

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

美國 2000年4月4日 09/542,148 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

五、發明說明()

發明背景：

1. 發明領域：

本發明係關於RAR α 特定性或選擇性視黃醛化合物與干擾素和其他抗腫瘤劑合併使用之用途。更特定言之，本發明係關於RAR α 特定性或選擇性化合物與干擾素和其他抗腫瘤劑合併用於治療乳癌的用途。還更特定言之，本發明係關於4-[(4-氯-3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-2,6-二氟-苯甲酸及相關化合物與干擾素及其他抗腫瘤劑合併使用之用途，其特定於4-[(4-氯-3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-2,6-二氟-苯甲酸及相關化合物與干擾素和其他抗腫瘤劑合併用於治療乳癌的用途。

2. 背景技藝：

天然的視黃酸及相關化合物，一般稱為視黃醛在生藥學、醫學及相關技藝方面已知具有重要的生物活性，包括防止和抑制惡性的細胞增生。有大量的專利和科學文獻存在，係說明視黃醛化合物的合成，其生物活性，以及在人體及其他生物系統中，在體外和體內的條件下針對發現視黃醛作用的各種方式所做的研究。

特定言之，在本技藝中一般接受抗細胞增生或抗腫瘤的領域之中，具有類似視黃醛化合物做為活性成份的醫藥組合物有用於治療或防止皮膚的過度增生疾病，以及其他前惡係與惡性的過度增生疾病，如乳癌、皮膚癌、前列腺癌、頸癌、子宮癌、結腸癌、膀胱癌、胃癌、肺癌、喉

五、發明說明()

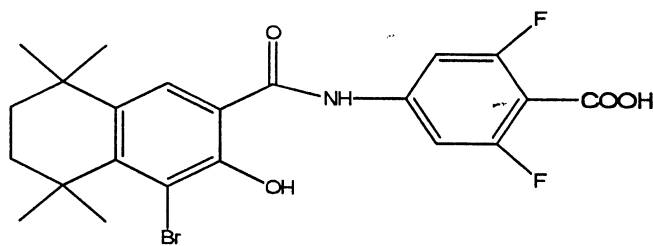
癌、口腔癌、血癌和淋巴系統的癌症，組織變形、結構不良、贅生、黏膜白斑病和黏膜的乳頭淋瘤，以及治療卡布希氏(Kaposi)肉瘤。然而，用視黃醛治療哺乳動物一般已認知的壞處是其黏膜皮膚的毒性，其發生在以有效劑量的視黃醛進行局部或全身治療時，多於90%的病患身上。

目前在本技藝中亦為普通常識的是有兩種主要型式的視黃醛受體存在於哺乳動物(及其他生物)體內。該二種主要型式或分類之受體分別稱為RAR和RXR。在每種型式當中有其次型；在RAR家族之中，該次型稱為RAR α ，RAR β 和RAR γ ，在RXR中，該次型稱為RXR α ，RXR β 和RXR γ 。在本技藝中亦已建立以下認知：即該二種主要的視黃醛受體型式及其數種次型在各種哺乳動物組織和器官中的分佈並不均勻。而且，在本技藝中一般接受許多不想要的視黃醛副作用，如黏膜皮膚之毒性是由一種或更多RAR受體的次型所調節的。Standeven等人的出版物<<毒物學通信>>第92期(1997年)231-240頁揭示以RAR α 選擇性視黃醛治療老鼠會造成顯著降低皮膚刺激(黏膜皮膚毒性)，甚於具有強的RAR β 和尤其是RAR γ 激動劑活性之視黃醛治療者。

美國專利案第5,965,606號揭示RAR α 特定性或選擇性視黃醛治療腫瘤的方法，而此種視黃醛的合成則在此專利案以及美國專利案第5,856,490號中有說明。美國專利案第5,965,606號之一種重要的RAR α 選擇性化合物(本專利參考文獻之化合物32)顯示在下方。

五、發明說明()

關於使用視黃醛與其他藥物合併治療腫瘤，在本技藝中有發表的報告指示某些視黃醛化合物有加成作用，而某些甚至會與其他已知的抗腫瘤化學治療劑，如干擾素和其他藥物協同作用於數種乳癌細胞培養以壓制或抑止癌細胞的增生。Fanjnl等人在<<癌症研究>>第56期，1571-1577頁(1996年)中的發表文章說明數說視黃醛化合物的檢驗，包括一種在該發表文章中稱做SRI 11220之化合物與干擾素在數種癌細胞株之中合併的檢驗，並且陳述在某些細胞株之中，化合物SRI 11220和干擾素的抗增生活性是協同的。此項先前技藝之化合物SRI 11220的結構顯示於下方。然而，顯然地Fanjnl等人之參考文獻將選擇性視黃醛與干擾素之抑制乳癌細胞歸因於RAR γ 受體之具潛勢的角色。事實上，SRI 11220化合物在此文獻中揭示為RAR γ 激動劑。

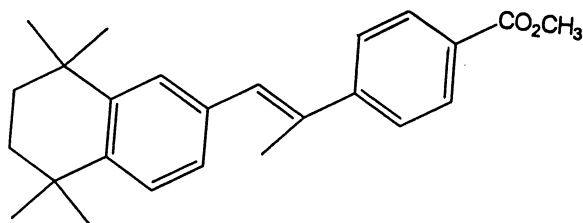


化合物32，美國專利第5,965,606號

化合物36，美國專利第5,856,490號

先前之技藝

五、發明說明()



SRI 11220(先前之技藝)

Toma等人在<<國際腫瘤與雜誌>>，第10期：597-607頁(1997年)之發表物中說明某些其他視黃醛，如完全反式的視黃酸(tRA)與 α -干擾素(α IFN)有協同效應，且與其他化學治療劑如塔莫科希芬(tamoxifen, TAM)在MCF-7人類乳癌細胞株中有協同效應。作為本發明之進一步的背景，吾人注意到Kurbacher等人在<<癌症通信>>第103期(1996年)183-189頁的發表物中說明維生素C與某些化學治療性的抗腫瘤用劑在MCF-7和MDA-MB 231人類癌細胞株中有協同作用。

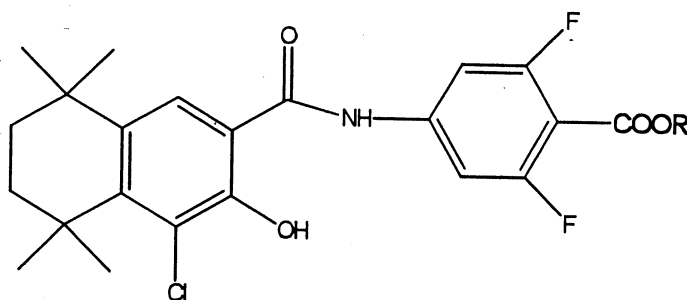
美國專利案第5,856,490號揭示四氫萘之芳基或雜芳基醯胺類，其一般而言是RAR α 特定性視黃醛。在化合物之中，特定說明以做為該參考文獻之較佳具體實例的是2,6-二氟-4-[3'-羥基-4'-溴-5',6',7',8'-四氫-5',5',8',8'-四甲基萘-2'-基)胺甲醯基]苯甲酸，其結構顯示於上方。在第5,856,490號參考文獻中，此化合物標記為化合物36。

發明摘述

五、發明說明()

本發明係關於RAR α 特定性或選擇性視黃醛與其他抗腫瘤劑用於治療需要此種治療之哺乳動物體內的惡性疾病或狀況之用途。該RAR α 特定性或選擇性視黃醛一般而言係以包含一種醫藥上可接受之賦形劑和RAR α 特定性或選擇性視黃醛做為活性成份的醫藥組合物施用在需要此種治療的哺乳動物身上。該合併治療的其他抗腫瘤劑可在同樣或相異的醫藥組合物之中施用。

本發明亦關於式1的化合物及該化合物之醫藥上可接受的鹽：



R = H 或碳數較低至1至6個碳的烷基

式1

其中R代表H或具有1至6個碳之碳數較低的烷基，以及式1化合物與其他抗腫瘤用劑合併用於治療需要此種治療之哺乳動物的惡性疾病或狀況上的用途。還有，本發明亦關於用以治療需要此種治療之哺乳動物身上的惡性腫瘤或狀況的醫藥組合物，其中該組合物的活性成份包含一種或更多的式1化合物。此種包含一種或更多式1化合物做為其活性成份的醫藥組合物可有利地與一種或更多其他抗腫瘤用劑合併用於治療需要此種治療之哺乳動物的惡性腫瘤或狀

五、發明說明()

況。

附圖之簡短說明：

圖1是一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 α 干擾素(IFN α)之組合在SKBR-3細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖2是一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 β 干擾素(IFN β)之組合在SKBR-3細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖3是一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 γ 干擾素(IFN γ)之組合在SKBR-3細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖4是另一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 α 干擾素(IFN α)之組合在SKBR-3細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖5是另一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 β 干擾素(IFN β)之組合在SKBR-3細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖6是另一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 γ 干擾素(IFN γ)之組合在SKBR-3細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖7是一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和 α 干擾素(IFN α)之組合在T47-D細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖8是一張顯示本發明的化合物AGN 195183(化合物2)和

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

β 干擾素 (IFN β) 之組合在 T47-D 細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖 9 是一張顯示本發明的化合物 AGN 195183 (化合物 2) 和 γ 干擾素 (IFN γ) 之組合在 T47-D 細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖 10 是另一張顯示本發明的化合物 AGN 195183 (化合物 2) 和 α 干擾素 (IFN α) 之組合在 T47-D 細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖 11 是另一張顯示本發明的化合物 AGN 195183 (化合物 2) 和 β 干擾素 (IFN β) 之組合在 T47-D 細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖 12 是另一張顯示本發明的化合物 AGN 195183 (化合物 2) 和 γ 干擾素 (IFN γ) 之組合在 T47-D 細胞中之抗增生效應的協同作用之作圖。

圖 13 是另一張顯示本發明的化合物 AGN 195183 (化合物 2) 在 T47-D 細胞和在 SKBR-3 細胞中之效應的作圖。

用於本發明檢驗以建立選擇性之 RAR α

特定性或選擇性化合物

RAR α 特定性和 / 或 RAR α 選擇性化合物可如例如美國專利案第 5,856,490 號和 5,965,606 號所說明的方法獲得，該專利之說明書明確地以參考文獻併入本說明書中。這些參考文獻亦提供數據以顯示該化合物確實是 RAR α 特定性或選擇性的激動劑。本技藝中已知測試化合物並建立其是否為 RAR α 特定性或選擇性激動劑的檢驗法，且其在許多先前

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

技藝之出版物和專利中有說明。例如，一種嵌合受體轉活化檢驗係測試RAR α ，RAR β ，RAR γ ，RXR α ，受體次型中類似激動劑之活性者，且根據Feigmer P.L.和Holm. M. (1989年)在<<焦點>>，第112期之研究者，詳細說明於美國專利案第5,455,265號之中。美國專利案第5,455,265號之說明書以參考文獻方式明確地併在本明書中。

全受體轉活化檢驗和配體結合檢驗係分別測量本發明之化合物的拮抗劑/激動劑類似活性，或其與數種視黃醛受體次型結合的能力，該檢驗說明在已出版之PCT申請案WO 93/11755號(尤其是第30-33頁和第37-41頁)，於1993年6月24日出版者，該專利之說明書亦以參考文獻併在本說明書中。配體結合檢驗的說明亦提供於下方。

配體結合檢驗

所有的結合檢驗均以相似的方式進行。所有六種受體型式係得自在巴氏病毒(Baculovirus)內表現之表現的受體型式(RAR α ， β ， γ 和RXR α ， β ， γ)。所有化合物的貯備溶液均製備為10 mM乙醇溶液，並經過連續稀釋成為1：1 DMSO：乙醇。檢驗緩衝液包含以下物質，用於所有六種受體檢驗中：8%甘油，120 mM KCl，8 mM Tris，5 mM CHAPS，4 mM PTT和0.24 mM PMSF，pH-7.4@室溫。

所有受體結合檢驗均以相同的方式進行。最終檢驗體積為250微升，且包含自10-40微克抽取物蛋白質，視待檢驗的受體而定，且具有5 nM [^3H]全部反式的視黃酸或10 nM [^3H]9-順式視黃酸和不同的競爭配體濃度，該濃度範圍在

五、發明說明()

