



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101087800 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 200580044803. 6

(22) 申请日 2005. 10. 25

(30) 优先权数据

60/622, 087 2004. 10. 25 US

60/672, 707 2005. 04. 18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 06. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2005/038523 2005. 10. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/047575 EN 2006. 05. 04

(73) 专利权人 德克技术公司

地址 美国路易斯安那

(72) 发明人 L·摩根

(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 11038

代理人 陈轶兰

(51) Int. Cl.

C07F 9/22(2006. 01)

A61K 31/675(2006. 01)

A61K 31/66(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0071134 A1, 2000. 11. 30, 说明书第 2 页图左下角、第 8 页中间结构式, 说明书第 4-5 页 Table1-2, 14-15、17-18 页 Table3-6.

施畅, 廖明阳. 环磷酰胺与异环磷酰胺在体内的代谢特点分析. 解放军药学报第 17 卷 第 2 期. 2001, 第 17 卷 (第 2 期), 92-94.

审查员 马进

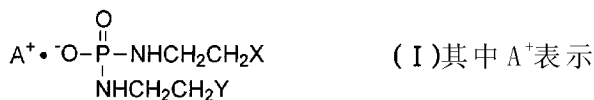
权利要求书3页 说明书25页 附图4页

(54) 发明名称

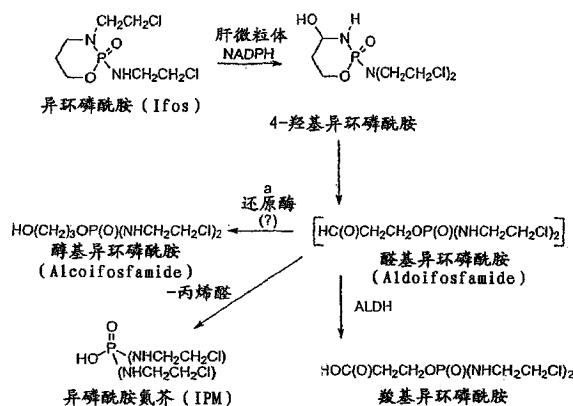
作为抗肿瘤剂的异磷酰胺氮芥及其类似物的盐

(57) 摘要

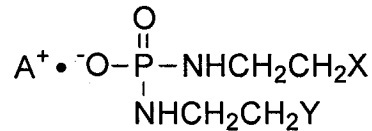
本发明涉及异磷酰胺氮芥和异磷酰胺氮芥类似物的盐和组合物。在一个实施方案中, 所述的盐可以由式 I 表示:



选自下列的铵种类: 脂族胺类和芳族胺类的质子化(共轭酸)或季铵形式, 所述胺类包括碱性氨基酸、杂环胺类、取代和未被取代的吡啶类、胍类和脒类; 且 X 和 Y 独立地表示离去基团。本文还披露了用于制备这类化合物和配制其药物组合物的方法。还披露了对受试者给予所披露的化合物, 特别是用于治疗过度增殖性疾病的方法。



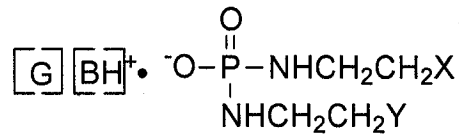
1. 下式的化合物：



其中 A^+ 表示 BH^+ 且 B 为选自碱性氨基酸、N- 甲基 -N- 乙基胺、二乙胺、三乙胺、二异丙基乙胺、一 -、双 - 或三 - (2- 羟乙基) 胺、2- 羟基 - 叔丁基胺、三 (羟甲基) 甲胺、N, N- 二甲基 -N-(2- 羟乙基) 胺、和 N- 甲基 -D- 葡糖胺的胺；且

X 和 Y 独立地表示离去基团；其中所述离去基团选自卤素和磺酸酯、且能够被亲核体置换。

2. 权利要求 1 的化合物，其中该化合物具有下式：



并且 G 表示碱性氨基酸，B 和 X 如权利要求 1 中所定义。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 B 选自赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸、高精氨酸、组氨酸、鸟氨酸及其组合。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 B 为赖氨酸。

5. 权利要求 1 的化合物，其中 X 和 Y 为卤素。

6. 权利要求 1 的化合物，其中 X 和 Y 为氯。

7. 权利要求 2 的化合物，其中 B 和 G 为赖氨酸且 X 和 Y 表示氯。

8. 权利要求 1 的化合物，进一步包含胺。

9. 权利要求 1 的化合物，进一步包含碱金属阳离子。

10. 权利要求 1 的化合物，其中所述铵阳离子为赖氨酸。

11. 药物组合物，包含权利要求 1 的化合物和药学上可接受的载体。

12. 权利要求 11 的药物组合物，其中，在权利要求 1 的化合物中，B 选自赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸、高精氨酸、组氨酸、鸟氨酸及其组合。

13. 权利要求 11 的药物组合物，其中，在权利要求 1 的化合物中，X 和 Y 为卤素。

14. 权利要求 11 的药物组合物，其中，在权利要求 1 的化合物中，X 和 Y 为氯。

15. 权利要求 11 的药物组合物，其中该组合物包含为对人类受试者给药配制的溶液。

16. 权利要求 15 的药物组合物，其中所述的溶液包含 0.1mg/mL-250mg/mL 的所述化合物。

17. 权利要求 16 的药物组合物，其中所述的溶液包含 20-100mg/mL 的所述化合物。

18. 权利要求 11 的药物组合物，其中该组合物在每剂量单位中包含 200mg-1500mg 的所述化合物。

19. 药物组合物，包含权利要求 2 的化合物和药学上可接受的载体。

20. 药物组合物，包含权利要求 7 的化合物和药学上可接受的载体。

21. 权利要求 11 的药物组合物，其中该组合物进一步包含胺碱。

22. 权利要求 21 的药物组合物，其中胺碱选自碱性氨基酸、脂族胺类、二 - 和三烷基胺类、杂环胺类、芳族胺类、取代和未被取代的吡啶类、胍类、脒类和它们的铵抗衡离子。

23. 权利要求 21 的药物组合物,其中胺碱选自赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸、高精氨酸、组氨酸、鸟氨酸、它们的铵抗衡离子及其组合。

24. 权利要求 21 的组合物,其中所述胺碱为赖氨酸。

25. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗过度增殖性疾病的药物中的应用。

26. 权利要求 25 的应用,其中所述的过度增殖性疾病包含乳腺癌、膀胱癌、骨癌、宫颈癌、结肠癌、中枢神经系统癌、食管癌、胆囊癌、胃肠癌、头颈部癌、何杰金病、非何杰金淋巴瘤、喉癌、白血病、肺癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、视网膜母细胞瘤、胃癌、睾丸癌或维尔姆斯瘤。

27. 权利要求 25 的应用,其中所述的过度增殖性疾病包含腺癌、肉瘤、白血病或淋巴瘤。

28. 权利要求 25 的应用,其中所述的过度增殖性疾病包含皮肤肿瘤。

29. 权利要求 28 的应用,其中所述的肿瘤为转移性的。

30. 权利要求 28 的应用,其中所述的过度增殖性疾病包含黑素瘤、肉瘤或它们两者。

31. 权利要求 30 的应用,其中所述的过度增殖性疾病包含黑素瘤。

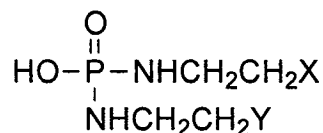
32. 权利要求 25 的应用,其中所述的过度增殖性疾病包含卵巢、乳腺、肺、前列腺或直肠的癌。

33. 权利要求 32 的应用,其中所述的肺肿瘤为非 - 小细胞或小细胞肺癌肿瘤。

34. 权利要求 33 的应用,其中所述的肺肿瘤为非 - 小细胞肺癌肿瘤。

35. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗患有过度增殖性疾病的受试者的药物中的应用。

36. 用于生产包含权利要求 1 的化合物的冷冻干燥物的方法,包括使下式的化合物



在有水存在下接触至少一当量的胺碱,所述胺碱选自 NH_3 、碱性氨基酸、N- 甲基 -N- 乙基胺、二乙胺、三乙胺、二异丙基乙胺、一 -、双 - 或三 -(2- 羟乙基) 胺、2- 羟基 - 叔丁基胺、三 (羟甲基) 甲胺、N,N- 二甲基 -N-(2- 羟乙基) 胺、三 -(2- 羟乙基) 胺和 N- 甲基 -D- 葡萄糖胺;和

冷冻干燥所得混合物,由此形成所述的冷冻干燥物,

其中 X 和 Y 独立地表示离去基团;其中所述离去基团选自卤素和磺酸酯、且能够被亲核体置换。

37. 权利要求 36 的方法,其中 X 和 Y 为氯。

38. 权利要求 36 的方法,其中使所述的化合物接触包括使所述的化合物接触至少两当量的所述胺碱。

39. 权利要求 36 的方法,其中所述的胺碱为赖氨酸。

40. 通过权利要求 36 所述方法生产的冷冻干燥物。

41. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物为抗过度增殖化合物。

42. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物在小鼠中具有静脉内 LD_{50} 大于异磷酰胺氮芥的静脉内 LD_{50} 。

43. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物在小鼠中具有静脉内 LD₁₀ 大于异磷酰胺氮芥的静脉内 LD₁₀。

44. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物在鼠中具有 184-265mg/kg 的静脉内 LD₅₀。

45. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物在鼠中具有 65-172mg/kg 的静脉内 LD₁₀。

46. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物在大鼠中具有 400-570mg/kg 的静脉内 LD₅₀。

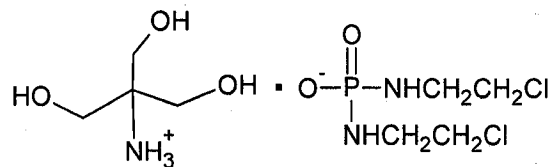
47. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物是稳定的异磷酰胺氮芥铵盐,其中该盐在有水存在下具有的半衰期大于在有水存在下异磷酰胺氮芥的半衰期。

48. 权利要求 40 的冷冻干燥物,其中,式 $A^+ \cdot ^-O-P(=O)(NHCH_2CH_2X)(NHCH_2CH_2Y)$ 的化合物比异磷酰胺氮芥的冷冻干燥制品更稳定,其中, A⁺、X 和 Y 如权利要求 1 中所定义。

49. 权利要求 1 的化合物,其中该化合物抗 CPA- 抗性肿瘤生长比 CPA、Ifos 或它们两者更有效。

50. 权利要求 1 的化合物,其中 B 是三(羟甲基)甲胺。

51. 权利要求 50 的化合物,具有下式:



