

申請日期	89.4.6
案 號	8P100433
類 別	A61K 47/36 A61P 35/00 (2006.01)

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	用以增強藥物之有效性的組成物與方法
	英 文	A COMPOSITION AND METHOD FOR THE ENHANCEMENT OF THE EFFICACY OF DRUGS
二、發明人	姓 名	崔西·伯隆恩
	國 籍	澳 洲
	住、居所	澳洲維多利亞克雷頓市·蒙那須大學分子生物及生物化學部門
三、申請人	姓 名 (名稱)	阿契瑪安可羅契私人有限公司
	國 籍	澳 洲
	住、居所 (事務所)	澳洲維多利亞豪森·柏晤德路737號·太平洋塔406室
	代 表 人 姓 名	馬歇爾B.耐漢森

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

澳洲 國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

，☒有 ☐無主張優先權1999,01,13
1999,11,09PP 8131
PQ 3938

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()

1

發明領域

本發明係有關一種藥物之有效性之增強，更特別的是，其具有克服細胞或生物體對於藥物之抗性。

發明背景

很多化學治療劑或藥物之臨床上的有用性嚴重地受到對該藥物之細胞抗性的出現所影響。因此，相當多的研究已在進行，而嘗試著說明涉及抗藥性之細胞機制以及克服該抗性的方法。至今提出許多涉及抗藥性之推定性的細胞機制。其等包含

(i)改變藥物的代謝，其可包含降低活化作用或增加活化作用；

(ii)標的細胞或生物體對該活性化合物的不通透性；

(iii)改變一受抑制之酵素專一性；

(iv)增加標的分子生成；

(v)增高細胞毒性損害的修復；以及

(vi)利用另一生物醫學路徑而繞過該受抑制的反應。

在藥物抗性中所涉及的細胞機制是複雜的，在發展出克服藥物抗性問題上之一般性可應用的方法，結果必然是顯少有進步的。另一個複雜的因素是，雖然藥物抗性是一與幾乎所有化學治療應用上有相關的問題，但其常常是與該等需要以許多同時使用的藥物持續且長期地治療之疾病相關。

在癌症的治療中，例如，常可觀察到癌細胞對活性化合物之不通透性。再者，亦常發現，對一藥物的抗性可造

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

2

成對另一生化上完全不同的藥物之抗性。此已被稱作多種抗藥性。一般受到多重抗藥性影響的藥物包含有阿黴素(亞德里亞黴素)、長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastine)、秋水仙素(colchicine)與放線菌素D。至少在某些例子中，多重抗藥性係為複雜的表型，其係與被稱為MdrI蛋白質(即已知的P-醣蛋白)之細胞膜藥物送出輸送子(efflux-transporter)的高位準的表現相關連。此一膜"泵"具有廣的專一性，且作用以自細胞去除廣範圍之各式各樣的化學上不相關的毒素(參見Endicott et al., 1989)。

近來，對一些微生物而言，一廣範圍之抗藥性相似機制已被報告。該等結果顯示出相當廣範圍受質專一性的細菌送出系統的存在，此是相似於於哺乳動物細胞之多重抗藥性泵(參見Nikaido, 1993)。

該逆轉抗藥性之物質已知為抗性修飾劑(RMAs)。在該等人類腫瘤對之具有抗性的化學治療劑具細胞毒性上是重要的。雖然許多試劑已被定為在人工環境下RMAs，但此等試劑的大部份具有低治療潛力或不具有治療潛力，蓋因其需要逆轉多重抗藥性的劑量下是在活體內具高毒性的。例如，代謝毒素，例如疊氮化物，係能夠在活體外逆轉抗藥性，但在活體內則無有用處。大部分其它高效用的RMAs，例如，PSC833，顯然係作為一位MdrI蛋白質上之藥物結合址的競爭性拮抗性。許多該等試劑亦具有毒

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

3

性，此限制其等在活體內的有用性。結果，有一種發展出用以逆轉多重抗藥性的另一藥理策略。

在嘗試去克服抗贅生藥劑之腫瘤攝取不佳以及降低系統性毒性(Singh et al., 1991)，調查家已試著將抗贅生藥劑，例如，氮甲喋呤(MTX)，鎖定於惡性組織的位置。一些研究亦已嘗試，利用將鏈結藥物鏈結至一依自身對腫瘤的親和性而被選定之聚合物，而將化學治療試鎖定於腫瘤(Hudecz et al., 1993; Klein et al., 1994; Akima et al., 1996)。然而，雖然這些聚合物可有助於將活性藥物輸送至該等鎖定組織，但其並不必然地會克服該等藥物的抗性問題。

已被建議可作為腫瘤鎖定劑的一種聚合物係為透明質(HA)。HA，亦為已知的透明質酸，係為一天然存在之包含一線性鏈聚合物的多醣，其被發明在所有的動物領域中皆存在有。HA 係為高度水溶性，此使其成為一供生物系統用之理想藥物傳送載劑。

申請人很吃驚地發現，HA 顯示出獨特的結構性以及生理化學特性，該等特性不僅可促住其作為藥物載劑的使用性，同時亦有助於克服抗藥性。在高濃度的 $\sim 1\text{g/L}$ ，HA採用一硬化的隨機捲繞構型，該構型相對於分子質量佔據一另外的體積(Laurent, 1970)，且在此位準或低於該位準，其對巨分子網絡形成一疏鬆鏈結(第1圖)。雖然不希望為任何理論所限制，但我們考量，基於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

4

該HA該物理特性，在多醣與試劑之間的相互作用機構，諸如，氮甲喋呤，可能是採取一種或二種形式：

(i)化學相互作用(第2A圖)。

離子鍵結可能發生於MTX胺基與HA的羧基，但如此相互作用造成沈澱。另外可能的相互作用是經由在藥物上可使用的胺基與在HA之羥基二者間的氫鍵結作用，但此不太可能是因為氮甲喋呤在水中是相當不溶的，因此，若是有此現象發生的話，其應該是一十分弱的相互作用。在MTX與HA二者間最可能的鍵結是經由MTX's 多數個疏水性基團與HA之二級結構中的疏水性區點(patch)二者間的疏水性相互作用(Scott et al., 1989)。

(ii) 分子結合

當MTX在HA凝膠中僅係為混合型(第2B圖)而無特定化學鍵結形成，MTX可夾帶於一由高濃度HA所形成的三維篩網內(Mikelsaar與Scott, 1994)，而使得該藥物在投藥後僅由該HA中擴散出來。若HA係被快速地攝取且為特定細胞受體所結合，則該藥物將會在該等點，例如，淋巴節、肝、骨髓、具有HA受體之腫瘤細胞，以高度濃釋放出來。

雖然，再次希望不要被任何特定的理論所限制，但HA可以幫助鎖定活性劑的機制可能是經由在一些腫瘤細胞上HA受體之過度表現(Stamenkovic et al., 1991; Wang et al., 1998)。該HA受體CD44，透明質調節移動性受體(RHAMM)與ICAM-1，已被連結至腫瘤的

五、發明說明()

5

起因(Bartolazzi et al., 1994)與發展(GUnthert 1993;Arch et al., 1992)。RHAMM在調節腫瘤細胞移動性與侵入性上是主要的因子(Hardwick et al., 1992)。已顯示出RHAMM對纖維組織母細胞之H-ras轉形作用是需要(Hall et al., 1995)，而此會使得該受體為腫瘤形成與生長的一可能的參與者。ICAM-1，一暫時結合至HA代謝上的受體(McCourt et al., 1994)，是在經轉形的組織中，例如，小鼠肥胖細胞瘤中，以及(Gustafson et al., 1995a)，且在人類乳癌腫瘤之腫瘤細胞基質(stroma)與集群(Ogawa et al., 35 1998)，是被高度地表現出的。

腫瘤細胞之HA受體的增加表現，提供一種供試著將HA併入化學治療之療程(regimens)的基本理由。但是，至今所獲得之有限資料教示方向是與現今所請求方法相背離。例如，利用將HA化學複合至絲裂黴素C與艾普比新(epirubicin)已可獲得有限的成功；調查家係能抑制直腸癌之生長達0.8-25%(Akima et al., 1996)。

Klein與其同僚(1994)報告出經移植老鼠乳腺與費雪膀胱癌之藥物的提高攝取，可僅利用將HA與5-FU混合來達成。小鼠肥胖細胞瘤已顯示出對靜脈注射的HA具有一親和性(Gustafson et al., 1995b)。

然而，雖有些HA的研究已顯示，HA可作為藥物的載劑，但該等研究無有一者顯示，HA係能夠克服對藥物之細胞抗性。

五、發明說明()

6

發明概要

本發明係提供一種增進細胞毒性劑或抗贅生劑的有效性的方法，其包含下列步驟：將該藥物與透明質共投藥給該試劑，其中該透明質的共投藥可促進該試劑之殺滅癌細胞的效用。

一般而言，該細胞毒性劑或抗贅生劑與透明質的共投藥可促進該試劑之殺癌細胞的效用。亦即，一般抗藥性的癌細胞會變得對其敏感。

較佳的是，該藥物係為氨甲喋呤、佩里塔克爾(paclitaxel)(紅豆杉醇)或5-氟尿嘧啶(5-FU)。

依據本發明的第二方面，其係提供一種細胞毒性或抗贅生性藥學組成物，其包含有透明質與一細胞毒性劑或抗贅生劑。可擇任地是，傳統的藥學佐劑亦可被包含在該藥學組成物中。

一般而言，該藥物係被夾帶在透明質內或被結合至該透明質上。

依據本本發明的第三方面，其係提供一種增強細胞毒性劑或抗贅生劑之效力的方法，其包含投藥以一包含有該透明質與該藥劑的藥學組成物。

雖然不想要被該理論所束縛，但一般相信，用來克服抗藥性的可能機制係為：

1. 透明質結合至位在抗藥性細胞受體上或經由大量的細胞內吞作用(endocytosis)而進入細胞，因而造成被夾帶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

7

或結合的藥劑被輸送入細胞內，而容許其變得具有治療活性。

2. 透明質結合抗藥性細胞之表面，其中該被夾帶或結合的藥劑由篩網擴散到細胞，因而造成藥物被輸送至抗藥性細胞。

3. 透明質與其它黏多醣採用一種可夾帶該藥劑之盤繞的構型，且亦可維合各種藥劑。

因此，在第四方面，本發明係提供一種降低或克服抗藥性的方法，其包含共投藥細胞毒性劑或抗贅生劑與一黏多醣一起的步驟，該黏多醣係能夠夾帶以及/或結合該藥劑，且能夠結合至位在該抗藥性留有上的受體或經由大量的細胞內吞作用而進入細胞，其中該藥劑係被輸送至該細胞內，藉此使得該藥劑變得具有治療活性。

雖然並不想被理論所束縛，但亦可能的是，該透明質與一藥劑的組合會造成該藥物係被留滯在該留有中達一段較長的時間，而容許一延長的釋放作用與較多時間供該藥物發揮其藥理效用。

因此，本發明的第五方面，係為提供一種增強一藥物之效力的方法，其包含將該藥劑與一黏多醣一起投藥的步驟，該黏多醣係與該藥物以一方式相結合，而使得該藥物係被留滯在該細胞中達一段比單獨投予該藥物更長的期間。例如，當該藥物係為細胞毒性藥劑時，該藥物係被留滯在該細胞中達一段較長的時間，容許一延長的釋放作用與較多時間供該藥物發揮其藥理效用。

五、發明說明()

8

依據本發明的第六方面，則是提供一種治療抗藥性疾病的方法，其包含將透明質與一藥物共投藥至需要該治療之病人的步驟。

在一實施例中，本發明的此方面係提供一種治療抗藥性疾病的方法，其包含有一將包含有透明質與一藥物的組成物投藥給需要該治療的病人之步驟。

更特別的是，用以治療抗藥性疾病的方法是可應用至具有抗藥性癌症的病人。較佳的是該癌病係對氮甲喋呤或5-FU具有抗藥性。

更佳的是，該抗藥性是多重抗藥性。

依據本發明的第七方面，其係提供一種治療癌症的方法，其包含將一藥物與黏多醣共投藥之步驟，該黏多醣係能夠夾帶或結合該藥物以及/或與該藥物以一方式相結合而使得該藥物被留滯在癌細胞內達一段比該藥物單獨投藥更長的期間。

依據本發明的第八方面，其係提供一種降低一藥物的胃腸道毒性的方法，其包含將一藥物與黏多醣共投藥之步驟，該黏多醣係能夠夾帶或結合該藥物以及/或與該藥物以一方式相結合而使得該藥物可降低該胃腸道毒性。

本說明書所有說明與申請專利範圍，該詞“包含”以及該詞的變化，例如，“包含有”意指“含有但不限於”，且並不想要來排除其它添加劑、成份、完整事物或步驟。

圖式簡要說明

五、發明說明 ()

9

第1圖顯示，在較高濃度下，HA形成一種三維篩網，其能夠夾帶諸如氬甲喋呤之類的小份子。該鎖定病理位置之HA/藥物係經由該HA快速地結合至特殊的留有受體，而後將該藥物自該HA擴散以及/或經由該HA與/或藥物受體之HA與藥物二者的共內部化而達成的。

第2A圖顯示在氬甲喋呤與HA之間可能分子相互反應。此包含有(i)離子鍵結，(ii)氬鍵，或(iii)疏水性鍵結。

第2B圖係為一氬甲喋呤在HA中纏結的示意圖。在較高的濃度下，HA形成一種以大型盤繞分子為代表之三維篩網。(*)代表氬甲喋呤，其具有僅僅454D，且十分容易被夾帶於400-900 kD HA分子內。

第3圖顯示在裸鼠中人類乳癌腫瘤的一般病理。第A組顯示第II-III級人類腫瘤的形態。第B組則顯示出顯示於第3A圖之腫瘤的另一個切面的顯微圖。該切面顯示，該環繞的小鼠肌肉(M)、腫瘤囊(C)、腫瘤壞死區域(N)、浸潤腫瘤(T)以及(→)顯示出一已知稱為“印地安排列(Indian files)”現象，其中該癌細胞排列成列，此一般係與浸潤癌腫瘤相關(Carter, 1990)。

第4圖顯示乳部惡性腫瘤的傳統病理特徵。第A組顯示一具有大區域壞死(N)之浸潤道腫瘤之特徵的切面。此顯示該腫瘤之較攻擊期間。第B組顯示血液細胞(-+)的存在，此顯示該腫瘤係接有血管且因而可存活。在相當接近血管處，有一些可被觀察到的管道(D)。第C組顯示，

五、發明說明 ()

10

被標記為(A)的細胞，如核分成片段所顯示者係，遭受到程式化死亡(apoptosis)。

第5圖顯示於裸鼠中生長的人類乳癌腫瘤細上之HA受體的免疫組織化學鑑定。第A組顯示，在腫瘤中癌胚(carcinoembryonic)抗體(CF-A)之局部化。第B組顯示在人類乳癌瘤上的RHAMM表現。第C組顯示在人類乳癌瘤上的ICAM-1的表現。該HA受體的局部化作用，ICAM-1主要是環繞著內皮組織(->)。第D組顯示在人類乳癌瘤上的CD44的表現。CD44H 係在約95%的腫瘤細胞上皆可檢測得。H：人類來源的細胞；M：鼠類來源的細胞。

第6圖顯示使用作為供鎖定腫瘤之氮甲喋呤的載劑之透明質的分子量分析結果。

第7顯示鎖定人類乳癌腫瘤之氮甲喋呤，其使用HA作為載劑。

第8圖顯示在HA存在下氮甲喋呤之增強攝取。

第9圖顯示當藥物與HA一起投藥時，在胃腸道中氮甲喋呤的降低攝取。

第10圖顯示在MTX/HA之間可能的物理相互作用與其後藥物/HA組合治療之腫瘤鎖定能力的示意表示。

第11圖顯示結合HA與5FU在活體外效用之細胞毒性加成性。

第12圖顯示使用HA作為載劑，5-FU鎖定人類乳癌腫瘤。

五、發明說明 ()

11

第13圖顯示在人類中HA的消除路徑。

第14圖顯示在胃、腦及肺中5-FU的增加攝取。

第15圖顯示在血漿5-FU藥學動力學消除上HA的效用。

第16圖顯示用於定義實驗終點的標準。其係顯示標準2(第A組)與標準3(第B組)。

第17圖顯示5-FU/HA佐劑治療的效用(6週的療程)：在主要腫瘤體積上的效用。

第18圖顯示5-FU/HA佐劑治療的效用(6週的療程)：在主要體重量上的效用。

第19圖顯示5-FU/HA佐劑治療的效用(6週的療程)：在癌淋巴節之分散與新腫瘤形成上的效用。

第20圖顯示6個月效用研究之腫瘤一般外觀。

第21圖顯示5-FU/HA佐劑治療在病人存在上的效用。

第22圖顯示在以CMF/HA治療達6週期間的小鼠在體質上的變化%。

第23圖顯示在以CMF/HA治療達6週期間的小鼠在腫瘤體積上的變化%。

第24圖顯示溶解於H₂O內的MTX之¹H NMR光譜。在光譜十分容易地鑑定出在MTX中的氫原子群。

第25圖顯示MTX與HA可能的相互作用。

第26圖顯示在600 MHz與298 K下透明質酸的600 MHz光譜。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

12

第27圖顯示，在298 K下，僅有MTX與MTX及增加加入有2毫微莫耳、10毫微莫耳、20毫微莫耳與80毫微莫耳之HA(50kDa)的600 MHz ^1NMR 光譜。

第28圖顯示，在298 K下，5-FU與5FU(1.25mg/mL、1.6mg/mL與6.4mg/mL及HA(750kDa，3mg/mL)在7.0與8.5ppm之間的600 MHz ^1NMR 光譜。

縮寫

BSA	牛血清蛋白
Ci	居里
CMF	環磷醯胺，氮甲喋呤與5-氟尿嘧啶
Cyc	環磷醯胺
DNA	去氧核糖核酸
Dpm	每分鐘的惡化情況
DTTP	去氧胸腺嘧啶三磷酸
ECM	細胞外母質
EDTA	二乙撐基二胺四乙酸
ELISA	酵素鏈結之免疫吸附分析
FCS	胎牛血清
5-FU	5-氟尿嘧啶
GAG	糖胺聚糖
GlcNAc	N-乙醯基胺葡糖胺
GlcUA	葡糖醛酸
HA	透明質/透明質酸

五、發明說明 ()

13

HABP	透明質結合蛋白
HAase	透明質酸酶
HBSS	Hanks平衡鹽溶液
HRP	馬自由基過氧化酶
h	小時
K_{av}	在凝膠內所獲致之體積分佈情況
l	升
min	分鐘
PBS	磷酸緩衝鹽溶液
PM	血漿膜
RHAMM	調節HA-移動性之受體
RMCA	大鼠之鼠類癌症
RNA	核糖核酸
RT	室溫
S-相	合成相
S.D.	標準偏差
SEM	平均值的標準誤差
V_e	溶析體積
V_o	空隙體積
V_t	總體積
TGD	腫瘤生長遲滯作用
TDT	腫瘤雙Ti

發明的詳細說明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

14

本發明將參見下列非限制性的實施例而進一步的說明。但可以了解到的是，下列的實施例僅是例示說明，且不可以任何方式而被視為對本發明上述揭示之一般性作限制。特別是，雖然本發明就有關癌症方面作詳細的說明，但可以了解的是，在此所發現的事實並不限於治療癌症。例如，細胞毒性劑亦可使用於治療其它的病況；氮甲喋呤廣泛地被使用於嚴重的類風濕性關節炎。

實例1 對在裸鼠中人類乳癌腫瘤的有效性與位在乳癌腫瘤上透明質受體之原位鑑定

為了建立出人類乳癌的合適動物模式，必須要進行病理測試。對一要在生理中存活的腫瘤而言，新生血管化是必要的，因此，微血管網可供應營養至該腫瘤上。血管化的存在、導管的入侵、壞死、程式化死亡、高有絲分裂指數與核不正常係為乳癌的所有特性。

人類乳癌細胞株MDA-MB-468 (American Tissue Culture Collection, Rockville, U.S.A) 係基於其對HA受體、CD44、RHAMM 與ICAM-1的表現而被選出。該等細胞一般係在170cm²的培養瓶中以單層形式生長並被次培養於被添加有10%胎牛血清(FCS)與10 μg/ml 慶大黴素之Leibovitz L-15培養基。為了要注射入小鼠，細胞係被生長成100% 匯流(confluency)，在0.05% 胰蛋白酶/0.01% EDTA溶液中作胰蛋白酶分析，在Beckman TJ-6實驗台型離心機 (Beckman, Australia) 以 400gav離心 10分鐘而清洗二次，使用

五、發明說明()

15

一 Model-ZM Coulter 計數器 (Coulter Electronics, England) 來計數，並以 1×10^8 細胞/ml 再懸浮於不具有血清之 Leibovitz L-15 培養液。

85 隻不具胸腺的 Balb/c/WEHI 雌性裸鼠 (Walter and Eliza Hall institute of Medical Research, Melbourne, Australia)，6 至 8 週大，係被維持在特殊不具有病原的條件下，並具有隨意取得之無菌的食物與水。如上所述，準備千萬個 MDA-MB-468 細胞，且直接注射進入在各小鼠乳頭下的脂肪墊。在 90% 的小鼠中可觀察到腫瘤生長。當腫瘤生長是可以目視檢測到時，該腫瘤的發展係以每週測量該腫瘤體積來監測。腫瘤體積係使用下列程式而由三個垂直直徑來計算出的：

$$V = (1/6) \pi (d_1 d_2 d_3)$$

其中：V 係為腫瘤體積 (mm^3)，

d_1 為腫瘤之第一直徑 (mm)，

d_2 為腫瘤之第二直徑 (mm)，以及

d_3 為腫瘤之第三直徑 (mm) (Lamszus et al, 1997)。

腫瘤接種後 8 週，該腫瘤平均尺寸為 482.2 mm^3 (SEM, 39.8 mm^3)。

在導入腫瘤後約 8 週，2 隻帶有腫瘤的小鼠係給予致死劑量的戊巴比妥鈉 (Nembutal)。在 3 分鐘內殺死該等小鼠，腫瘤係以手術取出並馬上固定於 10% 經緩衝之福馬林達 12 小時。該經固定的腫瘤係在一連串的 70-100%

五、發明說明()

16

酒精中脫水，而後以石臘包埋，再由其中切出2-4 μm 的切片。該切片係被置於載玻片上、去臘並與水接觸。該載玻片係在磷酸-緩衝的鹽溶液(PBS)中清洗3x5分鐘。利用以10%胎牛血清10分鐘而阻礙親異質蛋白，而後以PBS浸洗。在室溫(RT)下應用檢測用的抗體達60分鐘。該抗血清或抗體係為對抗RHAMM (Applied Bioligands Corporation (Manitoba, Canada))、ICAM-1、CD44v6、CD44v10、總CD44H與and CAE者。所有其它的檢測抗體係購自於Zymed (California, U.S.A)。該玻片係在PBS 中清洗3x5分鐘，且內源性過氧化酶活性係利用將之浸於0.3% H_2O_2 /甲醇中達20分鐘而被阻礙。在另一次的PBS 清洗後，在RT下應用過氧化酶-綴合之豬抗-兔子第二抗血清 (Dako, Denmark)達60分鐘，而後在PBS中清洗3x5分鐘。依據製造商指示製備Sigma 快速DAB (3,3'-二胺聯苯胺, Sigma, St. Louis, U.S.A)錠劑，並將DAB溶液在室溫下應用達5-10分鐘。該載玻片以自來水清洗10分鐘，以蘇木精作對應染色，脫水並放置。

蘇木精與伊紅-染色的乳癌腫瘤切片的檢視顯示所有與腫瘤存活有關的一般特性，如第3與4圖所示者，此確認了動物寄主成功地維持第II級人類乳癌。其具有幾個為惡性腫瘤特性之特徵。該標示為(B)之載玻片上的切片顯示出該等特性。在惡性腫瘤所觀察到的病理特性係在切片(B)中，即

五、發明說明 ()

17

- i) 高的核/細胞質比例
- ii) 有角度的核染色質與核仁
- iii) 不規則的核膜

可獲致的結論為，第II-III級位準的腫瘤係能夠在裸鼠的小鼠模式中被支持。第II-III級位準的腫瘤一般有約47%的預後存活率 (Bloom and Richardson, 1957)。

第II-III級位準的腫瘤係具有下列特性：

- i) 中等核多形性、過高的核染色質與有絲分裂活性，可觀察到腫瘤切面所顯示的所有特徵；以及
- ii) 很少或沒有導管形成

大區域的壞死 (N) 係與腫瘤分散的情況有相關的，此示出一較為攻擊性的侵入期間 (Carter, 1990)。該腫瘤的浸潤邊緣係以 () 顯示之。

本發明的主要目的係為有效性，即該在該等小鼠中所建立之腫瘤的組織學上與細胞學上的行為係可與在天然人類寄主中該等行為相比擬的。在達成此目的上，我們亦顯示出，在小鼠中的腫瘤細胞係為人類來源，且可高度表現出相關的HA受體，例如，RHAMM、CD44與推定之ICAM-1。因為該腫瘤鎖定係可經由受體-調節之化部人或結合作用而發生者係為一種假說，故必須要確認出HA受體、ICAM-1、CD44與RHAMM的表現。第5B-D圖顯示，該等受體全部係存在著。表1列出在二種測試瘤腫中該等受體表現的程度。

五、發明說明 ()

18

表1：在人類乳腫瘤外移植物上透明質受體的表現

在腫瘤上的抗原決定基表現的百分比之比率指數係被量化成：

0 %	-
1 - 25 %	+
26 - 50 %	++
51 - 75 %	+++
76 - 100 %	++++

HA 受體	功能	腫瘤上的分佈情況	在腫瘤上抗原決定基之表現 %
CD44H	顯著地結合並內部化HA之異構型 (Culty et al., 1992)	在除了一些基質細胞之外的細胞上的表現	++++
CD44v6	在腫瘤中的角色未知，但當使用作為一預後因子。表現愈高，則存活的機率愈低 (Friedrichs et al., 1995)		+
CD44v3	常在乳癌中過度表現 (Friedrichs et al., 1995)		-
RHAMM	轉形與腫瘤細胞侵入上是必要的 (Hall et al., 1995)	浸潤腫瘤細胞群，其在環繞壞死區域之細胞上具有高度表現	+++
ICAM-1	結合並內部化HA，推定的代謝受體 (McCourt et al., 1994)	在基質細胞上所存在者	++
CEA	表現惡性腫瘤細胞上之胎兒抗原 (Haskell, 1990)	在所有腫瘤細胞中存在著	++++

