

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/59
A61P 35/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98806760.9

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1154497C

[22] 申请日 1998. 6. 10 [21] 申请号 98806760. 9
[30] 优先权
[32] 1997. 6. 10 [33] AU [31] P07270
[86] 国际申请 PCT/AU1998/000440 1998. 6. 10
[87] 国际公布 WO1998/056387 英 1998. 12. 17
[85] 进入国家阶段日期 1999. 12. 30
[71] 专利权人 MRC 控股有限公司
地址 澳大利亚新南威尔士州
[72] 发明人 戴维·劳森·莫利斯
审查员 赵 超

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 12 页

[54] 发明名称 治疗肝脏肿瘤的方法和其中所用的
药学组合物

[57] 摘要

本发明涉及治疗受试者肝脏中肿瘤的方法。
此方法涉及向肝脏区域性运送维生素 D 化合物，例
如经肝动脉进行动脉灌注。 本发明还涉及适于这
类治疗的组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 选自维生素 D₃、1,25-二羟胆钙化甾醇、22-氧杂骨化三醇、钙泊三醇和 1 α .25(OH)₂.22.24 二烯 24.26.27 三高 D₃ 的至少一种维生素 D 化合物在制备用于治疗受试者肝脏中肿瘤的药物中的用途，其中所述药物为向肝脏局部运送的形式的药物。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述药物为经动脉或肝门静脉运送的药物。

3. 权利要求 2 的用途，其中所述药物为经肝动脉灌注运送的药物。

4. 前述权利要求中任一项的用途，其中所述药物为含维生素 D 化合物和药学可接受的油的组合物形式。

5. 权利要求 4 的用途，其中药学可接受的油为一种碘化油。

6. 权利要求 5 的用途，其中该碘化油为碘油。

7. 前述权利要求 1~3 之任一项的用途，其中所述肿瘤为原发性肝癌。

8. 权利要求 7 的用途，其中所述癌为肝细胞癌。

9. 权利要求 1~3 任一项的用途，其中所述肿瘤为继发性肝癌。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述癌为选自下组的癌的转移癌：结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌或肾癌。

11. 权利要求 9 的用途，其中所述继发性肝癌为肉瘤。

12. 前述权利要求 1~3 之任一项的用途，其中维生素 D 化合物为 1,25(OH)₂D₃。

13. 前述权利要求 1~3 之任一项的用途，其中所述药物为与能增强维生素 D 受体表达的化合物一起施用的药物。

14. 权利要求 13 的用途，其中能增强维生素 D 受体表达的化合

物为雌激素受体拮抗物。

15. 权利要求 14 的用途，其中该化合物为三苯氧胺。

16. 前述权利要求 1~3 之任一项的用途，其中所述药物为与一项或多项其它抗癌治疗一起施用的药物。

17. 权利要求 16 的用途，其中其它抗癌治疗选自放疗或化疗。

治疗肝脏肿瘤的方法和其中所用的药学组合物

本发明涉及治疗肿瘤的方法，并特别涉及治疗肝脏中的肿瘤的方法。本发明还涉及适于这类治疗的组合物。

肝细胞癌（原发性肝癌）世界上癌症死亡的最常见原因之一，估计每年全世界发病率为 100 万(Lencioni R & Bartolozzi C, 癌症杂志, 第 10 卷, 1-6 页)。尽管现在在西方这种病变得越来越引人注意，但在亚洲国家它是最常见的，而且各国发病率也很不一样。目前尚无有效治疗方法可供选择。若不经治疗，这种情况下的平均存活期为 3 个月。肝切除也许能让近 40% 的病例拥有 5 年存活期，但几乎没有病人具备进行这种治疗所需的条件。全身化疗对原发性肝癌的治疗效果很有限，而目前还不断有人在尝试采用经动脉化学成栓技术(TAE)直接将具有药理学活性的试剂运送至肝脏。TAE 将试剂经肝动脉向肝肿瘤的选择性运送和因此而在肿瘤中的浓缩与肿瘤的栓塞形成和因此而由局部缺血所致坏死结合在一起。很多化疗剂通过这种方式运送，包括阿霉素、表阿霉素和顺式铂氨(Choi, 癌症控制杂志, 卷 3, 407-413 页, 1996)。化疗剂常用造影剂碘油（一种碘标记的罂粟籽油脂肪酸乙酯）乳化或溶解。肿瘤对碘化油的吸收被认为将延长化疗剂与肿瘤接触的时间，而介质的不透射线特点使得有可能以放射照相术监控灌注的进展。

维生素 D 是由活化的 5-碳单位组成的一种类异戊二烯。维生素 D 的最常见形式是维生素 D₃、或胆钙化固醇。维生素 D₃ 在胆固醇生在肝脏中物合成的中间产物 7-脱氢胆固醇的生物合成中产生。维生素 D₃ 在肝脏中经代谢转化成血液循环中维生素 D 的主要形式 25-羟胆钙化固醇[25(OH) D₃]。25(OH) D₃ 经肾脏转化产

生两种主要的二羟化代谢产物，即 1,25-二羟胆钙化固醇[1,25(OH)₂D₃]和 24,25-二羟胆钙化固醇[24R,25(OH)₂D₃]。

1,25(OH)₂D₃ 是维生素 D₃ 的生物学活性最强的天然形式，它经血流转运至其位于肠粘膜细胞中的主要作用位点，也是钙吸收的受刺激处。因此维生素 D₃ 可看成一种激素原，因为它将转化成作用类似于类固醇激素的一种代谢物。它尤其在骨的无机质合成中调节钙和磷酸的代谢。

1,25(OH)₂D₃ 和维生素 D₃ 的其它一些类似物在治疗时用于抵消维生素 D 膳食性缺乏（佝偻病）的有害效应，或用于治疗以维生素 D 的合成或应答异常为特征的疾病如血磷酸盐过少性抗维生素 D 佝偻病和肾性骨营养不良症（肾病性佝偻病）。另一项在钙化相关性疾病骨质疏松症中的应用与确信的维生素 D 营养充足截然不同。此时的基本原则是直接抑制甲状旁腺的功能并减少骨质更新 (Goodman & Gilman, 治疗的药理学原理, 1992 年出版, The McGraw Hill Companies Inc.)。最后，一项维生素 D₃ 的最新应用是治疗皮肤病牛皮癣。

实验性研究显示维生素 D₃ 受体出现在多种细胞类型上，因此认为维生素 D 内分泌系统参与对很多并非直接涉及内环境钙平衡的基础性细胞加工的调节(Pols, HAP 等, 类固醇生物化学杂志, 卷 37, 873- 876 页, 1990)。在携带维生素 D₃ 受体的细胞中很多是恶性肿瘤组织或衍生自肿瘤的细胞系。一些癌细胞上受体的出现在很多病例中显示有功能性意义，而且文献中包含关于维生素 D₃ 及其类似物能抑制黑色素瘤、骨肉瘤和乳腺癌细胞 (Deluca HF & Ostrem V, 实验医学和生物学进展, 卷 206, 413-429 页, 1986)、结肠腺癌细胞(Cross HS 等营养学杂志, 卷 127 增刊, 2004—2008 页, 1995)和肝肿瘤细胞(Tanaka Y 等, 生化药理学, 卷 38, 449—453 页, 1989) 增殖的报道。

这一体外效应使人对维生素 D₃ 及其类似物在癌症治疗中的应

用产生希望。维生素 D₃ 化合物被列归“非传统性癌症疗法”（British Columbia Cancer Agency publication; 600 West 10th Ave, 温哥华, BC, 加拿大），已有人尝试临床试验以显示效应。不幸的是，应用维生素 D₃ 的天然类似物如 1,25(OH)₂D₃ 的尝试与癌症的成功治疗无关，而且事实上很少有人尝试。这主要是由于发现由维生素 D₃ 引起的癌症细胞生长的减少必需前生理学(supraphysiological)浓缩（Pols 等—出处同上）。这样做的结果是在维生素 D₃ 表达其治疗的抗肿瘤特性之前，它在体内钙平衡中的效应将过量表达并达到危险水平，导致高钙血症，有危及生命的毒性。

