

本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

日本 JP

1997/10/16 特願平9-283968

有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



## 五、發明說明 (1)

在技術領域

本發明是有關癌細胞內核酸酶活化劑。

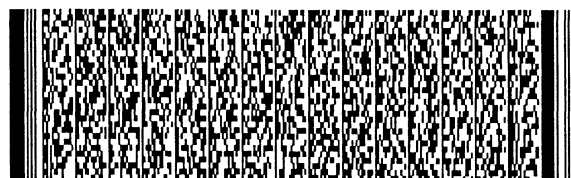
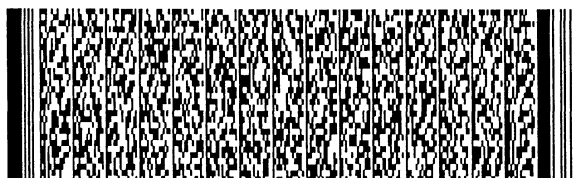
所謂"癌細胞內核酸酶活化劑"，如本說明書中所用者，表示可活化癌細胞內核酸酶之藥物，並因此可誘導細胞凋亡，而誘使癌細胞死亡。在此所用的密碼"I"代表肌苷酸，"C"代表"胞苷酸"，"A"代表"腺苷酸"，且U為"尿苷酸"。

所謂"誤配的poly(I) . poly(C)"及誤配的"poly(A) . poly(U)"，如熟悉該項技藝人士所熟知者，表示形成雙股之核酸鹼基中，含有部分未互補之poly(I) . poly(C)及poly(A) . poly(U)。

背景技藝

poly(I) . poly(C)是一段雙股RNA，其中含有聚肌苷酸及聚胞苷酸之聚核糖核苷酸共聚物，且已知為一種具強力干擾素誘導活性及免疫活化作用之醫學活性物質。由poly(I) . poly(C)具有加強免疫活化作用之事實可推測，物質經由免疫反應可間接抑制癌細胞生長，因此目前許多研究者正研究其被利用作為治療腫瘤藥物之可能性。然而，poly(I) . poly(C)調介免疫力之間接作用，並不至強到足以抑制癌細胞之生長，因此尚未實現以poly(I) . poly(C)來作為抗癌性治療。此外，目前也尚未發展出poly(I) . poly(C)對其他基於誘導干擾素之能力及免疫活化作用之適應症的治療療程。

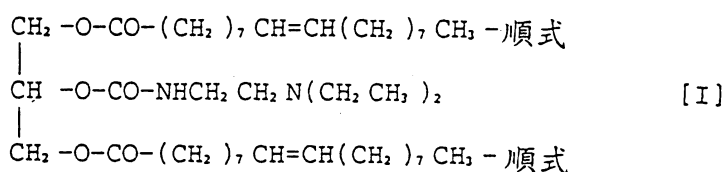
poly(A) . poly(U)，為聚腺苷酸及聚尿苷酸之聚核糖核苷酸共聚物，因此誤配的poly(I) . poly(C)，及誤配的



## 五、發明說明 (2)

poly(A) . poly(U) 雖有不同程度的變化，但仍視為具有相似的活性。

同時，為充作細胞內遞送藥物之有效載劑，已知之載劑有一般稱為陽離子脂質體之載體，如Lipofectin（註冊之商品名），以及以如式[I]之2-0-(2-二乙胺基乙基)胺甲醯基-1,3-0-二油醯基甘油之甘油衍生物及磷脂為必要組份之載劑，如PCT WO 91/17424, PCT WO 94/19314]

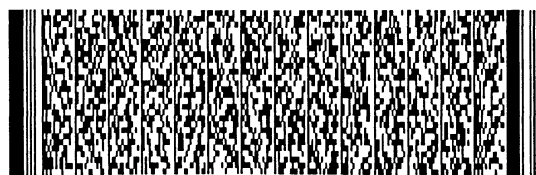


陽離子脂質體外觀呈小囊狀，具有脂質雙層結構且在水溶液中呈正電荷。由於陽離子脂質體在水溶液中呈正電荷，而雙股RNA（如poly(I) . poly(C)為例）在水溶液中呈負電荷，因此陽離子脂質體及poly(I) . poly(C)可很容易地形成複合物。

然而對於poly(I) . poly(C)等之雙股RNA本身，或其與陽離子脂質體之複合物，是否可活化癌細胞內之核酸酶以誘導細胞凋亡，因而造成癌細胞死亡，則是根本未知的。發明揭示

本發明之目的係提供可用於治療癌症之有效藥物。本發明的目的也是提供含有雙股RNA（如poly(I) . poly(C)）之新穎藥物。

附圖說明



## 五、發明說明 (3)

圖1表示DNA片段化之速率，縱座標代表DNA片段化之百分率(%)，且橫座標代表時間(小時)。

圖2表示在抑制劑ATA中加入核酸酶之作用，其中橫座標代表本發明實例4之活化劑濃度(毫微克/毫升)，-○-代表在無ATA系統中產生之數據，-●-代表在有ATA系統中產生之數據。

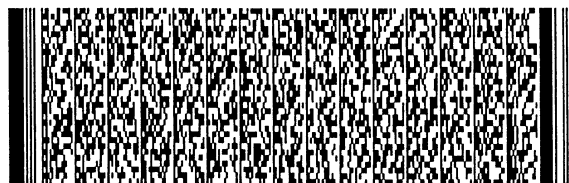
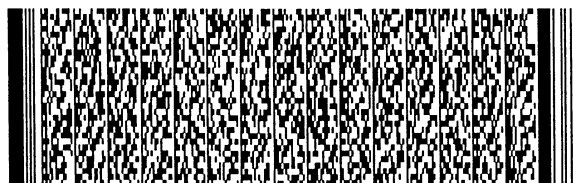
本發明經過許多研究後發現，癌細胞內核酸酶活化劑可有效治療惡性腫瘤，且因此發展了本發明。

