

[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 02811048. X

[51] Int. Cl.

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100496485C

[22] 申请日 2002.5.29 [21] 申请号 02811048. X

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 1 [33] US [31] 60/295,236

[32] 2001. 6. 1 [33] US [31] 60/295,190

[86] 国际申请 PCT/US2002/016737 2002.5.29

[87] 国际公布 WO2002/098416 英 2002.12.12

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.1

[73] 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 G·杜卡特 J·J·小吉邦斯

[56] 参考文献

Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. SHI Y 等人. CANCER RESEARCH, Vol. 55 No. 9. 1995

审查员 陈晏晏

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘元金 马崇德

权利要求书 2 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

抗肿瘤组合

[57] 摘要

本发明提供了 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂的组合在治疗肿瘤中的应用。

1. 一种抗肿瘤组合，其包含有效量的雷帕霉素衍生物和抗肿瘤烷化剂。

2. 如权利要求 1 所述的组合，其中所说的雷帕霉素衍生物是 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素。

3. 如权利要求 1 所述的组合，其中所说的雷帕霉素衍生物是 CCI-779。

4. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的组合，其中所说的抗肿瘤烷化剂选自 meclorethamine、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、噻替派、丝裂霉素、白消安、罗氮芥、卡氮芥、甲苄胂、替莫唑胺、顺铂、和卡铂。

5. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的组合，其中所说的雷帕霉素衍生物、抗肿瘤烷化剂或雷帕霉素衍生物和抗肿瘤烷化剂都是以亚治疗有效量被提供的。

6. 雷帕霉素衍生物和抗肿瘤烷化剂在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

7. 如权利要求 6 所述的应用，其中所说的肿瘤是肾癌、软组织癌、乳癌、肺的神经内分泌肿瘤、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、黑素瘤、小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、食道癌、胃癌、白血病、结肠直肠癌或未知的原发性癌。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的应用，其中所说的抗肿瘤烷化剂选自 meclorethamine、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、噻替派、丝裂霉素、白消安、罗氮芥、卡氮芥、甲苄胂、替莫唑胺、顺铂、和卡铂。

9. 如权利要求 6 或 7 所述的应用，其中所说的雷帕霉素衍生物、烷化剂或雷帕霉素衍生物和烷化剂都是以亚治疗有效量被提供的。

10. 如权利要求 6 或 7 所述的应用，其中所说的雷帕霉素衍生物是 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素。

11. 如权利要求 6 或 7 所述的应用，其中所说的雷帕霉素衍生物是 CCI-779。

12. 一种包含雷帕霉素衍生物和抗肿瘤烷化剂的产品，以同时、

单独或相继应用的联合制剂形式用于治疗哺乳动物肿瘤。

13. 如权利要求 12 所述的产品,其中所说的雷帕霉素衍生物是 CCI-779。

14. 一种包含雷帕霉素衍生物、抗肿瘤烷化剂和可药用载体的药物组合物。

15. 如权利要求 14 所述的药物组合物,其中所说的雷帕霉素衍生物是 CCI-779。

抗肿瘤组合

本发明涉及 mTOR 抑制剂(例如雷帕霉素与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸的 42-酯(CCI-779))和抗肿瘤烷化剂的组合在治疗肿瘤中的应用、mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂在制备治疗肿瘤的药物中的应用、用于治疗哺乳动物肿瘤的以同时、单独或相继应用的联合制剂形式包含 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂的产品、以及包含 mTOR 抑制剂、抗肿瘤烷化剂和可药用载体的药物组合物。

背景技术

雷帕霉素是一种由吸湿链霉菌所产生的大环三烯类抗生素,发现其在体外和体内都具有抗真菌活性,特别是具有对抗白色念珠菌的活性[C. Vezina 等人, J. Antibiot. 28, 721(1975); S. N. Sehgal 等人, J. Antibiot. 28, 727(1975); H. A. Baker 等人, J. Antibiot. 31, 539(1978); US 3, 929, 992; 和 US 3, 993, 749]。此外, 已经表明单独(US 4, 885, 171)或与溶血链球菌联合(US 4, 401, 653)的雷帕霉素具有抗肿瘤活性。

在 FASEB 3, 3411(1989)中已经公开了雷帕霉素的免疫抑制作用。还表明环孢菌素 A 和其它大环分子——FK-506 作为免疫抑制剂是有效的, 因此, 其可用于预防移植的排斥反应[FASEB 3, 3411(1989); FASEB 3, 5256(1989); R. Y. Calne 等人, Lancet 1183(1978); 和 US 5, 100, 899]。R. Martel 等人[Can. J. Physio. Pharmacol. 55, 48(1977)]公开了雷帕霉素在一种用于多发性硬化的模型——实验性过敏脑脊髓炎模型; 在一种用于类风湿性关节炎的模型——佐剂关节炎模型中都是有效的, 并且可以有效地抑制类-IgE 抗体的形成。