52. 药物组合物,包含权利要求 50 或 51 的化合物和药学可接受的载体。

53. 权利要求 52 的药物组合物,其中该组合物包含为对人类受试者给药配制的溶液。

54. 权利要求 11 的药物组合物,其中所述化合物是冷冻干燥物。

作为抗肿瘤剂的异磷酰胺氮芥及其类似物的盐

[0001] 政府权利的声明

[0002] 本发明在以 National Cancer Institute 颁发的资金 No. 5R44CA083552-03 的政府支持下进行。政府在本发明中拥有一定的权利。

[0003] 领域

[0004] 本说明书涉及异磷酰胺氮芥 (isophosphoramid mustard) 及其类似物的盐。还披露了药物组合物和使用这类组合物治疗过度增殖性疾病的方法。

[0005] 背景

[0006] 对在第一次世界大战中被芥子气杀死的士兵的尸检显示双氯乙基硫醚对快速分裂的细胞具有不均衡的作用并且提示双氯乙基硫醚化合物可能具有抗肿瘤作用。实际上, 早期研究人员尝试通过将双氯乙基硫醚直接注入肿瘤治疗癌症。这种研究受到双氯乙基硫醚化合物的极端毒性的限制, 研究氮芥类似物诸如双氯乙基甲胺作为较低毒性的备选。

[0007]

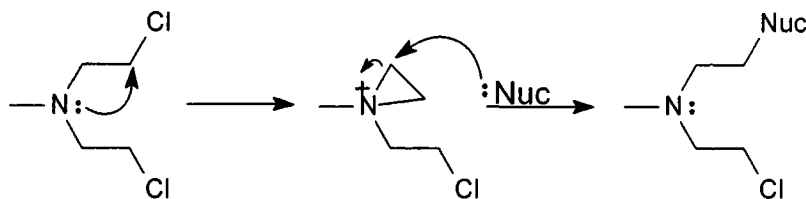


[0008]

双氯乙基硫醚

[0009] 一般而言, 芥子气化合物通过使 DNA 诸如在鸟嘌呤残基的 N-7 位上烷基化发挥其细胞毒性作用。芥子气化合物的烷基化机理解释在方案 1 中。参见方案 1, 芥子气化合物具有有助于氯置换的内部亲核体, 正如通过对双氯乙基甲胺所示的, 从而形成吡丙啶鎓中间体。因为双氯乙基甲胺带有两个离去基团, 所以可以重复方案 1 中描绘的亲核取代机制, 产生 DNA 或蛋白质 -DNA 交联。

[0010]

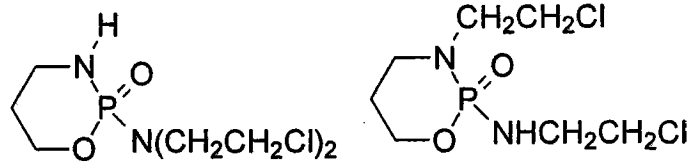


[0011] 方案 1

[0012] 双氯乙基甲胺是极具反应性的并且结果为非选择性。已经使用双氯乙基甲胺作为模型设计并且制备了数以千计的烷化剂。然而, 这些化合物中几乎没有显示出优于双氯乙基甲胺的足以进行临床试验的治疗优势。

[0013] 由于大部分双氯乙基甲胺类似物缺乏选择性, 所以研究了可以通过存在于肿瘤细胞中的高浓度磷酰胺酶活化的前体药物, 即磷酰胺化合物。已经证实两种磷酰胺烷化剂 - 环磷酰胺 (CPA) 和其异构体化合物异环磷酰胺 (Ifos) 特别有效。

[0014]



[0015]

环磷酰胺 (CPA)

异环磷酰胺 (Ifos)

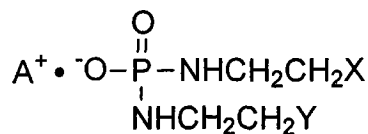
[0016] CPA 的代谢途径与 Ifos 的代谢途径类似 (Ifos 的代谢解释在附图 1 中) 且由此两种化合物具有共同的缺陷。可能最重要的是其因出血性膀胱炎导致的剂量限制性毒性。认为出血性膀胱炎是因 CPA 和 Ifos 活化过程中产生丙烯醛而诱导的。丙烯醛为在生理条件下与硫醇类反应的活性亲电子试剂,这可能是其谷胱甘肽耗尽形式的肝毒性的原因。最后,已经证实丙烯醛为致畸原和有利的诱变剂,并且这可能造成 CPA 治疗与严重副作用诸如膀胱癌和其它恶性肿瘤之间的关联。

[0017] 参见附图 1,异磷酰胺氮芥 (IPM) 为 CPA 和 Ifos 的共同代谢物。认为 IPM 产生至少部分由 CPA 和 Ifos 表现出的抗肿瘤活性。直接使用 IPM 作为抗癌剂的努力部分因该化合物的不稳定性而未获得成功。已经合成了 IPM 并且对该化合物进行了初步生物学评价,但令人遗憾的是 IPM 过于不稳定,以致于无法分离和用于人体治疗。

[0018] 公开内容的概述

[0019] 本文披露了下式的化合物:

[0020]



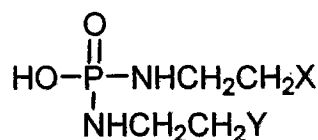
[0021] 其中 A^+ 表示铵种类,其选自:脂族胺类和芳族胺类的质子化(共轭酸)或季铵形式,所述胺类包括碱性氨基酸、杂环胺类、取代和未被取代的吡啶类、胍类和脒类;且 X 和 Y 独立地表示离去基团。

[0022] 在一个实施方案中,披露了包括一种或多种上述化合物的药物组合物。在该实施方案的一个方面中,所述的组合物可以包括一种或多种非上式所述的治疗剂用于联合疗法。

[0023] 在另一个实施方案中,披露了用于治疗患有过度增殖性疾病的哺乳动物受试者诸如人受试者的方法。这类方法可以使用一种或多种上述化合物和组合物。

[0024] 在另一个方面中,本文披露了下式化合物或其药学上可接受的盐的无菌药物组合物:

[0025]



[0026] 其中 X 和 Y 独立地表示离去基团。还披露了制备这类组合物的方法,包括通过使用无菌抗微生物过滤器使得该组合物无菌。在某些实施方案中,可以进行这类过滤,其中活性组分的分解低于 10%,优选低于 5%,2%,或甚至低于 1% 的分解。

[0027] 本文还披露了用于生产包含上述通式的化合物的冷冻干燥物的方法。在一个实施方案中,该方法包含使异磷酰胺氮芥或其类似物在有水存在下接触胺碱并且冷冻干燥所得

混合物。

[0028] 附图简述

[0029] 附图 1 为解释异环磷酰胺代谢,包括丙烯醛和异磷酰胺氮芥产生的示意图。

[0030] 附图 2 为在 500MHz 下记录的在 D₂O 中的 IPM • (LYS)₂ 的 ¹H NMR 波谱。

[0031] 附图 3 为附图 2 中波谱的展开部分。

[0032] 附图 4 为 IPM • (LYS)₂ 的 ¹³C NMR 波谱。

[0033] 详细描述

[0034] 提供下列术语解释和实施例是为了更好地描述本发明的化合物、组合物和方法并且指导本领域技术人员实施本发明。还应理解本说明书中使用的术语的目的仅在于描述具体的实施方案和实施例,但不旨在起限定作用。

[0035] 范围在本文中 can 表示为从“约”的一个具体值和/或到“约”的另一个具体值。当表示这类范围时,另一个实施方案包括从所述一个具体值和/或到另一个具体值。类似地,当将值通过使用前缀“约”表示为近似值时,应理解该具体值可构成另一个实施方案。进一步理解所述范围各自的端点的意义不仅与另一端点相关并且与另一端点彼此独立。

[0036] 在本说明书和如下的权利要求中,所涉及的许多术语应理解为具有如下含义:

[0037] “任选 (optional)”或“任选地 (optionally)”意指随后所述的事件或情况可以但不一定发生,并且该描述包括所述事件或情况发生和不发生的情况。

[0038] 术语“氨基酸”意指天然和非天然氨基酸,包括 α-氨基酸,对于手性氨基酸而言为其 D 和 L 立体异构体形式。碱性氨基酸残基的实例包括那些具有碱性侧链,诸如氨基或胍基的氨基酸。碱性氨基酸残基包括,但不限于精氨酸、组氨酸、高精氨酸、赖氨酸、高赖氨酸和鸟氨酸。

[0039] 术语“抗体”意指免疫球蛋白,无论是天然,还是完全或部分合成产生的免疫球蛋白。在该术语中还包括维持特异性结合能力的其所有的衍生物。该术语还涵盖具有与免疫球蛋白结合结构域同源或在很大程度上同源的结合结构域的任意蛋白质。这些蛋白质可以来源于天然来源或部分或完全通过合成产生。本文所用的抗体可以为单克隆或多克隆的。

[0040] 本文所用的“脂族胺”意指式 NR¹R²R³ 的化合物,其中 R¹⁻³ 中至少一个为脂族基团。

[0041] 术语“无环脂族胺”意指上述脂族胺,其中脂族基团中至少一个为无环的。

[0042] 术语“杂环胺”意指式 NR¹R²R³ 的化合物,其中 R¹⁻³ 中至少一个为杂环基或 R¹、R² 和/或 R³ 与其共同的氮原子一起形成环。

[0043] I. IPM 和 IPM 类似物的盐

[0044] 本文披露的化合物和组合物包括使用一个或多个当量的碱配制的 IPM 和 IPM 类似物。因为 IPM 及其类似物对酸敏感并且为酸性的,所以目前披露的化合物可提供更大的稳定性和其它优点。所披露的制剂在合成、稳定性和生物利用度方面的优点对本领域技术人员而言在考虑到本发明披露的内容时显而易见。

[0045] 在一个实施方案中,所披露的化合物为包括一个或多个阳离子的异磷酰胺氮芥或异磷酰胺氮芥类似物的盐。在一个实施方案中,阳离子可以为胺碱的共轭酸或可以为季铵

阳离子。对异磷酰胺氮芥及其类似物合适的抗衡离子包括碱的共轭酸（除非上下文中明确表示指定为游离胺，否则，如本文所用涉及胺的术语应理解为包括其共轭酸），所述的碱包括碱性氨基酸、脂族胺类、杂环胺类、芳族胺类、吡啶类、胍类和脒类。在脂族胺类中，无环脂族胺类以及环状和无环二-和三-烷基胺类特别适用于所披露的化合物。此外，季铵抗衡离子为可以使用的合适的抗衡离子的实例。