因此，本發明是有關一種癌細胞內核酸酶活化劑，物質是否為癌細胞內核酸酶活化劑可由實驗中容易地決定，例如如下文所示之試驗實例2觀察DNA或RNA之片段化情況。一般而言，本發明包括癌細胞內核酸酶活化組合物，其中含有可使藥物於細胞內有效遞送之載劑，與選自下列成員之複合物，包括poly(I).poly(C)，誤配的poly(I).poly(C)，poly(A).poly(U)，及誤配的poly(A).poly(U)(這些雙股RNA在下文統稱為"poly(I).poly(C)或同等物")，而癌細胞內核酸酶活化組合物包括陽離子脂質體與poly(I).poly(C)或同等物之複合物。

本發明較佳之具體實例包括癌細胞內核酸酶活化組合物，其係包含以載劑與poly(I).poly(C)或同等物之複合物，載劑中含有2-0-(2-二乙胺基乙基)胺甲醯基-1,3-0-二油醯基甘油(下文稱為甘油衍生物)及磷脂為基本組份(在下文中組合物稱為本發明活化劑)。

現在詳述本發明較佳之供示範的活化劑。

載劑通常稱為陽離子脂質體，但未必要嚴格呈陽離子脂



## 五、發明說明 (4)

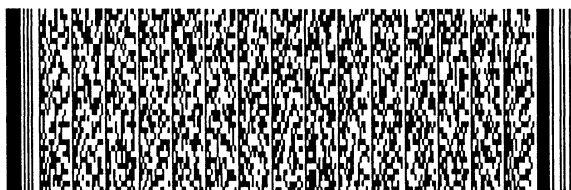
質體型式，只要其功能上可保證可將藥物遞送至細胞內即可。

依據本發明，poly(I) . poly(C) 或同等物之鏈長並不特別限制，若以poly(I) . poly(C) 為例，適合採用在50-2,000 bp 範圍內者。由100-500 bp 之RNA 較佳，而200-400 bp 更好。若鏈長少於50 bp，RNA 將無法充份有效，而若使用2000 bp 以上之鏈長則有安全上之考量。使用至100-500 bp 範圍的poly(I) . poly(C)，是就效力及安全性做RNA 平衡上之考量。由於poly(I) . poly(C) 或其同等物是呈各種鏈長的分佈型式，因此上述poly(I) . poly(C) 之鏈長是平均的鏈長。

應用於本發明之磷脂並未特別限制，只要是藥學上可接受之磷脂即可，因此包括下列磷脂但不限於此：磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯肌醇、磷脂醯絲胺酸、神經鞘磷脂及卵磷脂。也可使用氫化之磷脂。較佳之磷脂包括蛋黃磷脂醯膽鹼，蛋黃卵磷脂，大豆卵磷脂，及蛋黃磷脂。也可組合使用二種以上不同的磷脂。與常用於陽離子脂質體之磷脂醯乙醇胺比較，磷脂醯膽鹼及卵磷脂有助於顯著減弱毒性，但不會降低其活性。

複合物中，載劑與poly(I) . poly(C) 或同等物之比例，依磷脂及poly(I) . poly(C) 或同等物之種類、癌症型式及其他因素而定，但poly(I) . poly(C) 相較於10 重量百分率載劑，以0.05-10 重量比例為佳，較好0.1-4，且又更好是0.5-2 重量比例。

載劑中甘油衍生物與磷脂之比例視poly(I) . poly(C) 或



## 五、發明說明 (5)

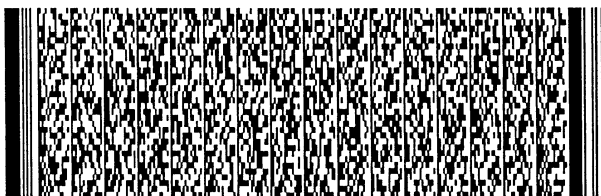
其相等物之種類及份量以及磷酯之種類而定，但是相對於甘油衍生物之每份重量，磷脂以0.1至10份重量為佳，較佳為0.5至5份重量，更較佳為1至2份重量。

本發明的活化劑可為將複合物分散在水溶液中之液體製劑型式(注射劑或點滴劑)，或呈冷凍乾燥型式。在液體製劑型式中，複合物之建議濃度為0.001-25%(w/v)，較好是0.01-5%(w/v)，又較好是0.1-1%(w/v)。

本發明之活化劑可含有藥學上可接受之添加物，如輔助用乳化劑，穩定劑，等張劑及/或pH值控制劑，並以適合的劑量存在。特言之，輔佐用乳化劑如C<sub>6-22</sub>脂肪酸(如辛酸，癸酸，月桂酸，肉豆蔻酸，棕櫚酸，硬脂酸，油酸，亞麻酸，花生四烯酸，廿二碳六烯酸)，或其藥學上可接受的鹽(如鈉鹽，鉀鹽，鈣鹽等)，白蛋白，右旋醣酐等，穩定劑如膽固醇，磷脂等，等張劑如氯化鈉、葡萄糖、麥芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖等，及pH值控制劑，如鹽酸、硫酸、磷酸、乙酸、氫氧化鈉、氫氧化鉀、三乙醇胺等均

可。

本發明之活化劑可以製造脂質體之一般技術來製造。典型的方法包括將特定量之水(如注射用水，注射用蒸餾水，或生理食鹽水)與特定量之甘油衍生物及磷脂在攪拌下混合，以適合的分散機器分散混合物，如混合器，均化器，超音波分散器，超音波均化器，高壓乳化劑分散器，微流化床(商品名)，Nanomizer(商品名)，Ultimizer(商品名)，或Manton-Gaulin高壓均化器，再加特定量之poly(I).poly(C)或同等物，並再分散混合物以生成本發