在一项为克服此问题，并将维生素 D₃ 的高钙血症效应从其对细胞分化的作用中分离而进行的尝试中，制药业作出很大的努力寻找可避免钙代谢效应并可能因此而有益于癌症或其它疾病治疗的合成类似物。这一尝试已取得一些有限的成功。例如，包含一个 22-23 双键、一个 24(S)-羟基功能性基团、而且碳 25-27 已掺入环丙烷的环中的类似物钙泊三醇已经合成。该化合物具有与 1,25(OH)₂D₃ 相似的受体亲和力，但其调节钙代谢的活性不足 1,25(OH)₂D₃ 的 1%。钙泊三醇作为牛皮癣的潜在治疗剂已进行了深入研究（Goodman & Gilman, 治疗的药理学原理， McGraw Hill 出版，1992）。尽管钙泊三醇在钙代谢中的效应已减小，它仍然主要用于避免全身性高钙血症。声称对钙代谢的效应减小、可用于肿瘤治疗的合成性维生素 D 类似物实例也已经公开（美国专利第 4,891,364 号，1990 年 1 月 2 日）。也有人尝试局部治疗某些癌症。Bower M 等主要用钙泊三醇治疗乳腺癌（柳叶刀，卷 337: 8743 期，701-702 页）。所治疗的 19 例病人中，只有 3 例显示有明显应答，1 例有微弱应答。而且，尽管这种合成类似物对钙代谢的效应大大减小，又尽管治疗仅限于乳腺癌损伤部位的周围皮肤，19 例病人中仍有 2 例在治疗期间出现高钙血症。

因此，尽管基础研究者有令人感兴趣的发现，制药业也付出

了极大的努力，维生素 D 化合物在癌症治疗中的应用仍未成功。使维生素 D₃ 的应用如此困难的关键限制可以是活性的固有缺陷，也可以是较低的治疗指数（有效剂量对毒性剂量之比）。

我们惊讶地发现，向肝脏区域性运送维生素 D 化合物如维生素 D₃ 或其前体、代谢物或类似物，即使该维生素 D 化合物为高剂量也可避免高钙血症的产生。例如，不顾这样一个事实：口服和静脉施与 1,25(OH)₂D₃ 治疗的剂量通常在 0.5 至 3mcg/天（正处于有发生高钙血症的明显危险的水平之时或之外），我们显示（实施例 2）以至少 10mcg/天的剂量经动脉向肝脏给药未发现任何全身毒性。

这一发现的一个合理性结论是：施与如此高剂量的维生素 D 化合物后避免了高钙血症归因于维生素 D 化合物在肝脏中的停留时间延长，或在肝脏中降解（首过效应）。但这些现象因以下原因无一能进行预测：所提供的剂量远高于生理水平，并因此，尽管动脉输入可使维生素 D 化合物与携带维生素 D 受体的细胞接触，也不能指望它们能抓住所有维生素 D 化合物。关于降解作用，肝脏的主要代谢活性适于经肝门途径进入的化合物，不适于肝动脉。而且，如上所述，肝脏是活化维生素 D 的部位之一，不必指望它能从血液中清除维生素 D 化合物。维生素 D 化合物在肝动脉运送后诱导较低高钙血症的确切原因尚不清楚。

向肝脏区域性运送维生素 D₃ 不仅显示安全，而且在 7 例病人中有 4 例至少对治疗产生了有限的应答，就如他们的肿瘤标志物增长率所指示的那样。

因此，我们不仅证实了以区域性运送的方式向肝脏施与大剂量维生素 D 化合物的令人惊讶的能力，还获得了对疾病进展的有利影响的指征。

相应地，本发明的第一方面在于治疗受试者肝脏中肿瘤的方法，包括向受试者施与药学有效量的选自由维生素 D、维生素 D

的前体、或其代谢物或类似物组成之组合的至少一种维生素 D 化合物，其中该维生素 D 化合物向肝脏区域性运送。

维生素 D 化合物的区域性运送可通过动脉运送或经肝门静脉的运送实现。优选维生素 D 化合物经动脉运送。尤其优选维生素 D 化合物经肝动脉的动脉内灌注运送。

本发明的治疗方法可用于治疗原发性或继发性肝脏癌症。本发明的方法尤其适用于治疗受试者体内的肝细胞癌（原发性肝癌）。本发明的方法还可用于治疗肝脏中转移形式的继发性肝癌，例如，结直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌或肾癌的转移。继发性癌可能是肉瘤。本发明的方法可用于治疗肝脏中的原发性或继发性肝癌。

尽管维生素 D 化合物可为维生素 D₃ 的类似物，但优选为维生素 D₃ 或其前体或代谢物。

维生素 D 类似物化合物可选择任意适当的类似物，如 1,25(OH)₂D₃ (1,25-二羟胆钙化甾醇)、OCT(22-氧杂骨化三醇, 22-Oxacalcitriol)、MC903(钙泊三醇)、或 EB1089(1 α .25(OH)₂ 22.24 二烯 24.26.27 三高 D₃, 1 α .25(OH)₂ 22.24 diene 24.26.27 trihomo D₃)。

特别地，本发明提供了选自维生素 D₃、1,25-二羟胆钙化甾醇、22-氧杂骨化三醇、钙泊三醇和 1 α .25(OH)₂ 22.24 二烯 24.26.27 三高 D₃ 的至少一种维生素 D 化合物在制备用于治疗受试者肝脏中肿瘤的药物中的用途，其中所述药物为向肝脏局部运送的形式的药物。

维生素 D 的代谢物可以是维生素 D 或它的类似物的羟化或其它产物。

维生素 D 化合物对肿瘤的效应很大程度上依赖于药物剂量，因此向肿瘤运送高浓度维生素 D 化合物将十分有利。但维生素 D 化合物在传统载体如水性介质中的有限溶解使得可向肿瘤运送的化合物的量有上限。

我们发现很高浓度的维生素 D 化合物如 1,25(OH)₂D₃ 可通过将化合物溶解在制药可接受的油中而获得。例如 1,25(OH)₂D₃ 2mg 易溶于碘油 1ml 中。这种高溶解性可以使向肿瘤运送的维生素 D 化合物具有非常高的浓度。用油做维生素 D 化合物的载体的另一好处是一些油在某些肿瘤中浓缩，从而可使维生素 D 化合物的肿瘤

浓度达到非常高。而且，获得高浓度的另一好处是，一些低浓度无活性的维生素 D 化合物当用油溶解时获得较高浓度而变得有活性。

相应地，本发明的第二方面在于第一方面的治疗方法，其中维生素 D 以溶于药学可接受之油中的维生素 D 化合物溶液形式运送。

油可以是碘化油如碘油，尽管显然碘的存在可能使灌注便于用放射照相术监控，但它并非油剂的必需特征。而且油剂只需(1)掺入大量维生素 D 化合物和(2)，若有必要，被所治疗的肿瘤吸收。因此，对于本领域的技术人员而言，载体也可包括其它油和制药业中用到的经化学修饰的油如 Cremophor(聚氧乙基化[polyoxyethylate]蓖麻油)。用于动脉内肿瘤治疗的油的实例公布于美国专利第 4,578,391 号，但该专利只涉及适用于灌注的保守性油可溶或水可溶抗肿瘤药物的溶解。已知用于静脉注射的制剂(由 Abbot 实验室出售的 Calcijex® calditiol 注射液，述于医师实用指南，出处同上，以及在美国专利第 4,308,264 号中所公布的制剂)均为水溶液，它们在癌症治疗中的应用尚未见报道。而且，它们的低钙三醇含量将使它们特别不适于经动脉向肝脏施用。更合适的载体包括能合并诸如脂质体和微乳剂(microemulsion)这样的亲脂物质的多组分系统。

