

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/498

A61K 47/44 A61P 35/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02815710.9

[43] 公开日 2004 年 12 月 1 日

[11] 公开号 CN 1551771A

[22] 申请日 2002. 7. 16 [21] 申请号 02815710. 9
[30] 优先权
[32] 2001. 7. 17 [33] AU [31] PR6443
[86] 国际申请 PCT/AU2002/000954 2002. 7. 16
[87] 国际公布 WO2003/007957 英 2003. 1. 30
[85] 进入国家阶段日期 2004. 2. 10
[71] 申请人 单检索有限公司
地址 澳大利亚新南威尔士
[72] 发明人 D • L • 莫里斯
M • H • 波格霍拉米

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 李华英

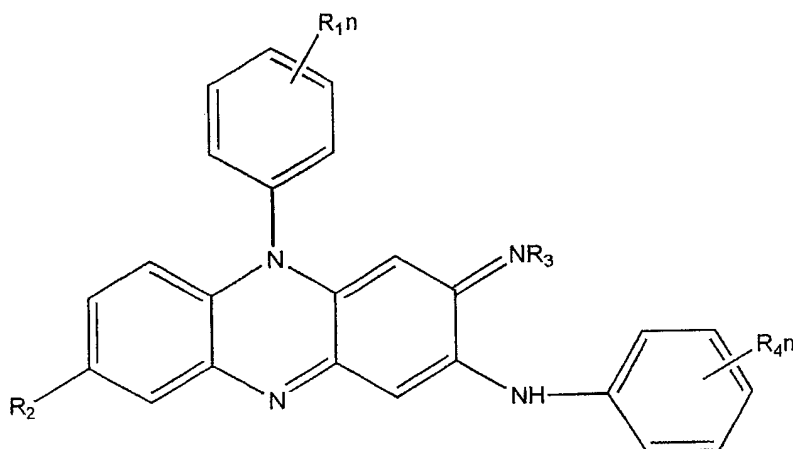
权利要求书 4 页 说明书 17 页 附图 8 页

[54] 发明名称 用于治疗癌症的方法和组合物
[57] 摘要

本发明提供了治疗肿瘤的方法。 所述方法包括将包含治疗有效量的氯苯吩嗪化合物的组合物局部递送到肿瘤位点。 本发明还提供了包含氯苯吩嗪化合物与脂质相联合的组合物。

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

1. 治疗个体中肿瘤的方法，所述方法包括将包含治疗有效量的式 I 化合物或其类似物或代谢物的组合物局部递送到肿瘤位点：



式 I

其中 R_1 和 R_4 选自氢原子、卤素原子、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、氟甲氧基和三氟甲基， R_2 选自氢和卤素原子， R_3 选自氢原子、 C_1 - C_4 烷基、 N,N -二烷基氨基烷基、 C_3 - C_{12} 环烷基、甲基环己基、羟基环己基、环烷基甲基、哌啶基、烷基取代的哌啶基和 N -苄基取代的哌啶基，且 n 是 1-3 并包括 1 和 3 的数字。

2. 权利要求 1 的方法，其中 R_1 取代位于 1-位，并优选为 Cl。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的方法，其中 $n=1$ ， R_1 是 Cl， R_2 是 H， R_3 是 $CH(CH_3)_2$ ，且 R_4 是 Cl。

4. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述氯苯吩嗪化合物是氯法齐明。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中所述肿瘤是肝细胞瘤或肝脏中的继发性癌症。

6. 权利要求 1 - 5 任一项的方法, 其所述局部递送是经由肝动脉进行的。

7. 权利要求 1 - 4 任一项的方法, 其中所述肿瘤选自结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌和其它器官中的继发性转移瘤。

8. 权利要求 1 - 7 任一项的方法, 其中所述组合物是作为连续输液经由泵通过主要动脉来给药的。

9. 权利要求 1 - 7 任一项的方法, 其中所述组合物是腹膜内给药的。

10. 权利要求 1 - 9 任一项的方法, 其中所述组合物还包含脂质。

11. 权利要求 10 的方法, 其中所述脂质是肿瘤对其高度摄取的脂质。

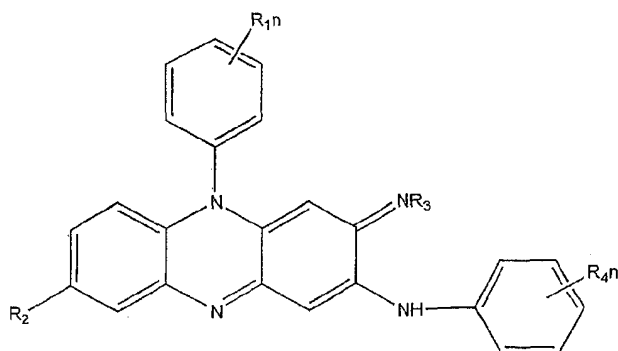
12. 权利要求 10 或权利要求 11 的方法, 其中所述脂质是油, 优选可通过外部手段例如 CT、MRI 或 PET 显示影像的油。

13. 权利要求 11 的方法, 其中所述油是碘化油。

14. 权利要求 11 的方法, 其中所述油是碘油。

15. 权利要求 10 的方法, 其中所述脂质选自大豆油、脂肪酸甘油单酯、中链甘油三酯、橄榄油、花生油、胡桃油、鳕鱼肝油、硝酰基脂肪酸、亚油酸乙酯、多碘化甘油三酯和多碘化三酰基甘油。

16. 用于治疗个体中肿瘤的药物组合物, 所述组合物包含脂质载体和浓度为至少 0.1 μM 的式 I 化合物或其类似物或代谢物:



式 I

其中 R_1 和 R_4 选自氢原子、卤素原子、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、氟甲氧基和三氟甲基， R_2 选自氢和卤素原子， R_3 选自氢原子、 C_1 - C_4 烷基、 N,N -二烷基氨基烷基、 C_3 - C_{12} 环烷基、甲基环己基、羟基环己基、环烷基甲基、哌啶基、烷基取代的哌啶基和 N -苄基取代的哌啶基，且 n 是 1-3 并包括 1 和 3 的数字。

17. 权利要求 16 的组合物，其中 R_1 取代位于 1-位，并优选为 Cl。

18. 权利要求 16 或 17 的组合物，其中 $n=1$ ， R_1 是 Cl， R_2 是 H， R_3 是 $CH(CH_3)_2$ ，且 R_4 是 Cl。

19. 权利要求 16-18 任一项的组合物，其中所述氯苯吩嗪化合物是氯法齐明。

20. 权利要求 16-19 任一项的组合物，其中所述脂质载体是肿瘤对其高度摄取的脂质。

21. 权利要求 16-20 任一项的组合物，其中所述脂质是油。

22. 权利要求 21 的组合物，其中所述油是碘化油。

23. 权利要求 21 的组合物，其中所述油是碘油。

24. 权利要求 16-19 任一项的组合物，其中所述脂质选自大豆油、脂肪酸甘油单酯、中链甘油三酯、橄榄油、花生油、胡桃油、鳕鱼肝油、硝酰基脂肪酸、亚油酸乙酯、多碘化甘油三酯和多碘化三酰基甘油。