[0046] 用于本发明的合适的胺碱（及其相应的铵离子）的具体实例包括，但不限于吡啶、N,N-二甲氨基吡啶、二氮杂双环壬烷、二氮杂双环十一碳烯、N-甲基-N-乙基胺、二乙胺、三乙胺、二异丙基乙胺、一-、双-或三-(2-羟乙基)胺、2-羟基-叔丁基胺、三(羟甲基)胺、N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)胺、三-(2-羟乙基)胺和N-甲基-D-葡萄糖胺。

[0047] 在另一个实施方案中，上述盐可以包括第二种胺或铵基团。在一个实施方案中，本文披露的化合物对于每当量的异磷酰胺氮芥或异磷酰胺氮芥类似物包括一个以上当量的胺。这类实施方案包括那些具有胺与异磷酰胺氮芥或异磷酰胺氮芥类似物非整数比的化合物。在某些实施方案中，所述的化合物具有2:1或3:1比例的胺与异磷酰胺氮芥或异磷酰胺氮芥类似物。在有效实施方案中，产生了含有两当量的胺碱/当量异磷酰胺氮芥的盐。在一个实施方案中，用于形成异磷酰胺氮芥和异磷酰胺氮芥类似物盐的胺碱包括一个以上氨基；这类碱可以称作“多元碱”。更具体地说，可以使用的多元碱的某些实例带有2个氨基；这类化合物可以称作“二元碱”。例如，一种合适的二元碱分子为N,N-二甲氨基吡啶，其包括两个碱性氨基。在本文披露的化合物的一个具体的实施方案中，化合物包括异磷酰胺氮芥或异磷酰胺氮芥类似物和一当量的二元碱胺。

[0048] 在一个实施方案中，所披露的化合物包括一种或多种两性离子碱。这类碱的实例包括碱性氨基酸，其在生理pH下为两性离子。

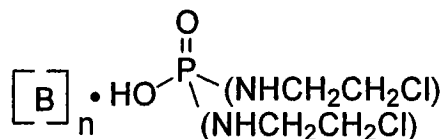
[0049] 在一个实施方案中，目前披露的盐比异磷酰胺氮芥和异磷酰胺氮芥类似物更稳定。例如，异磷酰胺氮芥在作为纯化合物冷冻干燥后在-20℃下储存3个月过程中分解了近40%。相比之下，IPM的赖氨酸盐未表现出任何可测量的分解，甚至在类似储存条件下10个月也是如此。

[0050] 在某些实施方案中，所披露的化合物为稳定的异磷酰胺氮芥盐或稳定的异磷酰胺盐类似物，其中该盐在室温（例如约23℃）和有水存在下具有的半衰期大于在相同条件和有水存在下异磷酰胺氮芥的半衰期。在某些优选的这类实施方案中，异磷酰胺氮芥盐在有水存在下具有等于或大于异磷酰胺氮芥2倍那么长的半衰期，更优选等于或大于5倍。

[0051] 在某些实施方案中，所披露的化合物的冷冻干燥物比异磷酰胺氮芥的冻干制品更为稳定。在某些优选的这类实施方案中，所披露的化合物的冷冻干燥物具有比异磷酰胺氮芥自身冻干制品更长的贮存期限，优选至少为其2倍那么长，更优选至少5倍那么长。

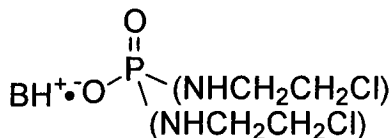
[0052] 在某些实施方案中，IPM或其类似物的药学上可接受的盐（诸如上述通式的化合物）的药物组合物比异磷酰胺氮芥自身（即非盐的形式）的其它方面相同的组合物在相同条件下更稳定。在某些优选的这类实施方案中，所披露的组合物具有比异磷酰胺氮芥的冻干制品更长的贮存期限，优选至少2倍那么长，更优选至少5倍那么长。

[0053] 本文披露的某些异磷酰胺氮芥和异磷酰胺氮芥类似物化合物包括两个离去基团。不受理论约束，认为这两个离去基团在体内被生物分子亲核体诸如核酸和蛋白质置换，由此交联生物分子。术语“离去基团”意指可以被亲核体置换的基团。就目前披露的化合物



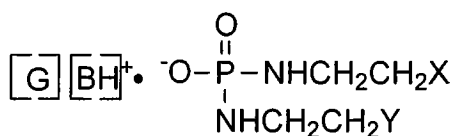
[0061] 就上述通式而言,B 可以为任意的碱性基团,特别是胺。应认识到上述通式将主要作为相应的盐存在且由此可以包括由下式表示的化合物:

[0062]



[0063] 就上述通式而言,这类化合物还可以包括一个或多个额外当量的胺或铵种类。这类化合物可以由下式表示:

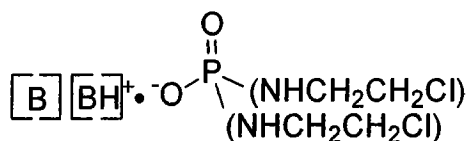
[0064]



[0065] 其中 G 表示第二种铵或胺种类。在具体的实例中,G 为碱性氨基酸且 BH⁺ 表示相同或不同碱性氨基酸的共轭酸。

[0066] 在一个实施方案中,BH⁺ 为 G 的共轭酸。在该实施方案中,所披露的异磷酰胺氮芥盐可以由下式表示:

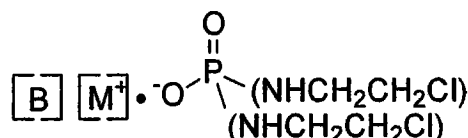
[0067]



[0068] 其中 B 为胺且 BH⁺ 为其共轭酸。

[0069] 在一个实施方案中,本文披露的化合物包括金属阳离子,诸如碱金属阳离子。这类阳离子的实例包括 Li⁺、Na⁺、K⁺ 和 Rb⁺ 和 Cs⁺。在一个方面中,这类实例可以由下式表示:

[0070]



[0071] 其中 M⁺ 表示碱金属阳离子且 B 如上述所定义。

[0072] II. 组合物和方法

[0073] 本说明书的另一个方面包括为对受试者给药制备的药物组合物,优选无菌药物组合物,并且其包括有效量的一种或多种目前披露的化合物。可以通过使 IPM 或其类似物的盐的溶液通过无菌抗微生物滤器制备这类无菌组合物。这类无菌组合物优选包含本发明的活性组分,其中正如通过检测分解副产物诸如磷酸及其盐和取代的乙胺类是否存在所测量的,分解率低于 10%,优选低于 5%,2%,或甚至低于 1% 分解。

[0074] 可以通过口服、局部、透皮、非肠道、通过吸入或喷雾给予本文披露的化合物,并且可以以含有常规无毒药理学上可接受的载体、辅剂和媒介物的剂量单位制剂给药。

[0075] 一般而言,优选通过注射非肠道给予所披露的异磷酰胺氮芥盐及其类似物。抑制剂可以单剂量或长期提供,这取决于具体的疾病、患者的情况、化合物的毒性和作为本领域技术人员公认的其他因素。

[0076] 所给予的化合物或多种化合物的治疗有效量可以根据所需作用和上述因素的不同而改变。

[0077] 用于对受试者给药的药物组合物可以包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等以及所选择的分子。药物组合物还可以包括一种或多种额外的活性组分,诸如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。药物制剂可以包括额外的成分,诸如载体。用于这些制剂的药学上可接受的载体为常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition (1995) 中描述了适合于本文披露的化合物的药物递送的组合物和制剂。

[0078] 一般而言,载体的性质取决于所用的具体给药模式。例如,非肠道制剂通常含有可注射的流体,其包括药学和生理学可接受的流体,诸如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒介物。就固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂或胶囊剂型)而言,常规的无毒性固体载体可以包括,例如药用级甘露糖醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体外,所给予的药物组合物可以含有少量的无毒性辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂和 pH 缓冲剂等,例如乙酸钠或失水山梨醇单月桂酸酯。

[0079] 在一个实施方案中,为对人类受试者给药配制所披露的化合物。在该实施方案的方面中,药物组合物包括约 0.1mg/mL- 约 250mg/mL, 诸如约 20- 约 100mg/mL 的异磷酰胺氮芥盐或其类似物的化合物。

[0080] 在一个方面中,将药物组合物的某些实施方案配制成单位剂型。例如,这类单位剂型在每剂量单位中可以含有约 100mg- 约 1500mg, 诸如约 200mg- 约 1500mg 的所披露的异磷酰胺氮芥盐或其类似物。

[0081] 在某些实施方案中特别关注,通过注射和 / 或植入的长效药物,例如包含多泡脂质体,诸如 DepoFoam (SkyePharma, Inc, San Diego, CA), 递送本发明的化合物(例如,参见 Chamberlain 等 Arch. Neuro. 1993, 50, 261-264; Katri et al. J. Pharm. Sci. 1998, 87, 1341-1346; Ye 等, J. Control Release 2000, 64, 155-166; 和 Howell, Cancer J. 2001, 7, 219-227)。

[0082] 本文披露了用于治疗特征在于异常或病理性增殖活性或瘤形成的病症的方法,通过对受试者给予一种或多种所披露化合物和组合物来进行。“瘤形成”意指异常和不受控制的细胞生长过程。瘤形成为增殖性疾病的一个实例。瘤形成的产物为赘生物(肿瘤),其为因过度细胞分裂导致的组织异常生长。不转移的肿瘤称作“良性的”。侵袭周围组织和 / 或可以转移的肿瘤称作“恶性的”。

[0083] 可以按照所披露的方法治疗的疾病包括那些特征在于异常细胞生长和 / 或分化的疾病,诸如癌症和其它瘤形成状况。可以使用所披露的化合物和组合物治疗的增殖性疾病的典型实例如下所述。

[0084] 可以使用本文披露的化合物和组合物治疗的血液肿瘤的实例包括:白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性白血病、前髓细胞性白血病、粒单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病);

慢性白血病（诸如慢性髓细胞性（粒细胞性）白血病、慢性髓细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病）；真性红细胞增多；淋巴瘤；何杰金病；非何杰金淋巴瘤（缓慢进展和高级别形式）；多发性骨髓瘤；瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；重链病；骨髓增生异常综合征；毛细胞性白血病；和脊髓发育不良。

[0085] 可以使用本文披露的化合物和组合物治疗的疾病的额外的实例包括：实体瘤，诸如肉瘤和癌，包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴样恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、膀胱癌和 CNS 肿瘤（诸如神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤（menangioma）、黑色素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤）。