雷帕霉素还可用于预防或治疗全身性红斑狼疮[US 5, 078, 999]、肺炎[US 5, 080, 899]、胰岛素依赖型糖尿病[US 5, 321, 009]、皮肤病, 如牛皮癣[US 5, 286, 730]、内脏病症[US 5, 286, 731]、平滑肌细胞增生和血管损伤后的内膜变厚[US 5, 288, 711 和 5, 516, 781]、成人 T-细胞白血病/淋巴瘤[EP 525, 960 A1]、眼睛炎症[US 5, 387, 589]、恶性肿瘤[US 5, 206, 018]、心脏炎性疾病[US 5, 496, 832]、和贫血[US

5, 561, 138]。

已经证明雷帕霉素与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸的 42-酯 (CCI-779) 是在体外和体内模型中都对肿瘤生长有显著抑制作用的雷帕霉素酯。在 US 5, 362, 718 中公开了包括 CCI-779 在内的雷帕霉素的羟基酯的制备和应用。

CCI-779 表现出与细胞毒性完全不同的细胞抑制作用, 并且可以延迟肿瘤的发展时间或肿瘤复发的时间。认为 CCI-779 具有与 sirolimus 的作用机理相似的作用机理。CCI-779 与胞浆蛋白 FKBP 相结合并与之形成一种复合体, 其抑制了一种酶, mTOR (雷帕霉素的哺乳动物靶目标, 也被称为与 FKBP12-雷帕霉素有关的蛋白 [FRAP])。对 mTOR 的激酶活性的抑制作用抑制了许多信号转导途径, 从而抑制了细胞周期从 G1 到 S 的进行, 其中所说的转导途径包括细胞因子-刺激的细胞增殖、mRNA 对于一些调控细胞周期 G1 期的关键蛋白的翻译、和 IL-2-诱导的转录。可以产生 G1-S 期传导阻滞的 CCI-779 的作用机理对于抗癌药而言是新的。

在体外, CCI-779 已经表现出可以抑制许多在组织形态学上分化的肿瘤细胞的生长。神经系统 (CNS) 癌、白血病 (T-细胞)、乳癌、前列腺癌、和黑素瘤系是对 CCI-779 最敏感的物质中的一些。该化合物抑制了细胞周期的 G1 期中的细胞。

用裸鼠进行体内研究已经证明 CCI-779 具有对抗各种组织形态类型的人肿瘤异种移植物的活性。神经胶质瘤对于 CCI-779 特别敏感并且该化合物在裸鼠正位神经胶质瘤模型中有效。CCI-779 可以显著抑制体外生长因子 (血小板来源的)-诱导的人成胶质细胞瘤细胞系。CCI-779 还抑制了一些人胰腺肿瘤在裸鼠体内的生长以及两种乳癌系之一在体内的生长。

发明内容

本发明提供了 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂的组合作为抗肿瘤的组化化疗的应用。这些组合特别是可用于治疗肾癌、软组织癌、乳癌、肺的神经内分泌的肿瘤、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、黑素瘤、小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、食道癌、胃癌、白血病、结肠直肠癌、和未知的原发

癌。本发明还提供了用作抗肿瘤组合化疗的 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂的组合，其中所用 mTOR 抑制剂或抗肿瘤烷化剂中任何一种的剂量或 mTOR 和抗肿瘤烷化剂两者的剂量都是亚治疗有效剂量。

在另一方面，本发明提供了 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂的组合在制备治疗肿瘤的药物中的应用。在另一方面，本发明提供了一种用于治疗哺乳动物肿瘤的以同时、单独或相继应用的联合制剂形式包含 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂的产品。还是在另一个方面，本发明提供了一种包含 mTOR 抑制剂、抗肿瘤烷化剂和可药用载体的药物组合物。

本发明中所说的术语“治疗”指的是通过给予所说哺乳动物有效量 mTOR 抑制剂和抗肿瘤烷化剂来对患有瘤性疾病的哺乳动物进行处理以抑制该类哺乳动物的肿瘤生长、根除肿瘤、或减轻该哺乳动物的痛苦。

正如在本发明中所用的这样，在涉及给予该组合时的术语“给予”指的是直接将该组合进行给药或将在体内可形成该组合的有效量的该组合的一种或两种组分的前体药物、衍生物或类似物进行给药。

mTOR 是雷帕霉素在哺乳动物中的靶目标，其也被称为与 FKBP12-雷帕霉素相关的蛋白 [FRAP]。对 mTOR 的激酶活性的抑制作用抑制了许多信号转导途径，从而抑制了细胞周期从 G1 向 S 的进行，其中所说的信号转导途径包括细胞因子-刺激的细胞增殖，mRNA 对于一些调控细胞周期 G1 期的关键蛋白的翻译、以及 IL-2-诱发的转录。

mTOR 控制着特定细胞周期调节蛋白的翻译中所涉及的至少两种蛋白的活性 (Burnett, P. E., PNAS 95: 1432 (1998) 和 Isotani, S., J. Biol. Chem. 274: 33493 (1999))。这些蛋白 p70s6 激酶中的一种被 mTOR 在丝氨酸 389 以及苏氨酸 412 上磷酸化。通过带有磷酸丝氨酸 389 残基特异抗体的这些细胞的整个细胞提取物的蛋白质印迹，在生长因子处理的细胞中可以观察到这种磷酸化作用。