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

19

實例 2 氣甲喋呤/透明質：藥物組成物之製備與注射

在證實了裸鼠模型的有用性之後，現在可將之用以測試HA/MTX調劑的有效性。

MTX的儲備溶液藉由溶解粉狀MTX於0.5% w/v碳酸鈉 (pH 9) 中被製備，並利用0.9% w/v NaCl使之達成24.5 mg/ml的濃度。該儲備溶液經由一0.22 μ m的濾器被過濾，以確保在加入 $[^3\text{H}]$ 氣甲喋呤前係為無菌，並且以一注射-等級的氯化鈉將之稀釋至一注射濃度。用於裸鼠以及人類的MTX之藥學動力學比較數據已經被刊行(Inaba et al, 1988)，而被應用於本研究的設計中，以儘可能的模擬人類治療的劑量。個別的注射根據個別的老鼠體型大小被製備，以達到於50 μ l中輸送15 mg/kg MTX的目標(相等於平均體重60公斤的0.42 mg/kg的人類治療的劑量；Inaba et al, 1988)。

乾燥的HA(model Mr 8.9×10^5 kDa)被加入至24.5 mg/ml MTX儲備溶液之一部分中並且振盪溶解隔夜，以提供一21 mg/ml之最終濃度。為確保無菌，加入慶大黴素至50 μ g/ml的濃度，並且於4°C下培養隔夜。在加入 $[^3\text{H}]$ 氣甲喋呤之後，該HA/MTX儲備混合物以注射等級之氯化鈉被稀釋成注射濃度。注射係個別地根據老鼠體型大小被製備，以於50 μ l中輸送15 mg/kg MTX與12.5 mg/kg HA。以如此量的HA注入體內，於試驗期間飽和動力學將被觀察(Fraser et al, 1983)。

五、發明說明()

20

為確保於氨甲喋呤/HA 注射混合物製備期間，HA 維持其分子量，該注射溶液於一Sephacryl S-1000 大小區別凝膠(Pharmacia, Uppsala, Sweden)上以1.6cm x 70cm的管柱明細事項，2ml的樣品大小，18ml/h的流速以及2ml的餾份大小被分析。第6圖顯示HA於混合過程中維持其分子量。

40隻小鼠被隨機分為的二組。第I組僅接受MTX，而第2組接受MTX/HA組合物治療法。動物被個別地置於一注射盒中，並且該注射經由尾部血管被投藥。於每一注射中包含有氚標記的氨甲喋呤(被注入的每分鐘的衰變量之平均(dpm) ± 標準差(SEM): 19,159,146 ± 1,336,819)之15mg/kg MTX ± 12.5mg/kg HA 被輸送。小鼠被個別地置於一柔軟的、非可浸濕的塑膠圍欄中如此尿液可被收集。於注射之後30min、1h、2h、4h或8h，小鼠藉腹腔注射0.1ml戊巴比妥鈉(Glaxo, Australia Pty. Ltd., Melbourne, Australia)被麻醉，並且使用針頭以及注射筒自心臟或是大血管收集血液。於血液收集之後，該動物藉由頸部錯位被殺死。

血液被輸送到EDTA塗覆的玻璃管中並且藉由於14,000gav離心10min製備血漿。在以100 μ l的30%v/v過氧化氫脫色並且加入3ml HiSafeII scintillant之後，放射性於一50 μ l等分試樣被計數。為克服化學化學發光與光致發光，視樣品來源該樣品於一Wallac 1410 β -計數器中重覆3、7或20 d期間被計數

五、發明說明()

21

2 min。於被計數之間的期間，樣品於室溫下被儲存在黑暗中。所有的計算結果於一穩定的樣品被執行，於此所有的化能與光能螢光均已被移除。

為了決定被注入MTX於血漿中的百分比，需要計算出每一老鼠的總血漿體積(ml)，使用下述公式：

$$\text{老鼠大小(g)} \times \text{老鼠血液體積(0.07)} \times \text{血液的血漿部份(0.59)}$$

被注入的MTX於血漿中百分比接著被計算：

$$\frac{\text{血漿體積(ml)} \times \text{dpm/ml 血漿} \times 100}{\text{被注入dpm總量}}$$

$$= \% \text{ 於血漿中被注入的MTX。}$$

為確保一正確數量的MTX被輸送至血管，該位於尾部血管的注射處被解剖並且計量MTX。被留存於注射位置的MTX注射之平均百分比為3.78% (SEM: 0.57%)。被輸送至血管的MTX量(可用以分配至組織以及腫瘤的MTX)如下被計算：

$$\frac{\text{被輸送至血管的MTX量(Dpm)}}{\text{於注射筒中量的差}} \times \text{注射材料之Dpm/mg} = \text{留存於注射位置的Dpm}$$

五、發明說明 ()

22

輸送至血管之MTX的數量從此之後將被稱作"注射劑量"。

為了正確的比較樣品族群以及標準化於器官與各腫瘤大小的輕微差異，於身體器官與腫瘤以及體液中的MTX濃度以 % 被注入劑量/組織克重來表示。

被留存於注射位置的MTX 注射百分比之平均值為3.78% (SEM: 0.57%)。為了標準化如此之變化，該於腫瘤及組織中被發現的dpm百分比以一被注入的dpm減去被發現留存於注射位置的dpm百分比被計算。此一用量於此後被認做是可獲得的dpm或是可獲得的氮甲喋呤。其結果被摘述於表2中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(23)

表2：於老鼠腫瘤、器官及體液中氣甲喋呤之攝取

數值係為平均值±SEM，於此 n=8

* 與 表示統計學地顯著圖形，當數據以 Mann-Whitney Rank Sum Test 分析時。

表示於老鼠全部血漿體積中之 MTX Dpm。圖形以血漿 MTX Dpm%若是注入 MTX 劑量表示

@ 表示於老鼠全部尿液中的 MTX Dpm。圖形以被注入劑量表示。N=3-8

ID 代表沒有足夠的資料供分析

	僅使用 MTX (平均%±SE)					HA/MTX (平均%±SE)				
	30 min	1 Hr	2 Hr	4 Hr	8 Hr	30 min	1 Hr	2 Hr	4 Hr	8 Hr
腫瘤	0.66±0.09	0.50±0.04	0.32±0.03	0.31±0.02	0.22±0.05	0.88±0.04	0.62±0.03	0.46±0.32	0.34±0.12	0.17±0.02
肝臟	9.56±1.92	4.63±1.50	2.13±0.55	2.11±2.16	0.71±1.84	12.83±1.66	7.14±0.92	2.43±0.24	1.99±0.45	0.49±0.08
脾臟	0.39±0.09	0.24±0.18	0.17±0.05	0.26±0.05	0.12±0.01	0.48±0.06	0.34±0.03	0.24±0.03	0.26±0.10	0.14±0.00
淋巴結	2.33±0.39	0.89±0.55	0.69±0.42	0.94±0.19	0.26±0.08	1.28±0.23	1.49±0.26	0.58±0.10	0.24±0.08	0.10±0.01
左腎	0.41±0.05	0.13±0.02	0.08±0.01	0.13±0.03	0.04±0.00	0.39±0.04	0.16±0.05	0.09±0.00	0.10±0.04	0.04±0.02
右腎	0.40±0.06	0.14±0.01	0.10±0.02	0.11±0.01	0.04±0.00	0.46±0.06	0.18±0.02	0.10±0.01	0.08±0.05	0.05±0.01
膀胱	8.44±39.0	5.46±5.30	1.65±1.08	1.63±1.49	0.50±0.66	5.29±16.07	16.96±8.99	3.18±3.89	1.89±3.16	0.21±0.04
腸	11.75±2.26	16.89±8.51	10.41±2.59	10.83±3.04	3.38±1.68	5.65±1.75	9.66±5.73	5.84±4.16	4.55±2.64	1.12±1.71
胃	3.75±2.10	4.38±1.73	5.86±1.22	0.84±0.31	0.24±0.06	2.64±0.68	4.44±0.87	4.52±0.59	1.24±0.71	0.49±0.20
腦	0.13±0.03	0.10±0.03	0.08±0.12	0.14±0.03	0.08±0.00	0.17±0.02	0.16±0.03	0.10±0.02	0.12±0.07	0.09±0.01
心臟	0.44±0.03	0.37±0.13	0.20±0.24	0.21±0.03	0.10±0.03	0.53±0.05	0.26±0.04	0.16±0.04	0.16±0.09	0.12±0.01
肺臟	0.90±0.11	0.40±0.14	0.30±0.16	0.33±0.07	0.15±0.14	1.03±0.12	0.41±0.10	0.24±0.09	0.16±0.01	0.14±0.02
子宮	0.67±0.12	0.33±0.23	0.30±0.07	0.27±0.07	0.11±0.01	0.78±0.70	0.62±0.24	0.28±0.12	0.19±0.14	0.11±0.01
血漿#	1.49±0.31	1.51±0.48	0.45±0.23	0.31±0.12	0.15±0.02	1.06±0.28	0.53±0.34	0.31±0.15	0.42±0.15	0.13±0.00
尿液@	14.28±1.65	9.06±3.47	20.44±3.38	23.55±4.01	3.15±0.02	15.64±4.46	18.03±2.44	12.81±2.41	35.58±6.05	ID

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

24

當該藥物與HA被共注射時，於血漿中MTX位準沒有統計學地顯著差異被發現。MTX之全部的藥學動力學維持不變，於靜脈注射投藥0.5至2h之後，一最大MTX血漿位準被達到(MIMS, 1997)。

當可能的尿液自該非可浸濕的塑膠圍欄以一注射筒和針頭被收集時。該尿液於4,000gav離心10 min被澄清。其放射性內含物在加入3ml HiSafeII scintillant至範圍8-30 μ l 樣品中之後被量測。雖然於確切的量化每一老鼠的尿液有一技術上的困難，我們藉由下述公式計算被注入MTX劑量於尿液中百分比：

$$\frac{\text{收集時間 (h)} \times 42 \mu\text{l} \times \text{dpm} / \mu\text{l} \text{ 尿液} \times 100}{\text{被注入總dpm}}$$

$$=\% \text{ 於尿液中被注入的MTX}$$

因為排尿速度的不同，自每一老鼠收集尿液是不可能的。當每一時間點每一治療可獲得3個或更多的尿液樣本時，於該等時間點每一數據無-母數統計分析被執行。於投藥後一小時，有50% ($p=0.043$)或是更多的MTX於接受MTX/HA之小鼠的尿液中(見Table 2)。

在殺死老鼠之後立刻切下該腫瘤、肝臟、心臟、脾臟、膀胱、左右腎臟、子宮、肺臟、胃、腸、腦以及淋巴結並且整個的分析。於各組織中的放射性總量藉由溶解100-400mg 組織於3-6ml 的 OptiSolv (ACC, Melbourne, Australia)中歷時36 h, 22°C來被量測。在溶液化完成後，於組織中的放射性在加入10ml的

五、發明說明 ()

25

HiSafeIII scintillant之後被計數。再一次的克服化學發光與光致發光，樣品於Wallac 1410 β 計數器中視樣品來源重覆3、7或20 d 期間。於計數之間的期間，樣品於室溫下被儲存在黑暗中。所有的計算結果於一穩定的樣品被執行，於此所有的化能與光能螢光均已被移除。圖片表現平均 $\pm$ SEM ($n=8$)。

證實諸如肝臟、脾臟以及腎臟之代謝活動器官沒有表現一高位準的藥物鎖定是很重要的，該鎖定會妨害任何增加增加腫瘤鎖定的正向方面。表2例示了於不同時間點測試氮甲喋呤在每一組織的攝取。

利用 Mann-Whitney Rank Sum Test 以及 Students t -test，當MTX與HA結合時，於MTX 濃度/組織克重並沒有統計學地顯著差異。由於在每一時間點的小數量動物，若是數據重覆，Mann-Whitney test成為統計學地無效的，但是於肝臟、子宮以及腸中，一明顯的趨勢可被觀察到。

於肝臟中，當MTX與HA結合時，於MTX之攝取顯示一短期的增加，如第7圖中所示者。

於30 min以及1h該肝臟含MTX濃度分別地平均增加65%以及26%。於2h時在與治療無關的肝臟中，MTX的量沒有差異被觀察到。在4h之後，一令人感興趣的趨勢變得很明顯，當MTX與HA共注射時，較少的MTX於肝臟中被發現 (4h: 少於68% MTX 以及8h: 少於75% MTX)，如第8圖所示。

五、發明說明()

26

於腸中有一顯著的趨勢，於此HA與MTX的組合物造成藥物於每一時間點之攝取的減少，如第9圖所示。

腸被完全均質化，然後溶液化大約400mg的組織於一3-6ml的OptiSolv中於22℃下歷時24h，隨後加入10ml的Hisafe-3 scintillant。為了克服化學發光與光致發光，樣品於一Wallac 1410 β -counter中視樣品來源重覆3、7或20 d期間被計數歷時2min。於計數之間的期間，樣品於室溫下被儲存在黑暗中。所有的計算結果於一穩定的樣品被執行，於此所有的化學與光致發光均已被移除。

該等圖表現平均 $\pm$ SEM (n=8)。以無-母數隨機測試分析該數據以配合展示HA之共投藥顯著地降低藥物排入GI道中(p=0.031，單尾測試)。

MTX 濃度的減少範圍自43-67%。以無-母數隨機測試分析該數據以配合展示HA之共投藥顯著地減少藥物排入腸胃道中(p=0.031，單尾測試)。

當與HA共投藥時，在4h時MTX顯著地較少出現於肺臟中，以52%的平均減少(P=0.014)。於其他時間點沒有顯著的差異顯示，然而，此一觀察之該顯著性仍然不確定。

於脾臟、子宮、腦、心臟、淋巴結、胃以及腎臟中沒有可觀察的趨勢被檢測出。

HA鎖定氮甲喋呤至腫瘤細胞的機制有兩種可能(第10圖)。

五、發明說明()

27

當HA與MTX被結合時，有一顯著的鎖定效果(第7圖)。藥物的留存於腫瘤中相對最大的增加為於0.5h(平均增加24%)、1h(平均增加30%)以及2h(平均增加119%)，而於4h以及8h該增加係可忽略的。由於在每一時間點的小數量動物以及數據的無母數分布，Mann-Whitney Rank Sum Test 測試被使用，而當HA被共注射時，顯示於腫瘤中藥物攝取的顯著增加。於1h時，該統計學的顯著差異為 $p=0.021$ ，而於2h時 $p=0.05$ 。其他的時間點沒有顯示一統計學地顯著差異，但是於MTX濃度/腫瘤克重的趨勢中，當與HA共注射時係一致的變大。

於第7圖中所展示的數據確定的顯示與HA共投藥於注射後30min之內已經大大地增加腫瘤MTX攝取。此外，於腫瘤中藥物濃度隨續的衰減中共投藥也維持了一較高的位準。於1h時 $p=0.021$ ($n_1=8$, $n_2=8$)，該差異是顯著的，並且於2h時，當 $P=0.05$ ($n_1=8$, $n_2=8$) 由無母數測試決定。

包含夾帶有MTX之HA結合至該受體，(CD44及/或I-CAM-1) 並且經由一受體-調節的胞飲作用被內化，俾以釋放該藥物至腫瘤細胞中。

HA分子篩網將會成為一向外擴散的障礙，如此於HA結合至受體(CD44、RHAMM及/或ICAM-1)之後，該被夾帶的MTX可以擴散至腫瘤細胞中。然而藉由HA基質被留存於該細胞表面，MTX對於一般被利用以MTX運送至細胞中主動運送具有增加可獲取性。

五、發明說明()

28

副作用以及藥物除了活性所欲位置外對組織的擴散，也可以藉由其與HA結合而被影響。例如，藉由受體媒介的細胞攝取，以及於肝臟(80-90%)、腎臟(10%)、脾臟以及骨髓的代謝，最後兩個部位的一些小變異，HA一般不存在血管中。因為預期的HA劑量似乎增加藥物的肝輸送至少一短暫時間。於30min及1h時肝臟顯示MTX濃度分別平均增加65%以及26%。於2h時沒有顯著的差異在MTX於肝臟中的量被發現，沒有治療。在4h之後，一感興趣的趨勢變得很明顯，當與HA共注射時，於此較少MTX於肝臟中被發現(4h:少於68%的MTX以及8h:少於75%的MTX)。在靜脈投藥之後，MTX於體液中被廣泛的散布，並且可被留存於肝臟中達數個月(McEvoy, 1988)；因此當於HA共注射時，MTX在肝臟於4h與8h減少的平均濃度指出一藥學動力學清除路徑中改變的平衡。慮及HA於肝臟內皮細胞(LEC)中快速的被代謝，接下來MTX與HA被於肝臟的竇狀線細胞中被共內化被釋放，於此其可被分布至肝細胞中以分泌至膽汁中並且隨之進入腸胃道，或是回到循環中以進一步的擴散進入體液中並且隨尿液排出，或是同時。

短期肝部鎖定有一個治療的優點。於肝臟轉移的情況中，一快速的、高暴露至MTX可為有益的，並且所觀察到的鎖定僅有1h，如此將中和任何長效毒性的問題。肝臟鎖定可以與需要生物活性的藥物被利用，例如：絲裂霉素C、亞德里亞黴素，於此該藥物/HA混合物將被鎖

五、發明說明()

29

定至LEC。藉由於LEC中不活化藥物濃縮於LEC中，其將可被擴散至肝細胞以活化，如此活化作為一活化鎖定機制。

MTX的毒性的主要位置之一係為腸胃道。MTX與HA共投藥顯著地減少了輸送到腸胃道藥物的數量。有數個機制與於腸胃道中MTX減少的濃度結合。

氮甲喋呤係為非常小的分子，其一般可被預期會通經大部分的微血管壁，然而與HA結合會大大地將降低其通經此路徑。

HA於肝臟內皮細胞的快速降解造成MTX快速的釋放進入肝臟並且回到血管中，於此其將經歷增加的腎臟的清除，如於1h時所指出者，並且於接受MTX/HA調劑之小鼠的尿液中多於50%的MTX被排出。

用以自身體中最後的消除MTX的主要方法是尿液的排出。於尿液內容物中的藥物與HA似乎有些許的增加，但是我們相信由其他的證據顯示，HA可由腎臟快速的吸收並且代謝，如此其存留時間會很短並且結合的藥物會很快地釋放至尿液中。

結論

於此報導的結果顯示一用以檢測治療藥劑與透明質一起投藥之前臨床試驗的第一階段，將可達成選擇性的輸送所欲的病理組織標的；因此於該點達成一較高且較有效的濃度。於此案例中，氮甲喋呤，一種廣泛的被用於現今治療療法中以治療人類乳腺癌腫以及其他人類惡性疾病以及

五、發明說明()

30

類風濕性關節炎之一細胞毒性藥物，已經藉由與/不與透明質投藥的靜脈注射路徑而被研究。

我們已經發現裸鼠模型係為一特別適合用於研究於活寄主中之人類乳癌腫瘤的模型，並且於使用HA至直接治療藥劑至罹病組織解決了基本的問題，同時因此加強了其有益的效用。我們的結果已經顯示並未與HA以特定形式結的小分子藥物，當被注入血管時，其展現HA仍然可以輸送如此的藥物於一增強的量至該病理組織中。此一研究顯示在體內佔優勢的條件，該MTX足以與HA被留存以影響一輸送至人類乳癌的顯著增強，以及潛在的降低非所欲的腸胃道毒性副作用。

實例3 佩里塔克爾/透明質藥物結合物之製備以及注射

證實裸鼠模型用於HA/佩里塔克爾的效用後，其可被用於測試其他化學療法的效用。經確定，由於其在治療上的重要性，佩里塔克爾（也被認為是紅豆杉醇）可以被使用。

佩里塔克爾係由西方紫杉(Western Yew, *Taxus brevifolia*)中被分離出來(Wani et al 1971)，且其臨床上可有效地對抗卵巢癌及乳癌(Rownisky et al 1990; McGuire et al 1989)並且正被用於其他不同癌症治療的試驗。然而，與佩里塔克爾結合主要的問題在於其極端的親脂性以及伴隨極差的水溶性。解決這項問題的努力已被引導至佩里塔克爾類似物及原藥的合成，以極度

五、發明說明()

31

的努力以創造出安全且生物可相容的調劑。截至目前沒有原藥已經顯示了足夠的安定性、溶解度或是活性足以證明其臨床的發展(Mathew et al 1992; Vyas et al 1993)。然而，半合成的 taxanes 較佩里塔克爾顯示了更大的溶解度以及潛力(Bissery et al 1991) 並且其中的一種形式 Taxoters 已經進入人體試驗階段(Bisset et al 1993)。

現今被用於靜脈輸送的佩里塔克爾的臨床的配方使用乙醇與 Cremophor EL 以一 1:1 (v/v) 的比例與於 6 mg/mL 的藥物。Cremophor EL 是確實的聚乙氧基的蓖麻油；一清澄的、油性黏稠的、黃色的物質。安定性研究已經顯示原始配方於 4°C 下具有 5 年的櫃藏時間。該調劑在使用前以 0.9% 生理食鹽水或 5% 右旋糖被稀釋至 0.3 至 1.2 mg/mL 的濃度並且該材料之物理的及化學的安定性於此等條件下係為 ca. 27 h。然而，載劑之稀釋至此等位準可以產生一過飽和溶液(Adams et al 1993) 若是使用所指示的方法，如此傾向產生沉澱，於投藥時需要一線濾器以確保避免注入粒子。同時也建議稀釋的 oaclitaxel 溶液於製備後 24 小時內被使用。上述溶液的霧狀物已經被觀察並且有助於排出 of plasticisers by Cremophor 自該注入袋及管中(Waugh et al 1991)。

除了於物理的於先前所提及的安定性外，Cremophor 最顯著的問題在於其經報導具有藥理活性之事實。使用 Cremophor EL 數種不同的藥物被投藥，其

五、發明說明 ()

32

中包含環孢靈素、tacrolimus以及teniposide。然而，被提供給佩里塔克爾的Cremophor EL 的劑量遠高於其他任何標記藥物。Cremophor已經被觀察到會嚴重的或不可過敏插入物。當快速的注入佩里塔克爾動物或人類體內時，載劑毒性也可能與不可避免的或致命的過敏反應被觀察到(Dye & Watkins 1980; Lorenz et al 1977; Weiss et al 1990)。

佩里塔克爾的儲備溶液係藉由個別地注射係根據個別的老鼠的體重被製備。

乾燥的HA(modal Mr 8.5x10⁵ k Da)被加入至一24.5mg/ml 佩里塔克爾儲備溶液的部分中並且溶解振盪隔夜，以提供一21mg/ml的最終濃度。為了確保無菌，加入慶大黴素至一50pg/ml的濃度並且於40℃下培養隔夜。接下來加入[³H]佩里塔克爾，該HA/佩里塔克爾儲備混合物以注射等級之氯化鈉被稀釋至注射濃度。注射係個別地根據老鼠體形被製備，以於50 μl中輸送15mg/kg MTX與12.5mg/kg HA。以如此量的HA注入體內，於試驗期間飽和動力學將被觀察(Fraser et al, 1983)。

為了確保於佩里塔克爾/HA 注射混合物製備期間有維持其分子量，該注射溶液於一Sephacryl S-1000 大小區別凝膠 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 以1.6cm x 70cm的管柱詳細事項，2ml的樣品大小，流速18ml/h以及2ml餾分被分析。第4圖顯示HA於混合物製備期間維持其分子量。

五、發明說明()

33

40隻小鼠被隨機分為的二組。第I組僅接受佩里塔克爾，而第2組接受佩里塔克爾/HA組合物治療法。動物被個別地置於一注射盒中，並且該注射經由尾部血管被投藥。於每一注射中包含有氚標記的氮甲喋呤（被注入的每分鐘的衰變量之平均(dpm) ± 標準差(SEM): 19,159,146 ± 1,336,819) 之 15mg/kg MTX ± 12.5mg/kg HA 被輸送。小鼠被個別地置於一柔軟的、非可浸濕的塑膠圍欄中如此尿液可被收集。於注射之後 30min、1h、2h、4h或8h，小鼠藉腹腔注射0.1ml戊巴比妥鈉(Glaxo, Australia Pty. Ltd., Melbourne, Australia)被麻醉，並且使用針頭以及注射筒自心臟或是大血管收集血液。於血液收集之後，該動物藉由頸部錯位被殺死。

血液被輸送到EDTA塗覆的玻璃管中並且藉由於 14,000gav 離心 10min 製備血漿。在以 100 μ l of 30%v/v 過氧化氫脫色並且加入 3ml HiSafeII scintillant之後，放射性於一 50 μ l 等分試樣被計數。為克服化學化學發光與光致發光，該樣品於一Wallac 1410 β -計數器中視樣品來源重覆於3、7或20 d期間被計數2 min。於被計數之間的期間，樣品於室溫下被儲存在黑暗中。所有的計算結果於一穩定的樣品被執行，於此所有的化能與光能螢光均已被移除。

為了決定被注入佩里塔克爾於血漿中的百分比，需要計算出每一老鼠的總血漿體積(ml)，使用下述公式：

五、發明說明 ()

34

老鼠大小(g) x 老鼠血液體積(0.07) 血液的血漿部份
x (0.59)

被注入的佩里塔克爾於血漿中百分比接著被計算：

血漿體積 (ml) x dpm/ml 血漿 x 100

被注入 dpm 總量

= % 於血漿中被注入的佩里塔克爾。

為確保一正確數量的佩里塔克爾被輸送至血管，該位於尾部血管的注射處被解剖並且計量佩里塔克爾。被留存於注射位置的佩里塔克爾注射之平均百分比也被決定。被輸送至血管的佩里塔克爾量(可用以分配至組織以及腫瘤的佩里塔克爾)如下被計算：

被輸送至 於注射筒 注射材料之 留存於注射位
血管的佩 中量的差 Dpm/m g 置的 Dpm
里塔克爾 = (mg) x -
的量
(Dpm)

輸送至血管之佩里塔克爾的數量從此之後將被稱作"注射劑量"。

為了正確的比較樣品族群以及標準化於器官與各腫瘤大小的輕微差異，於身體器官與腫瘤以及體液中的佩里塔克爾濃度以 % 被注入劑量/組織克重來表示。

五、發明說明 ()

35

留存於注射位置之佩里塔克爾注射的百分比之平均被計算出來。為了標準化如此的變化，被發現於腫瘤及組織中的dpm百分比以一注入dpm的百分比減去留存於注射位置之dpm的百分比被計算。此一量被稱作可獲得的dpm或可獲得的佩里塔克爾。