0-10⁻⁵ M。該檢驗經格式化用於96槽的微試管系統中。在4°C實行培育直到達到平衡。非特定性結合乃定義為在1000 nM適當標記之視黃酸異構物存在下所保留的結合狀態。在培育期間之末尾，將50微升6.25%羥磷灰石添加劑適當的沖洗緩衝液中。該沖洗緩衝液包含100 mM KCl，100 mM Tris和5 mM CHAPS(RXR α ， β ， γ)或0.5% Triton X-100(RAR α ， β ， γ)。將該混合物振盪混合並且在4°C培育10分鐘，離心並將懸浮液除去。用適當的沖洗用緩衝液沖洗羥磷灰石三次。受體-配體複合物被羥磷灰石所吸收。以液態閃爍計數法計算羥磷灰石粒塊以測定受體-配體複合物的量。

在校正非特定結合之後，測定IC₅₀的值。IC₅₀定義為降低50%特定性結合所需的競爭配體濃度。IC₅₀的值係從數據之對數-對數作圖以作圖法測得。K_d值則是將陳-普魯梭夫(Cheng-Prusoff)公式套用至IC₅₀值，標記的配體濃度和標記之配體的K_d來測定。

配體結合檢驗的結果係以K_d數字表示(請參考Chang等人<<生化藥理學>>，第22卷，3099-3108頁，明確地以參考文獻方式併入本說明書中)。

詳細之完全受體轉活化的實驗程序業經Heyman等人，<<細胞>>，第68期，397-406頁(1992年)；Allegretto等人，<<生物化學雜誌>>，第268期，26625-26633頁，以及Mangelsdorf等人，<<視黃醛：生物，化學與醫藥>>，第319-349頁)，Raven Press公司出版，紐約，其明確地以參

五、發明說明()

考文獻併入本說明書中。在本檢驗中已獲得的結果係以 EC_{50} 數字來表示，亦如同其在嵌合受體轉活化檢驗中的表示方法。

在嵌合轉活化檢驗中，本專利說明書之化合物2被發現具有180 nM的 EC_{50} 值，而在RAR α 受體中有75%的效率，並且在受體結合檢驗中其 K_d 值為5 nM。對於RAR β 和RAR γ 受體而言，化合物2經發現不具有激動劑活性，而其 EC_{50} 值大於 10^4 nM。

還有另一項轉活化檢驗「PGR檢驗」說明在Klein等人，<<生物化學雜誌>>，第271期，22692-22696頁(1996年)的發表物中，其明確地以參考資料併入本說明書中，而且詳細的說明亦提供於下方。PGR檢驗的結果亦以 EC_{50} 數字(nM濃度)來表示。

RAR-P-GR完整受體之轉活化檢驗

以含有4個複本之R5G視黃醛DNA反應元素的蟲螢光素酶報導質體(MTV-4(R5G)-Luc(0.7微克/每槽))和RXR α 表現用質體pRS-hRXR α (0.1微克/每槽)及以RAR-P-GR表現載體(0.05微克/每槽)中之一種在12孔槽的盤中經由磷酸鈣沉澱瞬間對CV-1細胞(4×10^5 個細胞/每槽)進行轉移感染，Chen等人(1987年)<<分子細胞生物學>>，第7期，2745-2752頁，如Klein在<<生物化學雜誌>>，第271期，22692頁中說明者，以上參考過。三種不同的RAR-P-GR表現質體pRS-RAR α -P-GR，pcDNA3-RAR β -P-GR和pcDNA3-RAR γ -P-GR分別表現RAR α ，RAR β 和RAR γ

五、發明說明 (11)

受體，其含有經修飾的DNA結合區位，使其「P-盒子區」改變成為糖皮質激素的「P-盒子區」。這些RAR-P-GR受體與RXR結合至DNA成為異二聚體複合物。特定言之，RAR-P-GR受體與視黃酸反應元素，稱為R5G者結合，R5G包含兩個RAR半區位(核苷酸序列5'-GGTTCA-3')由5個鹼基對分隔，而其中3'-半區位業經修飾成為糖表質激素受體的半區位5'-AGAACA-3'。為了容許轉移感染效率之變化，故使用 β -半乳糖苷酶表現質體(0.01微克/每槽)做為內部調整。或者，在一96孔微滴定盤格式(5000細胞/每槽)中進行檢驗，其方式與以上說明者完全相同，除了每槽中施加1/5量的DNA-磷酸鈣沉澱物(用20微升取代100微升)。在加入DNA沉澱物後8小時，用磷酸緩衝之鹽液(PBS)潤洗細胞並用D-MEM(Gibco-BRL出品)含10%活性碳萃取之胎牛血清(Gemini Bio-Products出品)者飼育之。用附圖中指出的化合物處理細胞18小時。用PBS潤洗之後，將細胞溶解，而用先前說明在de Wet (1987年)，<<分子細胞生物學>>，第7期，725-737頁的方法測量蟲螢光素酶的活性。蟲螢光素酶的數值代表以 β -半乳糖酶活性正規化之三次重複測定的平均值 $\pm$ SEM。

本發明使用之較佳RAR α 選擇性激動劑化合物

目前本發明之較佳的RAR α 特定性或選擇性化合物係揭示於美國專利案第5,965,606號者。本發明之最佳RAR α 特定性或選擇性化合物顯示於式1之中，這些化合物亦代表新的物質組合物且被認為是新穎且創新的。本發明化合物

五、發明說明()

之較佳具體實例在式1之範疇中者是式1之中的R基團為H或含1至3個碳之較低碳數烷基者，或其醫藥上可接受的鹽。本發明之最佳化合物是其中R為H者，或該化合物之醫藥上可接受的鹽。在此關聯之中要注意醫藥上可接受的鹽是任何保留母化合物之活性者且不會對其施用對象和其施用前後過程給予任何損害或不幸的影響。

醫藥上可接受的鹽類可得自有機或無機的鹼。該鹽可為單價或多價的離子，尤其有興趣的是無機離子，鈉，鉀，鈣和鎂。有機鹽可用胺類製備，尤其是銨鹽如單-，二-和三烷基胺或乙醇胺。鹽亦可從咖啡因、三甲醇胺基甲烷和相似的分子形成。

一般而言，式1的化合物可由美國專利案第5,856,490號說明的合成程序獲得，該專利明確地以參考文獻併入本說明書中。目前較佳之用於製備本發明較佳化合物，其中R為H者以及對應之乙酯的合成方法在以下有詳細說明。

本發明化合物之抗增生作用

本發明化合物之抗增生作用係以本技藝中廣為接受的檢驗證明。這些檢驗是在本發明之較佳化合物，即化合物2上(亦稱為AGN195183)實行的，且在不含或與人的重組 α ， β 和 γ 干擾素在本技藝中詳知為抗腫瘤用劑者合併施用(AGN編號是在研究言中由本發明之指定者隨意指派給化合物的數字)。該材料與檢驗程序在以下有詳細之說明。

檢驗程序實行之SKBR-3和T47-D亦為本技藝中詳知且可得自本技藝所詳知的來源。特定言之，如吾人所知，T-

五、發明說明 ()

47D是雌性激素受體陽性(ER^+)之人類乳癌細胞株，而SK-BR-3是一種雌性激素受體陰性(ER^-)之人類乳癌細胞株。本身在本技藝中已詳知的檢驗程序，涉及測定5-溴-2'-去氧尿苷(BrdU)之併入細胞。如吾人所知，併入較少BrdU代表較少的細胞增殖(抑制細胞增殖)，並且這項檢驗在本技藝中被接受做為受檢試劑抗增殖或抗腫瘤活性的測量方法。

當兩種或更多抗增殖或可能之抗增殖用劑的組合被檢驗時，其結果可能指出比吾人預期若個別用劑之作用為加成性，或該作用代表兩種用劑之預期效果的算術乘積(加成性抑制)為少的增殖抑制作用。或者，事實上以實驗觀察到的抑制作用可大於吾人預期兩種用劑之作用的簡單乘積。此種協同的抗腫瘤或抗增生效果是高度期望的，並且如以下說明在數種檢驗中被觀察到，即當本發明之化合物2與人類重組干擾劑合併使用時。該化合物與干擾素在治療腫瘤，尤其是乳癌時的協同作用，在先前技藝中並未被預期，並且是非顯然易見且令人驚奇的。該檢驗的材料與程序以及測定協同作用的論點說明於以下。

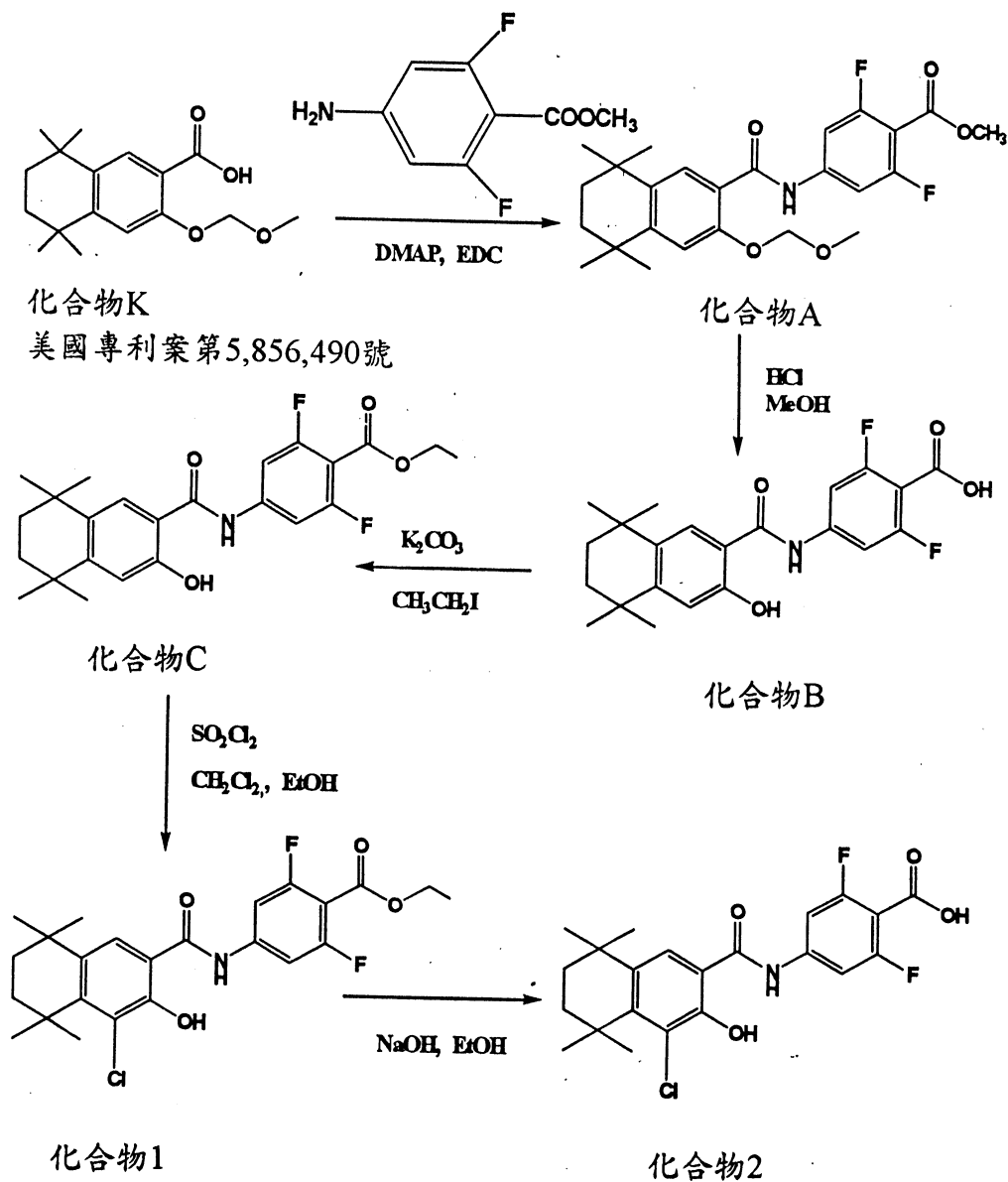
測定協同作用試劑之材料、檢驗方法及論據

人類重組干擾素 α (IFN- α)和人類重組干擾素 β (IFN- β)係購自Sigma化學公司(密蘇里州的聖路易市)。人類重組干擾素 γ (IFN- γ)係購自Roche Diagnostics公司(位於印第安納州的Indianapolis市)。IFN- α ，IFN- β 和IFN- γ 的貯備溶液係分別貯存在-70，4，和-20°C下。IFN操作溶液是在