本发明所用的“mTOR 抑制剂”指的是可以通过阻断细胞周期从 G1 到 S 的过程从而抑制细胞复制的化合物或配体，其中所说的阻断细胞周期从 G1 到 S 的过程是通过抑制由 mTOR 对 p70s6 激酶的丝氨酸 389 的磷酸化作用而进行的。

可以用下面的标准药理学试验方法来测定这里所定义的化合物是否是 mTOR 抑制剂。正如通过蛋白质印迹所证明的那样，用 mTOR 抑制

剂如雷帕霉素对生长因子刺激的细胞进行处理可完全阻断丝氨酸 389 的磷酸化作用，所说的蛋白质印迹组成了一种用于 mTOR 抑制作用的良好试验。因此，在存在 mTOR 抑制剂情况下培养的来自用生长因子(例如 IGF1)进行了刺激的细胞的整个细胞溶解产物在丙烯酰胺凝胶上不应该表现出一种谱带，其中所说的丙烯酰胺凝胶能用特异于 p70s6K 的丝氨酸 389 的抗体进行标记。

材料:

NuPAGE LDS 样品缓冲液(Novex Cat # NP0007)

NuPAGE 样品还原剂(Novex Cat # NP0004)

NuPAGE 4-12 % Bis-Tris 凝胶(Novex Cat # NP0321)

NuPAGE MOPS SDS Running 缓冲液 (Novex Cat # NP0001)

硝酸纤维素(Novex Cat # LC2001)

NuPAGE 转移缓冲液(Novex Cat # NP0006)

Hyperfilm ECL (Amersham Cat # RPN3114H)

ECL 蛋白质印迹检测试剂(Amersham Cat # RPN2134)

第一抗体: 磷酸-p70 S6 激酶(Thr389) (Cell Signaling Cat #9205)

第二抗体: 山羊抗-兔 IgG-HRP 复合物 (Santa Cruz Cat #sc-2004)

方法:

A. 细胞溶解产物的制备

使细胞系在另外添加了 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素的最理想的基础培养基中进行生长。对于磷酸化研究而言，将细胞在 6 孔板中进行传代培养。在细胞完全粘附后，使其血清饥饿。用 mTOR 抑制剂将其处理 2 至 16 小时。在进行药物处理后，将该细胞用 PBS (没有 Mg^{++} 和 Ca^{++} 的磷酸盐缓冲盐水) 清洗一次，然后将其溶解于 150-200 μ l NuPAGE LDS 样品缓冲液。将溶解产物迅速地进行超声，然后将其在 14000 rpm 下离心 15 分钟。将溶解产物在零下 80℃ 下进行储存直至使用。

还可以通过在其完全粘附后将该细胞在生长培养基中培养一夜来进行该试验操作。在两套条件下所得结果对于 mTOR 抑制剂而言应该是相同的。

B. 蛋白质印迹分析

1) 通过在每个试管中放置 22.5 μ l 溶解产物然后向其中加入 2.5 μ l NuPAGE 样品还原剂来制备总蛋白样品。将该样品在 70℃ 下加热 10 分钟。用 NuPAGE 凝胶和 NuPAGE SDS 缓冲液来进行电泳。

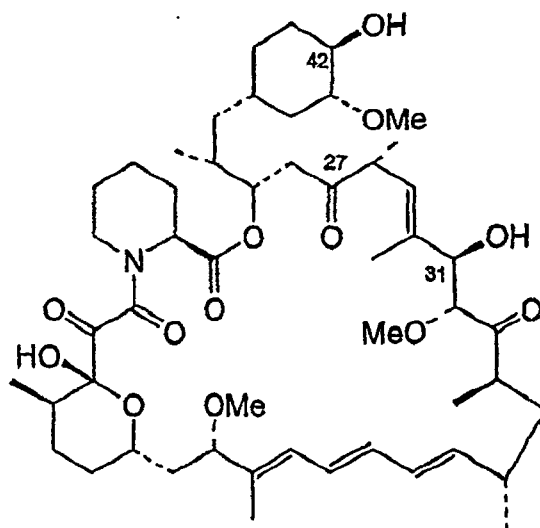
2) 用 NuPAGE 转移缓冲液将凝胶转移到硝酸纤维素膜上。将该膜用阻断缓冲液(带有 0.1% 吐温和 5% 脱脂奶的 Tris 缓冲盐水)阻断 1 小时。用清洗缓冲液(带有 0.1% 吐温的 Tris 缓冲盐水)将膜清洗两次。