當可能的尿液由非可浸濕的塑膠圍欄以注射筒及針頭被集後。尿液藉由於14,000gav離心10 min被澄清。其放射性的內容物於加入3 ml 的HiSafeII scintillant至8-30pl樣品被計數。

在殺死老鼠之後立刻切下該腫瘤、肝臟、心臟、脾臟、膀胱、左右腎臟、子宮、肺臟、胃、腸、腦以及淋巴結並且整個的分析。於各組織中的放射性總量藉由溶解100-400mg 組織於3-6ml 的 OptiSolv (ACC, Melbourne, Australia)中歷時36 h, 22°C來被量測。在溶液化完成後，於組織中的放射性在加入10ml的HiSafeIII scintillant之後被計數。再一次的克服化學發光與光致發光，樣品於Wallac 1410 β 計數器中視樣品來源重覆3、7或20 d 期間。於計數之間的期間，樣品於室溫下被儲存在黑暗中。所有的計算結果於一穩定的樣品被執行，於此所有的化能與光能螢光均已被移除。

實例4 5-氟尿嘧啶與HA之用途介紹

5-氟尿嘧啶係為(5-FU)，一種抗代謝產物其經常被用以治療乳癌及腸胃道癌(Piper & Fox, 1982)。5-FU細胞內地被轉換為其活化核苷酸形式，於此其同時干擾

五、發明說明 (36)

DNA與RNA合成。該藥物經由兩個活體中的機制被作用：

(i) FdUmp緊密的結合至thymidylate合成酶以阻礙thymidylate之形成，其係去氧三磷酸胸腺嘧啶合成的必要先趨物(DTTP)，其係用以合成DNA之四種去氧核糖核苷酸之一。由此一阻礙所造成的缺乏胸腺嘧啶的狀態對於活化地分化中細胞有毒性(Pinedo & Peters, 1988)。

(ii) 5-FU作用的第二個路徑係為併合FUTP至RNA中以干擾RNA作用。胸腺合成酶之阻礙由下述產生；Fdurd與5-FU併入至RNA中可以於細胞上產生細胞毒性效果。暴露至5-FU的濃度以及持續期間均為細胞毒性的重要決定因素。因為針對RNA的效果於延長的暴露時間中也許較佔優勢，因此針對DNA的效果在S相中短時間的細胞暴露也許較為重要。

數項研究已經檢示使用HA做為用於抗癌藥物的藥物輸送的用途。Coradini et al (1999)共價的結合丁酸鈉至HA，以決定是否此一HA/丁酸鈉組合物可增強於活體中乳癌細胞的藥物攝取。此一研究指出該HA做為一藥物輸送載劑的機制可能涉及HA-丁酸鹽-酯衍生物被攜帶至CD44受體有關。該HA/藥物複合物被內化，隨之藉由HA/藥物複合物的細胞質水解作用，接下來釋放出該丁酸鹽其施行一抗增殖效果。一於活體中的研究被執行，其共價地連結絲裂霉素C至HA作為一治療鼠性的路易士肺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

臟移植物的手段(Akima et al, 1996)。研究發現HA-MMC複合物於一0.01mg/kg的劑量造成一抗-腫瘤活性，於此該單獨的藥劑，絲裂霉素C並未展現一抗-腫瘤活性。

實例5 於人類乳癌細胞中5-FU與HA之協同作用的調查

人類乳腺上皮癌細胞株MDA-MB-468、MDA-MB-435 以及MDA-MB-231以與HA結合親合性(Culty et al, 1994)以及HA受體CD44以及RHAMM之表現(Wang et-al, 1996)為基礎被篩選出來。該等細胞株之特徵係如表3所述者。

表3:透明質結合以及人類乳腺上皮癌細胞株的受體表現

細胞株	乳癌型式	HA結合程度	HA受體表現 ^b	
			CD44	RHAMM
MDA-MB-231		++	+++	+++
MDA-MB-468		++++	++++	++
MDA-MB-435		+	+++	ND

a: Culty et al, 1994

b: Wang et al, 1996

細胞株MDA-MB-468、MDA-MB-435與MDA-MB-231如實例1所述者被例行的培養。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

由表4中可以看見於含有0nM 5-FU + 100nm 的培養基中生長的乳癌細胞株，當與未治療細胞相較時展現一統計學地顯著的增殖或細胞毒性的效果。

表4：透明質於乳癌細胞增殖之效果

細胞株	0nM 5-FU (平均細胞數 ± 1 S.D.)	0nM 5-FU+100nM HA (平均細胞數 ± 1 S.D.)
MDA-MB-231 (n=4)	34,206 ± 3,206	29,470 ± 4,452
MDA-MB-468 (n=4)	36,751 ± 2,814	37,607 ± 3,325
MDA-MB-435 (n=4)	117,760 ± 2,715	121,918 ± 7,815

統計測試同時使用無-母數 Rank Sum Test 以及母數 Student's t-test

因此，所有的結果係一0nM 5-FU/0nm HA細胞計量百分比被表現。雖然在細胞株之間生長模式的差異有被注意到，例如MDA-MB-231及MDA-MB-468細胞株展現了極差的平攤效果，於此無數的漂浮細胞於該測試培養基之應用前存在。該MDA-MB-435細胞株展現一高平攤效果及極高的生長速率。

五、發明說明 (39)

當HA與5-FU被結合時，一協同的細胞毒性效果於MDA-MB-468細胞株中被觀察到，但未出現於MDA-MB-231或MDA-MB-435乳癌細胞株中。此一結果顯示於第11圖。5-FU單獨的 IC_{50} 係 $>50 \mu m$ ，但是當與HA結合時 IC_{50} 係為40nM，一於藥物劑量的降低高達1250倍。

當5-FU於HA存在下被應用於乳癌細胞時，於人工環境下實驗的結果顯示一增加的細胞殺滅。該MDA-MB-468細胞對5FU/HA治療法顯示了最大的敏感性，於此 IC_{50} 由 $>50 \mu m$ 減少至40nm，於此MDA-MB-231與MDA-MB-435並未非常地受到5-FU/HA組合物的影響。Culty et al (1994)所決定的，以MDA-MB-468 (60-80%)、MDA-MB-231 (40-60%)以及MDA-MB-435 (40-60%)，所有的乳癌細胞株表現CD44受體的位準。已經顯示於此實驗中所使用的3株細胞株可以降解HA，意指於腫瘤細胞中CD44的作用可能在於調節HA的降解(Culty et al, 1994)。

另一個考量的問題是細胞對化學療法的藥物之先前暴露。在該細胞株由患者體內分離出來之前，癌症患者經常會接受化學治療法或是放射線，其可造成腫瘤含有抗治療細胞。於MDA-MB-435與MDA-MB-231的案例中，該等細胞株由之分離的患者均已先被暴露至5-FU(Cailleau et al, 1974)。由於癌症細胞含有數種適應克服藥物細胞毒性的機制，在治療後留存的腫瘤質塊極有

五、發明說明 (40)

可能會對5-FU有抗性，接著於人工環境下改變該等細胞對藥物的敏感性。

根據推測任何於活體中所取得的小鼠人類對應物治療的數據的觀點，該試驗模型及設計係細心的被發展。為了清顯示5-FU/HA佐劑治療法於人類乳癌外移植物於活體中的鎖定以及療效，隨後的因子被檢視：

人類乳癌腫瘤於一經良好的-證實的 Walter and Eliza Hall Institute品係裸鼠(一種廣泛的被接受的用於如此之研究的模型)被證實，其避免了一對抗異源的細胞免疫反應。

用於裸鼠及人類之5-FU之藥學動力學比較數據已經被刊行(Inaba et al, 1988)，並且被用於本研究之設計，以儘可能的模擬出人類治療上的劑量。

一主要的目標在於證實於此等小鼠中腫瘤組織學的以及細胞學的狀態係與腫瘤於其自然的人類寄主中相類似的。為達成這樣的目標，我們同時展示了位於人類來源中的小鼠腫瘤細胞以及其等之表現與諸如RHAMM以及CD44HA之HA受體高度相關。

實例6 HA及5-FU溶液之製備

一HA的儲備溶液($101\mu\text{M}$, 7mg/ml)經由溶解乾燥的HA(modal Mr $7\times 105\text{ kDa}$)於0.9% w/v無熱源注射等級NaCl中被製備。為了確保溶液均質，該HA於4°C溶解隔夜下然後充分振盪。為了確保HA於該儲備溶液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (41)

製備期間有維持其分子量，溶液於一S-1000 大小區別凝膠中以1.6cm x 70cm的管柱詳細事項、2ml的樣品大小、1.8ml/h的流速以及2ml餾分被分析。HA於一100nM的最終濃度，以所有的稀釋於適當的培養基中被製造。

5-FU儲備溶液藉由溶解5-FU於0.1M的氫氧化鈉並以0.9%w/v之無熱源注射等級的NaCl使之成為20mg/ml的濃度被製備。在加入(³H)-FU之前，該儲備溶液經由一0.22 μm的濾器被過濾以確保無菌，並且以注射等級之氯化鈉稀釋至一注射濃度。個別的注射係根據個別老鼠的體形大小被製備，以達成於50 μl中輸送30mg/kg 5-FU的目的(相等於人類治療上用於平均體重60kg之10.5mg/kg的劑量; Inaba et al, 1988)。一無熱源的HA儲備溶液(10mg/ml; modal M, 7x10⁵ Da)被加入至20mg/ml 5-FU儲備溶液的一部分中並且振盪培養隔夜，至一相等於老鼠大小12.5mg/kg的最終HA濃度。注射係根據老鼠大小個別地被製造，以50 μl中輸送30mg/kg 5-FU以及12.5mg/kg HA。以如此量之HA被注射進入體內，飽和動力學於試驗期間將被觀察到(Fraser et al, 1983)。為了確保於該混合物的製備期間HA維持其分子量，該注射溶液於一Sephacryl S-1000大小區別凝膠中，使用1.6cm x 70cm的管柱詳細事項、2ml的樣品大小、1.8ml/h的流速以及2ml的餾分被分析。於管柱餾份中的透明質藉由糖醛酸分析被檢測。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (42)

該糖醛酸分析自該等由凝膠過濾色層分析法所收集的餾份量地地被用以檢測透明質之存在。每一餾分 $25\mu\text{l}$ 的等分試樣接下來被轉移到96井穴盤中。 $250\mu\text{l}$ 的卞唑類試劑(3M carbazole/0.025M 硼酸鹽於 H_2SO_4 中)接下來被加至該等餾分中。該96井穴盤於 80°C 被培養歷時45-60min。一具有550nm濾器的Dynatech MR7000 plate reader被用來讀取該96井穴盤。當該吸光度 >3 標準偏差高於背景吸光度時,其被視為顯著。該背景藉由於 V_0 以及 V_t 之前與之後取得相同數目的樣品點該計算,於此該取用的平均係為16 (Fraser et al. 1988)。

HA與5-FU的配方(10mg/ml HA與20mg/ml 5-FU於0.5% NaCl中, pH 8.9)並沒有顯示一於HA之分子量上的降解效果。於大小區別凝膠中的色層分析法指出可能的分子量為700,000Da。

實例 7 藥物細胞毒性分析：試驗設計

於人工環境下在設計藥物滴定實驗時,應用與在靜脈注射投藥後血漿中可達藥物濃度相類似的濃度係為所欲者。當5-FU藉由一靜脈注射路徑(iv)於10.5mg/kg ($400\text{mg}/\text{m}^2$)被治療地被投藥,於30 min內血漿最位準係為 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ [$61\mu\text{M}$, .Kubo, 1990]。以此等於活體中的血漿濃度為基準,該等接隨的藥物濃度被選擇; 0、1、5、10、20、50、100 μM 5-FU $\pm$ 100nM HA。細胞株 MDA-MB-468、MDA-MB-231 以 MDA-MB-435 如上述於實例4至5中特化者被培養。當該等細

五、發明說明 (43)

胞達成匯流時，該等細胞自一於0.25%胰蛋白/0.05% EDTA的燒瓶中被移出。該單一-細胞懸浮液以一Coulter計數器(ZMI model)被計數並且細胞重新懸浮為100,000細胞/ml於細胞-特定培養基中。細胞被放入24-井穴盤(2cm² 表面積)藉由每井添加0.5ml細胞懸浮液，產生50,000細胞/井。

培養被容許持續24h，在培養基被移除之前，單一細胞層以HBSS清洗並且使用培養基(5-FU+HA)。在測試培養基中生長4日後該培養以HBSS沖洗，該細胞以0.25% 胰蛋白/0.05% EDTA利用胰蛋白化自井中移出並且以一Coulter Counter計數細胞。

實例8 EA 做為一藥物輸送以及腫瘤-鎖定載劑之評估

以實例5至7中人工環境試驗中藥物敏感度的結果，以及HA受體CD44與RHAMM之表現為基礎，該人類乳上皮癌細胞株MDA-MB-468被選定做為該癌細胞接種源用以產生任何裸鼠人類腫瘤外移植物。細胞被例行地培養並且如實例5中所述的次培養。為了注射至小鼠中，細胞被培養至100%匯流，於0.025% 胰蛋白/0.01% EDTA溶液中胰蛋白化，藉由於Beckman TJ-6 bench centrifuge中在400g下離心10min清洗二次，利用一Model-ZM Coulter counter被計數，並且以1 x 10⁸細胞/ml重新懸於一無血清的Leibovitz L-15 medium中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (44)

該無胸腺之 CBA/WEHI 6至8週大的雌性裸鼠，係被維持在特殊不具有病原的條件下，並具有隨意取得之無菌的食物與水。每一老鼠接受一於50 μ l中含有5 x 10⁶細胞的注射。該等細胞以一26規範(gauge)的針頭被注射至直接位於第一乳頭下方的乳腺脂肪墊中(Lamszus et al, 1997)。藉由量測三個與水平面呈直角的直徑，腫瘤每週地被量測(d₁d₂d₃)。腫瘤體積使用下列公式被估計：

$$(1/6)\pi(d_1 d_2 d_3)$$

使用5-FU ± HA之治療大約於癌細胞接種4至8週後開始。被用於每一研究中該小鼠平均腫瘤大小摘述於表5中。

表5：於每一研究開始時的人類乳癌腫瘤摘述

研究	腫瘤體積 (平均±SEM)	腫瘤佔淨身體體積% (平均±SEM)
5-FU 鎖定	0.41 ± 0.01 mm ³	0.22 ± 0.10 mm ³
有效期：6週	0.37 ± 0.20 mm ³	0.19 ± 0.10 mm ³
有效期：6個月	0.61 ± 0.36 mm ³	0.28 ± 0.17 mm ³

為證實當乳癌細胞株MDA-MB-468被注射至一適當的動物寄主中時之腫瘤產生力以及其產生腫瘤的能力，並不需要進行一項病理學的測試。因為一腫瘤為病理地可生存的血管增生(新血管化)係為必需的，於此該微血管網絡供給營養至該腫瘤。血管增生、導管的入侵、壞死、程

五、發明說明 (45)

式化死亡、高有絲分裂指數與核不正常的出現均為乳上皮癌的特徵。蘇木精與伊紅-染色的乳癌腫瘤切片的檢視顯示所有與腫瘤存活有關的一般特性，如此確認了動物寄主成功地維持第II級人類乳上皮癌。

在腫瘤誘生約8週之後，兩隻帶有腫瘤的小鼠被提供一致死劑量的戊巴比妥鈉。於殺死小鼠後3分鐘內，腫瘤被外科手術地移除並且立刻被固定於10%經緩衝的福馬林中歷時2h。該經固定的腫瘤係在一連串的70-100%酒精中脫水，而後以石臘包埋，再由其中切出2-4 μ m 的切片。該切片被置於一載玻片上，脫蠟並與水接觸。該載玻片係在磷酸-緩衝的鹽溶液(PBS)中清洗3x5分鐘。利用以10%胎牛血清10分鐘而阻礙親異質蛋白，而後以PBS浸洗。在室溫(RT)下應用檢測用的抗體達60分鐘。該抗血清或抗體係為對抗RHAMM以及CAE。該玻片係在PBS中清洗3x5分鐘，且內源性過氧化酶活性係利用將之浸於0.3% H_2O_2 /甲醇中達20分鐘而被阻礙。在另一次的PBS清洗後，在RT下應用過氧化酶-綴合之豬抗-兔子第二抗血清(Dako, Denmark)達60分鐘，而後在PBS中清洗3x5分鐘。依據製造商指示製備Sigma快速DAB(3,3'-二胺聯苯胺, Sigma, St. Louis, U.S.A)錠劑，並將DAB溶液在室溫下應用達5-10分鐘。該載玻片以自來水清洗10分鐘，以蘇木精作對應染色，脫水並放置。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (46)

腫瘤的人類來源經由以人類特定的癌症染色標記染色該腫瘤及週圍組織而被確定。CEA的出現清楚的展現其係為人類腫瘤，然而被維持於一鼠性的寄主的心血管系統中。由於經由受體-調節內化或結合腫瘤鎖定係為一假說，證實HA受體、CD44與RHAMM之表現係為必要者。

表6列示於人類乳癌腫瘤外移植物受體表現的程度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (47)

表 6 : HA 受體在於裸鼠中生長之人類乳癌腫瘤的分布

HA 受體	功能	腫瘤上的分佈情況	在腫瘤上抗原決定基表現 %
CD44H	顯著地結合並內部化HA之異構型(Culty et al., 1992)	在除了一些基質細胞之外的細胞上的表現	++++
CD44v6	在腫瘤中的角色未知，但當使用作為一預後因子。表現愈高，則存活的機率愈低(Friedrichs et al., 1995)		+
CD44v3	常在乳癌中過度表現(Friedrichs et al., 1995)		-
RHAMM	轉形與腫瘤細胞侵入上是必要的(Hall et al., 1995)	浸潤腫瘤細胞群，其在環繞壞死區域之細胞上具有高度表現	+++
CEA	表現惡性腫瘤細胞上之胎兒抗原(Haskell, 1990)	在所有腫瘤細胞中存在著	++++

在腫瘤上的抗原決定基表現的百分比之比率指數係被量化成：

0 %	-
1-25 %	+
26-50 %	++
51-75 %	+++
76-100 %	++++

五、發明說明 (48)

實例9 5-FU與HA於裸鼠模型中的使用

25隻小鼠被隨機的分為二群。第1組只接受 $[^3\text{H}]5\text{-FU}$ ，而第2組接受 $[^3\text{H}]5\text{-FU}/\text{HA}$ 結合物。該治療利用注射筒在注射之前與之後的重量經由尾部血管被量化地投藥。氙化的5-FU(平均注射 $\text{dpm} \pm \text{SEM}$: $31,313,002 \pm 131,348$) 其中含有 30mg/kg 5-FU $\pm 12.5\text{mg/kg}$ HA於每一注射中被輸送。

為了確保一確定量的 $[^3\text{H}]5\text{-FU}$ 被輸送至血液血管中量化，該位於尾部血管的注射處被解剖並且計量5-FU。被留存於注射位置的5-FU注射之平均百分比也被決定。被輸送至血管的5-FU量(可用以分配至組織以及腫瘤的5-FU)如下被計算：

$$\begin{array}{ccccccc} \text{被輸送至} & \text{於注射筒} & \text{注射材料之} & \text{留存於注射位} \\ \text{血管的5-} & \text{中量的差} & \text{Dpm/mg} & \text{置的Dpm} \\ \text{FU的量} & = (\text{mg}) & \times & - \\ (\text{Dpm}) & & & \end{array}$$

輸送至血管之5-FU的數量從此之後將被稱作"注射劑量"。

為了正確的比較樣品族群以及標準化於器官與各腫瘤大小的輕微差異，於身體器官與腫瘤以及體液中的5-FU濃度以 % 被注入劑量/組織克重來表示。

小鼠被個別地被置於柔軟的、非可浸濕的塑膠圍欄如此尿液可被收集。於注射之後10min、20min、30min

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

、1h或2h，小鼠藉由腹腔注射0.1ml的戊巴比妥鈉被麻醉。

當麻醉該等動物時，血液自心臟或是大血管使用針頭與注射筒被收集。血液被收集於一EDTA塗覆玻璃管並且於14,000gav離心10min。在以100 μ l的30%v/v過氧化氫脫色並且加入3ml HiSafeII scintillant之後，放射性於一50 μ l等分試樣被計數。為克服化學化學發光與光致發光，視樣品來源該樣品於一Wallac 1410 β -計數器中重覆3、7或20 d期間被計數2 min。於被計數之間的期間，樣品於室溫下被儲存在黑暗中。所有的計算結果於一穩定的樣品被執行，於此所有的化能與光能螢光均已被移除。

為了決定被注入MTX於血漿中的百分比，需要計算出每一老鼠的總血漿體積(ml)，使用下述公式：

$$\text{老鼠大小(g)} \times \text{老鼠血液體積(0.07)} \times \frac{\text{血液的血漿部份}}{(0.59)}$$

被注入的MTX於血漿中百分比接著被計算：

$$\frac{\text{血漿體積(ml)} \times \text{dpm/ml 血漿} \times 100}{\text{被注入dpm總量}}$$

$$= \% \text{ 於血漿中被注入的MTX。}$$

當可能的尿液自該非可浸濕的塑膠圍欄以一注射筒和針頭被收集時。該尿液於14,000gav離心10 min被澄清

五、發明說明 (50)

。其放射性內含物在加入3ml HiSafeII scintillant至範圍8-30 μ l 樣品中之後被量測。雖然於確切的量化每一老鼠的尿液有一技術上的困難，5-FU劑量於尿液中的百分比藉由下述公式被計算：

$$\text{收集時間 (h)} \times 42 \mu\text{l}^1 \times \text{dpm} / \mu\text{l 尿液} \times 100$$

被注入總dpm

在血液收集以頸部錯位殺死老鼠。殺死老鼠之後立刻切下該腫瘤、肝臟、心臟、脾臟、膀胱、左右腎臟、子宮、肺臟、胃、腸、腦以及淋巴結並且整個的分析其放射性。於各組織中的放射性總量藉由溶解100-400mg組織於3-6ml的OptiSolv (ACC, Melbourne, Australia)中歷時36 h，22°C來被量測。在溶液化完成後，於組織中的放射性在加入10ml的HiSafeIII scintillant之後被計數。該樣品如先前所述的被計數以克服化學發光。

如第12圖所示者，當HA與5-FU結合時有一顯著的鎖定效果。在10min時於腫瘤中藥物留存的相對最大增加被觀察到，於此該HA藉由2.42 ($p=0.001$ students t-test)的因子增強藥物攝取。於HA/5-FU投藥之後20min及30min，於5-FU的腫瘤攝取中統計學地顯著也被注意到，分別增加藥物攝取1.5倍至2倍 ($p<0.001$, Students t-test)。其他的時間點於5-FU單獨投藥及與HA共注射之間並沒有顯示一統計學地顯著差異。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (51)

表 7 透明質於帶有人類乳上皮癌外移植物之裸鼠中[3H]5-氟尿嘧啶之生物分布的效果

	5-FU (平均%劑量/g $\pm$ 1SE, n=5)					HA/5-FU (平均%劑量/g $\pm$ 1SE, n=5)				
	10 min	20 min	30 min	1 h	2 h	10 min	20 min	30 min	1 h	2 h
腫瘤	1.49 $\pm$ 0.25	2.13 $\pm$ 0.28	1.20 $\pm$ 0.17	1.34 $\pm$ 0.1	1.35 $\pm$ 0.24	3.60 $\pm$ 0.35	3.20 $\pm$ 0.22	2.45 $\pm$ 0.14	1.85 $\pm$ 0.23	1.03 $\pm$ 0.12
肝臟	19.64 $\pm$ 3.75	23.27 $\pm$ 1.6	15.86 $\pm$ 3.12	9.20 $\pm$ 1.83	3.64 $\pm$ 1.09	21.2 $\pm$ 1.81	21.37 $\pm$ 1.71	15.98 $\pm$ 1.68	8.73 $\pm$ 1.92	3.99 $\pm$ 1.24
脾臟	1.45 $\pm$ 0.28	1.71 $\pm$ 0.18	1.02 $\pm$ 0.13	1.02 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.09	1.94 $\pm$ 0.17	1.39 $\pm$ 0.12	1.17 $\pm$ 0.20	1.3 $\pm$ 0.19	1.21 $\pm$ 0.18
淋巴結	2.04 $\pm$ 0.31	2.98 $\pm$ 0.78	1.49 $\pm$ 0.27	1.72 $\pm$ 0.46	0.88 $\pm$ 0.17	3.47 $\pm$ 0.61	2.99 $\pm$ 0.47	1.97 $\pm$ 0.22	1.85 $\pm$ 0.29	0.75 $\pm$ 0.12
腎臟	5.15 $\pm$ 1.42	12.53 $\pm$ 2.37	10.12 $\pm$ 2.01	7.39 $\pm$ 1.12	3.97 $\pm$ 0.71	9.24 $\pm$ 0.91	14.56 $\pm$ 0.94	14.52 $\pm$ 1.56	10.72 $\pm$ 1.97	5.51 $\pm$ 0.98
膀胱	18.30 $\pm$ 3.98	40.34 $\pm$ 26.39	19.11 $\pm$ 10.76	33.69 $\pm$ 18.72	61.88 $\pm$ 39.1	13.31 $\pm$ 5.18	39.17 $\pm$ 20.74	37.95 $\pm$ 25.1	10.04 $\pm$ 5.53	6.05 $\pm$ 3.58
腸	1.33 $\pm$ 0.24	1.73 $\pm$ 0.42	2.39 $\pm$ 0.76	1.57 $\pm$ 0.23	2.44 $\pm$ 1.42	1.64 $\pm$ 0.28	2.06 $\pm$ 0.25	1.90 $\pm$ 0.08	1.30 $\pm$ 0.23	1.79 $\pm$ 0.62
胃	1.59 $\pm$ 0.35	1.25 $\pm$ 0.40	1.11 $\pm$ 0.26	1.58 $\pm$ 0.33	0.76 $\pm$ 0.18	2.44 $\pm$ 0.52	2.98 $\pm$ 0.38	1.63 $\pm$ 0.19	1.58 $\pm$ 0.11	1.48 $\pm$ 0.62
腦	0.34 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.06	0.66 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.03
心臟	1.26 $\pm$ 0.21	1.51 $\pm$ 0.19	1.01 $\pm$ 0.11	0.81$\pm$0.05	0.68$\pm$0.08	1.67 $\pm$ 0.28	1.56 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.19	0.48$\pm$0.10	0.36$\pm$0.05
肺臟	1.61 $\pm$ 0.35	2.48 $\pm$ 0.45	1.46 $\pm$ 0.20	1.15 $\pm$ 0.10	0.84 $\pm$ 0.01	2.21 $\pm$ 0.27	2.23 $\pm$ 0.21	2.13 $\pm$ 0.19	1.45 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.07
骨	1.37 $\pm$ 0.30	1.36 $\pm$ 0.13	0.86 $\pm$ 0.14	0.89 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.18	2.01 $\pm$ 0.07	1.78 $\pm$ 0.13	1.18 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.19	0.66 $\pm$ 0.05
子宮	1.88 $\pm$ 0.42	2.52 $\pm$ 0.22	1.63 $\pm$ 0.24	1.51 $\pm$ 0.24	1.57 $\pm$ 0.60	3.38 $\pm$ 0.35	3.41 $\pm$ 0.47	2.17 $\pm$ 0.21	1.78 $\pm$ 0.28	1.36 $\pm$ 0.45
血漿	6.26$\pm$0.57	5.32$\pm$0.80	2.59 $\pm$ 0.20	1.88$\pm$0.13	1.36 $\pm$ 0.3	2.76$\pm$0.18	2.76$\pm$0.36	2.50 $\pm$ 0.28	1.01$\pm$0.05	0.85 $\pm$ 0.09