五、發明說明 (14)

使用前藉著在培養基中稀釋來製備的。化合物 2 (AGN 195183) 之 5 mM 貯備溶液是在 DMSO 中製備的，並且緊接著在培養基中稀釋成指定的最終濃度。

較佳化合物之合成 (反應流程圖 1)



反應流程圖 1

五、發明說明 ()

甲基-2,6-二氟-4-[(3-甲氧基甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸酯(化合物A)

在3-甲氧基甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羧酸(化合物K,如美國專利案第5,856,490號中之說明,112毫克,0.38毫莫耳)溶於6毫升無水二氯甲烷之溶液中添加4-(二甲基胺基)-吡啶(DMAP,100毫克,0.46毫莫耳),2,6-二氟-4-胺基苯甲酸甲酯(化合物H1,如美國專利案第5,856,490號中之說明77毫克,0.38毫莫耳)和1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯胺鹽酸鹽(EDC,110毫克,0.57毫莫耳)。在室溫下攪拌該反應混合物至隔夜,然後濃縮至乾。用管柱層析法以乙酸乙酯:己烷(1:9)純化殘留物而產生標題化合物(化合物A),呈透明油液。

$^1\text{H NMR CDCl}_3$ δ 8.18 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.39 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 1.70 (s, 4H), 1.31 (s, 3H), 1.30 (s, 3H)。

2,6-二氟-4-[(3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸(化合物B)

將2,6-二氟-4-[(3-甲氧基甲氧基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸甲酯(化合物A,113毫克,0.26毫莫耳)溶於6毫升甲醇的濃液與3滴濃鹽酸在室溫下攪拌至隔夜,然後濃縮至乾。從乙酸乙酯:己烷中使固體再結晶產生呈白色固體之標題化合物(化合物B)。

$^1\text{H NMR}$ 丙酮- d_6 δ 10.2 (bs, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.56 (s, 1H),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明()

7.53 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 1.69 (s, 4H), 1.27 (s, 6H)。

2,6-二氟-4-[(3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸乙酯(化合物C)

在2,6-二氟-4-[(3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸(化合物B, 56毫克, 0.13毫莫耳)溶於4毫升丙酮的溶液中添加碳酸鉀(36毫克, 0.26毫莫耳)和碘乙烷(0.012毫升, 0.14毫莫耳)。使反應混合物在室溫下攪拌4小時, 然後濃縮並以管柱層析法用乙酸乙酯: 己烷(1: 9)純化產生呈白色固體之標題化合物(化合物C)。

^1H NMR CDCl_3 δ 8.00 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.40 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.70 (s, 4H), 1.41 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.29 (s, 3H)。

2,6-二氟-4-[(3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸乙酯(化合物1)

在氮氣下於25°C將2,6-二氟-4-[(3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸乙酯(化合物C, 227毫克, 0.52毫莫耳)溶於10毫升無水二氯甲烷的溶液中添加 SOCl_2 (0.0413毫升, 0.57毫莫耳)和無水乙醚(0.054毫升, 0.52毫莫耳)。在25°C下反應是自發的, 如 ^1H NMR偵測之結果。將反應混合物以飽和 NaHCO_3 溶液終止反應, 並且用乙酸乙酯進行萃取。用水、鹽液沖洗有機層, 並且用 Na_2SO_4 乾燥之。在以乙酸乙酯: 己烷(1: 9)進行管柱層析後得到呈白色固體之標題化合物(化合物1)。

五、發明說明 (17)

^1H NMR CDCl_3 δ 9.33 (b, 1H), 8.56 (b, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.36 (d, $J=9.83$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.53 (s, 6H), 1.39 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.32 (s, 6H)。

2,6-二氟-4-[(3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-苯甲酸(化合物2)

在4-[(4-氯-3-羥基-5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氫-萘-2-羰基)-胺基]-2,6-二氟-苯甲酸乙酯溶於6毫升EtOH的溶液中添加2毫升2M NaOH(aq)。使反應在室溫下攪拌12小時，然後用10% HCl予以酸化至pH=5。以旋轉裝置將多餘的醇蒸發去除，然後用乙酸乙酯(3×10毫升)對水液層進行萃取。將合併的有機層用水、鹽液沖洗，並以 Na_2SO_4 乾燥。使溶劑蒸發後，得到呈粗製形式的標題化合物(化合物2)，將其在乙酸乙酯/己烷中再結晶產生純粹的標題化合物(AGN 195183)，呈淺黃色固態。

^1H NMR 丙酮- d_6 δ 7.97 (s, 1H), 7.53 (d, $J=10.2$ Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.54 (s, 6H), 1.31 (s, 6H)。

乳癌細胞株的培養

將雌性激素受體陽性(ER^+)細胞株T-47D和 ER^- 細胞株SK-BR-3培養在Dulbecco氏之修飾過的Eagle氏培養基中(DMEM Gibco BRL, Gaithersburg, MD)，補充以10%胎牛血清(HyClone公司出品，位於猶他州的Logan市)，2 mM左旋-麩胺醯胺和1%抗生素-抗黴菌素(Gibco BRL公司出品)。細胞株係得自美國型式培養收集中心(ATCC，位於馬

裝

訂

線

五、發明說明()

里蘭州 Rockville 市，HTB-133 和 HTB-30 分別是對於 T47-D 和 SKBR-3)。將細胞培養在 37°C，含有 5% CO₂之濕度化的氛圍之中。

細胞增殖檢驗

癌細胞株的檢驗是利用市售之細胞增殖套組(Roche Diagnostics 公司出品)測定的，本質上是遵照製造商的指示進行。將細胞接種到 96 槽的組織培養盤(Corning 公司出品，位於紐約 Corning 市)之中，使其濃度為 3000 個細胞/每孔槽。24 小時以後，用化合物 2 (AGN195183) 和/或干擾素 (IFNs) 或只用溶劑處理細胞。用於本研究之適當的化合物 2 (AGN195183) 濃度是介於 10^{-11} M 和 10^{-6} M 之間，IFN 的濃度則介於 25 和 1000 單位/每毫升之間。每 72 小時更換培養基一次。七天之後，將 10 微升 5-溴-2'-去氧尿苷 (BrdU) 添加到每一孔槽中。24 小時以後藉由添加 100 微升抗-BrdU 抗體的 BrdU 量係藉由測量波長 450 微米之吸收值得知。每一實驗均重複 3 次進行。

協同作用之論據

在細胞培養物中觀察到由於本發明之化合物 2 (AGN195183) 與干擾素 (IFNs) 合併處理所造成的生長抑制經分析以瞭解協同和加成作用。協同效應係藉由計算假設之加成性交互作用預期的細胞生長和真正當兩種用劑合併時之細胞生長百分率的比率來測定的(數值 > 1 則指示協同效應)。協同效應之統計上的顯著性是利用雙邊學上的 t-測驗測定的。

五、發明說明()

協同作用定義為： $\%A \times \%B > \%AB$

加成性定義為： $\%A \times \%B = \%AB$

其中A和B是每一個別用劑的效應，而AB是合併的效應，此係根據Aapro等人在<<癌症化學療法之藥理學>>，第10期：161-166頁，1983年，和Marth等人，<<國家癌症機構雜誌>>，第77期：1197-1202頁，1986年，二者均明確地以參考文獻併入本說明書之中。

由檢驗測定到的抗增殖效應

現在參考附圖1至附圖12的作圖，其每一者代表得自以上說明之檢驗的結果，其中SKBR-3和T47-D分別用本發明之化合物2和人類重組干擾素(IFN) α ， β ，和 γ 分別處理。附圖13之作圖係說明這兩種細胞培養只以本發明之化合物2處理而不使用其他任何抗腫瘤劑的結果。這些作圖的每一者之中，將5-溴-2'-去氧尿苷(BrdU)的併入畫在Y(垂直)軸，而將本發明之化合物2的濃度或不同的IFN α ，IFN β 或IFN γ 之濃度分別畫在X(水平)軸上。干擾素之濃度係以國際單位表現，並在本技藝中被接受，而化合物2的莫耳濃度則以對數尺規繪圖。在每一個作圖中，除附圖13的作圖之外，包括一條曲線指示出僅使用一種用劑的結果，以兩種用劑合併(化合物2和相對之干擾素)之真正實驗結果，以及一條用以上說明方式計算的理論曲線，該曲線係假設兩種用劑的效應僅是加成，將BrdU之併入以百分率基底繪圖，相對於當不同濃度之用劑未用於相對作圖中的情形(0濃度代表100%併入)。

五、發明說明()

現在特定地參考附圖1，若在該圖所描繪之SKBR-3細胞檢驗中，化合物2的濃度為10 nM，而IFN α 的濃度則有變化。可見到實驗或實際觀察到之細胞增殖的抑制作用顯著大於(較少BrdU併入)只用IFN α ，並且顯著大於理論之加成曲線，因而顯示化合物2與IFN α 的協同效應。附圖2和3的作圖相似地描繪出在SKBR-3細胞中之檢驗，其中化合物2的濃度保持固定在10 nM，而IFN β 或IFN γ 的濃度則分別有改變。附圖2和3的作圖亦顯示合併治療有顯著的協同效果。

附圖4，5和6的作圖揭示在SKBR-3細胞中的檢驗結果，其中IFN α ，IFN β 和IFN γ 分別保持在100國際單位/每毫升(U/ml)的固定濃度，而本發明之化合物2的濃度則有改變。這些作圖亦顯示顯著的協同效應，代表干擾素與化合物2的組合相較於根據這兩種用劑之個別效果所期望的結果有顯著超越的細胞增殖抑制效果。

附圖7，8和9揭示在T47-D細胞中的檢驗結果，這是用固定之化合物2的濃度(100 nM)與不同濃度之IFN α ，IFN β 以及IFN γ 分別組合治療的結果。附圖7的作圖透露組合物的抑制作用在使用IFN α 時於此細胞株中是加成性的。然而，當使用IFN β 和IFN α 時，則觀察到的抑制作用會有顯著的協同性。

附圖10和11，12揭示在T47-D細胞中的檢驗結果，其中IFN α ，IFN β 和IFN γ 的濃度分別保持在100國際單位/每毫升(100 U/ml)的固定濃度，而本發明之化合物2的濃

五、發明說明()

度則有變化。當 IFN α 使用在該組合中(附圖 10)，該組合並非十分有效且只是加成的，但是當使用 IFN β 和 IFN γ 時，再次發現協同抑制作用，此作用曾在只有在高濃度之化合物 2 下以 IFN γ 共同處理時被觀察到。

先前的結果和尤其是本發明之化合物和人類重組干擾素在這兩種癌細胞株上之抗增殖作用的協同性是未預期且令人驚奇的，且其指示出 RAR α 特定性或 RAR α 選擇性化合物，並且尤其是本發明之較佳化合物也用於治療涉及惡性細胞增殖的疾病；如癌，而尤其是乳癌。事實上，先前的檢驗指出 RAR α 特定性或 RAR α 選擇性的化合物，尤其是本發明的較佳化合物有用於和干擾素合併用於醫療雌性激素受體陽性(T-47D)的乳癌細胞株，以及雌性激素受體陰性(SK-BR-3)之人類乳癌細胞株。

治療方法及施用方式

RAR α 特定性或 RAR α 選擇性化合物，且尤其是本發明之較佳化合物可根據本發明，以全身或局部的方式施用，視諸如：待治療的狀況，特定部位之治療需求，待施用之藥量等考慮以及其他各種考慮而定。對於治療乳癌及許多其他形式的惡性腫瘤，該化合物較為適合全身施用，以包含此類在本技藝中已詳知適用於腫瘤化療的賦形劑或惰性成份之醫藥組合物來進行。更特定言之，若該化合物是以全身施用，其可調製成粉末、藥片、藥錠或類似者，或呈適用於口服的糖漿或酏劑。對於血管內及腹膜內施用而言，該化合物可製備成能以注射施用的溶液或懸浮液。在

五、發明說明 (22)