3) 在 4℃ 下, 在旋转平台上将印迹/膜用在阻断缓冲液中的 P-p70 S6K (T389) 第一抗体 (1:1000) 培养一夜。

4) 将印迹用清洗缓冲液进行洗涤, 清洗 3 次, 每次清洗 10 分钟, 然后将其用在阻断缓冲液中的第二抗体 (1:2000) 在室温下培养 1 小时。

5) 在与第二抗体结合后, 将印迹用清洗缓冲液进行清洗, 清洗 3 次, 每次清洗 10 分钟, 然后用 Tris 缓冲盐水进行清洗, 清洗 2 次, 每次清洗 1 分钟, 随后进行化学荧光 (ECL) 检测并然后将化学荧光膜曝光。

本发明中所用的术语“雷帕霉素”定义了一类包含基本的雷帕霉素核(如下所示)的免疫抑制化合物。本发明的雷帕霉素包括可以被化学或生物学改性的该雷帕霉素核衍生物形式的化合物, 该化合物仍然具有免疫抑制性。因此, 术语“雷帕霉素”包括雷帕霉素的酯、醚、肟、腙、和胍、以及其中雷帕霉素核上的官能团已经被改性, 例如通过还原或氧化而被改性的雷帕霉素。术语“雷帕霉素”还包括雷帕霉素可药用的盐, 其能通过包含的酸性或碱性部分而形成盐。



雷帕霉素

优选地，雷帕霉素的酯和醚是雷帕霉素核的 42-和/或 31-位羟基的酯和醚、27-位羟基的酯和醚(通过 27-酮的化学还原而获得)，并且优选地肟、腙、和肟是雷帕霉素核 42 位上的酮(通过将 42-羟基氧化而获得)和 27-酮的肟、腙和肟。

下面的专利已经公开了优选的雷帕霉素的 42-和/或 31-酯和醚，其在这里都被引入作为参考：烷基酯(US 4, 316, 885)；氨基烷基酯(US 4, 650, 803)；氟化酯(US 5, 100, 883)；酰胺酯(US 5, 118, 677)；氨基甲酸酯(US 5, 118, 678)；甲硅烷基醚(US 5, 120, 842)；氨基酯(US 5, 130, 307)；缩醛(US 5, 51, 413)；氨基二酯(US 5, 162, 333)；磺酸酯和硫酸酯(US 5, 177, 203)；酯(US 5, 221, 670)；烷氧基酯(US 5, 233, 036)；O-芳基、-烷基、-链烯基、和-炔基醚(US 5, 258, 389)；碳酸酯(US 5, 260, 300)；芳基羰基和烷氧基羰基氨基甲酸酯(US 5, 262, 423)；氨基甲酸酯(US 5, 302, 584)；羟基酯(US 5, 362, 718)；受阻酯(US 5, 385, 908)；杂环酯(US 5, 385, 909)；偕-二取代的酯(US 5, 385, 910)；氨基链烷酸酯(US 5, 389, 639)；磷酰基氨基甲酸酯(US 5, 391, 730)；氨基甲酸酯(US 5, 411, 967)；氨基甲酸酯(US 5, 434, 260)；脒基氨基甲酸酯(US 5, 463, 048)；氨基甲酸酯(US 5, 480, 988)；氨基甲酸酯(US 5, 480, 989)；氨基甲酸酯(US 5, 489, 680)；受阻 N-氧化物酯(US 5, 491, 231)；生物素酯(US 5, 504, 091)；O-烷基醚(US 5, 665, 772)；和雷帕霉素的 PEG 酯(US 5, 780, 462)。在上面所列的专利中公开了这

些酯和醚的制备。

在 US 5,256,790 中公开了优选的雷帕霉素 27-酯和醚，该专利在这里被引入作为参考。在上面所列的专利中公开了这些酯和醚的制备。

在 US 5,373,014、5,378,836、5,023,264 和 5,563,145 中公开了优选的雷帕霉素的肟、腙、和胍，这些专利在这里被引入作为参考。在上面所列的专利中公开了这些肟、腙、和胍的制备。在 5,023,263 中公开了 42-氧代雷帕霉素的制备，该专利在这里被引入作为参考。

特别优选的雷帕霉素类物质包括雷帕霉素 [US 3,929,992]、CCI-779 [雷帕霉素与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸形成的 42-酯 [US 5,362,718]、和 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素 [US 5,665,772]。

当应用时，当雷帕霉素包含适宜的碱性部分时，可以与有机酸和无机酸形成雷帕霉素的可用盐，其中所说的酸例如醋酸、丙酸、乳酸、枸橼酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、丙二酸、苦杏仁酸、苹果酸、邻苯二甲酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、樟脑磺酸、以及类似公知可用的酸。当雷帕霉素包含适宜的酸性部分时，还可以与有机和无机碱形成盐，如碱金属盐（例如，钠、锂或钾盐）、碱土金属盐、铵盐、在各烷基中包含 1-6 个碳原子的烷基铵盐或在各烷基中包含 1-6 个碳原子的二烷基铵盐、以及在各烷基中包含 1-6 个碳原子的三烷基铵盐。

优选地，用于本发明的抗肿瘤组合的 mTOR 抑制剂是雷帕霉素，并且该 mTOR 抑制剂更优选地是雷帕霉素、CCI-779、或 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素。