粗體的 12 個點代表於此 HA 的共投藥顯著的降低了 5-FU 的濃度(student t-test)。

代表於此 HA 的共投藥顯著的增加了 5-FU 的濃度(student t-test)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

計

五、發明說明 (52)

證實諸如肝臟、脾臟以及腎臟之代謝活動器官沒有表現一高位準的藥物鎖定是很重要的，該鎖定會妨害任何增加增加腫瘤鎖定的正向方面。表7例示了於不同時間點測試 $[^3\text{H}]5\text{-FU}$ 在每一組織的攝取。

第13圖中顯示HA的初級代謝器官為肝臟、淋巴結與脾臟，然而5-FU大部分於肝臟中代謝。

當與HA共注射時，此等器官並沒有顯示5-FU攝取的顯著增加。然而，在與HA投藥10min之後腎臟沒有顯著的增加鎖定(增加1.8倍， $p=0.004$)。於此點之後，即使沒有統計學地顯著，增加藥物攝取持續直到樣品期間的終點。

膀胱、腸以及骨髓並沒有顯示5-FU之攝取的增加。於諸如子宮的組織中，在10 min時於藥物攝取有一短期的增加(增加1.8-倍， $p=0.032$)，但是於其他時間點沒有顯示差異，所以此一觀察之顯著性尚未能確定。

於一個或二個樣品點上，胃、腦以及肺臟確實顯示5-FU攝取的增加。然而，由於在每一個時間點的小動物數量($n=5$)不能實質的統計顯著性，即使一可分辨的趨勢如第14a-C圖所示的可被觀察到。

於1h與2h的後者樣品點中於心臟的5-FU顯著的減少被注意到，於此與HA共投藥造成分別59% ($P=0.003$)以及53% ($p=0.021$)的減少。

由不同的排尿速度，由每一老鼠收集尿液係為不可能的；因此足夠的尿液被收集以供統計分析。

五、發明說明 (53)

當5-FU與HA被共投藥時，於循環位準中的有一較早的減少(表7)。透明質降低的血漿5-FU藉由55% ($p=0.001$)。如第15圖中所示，藥力動力學的血漿半生期於接受5-FU/HA的小鼠由28min被轉換為56min。

實例10：對小鼠治療療法之投藥

常用於人類乳癌的治療療法係為環磷醯胺、氮甲喋呤以及5-氟尿嘧啶其係於28日循環的第1日以及第8日被投藥。於人類乳癌中該治療療法的開始係為6循環，於此段期間患者的狀況被重覆評估，因此我們為了嚐試儘可能模擬人類治療療法，藉由令小鼠於一長期的效力研究中暴露6循環(6個月)以及於一短期的效力研究中暴露6循環(6週)。慮及一老鼠的生命週期大約為兩年，我們如表8所示同時進行短期的與長期的治療計劃。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (54)

表8：治療投藥計劃

治療群	服用量	6週研究：	6個月研究： 治療療法
1. 生理食鹽水	0.1ml生理食鹽水(注射等級)	7日循環的1及2	28日循環的1及8
2. 5-FU/HA	0.1ml 含有： 30mg/kg 5-FU + 12.5mg/kg HA	7日循環的1及2	28日循環的1及8
3. HA	0.1ml 含有： 12.5mg/kg HA	7日循環的1及2	28日循環的1及8
4. 5-FU	0.1ml 含有： 30mg/kg 5-FU	7日循環的1及2	28日循環的1及8
5. HA 然後 5-FU	0.1ml 含有： 12.5mg/kg 或 HA 30mg/kg 5-FU	7日循環 1：HA 2：5-FU 3：HA 4：5-FU	28日循環 1：HA 2：5-FU 8：HA 9：5-FU
6. HA	0.1ml 含有： 12.5mg/kg HA	7日循環 1：HA 3：HA	
7. 5-FU	0.1ml 含有： 30mg/kg 5-FU	7日循環 2：HA 4：HA	

老鼠被分為7組，每組8隻動物被用於短期研究，以及58隻動物用於長期研究（參考表8的劑量與投藥計劃）。

該療法沒有被延伸超過6個月，因為已顯示超過6個月的治療法一般不會結合最佳的益處(Harris et al, 1992)。

如實例8所述，於長時間治療研究的治療施行日，動物們被稱重並且計量腫瘤體積。於6週期間研究動物們每

五、發明說明 (55)

日被稱重並且計量腫瘤體積。動物們被個別地置於一注射盒中，並且該注射經由尾部血管被投藥。已經實驗證明於患者對化學治療的反應中，壓力可為一主要因子 (Shackney et al, 1978)。因此，我們確定相同數目的小鼠被安置於每一獸籠中，每一獸籠的動物數目視試驗階段於5-8隻中變化。

於動物因病況的進展而死亡或是當6個月(長期)或是6週(短期)治療療法完成時，試驗終點出現。由於動物行為的指標，該等動物隔週的由一獨立的動物行為負責人員檢視評估疾病進展的程度。如第16圖中所示者，接下來的標準被用以檢測動物已經到達必需死亡的試驗終點：

- 1). 動物不吃不喝並表現引人注意的體重減輕；
- 2). 腫瘤超過體重的10% (Panel A)；
- 3). 腫瘤大小太大以致於動物無法移動 (Panel B)

於試驗終點該等動物們藉由注射戊巴比妥納 (60mg/ml)被麻醉，血液被收集然後以頸部錯位殺死該等動物。

於6週研究的末了，腫瘤大小被決定並且如第17圖所示，5-FU與5-FU/HA療法具有比生理食鹽水組顯著地較小的腫瘤 ($P=0.005$)。於5-FU與HA/5-FU治療群之間，腫瘤體積沒有顯著差異，指出兩種療法於對抗初級的腫瘤上展現相同的效力。於生理食鹽水與HA治療群之間，初級的腫瘤體積沒有顯著差異。在殺死老鼠之後該腫瘤、肝

五、發明說明 (56)

臟、心臟、脾臟、膀胱、左腎與右腎、子宮、肺臟、胃腸、腦以及淋巴結立刻被切下並置於4%的以0.06M 磷酸 pH 7.5緩衝的福馬林中以及1.0% w/v氯化鯨蠟基吡啶中。於組織學處理之前，該組織被固定歷時16-24h。經固定的組織100%的酒精中被脫水並且被包埋於石蠟塊中，由此2-4 μ m切片被置於顯微鏡的玻璃載玻片上。以蘇木精核染劑與伊紅細胞質染劑染色該組織切片以指出任何可指出治療毒性的病理學特徵。

每一動物收集9至11個淋巴結，確保所有於腫瘤區域的淋被收集。現今有兩種方法用以檢測淋巴結的轉移：

- i) 粗略器官組織的例行的蘇木精與伊紅染色
- ii) 使用諸如癌胚抗原之癌症標記的免疫組織學方法：

於本研究中轉移檢測的兩種方法同時被使用。並非所有可獲得的CEA抗體都會與人類乳癌細胞起反應，所以我們測試5種抗體的反應性 (DAKO, Amersham and KPL)。

該蘇木精與伊紅染色的淋巴結經由Dr P. Allen (經認可的病理學家) 於此每一淋巴結以顯微鏡檢視腫瘤細胞的出現。該CEA免疫染色的淋巴結被顯微鏡的檢視，任何被正向地染色的被計數並且考量淋巴結的轉移。

腫瘤體積如先前實例8中所述的藉由微血管量測以及腫瘤體積以每日或每週的基礎被檢視被計算。

五、發明說明 (57)

5-FU最常見的毒性效果係於腸胃道中，於此出血的進入腸道穿孔可能發生(Martindale, 1993)。每日檢視諸如腹瀉之GI不適並且每週注意諸如體重減輕之毒性證據。體重減輕藉由去除腫瘤重的體重被檢視，其藉由如Shibamoto et al, 1996所引述的以lg x 腫瘤體積(cm^3)來計算。為了展現該動物重量的變化，體重於治療時間開始依下述標準化：

$$\frac{\text{身體質量(去除腫瘤)} - \text{治療開始時身體質量(去除腫瘤)}}{\text{治療開始時身體質量(去除腫瘤)}} \times 100$$

在沒有治療的動物群中，沒有諸如腹瀉之GI道不適被注意。對於每一治療療法，腸胃的毒性使用體重的減輕(除去腫瘤重)作為指標。於每一動物死亡的時間，於體重變化之百分比以先前所述的被計算。於經標準化的體重在生理食鹽水、HA及5-FU治療群與5-FU/HA 群治療群之間有一統計學地顯著差異(第18圖)。接受5-FU/HA佐劑治療法的小鼠顯示16%的體重增加(students t-test, $p=0.025$)在全部期間該未治理群組於重量表現-2%的淨增加。

癌胚抗原(CEA)之免疫組織學與傳統的診斷病理提供了一優異的淋巴結轉移量化。老鼠平均含有15-19個淋巴結(Lamszus et al, 1997)，因此此一研究檢視該等動物60-70%的淋巴結。細心的步驟接下來為了確保所有的淋巴結排出該胞腺脂肪墊以及頰部被移除並被檢視。如表9A顯示，所有的動物顯示淋巴結轉移。

五、發明說明 (58)

第19A圖顯示淋巴結關聯的百分比(每一動物淋巴結轉移的速度)大大地受到5-FU、5-FU/I-IA以及HA治療的影響，於此該生理食鹽水群顯示淋巴結關聯量的顯示一6倍的增加。再一次的，HA顯示其可具有治療上的價值。

雖然於本研究的終點解剖該動物每一組織被微觀地並巨觀地檢視腫瘤結。使用接受HA/5-FU或HA療法的小鼠的預期，新腫瘤在鄰近於初級的腫瘤的頸部或是下臂部區域被觀察到。併入HA至該治療療法中避免了新腫瘤形成，如第19B圖所示者。

於未接受治療之全部患者存活率沒有顯示一顯著差異(表9A)，於此來自所有群的動物完成了該治療療法。

伴隨5-FU治療的主要毒性係為骨髓的降低以及於白血球細胞急降評估任何治療伴隨的血液毒性係為必要的。當麻醉該等動物時，血液自心臟或是大血管使用針頭以及注射筒被收集。白血球細胞數量藉由製造一血液於老鼠生理食鹽水(M)中之1/10的稀釋液，並且將之於一血球計數器中計數。一不同的血液計數藉由計數嗜中性白血球、淋巴球以及紅血球被計數。該等血液細胞次族群的估量與經刊行的老鼠血液資料相比較。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (59)

59

表 9A : 5-FU/HA 佐劑療法於人類乳癌外移植物在裸鼠中之生長及轉移的效果 : 6 週研究

治療群	TDT 平均 ± SEM	具有轉移之 巴結物 %	新腫瘤 數目	% 與每一 動物有關之 巴結物 平均 ± SEM	完成治療 之動物數 目	% 體重變化 平均 ± SEM
1. 生理食鹽水	9.4 ± 1.1	100	3	94.2 ± 2.8	8/8	100 ± 0.61
2. 5-FU/HA	20.9 ± 2.7	100	0	12.1 ± 0.9	8/8	116.0 ± 0.56
3. HA D1, 2	27.2 ± 5.2	100	0	18 ± 4.1	8/8	102.5 ± 0.38
4. 5-FU D1, 2	32.1 ± 3.5	100	1	14.3 ± 2.9	8/8	97.5 ± 0.73
5. HA 然後 5-FU	14.8 ± 3.7	待評估	待評估	待評估	8/8	101.8 ± 0.93
6. HA D1, 3	30.7 ± 4.9	待評估	待評估	待評估	8/8	100.9 ± 0.56
7. 5-FU D2, 4	15.3 ± 2.5	待評估	待評估	待評估	8/8	98.3 ± 0.73

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

- 62 -

訂

五、發明說明 (60)

為了確保並沒有誘生器官萎縮或是擴大，該等器官於後死亡期間被移出並稱重。每一器官的質量以一全部淨重的百分比被計算，並且與僅使用生理食鹽水群組(第1群)的器官相比較。

實例11 長期的治療：6-個月療法

當此一實驗被持續進行，有顯著的資料被產生。

TDT 係為一腫瘤於大小或是細胞數目倍增所耗費的時間，一腫瘤生長的參數其係簡單的被計量並且於觀念上可輕易的與臨床的腫瘤狀態相關 (Shackney et al, 1978)。藉由檢視腫瘤的倍增時間，評估腫瘤化學療法的反應係為可能者，因為緩慢的腫瘤生長即表示對化學治療法的極差反應(Schabel, 1975)。

於每一治療中該腫瘤倍增時間示於表9B中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(61)

61

表9B：5-FU/HA佐劑療法於人類乳癌外移植植物在裸鼠中之生長及轉移的效果：6個月研究

治療	TDT平均±SEM	試驗終點	腫瘤病理學：觀察
生理食鹽水	13.0±4.0	87.5%無法移動 12.5%代謝壓力	沒有特別特徵
5-FU	22.7±2.9	62.5%無法移動 37.5%代謝壓力	沒有特別特徵
5-FU/HA	28±2.6	25%無法移動 75%代謝壓力	小面積壞死出現，接著 大面積痂形成，2/8腫 瘤完全壞死並且掉落
HA	26±1.75	100%無法移動	小面積的壞死與痂形成
HA接著5-FU	13.5±0.63	37.5%無法移動 62.5%代謝壓力	沒有特別特徵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

-64-

訂

五、發明說明 (62)

於 5-FU/HA 以及 5-FU 治療之間的 TDT 並沒有一顯著的差異。因為於該 6 週期間研究，HA 的投藥同時也顯示初級的腫瘤中治療上的效果，相對於生理食鹽水之 13 ± 4 日的 TDT，其展現 -26 ± 1.75 的 TDT。在 5-FU 之前 24h 投藥 HA 顯然妨礙了 5-FU 腫瘤生長遲滯時間的關聯。

於檢視腫瘤腫瘤治療反應與腫瘤進程時，質量與體積係為一有用的參數，但是無法有效的展示由一療法引起的細胞毒性的效果。我們為證實 HA/5FU 療法是否殺死較多腫瘤細胞以及該細胞的地點。死亡的細胞可以被病理學地彰明：

i). 核不完整 (萎縮)

ii). 細胞溶解 (壞死)

將整個腫瘤圖像掃描至一 MCID 電腦中，其計算整個腫瘤量化死亡細胞的數目。具有碎片細胞核的細胞或是溶解的細胞被框出輪廓並且掃描，此等確實區域接下來被計算死亡的細胞。該腫瘤百分比被歸因於死亡細胞如下被計算：

萎縮以及壞死細胞區域 X 100

整個乳癌腫瘤區域

一可生存的細胞較衰亡中或是死去的細胞含有較多的水份，因此藉由測定該乾腫瘤質量對濕潤腫瘤質量的比例，預測可生存的對非可生存的細胞的區域係為可能的。該腫瘤被對稱的切開，於此一半用於腫瘤病理學的處理，

五、發明說明 (63)

而另一半測量其在50℃中乾燥48h前後的重量。該乾燥腫瘤質量的百分比如下被計算：

$$\frac{\text{乾燥腫瘤質量}}{\text{濕潤乳癌腫瘤質量}} \times 100$$

濕潤乳癌腫瘤質量

所有患者的存活時間以該動物於開始治療後存活的時間(日或是週)來被計算。

每一治療的腫瘤倍增時間於表9A顯示。在5-FU/HA以及5-FU治療之間的TDT沒有顯著差異。然而，HA的投藥於初級的腫瘤上顯示一治療上的效果，於此該TDT顯著的大於生理食鹽水群(p,0.05, Multiple comparison Tukey test)。在5-FU之前24h投藥HA顯示一治療上的妨礙任何5-FU腫瘤生長的遲滯時間。

引用的用於5-FU之治療時間為26% (Inaba et al, 1989)，但是該等接受5-FU的動物並沒有表現“治癒”。兩隻接受HA/5-FU 佐劑治療法的小鼠表現“治癒”，於此該腫瘤在治療大約12週之後完全的壞死並掉落。第20B圖顯示於接受以HA以及HA/5-FU治療的小鼠顯示有小痂形成的特徵，而第20C圖顯示在大面積的痂形成之後有小規模的壞死。小鼠之一經歷了小節的重新生長，但是第二隻老鼠於22週時仍然沒有腫瘤。如於第20A圖中所見，接受5-FU或是生理食鹽水的小鼠具有大的腫瘤，由於腫瘤質量的緣故其最基本的結束該動物的死亡(表9B)，但是接受HA+5-FU的小鼠顯示一腫瘤外觀特徵，於此一小面積的壞死於一痂之後形成。

五、發明說明 (64)

於第22週，5-FU/HA 小鼠的37.5% 依然存活，並且對於該等5-FU/HA 佐劑治療法小鼠，主要的死因是體重減輕以及代謝壓力(表9B)。

當HA ± 5-FU被投藥至帶有人類乳癌外移植物的小鼠時，於所有的患者生存率中呈現一顯著差異。於24週研究的第22週，唯一存活的群是5-FU/HA 以及HA，如第21圖中所示者。

結論

得自5-FU鎖定的數據顯示當5-FU與HA於時間點10、20、30分鐘共注射時，分別相對於5-FU攝取2.4、1.5及2倍的統計學的顯著增加的增加。這指出5-FU藉由HA被結合至腫瘤上。有兩個可能的HA鎖定5-FU至腫瘤的機制係為可能者：

HA 包含結合5-FU結合至該等受體 (CD44)並且藉由受體-調節胞飲被內化，如此釋放藥物至該腫瘤細胞中。

HA分子篩網將會成為一向外擴散的障礙，如此於HA 結合至受體(CD 44及RHAMM)之後，該被夾帶的5-FU可以擴散至腫瘤細胞中。然而藉由HA基質被留存於該細胞表面，5-FU對於一般被利用以5-FU運送至細胞中主動運送具有增加可獲取性。

HA的代謝主要於淋巴結(Fraser et al, 1988)以及肝臟(Laurent et al, 1986)中發生。HA 一般由血管中藉由受體-調節的細胞的攝取以及於肝臟(80-90%)、腎

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (65)

臟(10%)、脾臟 (0.1%)和骨髓(0.1%)中被澄清(Fraser et al, 1983)。循環HA藉由全部的代謝受體，同時也被肝臟內皮細胞(LEC)受體(Eriksson et al, 1983)被攝取，於此該CD44受體呈現與HA內化結合至細胞的步驟有涉，而非新陳代謝，然而RHAMM受體僅與細胞運動。結合HA與5-FU可造成高位準的5-FU被鎖定至該HA或5-FU新陳代謝的位置。得自鎖定實驗的數據(表6)顯示當與HA投藥時，於5-FU鎖定至該肝臟有一顯著的增加。因為沒有增加的鎖定至該肝臟被發現，其暗示該位於肝臟的LEC受體相對於CD44受體具有一較低的親和力。另一個可能性係為CD44異構體於肝臟的表現(Stamenkovic et al, 1991)並不會以一高親合性結合至HA。因為藉由肝臟沒有增加的5-FU鎖定於其他如脾臟、骨髓以及淋巴結之代謝器官中被注意到。

在10分鐘的時間內，於5-FU鎖定至腎臟有一顯著的1.8倍的增加。雖然其他的4個時間點，當HA/5-FU被共投藥於5-FU攝取藉由腎臟沒有顯示一顯著的增加，於此顯示一一般的趨勢發生，於以與HA投藥此多於5-FU輸送至腎臟。用以最終消除5-FU的主要路徑係由體內以泌尿器官排出。即使於藥物與HA的腎臟內含物中似乎有一點增加，但是我們相信由其它的證據，HA藉由腎臟被攝取並且快速的被代謝，如此其留存時間將會很短暫並結合至藥物將會很快的被釋放至尿液中。

五、發明說明 (66)

於諸如胃、腦、肺臟以及子宮之組織，短期的鎖定於一個或多個時間點被注意到。沒有一致的藥學動力學模式被產生，其將可指出我們需要增加新的族群樣品數目，其可清楚的指出此等觀察結果是否真實。於在10-30min內增加至腦之鎖定的案例中，其將可藉由先前的觀察被解釋。HA已經被結合用以增強藥物通過血液-腦障壁之能力(Nelson & Falk, 1994)。

於30 min 以及1 h的時間點，5-FU與HA共投藥於肺臟中有一顯著的增加。已經報導，肺臟巨噬細胞含有高位準的HA-結合、CD44異構體(Underhill et al 1993)，其可達成增加的鎖定。此可被結合至一治療上的優點於肺臟上皮癌的治療結合，於此小細胞及大細胞肺臟上皮癌已經報導含有CD44與RHAMM的過度表現(Horst et al, 1990)。

在1及2h時，當HA與5-FU共注射時，鎖定至心臟的5-FU顯著減少。因為5-FU投藥可能會產生一心臟毒性(MIMS, 1997)，相較於5-FU單獨投藥，5-FU與HA的投藥可能會降低對心臟毒性的程度。

當評估HA/5-FU佐劑治療法的療效時，數個觀察在長期和短期計劃中被一致化。

接受HA/5-FU或單獨HA的小鼠顯示較有活力並維持或是增加體重，於6個月研究中，HA/5-FU小鼠增加的存活時間支持該等觀察。

五、發明說明 (67)

接受 5-FU/HA 或 HA 之小鼠的腫瘤發展最大的壞死區域，至其極限有兩個腫瘤掉落。

HA 對 5-FU 的加入並未呈現一顯著的效果於初級治療的體積，當該治療法被投藥歷時 6 個星期，但這不是肇因於該腫瘤的 vasculature。腫瘤含有三個區域。當 HA 與 / 不與 5-FU 共投藥時，其會到達該腫瘤處，進入該血管化並且半壞死的區域，該被危害的血管裂縫接合。由於 HA 對吸收水份的能力，其可產生一細胞外液體湧入至該腫瘤的壞死區域，接下來增加腫瘤體積並進一步對腫瘤血管造成危害。此一假說與該使用 HA±5-FU 確實會展現一壞死與腫瘤細胞間液漏泄的觀察結果一致。當計算壞死細胞對可生存的細胞區域與該乾燥：濕潤質量比被完成時，我們可以證實這項假說。

該長期的效果研究顯示如第 21 圖所示者，接受 HA/5-FU 治療的小鼠顯示一增加的存活率。此等小鼠之平均腫瘤體積相較於其他治療群也顯示被降低。於長效期研究中造成 HA/5-FU 群死亡的原因主要是由於代謝壓力，而造成 5-FU 群的死亡的原因多半是腫瘤尺寸太大造成無法移動。所有僅使用 HA 的小鼠死於腫瘤太大造成無法行動，而非由於毒性。因此 HA 劑量並未顯示任何毒性效果被投藥。由該鎖定的結果其可發現 5-FU 增加的鎖定發生於當 HA 與 5-FU 結合至該腫瘤時 (第 12 圖)。經由 HA 結合至 HA 特定受體 CD44 以及 RHAMM，HA 鎖定 5-FU 至腫瘤的能力，其已經展現一於腫瘤位置增加的量

五、發明說明 (68)

(Culty et al,. 1994; Wang et al 1996), 可以反應 HA 與 5-FU 以及其他細胞毒性的藥物的使用可能有助於克服沒有足夠藥物到達腫瘤以具有任何治療上的影響的問題。於該短期研究中同時也發現該 5-FU/HA 小鼠相較於所有其他群組顯示一體重上的增加 (第 21 圖)。因此, HA 對腫瘤位置的鎖定能力可能會減少 5-FU 到諸如腸之其他器官的能力, 並且降低伴隨 5-FU 治療法特別是腸胃毒性的副作用。

相較於早先於實例 1 至 3 中所揭露的 MTX/HA 佐劑治療法之預測, 我們注意到一些明顯共同的結果及差異, 其摘述於表 10 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (69)

**表10：使用 MTX/HA 及 5-FU/HA 佐劑治療法之間的共同
結果以及差異**

研究	類似結果	不同結果
MTX/HA：6個月 對 5-FU/HA：6週	接受 HA/藥物的小 鼠顯示明顯的體重 增加；於患者存活 並無顯著的增加； 抑制新腫瘤形成； 展現一較長的 TDT ；降低淋巴結轉移	
MTX/HA：6個月 對 5-FU/HA：6個月	展現一較長的 TDT	5-FU 小鼠展現存 活率增加
HA 控制 MTX/HA ：6個月 對 HA 控制 5-FU/HA ：6週及6個月		於 5- FU/HAHA 小鼠 研究顯示藉由降低 TDT，HA 發揮了 治療上的效力； HA 降低淋巴結轉 移以及腫瘤形成。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (70)

於該兩種研究中主要的差異在於該腫瘤的初始質量，於該 MTX/HA 研究中該平均腫瘤體積為 175.13 mm^3 相較於 61.63 mm^3 於 5-FU/HA 研究。經由該粒子移動至腫瘤中的動力以及一患者對腫瘤體積的反應，這可以說明於相對於 TDT 估計之差異。

實例 12 與透明質結合之治療法的療效

最常被用於人類初級與轉移的乳癌的治療療法是結合化學治療法與環磷醯胺 (Cyc)、MTX 以及 55-FU，其於一 28 日循環的第 1 日和第 28 日被投藥。該組合物療法通常被稱作 CMF，經常以 6 個循環被提供，於此時間該患者的病況被再評估。該利用 CMF 治療法之抗腫瘤反應速度已經被報導大約為 50% (Bonadonna, 1981; Bonadonna, 1988)，但是該治療法有許多隨附的副作用，例如疲倦、噁心、白血球減少以及嘔吐 (Bonadonna, 1976; Meyerowitz, 1979)。由於利用 HA 作為藥物用於 MTX 及 5-FU 輸送載劑之成功，我們評估 HA/CMF 佐劑治療法超過 6-週以及 6 個月治療療法的療效與毒性。