## 五、發明說明 (6)

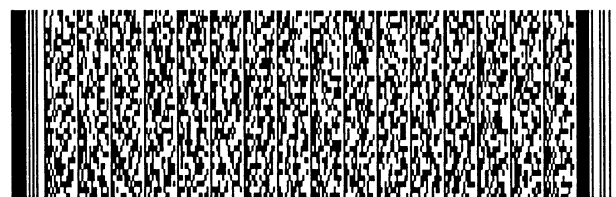
明可供注射之活化劑。可在分散前後之適合階段，可加入上述視所需之添加物。另外，本發明的活化劑可由加水至甘油衍生物，磷脂，及poly(I).poly(C)或同等物之三元混合物中，再將整個混合物分散之。再者，可插入粗製分散步驟。

以上述分散步驟所得之活化劑可冷凍乾燥，生成本發明經冷凍乾燥之活化劑。此冷凍乾燥操作可在傳統方式下進行。例如，將以此分散步驟所得之本發明活化劑滅菌，再分裝至小瓶內。進行2小時約 $-40\sim-20^{\circ}\text{C}$ 之初步冷凍，再於約 $0\sim10^{\circ}\text{C}$ 下進行第一次真空乾燥，並進一步在約 $15\sim25^{\circ}\text{C}$ 下進行第二次真空乾燥。一般而言，小瓶內充入氮氣，再加塞使生成本發明之經冷凍乾燥之活化劑。

本發明經冷凍乾燥穩定者通常加入適合的(重新溶解用)溶劑使重新溶解，再供使用。可供重新溶解用之溶劑包括注射用水，生理食鹽水，及其他一般輸液。重新溶解用溶劑之量依所求之用途而變化，且並不特別限制，但較好是冷凍乾燥前體積之0.5-2倍，但不超過500毫升。

本發明的活化劑可活化癌細胞內之核酸酶，因而誘導細胞凋亡，具毒性低，因此可發現其對於包括人類在內之哺乳動物之癌症治療上有戲劇性效力，如肝癌。特言之，含有在載劑及poly(I).poly(C)間形成之複合物之活化劑係具有有效性極高，但毒性極低之優點。

本發明之活化劑可以靜脈內，局部，穿越粘膜，及其他各種路徑投予以治療腫瘤疾病。當本發明的活化劑可用於治療肝癌時，較好是由靜脈內投藥、肝動脈投藥、或門靜



## 五、發明說明 (7)

脈投藥。

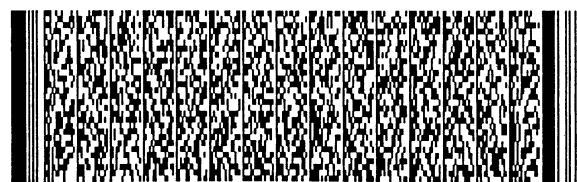
本發明活化劑在癌症治療上之劑量依poly(I) . poly(C)或同等物及磷脂種類、癌症型式、受者之年齡及種族、投藥路徑、及治療之形式等條件而定。就poly(I) . poly(C)或同等物而言，通常為每劑約50微克-50毫克/人次為佳，且較好每劑100微克-2毫克/人次。於如此之poly(I) . poly(C)而言，所建議之劑量通常為每劑50微克-50毫克/人次，且較好每劑100微-2毫克/人次。本發明之活化劑可經由注射或採點滴注射方式投藥，以一天1~3次，每天，每隔一天，或每週或每二週一次地投藥。

## 實例

以下操作實例及試驗實例進一步詳述本發明。本發明活化劑之濃度皆以活化劑中poly(I) . poly(C)之濃度表示。

## 實例1

將溶於100毫升注射用水中之40克麥芽糖，與2克的甘油衍生物及2克經純化的蛋黃卵磷脂混合，混合物以均化器處理5分鐘，製成粗製的載劑分散相。此粗製分散相再進一步以實驗用壓縮乳化器-分散器處理1小時，並以注射用水調至250毫升。回收所生成之載劑分散相。在此載劑分散相250毫升中，加入150毫升含有500毫克poly(I) . poly(C)[平均鏈長：約200 bp]之水溶液，同時攪拌，並使用實驗用壓縮乳化器-分散器，進一步處理混合物1小時以生成本發明之活化劑。此活化劑再分散至每瓶1毫升之小瓶內，並以傳統方式冷凍乾燥。



## 五、發明說明 (8)

## 實例2

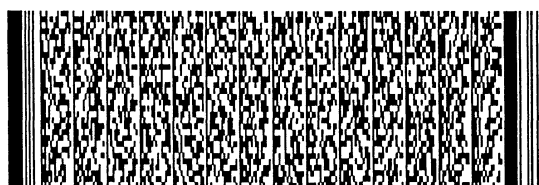
將溶於10升注射用水之4公斤蔗糖，與50克甘油衍生物及30毫克蛋黃磷脂混合，混合物以Manton-Gaulin高壓均漿器處理10分鐘。生成的分散液以注射用以使達到25升，並回收之。在此載劑分散液20升中，以攪拌方式加入12升含有10克poly(I).poly(C)[平均鏈長：約200 bp]的水溶液，且混合物以鹽酸調至pH 5.5，再以Manton-Gaulin高壓均勻漿進一步處理30分鐘，以生成本發明的活化劑。此活化劑再分裝於每小瓶20毫升之小瓶內，並以傳統方式冷凍乾燥即生成冷凍乾燥型式。可於此冷凍乾燥穩定者加入市售之5%葡萄糖輸液(500毫升)溶解之。