正如这里所描述的这样，在本发明的 mTOR 抑制剂加抗代谢物的组合中将 CCI-779 评价为一种有代表性的 mTOR 抑制剂。

在 US 5,362,718 中对 CCI-779 的制备进行了描述，该专利在这里被引入作为参考。当 CCI-779 被用作抗肿瘤剂时，当以日剂量方案（每天给药，连续给药 5 天，每隔 2-3 周进行一次该类给药）为基础时，将其初始的静脉输入剂量设计为约 0.1 至 100 mg/m²，并且当以每周给药一次的剂量方案为基础进行给药时，该剂量为约 0.1 至 1000 mg/m²。口服或静脉输入是优选的给药途径，并且更优选静脉内给药。

本发明所用的术语“抗肿瘤烷化剂”指的是在细胞中与许多富电

子的原子进行反应（或“烷基化”）从而形成共价键的物质。与其抗肿瘤活性有关的最重要的反应是与 DNA 碱基的反应。一些烷化剂是单官能团的烷化剂，其仅可以与 DNA 的一条链进行反应。其它一些是双官能团的，可以与 DNA 两条链中每一条链上的原子进行反应从而形成一种 DNA 双螺旋的两条链共价结合的“交联”。除非被修复，否则这种损害将使得细胞不能有效进行复制。单官能团烷化剂的致死性是由于对 DNA 细胞受损性损害的识别和细胞对该损害的反应而产生的。

(Colvin OM. 抗肿瘤烷化剂. *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 第 6 版, 主编: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2001, 363 页.)

通常根据抗肿瘤烷化剂的结构和反应部分将其分成几类，其包括氮芥类，如二氯甲二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、和苯丁酸氮芥；azidines 和环氧化物，如噻替派、丝裂霉素 C、二去水卫矛醇、和二溴卫矛醇；烷基磺酸酯类，如白消安；亚硝基脲类，如卡莫司汀 (BCNU)、环己基-氯乙基亚硝基脲 (CCNU)、和甲基环己基氯乙基亚硝基脲 (MeCCNU)；胍和三嗪衍生物，如甲苄胍、达卡巴嗪、和替莫唑胺；以及铂化合物。铂化合物是包含优先在鸟嘌呤和腺嘌呤残基的 N7 位上进行反应以形成各种单官能团和双官能团加合物的物质的铂。(Johnson SW, Stevenson JP, O'Dwyer PJ. 顺铂及其类似物. 在 *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 第 6 版中, 主编 DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2001. 378 页.) 这些化合物包括顺铂、卡铂、铂 IV 化合物、以及多核的铂络合物。

下面是本发明抗肿瘤烷化剂有代表性的实例。

二氯甲二乙胺可以以可注射形式 (MUSTARGEN) 通过商业途径获得。

环磷酰胺可以以可注射形式 (环磷酰胺, 冷冻干燥的 CYTOXAN、或 NEOSAR) 和口服片剂的形式 (环磷酰胺或 CYTOXAN) 通过商业途径获得。

异环磷酰胺可以以可注射的形式 (IFEX) 通过商业途径获得。

美法仑可以以可注射的形式 (ALKERAN) 和口服片剂的形式 (ALKERAN) 从商业途径获得。

苯丁酸氮芥可以以口服片剂的形式 (LEUKERAN) 通过商业途径获得。

噻替派可以以可注射的形式 (噻替派或 THIOPLEX) 通过商业途径获得。

丝裂霉素可以以可注射的形式 (丝裂霉素或 MUTAMYCIN) 通过商业途径获得。

白消安可以以可注射的形式 (BUSULFEX) 和口服片剂的形式 (MYLERAN) 通过商业途径获得。

罗氮芥 (CCNU) 可以以口服胶囊的形式 (CEENU) 通过商业途径获得。

卡氮芥 (BCNU) 可以以颅内植入物的形式 (GLIADEL) 和可注射的形式 (BICNU) 通过商业途径获得。

甲苄肼可以以口服胶囊的形式 (MATULANE) 通过商业途径获得。

替莫唑胺可以以口服胶囊的形式 (TEMODAR) 通过商业途径获得。

顺铂可以以可注射的形式 (顺铂、PLATINOL、或 PLATINOL-AQ) 通过商业途径获得。

卡铂可以以可注射的形式 (PARAPLATIN) 通过商业途径获得。

下表简要地概括了一些上面所列抗肿瘤烷化剂的推荐剂量。

表 1. 抗肿瘤烷化剂的推荐剂量

药物	剂量	方案
二氯甲二乙胺	0.4 mg/kg	各过程以 0.1 至 0.2 mg/kg/天的单剂量或分隔剂量来进行
环磷酰胺	40-50 mg/kg , i. v. 10-15 mg/kg, i. v. 3-5 mg/kg, i. v. 1-5 mg/kg, 口服	在 2-5 天时间内以分隔剂量进行 每隔 7-10 天给药一次 每周给药两次 每天
异环磷酰胺	1.2 g/m ² , i. v.	连续 5 天每天给药; 每隔 3 周重复进行一次或在血液毒性恢复后重复进行