25. 权利要求 16-24 任一项的组合物，其中所述氯苯吩嗪化合物以至少约 0.5 μM 的浓度存在于组合物中。

26. 权利要求 16-25 任一项的组合物，其中所述氯苯吩嗪化合物的浓度为约 0.1 - 约 10 μM 。

用于治疗癌症的方法和组合物

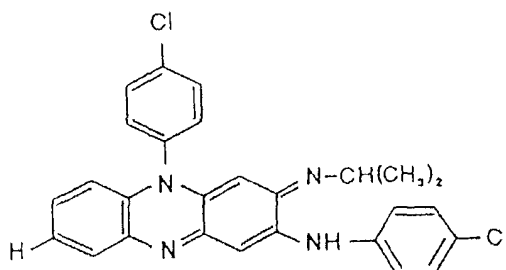
发明领域

本发明涉及治疗癌症的方法，特别是治疗肝癌的方法。本发明还涉及用于这样的治疗的组合物。

发明背景

肝细胞癌(HCC)是致死率最高的恶性肿瘤之一，并且在世界范围内位列第七位最常见的癌症。其发生率有很大的差异，在亚洲国家最经常发生。由于隐袭的发病，大多数 HCC 在诊断出时已不可以切除。目前全身使用来治疗 HCC 的化疗剂不是很成功(1-5)。在近几年，局部递送药物来治疗 HCC 的优点已有描述。该给药途径直接在肿瘤位点达到了较高的药物浓度，而使身体的其余部分免受毒性影响。此外，在被肝脏肿瘤高度摄取并且长时间保留的油例如碘油(lipiodol)中递送药物可进一步提高该给药途径的选择性(6-8)。通过达到高的局部肝脏水平，该方法使得能够治疗对氯法齐明或其类似物敏感的肝脏肿瘤。然而，所用的药物必须极其溶于油例如碘油以适当地递送以及随后在肿瘤内让药物从脂质中持续释放。

氯法齐明是一种氯苯吩嗪化合物，其分子量为 473.14，并且由于其复杂的杂环结构，其在正常条件下具有特征性的深红色到橙色(9)。其是作为一类化合物—氯苯吩嗪当中活性最强的抗分枝杆菌剂出现的，是由 Medical Research council of Ireland 的实验室从 1944 年合成的，当时这是寻找结核病治疗手段的计划的一部分。已经合成了几百个氯法齐明衍生物，并且在实验室中测试了其可能的治疗应用。



氯法齐明的结构： $[C_{27}H_{22}Cl_2N_2; 3-(4-氯苯胺基)-10-(4-氯苯基)-2,10-二氢-2-(异丙基亚氨基)-吩嗪]$ 。

自 1962 年开始，氯法齐明已用于治疗分枝杆菌疾病。其在多种疾病的治疗中是临床有效且安全的，并且主要是与达普宋和利福平联合用于治疗多种杆菌性麻风病。目前，氯法齐明的主要应用是在治疗瘤型麻风的世界卫生组织多药物治疗中。氯法齐明一般被视为安全的药物。尽管如此，其使用还是带来了某些缺点和副作用。这些副作用通常是轻的、与剂量有关的以及可逆的。所观察到的最常见的副作用是皮肤变为红棕色，这在施以高剂量的所有患者中都能看得见。某些文化，特别是一些亚洲种族认为有关的着色是耻辱和不能接受的，并且这是不依从治疗方案的主要原因(9-12)。

氯法齐明或其类似物的抗微生物作用已经成为众多科学出版物和专利的主题。

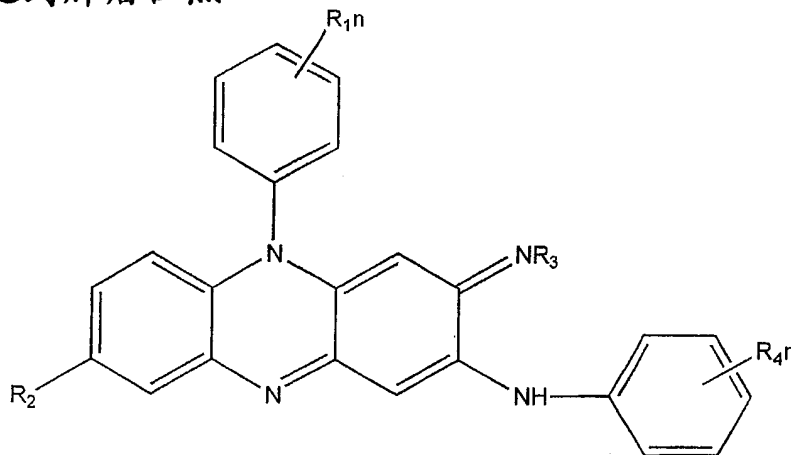
最近两组研究人员已经报道了口服使用氯法齐明来治疗 HCC。Ruff 等人(13)报道，10% (3/30)的用氯法齐明进行治疗的患者(HCC)具有客观反应，而 43% (13/30)的患者的该疾病稳定了最长达 20 个月。在随后的研究中，Falkson 等人(14)报道了在仅用氯法齐明进行 HCC 治疗的患者当中，没有任何患者具有客观反应。

Van Rensburg 等人已报道了氯法齐明在体外抗 FaDu——一种人鳞状细胞癌、PLC/PRF 5——一种人 HCC 细胞系的活性，以及在体内抗化学诱导的小鼠肉瘤和大鼠乳腺肿瘤的活性(15,16)。类似地，Sri-Pathmanthan 已表明了氯法齐明在体外和体内(裸鼠异种移植物)条件下对人肺癌细胞有活性(17)。最近，US 专利 5,763, 443 (该专利的公开内容引入本文以供参考)提出了有关氯苯吩嗪的多药耐药性(MDR)活性。

发明概述

本发明者们已证明了氯法齐明是一些肝脏和结肠直肠癌细胞系增殖的有效抑制剂。

因此，在第一个方面，本发明提供了治疗个体中肿瘤的方法，所述方法包括将包含治疗有效量的式 I 化合物或其类似物或代谢物的组合物局部递送到肿瘤位点：



式 I

其中 R_1 和 R_4 选自氢原子、卤素原子、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、氟甲氧基和三氟甲基， R_2 选自氢和卤素原子， R_3 选自氢原子、 C_1 - C_4 烷基、N,N-二烷基氨基烷基、 C_3 - C_{12} 环烷基、甲基环己基、羟基环己基、环烷基甲基、哌啶基、烷基取代的哌啶基和 N-苄基取代的哌啶基，且 n 是 1-3 并包括 1 和 3 的数字。

