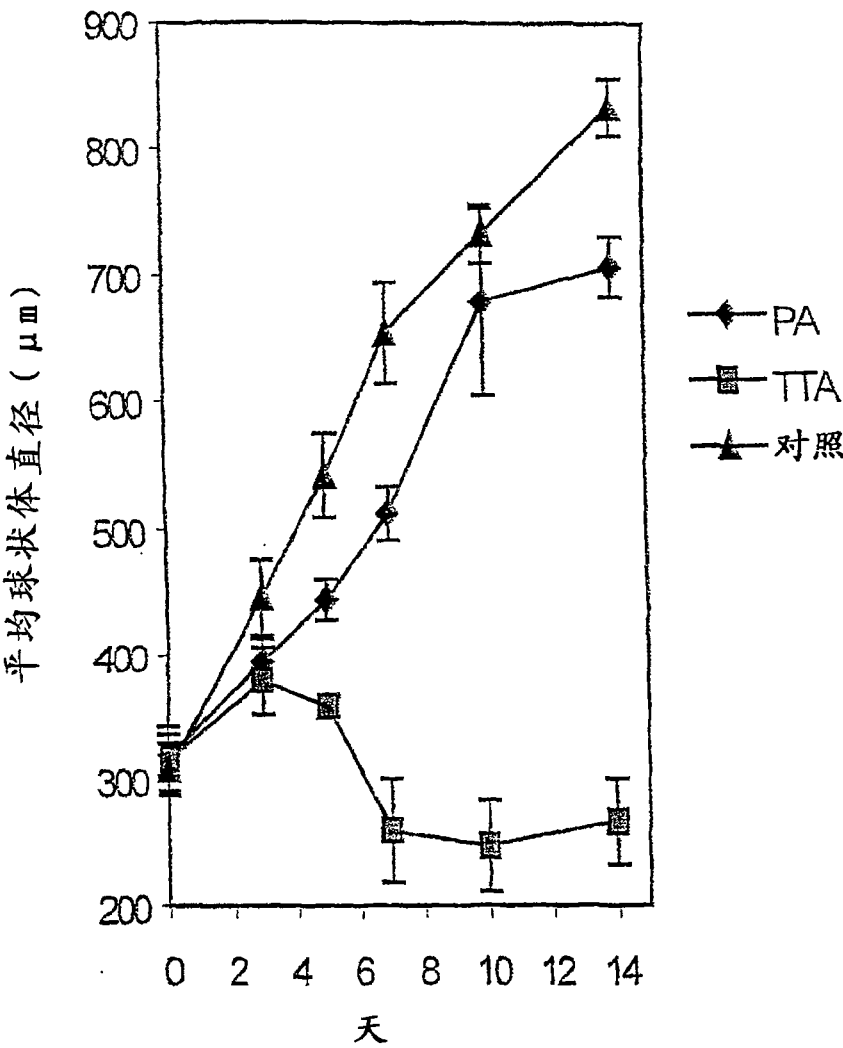


图 3

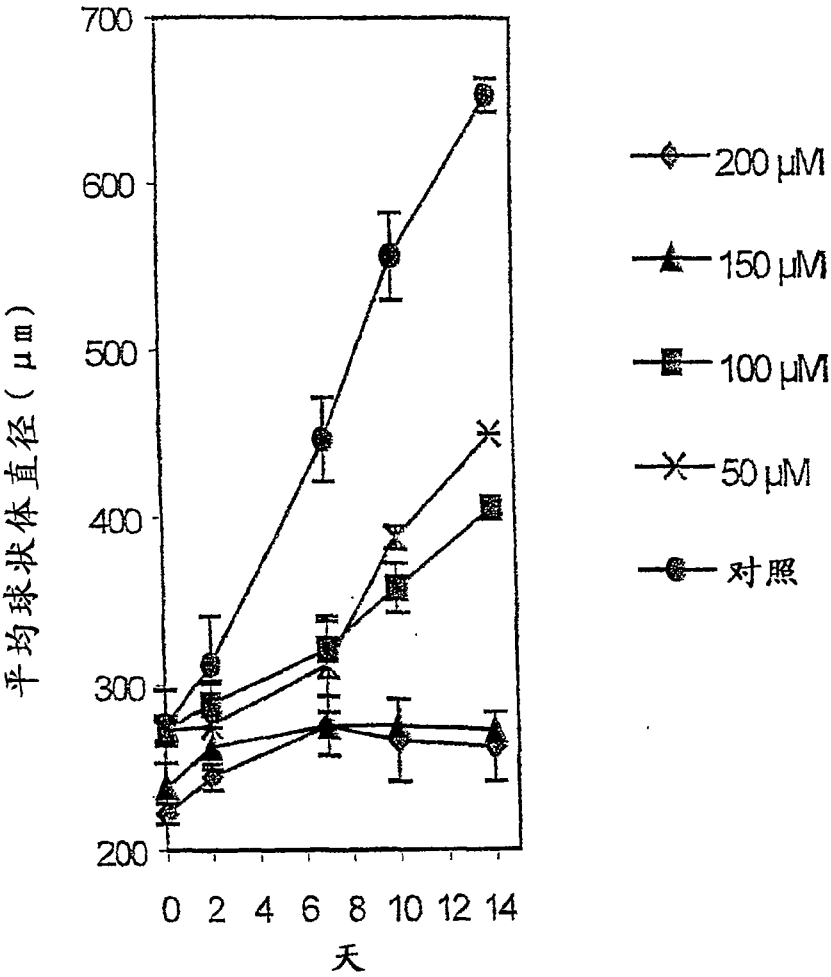


图 4

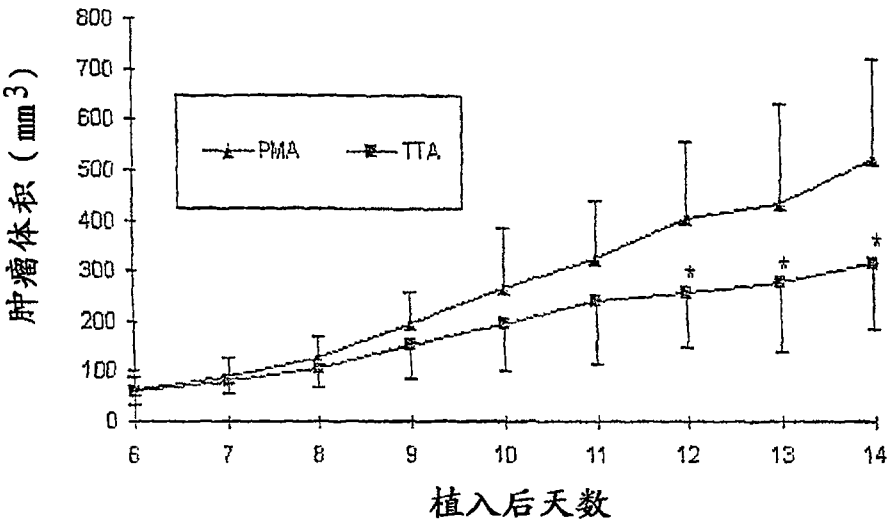


图 5