某些情形之中，藉由注射調配這些化合物可能有用，在某些其他的情形之中，將這些化合物調配成栓劑形式或用以貯存在皮下或肌肉注射的延長釋出調配物可能有用。

RAR α 特定性或 RAR α 選擇性化合物，且尤其是本發明的較佳化合物可做為化療用劑施用以治療腫瘤，其係以有用之醫療劑量施用，該劑量會隨狀況而有所改變，並且在某些情況下，會隨受治療狀況的嚴重性和待治療病患之容受性而有所改變。因此，沒有單一一種劑量可以一致使用的，而是需要視腫瘤的特殊性或待治療的惡性狀況而修改使用的劑量。此種劑量可經由例行的實驗達成，對於治療固體腫瘤，尤其是乳癌，吾人冀望對需要該化合物之病患施用化合物大約 1 至 8 週，以能有效制止、減緩腫瘤生長或使腫瘤消散的劑量施行之。較好是以口服方式施用該藥物，以較好是每日劑量在大約 50 毫克/每日至 500 毫克/每日的範圍內施用。最佳的是用於該治療之化合物是本發明的化合物 2。

較好是將 RAR α 特定性或 RAR α 選擇性化合物，尤其是本發明的較佳化合物，而最好是化合物 2，依照本發明與其他化學治療劑，如干擾素而較好是人類的重組干擾素或其他已知的腫瘤治療劑合併施用。其他適於和該化合物合併用於治療的化學治療劑為：塔莫科希芬(tamixofen)和紫杉醇。與干擾素和某些其他的化學治療劑一起使用，可能發生協同性的抗腫瘤效果，且如以上說明之細胞培養檢驗程序所證實者。再此地，當該化合物用於合併治療時，有用

五、發明說明 (23)

的治療劑量會隨狀況而有變化，而在某些情形中其會隨待治療的狀況之嚴重性和待治療病患的嚴重性而有變化。因此，所需的劑量可經由例行的實驗達成，這在腫瘤化療科學中是慣常進行的。

一般而言，吾人期望在合併治療和用於治療固體腫瘤如乳癌的情形中，該化合物之每日劑量在大約50毫克/每日至500毫克/每日的範圍。與本發明之化合物合併使用之其他化學治療劑的每日劑量要視該化學治療劑的本性而定，且可利用例行之一般在本技藝中實行的實驗法來達成。當干擾素被用於治療腫瘤，例如乳癌，而與RAR α 特定性或RAR α 選擇性化合物，以及尤其是與本發明之較佳化合物合併使用時，干擾素之每日劑量在大約1至9百萬國際單位/每日的範圍內為適宜。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

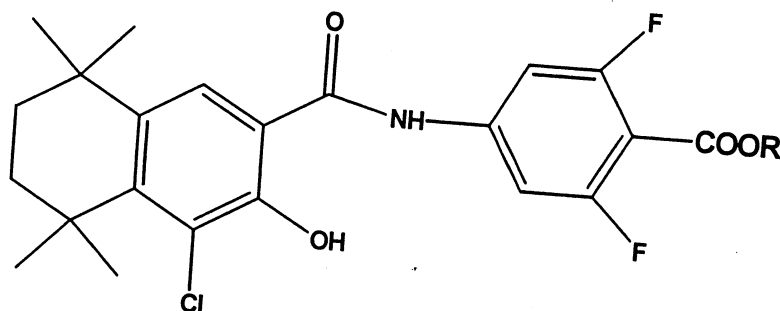
裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱: 以RAR α 選擇性視黃醛化合物結合其他抗腫瘤劑 治療腫瘤)

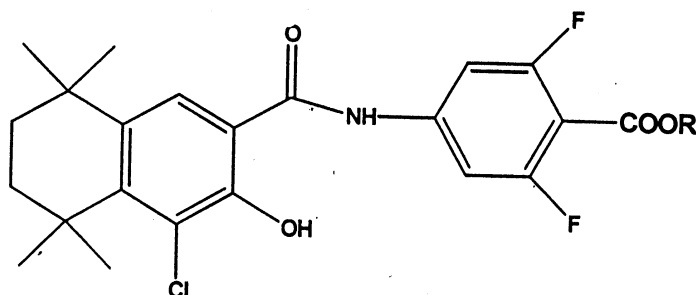
對於RAR α 受體之特定性與選擇性優於對RAR β 及RAR γ 受體之激動劑化合物，尤其是以下式中化合物



其中R是H，或含1至6個碳之碳數較低的烷基，或其醫藥上可接受的鹽。該化合物有用於治療哺乳動物體內之惡性疾病或狀況。而在治療固態腫瘤方面，該化合物會與人的重組干擾素展現協同的抗增生效果。

英文發明摘要 (發明之名稱: TREATMENT OF TUMORS WITH RAR α SELECTIVE RETINOID COMPOUNDS IN COMBINATION WITH OTHER ANTI-TUMOR AGENTS)

Compounds which are specific or selective agonists of RAR α receptors in preference over RAR β and RAR γ receptors, and particularly compounds of the formula

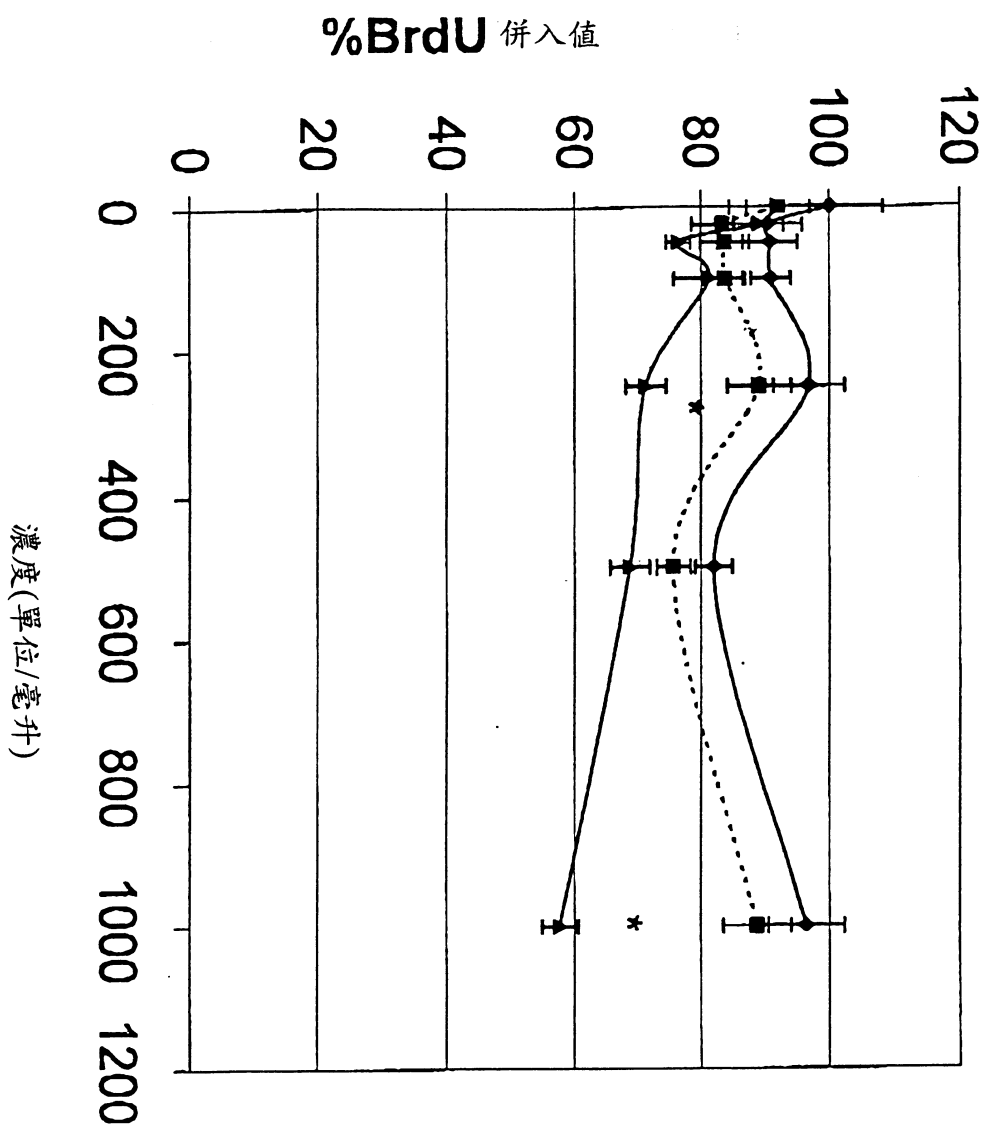


where R is a H, lower alkyl of 1 to 6 carbons, or a pharmaceutically acceptable salt, are useful for treating a malignant disease or condition in a mammal. In treatment of solid tumors the compound exhibit synergistic anti-proliferative effect with human recombinant interferon.

公告本

90 107695

圖 1：在SK-BR-3細胞中同時施用
IFN- α 和 AGN 195183



—◆— IFN- α

...■... 理論加成曲線

—▲— 實驗組合曲線:

IFN- α + 5183 10 nM

圖2：在SK-BR-3細胞中同時施用
IFN- β 和AGN 195183

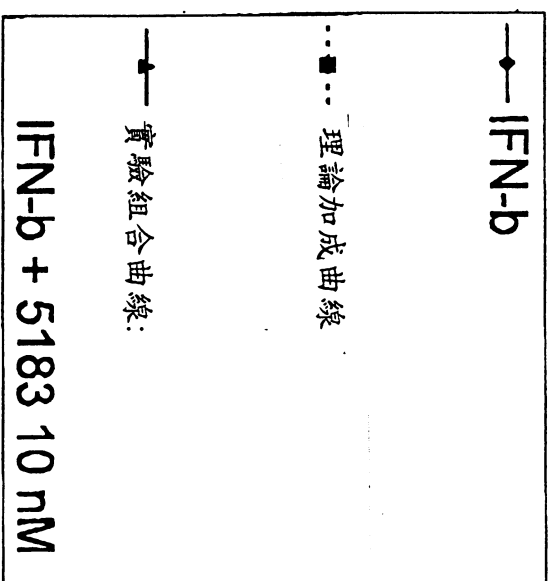
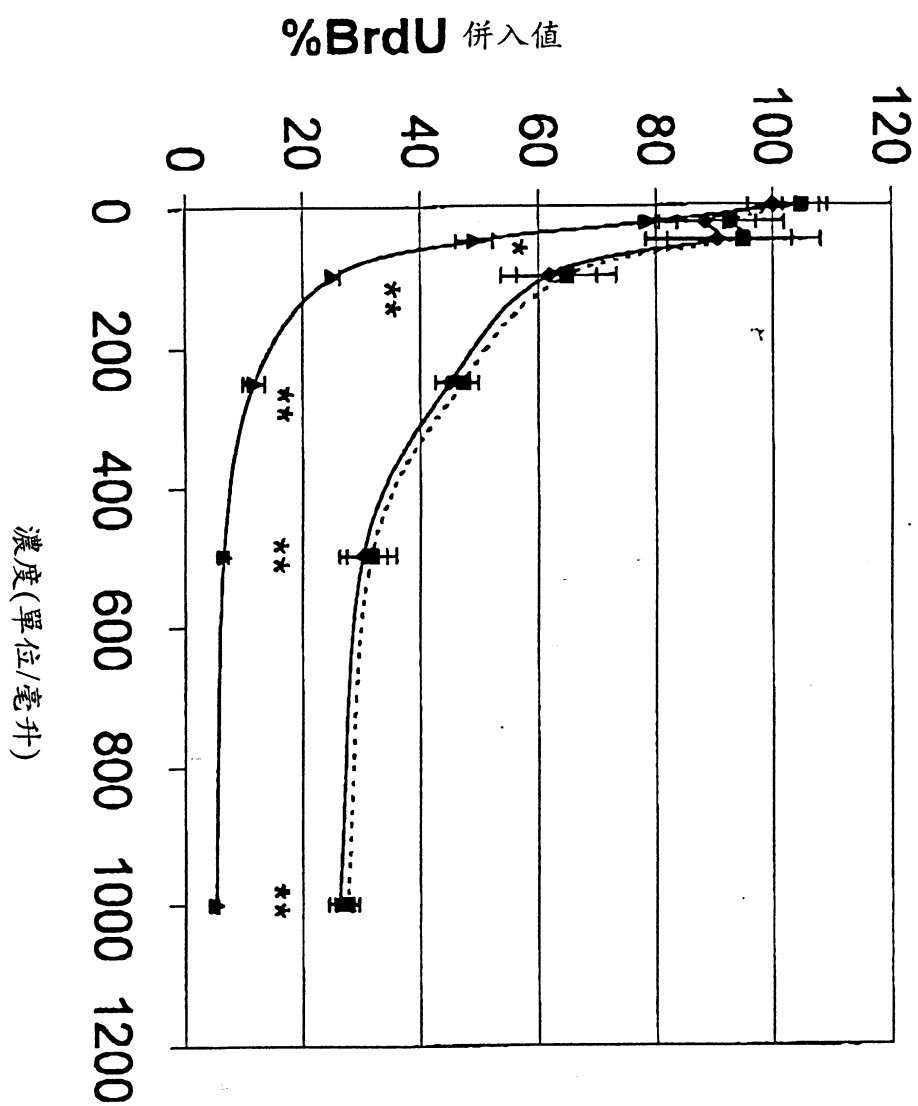