三苯氧胺(一种雌激素受体拮抗物)已显示能显著但温和地改进人类肝癌的存活。它还显示能增加维生素 D 受体在乳腺癌细胞系中的表达。我们相信三苯氧胺对肝癌的作用可归因于它对维生素 D 受体表达的影响，使肿瘤对内源性维生素 D 更加敏感。故我们希望三苯氧胺和雌激素或雌激素样化合物能显著性增强对诸如肝癌这样的癌症的维生素 D 治疗效果并在使用低剂量维生素 D 化合物的同时显著性增强应答反应，从而避免高钙血症和其它并发症。

相应地在第三方面，本发明在于与本发明第一和第二方面一致的治疗方法，该方法进一步包括施用能增强维生素 D 受体表达的化合物。

可增强维生素 D 受体表达的化合物可能是三苯氧胺或其它雌激素或雌激素样化合物。

可增强维生素 D 受体表达的化合物可在施用维生素 D 化合物之前、之时或之后施用。

本发明的第四方面在于适于治疗肝脏中肿瘤的组合物，该组合物包括药学有效量的、选自下组的、溶于药学可接受的油中的维生素 D 化合物，该组合为：维生素 D、维生素 D 的前体、或其代谢物或类似物。

药学可接受的油为某种碘化油如碘化罂粟籽油。药学可接受的油可能是非碘化油，如罂粟籽油。

在图中：

图 1 显示 1,25 二羟维生素 D₃ 体外对肝癌 HepG2 细胞生长的影响。

图 2 显示 1,25 二羟维生素 D₃ 体外对人类结肠癌细胞 LoVo 处理 10 天后对其生长的影响。

图 3-7 显示按本发明的方法进行治疗期间病人血清钙水平之图。

图 8-9 显示按本发明进行治疗期间病人 CEA 水平之图。

图 10-11 显示第一和第二只猪分别经静脉和肝动脉灌注的钙水平。

图 12 显示 3H 维生素 D₃ 在水和碘油中的溶解度。

为使本发明更易于理解，我们提供以下非限制性实施例。

实施例 1—对人类肝癌细胞系体外生长的影响

对一定浓度范围的 $1,25(\text{OH})_2$ 维生素 D_3 对人类肝癌细胞系 HepG2 体外生长的影响进行了研究。生长抑制作用被肝癌细胞对胸苷吸收的减少所证实（见图 1）。这里所报道的抑制作用之大小令人惊奇，观察到对生长产生 95% 的抑制作用，尽管是剂量依赖型的（ 10^{-11}M 浓度则有效性明显减少）。虽然维生素 D 类似物已显示能抑制其它类型的癌症，但这是首次证实在肝癌中的作用。

我们发现对其它癌症抑制作用的大小，如对结直肠癌生长的 50-60% 抑制作用已算是较好应答（见图 2）。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对结直肠癌的作用比对比实验中所用类似物(EB1089)小，如下表所示。

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 EB1089 对人类结直肠癌细胞 LoVo 和人类肝癌 HepG2 细胞的作用。结果表示为相应于对照的百分数 $\pm$ SEM

浓度	LoVo		HepG2	
	D_3	EB1089	D_3	EB1089
10^{-7}M	34.2 ± 3.8	40.5 ± 10.7	7.1 ± 6.3	11.2 ± 2.7
10^{-8}M	53.1 ± 5.0	51.0 ± 10.3	8.6 ± 6.3	13.1 ± 2.8
10^{-9}M	74.2 ± 6.8	73.3 ± 11.7	13.8 ± 6.4	13.2 ± 2.7
10^{-10}M	96.5 ± 12.9	55.3 ± 13.7	56.6 ± 6.7	49.1 ± 2.9
10^{-11}M	127.4 ± 7.1	64.7 ± 12.7	105.6 ± 6.6	41.7 ± 3.6

用 D_3 或 EB1089 处理 LoVo 细胞 10 天，处理 HepG2 细胞 5 天。

维生素 D_3 类似物 EB1089 对其它肝癌细胞系的作用见下表。

细胞系	浓度				
	10^7 M	10^8 M	10^9 M	10^{10} M	10^{11} M
SK-Hep	34.8 ± 5.2	63.1 ± 16.2	52.1 ± 8.8	52.1 ± 8.6	82 ± 9.2
	46.6 ± 13.0	71.3 ± 11.8	61.6 ± 12.2	61.1 ± 16.6	78.8 ± 11.5
	79.2 ± 4.4	83.1 ± 4.2	88.4 ± 4.1	91.0 ± 4.5	118.3 ± 26.4
	60.1 ± 11.7	95.6 ± 12.2	103.1 ± 12.4	103.8 ± 11.7	66.9 ± 36.9
Hep 1-6	56.1 ± 7.2	63.9 ± 7.0	78.1 ± 11.4	110.8 ± 13.8	103.4 ± 9.2
	118.9 ± 11.1	113.4 ± 5.6	106.7 ± 5.4	103.5 ± 4.5	98.1 ± 4.3
HTC	57.9 ± 7.2	63.9 ± 12.5	97.4 ± 13.8	107.8 ± 12.7	95.9 ± 13.0
	95.3 ± 17.7	86.9 ± 15.0	100.4 ± 15.4	113.0 ± 22.1	98.8 ± 15.5
NovoKoff	91.5 ± 14.5	106.0 ± 18.1	103.7 ± 13.8	116.3 ± 22.1	131.0 ± 15.9
	84.6 ± 17.0	79.0 ± 18.4	95.4 ± 18.2	94.0 ± 21.4	92.6 ± 17.6
Morris	136.0 ± 12.5	134.0 ± 13.3	117.8 ± 11.7	118.0 ± 11.9	118.0 ± 14.3
	80.1 ± 5.2	83.3 ± 4.7	79.1 ± 4.9	88.3 ± 3.9	90.8 ± 5.9
PCL	98.5 ± 4.5	101.6 ± 11.5	98.3 ± 6.5	92.5 ± 6.6	102.5 ± 10.0
	106.0 ± 9.1	105.2 ± 4.9	95.1 ± 3.3	100.1 ± 2.1	95.9 ± 2.9

(所用实验均在 5% 活性炭处理的培养基中进行。均为 5 天。
每一细胞系的系列结果为重复实验的结果)

作用速度也很不同，肝癌中在 24 小时测得抑制作用而结直肠癌中的作用较缓和，在 5 天时测得并且通常只到第 10 天便清除。

维生素 D_3 和其类似物在肝癌中所获效应比其它癌症大如此之多的机制，我们相信是由于肝癌细胞产生了活性代谢物。

实施例 2—测定 $1,25(OH)_2D_3$ 的首过效应

已知象 calcitriolic acid 和其它种种偶联化合物的主要排泄途径是在胆汁中。我们假设如果限制 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 以免达到较高的全身浓度并因此造成高钙血症，肝脏中的这一分解代谢将导致首过效应。

进行了两项试验以测定这种首过效应是否存在，以及在临床上是否有用。试验是这样的：

1. 进行一期临床试验观察肝动脉灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的效果。
2. 建立猪动物模型比较 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 静脉施与与静脉灌注的效果。

这些试验的方法和结果概述如下：

一期临床试验

进行了肝动脉灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 给药的一期临床试验。

动物

1. 确立 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 肝动脉灌注治疗肝脏癌症的安全性，尤其是它对血清钙水平的影响。
2. 通过监控肿瘤标志物水平及其上升率调查这种灌注对肝脏癌症的影响。

受试者：

有肝癌或有结直肠癌转移、对目前化疗方案不能应答的病人共 7 例。

受试者的详细情况见下表：

编号	年龄	性别	肿瘤	肝外疾病/并发症
1	62	女	结直肠癌	肺转移
2	73	男	肝癌	无
3	42	男	结直肠癌	无
4	72	女	结直肠癌	梗阻性黄疸，内置模具可部分缓解
5	57	男	结直肠癌	无
6	75	男	结直肠癌	肺转移，梗阻性黄疸，可由内置模具缓解