[0086] 在一个实施方案中，本文披露的化合物对抗 CPA 抗性肿瘤生长优于单独的 CPA 或 Ifos。因此，本文披露的方法的一个方面包括使用本文披露的异磷酰胺氮芥盐或其类似物治疗患有 CPA 抗性瘤形成状况的受试者。

[0087] 在该方法的一个实施方案中，对受试者给予约 0.2mg/kg/天 - 约 20mg/kg/天的所披露的异磷酰胺氮芥盐或其类似物。例如，可以将约 0.5- 约 10mg/kg/天，诸如约 1- 约 7.5mg/kg/天的所披露的化合物给予受试者。

[0088] 在该方法的另一个实施方案中，对受试者给予约 10- 约 700mg/m²/天，诸如约 20- 约 400mg/m²/天或约 100- 约 500mg/m²/天。例如约 30- 约 100mg/m²/天，诸如约 40- 约 90mg/m²/天的所披露的化合物。

[0089] 在本文所披露的用于治疗过度增殖性疾病的方法的一个实施方案中，按照多次每天给药方案对受试者给予所披露的化合物。在这类实施方案中，在至少两天和多至 5 个不同的天数给予所述的化合物。在多次每日给药方案的一个方面中，将所述化合物在连续天对受试者给药，诸如连续 2-5 天。

[0090] 在该方法的一个实施方案中，除目前披露的化合物和组合物外，还对受试者给予一种或多种额外的治疗剂。例如，可以使用的额外的治疗剂包括微管结合剂、DNA 嵌入剂或交联剂、DNA 合成抑制剂、DNA 和 / 或 RNA 转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂和 / 或血管生成抑制剂。

[0091] “微管结合剂”意指与微管蛋白发生相互作用以使微管形成稳定或使其不稳定，由此抑制细胞分裂的活性剂。可以与目前披露的异磷酰胺氮芥盐及其类似物结合使用的微管结合剂的实例包括，但不限于紫杉醇、多西他赛、长春碱、长春地辛、长春瑞滨（诺维本）、埃坡霉素类、秋水仙碱、多拉司他汀 15、诺考达唑、鬼臼毒素和根霉素。还可以使用这类化合物的类似物和衍生物并且它们为本领域技术人员所公知。例如，并入本发明化合物的合适的埃坡霉素和埃坡霉素类似物描述在国际公开号 WO 2004/018478 中，将该文献以参见的方式并入本文。目前认为紫杉烷类，诸如紫杉醇和多西他赛，特别可用作目前披露的化合物中的治疗剂。其它有用的紫杉烷类的实例，包括紫杉醇类似物，教导在 Holton 的美国专利 US 6,610,860、Gurram 等的 US 5,530,020 和 Wittman 等的 US 5,912,264 中。将这些专利各自以参见的方式并入本文。

[0092] 合适的 DNA 和 / 或 RNA 转录调节剂, 包括, 但不限于放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星及其衍生物和类似物, 也适于与目前披露的化合物联用。

[0093] 可以并入所披露的化合物的 DNA 嵌入剂和交联剂包括, 但不限于顺铂; 卡铂; 奥沙利铂; 丝裂霉素, 诸如丝裂霉素 C; 博来霉素; 苯丁酸氮芥; 环磷酰胺; 及其衍生物和类似物。

[0094] 适合于用作治疗剂的 DNA 合成抑制剂包括, 但不限于甲氨蝶呤、5- 氟 -5' - 脱氧尿苷、5- 氟尿嘧啶及其类似物。

[0095] 用于与目前披露的化合物联用的合适的酶抑制剂的实例包括, 但不限于喜树碱、依托泊苷、福美坦、曲古抑菌素及其衍生物和类似物。

[0096] 与目前披露的化合物一起使用的影响基因调节的合适的治疗剂包括导致一种或多种基因表达增加或减少的活性剂, 诸如, 但不限于雷洛昔芬、5- 氮杂胞苷、5- 氮杂 -2' - 脱氧胞苷、他莫昔芬、4- 羟基他莫昔芬、米非司酮及其衍生物和类似物。

[0097] 本文所用的术语“血管生成抑制剂”意指如下分子, 包括, 但不限于生物分子, 诸如起抑制血管生长的作用的肽类、蛋白质、酶、多糖类、寡核苷酸、DNA、RNA、重组载体和小分子。血管发生参与某些病理过程, 诸如那些疾病中涉及的过程, 所述疾病诸如糖尿病性视网膜病、慢性炎症性疾病、类风湿性关节炎、皮炎、银屑病、胃溃疡和大部分类型的人实体瘤。

[0098] 本领域中已知血管生成抑制剂并且合适的血管生成抑制剂的实例包括, 但不限于血管他丁 K1-3、十字孢碱、染料木黄酮、烟曲霉素、甲羟孕酮、苏拉明、干扰素 - α 、金属蛋白酶抑制剂、血小板因子 4、生长抑素、血小板反应蛋白、内皮他丁、沙利度胺及其衍生物和类似物。

[0099] 可以属于或不属于上述分类中的一种或多种其它的治疗剂特别是抗肿瘤剂也适合于与目前披露的化合物联合给药。作为实例, 这类活性剂包括阿霉素、芹菜苷配基、雷帕霉素、zebularine、西咪替丁及其衍生物和类似物。

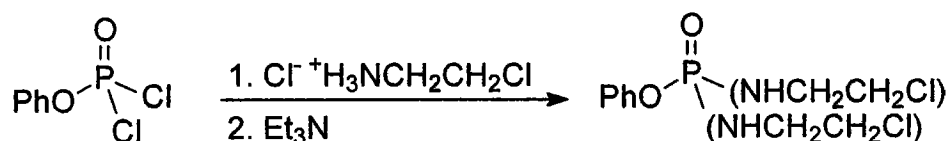
[0100] III. 实施例

[0101] 通过下列非限制性实施例进一步解释上述披露的内容。

[0102] 实施例 1

[0103] 本实施例描述了按照如下方案合成 IPM 的苯基酯。

[0104]



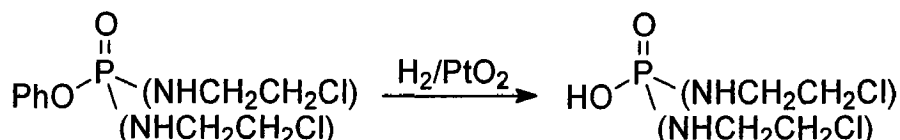
[0105] 向安装了机械搅拌器、500mL 滴液漏斗和氯化钙干燥管的 5L 3 颈圆底烧瓶中悬浮在 1200mL 二氯甲烷中的 2- 氯乙胺盐酸盐 (116g ; 1.0mol) 并且在冰水浴中搅拌。当温度降至 5°C 时, 加入苯基二氯磷酸酯 (105.5g ; 0.5mol) (商购自 Aldrich, Milwaukee, WI)。以每秒 1 滴缓慢滴入三乙胺 (202g, 2mol); 温度不超过 5°C。将该混合物搅拌过夜。第 2 天将 200mL 浓盐酸 (12M) 与 1800mL 水混合。向反应混合物中缓慢加入 200mL 该酸溶液。混合物变澄清并且将其转入 2L 分液漏斗并且分离有机层与水层。用该酸溶液 9×200mL, 随后用水 1×200mL 萃取有机层。然后分离有机层并且用硫酸钠干燥且过滤。然后在减压下蒸发二氯甲烷并且将油残余物溶于 40mL 乙酸乙酯并且搅拌下缓慢加入 60mL 己烷; 然后将其用

石蜡膜覆盖并且保持在 5°C 下的冷藏箱内过夜。次日抽吸过滤白色晶体并且用 100mL 冷己烷洗涤且然后风干。将母液保持在冷藏箱内 9 小时且形成第二批晶体并且使其风干。经冷冻来自第二批的母液过夜形成第三批晶体并且使它们风干。合并批量得到 117.3 克产量；0.39mol。产率为 82%；m. p. 53-55；对 $C_{10}H_{15}Cl_2N_2O_2P$ (F. W. 297.13) 分析的计算值 C, 40.44%；H, 5.09%；N, 9.43%；测定值 C, 39.7%；H, 4.97%；N, 9.00%。

[0106] 实施例 2

[0107] 本实施例描述了由实施例 1 中所述的 IPM 苯基酯合成 IPM(N,N' -二(2-氯乙基)phosphorodiamidic acid(二氨基磷酸))。

[0108]



[0109] 将来自实施例 1 的白色固体酯 (0.39mol) 溶于 100mL 95% 乙醇并且加入到帕尔烧瓶中并且加入 2.5g PtO_2 。在 50PSI 下氢化该混悬液；2 小时后终止氢化并且在搅拌下谨慎加入 2.5g PtO_2 。在 50PSI 下继续氢化 2 小时。然后将其终止，使该体系达到环境压力并且在具有磁性搅拌的加热板上加热。当该混悬液沸腾时，即刻将其通过使用 2 层滤纸的 5.5cm 抽吸漏斗抽吸过滤并且将上清液储存在 5°C 下 2 小时；保存催化剂并且加入到帕尔烧瓶中并且储存在冷藏箱内过夜。将形成的白色固体通过 9cm 抽吸漏斗抽吸过滤并且保存在无杀虫药的瓶内；将母液加入到帕尔烧瓶中并且加入 1.25 克 PtO_2 ，将该体系在 50PSI 下氢化 2 小时。将其终止，如前所述加热并且过滤且将母液保存在冷藏箱内过夜。抽吸过滤形成的白色晶体并且将母液保存在冷藏箱内过夜。抽吸过滤形成的白色晶体并且与第一批合并。将母液收集在装有用过的催化剂的帕尔烧瓶中并且再加入 1.25 克 PtO_2 ，且在 50PSI 下继续氢化 2 小时。然后将其终止，加热并且过滤而产生第三批物质，将其与第 1 和 2 批合并。将合并的批量在 150mL 丙酮中搅拌 30 分钟，然后储存在 5°C 下 2 小时且然后过滤并且储存在真空干燥器内 2 小时。产量为 38g；0.17mol；产率为 44%；mp(校准) 112-114。对 $C_4H_{11}N_2O_2PCl_2$ (F. W. 221.11) 分析的计算值 C, 21.73%；H, 5.01%；N, 12.67%；测定值 C, 22.12%；H 5.02%；N, 12.23%。

[0110] 实施例 3

[0111] 本实施例描述了由按照实施例 2 产生的 IPM 制备 IPM 赖氨酸盐。称取 L-赖氨酸 (26.4g) 并且量取水 (6L)。在 2-8°C 搅拌下向水中加入 L-赖氨酸。称量主体药物物质 IPM (20g) 并且在 2-8°C 搅拌下缓慢加入到赖氨酸溶液中。