圖3：在SK-BR-3細胞中同時施用
IFN- γ + AGN 195183

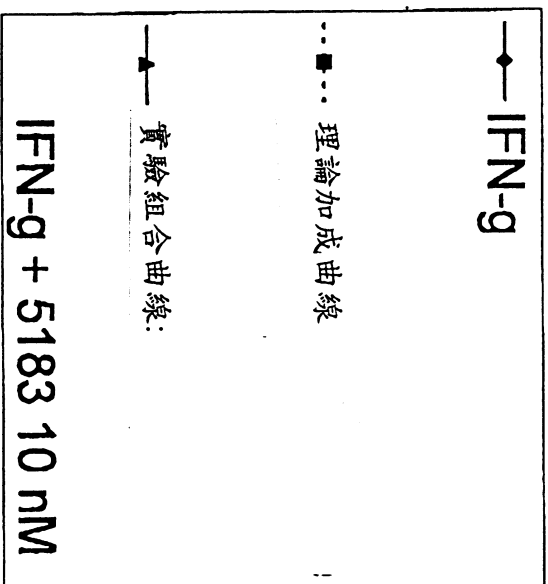
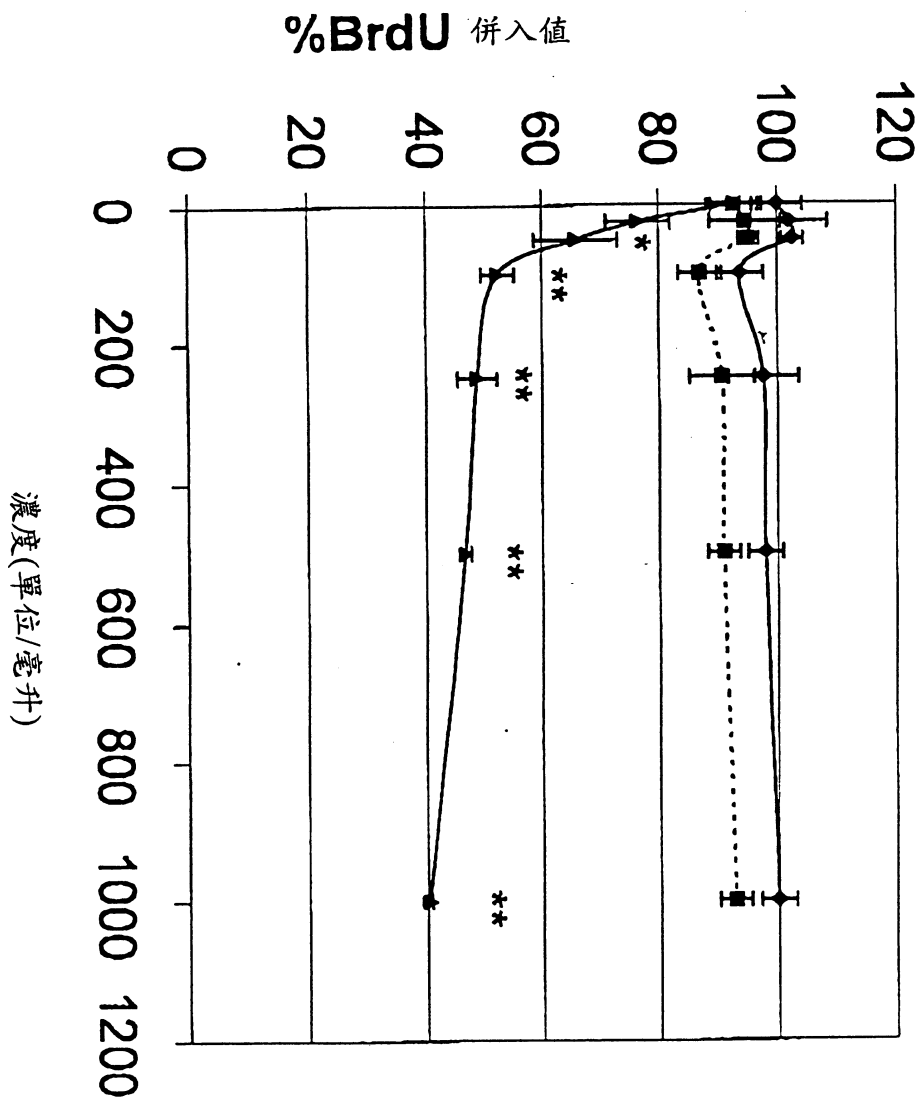
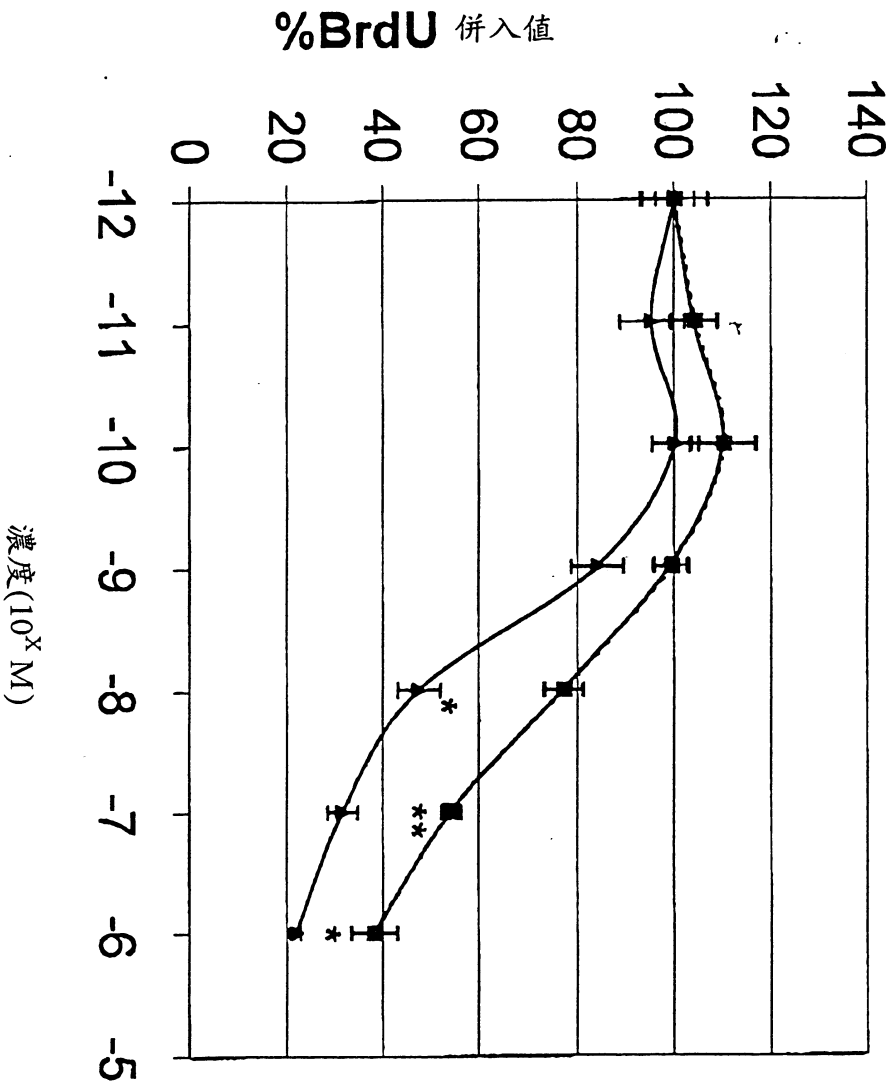