## 實例3

將溶於100毫升注射用水之20克葡萄糖，與2克甘油衍生物及2克大豆卵磷脂混合，混合物以均漿器處理5分鐘以製成粗製的載劑分散液。此粗製分散液進一步以實驗用壓縮乳化器-分散器處理1小時，再以注射用水調至250毫升。回收所生成的載劑分散液。於此載劑分散液250毫升中，以攪拌方式加入150毫升含有50毫克poly(I).poly(C)[平均鏈長：約200 bp]之水溶液，並利用實驗用壓縮乳化器-分散器，進一步處理混合物1小時以生成本發明之活化劑。

## 實例4

將溶於100毫升注射用水之40克麥芽糖與1.2克甘油衍生物及2.0克純的蛋黃卵磷脂混合，此粗製分散液以實驗用壓縮乳化器-分散器進一步處理30分鐘，並以注射用水使



## 五、發明說明 (9)

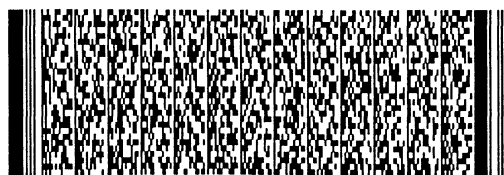
達到250毫升。回收所生成之載劑分散液。在此250毫升載劑分散液中，以攪拌方式加入150毫升含有200毫克poly(I).poly(C)[平均鏈長：約200 bp]之水溶液，並使用實驗用壓縮乳化器-分散器，進一步處理混合物2小時以生成本發明的活化劑。

## 實例5

將溶於100毫升注射用水之40克麥芽糖，與1.2克甘油衍生物及2.0克經純化的卵黃卵磷脂混合，此粗製分散液以實驗用壓縮乳化器-分散器進一步處理30分鐘，再以注射用水使達250毫克。回收所生成的載劑分散液。在此250毫升載劑分散液中，以攪拌方式加入150毫升含有100毫克poly(I).[平均鏈長360 鹼基]及100毫克poly(C)[平均鏈長：318 鹼基]之水溶液，並使用實驗用壓縮乳化器-分散器，進一步處理混合物2小時，以生成本發明之活化劑。

## 實例6

將溶於100毫升注射用水之40克麥芽糖，與2克甘油衍生物及2克純化的蛋黃卵磷脂混合，混合物以均漿器處理5分鐘，以製成粗製的載劑分散液。此粗製的分散液進一步以實驗用壓縮乳化器-分散器處理1小時，再以注射用水調整至250毫升。回收所生成的載劑分散液。在此250毫升載劑分散液中，以攪拌方式加入150毫升含有250毫克poly(I)[平均鏈長：1419 鹼基]及250毫克poly(C)[平均鏈長：1491 鹼基]之水溶液，並使用實驗用壓縮乳化器-分散器，進一步處理混合物1小時以生成本發明之活化劑。此



## 五、發明說明 (10)

活化劑再分裝至每小瓶1毫升之小瓶內，再以傳統方式冷凍乾燥。

## 實例7

將溶於100毫升注射用水之40克麥芽糖，與1.2克甘油衍生物及2.0克經純化的蛋黃卵磷脂混合，且此粗製分散液以實驗用壓縮乳化器-分散器進一步處理30分鐘，再以注射用水使達250毫升。回收所生成之載劑分散液。在此250毫升載劑分散液中，以攪拌方式加入150毫升含有100毫克poly(I)[平均鏈長：84鹼基]及100毫克poly(C)[平均鏈長：76鹼基]之載劑分散液，並利用實驗用壓縮乳化器-分散器，進一步處理混合物2小時，以生成本發明之活化劑。

## 實例8

依實例4之相同方式製備本發明之含有poly(I). poly(C)之活化劑[平均鏈長：約350 bp]。

## 實例9

依實例4之相同方式製備本發明之含有poly(I). poly(C)之活化劑[平均鏈長：約1450 bp]。

## 實例10

依實例4之相同方式製備本發明之含有poly(I). poly(C)之活化劑[平均鏈長：約80 bp]。

試驗實例1：對於各種細胞株之生長抑制作用(於試管內)

於96孔洞之盤種入 $10^4$ 細胞/孔洞密度之細胞。次日，加入實例4之活化劑或亞德里亞黴素，並繼續培養。3天後，以MTT方法決定存活之細胞數目。結果如表1及2所示。



## 五、發明說明 (11)

表 1

癌細胞株	細胞型式	活化劑 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)	亞德里亞霉素 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)
[ 癌細胞株 ]			
MCF7	乳房腺癌	0.09	73
A-204	橫紋肌肉瘤	0.71	76
Malme 3M	惡性黑色素瘤	0.80	114
MDA-MB-468	乳房腺癌	0.89	57
LoVo	結腸腺癌	1.3	65
RT4	膀胱乳頭狀瘤	1.6	58
T47D	乳房導管癌	2.1	114
OVCAR3	卵巢腺癌	2.4	>1000
HT1376	膀胱癌	4.3	217
MDA-MB-453	乳房癌	5.4	143
A431	類上皮癌	5.7	52
PCC-3	前列腺腺癌	6.4	>1000
RD	橫紋肌肉瘤	6.9	208
SK-BR-3	乳房腺癌	8.1	78
HeLaS3	子宮頸類上皮癌	8.6	49
Ls174T	結腸腺癌	8.8	96
MDA-MB-134VI	乳房導管癌	14	81
WM-266-4	黑色素瘤	15	206
CALU6	肺發育不良癌	21	282
TSU-PR-1	前列腺癌	26	572
McA-8994	大鼠肝癌	29	>1000
KM12-HX	結腸癌	33	130
SAOS2	骨性肉瘤	34	75
SK-HEP-1	肝腺癌	38	302
HT144	惡性黑色素瘤	38	219
DUI45	前列腺癌	39	236
COLO320DM	結腸腺癌	40	838
SK-OV-3	卵巢腺癌	40	252
G-361	惡性黑色素瘤	52	146
SW480	結腸癌	53	97
KB	口腔類上皮肉瘤	71	25
NC65	胰臟癌	137	73
HCC-T	肝癌	153	76
PLC/PRF/5	肝癌	207	42
A546	肺癌	263	831
AsPC-1	胰臟腺癌	268	800
Hs0578T	乳房導管癌	282	760
A673	橫紋肌肉瘤	407	104