[0112] 一旦在 2-8°C 下溶解，就使该溶液通过无菌抗微生物滤器 (0.22 微米)。将该溶液维持在 2-8°C 下并且在无菌条件下分散入小瓶。

[0113] 然后在下列条件下冻干溶解的产物。

[0114]

| 时间 (小时) | 操作 | 温度 (°C) |
|------------|----|------------|
| 0-1 | 加载 | 0-45 |

| | | |
|-------|------|-----|
| 1-7 | 保持 | -45 |
| 7-34 | 初次干燥 | -25 |
| 34-55 | 二次干燥 | -10 |
| 55-76 | 二次干燥 | 0 |
| 76+ | 氮吹洗 | 0 |

[0115] 或者,可以在下列条件下冻干溶解的产物

[0116]

| 时间 (小时) | 操作 | 温度 (°C) |
|------------|------|------------|
| 0-0.5 | 加载 | 0-45 |
| 0.5-6.5 | 保持 | -45 |
| 6.5-33 | 初次干燥 | -25 |
| 33-54 | 初次干燥 | -10 |
| 54-95 | 二次干燥 | 0 |
| 95+ | 氮吹洗 | 0 |

[0117] 按照标准操作步骤在无菌条件下密封小瓶。将冻干的 IPM 赖氨酸盐包装在未打印的带有波纹橡胶密封塞的玻璃瓶中。该容器 / 封闭系统不包括衬垫。负离子电喷射质谱揭示出 $IPM \cdot (LYS)_2$ 在 $M = 219.0, 441.0$ (二聚体) 和 662.7 质量单位 (三聚体) 的特征峰。在附图 2-4 中提供了 D_2O 中的 $IPM \cdot (LYS)_2$ 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 波谱。

[0118] 如上面对赖氨酸盐所述制备 IPM 的环己胺和铵盐。分离这些盐中的每一种,具有 2 : 1 胺 : IPM 的化学计量。

[0119] 实施例 4

[0120] 本实施例描述了 IPM 针对植入小鼠的几种不同癌细胞系的评价。小鼠在每一研究中均充分耐受腹膜内 (IP) 和静脉内 (IV) IPM 治疗;唯一的毒性在于在尸体解剖时观察到的与诱导的肿瘤相关的器官病理学情况。

[0121] 首先,对植入小鼠的两种 L1210 变体 L1210/0 和 L1210/CPA 细胞系评价 IPM,与 Ifos 相比。IPM 的剂量为 Ifos 剂量的 50%。在 L1210/0 处理组中对所有三种活性剂观察到了 ILS。然而,对 L1210/CPA 模型而言,IPM 治疗显示出超过了其它两组 (Ifos vs CPA) 的优越性。在 CPA 抗性肿瘤系中,IPM 治疗的动物在存活率方面具有 2 倍的增加,肿瘤负荷减少 7 倍。就 L1210/0 肿瘤模型而言,IPM 的活性等于 CPA 和 Ifos,但剂量低于它们。这表明 CPA 抗性细胞对 IPM 无交叉抗性。将本研究结果记录在下表 2 中。

[0122]

表 2

[0123] 异磷酰胺氮芥对 L1210/0 和 L1210/CPA 白血病的活性 (来自剂量-响应研究的在 #LD₁₀ 剂量下的最佳反应)

[0124]

| 活性剂 | 剂量 (mg kg ⁻¹) | L1210/0† | | | L1210/CPA† | | |
|------------|------------------------------|-------------------------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------------------|-----------------------|---|
| | | 开始时的肿瘤负荷为 | | | 开始时的肿瘤负荷为 | | |
| | | R _t =8.5 x 10 ⁷ 个细胞 | | | R _t =6.0 x 10 ⁷ 个细胞 | | |
| | | 第60天 | % ILS | Net log ₁₀ | % ILS | Net log ₁₀ | |
| 存活着/ 总数 | (仅死亡的 小鼠) | 疗法后肿瘤负 荷的减少± | (仅死 亡的 小鼠) | 疗法后肿 瘤负荷的 减少± | | | |
| 环磷酰胺 | 200 | 0/10 | + 107 | 7 | 0/10 | + 57 | 4 |
| 异环磷酰胺 | 431 | 0/10 | + 185 | 8 | 0/10 | + 85 | 5 |
| | 289 | 0/9 | + 114 | 8 | 0/10 | + 57 | 4 |
| 异磷酰胺氮芥 | 100 | 0/10 | + 128 | 8 | 1/10 | + 114 | 7 |

[0125] * 治疗 :IP ;仅第 2 天 ;在一系列剂量内的最高无毒性剂量 (LD₁₀ 或 LD₁₀ 以下)。

[0126] † IP ;10⁶ 个细胞,在雄性 CDF₁ 小鼠中。

[0127] 第二项研究证实 IPM 在植入了 Lewis 肺癌肿瘤的小鼠中对 Lewis 肺癌的抑制作用。使用 CPA, Ifos, PM 和 IPM 对荷 Lewis 肺癌小鼠单剂第 2 天 IP 给药揭示出,与在等毒性的等剂量下 Ifos 的 7/10 和 CPA 的 5/10 相比, IPM 产生了 6/10 无瘤的存活者。将单剂量方案用于每种活性剂并且在所有 4 种活性剂之间记录的活性 (T-C) 相同。

[0128] 记录在表 3 中的本研究结果证实 IPM 可有效对抗 Lewis 肺癌。

[0129]

表 3

[0130]

Lewis 肺癌对异磷酰胺氮芥的反应

[0131]

植入物大小 :20-30mg ;植入物部位 :皮下 ;药物治疗 :IP

[0132]

最高无毒性剂量

[0133]

活性剂 方案 (mg kg⁻¹/剂量) 无瘤存活者 T-C* % ILS‡ Log 杀伤总数 δ

[0134]

环磷酰胺 第 2 天

[0135]

单剂量 200 5/10 27 68 > 6.8

[0136]

异环磷酰胺 第 2 天

[0137]

单剂量 300 7/10 18 55 > 4.5

[0138]

磷酰胺氮芥 第 2 天

[0139]

单剂量 200 0/10 4.9 15 1.2

[0140]

第 2 天

[0141]

Q5 分钟 ×7 30 0/10 6.1 17 1.5

[0142]

异磷酰胺氮芥 第 2 天

[0143] 单剂量 100 6/10 8.4 34 > 2.1

[0144]

[0145] * 肿瘤生长延迟 (T-C), 其中 T = 治疗组肿瘤达到预定重量 (750mg) 所需的中数时间 (天数), C 对照组肿瘤的上述时间 (各 120 的中数)。从这些计算中排除无瘤的存活性。

[0146] † 对照组: 死亡的中数天数 = 29; 肿瘤达到 750mg 的时间中数 = 10.4 天; 在 30 只对照小鼠中没有无瘤的存活性。

[0147] ‡ 寿命增加, 不包括存活性。

[0148] δ 根据下式计算 \log_{10} 细胞杀伤 (总数): $\text{Log 杀伤} = T - C \text{ 值} / (3.32T_4)$ 。其中 T_4 为根据成指数生长的对照组肿瘤 (100-400mg 范围) 的最佳拟合直线测定的肿瘤体积 - 倍增时间。在本实验中对 Lewis 肿瘤而言, $T_4 = 1.2$ 。

[0149] 第三项研究评价了 IPM 在抑制 B16 黑素瘤生长中的功效。150mg IPM 的单剂量给药揭示出在这种抗性动物模型中 IPM 稍次于 CPA, 但比 Ifos 好。在三种治疗剂之间的 % ILS 反应之间无统计学差异。记录在表 4 中的本研究结果证实了 IPM 对黑素瘤的功效。

[0150]

表 4

[0151]

皮下 B16 黑素瘤对环磷酰胺、

[0152]

异磷酰胺氮芥、磷酰胺氮芥和异环磷酰胺的反应的比较

[0153]

Rx 剂量 无瘤的存 T-C*

[0154]

活性剂 方案 (mg mg⁻¹) 活者 (天) % ILS

[0155]

环磷酰胺 第 2 天

[0156]

单剂量 200 5/10 27 68

[0157]

异环磷酰胺 第 2 天

[0158]

单剂量 300 7/10 18 55

[0159]

磷酰胺氮芥 第 2 天

[0160]

单剂量 200 0/10 4.9 15

[0161]

第 2 天

[0162]

Q5 分钟 × 7 30 0/10 6.1 17

[0163]

异磷酰胺氮芥 第 2 天

[0164]

单剂量 100 6/10 8.4 34

[0165]

[0166] * 参见上述表 3 的脚注。预定的重量为 750mg。

[0167] 第四项研究评价了 IPM 在抑制小鼠中 P388 白血病中的作用。在该动物模型中, 正如通过 $> \log_{10}$ 细胞杀伤所示的, IPM 对 IP 植入的 P388 白血病的有效性 CPA 和 Ifos 相当, 不过, 它产生的无瘤存活性较少。然而, 对于 P388/CPA 肿瘤模型, IPM 与 CPA 和 Ifos 相比, 在细胞杀伤和 % ILS 方面显著改善。将本研究结果记录在表 5 中。所有数据均具有统计学显著性并且证实 IPM 可以用于对抗 CPA 抗性治疗的肿瘤并且用于使用其它活性剂预防治疗的患者。

[0168]

表 5

[0169] 异磷酰胺氮芥对 P388/0 和 P388/CPA 白血病的活性 (来自剂量 - 响应研究的在 #LD₁₀ 剂量下的最佳反应)

[0170]

| 活性剂 | 剂量 ^a (mg kg ⁻¹) | P388/0† | | | P388/CPA† | | |
|------|-------------------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| | | 第 60 天 存活者 /总数 | % ILS (仅死亡 的小鼠) | Net log ₁₀ 疗法后肿瘤 负荷的减少 | 第 60 天的存 活者/ 总数 | % ILS (仅死 亡的小 鼠) | Net log ₁₀ 疗法后 肿瘤负 荷的减 少± |
| CPA | 265 | 7/10 | + 280 | 7 | 0/10 | + 35 | 3 |
| | 175 | 4/10 | + 130 | 7 | 0/10 | + 35 | 3 |
| Ifos | 538 | 7/10 | + 210 | 7 | 0/10 | + 42 | 4 |
| | 431 | 7/10 | + 130 | 7 | 0/10 | + 39 | 4 |
| IPM | 125 | 0/9 | + 100 | 6 | 0/10 | + 71 | 7 |
| | 100 | 1/10 | + 140 | 7 | 0/10 | + 85 | 7 |