附图说明

附图 1：人肝细胞瘤细胞系 HepG2 中的细胞增殖，通过 $^3[H]$ 胸苷掺入测定的，并且是以每分钟的计数(CPM)表示的。将细胞在培养物中用不同浓度的氯法齐明(CF, 0-5 μM)处理 5 天。值代表每分钟计数(CPM)的平均值 $\pm$ s.e.m., 其与在处理期结束时每个孔中存在的活细胞数目成正比。

附图 2：将铺在 6 孔平板中的 HepG2 细胞用氯法齐明(0-5 mM)处理 1、3 或 7 天，使用台盼蓝染料法计数剩余的活细胞数目。所有计数都是以一式四份的方式获得。值代表平均值 $\pm$ 标准误差。

附图 3：让大鼠肝细胞瘤细胞 novikoff 在试管中生长，并用不同浓度的氯法齐明(0-10 mM)处理 1、3 或 7 天。在处理期结束时，使用台盼蓝法计数剩余的活细胞数目。所有计数都是以一式三份的方式获得，并且值代表平均值 $\pm$ 标准误差。

附图 4: 在人肝细胞瘤细胞系 HepG2 中氯法齐明对细胞增殖的抑制。将铺在 24 孔平板中的细胞在培养物中用氯法齐明(CF, 5 μ M)、碘油(L, 100 μ l)或氯法齐明-碘油(CF/L)处理 1 天, 并充分洗涤。然后将细胞与单独的培养基(没有加入药物或碘油)再培养 9 天。通过 3 [H]胸苷掺入测定细胞增殖, 并且结果(平均值 $\pm$ s.e.m.)是以每分钟的计数(CPM)表示。

附图 5: 向大鼠(雄性 S.D.)的肝脏中接种 2×10^6 个大鼠肝脏肿瘤细胞。7 天后, 再进行一次剖腹术, 测定肿瘤体积(V1)后, 通过将导管置于肝动脉内来缓慢地输注 100 μ l 无菌生理盐水、碘油或氯法齐明(0.4 mg, 溶解在 100 μ l 碘油中)。7 天后, 将动物安乐死, 并测定肿瘤体积(V2)。

附图 6: 分析得自用单次肝动脉内剂量的氯法齐明(0.4 mg, 在 100 μ l 碘油中)治疗的动物的血浆样本以测定总胆红素。用药物治疗后 7 天在临将动物安乐死之前通过心脏穿刺来收集血液。

附图 7: 向大鼠(雄性 S.D.)的肝脏中接种 2×10^6 个大鼠肝脏肿瘤细胞。7 天后, 再进行一次剖腹术, 并测定肿瘤体积(V1)。24 小时后, 通过每天一次口服载体[0.5%羧甲基纤维素(CMC)]或氯法齐明(50 mg/kg, 在 0.5% CMC 悬浮液中)治疗动物, 共 7 天。在该期间结束时在最后一次给药后 24 小时, 将动物安乐死, 并测定肿瘤体积(V2)。

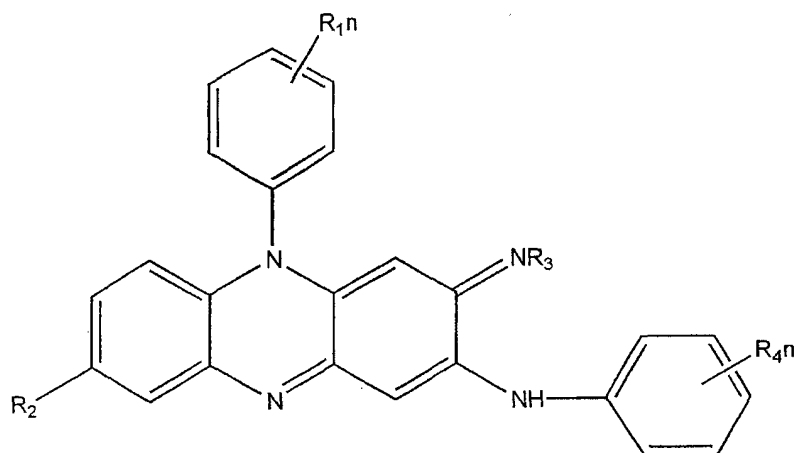
附图 8: 在培养物中用不同浓度的氯法齐明处理 5 天的 LOVO 细胞(结肠直肠癌细胞系)中以每分钟计数表示的[3 H]胸苷掺入。

发明详述

本发明者们已经证明了, 在肝脏肿瘤的治疗中向肝脏局部施用氯苯吩嗪化合物提供了很多优点。本发明者们还相信, 通过将该氯苯吩嗪化合物局部递送到其它癌症例如结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、间皮瘤、肾癌和脂肉瘤的肿瘤, 也可以获得该有益效果。

因此, 在第一个方面, 本发明涉及治疗个体中肿瘤的方法, 所述方法包括将包含治疗有效量的式 I 化合物或其类似物或代谢物的组合

物局部递送到肿瘤位点:



式 I

其中 R_1 和 R_4 选自氢原子、卤素原子、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、氟甲氧基和三氟甲基, R_2 选自氢和卤素原子, R_3 选自氢原子、 C_1 - C_4 烷基、 N,N -二烷基氨基烷基、 C_3 - C_{12} 环烷基、甲基环己基、羟基环己基、环烷基甲基、哌啶基、烷基取代的哌啶基和 N -苄基取代的哌啶基, 且 n 是 1-3 并包括 1 和 3 的数字。

R_1 取代优选位于 1-位, 并优选为 Cl。

优选的是, $n=1$, R_1 是 Cl, R_2 是 H, R_3 是 $CH(CH_3)_2$, 且 R_4 是 Cl。

特别优选氯苯吩嗪化合物为氯法齐明。

本发明方法特别适于治疗肝脏肿瘤。肿瘤可以是肝细胞瘤(原发性肝癌)或肝脏中的继发性癌症。优选经由肝动脉局部递送到肝脏。

本发明方法还可用于治疗其它癌症, 例如结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌或其它器官中的继发性转移瘤。

氯苯吩嗪化合物的局部递送可通过施用在可药用制剂中的化合物来实现。组合物可作为连续输液经由泵通过患病器官的主要动脉例如对于肝细胞瘤为肝动脉来给药。此外, 组合物可作为悬浮液来腹膜内给药以治疗源自卵巢癌、胰腺癌、胃癌或任何其它癌症的腹膜疾病。

制剂优选包含脂质。特别优选的是肿瘤对其高度摄取从而可将高浓度药物递送给肿瘤的脂质。

优选地, 脂质是油, 优选可通过外部手段例如 CT、MRI 或 PET

显示影像的油。优选该油为碘化油，特别是碘油——一种罂粟籽油的碘化乙酯。在另一优选的实施方案中，该油是可碘化的亚油酸乙酯。

虽然在本发明中碘油是优选的油，但是应当理解，满足下列标准的任何油都适于局部递送化合物：

- 1) 与血液相容，和
- 2) 对于氯法齐明或其它命名的氯苯吩嗪来说是合适的溶剂。

还优选的是，该油使得能够外部监测贮药库(depot)。这样油可携带使得能够通过任何外部手段例如 CT、MRI、PET 检测的组分、化学基团或取代基。

可使用的油的非限制性实例包括大豆油(参见 Tibell 等人, Transpl Int 1993 6:69-72)，棉籽油，红花油，脂肪酸甘油单酯，中链甘油三酯和食用油例如橄榄油、花生油、胡桃油、鳕鱼肝油等。从 Larodan Fine Chemicals AB (www.larodan.se)可获得多种色谱纯化的油。