利用以下方程式估計抑制%。

$$(1 - \frac{\text{經藥物處理細胞之 O.D. 值}}{\text{經食鹽水處理細胞之 O.D. 值}}) \times 100\%$$



## 五、發明說明 (12)

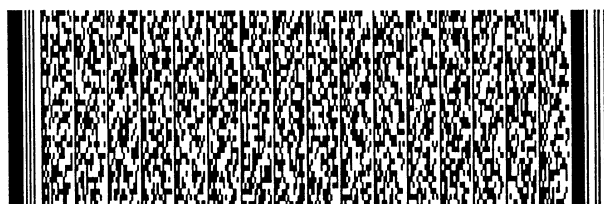
表 2

細胞株	細胞型式	活化劑 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)	亞德里亞霉素 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)
[非癌細胞株]			
WRL68	人類胚胎肝細胞	>1000	283
BNL CL. 2	老鼠正常肝細胞	>1000	398
NCTCclone1469	老鼠正常肝細胞	>1000	101
Clone9	大鼠正常肝細胞	>1000	228
Swiss/3T3	老鼠胚胎細胞	>1000	903
NIH/3T3	老鼠胚胎細胞	>1000	102
BALB/c CL. 7	老鼠正常纖維母細胞	>1000	117
BALB/c3T3 cloneA31	老鼠胚胎細胞	>1000	427
NRK-49F	大鼠正常腎纖維母細胞	>1000	>1000
CHO-K1	中國倉鼠卵細胞	>1000	20
BHK-21	倉鼠腎細胞	>1000	47

利用下方程式估計抑制%

$$\left(1 - \frac{\text{經藥物處理細胞之 O.D. 值}}{\text{經食鹽水處理細胞之 O.D. 值}}\right) \times 100\%$$

由表1及2可明顯看出，活化劑在0.01-500毫微克/毫升之濃度下，在許多上皮及纖維母細胞衍生之癌細胞株上可呈現強烈的生長抑制作用，其即使與藉由抑制核酸合成而表現抗癌作用之亞德里亞霉素比較，亦未顯現較低之作用。活化劑對於各種器官之癌細胞均有作用，因此並無器官專一性。另一方面，本發明的活化劑並不抑制4種由肝衍生之細胞株及7種纖維母細胞株等非癌細胞株之生長，甚至在1000毫微克/毫升濃度亦然。應注意，此試管內抗癌作用單獨使用poly(I).poly(C)或單獨使用載劑根本觀察不到，且僅就poly(I).poly(C)轉位至細胞內是無法說明的。



## 五、發明說明 (13)

## 試驗實例2：細胞凋亡現象之觀察

## (1) DNA 及 RNA 之片段化

## 1) DNA 之片段化

在A431細胞株及KM12-HX細胞株中，各自加入1微克/毫升的實例4活化劑。於5及7.5小時後分別回收A431細胞及KM12-HX細胞。細胞以5mM Tris-HCl (pH8.0) -10mM EDTA-0.5%(v/v) Triton X-100溶解，並以13000 x g離心20分鐘以分離出片段化之DNA(上清液)及染色質部份(團塊)。之後，令100微克/毫升RNase A作用在上清液中，37°C下1小時，再加入200微克/毫升蛋白酶K及1%(w/v) SDS(硫酸十二酯鈉)，於50°C下反應1.5小時。片段化之DNA以酚-氯仿萃取，再進行1.8%瓊脂糖凝膠電泳。結果可在各細胞株中觀察到DNA片段化狀況。

對A431細胞株檢視DNA片段化之時間過程。於此6孔洞之小盤種入 $2.8 \times 10^5$ 細胞/孔洞之A431細胞，並於次日將細胞DNA標上2微居里 $[^3\text{H}]$ 胸苷。之後，加入實例4之活化劑(1微克/毫升)，且在時間間隔下回收細胞。細胞以5mM Tris-HCl (pH8.0)-10mM EDTA-0.5%(v/v) Triton X-100溶解，以13000 x g離心20分鐘以自染色質流份中(團塊)分出片段化的DNA(上清液)。由上清液及團塊中別測得之放射活性，可估計片段化之DNA占總DNA之比例。結果如圖1所示。

於加入後3小時，片段比例為總DNA之約30%，而在5小時時不少於55%，顯示此片段化係在本發明活化劑於細胞內吸收後立即發生。



## 五、發明說明 (14)

## 2) RNA 成片段化

在A431細胞株、MDA-MB-468細胞株、KB細胞株、HeLaS3細胞株及MCF-7細胞株中，各自加入呈1微克/毫升poly(I)·poly(C)之實例4活化劑，並於4小時後回收經處理之細胞。由所回收之細胞中，分出核糖體部份，並以ACPC(酸-鈎-酚-氯仿)方法萃取總RNA。RNA進行經甲醛修飾之凝膠(1.8%瓊脂糖凝膠)電泳，再進行溴化乙錠染色。結果，可在所有細胞株中觀察到28S及18S核糖體RNAs之片段化情形。