美法仑	6 mg, 口服 10 mg, 口服 0.15 mg/kg, 口服 16 mg/m ² , i. v.	2-3 周内每天给药, 之后间隔 4 周, 然后每天 2 mg 维持剂量 7-10 天内每天给药, 之后在血细胞计数恢复后每天 2 mg 维持剂量 7 天内每天给药, 之后停药至少 14 天, 然后每天以 0.005 mg/kg 的日剂量维持 每隔 2 周输注一次, 在 15-20 分钟内给药, 给药四次, 之后为休息期, 然后以四周的间隔进行给药以进行维持
苯丁酸氮芥	0.1-0.2 mg/kg, 口服	每天给药, 给药 3-6 周
噻替派	0.3-0.4 mg/kg, i. v.	每隔 1-4 周给药一次
丝裂霉素	20 mg/m ² , i. v.	每隔 6-8 周给药一次
白消安	1.8 mg/m ² , 口服	每天给药
罗氮芥	130 mg/m ² , 口服	每隔 6 周给药一次
卡氮芥	150-200 mg/m ² , i. v.	每隔 6 周给药一次
甲苡胍	2-4 mg/kg, 口服 1-2 mg/kg, 口服	第一周每天给药, 然后 4-6 mg/kg 直至获得最大反应 维持
替莫唑胺	150 mg/m ² , 口服	5 天内每天给药一次, 每 28 天为一个治疗周期
顺铂	20 mg/m ² , i. v. 75-100 mg/m ² , i. v.	每个周期内 5 天每天给药一次 每隔四周的周期给药一次
卡铂	360 mg/m ² , i. v.	每隔四周的周期给药一次

本发明优选的 mTOR 抑制剂加抗肿瘤烷化剂的组合包括 CCI-779 加顺铂; CCI-779 加环磷酰胺; CCI-779 加卡铂; 和 CCI-779 加 BCNU。

用 CCI-779 作为代表性 mTOR 抑制剂,在体外和体内标准药理学方法中用 CCI-779 加顺铂; CCI-779 加环磷酰胺; 和 CCI-779 加 BCNU 作为本发明有代表性的组合对该 mTOR 抑制剂加抗肿瘤烷化剂组合的抗肿瘤活性进行了确证。下面对所用方法和所得结果简要进行了描述。

用人横纹肌肉瘤系 Rh30 和 Rh1 以及人成胶质细胞瘤系 SJ-GBM2 来进行 CCI-779 和烷化剂的体外组合研究。体内研究使用的是人成神经细胞瘤 (NB1643) 和人结肠癌系 GC3。

测定各种感兴趣的药物的剂量响应曲线。将细胞系 Rh30、Rh1 和 SJ-G2 分别以 6×10^3 、 5×10^3 和 2.5×10^4 个细胞/孔的数量接种在一种 6 孔平板上。在将其培养 24 小时后,将药物加入到用于 Rh30 和 Rh1 的 10% FBS+RPMI 1640 中或加入到用于 SJ-G2 的 15% FBS+DME 中。在将其与包含药物的培养基接触 7 天后,通过用低渗溶液,然后用一种洗涤剂对细胞进行处理来使核被释放出来。然后用 Coulter 计数器对核进行计数。将实验结果作图并通过外推测定出各药物的 IC_{50} (对生长产生 50% 抑制的药物浓度)。因为实验与实验之间的 IC_{50} 值略有不同,所以在相互作用的研究中使用将各药物的 IC_{50} 括在一起的两个值。当其以 1: 1 的比例存在时如果相同主干 (isobole) 是标准形状,则出现两种药物之间相互作用的最大点。因此,将 CCI-779 三种接近的 IC_{50} 浓度各自分别以 1: 1 的比例与顺铂、BCNU 与苯丙氨酸氮芥三种相近的 IC_{50} 中的各种进行混合。其产生了九种 1: 1 的各实验药物加 CCI-779 三种 IC_{50} 浓度和其它药物的组合。对包含 IC_{50} 值的各药物而言,这种方案通常产生至少一种组合。然后,用 Berenbaum's 公式: $x/X50+y/Y50=1, <1, >1$ 来计算 CCI-779 各 IC_{50} 浓度和各种化疗药物 1:1 的组合的相加性、协同作用或拮抗作用。如果单独进行试验的 CCI-779 的三种浓度没有产生与其它单独进行试验的化合物的三种 IC_{50} 中任何一种相匹配的 IC,则对所有 1: 1 的组合都进行检查以查看是否其 IC 值落在分别进行试验的药物的适宜 IC 值之间。如果的确如此,则认为该作用具有加和性。

在体外标准药理学试验操作中所得的结果表明,当用 Rh30 肿瘤系进行试验时,CCI-779 加顺铂的组合具有协同性;对抗 Rh1 肿瘤细胞系时该组合的作用高于加和性但在数学上却没有达到协同性,并且在对抗 SJ-G2 肿瘤细胞系时具有加和性。CCI-779 加 BCNU 的组合在对抗