众所周知，所有这样的油(如同碘油)都必须与表面活性剂一起使用，以在注射到循环系统中时是安全的(参见 Guerbet 的专利，GB1081551)。

可使用的其它脂质的非限制性实例包括硝酰基脂肪酸、在 MRI 中使用的 NFA (参见 Gallez 等人, Magn Reson Med 1993 30: 592-599)、用于 CT 的多碘化甘油三酯(参见 Weichert 等人, J Med Chem 1995 38:636-646)和用于 CT 的多碘化三酰基甘油(参见 Weichert 等人, J Med Chem 1986 29:2457-65)。

与全身给药相比，使用脂质例如碘油局部递送药物可在肿瘤位点达到更高的药物浓度，同时降低了其它身体器官暴露于不想要的药物作用的程度，从而减少了副作用数目以及减轻了副作用严重程度。在 HCC 中，通过选择碘油作为递送药物的载体，这可更具选择性和更有效。

当注射到肝动脉内时，油被 HCC 保留数周至一年以上，但是在 7 天内就能从正常肝脏实质中清除。虽然不希望以任何方式限制本发明，但是试图解释碘油在 HCC 中保留的一个假设认为，这些细胞不能清

除碘油，因为它们缺乏网状内皮枯否细胞组分。本发明者们先前已经证明了在体外，溶解在碘油中的维生素 D 化合物例如 1,25-二羟基维生素 D₃ 对 HepG2 细胞产生了显著且持续的抑制作用，并且当经由携带肿瘤的大鼠的肝动脉注射时，药物保留在肿瘤内(参见国际专利申请 PCT/AU98/00440 和 PCT/AU99/00323，其公开内容引入本文以供参考)。

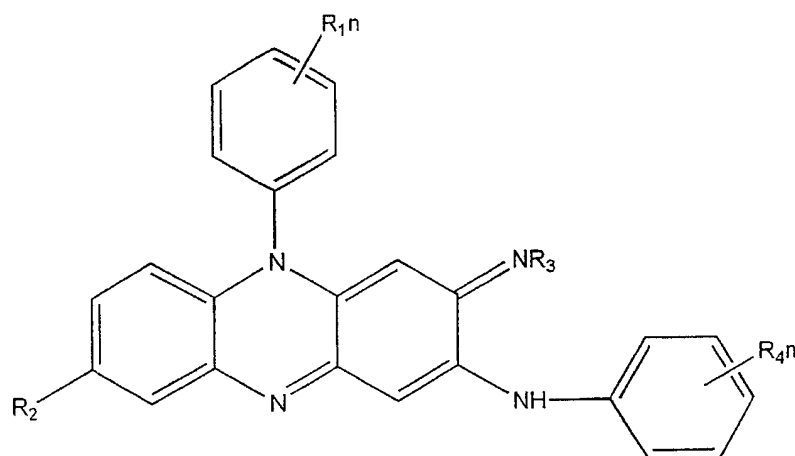
在本发明者们用氯法齐明、碘油和肝细胞瘤细胞系所取得的经验的基础上，他们相信，给予溶解在油例如碘油中的氯法齐明并且经由肝动脉给药将使得在肿瘤细胞内药物从油中持续地释放出来，从而持续地抑制肿瘤细胞的增殖。

碘油的这些独特性质以及氯法齐明的效力和脂溶性一起使得该组合成为用于在 HCC 患者中肝动脉内给药的有吸引力的制剂。

氯苯吩嗪化合物的治疗有效量的确定可使用常规计算方法根据动物数据来进行。氯苯吩嗪化合物的浓度通常为至少约 0.1 μM ，一般为约 0.1 - 约 10 μM 。

氯法齐明是脂溶性非常强的化合物，其 log_p 值为 7.4 [(辛醇/水) 9]。

在第二个方面，本发明提供了用于治疗个体中肿瘤的药物组合物，所述组合物包含脂质载体和浓度为至少 0.1 μM 的式 I 化合物或其类似物或代谢物：



式 I

其中 R_1 和 R_4 选自氢原子、卤素原子、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、氟甲氧基和三氟甲基， R_2 选自氢和卤素原子， R_3 选自氢原子、 C_1 - C_4

烷基、N,N-二烷基氨基烷基、C₃-C₁₂ 环烷基、甲基环己基、羟基环己基、环烷基甲基、哌啶基、烷基取代的哌啶基和 N-苄基取代的哌啶基，且 n 是 1-3 并包括 1 和 3 的数字。

优选 R₁ 取代位于 1-位，并优选为 Cl。

优选的是，n=1，R₁ 是 Cl，R₂ 是 H，R₃ 是 CH(CH₃)₂，且 R₄ 是 Cl。

氯苯吩嗪化合物特别优选为氯法齐明。

脂质载体优选为肿瘤对其高度摄取，这样可将高浓度药物递送给肿瘤的脂质。

优选地，脂质是油，优选可通过外部手段例如 CT、MRI 或 PET 显示影像的油。该油优选为碘化油，特别是碘油——一种罂粟籽油的碘化乙酯。

虽然在本发明中碘油是优选的油，但是应当理解，满足下列标准的任何油都适于局部递送化合物：

- 1) 与血液相容，和
- 2) 对于氯法齐明或其它命名的氯苯吩嗪来说是合适的溶剂。

还优选的是，该油使得能够外部监测贮药库。这样油可携带能够通过任何外部手段例如 CT、MRI、PET 检测的组分、化学基团或取代基。

可使用的油的非限制性实例包括大豆油(参见 Tibell 等人, Transpl Int 1993 6:69-72)，脂肪酸甘油单酯，中链甘油三酯和食用油例如橄榄油、花生油、胡桃油、鳕鱼肝油等。

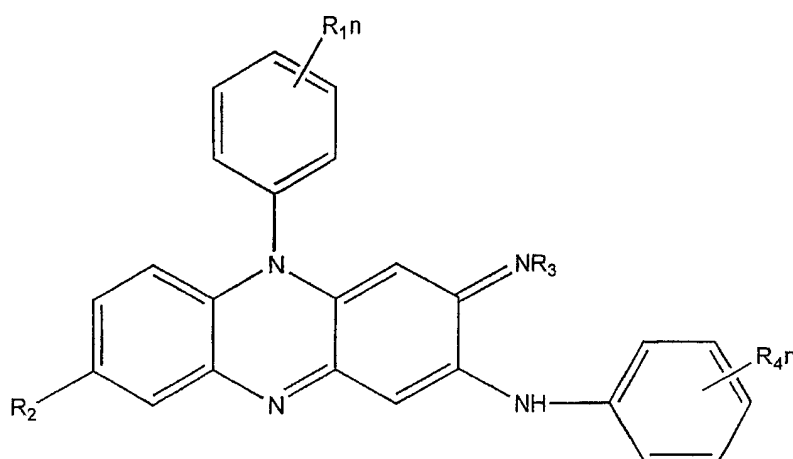
众所周知，所有这样的油(如同碘油)都必须与表面活性剂一起使用，以在注射到循环系统中时是安全的(参见 Guerbet 的专利，GB1081551)。