## (2) 核酸酶抑制劑之影響

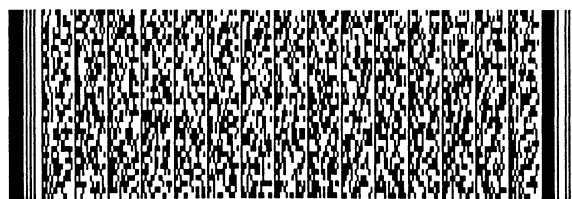
於96孔洞盤中種入 $10^4$ 細胞/孔洞密度之HeLaS3細胞，並於次日同時加入 $10\ \mu\text{M}$ 核酸酶抑制劑ATA(auritricarboxylic acid)及實例4之活化劑。細胞進一步生長3天，再以MTT方法決定存活細胞之數目。結果表示於圖2。

圖2中顯示，當加入ATA抑制細胞內核酸酶活性時，本發明的活化劑無法抑制癌細胞之生長。再者，當8小時後且在加入本發明活化劑之前自培養基中移去ATA，則活化劑無法表現其活性。因此，ATA的作用被認為並非抑制本活化劑之細胞內吸收，而是作用如核酸酶抑制劑一般。

(3) 上述試驗結果顯示，本發明的活化劑可活化細胞內核酸酶，藉此誘導癌症細胞之細胞凋亡。

試驗實例3：在鼠類轉移型肝癌模式中之影響(於活體內)

於裸鼠Balb/c, nu/nu(5週大，雄的)之脾臟內注入 $10^6$



## 五、發明說明 (15)

細胞/老鼠的KM12-HX細胞株(一種人類結腸癌細胞株,其當移植至裸鼠的脾臟內,會轉移至肝,並以高效率造成腫瘤傷害),再於10分鐘後摘除出脾臟。開始3天後,將本發明實例4之活化劑每週二次靜脈內投予,採實質上固定的時間間隔共歷連續5週。於最後一劑後2天,取出肝臟,再決定於肝上形成的癌結節數目及面積。結果表示於表3。

表3

	癌症結節數目	面積(毫米 <sup>2</sup> )
對照組(10%麥芽糖)	35±6.2	244±44
本發明的活化劑		
30微克/公斤,每週二次	11±4.0*	69±32 (72%)*
100微克/公斤,每週二次	6.1±1.4*	22±8.1(91%)*
對照組(10%麥芽糖)	20±3.5	165±29
本發明的活化劑		
100微克/公斤,每週二次	3.9±0.8*	4.2±1.0(97%)*
100微克/公斤,每週一次	6.4±1.7*	38±16(77%)*

表中之數字表示每隻老鼠之癌症結節數目及面積(平均值±S.E.)。括號內之數字表示抑制百分率。

\*: 意義值在 $p < 0.01$  (Dunnett's 試驗)

與對照組(給予10%麥芽糖)比較,肝癌細胞生長之抑制作用,在30微克/公斤組為72%,在100微克/公斤組為91%。於100微克/公斤組,即使投藥計劃是每週一次也可得到77%的抑制作用。

此外,製備肝組織檢品及進行病理檢查。結果在對照組中之肝癌係上皮低分化型腺癌。可觀察到受試者具一般程



## 五、發明說明 (16)

度之血管化作用。但無顯著的免疫細胞浸潤現象。再者，腫瘤組織有局部的鈣化。在以本發明活化劑處理組中，測不到明顯的癌細胞，只在癒合後可注意到有鈣化情形留下。

因此，本發明的活化劑在10微克/公斤~100微克/公斤劑量範圍內，以每週二次給藥計劃，於動物肝癌模式中可顯示顯著的效力。

## 試驗實例4：毒性研究

## (1) 大鼠給予單一劑量之肝毒性表現(急性中毒研究)

採用6週大的8隻雄的SD大鼠，本發明的實例4活化劑以單一靜脈內劑量投予，並於20小時後決定血清中胺基醯基轉移酶活性。其結果，高達至5毫克/公斤仍無死亡例，而在5毫克/公斤最多只觀察到血清胺基醯基轉移酶之水平略為上升。於1毫克/公斤下，血清胺基醯基轉移酶水平略為上升。

## (2) 大鼠之二週的亞急性毒性

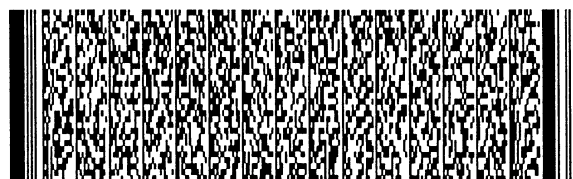
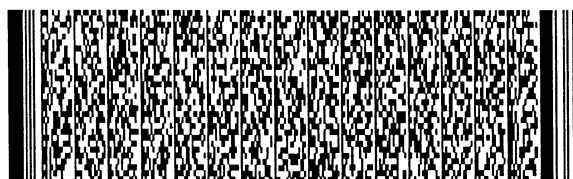
本發明實例4之活化劑，靜脈內投予至6隻雄的SD大鼠(6週大)中，每天投予共連續14天。其結果，劑量高達1毫克/公斤仍未見顯著的毒性徵兆。