7	57	男	结直肠癌	梗阻性黄疸，内置模具可部分缓解
---	----	---	------	-----------------

治疗概述见下表：

病人 编号	第一期		第二期		第三期		第四期		第五期	
	剂量 (mcg/ 天)	天数	剂量 (mcg/ 天)	天数	剂量 (mcg/ 天)	天数	剂量 (mcg/ 天)	天数	剂量 (mcg/ 天)	天数
1	0.02	4	0.05	3						
2	0.02	4	0.05	3						
3	2	4	5	24	0	35	10	8	15	3
4	0.5	8	2	8	5	10				
5	2	5	5	21	0	35	10	4	15	10
6	2	4	5	23	0	25	10	4	15	3
7	2	3	5	26						

方法：

每例病人经肝动脉导管灌注 1,25(OH)₂D₃ 一周或连续四周。定期分析 LFT、UEC、钙和磷酸盐水平、AFP 或 CEA 水平。

病人 1 和 2 首先给予 1,25(OH)₂D₃ 0.2mcg/天或 4 天，然后 0.5mcg/天又 3 天，均通过临时肝动脉导管给予。

病人 3、5 和 6 首先给予 2mcg/天，再 5mcg/天持续 4 周。休息 4 周使受到诱导的任何肝脏酶类均减少后，重新开始以 10mcg/天的剂量进行治疗，并迅速将剂量提高到 15mcg/天。

病人 4 由于在治疗前有 paraneoplastic 现象而发生高钙血症，因此给予较低剂量。始于 0.5mcg/天，迅速增加到 2mcg/天，然后增加到 5mcg/天。

病人 7 开始实行与病人 3、5 和 6 一样的剂量方案，但在开始 10mcg/天的剂量治疗之前因病情恶化而终止试验。

结果测量：

钙水平—反映高钙血症的进展

CEA 或 AFP 水平—反映肿瘤对治疗产生应答的证据

UEC 和 LFT—反映对肝功能和肾功能的不期望的影响。

结果:

7 例病人完成了全部试验。无一例病人对灌注出现任何不期望的不利反应或副作用。也无一例病人出现肝功能和肾功能的紊乱。

病人 1 或 2 均未在低剂量治疗期间出现高钙血症（结果未显示）。

图 3 中带点的线表示血清钙的正常范围。受试者 1 和 2 于 0—7 天接受治疗。受试者 3—7 于 0—28 天接受治疗。

图 3 和 4 证实以 5mcg/天肝动脉灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 不会导致高钙血症。正如图 3 所证实，治疗前已有高钙血症的病人治疗时钙水平并未升高。

图 5、6 和 7 证实高达 10mcg/天的剂量可通过该途径给予而不会产生高钙血症。这些图还显示 3 例接受 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 15mcg/天的病人中有 2 例发生高钙血症。

图 8 和 9 具体描述了所有 7 例病人的肿瘤标志物应答。正如图 7 所见，病人 1 的标志物水平在治疗开始时戏剧性地上升，但随后又戏剧性地以相同方式回落。病人 2 的标志物水平没有下降但上升率随时间变得平稳。病人 3 的标志物水平先戏剧性回落，但随后重新上升。这次上升发生在出现肝外疾病的同时。图 9 显示，病人 5 和 6 就 CEA 水平上升率而言地治疗未发生任何应答，但病人 7 的 CEA 水平上升率在某种程度上可能指示有应答。

讨论和结论:

我们证实经肝动脉灌注施与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 很安全且无不期望的副作用。可给予高达 10mcg/天的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 而不会产生高钙血症。这一点可比以前的一次试验，那次试验中，口服给予 2mcg/天的钙三醇，结果 50% 的病人出现高钙血症。

肿瘤标志物数据更难解释，因为所有这些病人均有不同程度

但非常严重的肝病和肝外疾病，但似乎 7 例受治病人中有 4 例至少对治疗产生了有限的应答，证据是他们的肿瘤标志物水平上升率随时间下降。

实施例 3—猪动物模型比较 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 静脉给予与静脉灌注的效果

目的:

通过比较肝动脉灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对血清钙水平的影响与以相同剂量静脉灌注的影响，调查这种灌注是否存在首过效应。

受试者:

体重 15—50 kg 的雌性 Landrace 猪（极少疾病）。

方法:

每只动物麻醉后肝动脉或静脉插管，并与埋植的、可连续灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的“Infusaid”泵连接。持续灌注一或两周，然后让动物休息 4 周以减少任何诱导出的肝脏酶类。再将动物“交换”那些第一次灌注是通过肝动脉的动物将他们的泵与静脉内插管连接，反之另一组动物亦然。

定期取血分析有害的钙水平、LFT 和 UEC。

结果:

3 只猪取得了数据并完成了试验。1 号猪和 2 号猪均进行了静脉和肝动脉灌注。3 号猪很不幸对三氟氯溴甲烷麻醉起反应—严重高烧并死于手术。无一猪对经任一种途径灌注的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 产生不期望的反应，全过程中所有动物的 LFT 和 UEC 保持正常。

图 10 表示静脉和肝动脉灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 导致的钙水平。很明显静脉途径运送导致高钙血症而相似剂量经肝动脉运送时不影响钙水平。

图 11 证实在 2 号猪中有与 1 号猪相似的结果。

讨论和结论:

此试验证实经肝动脉灌注 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 不产生当以相似剂量静脉运送时可见的高钙血症。这说明存在与肝动脉 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 灌注相关的首过效应。

实施例 4—测定维生素 D_3 在碘油中的溶解度

为阐明维生素 D 化合物在碘油中的溶解度，将放射性标记的维生素 D_3 以不同量溶于碘油中并与放射性标记的维生素 D_3 的溶解度比较。结果见图 2，证实维生素 D_3 在碘油中比在水性基质中更易溶解。

本领域技术人员将会理解：可对本发明进行很多改变和修饰（如特定实施例所示）而不偏离本发明所广泛描述的精神或范围。例如，本发明的治疗方法可与一或多种传统抗癌疗法如放疗或化疗联用。因此这些实施方案应被看作对所有各方面的举例说明而非限制。