SJ-G2 肿瘤细胞系时具有协同性, 对抗 Rh30 细胞系时其高于加和性但是在数学上却没有达到协同性水平, 并且在对抗 Rh1 细胞系时具有加和性。CCI-779 加苯丙氨酸氮芥的组合对抗各种细胞系都有加和性。

通过胸腺切除术使 4 周大的雌性 CBA/CaJ 小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 丧失免疫, 然后在 3 周后用 ^{137}Cs 源对其进行整体放射 (1200 cGy)。在放射后 6-8 小时小鼠接受 3×10^6 个有核的骨髓细胞。将约 3 mm^3 的肿瘤块移植到小鼠的背侧肋腹腔中以使肿瘤开始生长。在开始进行治疗前将带瘤小鼠随机分成七组。当肿瘤直径达到约 0.20-1 cm 时, 给各带瘤小鼠进行给药。用与计算机相接的数字游标卡钳以 7 天的间隔对肿瘤大小进行测量。假定肿瘤是球形, 用公式 $[(\pi/6) \times d^3]$ 来计算肿瘤体积, 其中 d 是平均直径。根据连续给药 5 天, 两周给药的时间表将 CCI-779 进行给药, 每隔 21 天重复进行这种周期, 进行 3 个周期。这使得 CCI-779 在第 1-5、8-12 天 (周期 1); 第 21-25、28-32 天 (周期 2); 和第 42-46、49-53 天 (周期 3) 时被进行给药。各研究其它化疗药物给药的时间表如下:

环磷酰胺在第 1 天和第 8 天进行给药, 每 21 天重复进行这种周期, 进行 3 个周期

用人横纹肌肉瘤 (Rh18), 用上述的小鼠异种移植试验法对 CCI-779 和环磷酰胺的组合进行了评估。在这种试验操作中, CCI-779 与环磷酰胺 (44 mg/kg) 的作用具有加和性。当以不是最理想的剂量进行联用时, CCI-779 加环磷酰胺等于以最佳剂量进行给药的环磷酰胺。

根据这些标准药理学试验操作的结果, mTOR 抑制剂加抗肿瘤烷化剂的组合可用于抗肿瘤治疗。更特别地是, 这些组合可用于治疗肾癌、软组织癌、乳癌、肺的神经内分泌肿瘤、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、黑素瘤、小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、食道癌、胃癌、白血病、结肠直肠癌、和未知的原发性癌。因为这些组合包含至少两种活性抗肿瘤剂, 所以该类组合的应用也提供了其中所说物质中的一种或两种是以亚治疗有效剂量进行使用的各物质组合的应用, 从而降低了与各化疗剂有关的毒性。

在进行化疗时,具有不同作用形式的多种物质一般是作为化疗“鸡尾酒”的一部分来进行使用的。可以预见本发明的组合将用作化疗鸡尾酒的一部分,其中所说的化疗鸡尾酒可根据所治疗的瘤形成的性质而包含一种或多种另外的抗肿瘤剂。例如,本发明还涉及该 mTOR 抑制剂/烷化剂组合与其它化疗剂联合的应用,其中所说的其它化疗剂如抗代谢物(即,5-氟尿嘧啶、氟尿苷、硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、6-巯嘌呤、氯甲蝶呤、吉西他滨、capecitabine、喷司他丁、三甲曲沙、或克拉曲滨);激素类物质(即,雌莫司汀、他莫昔芬、托瑞米芬、anastrozole、或来曲唑);抗生素(即,普卡霉素、博莱霉素、米托蒽醌、伊达比星、更生霉素、丝裂霉素、或柔红霉素);免疫调节剂(即,干扰素、IL-2、或 BCG);抗有丝分裂剂(即,长春碱、长春新碱、替尼泊苷、或维诺利宾);拓扑异构酶抑制剂(即,托泊替堪、伊立替康、依托泊苷、或阿霉素);和其它物质(即,羟基脲、trastuzumab、六甲蜜胺、retuximab、紫杉醇、docetaxel、L-天门冬酰胺酶、或 gemtuzumab ozogamicin)。

本发明所用的组合方案可以同时进行给药或可以以交错方案进行给药,所说的交错方案是 mTOR 抑制剂在除烷化剂外的化疗过程中在不同的时间进行给药。两种物质给药之间的这种时间差异可以为几分钟、几小时、几天、几星期或更长的时间。因此,术语“组合”不一定指的是同时或以单一剂量形式给药,而是各组分可以在所需治疗时期进行给药。所说的物质还可以通过不同的途径来进行给药。例如,在 mTOR 抑制剂加烷化剂的组合中,预见到 mTOR 抑制剂可以进行口服或胃肠外给药,优选胃肠外给药,而烷化剂可以通过胃肠外、口服或其它可接受的方法进行给药。这些组合可以被每天给药、每周给药一次或甚至每月给药一次。作为典型的化疗方案,可以在几星期后重复进行化疗过程,并且可以按照相同的时间范围来进行两种物质的给药,或可以根据患者的反应进行修改。