圖4：在SK-BR-3細胞中同時施用
AGN 195183+IFN- α



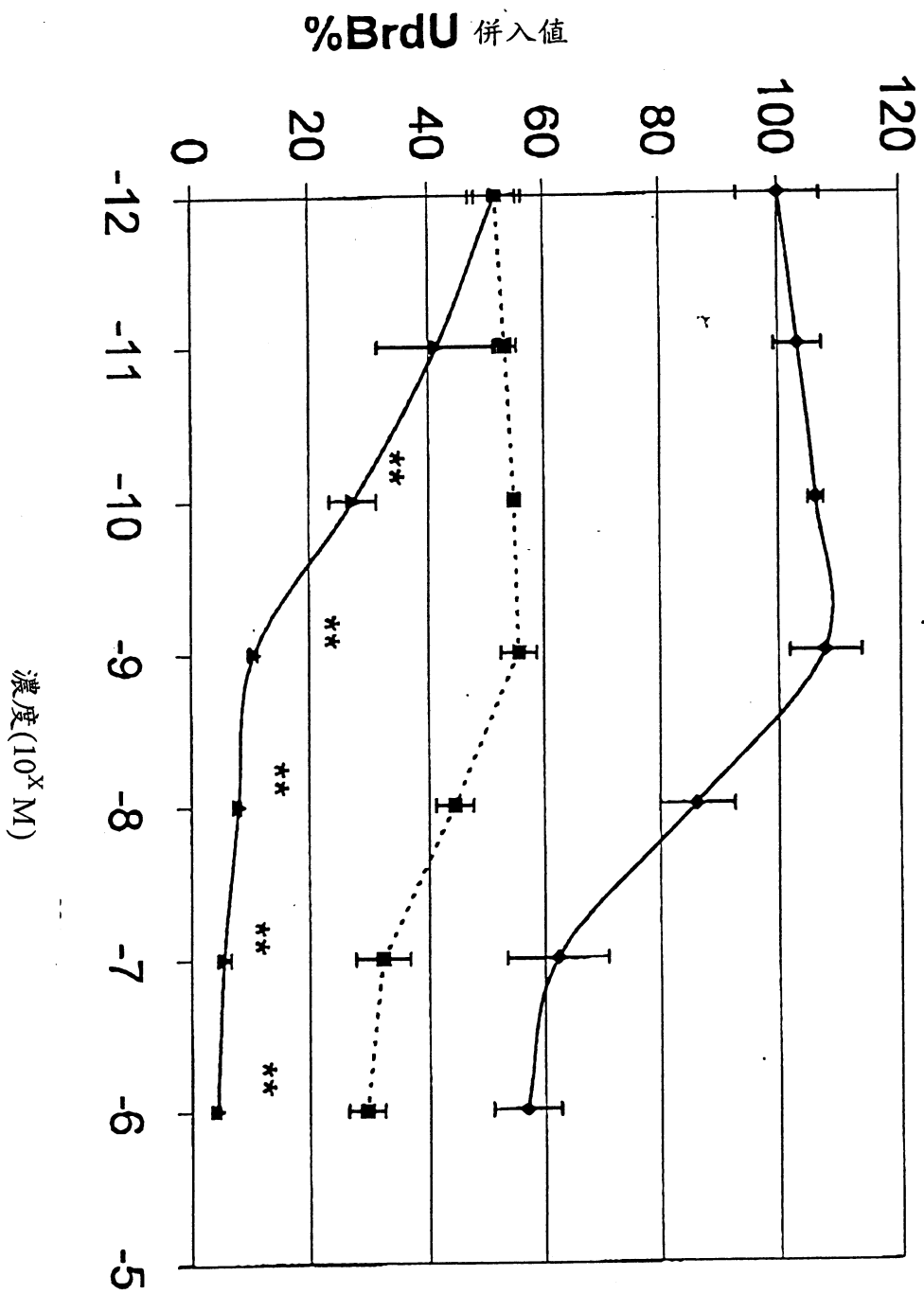
—◆— AGN 195183

—■— 理論加成曲線

—▲— 實驗組合曲線

AGN 195183 + IFN- α
100 U/ml

圖5：在SK-BR-3細胞中同時施用
AGN 195183+IFN- β



—◆— AGN 195183

---■--- 理論加成曲線
IFN-b 100單位/毫升
引致50%的抑制

—▲— 實驗組合曲線
: AGN195183
+IFN-b

圖6：在SK-BR-3細胞中同時施用
AGN 195183+IFN- γ

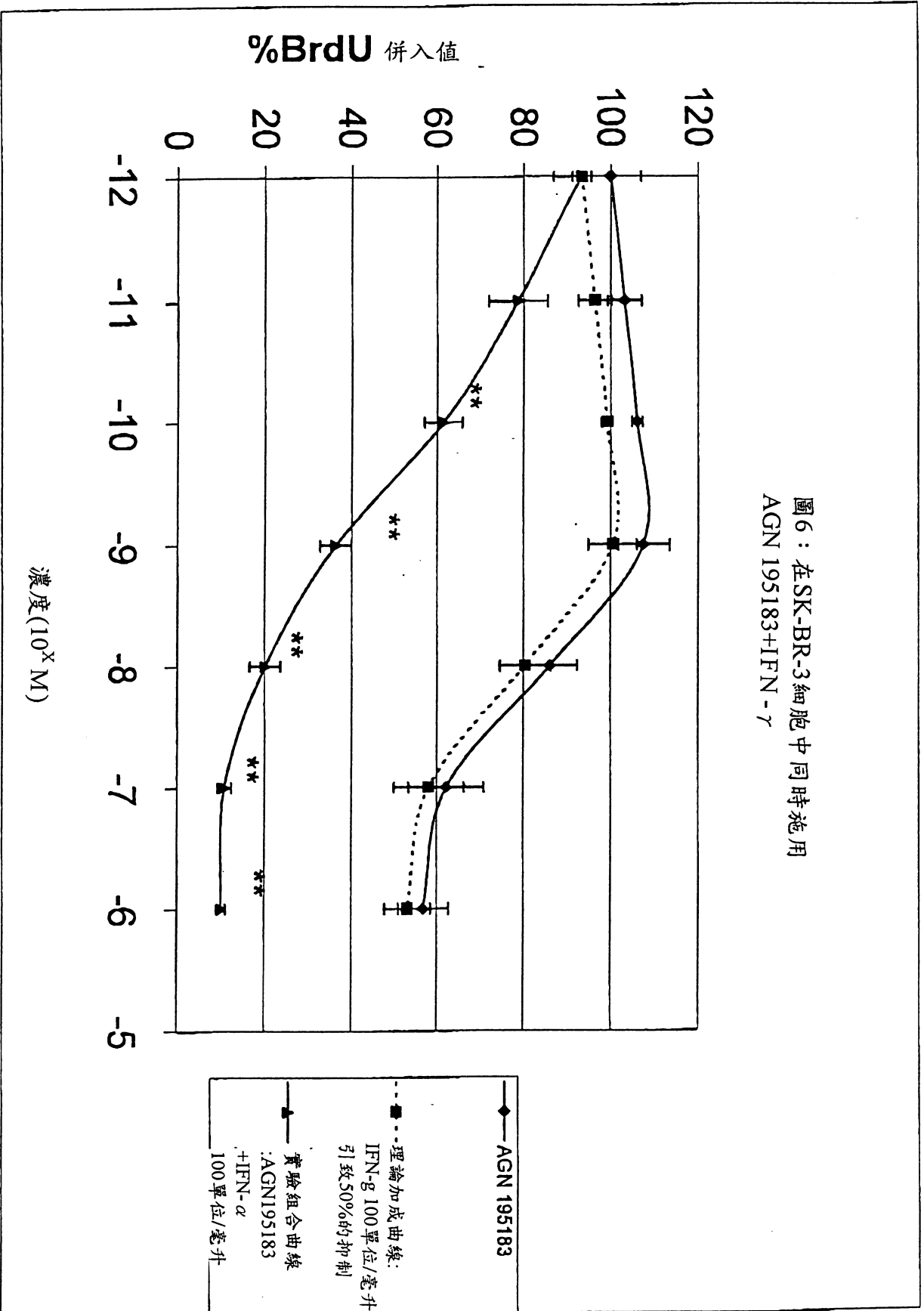


圖 7：在 T-47D 細胞中同時施用
IFN- α + AGN 195183

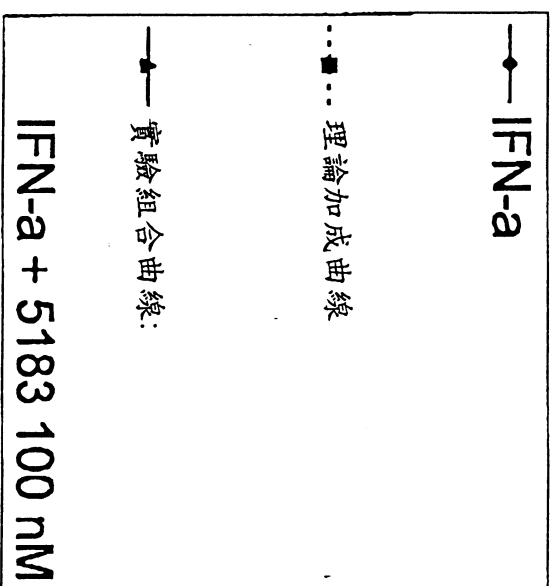
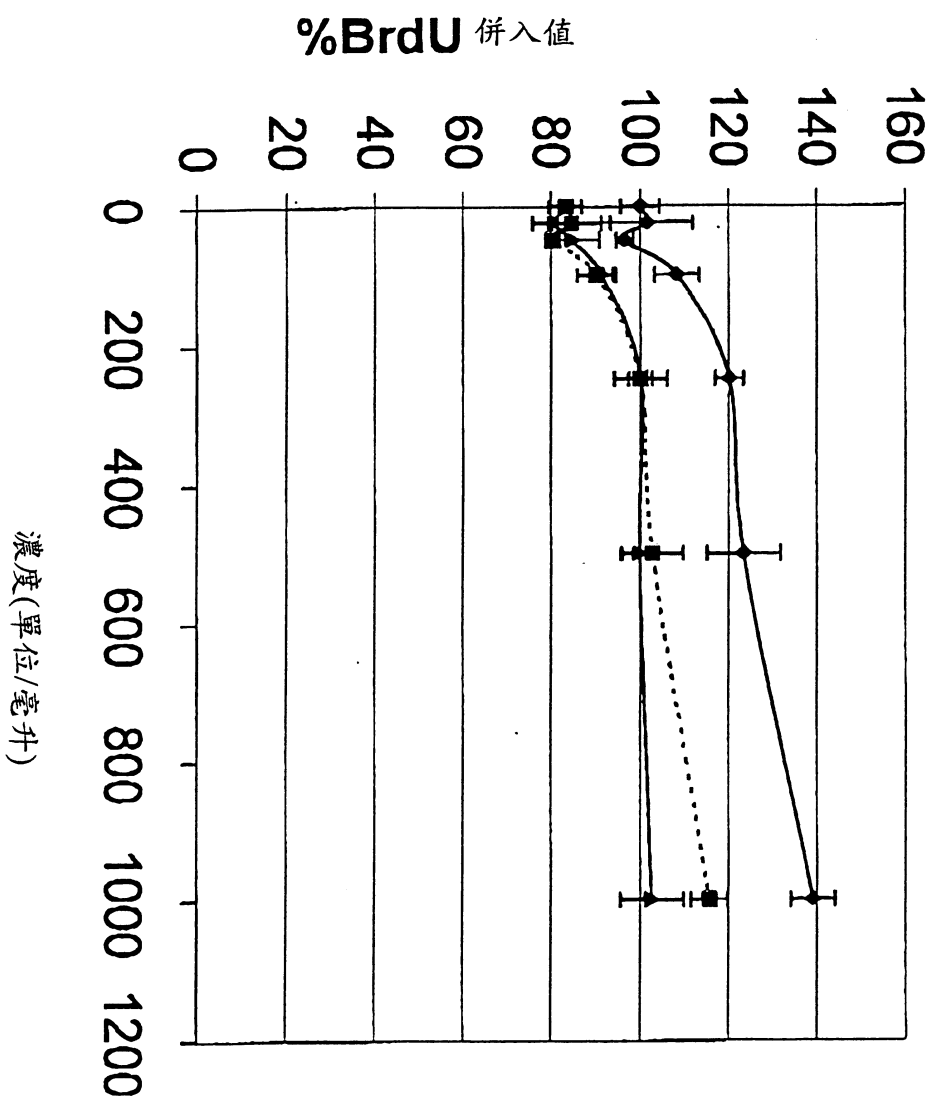


圖8：在T-47D細胞中同時施用
IFN- β + AGN 195183

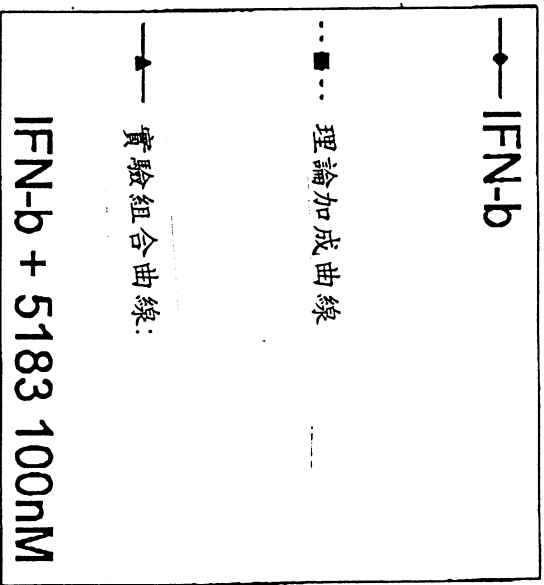
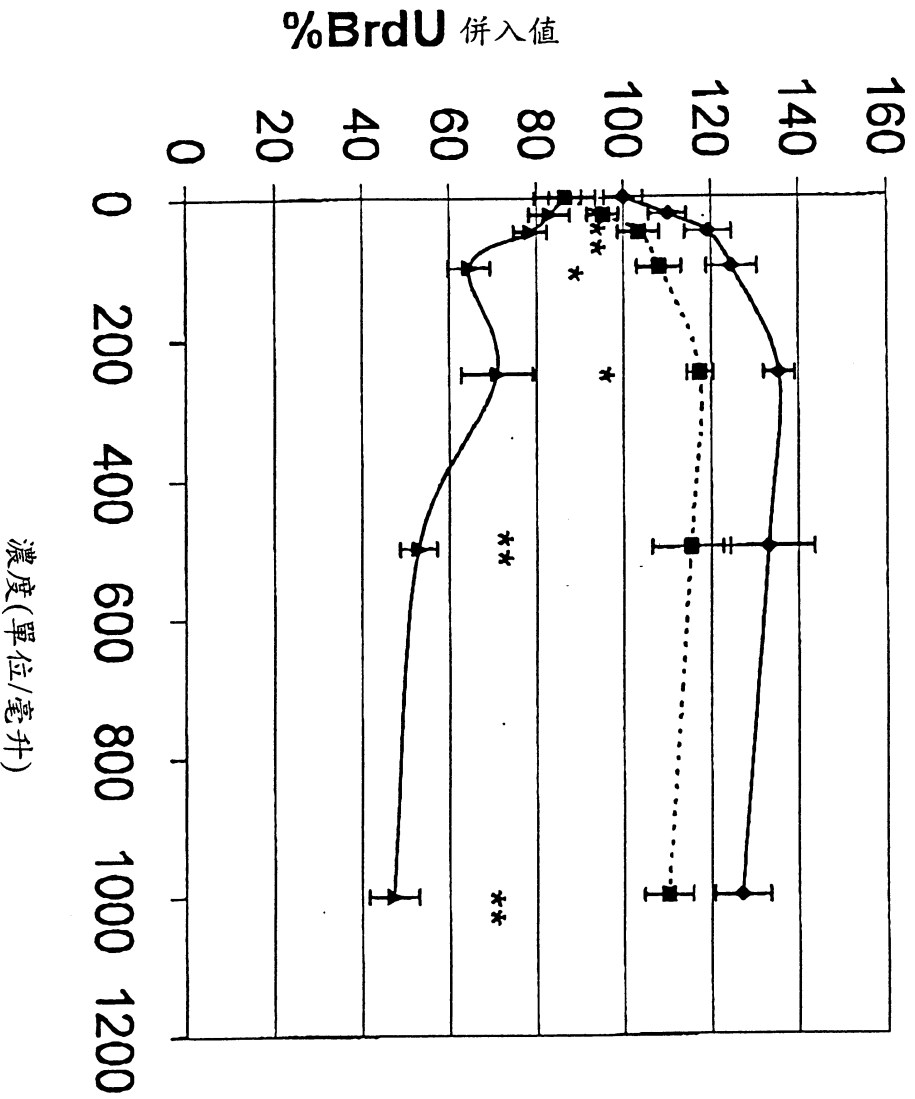
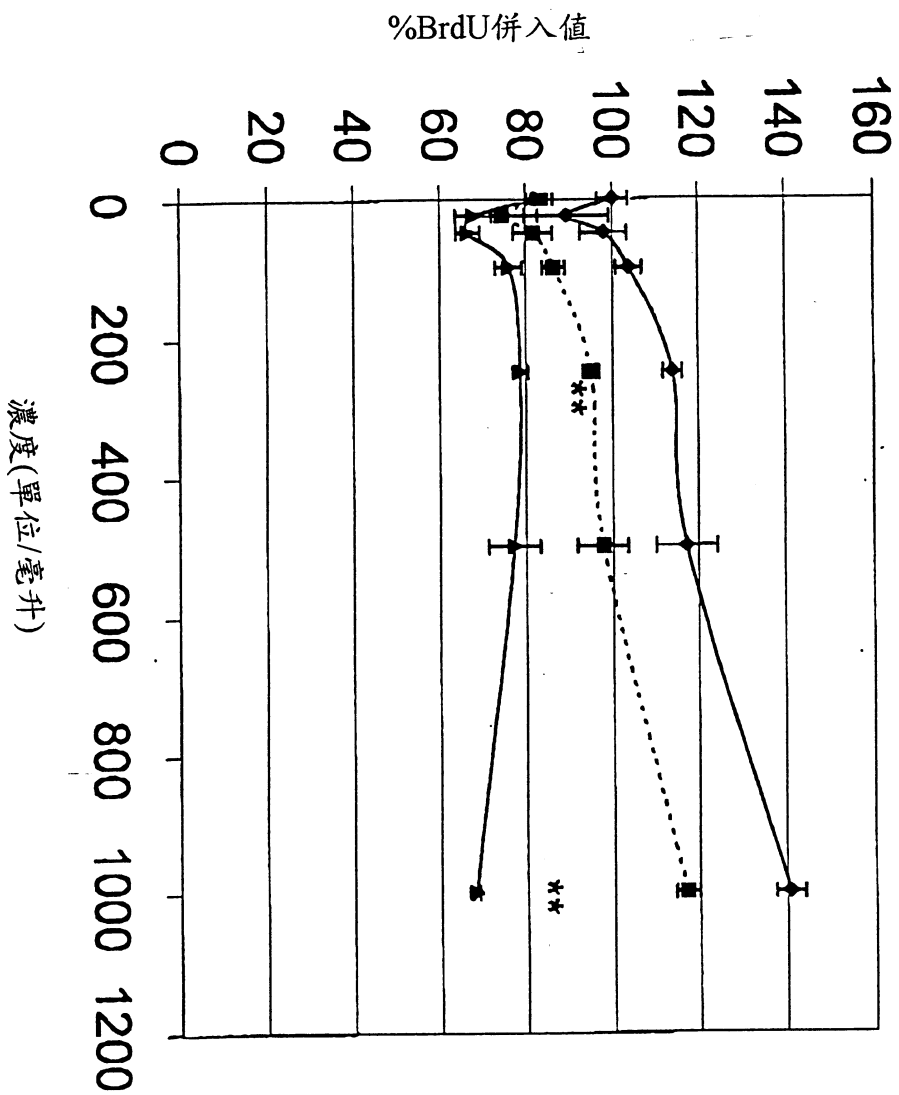