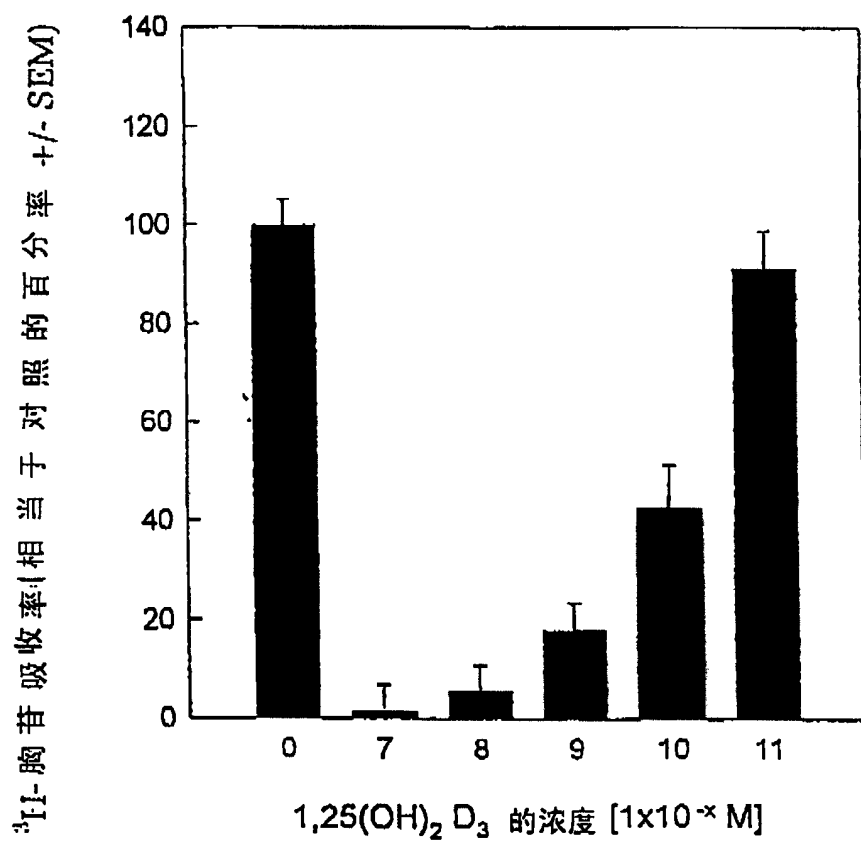


图1

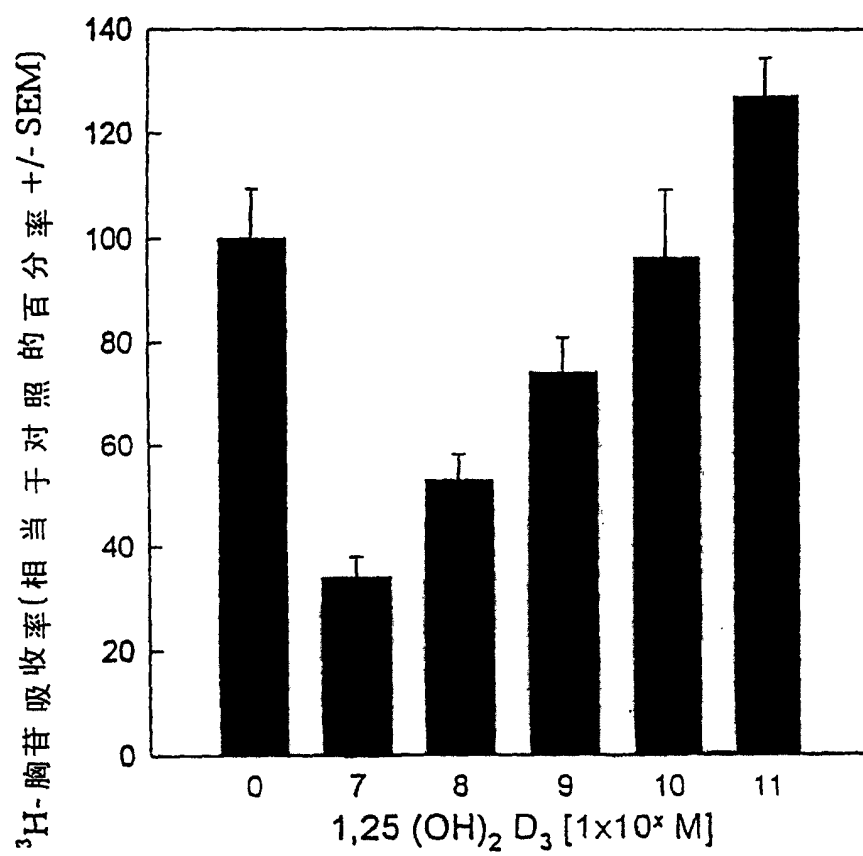


图2

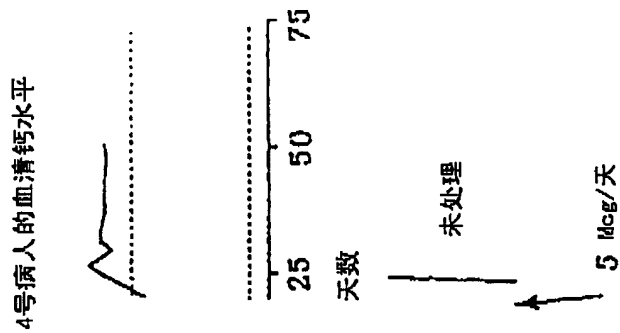


图3

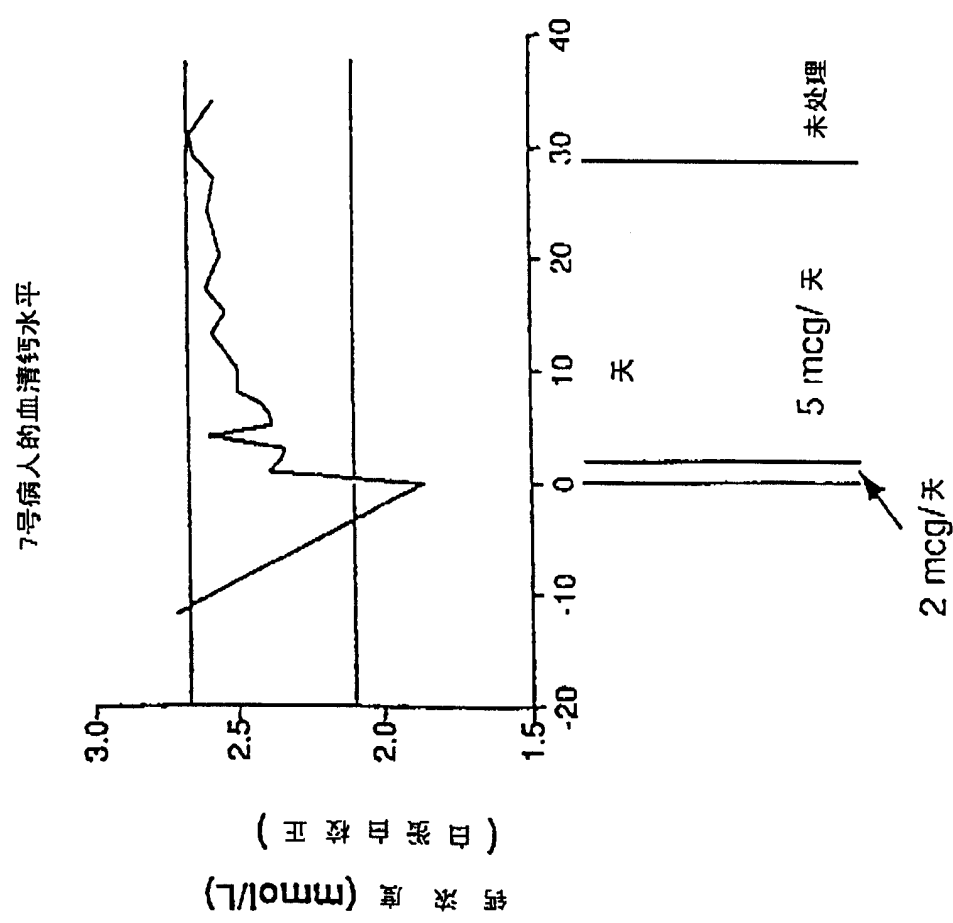