可使用的其它脂质的非限制性实例包括硝酰基脂肪酸、在 MRI 中使用的 NFA (参见 Gallez 等人, Magn Reson Med 1993 30: 592-599)、用于 CT 的多碘化甘油三酯(参见 Weichert 等人, J Med Chem 1995 38:636-646)和用于 CT 的多碘化三酰基甘油(参见 Weichert 等人, J

Med Chem 1986 29:2457-65).

氯苯吩嗪化合物优选以至少约 $0.5 \mu\text{M}$ 的浓度存在于组合物中。氯苯吩嗪化合物的上限是由该化合物的溶解度决定的。然而，氯苯吩嗪化合物的浓度优选为约 $0.1 - 10 \mu\text{M}$ 。

在另一个方面，本发明涉及式 I 化合物或其类似物或代谢物在制备用于治疗个体肿瘤的药物中的应用：



式 I

其中 R_1 和 R_4 选自氢原子、卤素原子、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 烷氧基、氟甲氧基和三氟甲基， R_2 选自氢和卤素原子， R_3 选自氢原子、 C_1-C_4 烷基、 N,N -二烷基氨基烷基、 C_3-C_{12} 环烷基、甲基环己基、羟基环己基、环烷基甲基、哌啶基、烷基取代的哌啶基和 N -苄基取代的哌啶基，且 n 是 $1-3$ 并包括 1 和 3 的数字，

其中所述药物适于局部递送到肿瘤位点上。

R_1 取代优选位于 1 -位，并优选为 Cl 。

优选的是， $n=1$ ， R_1 是 Cl ， R_2 是 H ， R_3 是 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ，且 R_4 是 Cl 。

氯苯吩嗪化合物特别优选为氯法齐明。

所述药物特别适于治疗肝脏肿瘤。肿瘤可以是肝细胞瘤(原发性肝癌)或肝脏中的继发性癌症。优选经由肝动脉局部递送到肝脏。

所述药物还可用于治疗其它癌症，例如结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌或其它器官中的继发性转移瘤。

所述药物优选还包含脂质。特别优选的是肿瘤对其高度摄取，这

样可将高浓度药物递送给肿瘤的脂质。

优选地，脂质是油，优选可通过外部手段例如 CT、MRI 或 PET 显示影像的油。该油优选为碘化油，特别是碘油——一种罂粟籽油的碘化乙酯。

虽然在本发明中碘油是优选的油，但是应当理解，满足下列标准的任何油都适于局部递送化合物和外部监测贮药库：

- 1) 与血液相容，
- 2) 对于氯法齐明或其它命名的氯苯吩嗪来说是合适的溶剂，
- 3) 携带使得能够通过任何外部手段例如 CT、MRI、PET 检测的组分、化学基团或取代基。

可使用的油的非限制性实例包括大豆油(参见 Tibell 等人, *Transpl Int* 1993 6:69-72)，棉籽油，红花油，脂肪酸甘油单酯，中链甘油三酯和食用油例如橄榄油、花生油、胡桃油、鳕鱼肝油等。从 Larodan Fine Chemicals AB (www.larodan.se) 可获得多种色谱纯化的油。

众所周知，所有这样的油(如同碘油)都必须与表面活性剂一起使用，以在注射到循环系统中时是安全的(参见 Guerbet 的专利，GB1081551)。

可使用的其它脂质的非限制性实例包括硝酰基脂肪酸、在 MRI 中使用的 NFA (参见 Gallez 等人, *Magn Reson Med* 1993 30: 592-599)、用于 CT 的多碘化甘油三酯(参见 Weichert 等人, *J Med Chem* 1995 38:636-646)和用于 CT 的多碘化三酰基甘油(参见 Weichert 等人, *J Med Chem* 1986 29:2457-65)。

与全身给药相比，使用脂质例如碘油局部递送药物可在肿瘤位点达到更高的药物浓度，同时降低了其它身体器官暴露于不需要的药物作用的程度，从而减少了副作用数目以及减轻了副作用严重程度。在 HCC 中，通过选择碘油作为递送药物的载体，这可更具选择性和更有效。

本文所用术语“局部递送”以及变型例如“局部给药”是指直接递送到肿瘤，递送到直接供给患病器官的血管，例如对于肝癌为肝动脉，

或递送到邻近肿瘤的体腔，例如对于胰腺癌为腹膜内。

本文所用术语“个体”是以其最广义使用，并且旨在包括人和非人动物。

在本说明书中，词语“包含”或其变型“含有”或“包括”应当理解是指包含所述的成分、整数或步骤，或成分、整数或步骤组，而不是排除任何其它成分、整数或步骤，或成分、整数或步骤组。

在说明书中提及的所有出版物都引入本文以供参考。

包括在本说明书中的任何对文件、条例、材料、装置、文章等的讨论都仅是为了给本发明提供上下文而提供的。不应认为是承认任何或所有这些内容形成现有技术基础的一部分或者是本发明相关领域中的一般常识，因为其在在本申请的每个权利要求的优先权日期之前在澳大利亚存在。

为了能更充分地理解本发明，现参照下列非限制性实施方案来描述本发明。

实施例 1

抗肝癌细胞的体外测试

方法：使用 $^3\text{[H]}$ 胸苷掺入分析来研究氯法齐明对细胞增殖的影响。将贴壁细胞(5/000 - 10/000)平板接种到 24-孔 Corning 组织培养皿中，并暴露于含有载体或不同浓度的氯法齐明(10^{-9} - 10^{-5} 摩尔/升)的培养基(MEM 5% FBS)。对于是脱附的大鼠细胞系的 Novikoff，将 2000 个细胞悬浮在 2 ml DMEM (5% FBS)中，并在与贴壁细胞相同的条件下保持。隔日用新鲜的培养基替换培养基。在处理期间(5 - 10 天)结束时，通过向每个孔中加入 $0.5 \mu\text{Ci}$ $^3\text{[H]}$ 胸苷并最后培养 4 小时来测定细胞培养物的胸苷掺入。使用 β -闪烁计数器(18)测定掺入的放射性的量。结果以每分钟实际计数-培养基中使用的药物浓度或 % 抑制(与对照相比胸苷掺入量的减少)来表示。用氯法齐明处理不同的肝癌细胞系 HUH-7、HepG2、SKHEP-1、Hep3-B (人细胞系)和 Novikoff (大鼠细胞系)使得这些细胞的 $^3\text{[H]}$ 胸苷掺入被剂量-依赖性地抑制(表 1 和附图 1)。