## (3) 抗原性研究

採用雄的天竺鼠(Hartley株，5週大)，研究本發明實例4活化劑之抗原性。結果，在50微克/動物時未見有抗原性。

## (4) 簡易的致突變研究

依據本發明實例4之活化劑接受簡易可逆突變分析及簡



## 五、發明說明 (17)

易染色體異常分析。其結果，在10微克/毫升時未見致突變性。



圖式簡單說明

附頁

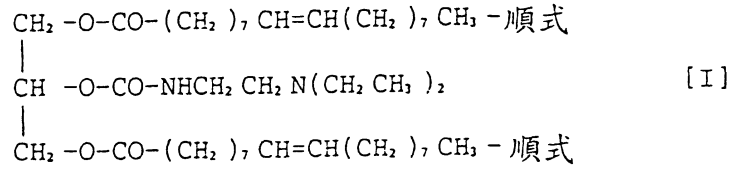


表 1

癌細胞株	細胞型式	活化劑 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)	亞德里亞毒素 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)
[癌細胞株]			
MCF7	乳房腺癌	0.09	73
A-204	橫紋肌肉瘤	0.71	76
Malme 3M	惡性黑色素瘤	0.80	114
MDA-MB-468	乳房腺癌	0.89	57
LoVo	結腸腺癌	1.3	65
RT4	膀胱乳頭狀瘤	1.6	58
T47D	乳房導管癌	2.1	114
OVCAR3	卵巢腺癌	2.4	>1000
HT1376	膀胱癌	4.3	217
MDA-MB-453	乳房癌	5.4	143
A431	類上皮癌	5.7	52
PCC-3	前列腺腺癌	6.4	>1000
RD	橫紋肌肉瘤	6.9	208
SK-BR-3	乳房腺癌	8.1	78
HeLaS3	子宮頸類上皮癌	8.6	49
Ls174T	結腸腺癌	8.8	96
MDA-MB-134VI	乳房導管癌	14	81
WM-266-4	黑色素瘤	15	206
CALU6	肺發育不良癌	21	282
TSU-PR-1	前列腺癌	26	572
McA-8994	大鼠肝癌	29	>1000
KM12-HX	結腸癌	33	130
SAOS2	骨性肉瘤	34	75
SK-HEP-1	肝腺癌	38	302
HT144	惡性黑色素瘤	38	219
DU145	前列腺癌	39	236
COLO320DM	結腸腺癌	40	838
SK-OV-3	卵巢腺癌	40	252
G-361	惡性黑色素瘤	52	146
SW480	結腸癌	53	97
KB	口腔類上皮肉瘤	71	25
NC65	胰臟癌	137	73
HCC-T	肝癌	153	76
PLC/PRF/5	肝癌	207	42
A546	肺癌	263	831
AsPC-1	胰臟腺癌	268	800
Hs0578T	乳房導管癌	282	760
A673	橫紋肌肉瘤	407	104

附頁

表 2

細胞株	細胞型式	活化劑 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)	亞德里亞霉素 IC <sub>50</sub> (毫微克/毫升)
[非癌細胞株]			
WRL68	人類胚胎肝細胞	>1000	283
BNL CL. 2	老鼠正常肝細胞	>1000	398
NCTCclone1469	老鼠正常肝細胞	>1000	101
Clone9	大鼠正常肝細胞	>1000	228
Swiss/3T3	老鼠胚胎細胞	>1000	903
NIH/3T3	老鼠胚胎細胞	>1000	102
BALB/c CL. 7	老鼠正常纖維母細胞	>1000	117
BALB/c3T3 cloneA31	老鼠胚胎細胞	>1000	427
NRK-49F	大鼠正常腎纖維母細胞	>1000	>1000
CHO-K1	中國倉鼠卵細胞	>1000	20
BHK-21	倉鼠腎細胞	>1000	47

表 3

	癌症結節數目	面積(毫米 <sup>2</sup> )
對照組(10%麥芽糖)	35±6.2	244±44
本發明的活化劑		
30 微克/公斤, 每週二次	11±4.0*	69±32 (72%)*
100 微克/公斤, 每週二次	6.1±1.4*	22±8.1(91%)*
對照組(10%麥芽糖)	20±3.5	165±29
本發明的活化劑		
100 微克/公斤, 每週二次	3.9±0.8*	4.2±1.0(97%)*
100 微克/公斤, 每週一次	6.4±1.7*	38±16(77%)*

## 四、中文發明摘要 (發明之名稱：癌細胞核酸酶活化劑)

本發明是有關一種癌細胞核酸酶活化劑以及其抗癌組合物，其中含有可於細胞內有效遞送藥物之載劑與加 poly(I) . poly(C)，誤配的 poly(I) . poly(C)，poly(A) . poly(U) 或誤配的 poly(A) . poly(U) 所形成之複合物。

## 英文發明摘要 (發明之名稱：CANCER CELL NUCLEASE ACTIVATOR)

A cancer cell nuclease activator comprising a complex of a carrier effective in intracellular delivery of a drug with poly(I).poly(C), mismatched poly(I).poly(C), poly(A).poly(U) or mismatched poly(A).poly(U), and an anticancer composition thereof are provided.