图4

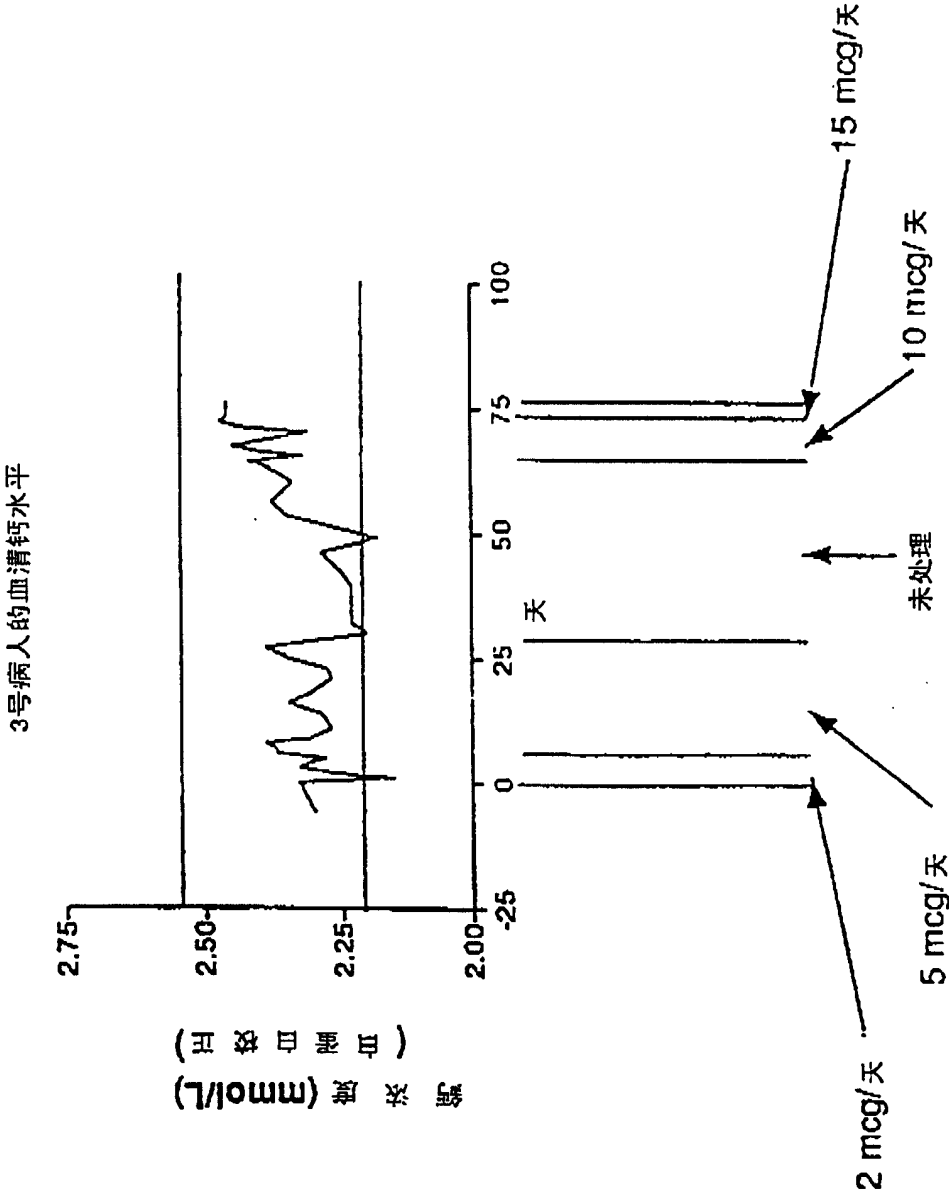


图5

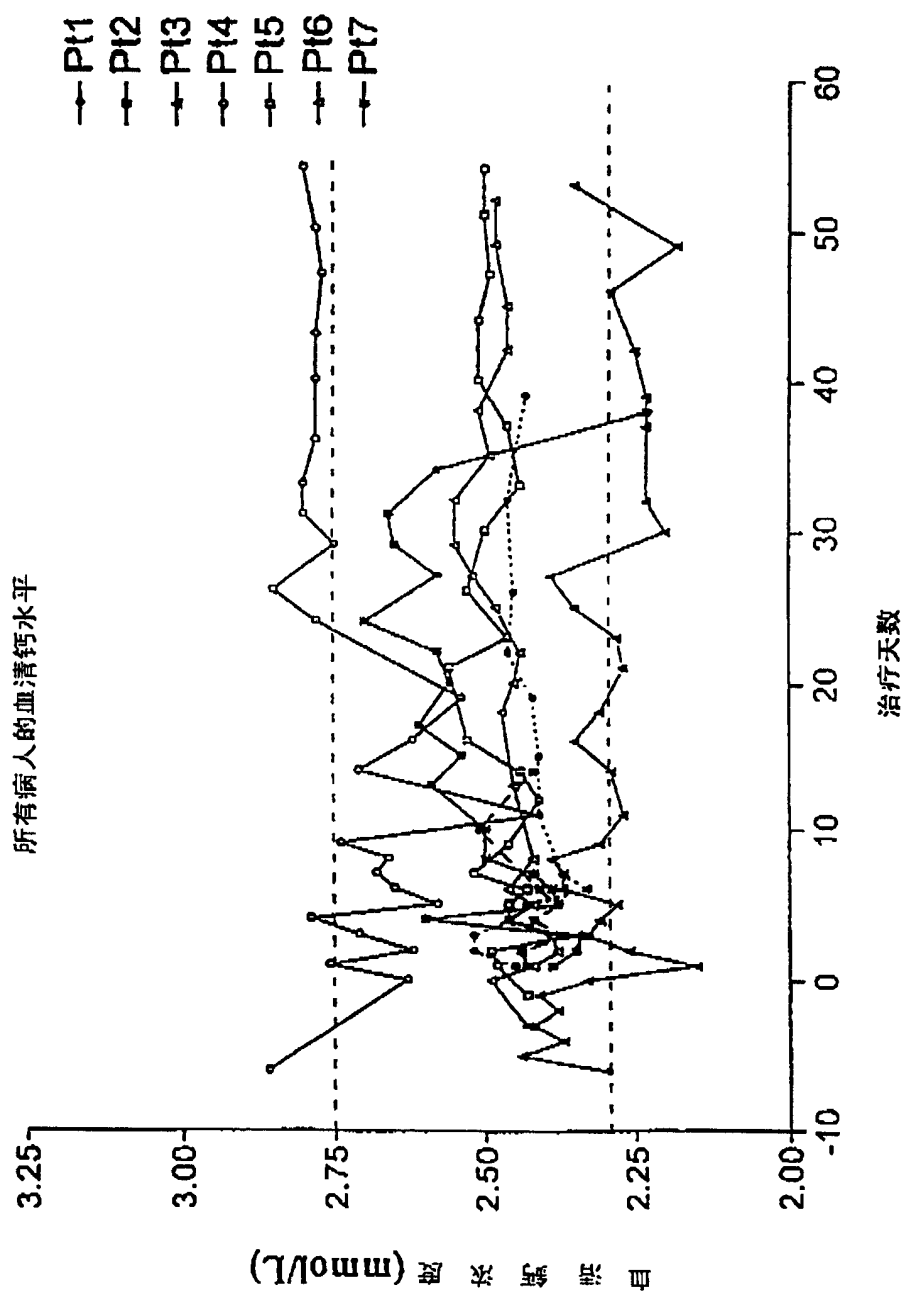


图6

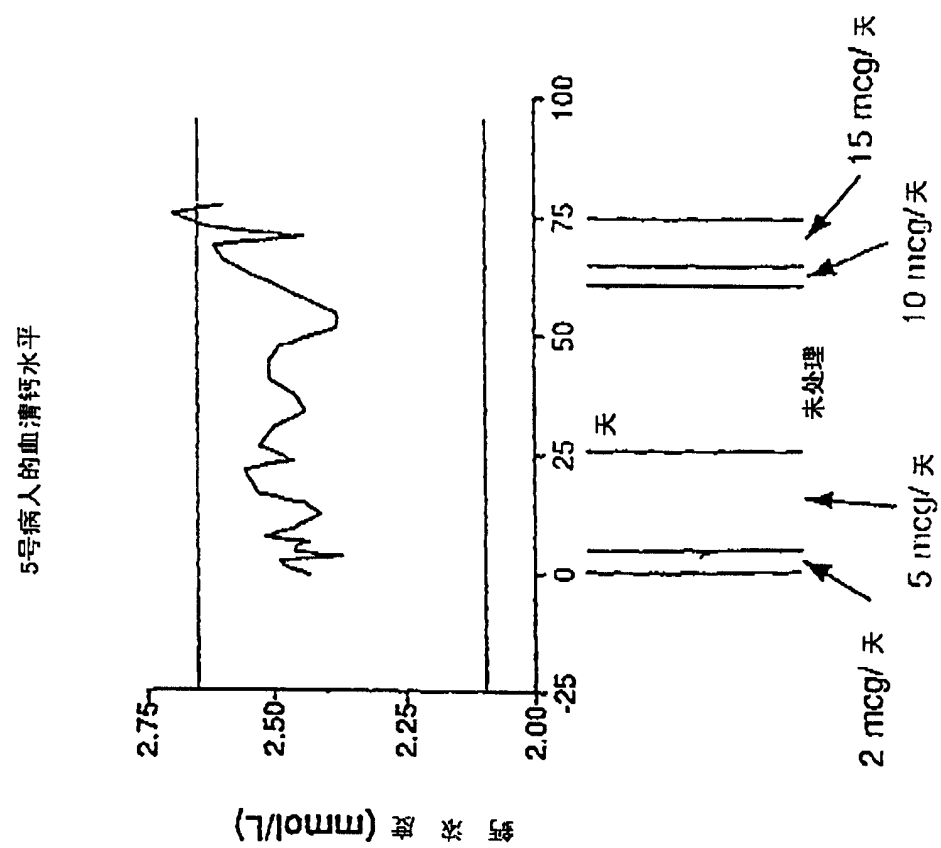


图7