MTX 與 5-FU 分別如實例 2 及 6 中所述的被製備。該 Cyc 的儲備濃度藉由溶解 1g 的冷凍乾燥的藥物於 1ml 的注射等級的無熱源蒸餾水中並且以注射等級之 0.9% 氯化鈉補足成為 50ml。該儲備溶液被等分為小體積並且在使用前與 -20°C 下冷凍。

五、發明說明 (71)

CMF注射藉由取出適量體積藥物儲備溶液被製備以達成最終藥物濃度：

30mg/kg 5-FU (儲備溶液：20mg/ml)

15mg/kg MTX (儲備溶液：24.5mg/ml)

26mg/kg CYc (儲備溶液：20mg/ml)

12.5mg/kg HA (儲備溶液：10mg/ml)

為證實該CMF/HA佐劑療法之療效以及任何可能的毒性，於裸鼠中的人類乳癌腫瘤移植物被使用。為了儘可能模擬治療療法，小鼠於一長期效用研究的6循環(6個月)以及一短期效用研究的6循環(6週)中被治療。小鼠被隨機分為7組每組8隻用於短期研究，以及5組每組8隻用於長期研究。

小鼠以30mg/kg 5-FU；15mg/kg MTX；26mg/kg Cyc ±12.5mg/kg於一7日療法第1日與第6日被治療歷時6週，或是於一28日療法的第1日與第8日被治療歷時6個月。對照組包含有生理食鹽水、12.5mg/kg HA的投藥，或是小鼠於第一日有12.5mg/kg HA然後於第2日有CMF。小鼠每日被檢視任何治療毒性，並且每日或每週量測腫瘤質量(參見表11)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (72)

表11：治療投藥計劃

治療群	服用量	6週研究：	6個月研究： 治療療法
1. 生理食鹽水	0.1ml 0.9% 之生理食鹽水 (注射等級)	7日循環的1及2	28日循環的1及8
2. CMF/HA	0.1ml 含有： 30mg/kg 5-FU+15mg/kg MTX+26mg/kg Cyc+12.5mg/kg HA	7日循環的1及2	28日循環的1及8
3. HA	0.1ml 含有： 12.5mg/kg HA	7日循環的1及2	28日循環的1及8
4. CMF	0.1ml 含有： 30mg/kg 5-FU 15mg/kg MTX+26mg/kg Cyc	7日循環的1及2	28日循環的1及8
5. HA 然後 CMF	0.1ml 含有： 12.5mg/kg 或 30mg/kg 5-FU 15mg/kg MTX+26mg/kg Cyc	7日循環 1：HA 2：5-FU 3：HA 4：5-FU	28日循環 1：HA 2：5-FU 8：HA 9：5-FU
6. HA	0.1ml 含有： 12.5mg/kg HA	7日循環 1：HA 3：HA	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (73)

如表 12a 以及 12b 中所示者，於該 6 週期間研究以下結果被觀察到：

1). 接受一含有 HA (CMF/HA, HA 接下來使用 CMF 或僅使用 HA) 療法小鼠顯示增加的存活率，超過僅使用 CMF 的群組 50%。CMF 治療群的平均存活時間為 40.4 days 相對於所有其他群組的 42 中。

2). 以 HA 與 CMF 結合物治療的動物們顯示一顯著的重量增加 (t-test, $P < 0.001$) 超過僅使用 CMF 或是 HA 治療顯示一更好的結果 (參見第 22 圖)。

3). 以生理食鹽水治療之小鼠的腫瘤倍增時間 (未治療控制組) 明顯的少於其他治療群 (t-test, $p < 0.001$)，但是於其他治療群之間沒有統計學地顯著差異 (參見第 23 圖)。

4). 於 CMF 以及 CMF/HA 治療群之間關於初級腫瘤之終點體積有一顯著的差異，於此 CMF 於 7/8 的動物中造成腫瘤質量的降低，而 CMF/HA 僅於 3/8 的動物中造成腫瘤腫瘤體積的降低。

5). 當小鼠以 HA±CMF 來治療時，雖然僅以 CMF 治療的小鼠顯示疲倦、結合膜炎、健康極差的徵候，並沒有治療毒性被注意到。

當 CMF/HA 或 HA 治療法於 28 日循環的第 1 日及第 8 日被施用時，隨後的結果被發現；於治療群之間的存活時間有一顯著差異

1). 於治療群之間於體重增加上沒有顯著差異。

五、發明說明 (74)

2). 接受HA±CMF之小鼠的初級的腫瘤顯示小面積的壞死與痂之形成

3). 於該初級腫瘤的治療中，CMF作為單一藥劑沒有顯示超過生理食鹽水以及HA治療的療效。添加HA至CMF產生一統計學顯著地較大的(t-test, $p=0.001$)初級的腫瘤。

由此研究可以導出隨續的結論：

1). HA/CMF佐劑治療法的長期的投藥(6個月)不會顯示一療效的增加或是於治療副作用的降低。

2). HA/CMF佐劑治療法的短期投藥(6-週)顯示超過單獨以CMF治療的許多優點。

3). 明顯的體重增加。

4). 完成治療的動物增加50%。

5). 沒有諸如疲倦、結合膜炎、胃口不好等副作用。

6). 接受HA的小鼠沒有顯示任何毒性的記號。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(75)

表12A CMF/HA佐劑療法對在裸鼠中之人類乳癌外移植物之生長及轉移的效果：6週研究

治療群	TDT平均±SEM	具有淋巴結轉移之物%	新腫瘤數目	%與每一有關之淋巴結平均±SEM	於初級腫瘤體積之變化(%原始腫瘤體積)平均±SEM	存活時間(日)平均±SEM	完成的動物數目	%體重變化平均±SEM
1.生理食鹽水	9.4±1.1	100	3	94.2±2.8	494.7±101.6	42±0	8/8	100.1±0.61
2.CMF/HA	29.3±6.2	N/A	N/A	N/A	30.2±26.5	42±0	8/8	108.7±0.62
3.HA D1,2	27.2±5.2	100	0	18±4.1	238.0±77.6	42±0	8/8	102.5±0.38
4.CMF D1,2	37.6±4.4	N/A	N/A	N/A	-46.2±12.0	40.4±0.68	4/8	84.5±1.37
5. HA然後CMF	21.8±5.8	N/A	N/A	N/A	55.6±26.6	42±0	8/8	106±0.51
6. HA D1,3	30.7±4.9	N/A	N/A	N/A	66.1±30.1	42±0	8/8	100.9±0.56

五、發明說明(76)

76

表12B CMF/HA佐劑療法對在裸鼠中之人類乳癌外移植物之生長及轉移的效果：6個月研究

治療	TDT 平均 ±SEM	存活時間(週) 平均±SEM	%原始身體質量 於試驗終點 ±SEM	於初級腫瘤體積 之變化(%原始腫 瘤體積) 平均±SEM	試驗終點	腫瘤病理學：觀察
生理食鹽水	14.8±1.1	18.1±0.39	98.569±3.31	494.7±101.6	87.5% 無法移動 12.5% 代謝壓力	沒有特別特徵
CMF	40.1±4.0	10.5±0.33	90.9±5.44	392.8±129.6	100% 代謝壓力	沒有特別特徵
CMF/HA	23.5±1.4	12.6±0.21	93.6±4.92	2100.5±564.6	100% 代謝壓力	小面積的壞死於第 11周出現在2/8的 小鼠；然後大面積 的癌形成
HA	24.7±0.7	18.1±0.45	104.6±4.45	1929.1±661.0	100% 無法移動	小面積的壞死與癌 形成
				55.6±26.6		
				66.1±30.0		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

- 79 -

訂

五、發明說明 (77)

實例13 化學療法的藥物與HA之本質的本質之NMR調查

為了進一步調查HA與化學療法的藥物之間的交互作用，使用 ^1H 核磁共振(NMR)光譜學。氧化氘($^2\text{H}_2\text{O}$ (99.96%))自Cambridge Isotope Laboratories取得。MTX自Faulding Pharmaceuticals取得並且5-FU以及HA儲備溶液如先前所述的被製備。

光譜在298 K下於一Brüker DRX 光譜儀於600 MHz 以一屏蔽梯度單元被操作記錄。該2D實驗使用時間比例相增量被記錄於一相-敏感模式的用以於 t_1 維度正交檢測(Marion & Wuthrich, 1983)。該2D實驗使用MLEV-17 spin lock sequence (Bax & Davis, 1985) 包含有TOCSY序列與120ms的混合時間；NOESY (Kumar et al., 1980) 250以及400 ms的混合時間與ROESY光譜以一250 ms的混合時間。探針的溫度校正藉由與乙二醇化學的移位被達成。所有化學的移位(ppm)係參考4,4-二甲基-4-silapentane-1-磺酸鹽(DSS, 0 ppm)之甲基共振。

用於NOESY、ROESY以及TOCSY實驗之水訊息的水溶液藉由使用改良的WATERGATE程序被達成(Piotto et al., 1992)於此兩種1 ms 的梯度脈波被應用於一二項式3-9-19 脈波的兩側。於光譜6024 Hz與4096 複合的資料點被 F_2 與 512 於 F_2 維度的增量，以每增量32掃描用於該TOCSY實驗以及80掃描用於NOESY。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (78)

NH 質子緩慢交換藉由獲取一系列的一維度 (1D) 光譜獲得超過 16K 資料點與使用 32 掃描。

NMR 擴散實驗於一 Bruker AMX spectrometer 中裝置以一於 500 MHz 操作的梯度控單元。所有的實驗以 16 或 64 掃描於 298 K 超過 16K 的資料點與 7575 Hz 被獲得。一 15.44 G/cm 的梯度強度被用於該擴散實驗中。每一擴散由一系列的 12 PFGLED 光譜中被獲得，於其中該延遲 ($\tau=20$ ms, $\Delta=50$ ms, $T=30$ ms 以及 $T_e = 14$ ms) 並且於此該 G 之幅度被保持常數，但是該場梯度脈波 (8) 被增量 1 ms 步驗由 0.2 ms 至 12.2 ms 於該最終光譜中。

所有的光譜於一 Silicon Graphics Indigo workstation 使用 Xwinr (Bruker) 軟體處理。因為 2D 實驗該 t_1 維度係為以日填滿至 2048 個真實數據點，並且 90° 相移正弦鐘形鐘功效於 Fourier 轉形前被應用。

該 NMR 實驗被計用以顯示加入 HA 之 MTX ^1H 的 NMR 光譜。藉由檢視該藥物 MTX 之光譜的特定變化，諸如峰之變寬或移動其可看出該藥物分子與 HA 是否有任何交互作用。第 24 圖顯示 MTX 溶於水中之 ^1H NMR 光譜圖。此一光譜圖很快地辨認出於該氦甲喋呤中的每一個氫原子基團。

氦甲喋呤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (79)

氮甲喋呤具有數個功能基團，其可潛在地與透明質分子交互作用。該位於該 2,4-胺基喋啶芳香環的MTX初級胺類殘基可與該位於透明質分子上的羧基基團形成一個離子結合。介於位於氮甲喋呤該胺類基團透明質之羧酸環的羥基基團之氫鍵交互作用係為另一可能。MTX之疏水性芳香族環與折疊的透明質聚合物之疏水性碎片之間的疏水性交互作用亦為可能者。此等交互作用被圖式於第25圖中。

為了處理氮甲喋呤與HA之間是否有一特定交互作用的問題，該NMR實驗被設計用以顯示於加入HA之MTX的 ^1H NMR光譜的變化。第26圖顯示1該透明質酸在600 MHz 以及298 K下之600 MHz 光譜圖。

第27圖顯示MTX單獨以及MTX與增加的加入HA (50 kDa) 2 毫微莫耳、10 毫微莫耳、20 毫微莫耳 以及 80 毫微莫耳 於298 K下，該600 MHz ^1H NMR 光譜圖。此等光譜圖顯示於氮甲喋呤該等峰沒有任何的化學的移位位置變化。增加的峰呈現該HA的連續量的光譜圖其完全與透明質酸的共振一致。由於於此光譜圖中MTX的共振沒有化學的移位位置，其顯示該MTX分子沒有特定的區域與HA分子產生交互作用。

決定在MTX之NH基團與該HA之酸基團之間是否有一強交互作用的一種方法是量測該NH質子的交換速率。該等氫原子傾向於並且可與該大量溶劑快速的交換。然而若是，其等係與涉及一與HA分子之強烈反應而沒有被大

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (80)

量溶液所保護，其等之交換速率會減少。於此等實驗中 MTX 之胺類氫原子與來 D_2O 的氫交換，其交換速率應該提供一保護介於該 MTX 與 HA 之間。溶液 1H NMR 分析藉由加入氧化氫至一 MTX 及 HA 溶於 0.5% w/v Na_2CO_3 (pH 9) 的溶液中被製備，其顯示在 4 分鐘內所有 MTX 的胺類氫原子已與樣品中的氫交換。此一結果暗示位於 MTX 中的胺類氫原子與該大量溶劑無法避免交換。

該胺類氫峰自 1H NMR 光譜圖消失的原因是因為氫較氫具有一非常不同的共振，並且因此沒顯示於 1H NMR 光譜圖中。相類似的實驗被例行的使用以測試於聚脘及蛋白質中的骨架胺氫原子是否被大量溶劑所保護。當蛋白質的鹽胺氫原子涉及該氫鍵排列其安定一 α -螺旋以及 β -平板二級結構該等氫原子的交換速率經常會戲劇性地減少。於某些案例中該氫訊息涉及此等交互作用其可堅持數小時數日甚至數個月端視該交互作用的強度以及其由大量溶液的保護程度(例如於一疏水性蛋白質的核心中)。

擴散實驗被 MTX 單獨的，以及於 HA 出現下的執行。此等實驗可以指出是否被夾帶的 MTX 之擴散由於 HA 篩網的出現而被延遲。該 1H NMR 擴散實驗的重覆指出對於 MTX 分子的主要部分並沒有 MTX 擴散速度的延遲因為於該 MTX 與 HA 存在的 MTX 之間的擴散係數有一可忽略的差異。此一發現可以暗示於 HA 網絡中在 HA 分子之間有大量的溶液腔其容許藥物於其間自由的擴散至基質中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (81)

該擴散實驗暗示大部分的MTX分子係自由的經由HA分子被擴散。此一腳本並沒有被列入考量，若是一小部分的(也就是 5%MTX分子)以一不特定的方式與HA分子交互作用。

由前述實驗MTX 與HA沒有強烈地交互作用是很明顯的，若有任何交互作用也是不特定的。用以測試弱連結(10^{-3} - 10^{-7} M)的一種方法是測試用於不特定的結合是執行一轉移NOESY實驗於此等2D實驗中越峰將顯示該連結是否微弱地結合至HA。一轉移的MTX/HA 之NOESY光譜圖顯示沒有越峰因為MTX 結合至HA其暗示了在MTX與HA之間一可忽略的交互作用。

如同一進一步的確定是否小部分的(亦即 5% 的MTX分子)以一不特定的方式微弱地與HA分子交互作用。於ROESY光譜圖中的峰應該顯示是否有一即使是小部分的MTX分子於自由的及結合至HA的狀態間化學的交換。A 250 ms ROESY光譜圖沒有顯示任何地化學的交換峰其暗示即使是小百分比的MTX也沒有與HA交互作用。

5- 氟尿嘧啶

第 28 圖 顯示 該 5-FU 及 5-FU (1.25 mg/mL, 1.6 mg/mL and 6.4 mg/mL) with HA (750 kDa, 3 mg/mL) 在 70.0 與 8.5 ppm 之間，於 298 K 下的起始實驗之 600 MHz ^1H NMR 光譜，以調查是否有一交互作用與 50kDa 的 HA 被執行。在 5-FU 與 HA 沒有交互作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (82)

被觀察到(資料未顯示)。為了調查一交互作用是否視HA的分子量而定，進一步的滴定實驗與750 kDa 透明質被執行。該被使用的5-FU濃度相等於HA/5-FU 佐劑治療法之Kings College London配方研究其入一製劑用於瑞士的臨床的階段。該濃度被設計以模擬該用於混合HA/5-FU的濃度，於該注入袋中以及HA/5-FU濃度於血漿中被估計。不幸地，該5-氟尿嘧啶的胺類共振與此等配方之大量的溶劑水在pH (8.8 to 9.1) 快速交換因此此等共振於5-FU的光譜圖中係為不可見者。僅有一個CH的共振於5-FU的光譜圖中係為可見者。降低此等溶液之pH係為不可行的，因為5-FU於低pH將會沉澱。此等光譜圖顯示於該化學5-FU之峰之的移位位置並沒有改變。此等光譜指出該5-FU 沒有顯示與HA分子交互作用。

擴散實驗於5-FU單獨以及於HA的存在下被執行。重覆¹H NMR 擴散實驗的結果顯示於表13中指出5-FU 擴散藉由透明質的出現沒有任何遲延，因為於5-FU單獨與5-FU於HA存在之擴散係數有一可忽略的差異。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (83)

表4：NMR擴散係數

樣品	HA 儲備 (750kDa, 10mg/mL)	5-FU (20mg/mL)	擴散常數 m^2/s
4		62.5 μL	$9.245 \times 10^{-10} / 8.900 \times 10^{-10}$
1	300 μL	62.5 μL	$8.701 \times 10^{-10} / 9.030 \times 10^{-10}$
5		80 μL	$9.141 \times 10^{-10} / 9.204 \times 10^{-10}$
2	300 μL	80 μL	$8.948 \times 10^{-10} / 9.021 \times 10^{-10}$
6	-	320 μL	$9.004 \times 10^{-10} / 8.997 \times 10^{-10}$
3	300 μL	320 μL	$8.851 \times 10^{-10} / 8.833 \times 10^{-10}$

2D實驗、NOESY以及ROESY：2D實驗於5-FU 無法進行，因為只有一種共振於其光譜中係可見者。

於透明質存在下的MTX以及5-FU之NMR分析使用滴定實驗、氘交換實驗以及用於5-FU、擴散實驗已經顯示在化學療法藥物與透明質之間沒有任何的交互作用。此等結果暗示化學療法的藥物藉由透明質網絡之夾帶足以增加藥物輸送至病理的位置的數量。此等結果完全與先前使用凝膠過濾色層分析法、平衡透析一致，並且透明質與MTX及5FU之間的分子交互作用之CD光譜也沒有檢測到一交互作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (84)

參考文獻

Adams JD, Flora KP, Goldspiel BR, Wilson JW, Finley R, Arbuck SG and Finley R, 1993. *J. Natl. Cancer. Inst. Monographs* 15:23-27.

Akima, K., Ho, H., Iwata, Y., Matsuo, K., Watari, N., Yanagi, M., Hagi, H., Oshima, K., Yagita, A., Atomi, Y & Tatekawa, I. (1996) Evaluation of antitumour activities of hyaluronate binding antitumour drugs: Synthesis, characterization and anti-tumour activity. *Jap. J. Drug Targeting* 4, 1-8.

Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P and Zoller M, 1992. *Science* 257(5070):682-685.

Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A and Stamenkovic I, 1994. *J Exp Med* 180:53-66.

Bax, A. & Davis, D.G. (1985) MLEV-17 based two-dimensional homo-nuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 65, 355-360.

Bissery M, Guenard D and Lavelle F, 1991. *CancerRes* 51:4845-4852.-

Bisset D, Setanioans A, Cassidy J, Graham MA and Kerr DJ, 1993. *Cancer Res* 53:523-527.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (85)

Bonadonna G (1976) N Engl J Med Med 294: p. 405.

Bonadonna G (1981) N Engl J Med Med 304: p. 10.

Bonadonna G (1988) Handbook of Medical Oncology, 3rd edition. Chicago, Year Book Med Publ, p. 1075.

Cailleau, R. (1974) Breast cancer cell lines J Natl Cancer Inst 55 : pp 661-674

Carter D, 1990. *Interpretation of Breast Biopsies*, Second Edition Raven Press, New York.

Coradini, D., Pellizzaro, C., Miglierini, G., Daidone, M.G. and Perbellini, A. (1999) Hyaluronic Acid As Drug Delivery For Sodium Butyrate: Improvement Of The Anti-Proliferative Activity On A Breast-Cancer Cell Line. *Int. J. Cancer*. 81:pp.411-416

Culty M, Nguyen HA and Underhill CB, 1992. *J Cell Biol* 116(4):1055-1062.

Culty, M., Shizari, M., Erik, W., Thompson. and Underhill, C.B. (1994) Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: Correlation with invasive potential. *Journal of Cellular Physiology* 160: pp 275-286

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (86)

Dye D and Watkins J, 1980. *Br. Med. J*
280:1353. Endicott JA et al, 1989. *Annual Reviews*
in Biochemistry 58: 127-171.

Eriksson, S., Fraser, JRE., Laurent, TC., Perioft,
H. and Smedsrod, B. (1983) Endothelia cells are a
site of uptake and degradation of hyaluronic acid in
the liver. *Exp Cell Res.* 144: pp. 223-228

Fraser, JRE., Appelgren, LE. and Laurent, TC.
(1983) Tissue uptake of circulating hyaluronic acid.
A whole body autoradiographic study. *Cell Tissue*
Res 233(2): pp285-293

Fraser, JRE., Kimpton, WG., Laurent, TC., Cahill,
RNP. and Vakais, N. (1988) Uptake and degradation
of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem. J.* 256:
pp. 153-158

Friedrichs G, Folker HJ, A-rlt PA and Gunthert U,
1995. *The Lancet* 345:1237-1238.

Günthert U, 1993. *Curr Topics Microbiol*
immunol 184:47-63.

Gustafson S, Björkman T, Forsberg N, Lind T,
Wikström T and Lidholt K, (1995a). Accessible
hyaluronan receptors identical to ICAM-1 in mouse
mast tumour cells. *Glycoconjugate J.* 12, 350-355.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (87)

Gustafon, S., Björkman, T., Forsberg, N., McCourt, P., Wikström, T., Lilja, K., Tinner, B., Fuxe, K., Westlin, J.-E., Lidholt, K. Lind, T., Westerberg, G., Bergström, M, Langström, B., de la Torre, M., Bergh, J., Hagberg, H., Glimelius, B., Lindahl, U., & Laurent, T.C. (1995b) studies on receptors for hyaluronan and the turnover of radioactively-labelled hyaluronan in mice and rats. Royal Soc. Med. Round Table Series no36, 5-7.

Hall, CL., Yang, B., Yang, X., Zhang, S., Turley, M., Samuel, S., Lange, LA., Wang, C., Curpen, GD., Savani, RC., Greenberg, AH., Turley, EA. (1995). Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell* 82: pp 19-28

Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA, 1992. *J Cell Biol* 117(6)-.pp1343-1350.

Harris, JR., Lippman, ME., Veronesi, U. and Willett, W. (1992) Medical Progress in Breast cancer . *The New England Journal of Medicine*. 327: pp. 473-480

Hudecz, F., Clegg, JA., Kajtar, J., Embleton, MJ., Pimm, MV., Szekerke, M. and Baldwin, RW. (1993) Influence of carrier on biodistribution and in vitro cytotoxicity of methotrexate-branched polypeptide conjugates. *Bioconjugate Chem* 4: pp 25-33

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (88)

Inaba, M., Kobayashi, T., Tashiro, T. and Sakurai, Y. (1988). Pharmacokinetic approach to rational therapeutic doses for human tumour-bearing nude mice. *Jpn J Cancer Res* 79(4): pp509-516

Klein E.S., He, W., Shmizu, S., Ascula, S., & Falk, R.E. (1994). Hyaluronic-acid enhances tritiated fluorouracil uptake in experimental cancer. Royal Soc Med Round Table series no 33: 11-15.

Kumar, A., Ernst, R.R. & Wuthrich, K. (1980) Studies of J-Comectivities and selective ^1H - ^1H Overhauser effect in H_2O solutions of macromolecules by twodimensional NMR experiments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 (3), 1156-1163.

Lamszus, K., Jin, L., Fuchs, A., Shi, E., Chowdhury, S., Yao, Y., Polverni, P.J., Laterra, J., Goldberg, ID. and Rosen, EM. (1997) Scatter factor stimulates tumour growth and tumour angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Lab Inv* 76(3) : pp 339-353

Laurent, T.C, 1970. In: *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*. (Editor: Balazs, E.A.) Academic Press, New York. 2: pp. 703-732.

Laurent, TC., Fraser, J.R.E., Pertoft, H. and Smedsrod, B. (1986) Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells. *Biochem J.* 234: pp.653-658

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (89)

Lorenz W, Riemann HJ, Schmal A, Schult H, Lang S, Ohman C, Weber D, Kapp B, Luben L and Doenicke A, 1977. *Agents Actions*, 7:63-67.

Marion, D. & Wuthrich, K. (1983). Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 967-974.

Martindale, W. (1993) The extra phamacopoeia 30th Ed (editor: Reynolds, JEF and Parfitt, K. Pharmaceutical Press, London

Mathew AE, Mejillano MR, Nath JP, Himes RH and Stella VJ, 1992. *J. Med. Chem* 35:145-151.

McCourt, PAG., EK, B., Forsberg, N. and Gustafson, S. (1994) Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem.* 269:pp.30081-30084

McEvoy, 1988. *American Hospital Formulary Service-Drug Information 88*. Bethesda, MD, American Society of Hospital Pharmacists, Inc. 2222.

Mikelsaar, RH. and Scott, JE. (1994) Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (90)

NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconjugate J* 11: pp 65-71

MIMS Medical Network (1996)
<http://www.medical.netau/mims-get5-FU/711>

Nelson, JA. and Falk, RE. (1994) Anticancer research . *Int J Cancer Res Treat*

Nikaido N, 1993. *Science* 264:382-388.

Ogawa Y, Hirakawa K, Nakata B, Fujihara T, Sawada T, Kato Y, Yoshikawa K and Sowa M, 1998. *Clin Cancer Res* 4(1):31-36.

Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661-665.

Piper, AA. and Fox, M. (1982) Biochemical basis for the differential sensitivity of human T- and B-Lymphocyte lines to 5-fluorouracil. *Cancer Research* 42 : pp 3753-3760

Rownisky EK, Cazenave LA and Donehower RC, 1990. *J. Natl. Cancer. Inst* 82:1247-1259.