## 六、申請專利範圍

poly(I) . poly(C) 之複合物。

8. 根據申請專利範圍第7項之抗癌組合物，其中的磷脂是卵磷脂。

9. 根據申請專利範圍第7項或第8項之抗癌組合物，其中 poly(I) . poly(C) 具有100至500 bp 範圍內之平均鏈長。

10. 根據申請專利範圍第7項或第8項之抗癌組合物，其中的癌症是肝癌。



87115507

圖式

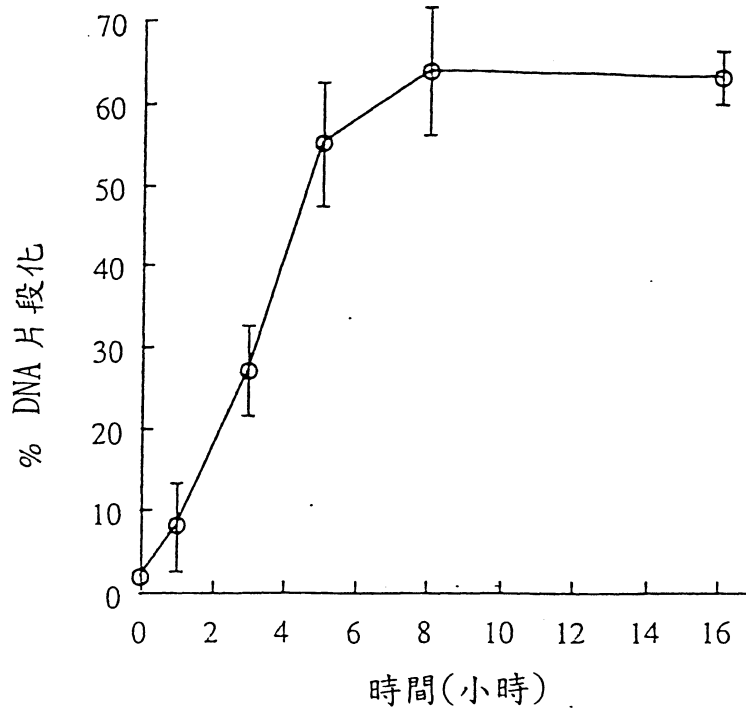


圖 1

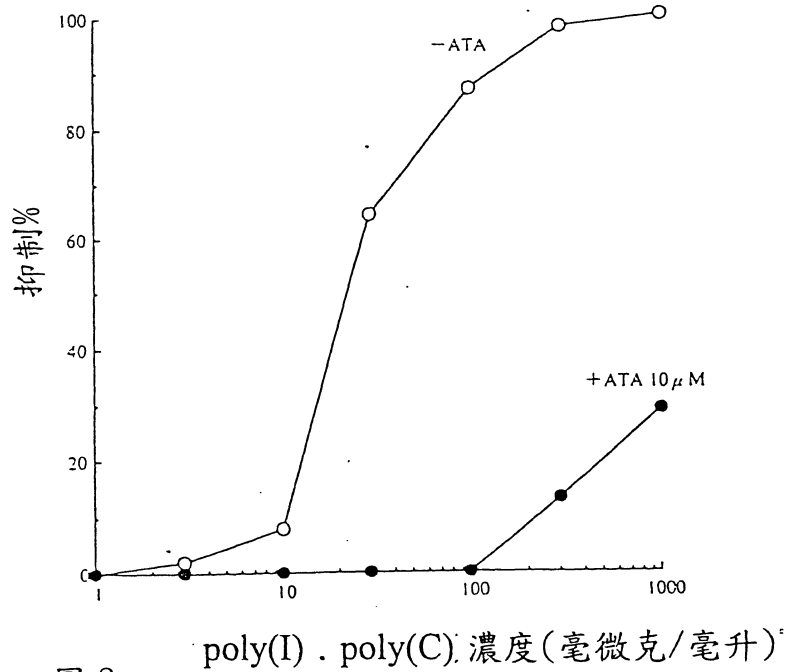


圖 2

核酸酶抑制劑之添加效應

91年11月 日 修正本

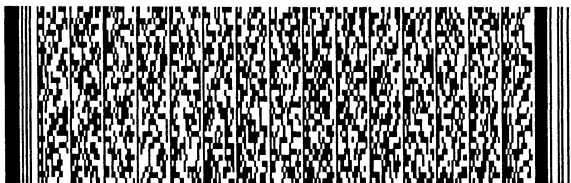
申請日期：	案號：87115507	
類別：	公告本	修正 91.11-8 本 年 月 日 補充

(以上各欄由本局填註)

# 發明專利說明書

524693

一、發明名稱	中文	癌細胞核酸酶活化劑
	英文	CANCER CELL NUCLEASE ACTIVATOR
二、發明人	姓名 (中文)	1. 平林 加壽子 2. 關 純造
	姓名 (英文)	1. KAZUKO HIRABAYASHI 2. JUNZO SEKI
	國籍	1. 日本 2. 日本
	住、居所	1. 日本國京都府京都市右京區太秦森前町11-1格林帕雷斯蚕之社307號 2. 日本國大阪府茨木市西駅前町13-11
三、申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 日商日本新藥股份有限公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. NIPPON SHINYAKU COMPANY, LIMITED
	國籍	1. 日本
	住、居所 (事務所)	1. 日本國京都府京都市南區吉祥院西之庄門口町14番地
	代表人姓名 (中文)	1. 阿萬 英昭
	代表人姓名 (英文)	1.



## 六、申請專利範圍

1. 一種癌細胞核酸酶活化劑，其中含有可於細胞內有效遞送藥物之載劑與poly(I) . poly(C)、誤配之poly(I) . poly(C)、poly(A) . poly(U)或誤配之poly(A) . poly(U)之複合物，該可於細胞內有效遞送藥物之載劑是陽離子脂質體。

2. 根據申請專利範圍第1項之癌細胞核酸酶活化劑，其中含有基本上由2-0-(2-二乙基胺基乙基)胺甲醯基-1,3-0-二油醯基甘油及磷脂所組成之載劑與poly(I) . poly(C)或誤配之poly(I) . poly(C)之複合物。

3. 根據申請專利範圍第2項之癌細胞核酸酶活化劑，其中的磷脂是卵磷脂。

4. 根據申請專利範圍第2或3項之癌細胞核酸酶活化劑，其中poly(I) . poly(C)具有100至500 bp範圍內之平均鏈長。

5. 根據申請專利範圍第2或3項之癌細胞核酸酶活化劑，其中的癌症是肝癌。

6. 一種含有癌細胞核酸酶活化劑之抗癌組合物，其中含有可於細胞內有效遞送藥物之載劑與poly(I) . poly(C)、誤配之poly(I) . poly(C)、poly(A) . poly(U)或誤配之poly(A) . poly(U)之複合物，該可於細胞內有效遞送藥物之載劑是陽離子脂質體。

7. 根據申請專利範圍第6項之抗癌組合物，其中含有基本上由2-0-(2-二乙基胺基乙基)胺甲醯基-1,3-0-二油醯基甘油及磷脂所組成之載劑與poly(I) . poly(C)或誤配的