圖9：在T-47D細胞中同時施用
IFN- γ + AGN 195183



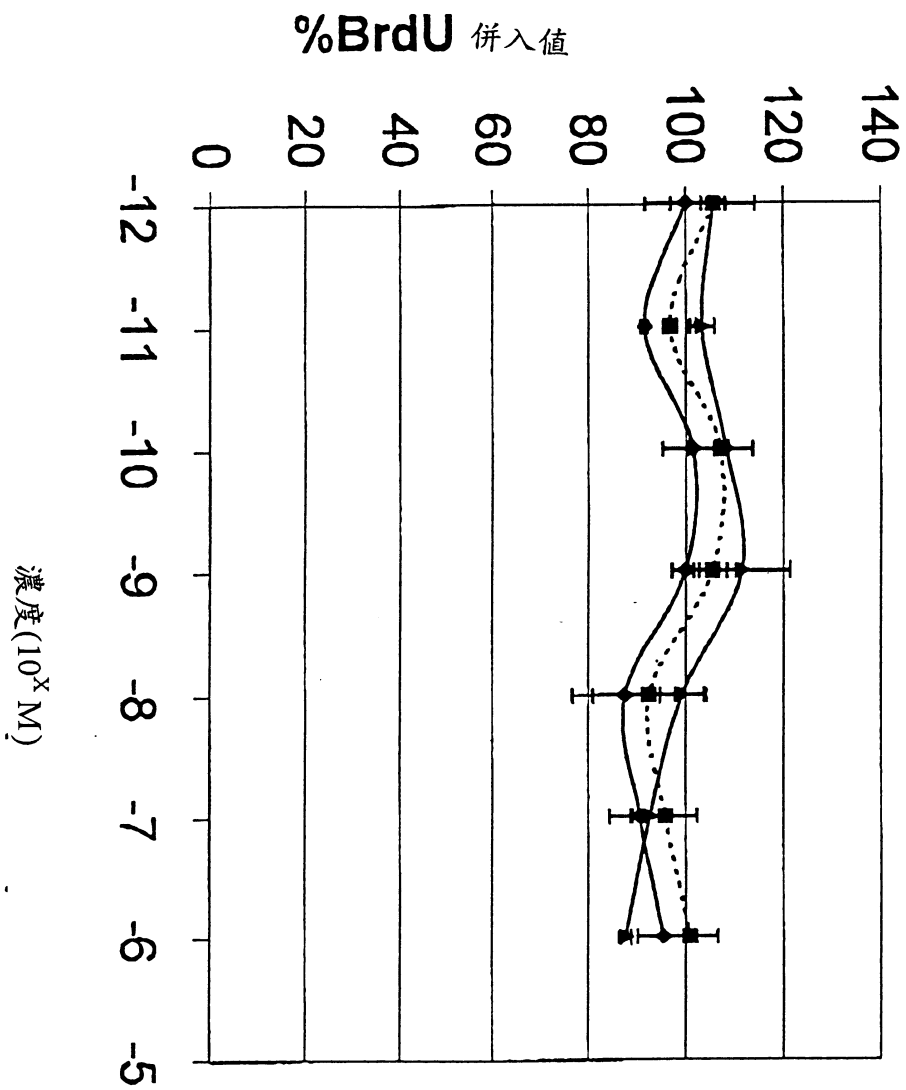
—◆— IFN-g

...■... 理論加成曲線

—▲— 實驗組合曲線:

IFN-g + 5183 100 nM

圖 10：在 T-47D 細胞中同時施用
AGN 195183 + IFN- α

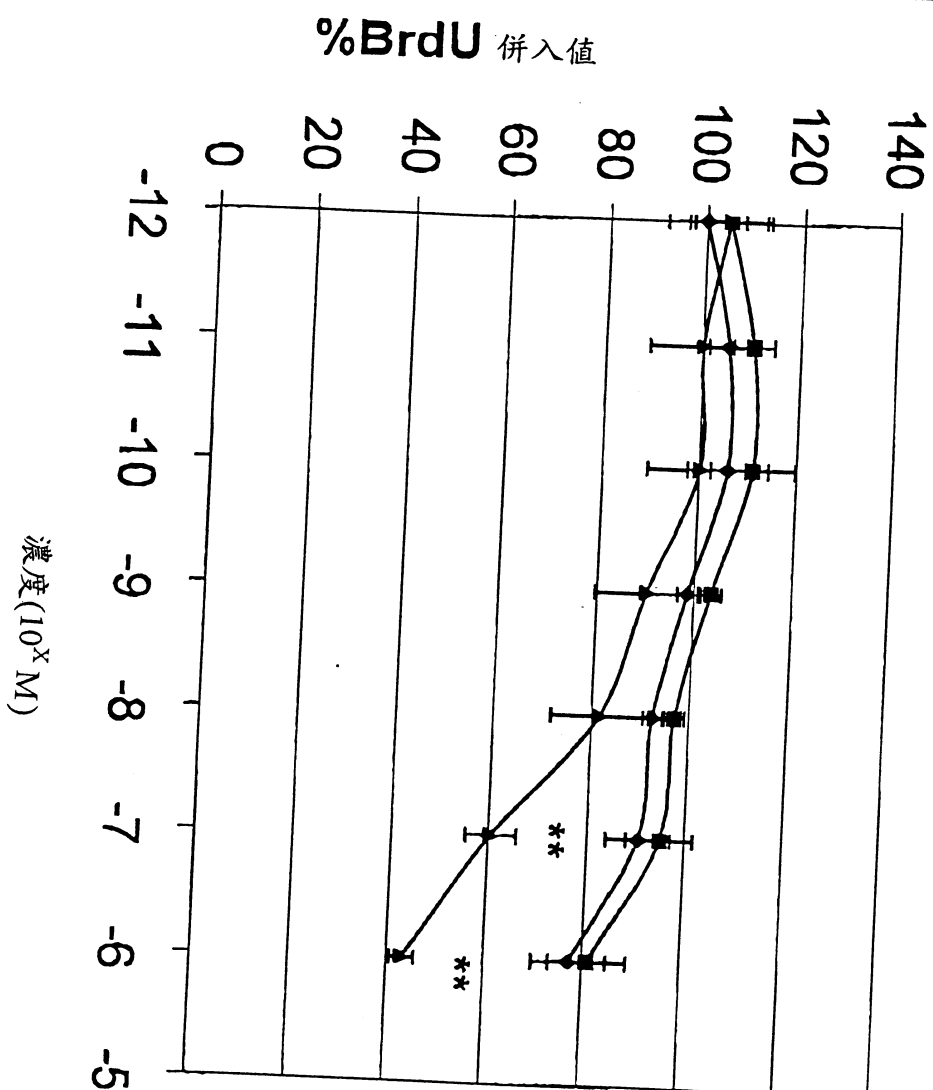


—◆— AGN 195183

...■... 理論加成曲線

—▲— 實驗組合曲線：
5183 + IFN- α
100U/ml

圖 11：在 T-47D 細胞中同時施用
AGN 195183+IFN- β

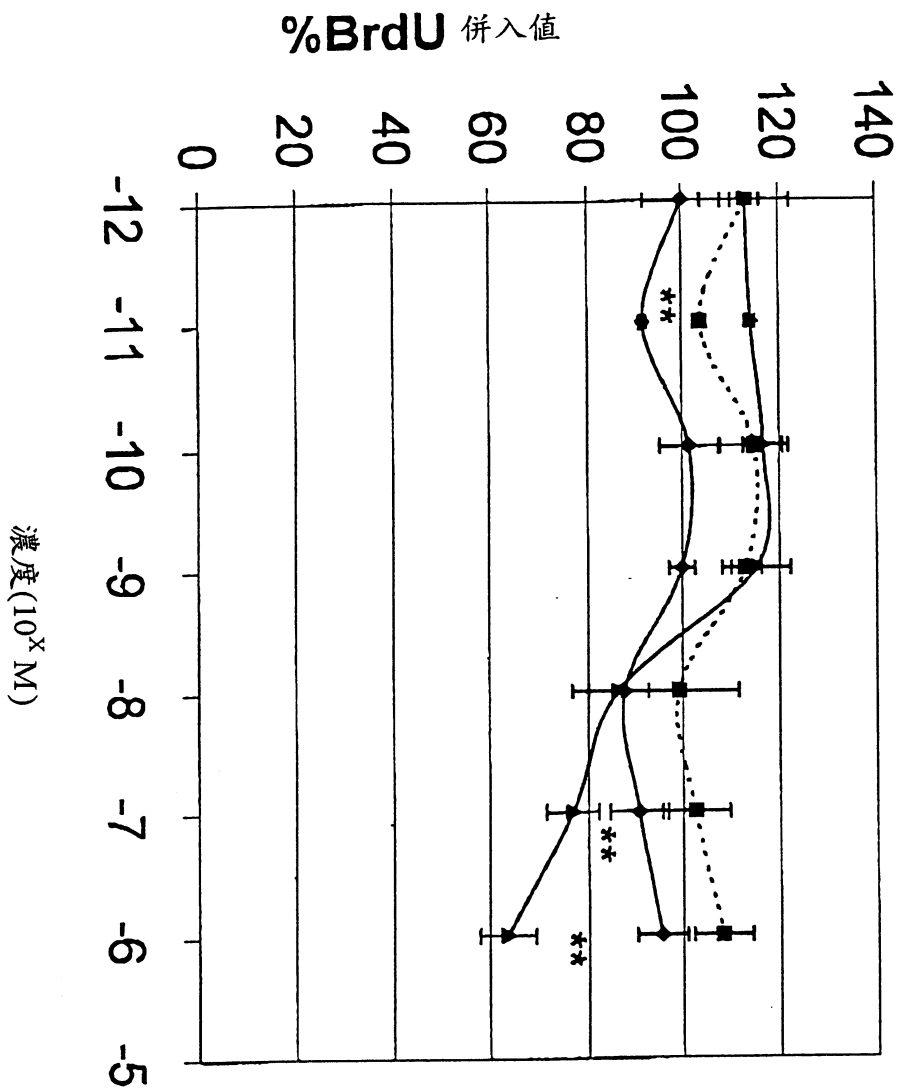


◆ AGN 195183

■ 理論加成曲線: IFN- β
100 單位/毫升對 BrdU
併入沒有影響

▲ 實驗組合曲線:
AGN 195183+IFN- β
100 單位/毫升

圖 12：在 T-47D 細胞中同時施用
AGN 195183 + IFN- γ

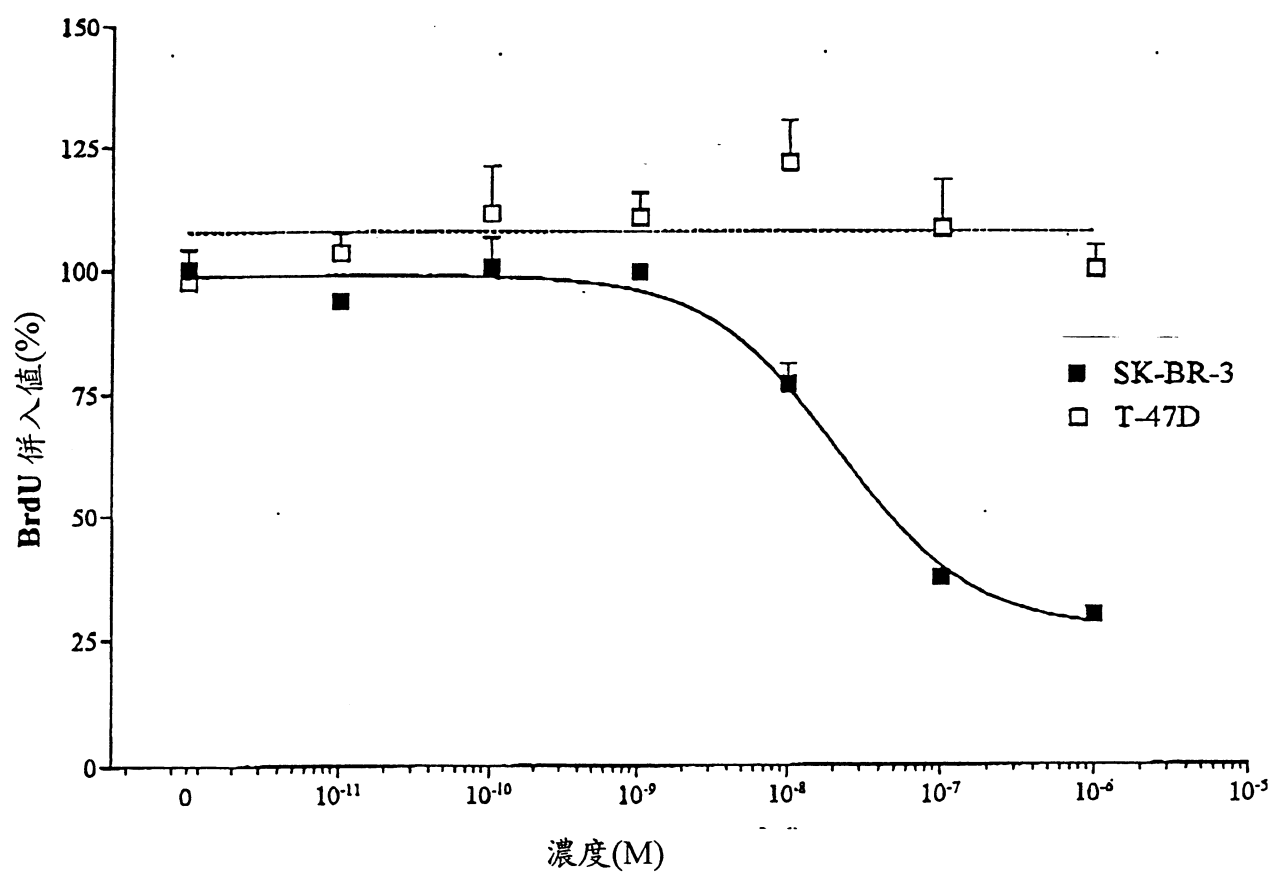


—●— AGN 195183

---■--- 理論加成曲線

—▲— 實驗組合曲線:
5183 + IFN-g
100U/ml

圖13：AGN 195183在SK-BR-3和T-47D
乳癌細胞株中的劑量反應曲線



公告本

申請日期	90.3.30
案 號	090107695
類 別	C07C 233/81, A 61K 31/00

修正
補充 本95年5月18日
A4
C4

中文說明書替換頁(95年5月)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明名稱	中 文	以RAR α 選擇性視黃醛化合物結合其他抗腫瘤劑治療腫瘤
	英 文	TREATMENT OF TUMORS WITH RAR α SELECTIVE RETINOID COMPOUNDS IN COMBINATION WITH OTHER ANTI-TUMOR AGENTS
二、發明人	姓 名	1.艾利莎 尼曼 ALISSAR NEHME
	國 籍	2.理察 L. 比爾德 RICHARD L. BEARD
	住、居所	3.羅沙沙 A. 察拉拉那 ROSHANTHA A. CHANDRARATNA 1.黎巴嫩 2.3.美國
三、申請人	姓 名 (名 稱)	美商歐樂根公司 ALLERGAN, INC.
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國加州歐文鎮郵箱19534號杜邦道2525號 2525 DUPONT DRIVE, IRVINE, CA 92612, U. S. A.
	代 表 人 姓 名	馬丁阿 福耶特 VOET, MARTIN A.

70256-950516.DOC

- 1 -

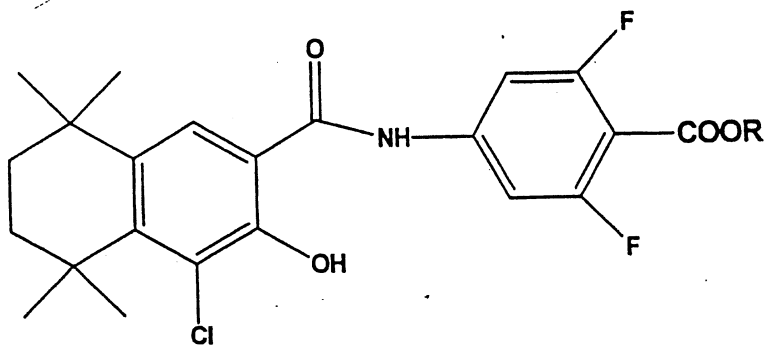
六、申請專利範圍

修正
補充

本94年9月19日

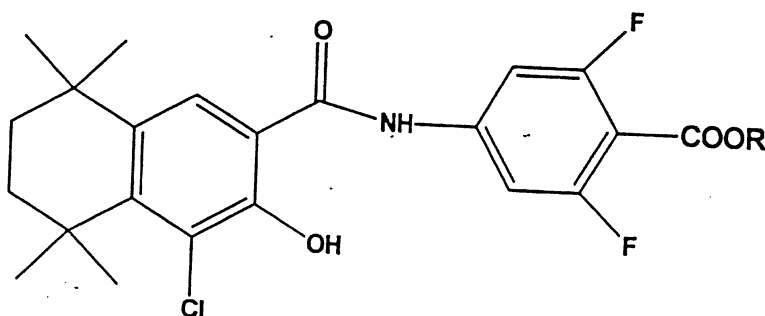
公告本

1. 一種下式之化合物，



其中R是H，含1至6個碳之碳數較低的烷基，該化合物之醫藥上可接受的鹽。

2. 根據申請專利範圍第1項之化合物，其中R是含1至3個碳之碳數較低的烷基。
3. 根據申請專利範圍第1項之化合物，其中R是H，或該化合物之醫藥上可接受的鹽。
4. 一種用於治療哺乳類動物之腫瘤之醫藥組合物，該組合物包含一種醫藥上可接受的賦形劑和醫療上有效劑量之下式化合物或該化合物之醫藥上可接受的鹽：



其中R是H，含1至6個碳之碳數較低的烷基。

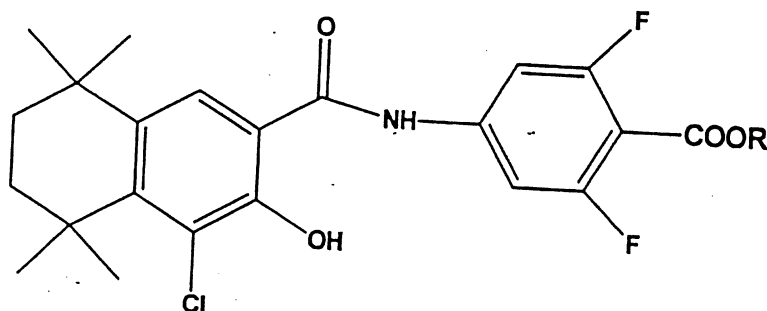
六、申請專利範圍

5. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中在化合物之式中的R是含1至3個碳之碳數較低的烷基。
6. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中在化合物之式中的R是H，或該化合物之醫藥上可接受的鹽。
7. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其尚包含對治療哺乳動物之腫瘤有效的干擾素。
8. 根據申請專利範圍第5項之醫藥組合物，其尚包含對治療哺乳動物之腫瘤有效的干擾素。
9. 根據申請專利範圍第6項之醫藥組合物，其尚包含對治療哺乳動物之腫瘤有效的干擾素。
10. 根據申請專利範圍第7項之醫藥組合物，其中該有效於治療哺乳動物之腫瘤的干擾素係至少一成員選自干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 δ 所組成之群。
11. 根據申請專利範圍第8項之醫藥組合物，其中該有效於治療該腫瘤的干擾素係至少一成員選自干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 δ 所組成之群。
12. 根據申請專利範圍第9項之醫藥組合物，其中該有效於治療該腫瘤的干擾素係至少一成員選自干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 δ 所組成之群。
13. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其包含每日劑量大約為50毫克至500毫克之該化合物。
14. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其適用於治療乳癌腫瘤。
15. 根據申請專利範圍第12項之醫藥組合物，其適用於治療

六、申請專利範圍

乳癌腫瘤。

16. 一種用於治療需要此種治療之哺乳動物體內腫瘤的醫藥組合物，其包括醫藥上可接受之賦形劑和醫療上有效量之下式之化合物，



其中R是H，或含1至6個碳之碳數較低的烷基或該化合物之醫藥上可接受的鹽，及

有效於治療哺乳動物體內腫瘤之干擾素。

17. 根據申請專利範圍第16項的醫藥組合物，其中該化合物式中的R為含1至3個碳之碳數較低的烷基。
18. 根據申請專利範圍第16項的醫藥組合物，其中該化合物式中的R是H，或該化合物之一種醫藥上可接受的鹽。
19. 根據申請專利範圍第16項的醫藥組合物，其包括每日劑量大約為50毫克至500毫克之該化合物。
20. 根據申請專利範圍第16項的醫藥組合物，其中該哺乳動物之腫瘤是乳癌。
21. 根據申請專利範圍第16項的醫藥組合物，其中該干擾素係至少一成員選自干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 δ 所組

六、申請專利範圍

成之群。

22. 根據申請專利範圍第20項的醫藥組合物，其中該干擾素係至少一成員選自干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 δ 所組成之群。

裝
訂