[0171] * 治疗 :IP ;仅第 1 天 ;在一系列剂量内的最高无毒性剂量 (LD₁₀ 或 LD₁₀ 以下)。

[0172] †植入物 :IP ;10⁶ 个细胞,在雌性 CDF1 小鼠中。

[0173] 第五项研究评价了使用 IPM 对小鼠中植入的 M5076 肉瘤的抑制作用。每天将 18-40mg/kg 剂量的 IPM IP 注射入生长中的肿瘤,连续 5 天 (在第 11-15 天每天 IP 注射该化合物)。T-C 为以 40mg/kg 6.1 天。这些剂量得到充分耐受,且反应显著改善。小鼠充分耐受 IP 治疗 ;唯一的毒性是在尸体解剖中观察到的与诱发的肿瘤相关的器官病理学情况。记录在表 6 中的本研究结果证实 IPM 以剂量依赖性方式对肉瘤有效。

[0174] 表 6

[0175] SC 植入的 M5076 肉瘤对使用 IPM 治疗的反应

[0176]

| 活性剂 | 剂量 (mg/kg) | 达到 2 次倍增的天数 | 延迟的天数 (T-C) |
|-----|---------------|-------------|----------------|
| IPM | 40 | 15.4 | 6.1 |
| IPM | 27 | 12.6 | 3.3 |
| IPM | 18 | 10.3 | 1 |

[0177] 第六项研究评价了对小鼠植入的 16/C 乳腺肿瘤的抑制作用。给小鼠植入 16/C 乳腺肿瘤,并且当肿瘤可触及 / 可测量时,用 CPA、Ifos 和 IPM 作为单独的活性剂治疗。将 CPA 和 Ifos 用作 IPM 的对照。从肿瘤植入后第 7 天开始,以 30-60mg/kg/ 天的剂量 IP 给药 4 天。在三种活性剂的所有剂量下,IPM 与 CPA 和 Ifos 相比在活性上具有统计学改善。当与

Ifos 和 CPA 比较以相同剂量/天对抗该侵袭性鼠乳腺肿瘤时, IPM 在‘达到 2 次倍增的天数’和‘天数延迟 (T-C)’ 方面占有优势。所有比例均在置信限范围内。这些数据 (记录在表 7 中) 证实了 IPM 对乳腺肿瘤的功效并且 4 天给药进一步支持了 IPM 多次给药的优越性。

[0178]

表 7

[0179]

| 活性剂 | 剂量 (mg/kg) | 途径 | 方案 | | 达到 2 次倍增的天数 | 天数延迟 (T-C) |
|------|------------|----|---------------|------|-------------|------------|
| 对照 | | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | 对照 | 3.2 | |
| CPA | 60 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | CPA | 7.7 | 4.5 |
| CPA | 50 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 7.2 | 4.0 |
| CPA | 40 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 4.4 | 1.2 |
| CPA | 30 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 3.6 | 0.4 |
| IFOS | 60 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | IFOS | 4.6 | 1.4 |
| IFOS | 50 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 4.9 | 1.7 |
| IFOS | 40 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 3.8 | 0.6 |
| IFOS | 30 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 4.0 | 0.8 |
| IPM | 50 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | IPM | 9.5 | 6.3 |
| IPM | 40 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 8.5 | 5.2 |
| IPM | 30 | IP | Q 1dx 4 第 7 天 | | 7.4 | 4.2 |

[0180] 第七项研究评价了 IPM 对 IP 植入的人 lox-IMVI 黑素瘤的作用。给裸鼠 IP 植入人 Lox 黑素瘤并且使用 CPA 或 IPM 治疗 5 天。两者的剂量均为每天 40mg/kg IV×5 天。CPA 的 % ILS 为 +121, 且 IPM 的 % ILS 为 +52。然而, 观察到了极佳反应并且剂量得到充分耐受。反应在置信水平范围内。本研究结果 (记录在表 8 中) 证实了 IV 给予 IPM 的功效并且进一步证实了 IPM 对人黑素瘤的功效。

[0181]

表 8

[0182]

| 治疗: IV; Q1DX5 (1) | | 治疗反应 | |
|-------------------|---------------|----------|-------|
| 活性剂 | 剂量 (mg/kg/剂量) | 死亡天数的中位值 | % ILS |
| 对照 | - | 19.0 | -- |
| CPA | 40 | 42.0 | +121 |
| IPM | 40 | 29.0 | +52 |

[0183] 第八项研究评价了使用 IPM 对人 MX-1 乳腺肿瘤的抑制作用。从 (植入后) 第 12 天开始每天 ×5 天方案给药, 比较以 40-60mg/kg 每天 IP 给予 CPA、Ifos 或 IPM。记录在表

9 中的数据证实了 IPM 对人乳腺肿瘤具有活性。所有比例均在置信限内。

[0184]

表 9

[0185]

SC MX-1 乳腺肿瘤对使用 CPA、IFOS 和 IPM 治疗的反应

[0186]

| 活性剂 | 剂量 (mg/kg) | 途径 | 方案 | 达到 2 次 倍增的天数 | 天数延迟 (T-C) |
|------|---------------|----|---------------|-----------------|---------------|
| CPA | 60 | IP | Q 1d×5 第 12 天 | > 48.0 | > 40.5 |
| IFOS | 60 | IP | Q 1d×5 第 12 天 | 39.4 | 31.9 |
| IFOS | 40 | IP | Q 1d×5 第 12 天 | 16.1 | 8.6 |
| IPM | 60 | IP | Q 1d×5 第 12 天 | 26.5 | 19.0 |
| IPM | 40 | IP | Q 1d×5 第 12 天 | 14.2 | 6.7 |

[0187] 实施例 5

[0188] 本实施例比较了 IPM 和 IPM · (LYS)₂ 和 IPM · (NH₄)₂ 盐对各种过度增殖性细胞系的功效。

[0189] 从 (植入后) 第 6 天开始, 当通过 IP 途径连续 5 天每天给予 20-125mg/kg 每天 × 5 天剂量的所述化合物时, 比较了 IPM 和 IPM · (LYS)₂ 盐和 IPM · (NH₄)₂ 盐对 Lewis 鼠肺肿瘤的功效。IPM 及其赖氨酸盐在反映出盐的 MTD(mg/kg/ 剂量) 超过母体药物 2- 倍增加的剂量下具有等同活性。所有比例均在置信限范围内。小鼠充分耐受所述盐的 IP 给药; 唯一的毒性是在尸体解剖时观察到的与诱发的肿瘤相关的器官病理学情况。本研究结果 (记录在表 10 中) 证实了 IPM · (LYS)₂ 在抗 Lewis 鼠肺肿瘤方面表现出与 IPM 等效, 并且 IPM · (NH₄)₂ 盐对 Lewis 鼠肺肿瘤有效。

[0190]

表 10

[0191]

Lewis 鼠肺肿瘤

[0192]

| 活性剂 | MTD 剂量 (mg/kg/ 剂量) | T-C (天数) |
|----------|-----------------------|---------------|
| IPM 赖氨酸盐 | 93.2 | 8.3* |
| IPM 铵盐 | 42.8 | 9.1 |
| IPM | 40.0 | 12.5* |

[0193] 植入物 : 20-30mg 肿瘤碎片

[0194] 治疗途径 : 腹膜内

[0195] 方案 : q1d×5 第 6 天开始

[0196] * 尽管 T-C 值具有统计学差异 (P = 0.004), 但是抗肿瘤活性相当。

[0197] 就抑制 MX-1 乳腺肿瘤方面进行 IPM、IPM · (LYS)₂ 盐和 IPM · (NH₄)₂ 盐的功效的第二种比较。在本研究中, 从给小鼠植入 MX-1 乳腺肿瘤后第 12 天开始, 当以 20-100mg/kg 每

天 ×5 天的剂量 IP 给药时,比较了 IPM 和 IPM • (LYS)₂ 盐的作用。IPM • (LYS)₂ 盐在相当的给药剂量下优于 IPM 8- 倍。赖氨酸盐的 MTD 也较高。所有比例均在置信限内。小鼠充分耐受使用 IPM • (LYS)₂ 和 IPM • (NH₄)₂ 盐 IP 治疗;唯一的毒性是在尸体解剖时观察到的与诱发的肿瘤相关的器官病理学情况。本数据(记录在表 11 中)证实 IPM • (LYS)₂ 盐和 IPM • (NH₄)₂ 盐在抗人乳腺肿瘤细胞方面明显优于 IPM。

[0198]

表 11

[0199]

MX-1 人乳腺肿瘤

[0200]

| 活性剂 | MTD 剂量 (mg/kg/ 剂量) | T-C (天数) |
|----------|-----------------------|-------------|
| IPM 赖氨酸盐 | 93.2 | 10.2* |
| IPM 铵盐 | 28.6 | 4.6 |
| IPM | 40.0 | 2.1* |

[0201] 植入物:乳腺脂肪垫中皮下植入 20-30mg 肿瘤碎片

[0202] 治疗途径:腹膜内

[0203] 方案:q1d×5,从第 12 天开始

[0204] *P- 值 = 0.041

[0205] 实施例 6

[0206] 本实施例描述了在对小鼠每天静脉内(快速推注)注射 3 天后异磷酰胺氮芥赖氨酸盐的急性毒性评价。本研究由两期组成。

[0207] 第一期,剂量范围-寻找期由 4 个治疗组组成(1 只小鼠/性别/组),其接受作为每日单剂量连续 3 天的测试制品,各自相应的剂量水平为 100,200,400 和 600mg/kg。媒介物为 0.9%的注射用氯化钠 USP,所有剂量均为 15mL/kg 的恒定体积。在给药后对动物观察 7 天。7 天观察期后,在第 10 天时,将剂量范围-寻找期的所有存活者列在本报告的附录 F 中。基于以 200,400 和 600mg/kg 在剂量范围-寻找期中注意到的死亡数,为主要研究期选择的剂量水平为 50,75,100,200,300,500 和 600mg/kg(参见下文)。

[0208] 第二期主要研究期由 8 个治疗组组成(5 只小鼠/性别/组),其接受每日单剂量连续 3 天的测试制品,各自相应的剂量水平为 50,75,100,200,300,400,500 和 600mg/kg。额外 1 组(5 只小鼠/性别)用作母体化合物的对照组并且以相同方式接受剂量水平为 150mg/kg 的异磷酰胺氮芥母体化合物。媒介物为 0.9%的注射用氯化钠 USP,所有剂量均为 15mL/kg 的恒定体积。在 3 天给药期限后对动物观察 11 天。