Schabel, FM. (1975) Concepts for systemic treatment of micrometastases. *Cancer* 35: pp. 15-24

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (91)

Scott, JE., Heatley, F. and Hull, WE. (1989)
Secondary structure of hyaluronate in solution. A
H-nmr investigation at 300 and 500 MHz in
(2H6)dimethyl sulphoxide solution. *Biochem J.* 220:
pp 197-205

Shackney, SE., McCormack, GW. and Cuchural,
GJ. (1978) Growth rate patterns of solid tumours and
their relation to responsiveness to therapy: An
analytical review. *Annals of Internal Medicine.* 89:
pp 107-121

Shibamoto, Y., Murata, R., Miyauchi, S.,
Hirohashi, M., Takagi, T., Sasai, K., Shibata, T.,
Oya, N. and Takahashi M. (1996) Combined effect of
clinically relevant doses of emitefur, a new 5-
fluorouracil derivative, and radiation in 鼠性的
tumours. *Brit. J. Cancer.* 74: pp 1709-1713

Singh, M., Ghose, T., Kralovec, J., Blair, AH. and
Belitsky, P. (1991) Inhibition of human renal cancer
by monoclonal-anti-body-linked methotrexate in an
ascites tumor model. *Cancer Immunol*
Immunotherapy 32 (50): pp 331-334

Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M and Seed B,
1991. *EMBO J* 10:343-348.

Underhill, CB., Nguyen, HA., Shizari, M. and
Culty, M. (1993) CD44 positive macrophages take up

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (92)

hyaluronan during lung development. *Developmental Biology* 155 (2) : pp 324-336

Vyas DM, Wong H, Crosswell AR, Casazza AM, Knipe JO and Mamber SW, 1993. *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* 3:1357-1360.

Wang C, Thor AD, Moore DH, Zhao Y, Kerschmann R, Stern R, Watson PH and Turley EA, 1998. *Clin Cancer Res* 4 (3) :567-76.

Wang, C., Zhang, S. and Turley, EA. (1996) The role of hyaluronan and hyaluronan receptors in breast cancer cell invasion, motility and proliferation. In: Fourth International Workshop on Hyaluronan in Drug Delivery. (Editor: Willoughby, D.A) Roy. Soc. Med. Press. pp 37-53 Wani MC, Taylor HL and Wall ME, 1971. *J. Am. Chem. Soc* 93:2325-2327.

Waugh W, Trissel L and Stella VJ, 1991. *Am. J. Hosp. Pharm* 48: 1520-1524.

Weiss RB, Donehomer RC, Weirnik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Leyland-Jones B, 1990. *Br. J. Clin. Oncol* 8:1263-1268.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：

用以增強藥物之有效性的組成物與方法)

本發明係關於增強藥物的有效性，更詳言之，係關於克服細胞或器官對藥物的抗性。

詳言之，本發明提供一種方法用以增強細胞毒性或抗贅生藥劑的有效性，其包含有該藥物與透明質共投藥的步驟，其中與透明質共投藥步驟增強了該藥劑的癌細胞殺滅潛能。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

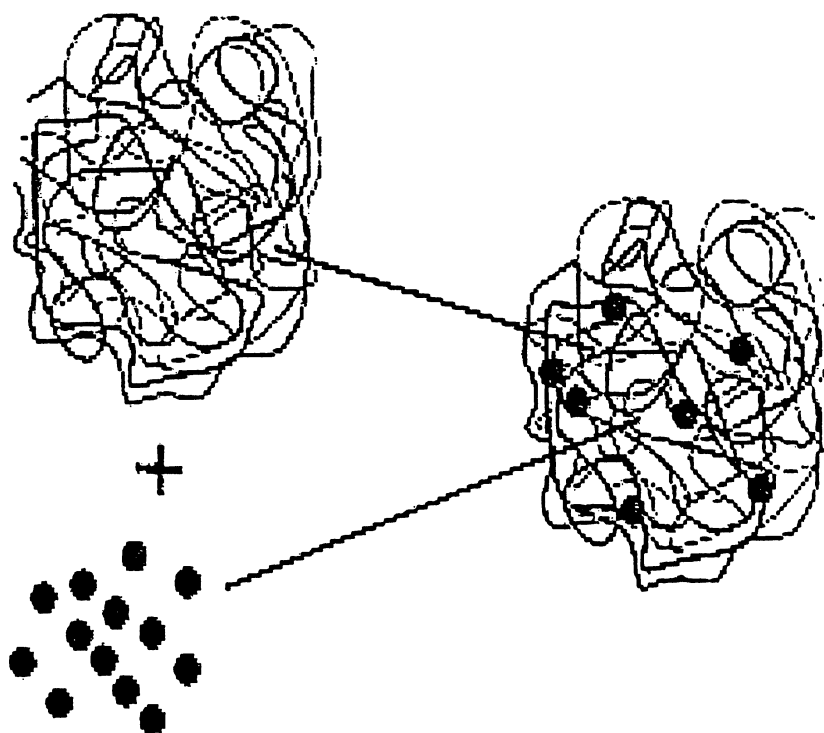
訂

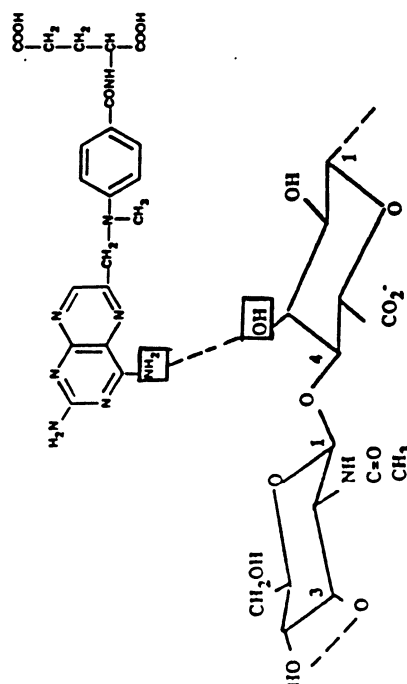
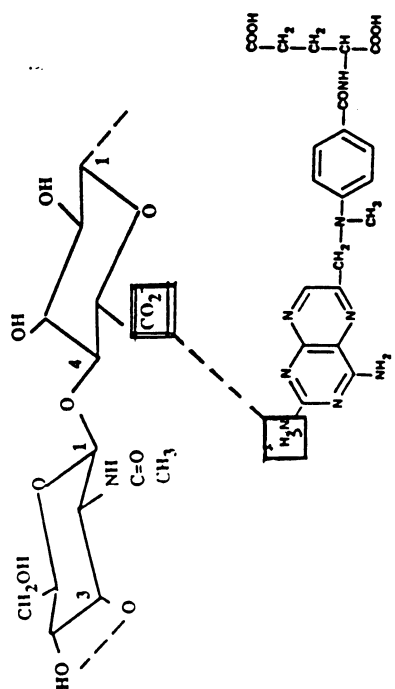
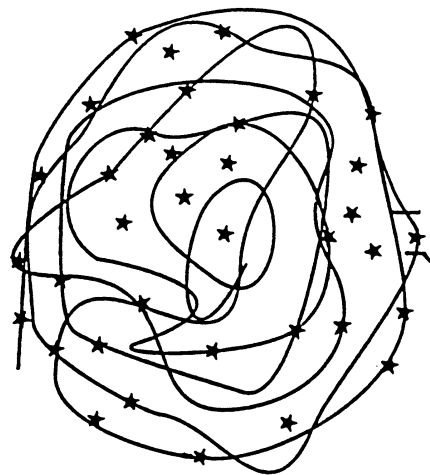
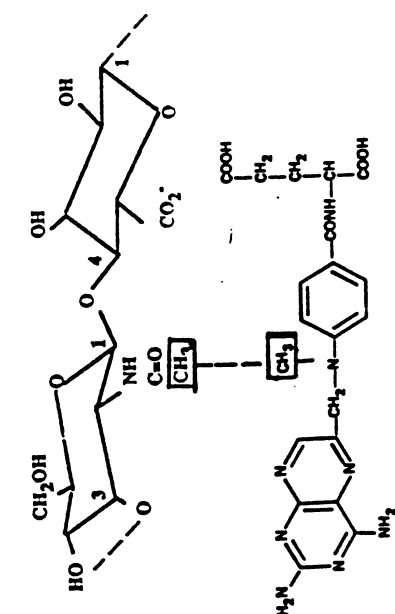
英文發明摘要(發明之名稱：

A COMPOSITION AND METHOD FOR THE
ENHANCEMENT OF THE EFFICACY OF DRUGS)

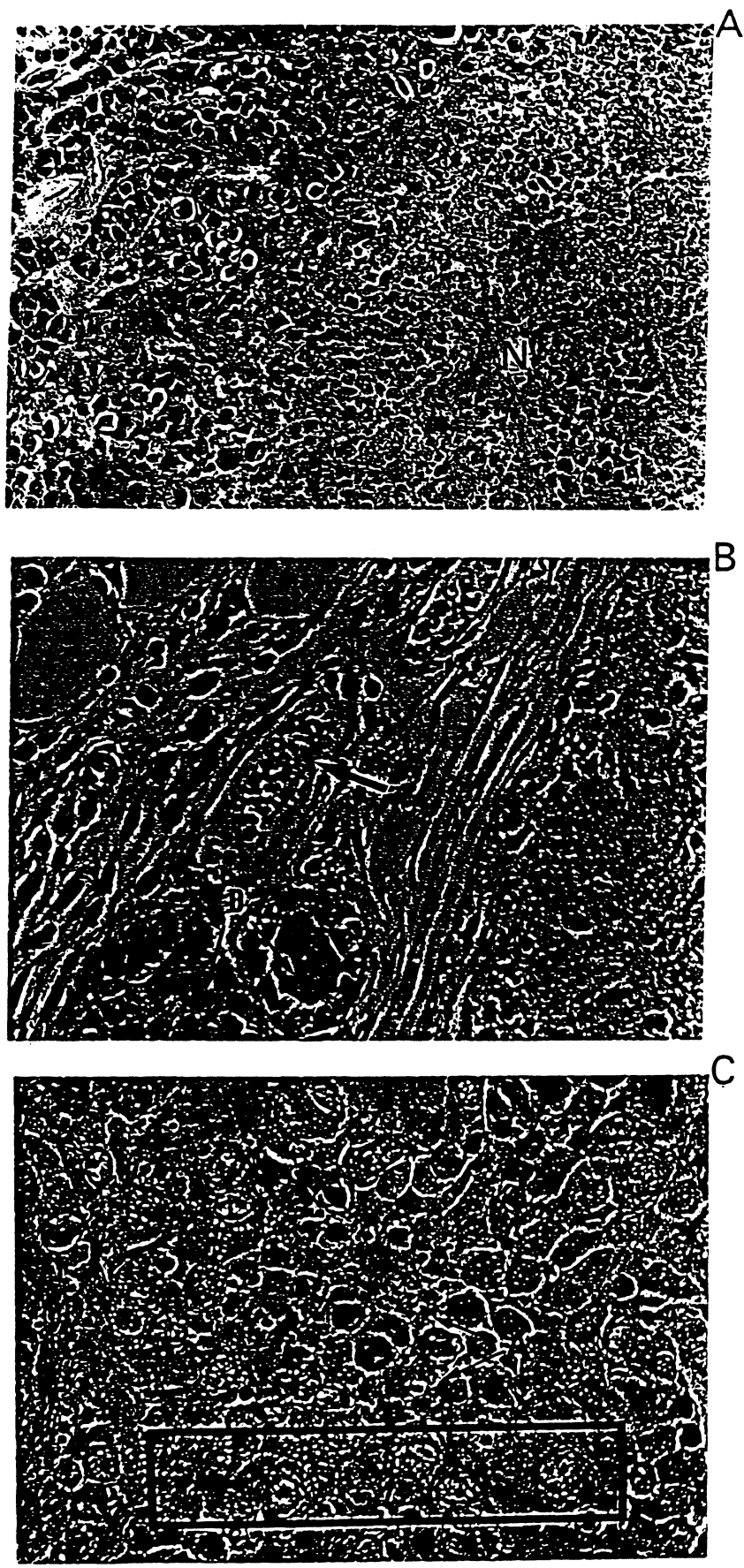
The present invention relates to enhancement of the efficacy of drugs, and more particularly, with overcoming the resistance of cells or organisms to drugs.

In particular, the present invention provide a method for enhancing the effectiveness of a cytotoxic or anti-neoplastic agent, comprising the step of co-administering said agent with hyaluronan wherein co-administration with hyaluronan enhances the agents' cancer cell-killing potential.