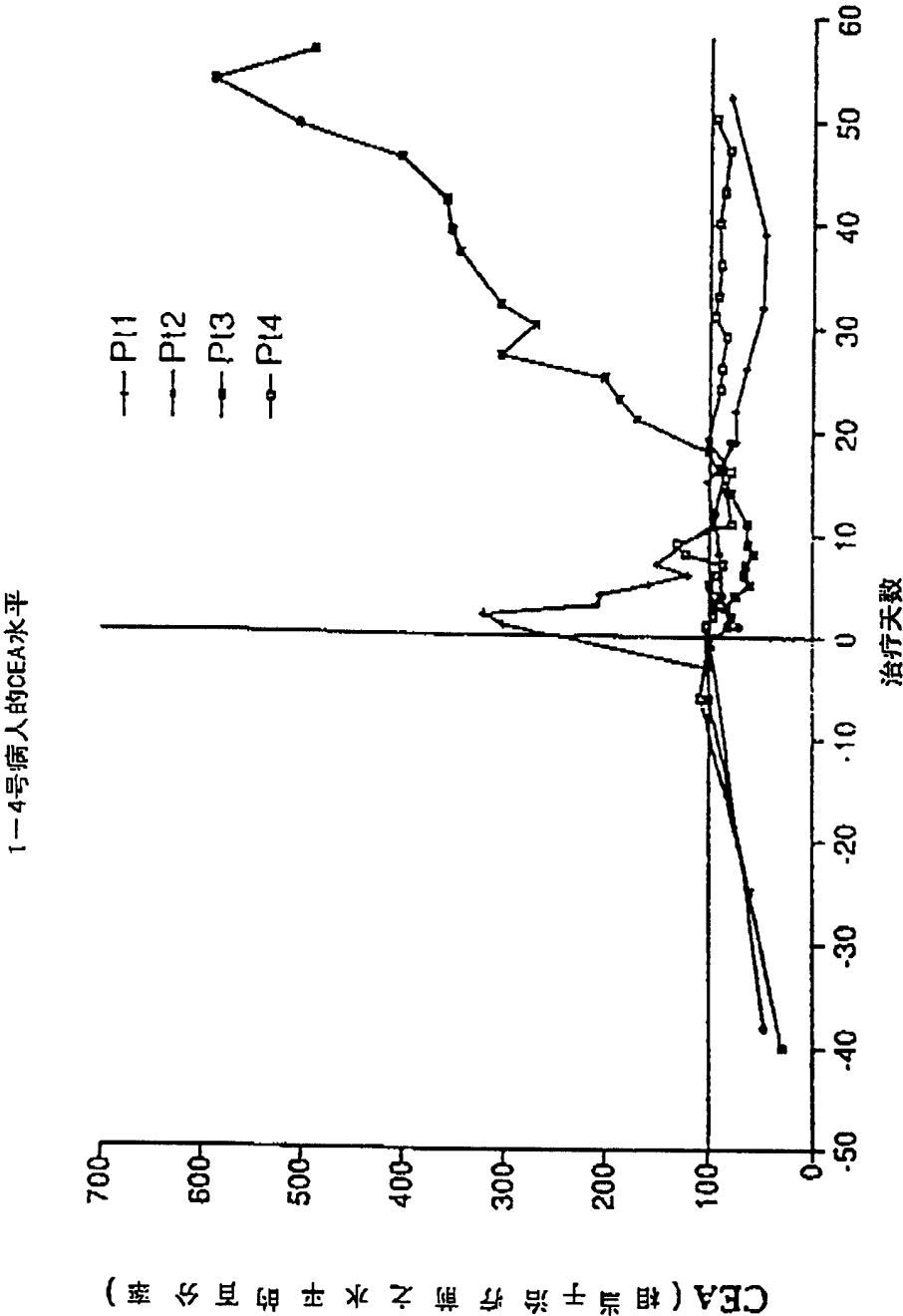


图8

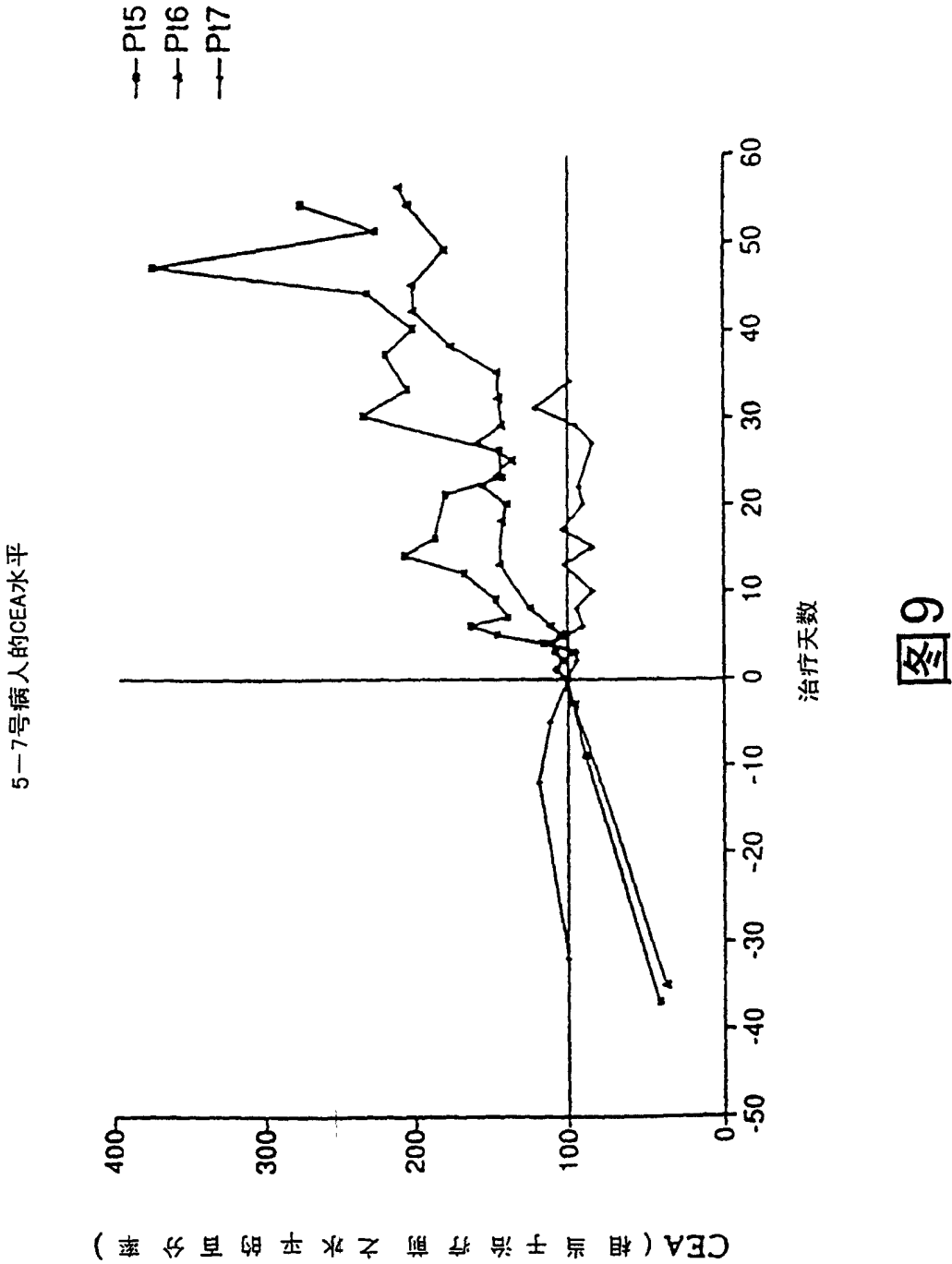


图9

1号猪—静脉及肝动脉灌注所得钙水平

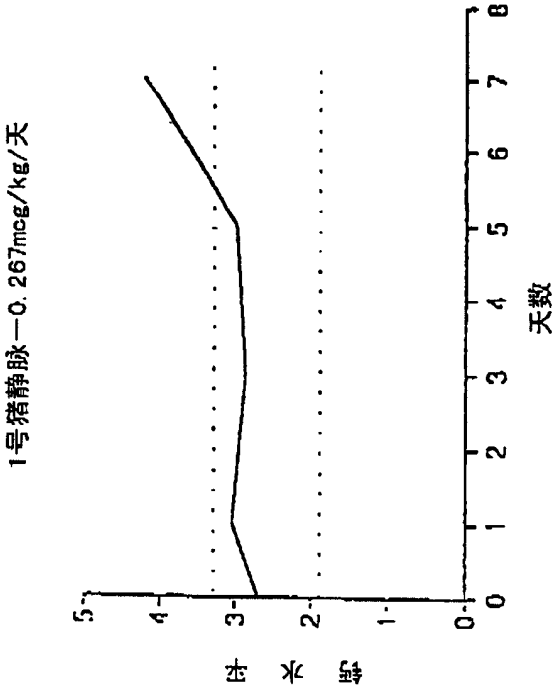


图10

2号猪一静脉及肝动脉灌注所得钙水平