[0209] 对所有动物每天两次进行死亡率、发病率和食物与水的利用率的观察。在本研究过程中每天进行临床体征的观察(在第 1,2 和 3 天时给药后约 1 和 4 小时,并且在非给药天时每天 1 次)。在收到后的第 2 天,随机化前和第 -1 和 7 天时测量并记录所有存活动物的体重。还在第 14 天时对主要研究期中所有存活动物测定了体重。在尸体剖检时对每只主要研究动物进行肉眼检查评价(第 15 天)。

[0210] 动物获取和环境适应:

[0211] 在 2003 年 4 月 21 日从 Charles River Laboratories, Portage, Michigan 接收总计 62 只雄性和 61 只雌性 Cr1 :CD-1 (1CR)BR 小鼠 (约 6 周龄)。在 7-16 天的环境适应期中,验证了动物的性别,给动物称重并且每天观察两次一般健康状况和任何疾病征兆。在接收时,使动物以 3-4 只小鼠 / 笼圈养,以便适应自动添水系统。在接收后 3 天,使动物单独圈养。在研究选择前对所有动物给予详细的临床观察。

[0212] 随机化、研究分配和维持:

[0213] 在分配用于研究前,给小鼠称重并且检查疾病迹象和其它身体异常。分配用于研究的动物均具有对每种性别而言平均体重 20% 内的体重。使用简单的随机化操作步骤,使动物进入治疗组。通过二氧化碳吸入对本研究获得的额外动物实施安乐死并且弃去。

[0214] 将 49 只雄性和 49 只雌性小鼠 (在随机化时,称重分别为 24.8-29.1g 和 21.5-24.2g) 分配到表 12 中鉴定的治疗组。

[0215] 给每只动物指定用于 Provantis™ 的动物编号并且植入带有唯一鉴定编号的微芯片。各动物编号、植入物编号或研究编号构成对每只动物而言唯一的鉴定特征。根据动物编号、研究编号、组编号和性别确定笼。如数据所记录的,在本研究过程中验证动物鉴定特征。

[0216] 使动物各自圈养在悬挂的不锈钢金属丝网状笼中。每天提供荧光照射约 12 小时并且通过自动定时器控制。监测温度和湿度并且每天记录,且分别维持在 68-74 °F 和 30-68%。

[0217] 基于获自先前研究的数据选择用于剂量范围 - 寻找期的剂量水平。在回顾来自剂量范围 - 寻找期的结果后设定用于主要研究期的剂量水平,但就 150mg/kg 母体化合物对照组而言,基于获自先前研究的数据选择其剂量水平。

[0218] 表 12

| 组的分配 | | | |
|-----------------------------------------|-----------------|-----|----|
| 组 编号 | 剂量水平 (mg/kg) | 动物数 | |
| | | 雄性 | 雌性 |
| 剂量范围-寻找期^a | | | |
| 1 | 100 | 1 | 1 |
| 2 | 200 | 1 | 1 |
| 3 | 400 | 1 | 1 |
| 4 | 600 | 1 | 1 |
| 主要研究期^b | | | |
| 5 ^c | 150 | 5 | 5 |
| 6 | 50 | 5 | 5 |
| 7 | 75 | 5 | 5 |
| 8 | 100 | 5 | 5 |
| 9 | 200 | 5 | 5 |
| 10 | 300 | 5 | 5 |
| 11 | 400 | 5 | 5 |
| 12 | 500 | 5 | 5 |
| 13 | 600 | 5 | 5 |
| ^a 对动物给药 3 天，随后是 7 天观察期。 | | | |
| ^b 对动物给药 3 天，随后是 11 天观察期。 | | | |
| ^c 对该组给予异磷酰胺氮芥母体化合物(母体化合物对照)。 | | | |

[0219] 给药：

[0221] 4 个范围寻找治疗组 (1 只小鼠 / 性别 / 组) 通过静脉内 (快速推注) 连续 3 天注射接受作为每日单剂量的测试制品, 其相应的剂量水平为 100, 200, 400 和 600mg/kg。所有剂量均为 15mL/kg 的体积并且基于最近的体重。

[0222] 8 个主要研究治疗组通过静脉内 (快速推注) 连续 3 天注射接受作为每日单剂量的测试制品, 其相应的剂量水平为 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 和 600mg/kg。额外的 1 组 (5 只小鼠 / 性别) 用作母体化合物对照组并且以相同方式接受 150mg/kg 剂量水平的异磷酰胺氮芥母体化合物。所有剂量均为 15mL/kg 的体积并且基于最近的体重。

[0223] 在动物受到约束时, 通过插入尾静脉的针头给予给药制剂并且观察针座中是否存在血液以便确保针头适当置于静脉中。然后对每只动物以绝对剂量体积给予剂量。

[0224] 观察和检查：

[0225] 在整个研究持续过程中每天两次对所有小鼠观察发病率、死亡率、损伤和食物与水的利用率。

[0226] 在第 1, 2 和 3 天时, 在给药后 1 和 4 小时并且在非给药天时每天 1 次对每只动物进行详细临床检查。观察包括, 但不限于评价皮肤、皮毛、眼、耳、鼻、口腔、胸腔、腹部、外生殖器、四肢和足、呼吸和循环作用、自主神经效应诸如分泌唾液; 和神经系统作用, 包括震颤、惊厥、对操纵的反应性和异常行为。

[0227] 在收到后第 2 天,随机化前和第 -1 和 7 天时测定并记录所有存活动物的体重。还在第 14 天对主要研究期中所有存活动物测定了体重。对在接收后和随机选择前记录的体重未作报导,但保存在研究文件中。

[0228] 在第 10 天时,对所有剂量范围 - 寻找期的存活动物实施安乐死并且弃去。对任何剂量范围 - 寻找动物均未进行尸体剖检。所有主要研究期的动物在由兽医病理学家批准的操作程序下接受全面尸体剖检。在本研究终止时,通过二氧化碳吸入并且通过腹部腔静脉放血对所有主要研究期的存活动物实施安乐死。

[0229] 对每只动物仔细检查外部异常,包括肿瘤块。从腹侧正中切口折回皮肤并且鉴定任何皮下异常且与死前发现的情况相关联。检查腹腔、胸腔和颅腔的异常并且摘除器官且进行检查。记录所有异常情况。不保存组织并且弃去动物尸体。

[0230] 统计学:

[0231] 如果合适,使用 SAS®中 Probit 程序 (SAS Institute, Inc. SAS/STAT®User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2. Cary NC :SAS Institute ;1989) 计算 LD₅₀ 和 LD₁₀ 及其 95% 置信限 (主要研究治疗组)。

[0232] 将在进行本研究过程中使用的计算机系统列在表 13 中。

[0233]

表 13

[0234]

| |
|----------------------------|
| 计算机系统 |
| In-life System :Provantis™ |
| 随机化 :Provantis™ |
| 病理学 :Provantis™ |
| 统计学分析 :SAS |
| 报告 :SAS 和 |
| Microsoft Office |
| Professional |

[0235] 结果:

[0236] 下列数据为确定的主要研究期的结果。

[0237] 将死亡率结果的总结列在下表 14 中。死亡率结果总体表现出典型的剂量响应作用,其中 IPM 赖氨酸盐的毒性在雌性动物中稍高于在雄性动物中。IPM 母体化合物对照组表现出预期的死亡率,并且在雌性动物中的毒性高于在雄性动物中的毒性,这与来自先前研究的数据相关。

[0238]

表 14

[0239]

| 研究天和累计的死亡率 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|----|---|-------|----------------|-------|-----|-------|
| 剂量水平 (mg/kg) | 研究天(雄性/雌性) | | | | | | | | | | | | | | | | 累计死亡率 | | |
| | 1-5 | | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | | 11 | | 12-14 | | M | F | 总计 |
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | 总计 |
| 150 ^a | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1/5 | 4/5 | 5/10 |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | 0/5 | 0/10 |
| 75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | 0/5 | 0/10 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/5 | 0/5 | 1/10 |
| 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 0/5 | 3/5 | 3/10 |
| 300 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4/5 | 5/5 | 9/10 |
| 400 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5/5 | 5/5 | 10/10 |
| 500 | 0 | 0 | 4 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5/5 | 5/5 | 10/10 |
| 600 | 0 | 0 | 3 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5/5 | 5/5 | 10/10 |

^a 母体化合物对照

^b 在第 12 天时发生的死亡

M - 雄性 F - 雌性

[0240] 在小鼠中(合并的性别)IPM 赖氨酸盐的静脉内 LD₁₀ 计算为 133mg/kg(95%置信限为 65-172),而静脉内 LD₅₀ 计算为 220mg/kg(95%置信限为 184-265mg/kg)。

[0241] 雄性和雌性的 LD₁₀ 值分别为 140 和 179mg/kg(雄性的 95%置信限为 12-199mg/kg;对雌性未能计算),而雄性和雌性的 LD₅₀ 值分别为 247 和 197mg/kg(对雄性的 95%置信限为 187-330;对雌性未能计算)。

[0242] 在死后观察中在任一性别中均未注意到与治疗相关的肉眼发现。

[0243] 结论:

[0244] 死亡率结果总体表现出典型的剂量响应作用,IPM 赖氨酸盐在雌性动物中的毒性稍高于在雄性动物中的毒性。在 50 或 75mg/kg 下无动物死亡;在 100mg/kg 下,10 只动物中有 1 只死亡;在 200mg/kg 下,10 只动物中有 3 只死亡;在 300mg/kg 下,10 只动物中有 9 只死亡;并且在 400,500 和 600mg/kg 下,所有动物死亡。IPM 母体化合物对照组表现出预期的死亡率(10 只动物只有 5 只死亡),并且在雌性动物中的毒性高于在雄性动物中的毒性,这与来自先前研究的可利用的数据相关。在研究时的死亡发作稍延迟,其中在第 6 天时发生首批死亡并且在第 12 天时发生最后一批死亡。在两种性别中均观察到了大体反映出小鼠死亡前恶化状态的临床体征。这些临床体征包括濒死、活动减少、活动增加、肿胀(尾、鼻/口部和/或面部)、呼吸急促/缓慢/浅/困难/听得到、震颤、皮肤摸起来冷、外观蓬乱、姿态弯曲、肢体功能受损、背部和/或肛门生殖器区中的毛发脱色、几乎没有粪便/无粪便

和排尿减少。截止到第 7 天时,在存活动物中注意到与治疗相关的平均体重增加减少或在许多情况中体重减轻,其中到第 14 天时在那些存活至研究终止的动物中至少部分恢复。在尸体剖检时未注意到与治疗相关的肉眼发现。