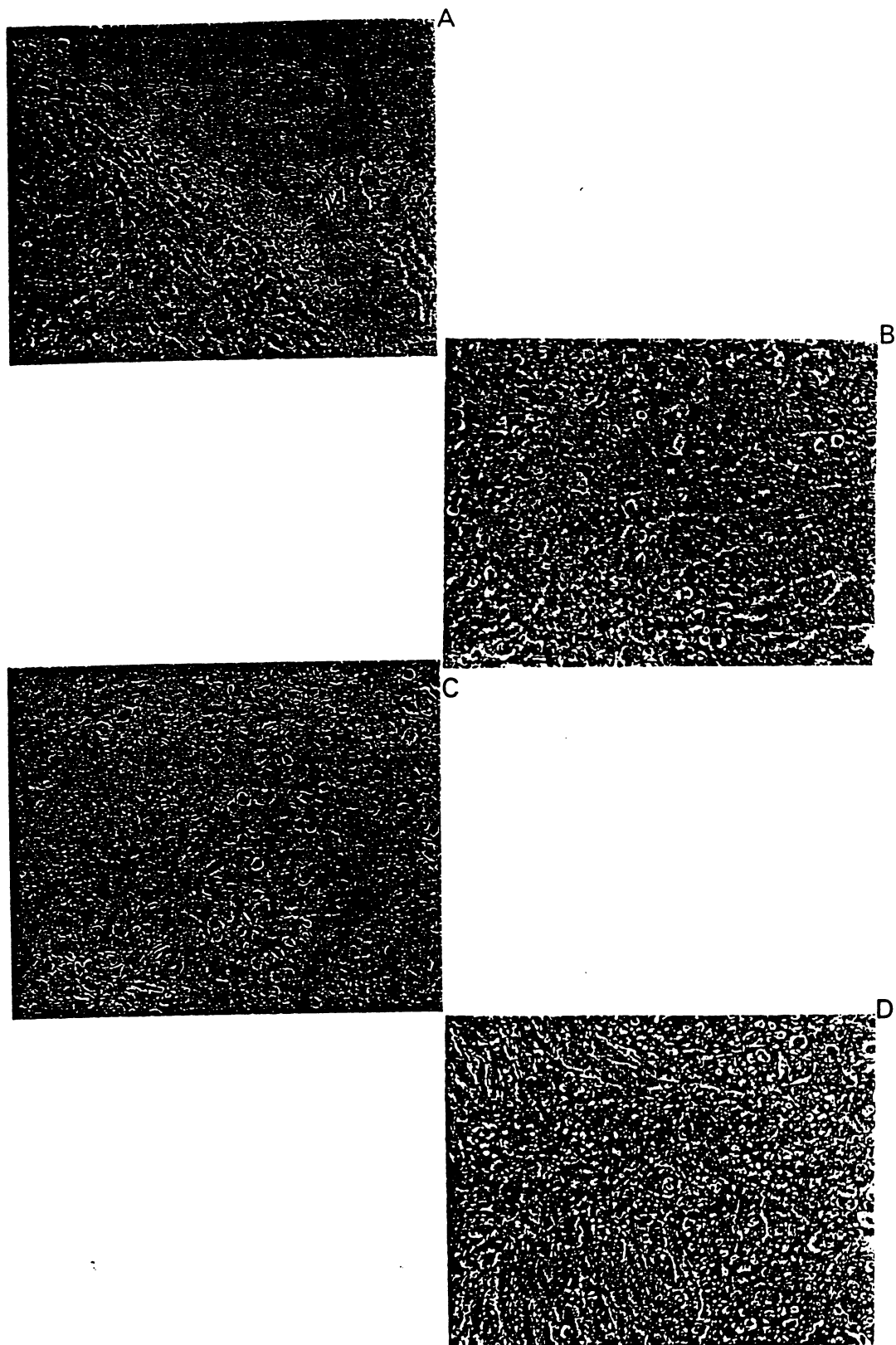




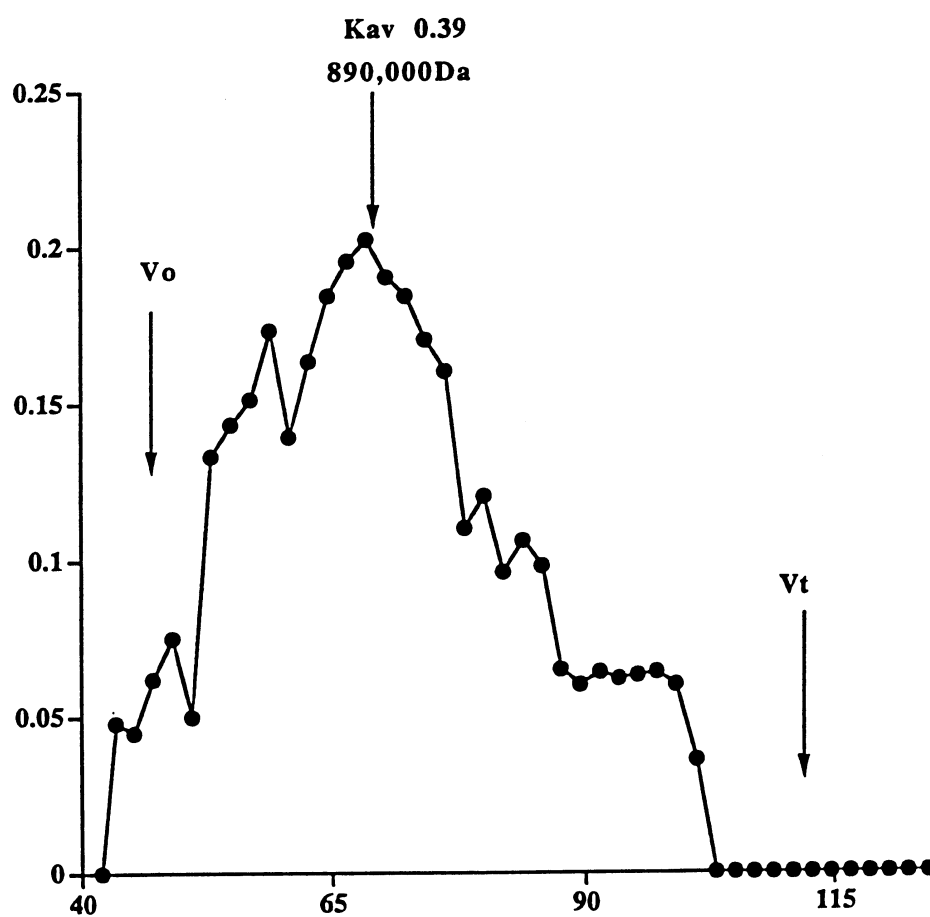




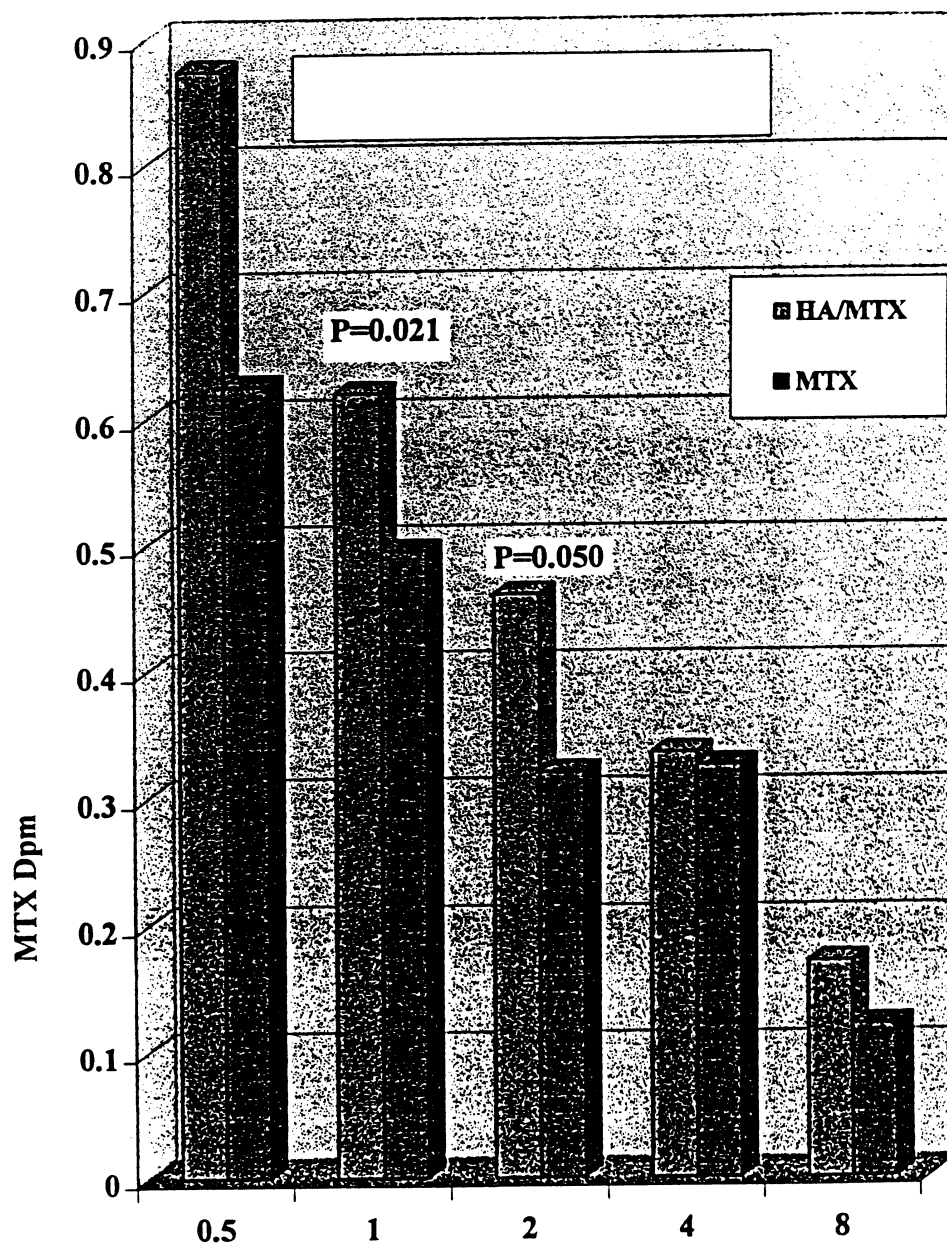
第 4 圖



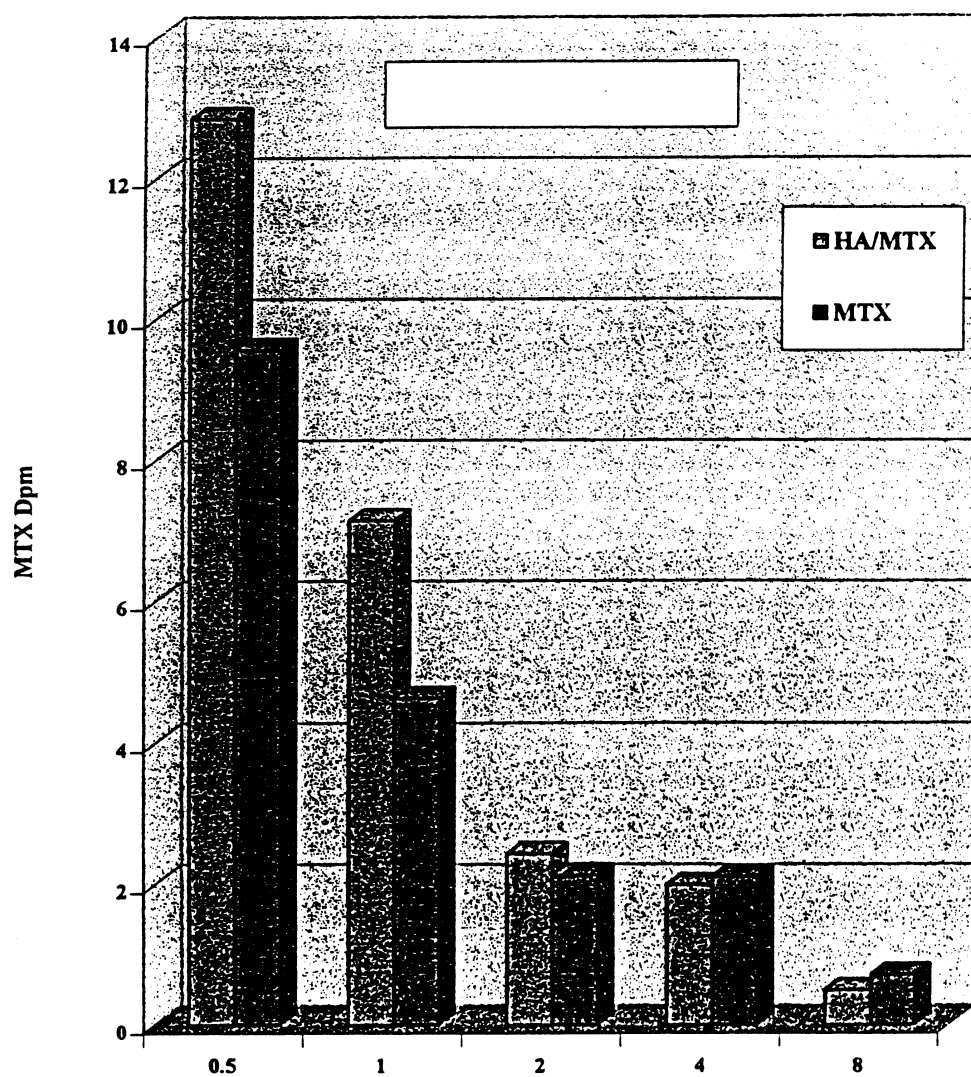
第 5 圖



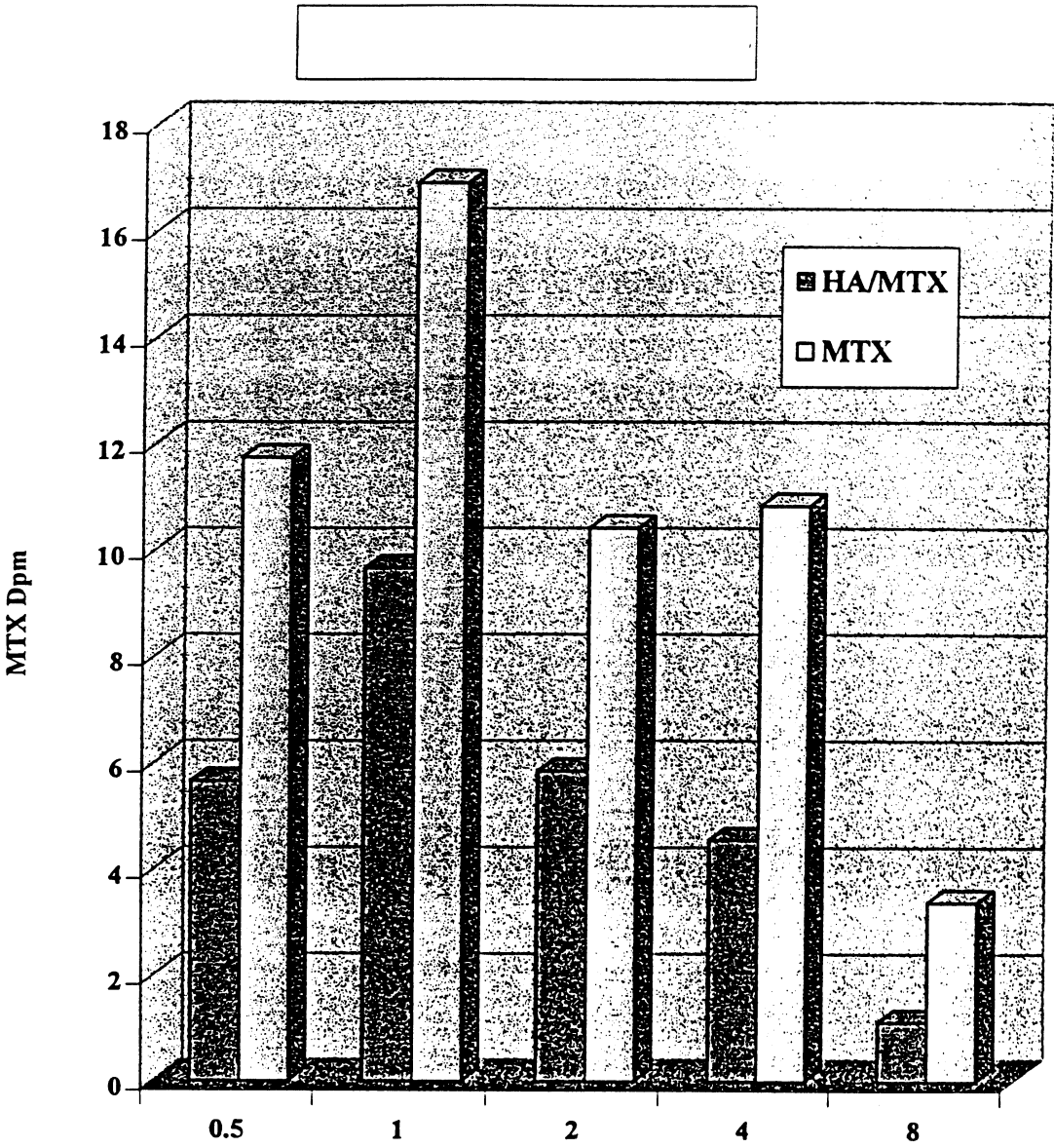
第 6 圖



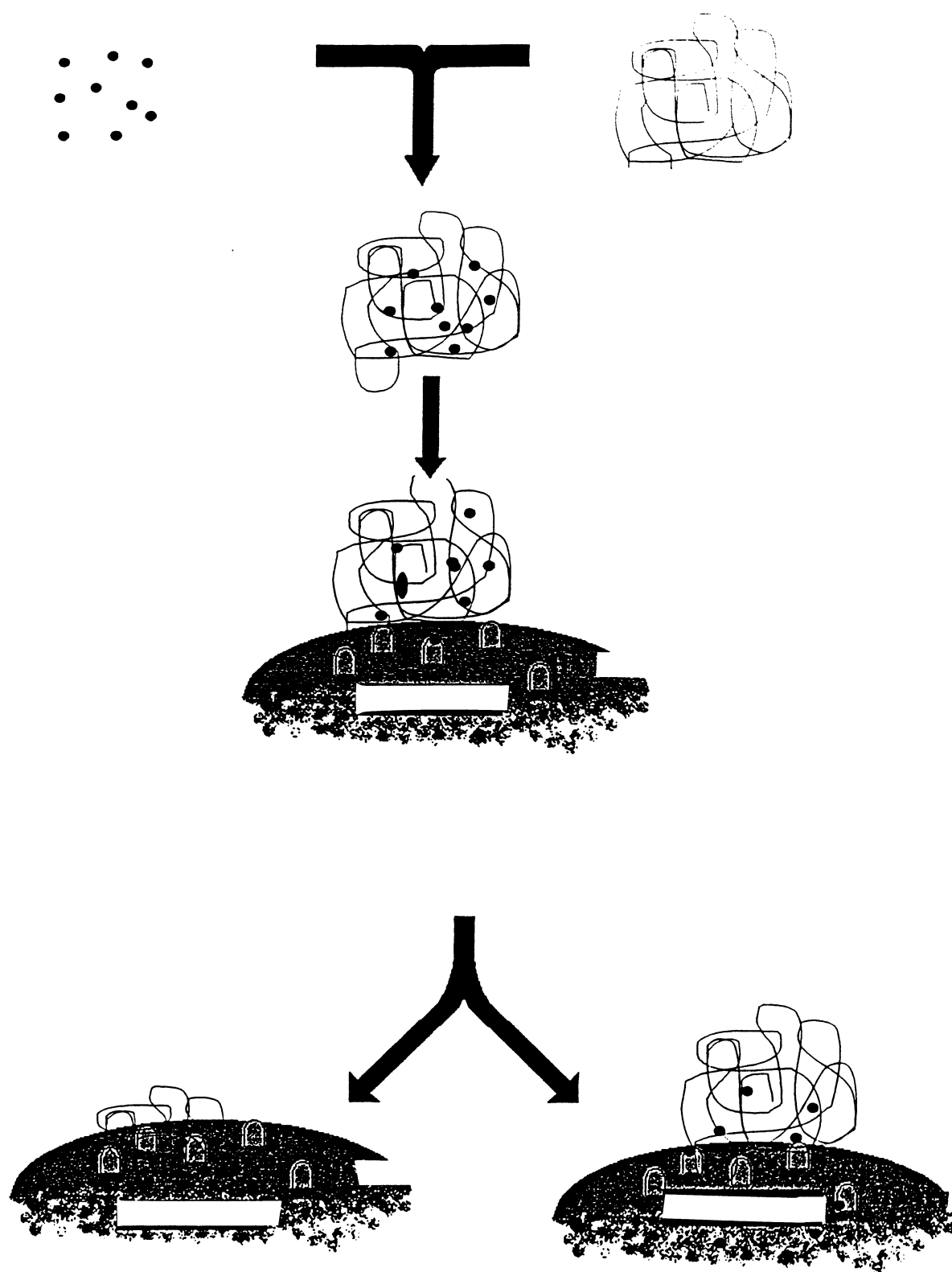
第 7 圖

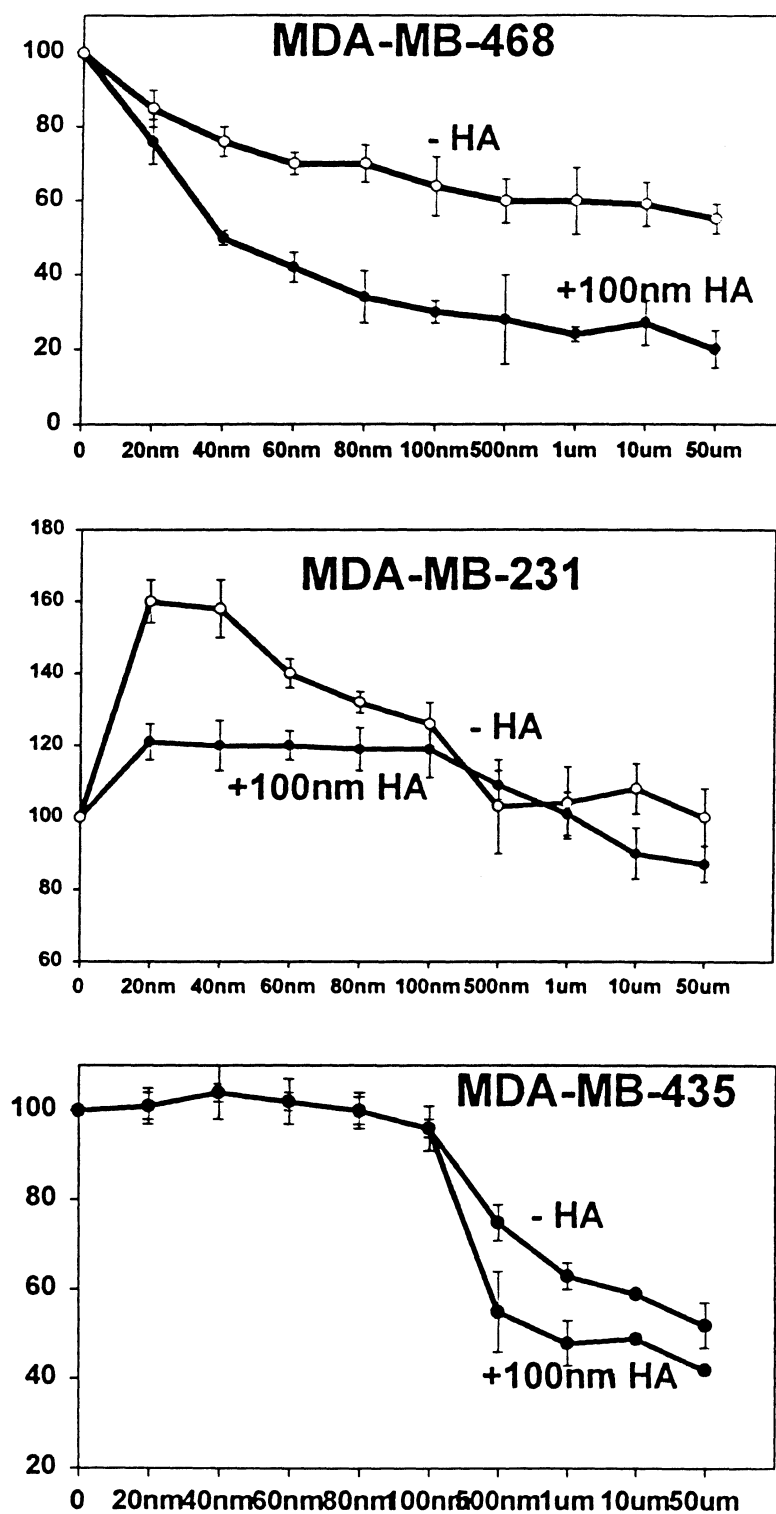


第 8 圖

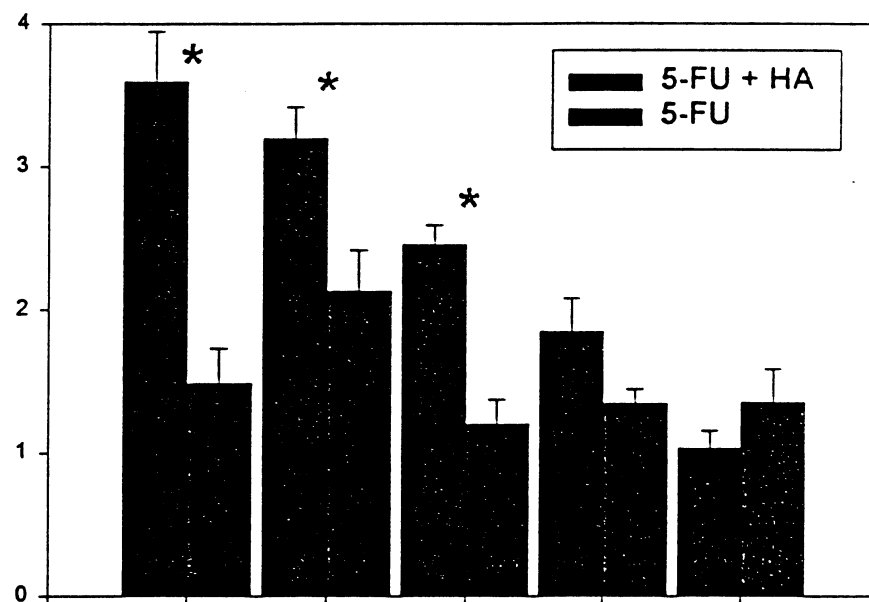


第 9 圖

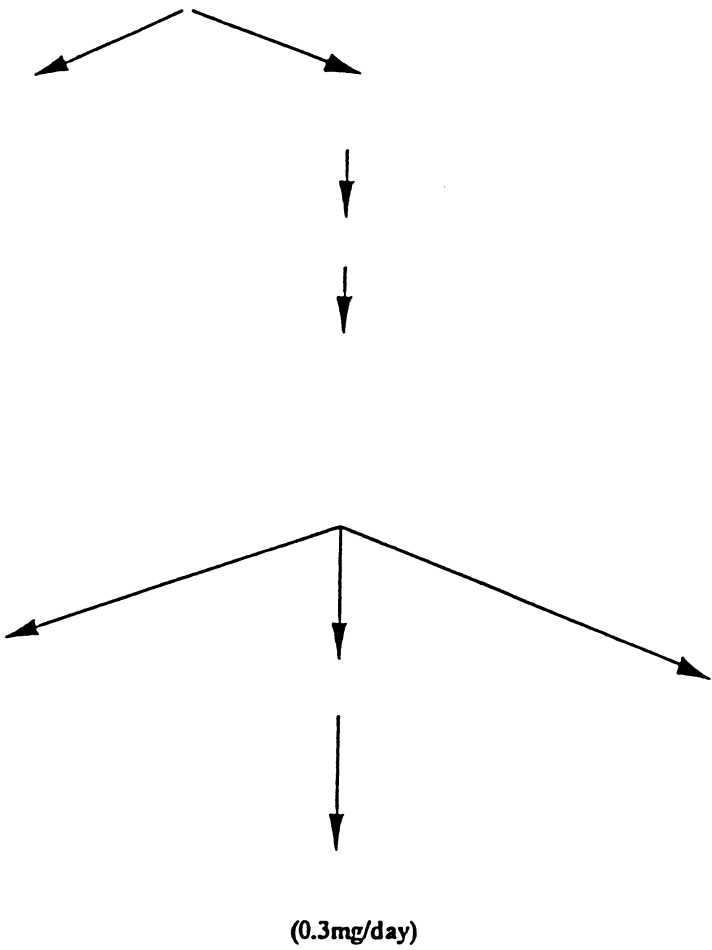




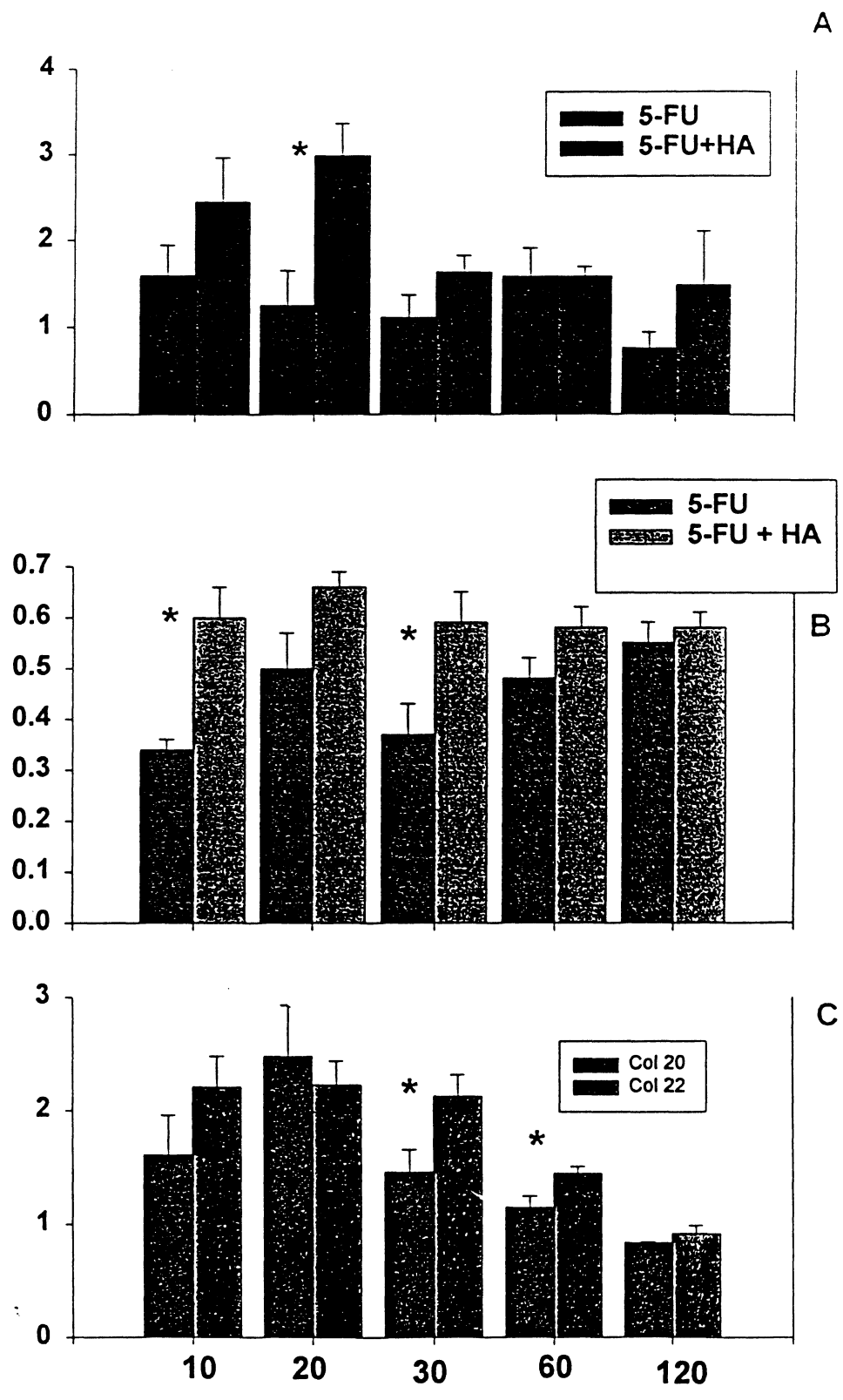
第 11 圖



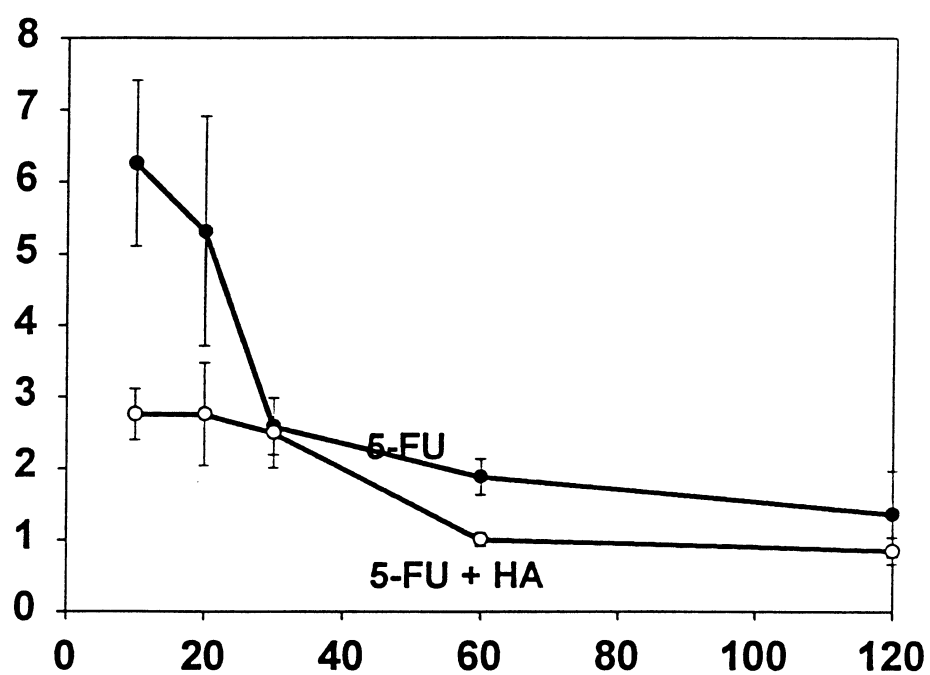
* $P = \text{or} < 0.001$, Students t-test