正如化疗中通常所做的那样,由进行治疗的医生根据许多因素对该剂量方案进行密切监督,其中所说的因素包括疾病的严重程度、疾病的反应、任何与治疗有关的毒性、患者的年龄、健康情况和其它并发症或治疗。

根据用 CCI-779 加烷化剂的组合所得的结果,将 mTOR 抑制剂最初

的静脉内输入剂量设计为约 0.1 至 100 mg/m²，优选地为约 2.5 至 70 mg/m²。还优选地通过静脉内给药来将该 mTOR 抑制剂进行给药，一般在 30 分钟内将其进行给药，并且每星期给药大约一次。烷化剂组分的初始剂量将取决于所用的组分，并且开始将以医生对所选择物质的经验为基础。在一个或多个治疗周期后，可以根据所得的结果和所观测到的副作用来上调或下调该剂量。

对于可通过商业途径获得的烷化剂而言，可以使用现有的剂型，可以根据需要对剂量进行分配。或者，可以根据标准的药学操作对该类物质或不能通过商业途径获得的烷化剂进行配制。包含本发明活性化合物的口服制剂可包括任何常用的口服形式，包括片剂、胶囊剂、颊剂、糖锭剂、锭剂和口服液体（混悬液或溶液）。胶囊剂可以包含活性化合物（多种活性化合物）的混合物和惰性填充剂和/或稀释剂如可药用的淀粉（例如玉米、马铃薯或木薯淀粉）、糖、人造甜味剂、粉状纤维素，如结晶纤维素和微晶纤维素、面粉、明胶、树胶等等。有用的片剂制剂可以通过常规的压缩、湿法制粒或干法制粒来进行制备，并可以使用可药用的稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、表面改性剂（包括表面活性剂）、混悬剂或稳定剂，其非限制性地包括硬脂酸镁、硬脂酸、滑石粉、月桂基硫酸钠、微晶纤维素、羧甲基纤维素钙、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、海藻酸、阿拉伯胶、黄原胶、枸橼酸钠、复合硅酸盐、碳酸钙、甘氨酸、糊精、蔗糖、山梨醇、磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露醇、氯化钠、滑石粉、干淀粉和粉状糖。优选的表面改性剂包括非离子和阴离子表面改性剂。表面改性剂的代表性实例非限制性地包括泊洛沙姆 188、苯扎氯铵、硬脂酸钙、十六/十八烷醇、cetomacrogol 乳化蜡、脱水山梨醇酯、胶体二氧化硅、磷酸酯、十二烷基硫酸钠、硅酸镁铝、以及三乙醇胺。本文的口服制剂还可以利用标准的延迟或定时释放制剂以改变活性化合物（多种活性化合物）的吸收。该口服制剂还可以包括使用在水或果汁中的活性成分，其中可以根据需要包含增溶剂或乳化剂。

在一些情况中希望将该化合物以气雾剂的形式直接给药于气管。

该化合物还可以通过胃肠外给药或腹膜内给药来进行给药。这些游离碱或可药用盐形式的活性化合物的溶液或混悬液可以在适宜地混有表面活性剂如羟丙基纤维素的水中进行制备。还可以在甘油、液态

聚乙二醇以及其油类混合物中来进行分散体的制备。在普通的储存和应用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

适于注射应用的药物形式包括无菌的水性溶液或分散体和用于该无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。在所有的情况中，该形式必需是无菌的，并且必需具有一定的流动性以具有较好的可注射性。其在制造和储存条件下必需稳定并且必需能防止微生物如细菌和真菌的污染作用。其载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇）、其适宜的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。

对于本发明的目的而言，经皮给药应被理解为包括所有通过身体表面和包括表皮和粘膜组织在内的机体通道的内部层进行的给药。该类给药可以用本发明的化合物或其可药用的盐以洗剂、霜剂、泡沫、混悬液、溶液和栓剂（直肠和阴道栓）的形式来进行。

经皮给药可以通过使用包含该活性化合物和载体的经皮贴片来完成，其中所说的载体对该活性化合物而言是惰性的，对皮肤无毒并且可以使得所说的物质通过皮肤吸收入血液进行全身给药。该载体可以是任何形式如霜和软膏、糊剂、凝胶、和闭合装置。霜和软膏可以是水包油或油包水型的粘性液态或半固态乳液。由分散在包含该活性成分的石油或亲水性石油中的吸收性粉末所组成的糊剂也是适用的。可以使用各种闭合装置将该活性成分释放到血液中，所说的装置如覆盖着包含该活性成分并包含或不包含载体的储库、或包含该活性成分的基质的半透膜。其它闭合装置在文献中是已知的。

栓剂制剂可以用传统的材料来进行制备，包括椰子油（可以向其中加入或不加入蜡以改变栓剂的熔点）以及甘油。还可以使用水溶性的栓剂基质如各种分子量的聚乙二醇。