表 1: 氯法齐明在体外对肝癌细胞系增殖($^3\text{[H]}$ 胸苷掺入)的影响。

细胞系	[氯法齐明 μM]				
	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0
HUH-7	0	38.3 $\pm$ 7.2	51.1 $\pm$ 3.4	88.9 $\pm$ 1.1	96.7 $\pm$ 0.9
HepG2	21.0 $\pm$ 1.9	38.2 $\pm$ 2.2	52.9 $\pm$ 4.7	75.6 $\pm$ 2.7	92.4 $\pm$ 1.9
SKHEP-1	30.3 $\pm$ 2.9	62.7 $\pm$ 7.1	69.0 $\pm$ 3.2	70.9 $\pm$ 2.1	97.1 $\pm$ 1.7
Hep3- β	28.4 $\pm$ 7.4	62.3 $\pm$ 3.1	91.6 $\pm$ 1.1	94.3 $\pm$ 0.07	95.4 $\pm$ 1.4
Novikoff	0	0	11.7 $\pm$ 3.3	18.9 $\pm$ 2.9	42.7 $\pm$ 4.1

值代表, 对于每种细胞系, 当用不同浓度的氯法齐明处理 5 天时, $^3\text{[H]}$ 胸苷掺入的 % 抑制(与对照相比)的平均值 $\pm$ s.e.m.

这些结果表明, 人细胞系对氯法齐明的抗增殖作用很敏感, 在较高的药物浓度下, 通常对化疗和放疗非常抵抗的大鼠细胞系 Novikoff (19)表现出适度的敏感性。在所测试的人肝癌细胞系当中, Hep3- β 对氯法齐明的抗增殖作用表现出最高程度的敏感性(附图 1)。

实施例 2

抗 HepG2 细胞的体外测试

将铺在 6 孔平板中的 HepG2 细胞用氯法齐明(0 - 5 μM)处理 1、3 或 7 天, 使用台盼蓝染料法计数剩余的活细胞。所有计数都是以一式四份的方式获得。结果如附图 2 所示, 其中值代表平均值 $\pm$ 标准误差。

实施例 3

抗大鼠肝细胞瘤细胞 novikoff 的体外测试

让大鼠肝细胞瘤细胞 novikoff 在试管中生长, 并用不同浓度的氯法齐明(0 - 10 μM)处理 1、3 或 7 天。在处理期结束时, 使用台盼蓝法计数剩余的活细胞数目。所有计数都是以一式三份的方式获得, 并且值代表平均值 $\pm$ 标准误差。结果如附图 3 所示。

实施例 4

使用碘油抗肝癌细胞的体外测试

已经表明, 一些油, 特别是碘油被肝癌细胞摄取和保留。在这方面我们已表明:

- 在细胞培养条件下, 碘油被肝癌细胞高度摄取(18)

- 在携带肝脏肿瘤的大鼠中，碘油被肿瘤摄取并保留在肿瘤内(19)
- 在肝脏肿瘤患者中，给予溶解在碘油中的大剂量的 1,25-二羟基维生素 D3 并且经由肝动脉输注不导致高钙血症的发生
- 氯法齐明在碘油中高度溶解和稳定

为了研究溶解在碘油中的氯法齐明是否被细胞摄取并逐渐释放以产生持续的抗增殖作用，进行下述实验。

将分会合的 HepG2 细胞以每孔 10/000 个细胞的比例铺在 24 孔组织培养平板中，在具有潮湿的 5% CO₂ 气氛的培养器中于 37℃ 培养 24 小时。然后用在 MEM 或 MEM 加碘油(0.5% v/v)中制备的含有浓度为 5 μM 的氯法齐明的培养基替换原培养基。对于此，将溶解在乙醇中的氯法齐明置于试管中，将乙醇在氮气流下蒸发，通过加入碘油来回收药物，最后在培养基中重新配制以得到所需的药物和碘油浓度。将两组对照细胞用在培养基中配制的氯法齐明(没有碘油)或含有碘油的培养基(没有药物)处理。24 小时后，对于所有细胞，用既不含有药物也不含有碘油的标准培养基替换原培养基。从现在起，在随后的 9 天，隔日替换培养基。在该处理期结束时，测定细胞的胸昔掺入(如上所述)。

所得结果(附图 4)表明，用溶解在碘油中并在细胞培养基中稀释(0.5% V/V)的氯法齐明短暂处理 HepG2 细胞导致细胞增殖被持续地抑制，一直延续到把药物从细胞培养基中除去后很久(9 天)。这可能是由于油被细胞摄取，然后药物在细胞内从油中持续地释放所致。

从这些体外结果可以假定，被细胞摄取的碘油起药物贮库的作用，使得细胞连续暴露于氯法齐明，一直延续到将药物从培养基中除去之后很久。所以，在暴露于氯法齐明/碘油处理的细胞中，增殖以及由此³[H]胸昔掺入显著($p < 0.01$)减少。

实施例 5

在携带 novikoff 肿瘤的大鼠中的体内测试

为了确定溶解在碘油中的氯法齐明在体内是否有活性，采用 novikoff 大鼠肿瘤模型。进行下列操作。对大鼠施以全身麻醉(氟烷气

体)和剖腹术。然后使用 26G 3/8 结核菌素针头将悬浮在 100 μ L 培养基中的 2×10^6 个 novikoff 细胞滴注在肝脏被膜下方。用缝线将腹部切口缝合。所有操作都是在全身麻醉和无菌条件下进行的。

7 天后, 再进行一次剖腹术, 测定肿瘤体积(V1)后, 通过将导管置于肝动脉内来缓慢地输注 100 μ l 无菌生理盐水、碘油或氯法齐明(0.4 mg, 溶解在 100 μ l 碘油中)。7 天后, 对动物实施安乐死, 并测定肿瘤体积(V2)。结果如附图 5 所示。

实施例 6

胆红素测定

分析得自用单次肝动脉内剂量的氯法齐明(0.4 mg, 在 100 μ l 碘油中)治疗的动物的血浆样本以测定总胆红素。用药物治疗后 7 天在临将动物安乐死之前通过心脏穿刺来收集血液。结果如附图 6 所示。

实施例 7

口服施用氯法齐明

向大鼠(雄性 S.D.)的肝脏中接种 2×10^6 个大鼠肝脏肿瘤细胞。7 天后, 再进行一次剖腹术, 并测定肿瘤体积(V1)。24 小时后, 通过每天一次口服载体[0.5%羧甲基纤维素(CMC)]或氯法齐明(50 mg/kg, 在 0.5% CMC 悬浮液中)治疗动物, 共 7 天。在该期间结束时在最后一次给药后 24 小时, 将动物安乐死, 并测定肿瘤体积(V2)。结果如附图 7 所示。