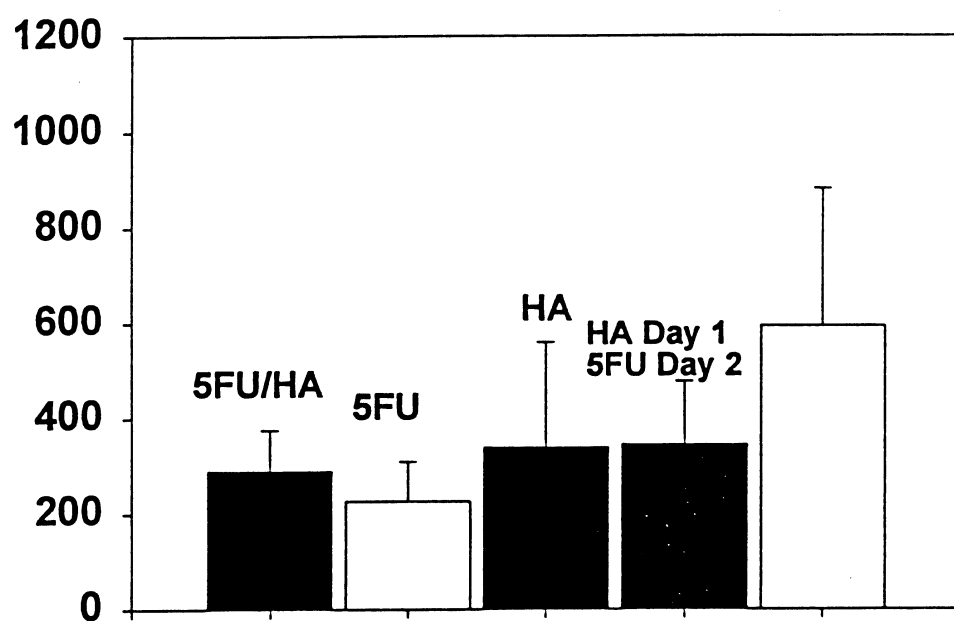
第 13 圖

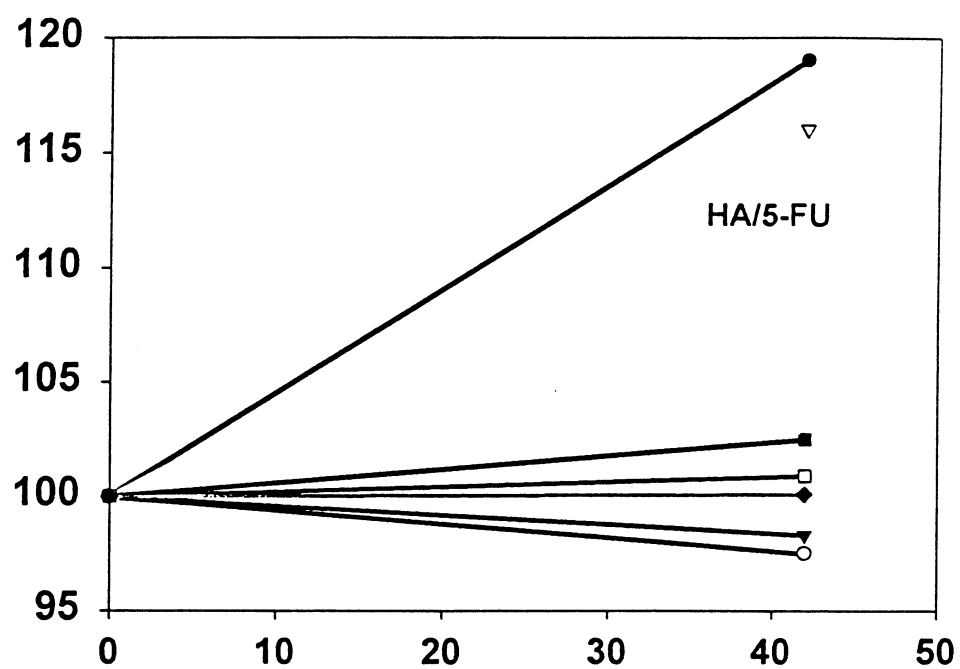


第 14 圖

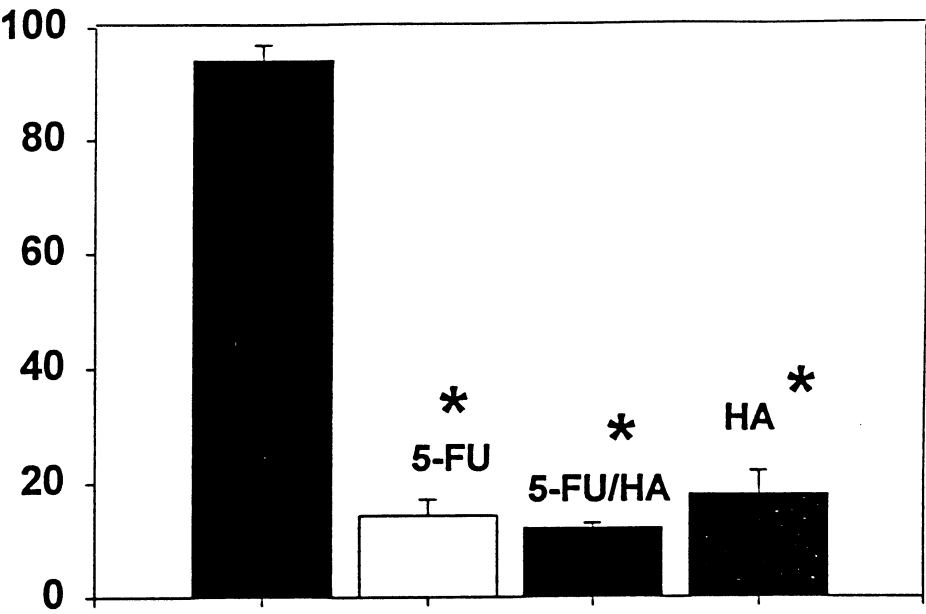




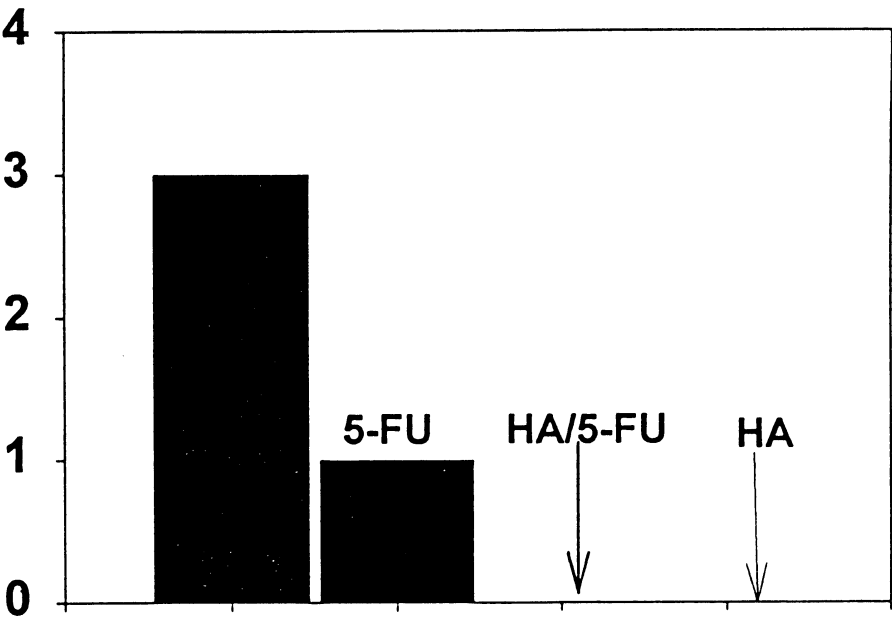




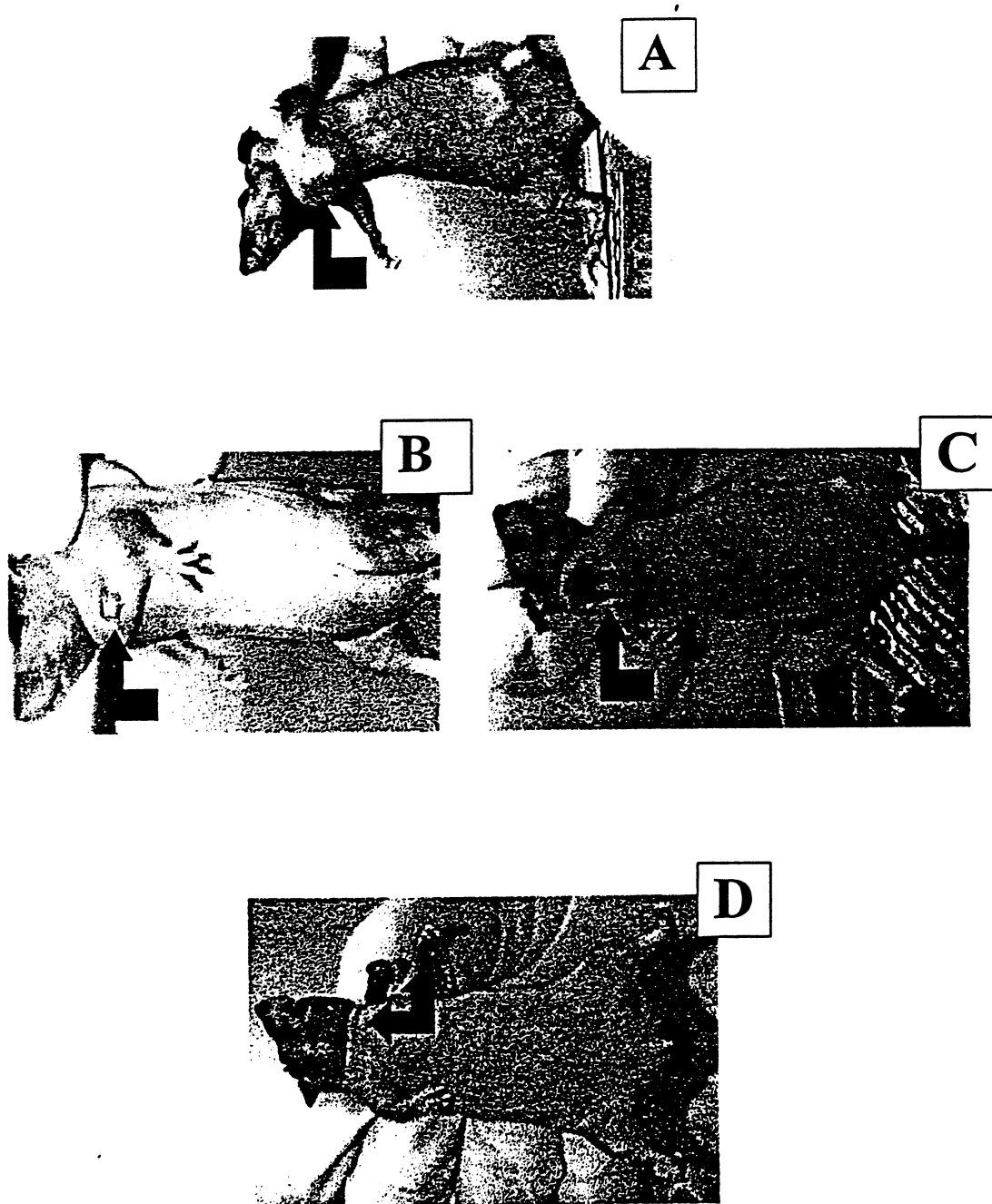
A

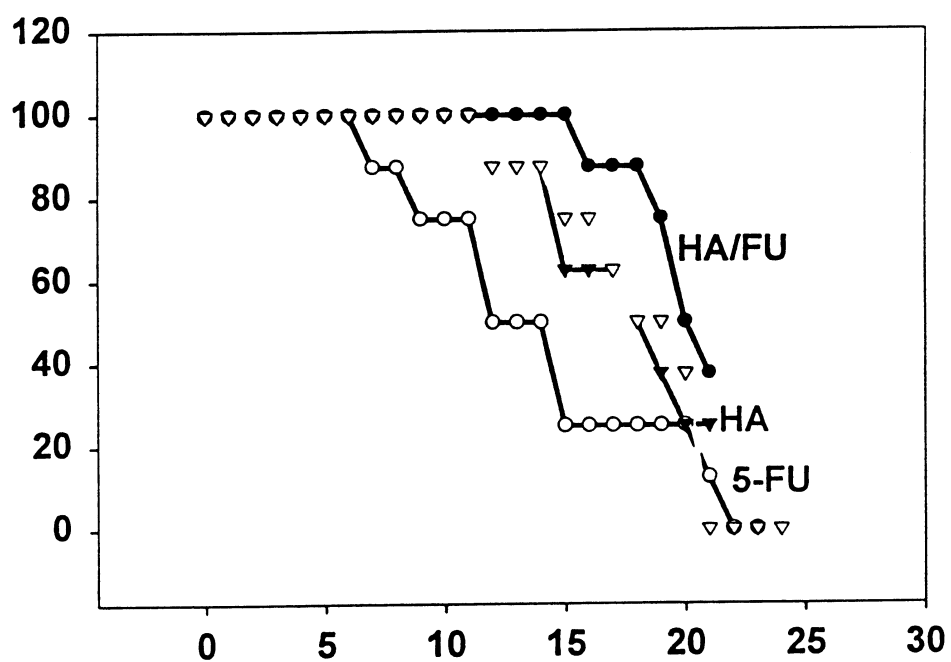


B

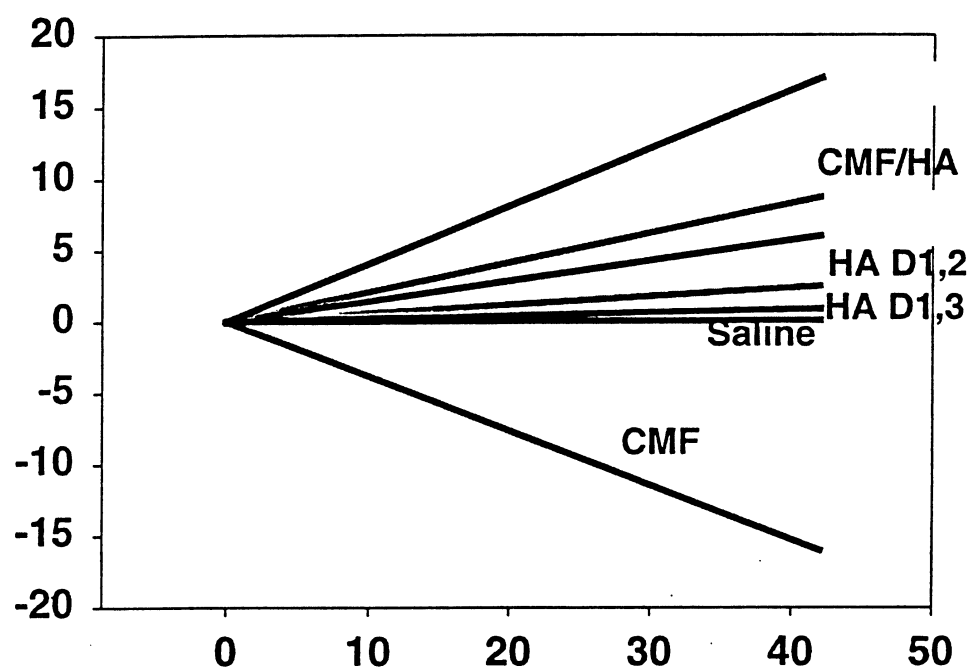


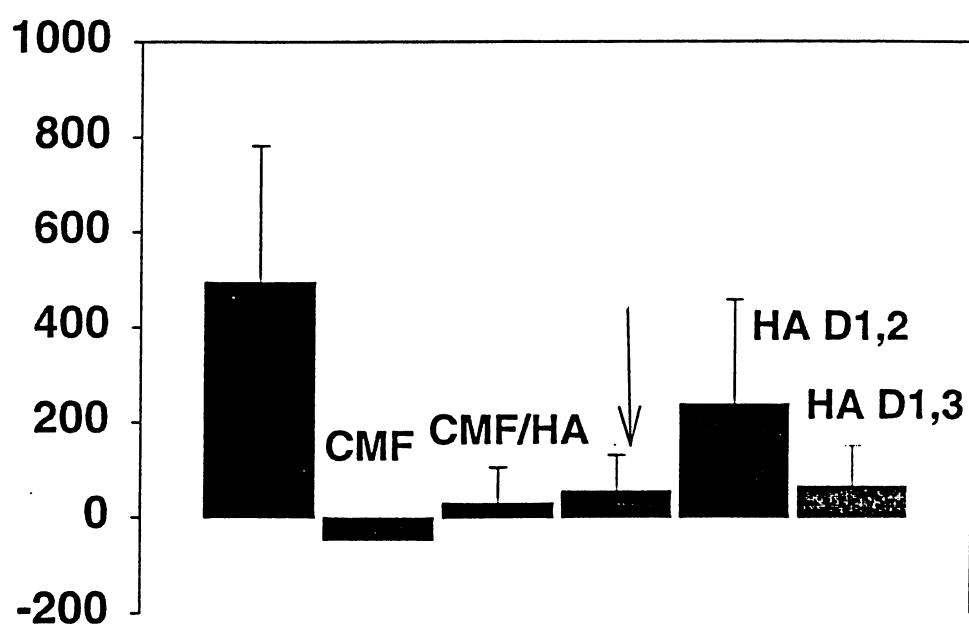
第 19 圖



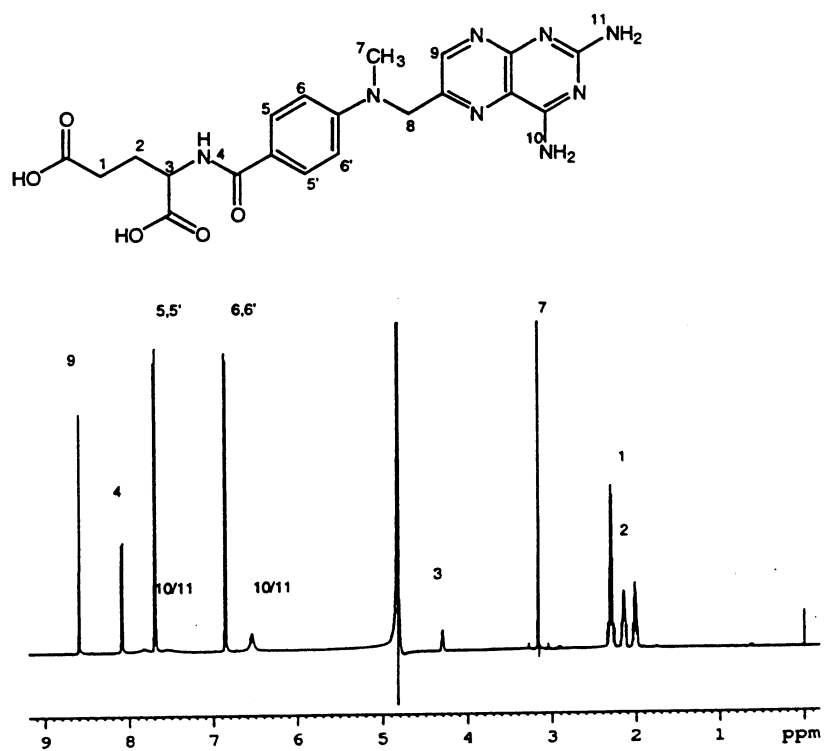


第 21 圖

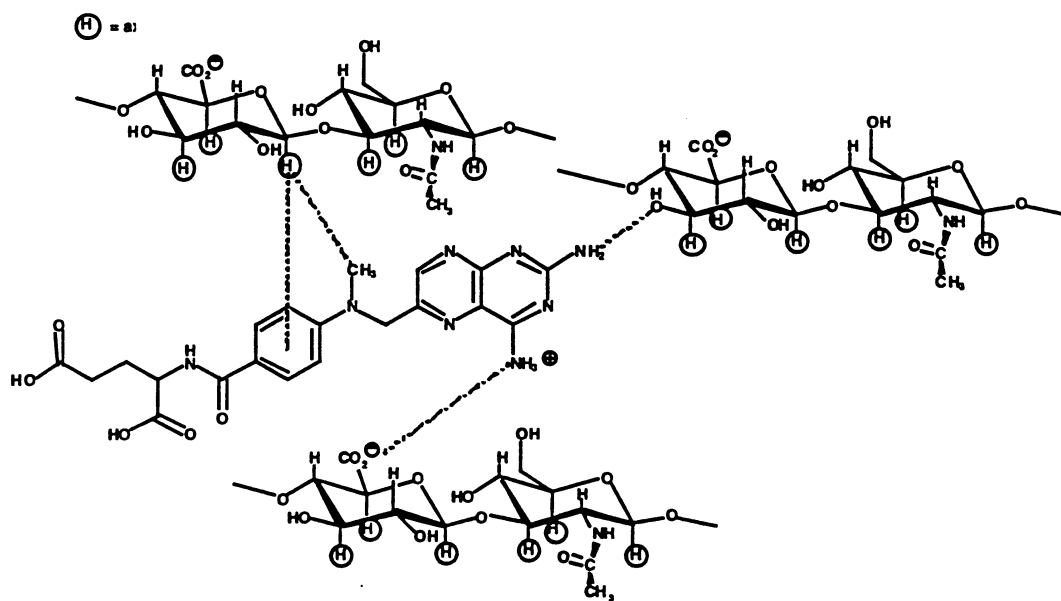




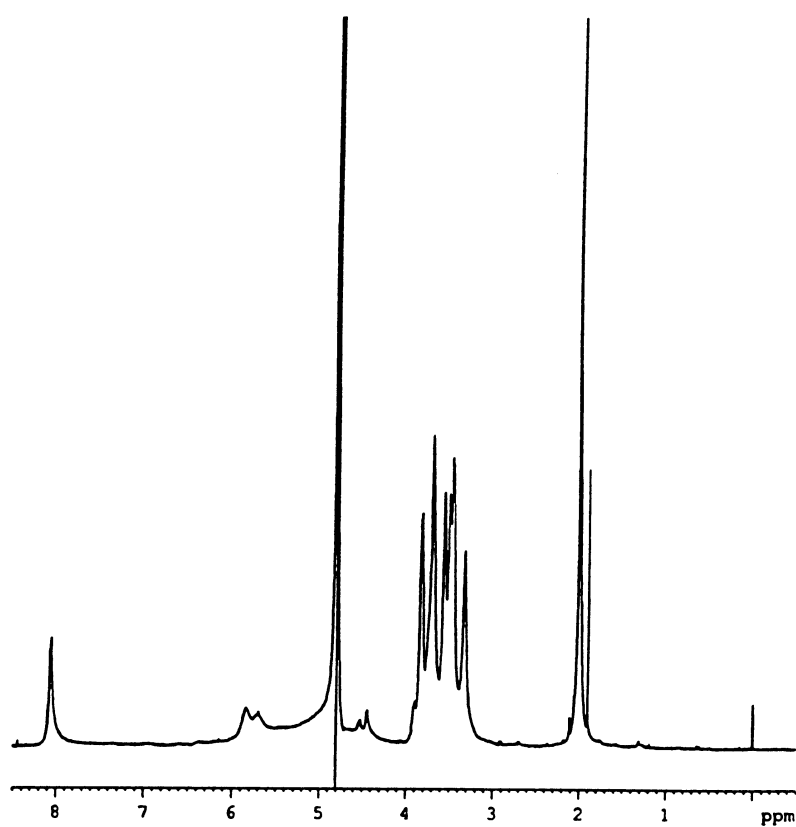
I284042



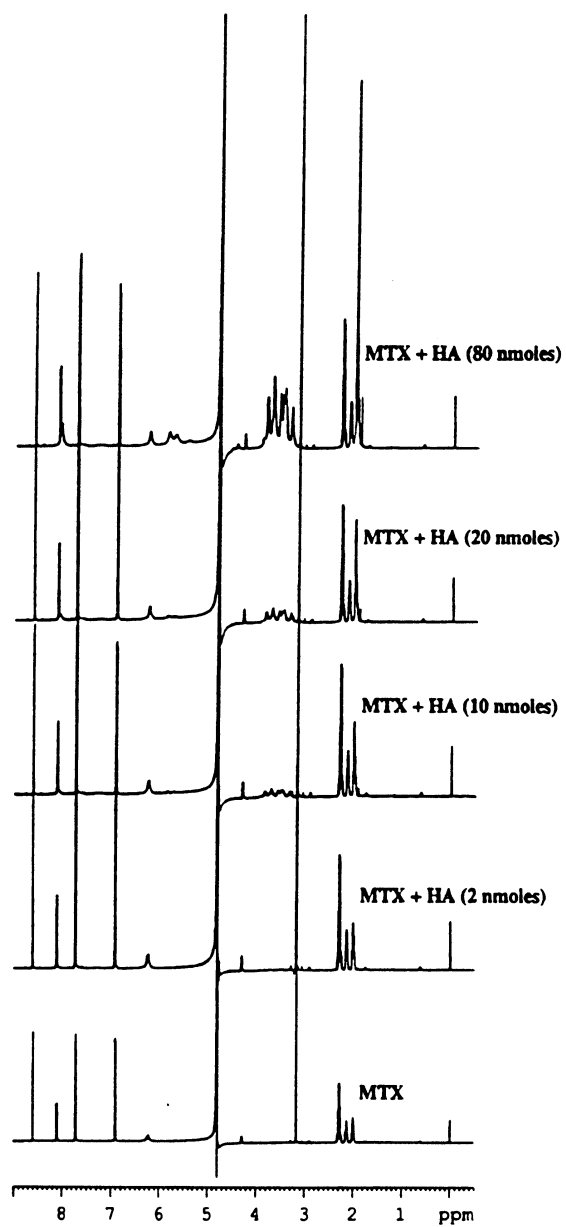
第 24 圖

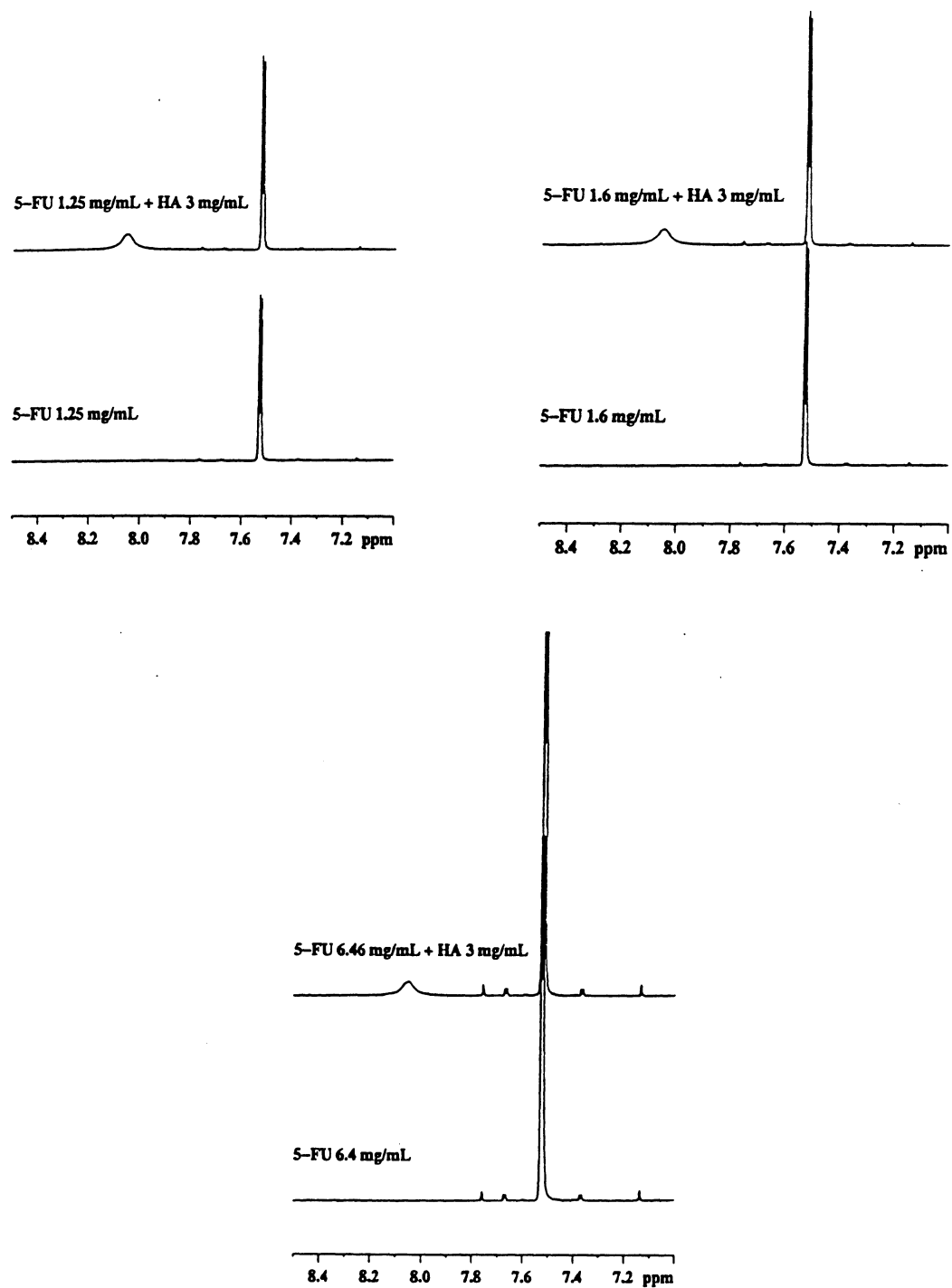


I284042



第 26 圖





六、申請專利範圍

第 089100433 號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：95年8月

1. 一種針對透明質(hyaluronan)與一細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一選自於癌症、腫瘤與贅瘤之疾病，其中該藥劑的癌細胞殺滅潛力會由於該透明質與該藥劑的組合使用而被增強。
2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該藥劑係擇自於下列所構成之群組：氮甲嘌呤、佩里塔克爾[paclitaxel(紅豆杉醇)]、5-氟尿嘧啶、環磷醯胺，以及此等之組合。
3. 一種細胞毒性或抗贅生藥學組成物，其包含透明質(hyaluronan)以及一細胞毒性或抗贅生藥劑，其中該組成物係供用於全身性投藥。
4. 如申請專利範圍第1項之針對透明質(hyaluronan)與一細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一選自於癌症、腫瘤與贅瘤之疾病，其中該癌症、腫瘤與贅瘤之疾病係具藥物抗性。
5. 如申請專利範圍第1項之針對透明質(hyaluronan)與一細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一選自於癌症、腫瘤與贅瘤之疾病，其中該透明質(hyaluronan)係可夾帶及/或結合一抗贅生或細胞毒性藥劑。

六、申請專利範圍

6. 如申請專利範圍第5項之用途，其中該癌症、腫瘤與贅瘤之疾病係具藥物抗性。
7. 如申請專利範圍第6項之針對透明質(hyaluronan)與一細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一選自於癌症、腫瘤與贅瘤之疾病，其中該透明質(hyaluronan)係可結合至在該癌症、腫瘤與贅瘤細胞上的受體。
8. 如申請專利範圍第4項之針對透明質(hyaluronan)與一細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一具藥物抗性之癌症、腫瘤與贅瘤疾病，其中該透明質(hyaluronan)增強該藥劑之有效性，藉由提供該藥劑於一個體體內之一更長的曝露期間，相較於單獨使用該藥劑。
9. 如申請專利範圍第4項之針對透明質(hyaluronan)與一細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一具藥物抗性之癌症、腫瘤與贅瘤疾病，其中該癌症、腫瘤與贅瘤在單獨使用該細胞毒性或抗贅生藥劑時係對該組合中之細胞毒性或抗贅生藥劑具有抗性。
10. 如申請專利範圍第8項之用途，其中該癌症係對於擇自於由氮甲嘌呤、佩里塔克爾[paclitaxel(紅豆杉醇)]、5-氟尿嘧啶、環磷醯胺，以及此等之組合物所構成之群組的一種或多種藥劑具有抗性。
11. 如申請專利範圍第4項之針對透明質(hyaluronan)與一

六、申請專利範圍

細胞毒性或抗贅生藥劑的組合用於製造一藥物之用途，該藥物係供用於治療一具藥物抗性之癌症、腫瘤與贅瘤疾病，其中相較於單獨投與該藥劑，該藥物降低被投與至一個體體內之該藥劑所引起的腸胃道毒性。