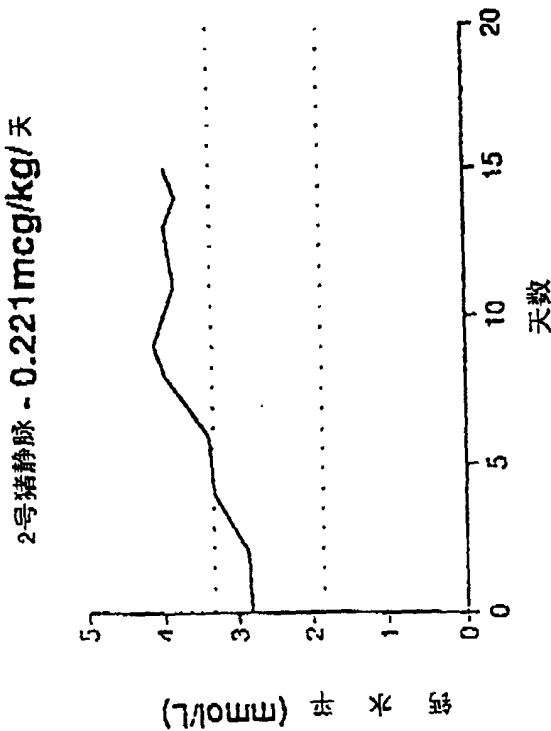
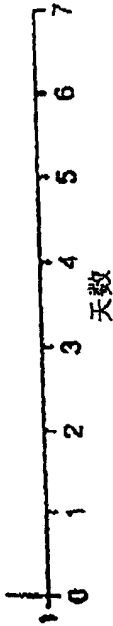
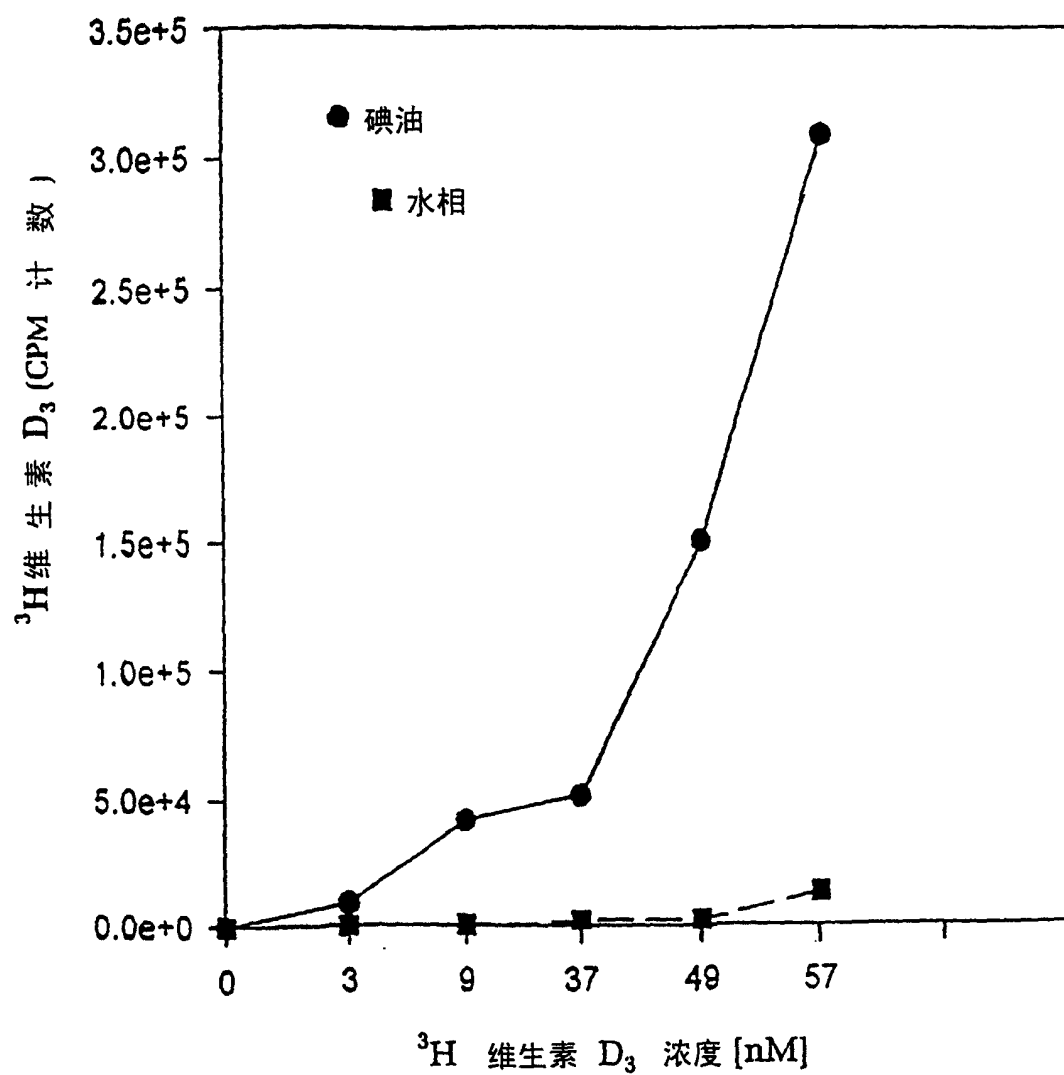


图11



100 μL 碘油 + 100 μL 水冷却的溶于4mM碘油中的维生素 D_3

图12