实施例 8

抗人结肠直肠癌细胞的体外测试

我们还第一次证明了在体外用氯法齐明处理结肠直肠细胞系 C-170、HT-29 和 LOVO 使得通过 3 [H]胸苷掺入所测定的这些细胞的增殖被显著抑制(附图 8)。其它结肠直肠癌细胞(HT-29 和 C-170)在体外也以类似于 LOVO 的方式被抑制, 其中在这 2 个细胞系中, 经过 5 天的治疗期, 浓度为 1 μ M 的氯法齐明也产生了 > 70% 的对细胞增殖抑制。

这些结果表明, 用溶解在碘油中的氯法齐明治疗的大鼠, 其肿瘤

显著小于用碘油或盐水治疗的动物的肿瘤。这与上述体外结果一致，这些体外结果表明氯法齐明-碘油可能首先被肿瘤细胞摄取和储存，然后释放以在肿瘤附近产生药理有效浓度，从而抑制肿瘤生长。此外，在体内抑制 novikoff 细胞增殖的能力非常值得关注，因为 novikoff 一般是耐药性细胞系，并且在体外研究中是对氯法齐明最不敏感的细胞系(表 1)。

根据这些结果据信，在肿瘤、特别是肝癌患者中，溶解在碘油中并且局部给药的氯法齐明将被肿瘤细胞摄取，从而产生高的局部药物浓度和带来效力，同时使身体的其余部分免于不利地暴露于高浓度药物。

本领域技术人员应当理解，在不背离所广义描述的本发明实质或范围的情况下，可对如具体实施方案所示的本发明作多种改变和/或修改。因此，本发明实施方案在所有方面都视为举例说明而不是限制性的。

参考文献:

- 1 Okada, S. 肝细胞癌的化疗. Hepatogastroenterology 45:1259-63, 1998.
- 2 Tang, Z.Y. 肝细胞癌. J. Gastroenterol. Hepatol. 15: (Suppl.) G1-7, 2000.
- 3 Akriviadis, E.A., Llovet, J.M., Efremidis, S.C. 肝细胞癌. Br. J. Surg. 85:1319-31, 1998.
- 4 Mathurin, P., Rixe, D., Carbonell, N.等人. 综述文章: 不可切除的肝细胞癌的治疗概述-不可能的转变分析? Aliment. Pharmacol. Ther. 12:111-26, 1998.
- 5 Farmers, D.G. , Rosove, M.H. , Shaked, A.等人. 肝细胞癌在目前治疗药征. Ann. Surg. 219:236-47, 1994.
- 6 Bhattacharya, S., Dhillon A.P. , Winslet M.C. ,等人. 人肝癌细胞和内皮细胞吸收碘化油. Br. J. Cancer 73:877-881, 1996.
- 7 Nakakuma, K., Tashiro, S., Hiraoka, T.,等人. 对注射到结扎

的供给肝动脉内以治疗肝癌的油性抗癌药物的抗癌治疗的研究. *Cancer* 52:2193-2200, 1983.

8 Chou, F.I., Fang, K.C., Chung, C., 等人. 人肝细胞瘤细胞对碘油的摄取和保留. *Nucl. Med. Biol.* 22:379-386, 1995.

9 O'Conner, R., O'Sullivan, J.F., O'Kennedy, R. 氯法齐明的药理、代谢和化学性质. *Drug Metab. Rev.* 27:591-614, 1995.

10 Arbiser, J.J., Moschella, S.L.M. 氯法齐明: 其医疗应用和作用机制的综述. *J. A. Acad. Dermatol.* 32:241-7, 1995.

11 Dollery, C. (ed.) 氯法齐明. In "Therapeutic drugs". pp C282-C286, Churchill-Livingstone, 1995.

12 Reddy, V.M., Nadadhur, G., Daneluzzi, D., 等人. 氯法齐明及其新类似物 B4154 和 B4157 的抗结核活性. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:633-636, 1996.

13 uff, P., Chasen, M.R., Long, J.E.H. 等人. 口服氯法齐明在不可切除且转移性肝细胞癌中的 II 期试验. *Ann. Oncol.* 9:217-219, 1998.

14 Falkson, C.I., Falkson, G. 氯法齐明加阿霉素在严重的、不可切除的原发性肝细胞癌中的 II 期试验. *Oncology* 57:232-235, 1999.

15 Van Rensburg, C.E.J., Durandt, C., Garlinski, P. J. 等人. 在携带肿瘤的大鼠和小鼠中评价氯苯吩嗪剂氯法齐明和 B669 的抗肿瘤活性. *Int. J. Oncol.* 3:1011-1013, 1993.

16 Van Rensburg, C., E., J., Van Staden, A., M., Anderson, R. 氯苯吩嗪剂氯法齐明和 B669 通过磷脂酶 A₂-介导的氧化和非氧化机制在体外抑制癌细胞系增殖. *Cancer Res.* 53:318-323, 1993.

17 Sri-Pathmanathan, R., M., Plumb, J., A., Fearon, K., C., H. 氯法齐明在体外和体内改变能量代谢和抑制人肺癌细胞系的生长速度. *Int. J. Cancer* 56:900-905, 1994.

18 Labarca, C., Paigen K. 简单、快速和简单的敏感性 DNA 测定操作. *Anal. Biochem.* 102:344-352, 1980.

19 Hafeli, U.O., Casillas, S., Dietz, D.W. 等人. 在大鼠模型中使

用放射性铼($^{186}\text{RE}/^{188}\text{RE}$)玻璃微球进行肝脏肿瘤放射栓塞. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 44:189-199, 1999.

20 Kurth, S., Bulian, D., Kreft, B.等人. 在大鼠中用氟尿嘧啶、氟脱氧尿苷、motomycin C、顺铂或甲氨喋呤作为单剂抗癌药物进行动脉内肝脏化疗来治疗移植的实验肝脏肿瘤. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122:421-426, 1996.

21 Pourgholami, M.H. , Akhter, J., Finaly, I.G.等人. 溶解在碘油中的 1,25-二羟基维生素 D3 在人肝胚细胞瘤 HepG2 中产生持续的抗增殖作用. *Anticancer Res.* 20:723-728, 2000.

22 Finlay, I.G., Stewart, G.J., Pourgholami M.H.等人. 使用碘油和中链甘油三酯作为肝动脉施用 1,25-二羟基维生素 D3 的递送剂 - 肝细胞瘤的可能的治疗. *Anticancer Res.* 20:2705-2710, 2000.

图1

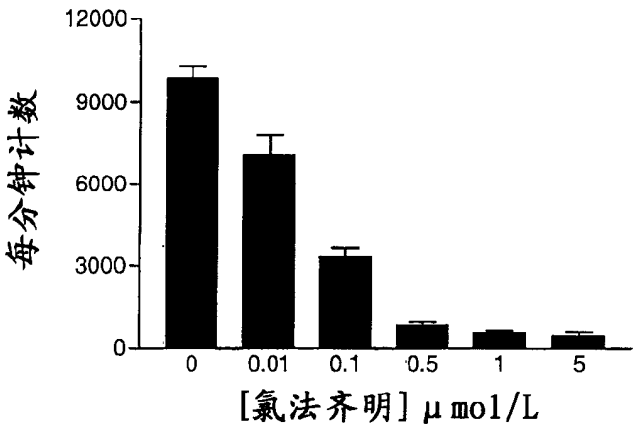


图 2

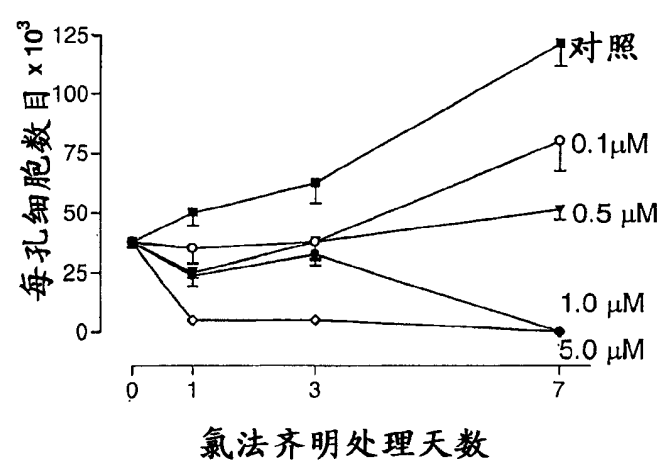


图 3

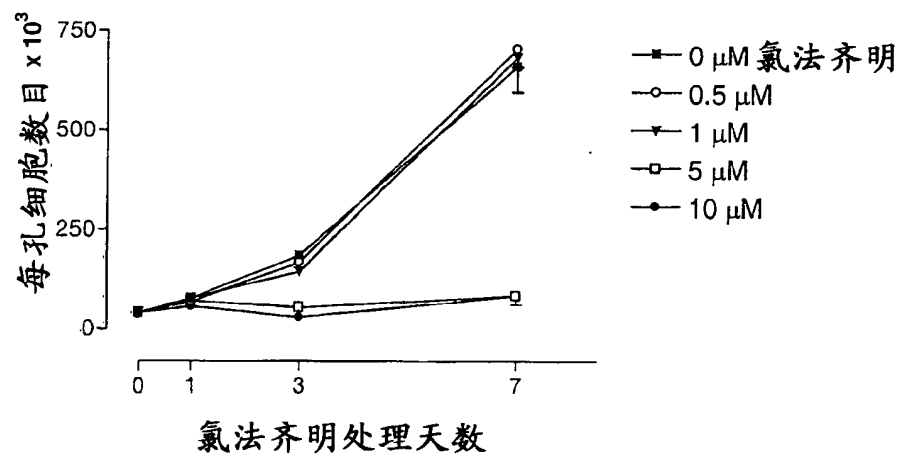


图 4

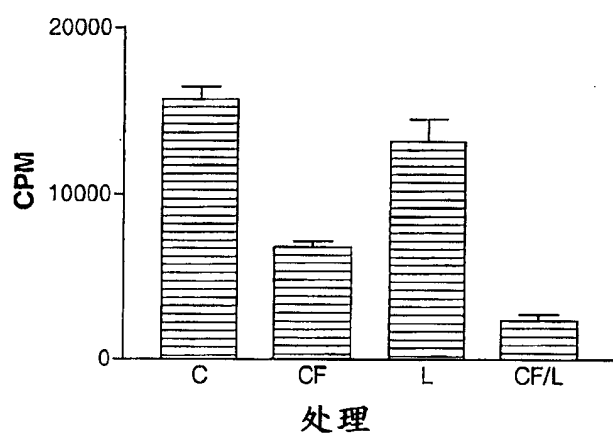


图 5

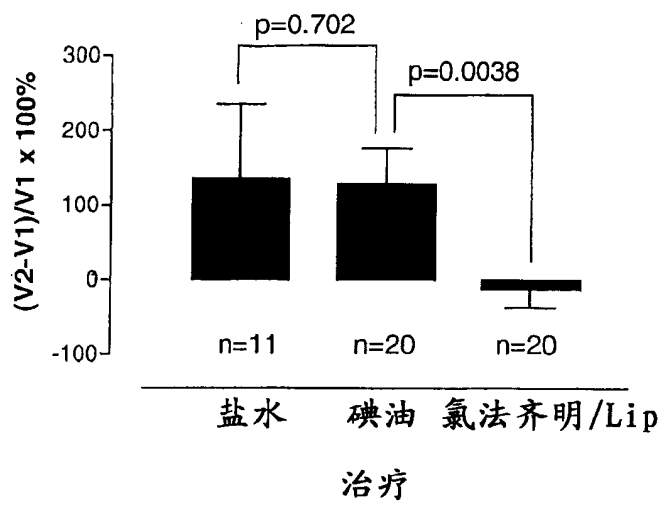


图6

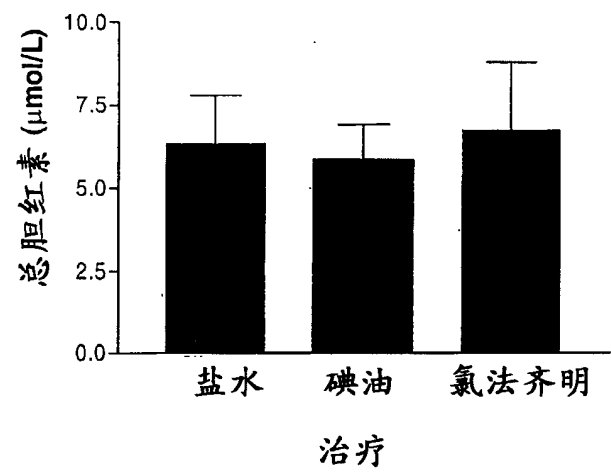


图 7

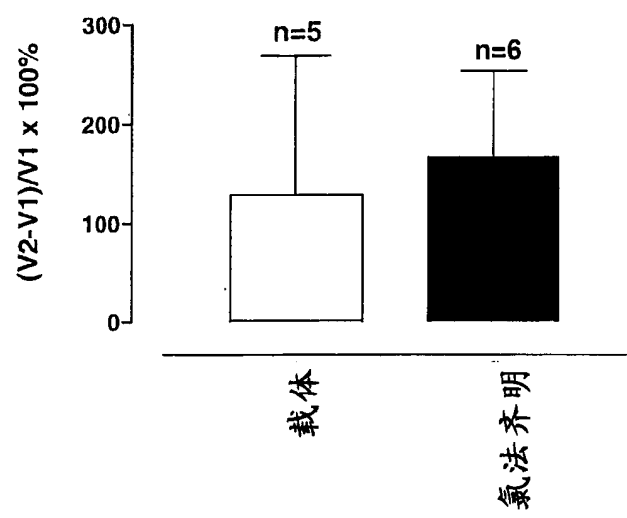


图 8