[0245] 基于本研究的条件和发现,在小鼠中(合并的性别)IPM 2Lys 的静脉内 LD₁₀ 计算为 133mg/kg(95%置信限为 65-172),而静脉内 LD₅₀ 计算为 220mg/kg(95%置信限为 184-265mg/kg)。

[0246] 实施例 7

[0247] 本实施例概括了对 IPM 及其赖氨酸盐的广泛临床前数据结果。该数据用于设计在人体临床试验中使用的剂量方案。

[0248] 已经使用小鼠、大鼠和狗通过临床前急性和亚急性研究研究了 IPM 及其赖氨酸盐的毒性。已经在小鼠和大鼠中研究了 IPM 的单剂量口服、静脉内(IV)和腹膜内(IP)给药途径。在小鼠和狗中研究了多次每日剂量给药-IV 和 IP。在小鼠和狗中的亚-急性静脉内(3-天)给药提供了有关用于设计在人体中的给药和剂量方案的毒性和药物分布的毒理学/药代动力学信息。在小鼠中进行了使用 IPM 赖氨酸盐的亚-急性 IV(3-天)给药。

[0249] 基于剂量范围寻找研究的结果,需要高于预期的剂量的 IPM 产生死亡率。对大鼠而言,雄性的口服 LD₅₀ 值计算为 4443mg/kg,雌性计算为 2786mg/kg 并且两种性别合并计算为 3560mg/kg。在每种情况中,可以计算 95%置信限。

[0250] 就小鼠而言,雄性口服 LD₅₀ 值计算为 1014mg/kg(95%置信限),雌性计算为 1962mg/kg(95%置信限为 1523-2983mg/kg),并且两种性别合并计算为 1432mg/kg(95%置信限为 1128-1742mg/kg)。

[0251] 对大鼠而言,雄性单剂量静脉内 LD₅₀ 值计算为 567mg/kg,雌性计算为 400mg/kg,并且两种性别合并计算为 428mg/kg。在每种情况中,未能计算 95%置信限。就小鼠而言,雄性静脉内 LD₅₀ 值计算为 929mg/kg(95%置信限),雌性计算为 484mg/kg(95%置信限为 72-1364mg/kg),并且两种性别合并计算为 688mg/kg(95%置信限为 398-1366mg/kg)。

[0252] 通过 IV 和 IP 途径给予 IPM 在小鼠、大鼠和狗中确实产生了急性死亡。还评价了对小鼠和大鼠口服给药并且在这些啮齿动物种类中 LD₅₀ 值测定为在 1.4-3.5g/kg 范围。在小鼠、大鼠和狗中的急性静脉内毒性症状包括食欲减少、腹泻、活动减少和死亡。

[0253] 来自三(3)天给药研究的可接受的剂量明显不同于单剂量方案。评价了药物对骨髓、脾和肾小管功能的影响。IPM 对这些器官的影响似乎促成这两类动物的死亡原因。概括如下。

[0254] 在小鼠中的 IPM 亚-急性 IV 研究提供了有关 LD₁₀ 值和人体中可能发生的毒性的信息。死亡率结果表现出典型的剂量响应作用,其中 IPM 在雌性动物中的毒性稍高于在雄性动物中的毒性。

[0255] 小鼠(合并性别)静脉内 IPM 的 LD₁₀ 值计算为 119mg/kg(95%置信限为 87-134mg/kg),而静脉内 LD₅₀ 值计算为 149mg/kg(95%置信限为 132-169mg/kg)。雄性和雌性的 LD₁₀ 值分别为 168 和 125mg/kg,而雄性和雌性的 LD₅₀ 值分别为 176 和 132。在每种情况中,未能计算 95%置信限。

[0256] 亚-急性 IPM 赖氨酸盐研究包括总计 40 只雄性和 40 只雌性小鼠(Cr1:CD-(1CR)BR),在随机化时体重分别为 24.8-29.1g 和 21.5-24.2g),使用 50-600mg/kg IV 每天 × 3 天

的剂量治疗它们（表 8.8）。

[0257] 就 IPM LYS 盐而言,3-天小鼠研究的静脉内 LD₁₀ 计算为 133mg/kg(95%置信限为 65-172mg/kg)(合并性别),而静脉内 LD₅₀ 计算为 220mg/kg(95%置信限为 184-265mg/kg)(合并性别)。雄性和雌性的 LD₁₀ 值分别为 140 和 179mg/kg(雄性的 95%置信限为 12-199mg/kg;对雌性未能计算)。雄性和雌性的 LD₅₀ 值分别为 247 和 179mg/kg(雄性的 95%置信限为 187-330mg/kg;对雌性未能计算)。

[0258] IPM 赖氨酸盐总体表现出典型的剂量响应作用,其中在雌性动物中观察到的毒性稍高。在 50,75 或 200mg/kg 下无小鼠死亡;在 100mg/kg 下,10 只动物中有 1 只死亡;在 300mg/kg 下,10 只动物中有 9 只死亡;并且在 400,500 和 600mg/kg 下,所有小鼠死亡。母体 IPM 对照组表现出预期的死亡率,并且在雌性动物中的毒性高于在雄性动物中的毒性,这与来自先前研究的可利用的数据相关。在研究时的死亡发作稍延迟,其中在第 6 天时发生首批死亡并且在第 12 天时发生最后一批死亡。在两种性别中均观察到了大体反映出小鼠死亡前恶化状态的临床体征。

[0259] 基于显微镜检查的发现,连续 3 天每天单独或作为赖氨酸盐 IV 给予的 IPM 产生了与治疗相关的骨髓耗尽、肾小管坏死或两者的组合并且认为是死亡的原因。就 IPM 而言,在 178mg/kg 和更高剂量下雄性动物中存在严重的骨髓耗尽,并且在 133mg/kg 和更高剂量下,在雌性动物中存在严重的骨髓耗尽。在 237mg/kg 和更高剂量下在雄性动物中出现肾小管坏死,并且在 133mg/kg 和更高剂量下,在雌性动物中出现肾小管坏死。此外,在本研究过程中死亡的大部分雄性动物和所有雌性动物中均注意到了脾淋巴组织耗尽。在 75mg/kg 下,在任一性别中均未注意到明显的与治疗相关的微观发现。观察到了一般继发于死亡前小鼠恶化状态的临床体征,但在存活至研究终止的小鼠中未观察到体重作用的明显证据。

[0260] 连续 3 天每天给予异磷酰胺氮芥 (IPM) 及其赖氨酸盐的静脉内 LD₁₀ 分别计算为 119mg/kg 与 133mg/kg,LD₅₀ 分别计算为 149mg/kg 与 220mg/kg。

[0261] 使用 IPM 及其赖氨酸盐在啮齿动物和狗中进行了急性和亚-急性毒性研究。还将这些研究用于研发可接受的人体研究的起始剂量。将 IV 给予 IPM 的啮齿动物和狗的毒性数据的总结记录在表 15 中并且将 IV 给予 IPM • (LYS)₂ 的小鼠毒性数据的总结记录在表 16 中。

[0262]

表 15

[0263]

| 静脉内治疗经验概括-IPM | | | | | |
|---------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------|-----|--------------------------------|
| 数目和物种 | 剂量、方案和持续时间 | IPM 的总剂量 (mg) | 血浆 IPM | 功效 | 安全性 LD ₅₀ (mg/kg) |
| 47 只大鼠 | 400-2,000 mg/kg; iv x 1d | 81.6-650 | 未测试 | 未测试 | 428 |
| 40 只小鼠 | 100-1,200 mg/kg; iv x 1d | 3.2-36 | 未测试 | 未测试 | 688 |
| 80 只小鼠 | 75-562 mg/kg; iv 每天 x 3 天 | 5.7-60.6 | 未测试 | 未测试 | 149 |
| 14 只狗 | 1-100 mg/kg/d; iv 每天 x 3 天 | 22.5-2130 | 100 mg/kg/天 x 3 天 (C _{max} :25-78 mcg/ml) | 未测试 | 1-5 mg/kg/天 x 3 天 (100%存活率) |

[0264]

表 16

[0265]

静脉内 IPM 赖氨酸盐

[0266]

| 数目和物种 | 剂量、方案和持续时间 | IPM 的总剂量 (mg) | 血浆 IPM | 功效 | 安全性 LD ₅₀ (mg/kg) |
|--------|------------------------------|---------------|--------|-----|------------------------------|
| 80 只小鼠 | 50-600mg/kg/d; iv 每天 ×3 天 | 4.3-80 | 未测试 | 未测试 | 220 |

[0267] 狗的 IPM MTD 为 5mg/kg/天 ×3 天,且在人体中相应的起始剂量 100mg/m²/天连续三 (3) 天应是安全的起点。就 IPM • (LYS)₂ 而言,在 小鼠中静脉内三 (3) 天剂量方案的 LD₁₀ 计算为 133mg/kg/天 ×3 天。认为 IPM • (LYS)₂ 是具有陡峭治疗范围的最低毒性的烷化剂。基于 mg/kg,该赖氨酸盐在人体中的平均毒性剂量 (MTD) 估计为在 小鼠中 LD₁₀ 的 1/10 或 40mg/m²/d。

[0268] 将估计的相当的人 IV 剂量记录在表 17 中。

[0269]

表 17

[0270]

估计的相当的人静脉内剂量

[0271]

| 药物 | 物种 | 亚 - 急性 IV LD ₁₀ | 相当的人 IV 剂量 |
|----------|----|----------------------------|-------------------------|
| IPM | 小鼠 | 119mg/kg/d | 30mg/m ² /d |
| IPM | 狗 | 5mg/kg/d | 100mg/m ² /d |
| IPM 赖氨酸盐 | 小鼠 | 133mg/kg/d | 40mg/m ² /d |

[0272] 实施例 8

[0273] 本实施例描述了在具有转移性卵巢癌的人体受试者中进行的癌症治疗。

[0274] 连续 3 天每天通过静脉内输注用 IPM 500mg/m² 治疗受试者。使用补充的电解质纠正其血清电解质, 诸如磷和氯, 7 天后中断。监测 BUN 和肌酸酐在正常范围。

[0275] 实施例 9

[0276] 本实施例描述了使用 IPM • (LYS)₂ 治疗人体受试者的结果。到目前为止, 已经使用 IPM • (LYS)₂ 治疗了具有晚期癌症的四 (4) 位患者。

[0277] IPM 赖氨酸盐的初始剂量为 30mg/m², 每天通过静脉内给药, 连续三 (3) 天。每 21-28 天增加剂量治疗 1 位患者 (组) 以便使毒性显现。如果没有严重的毒性事件, 那么就将剂量增加 40%。已经治疗了 4 位患者 - 每种剂量 1 位患者 - 30, 42, 59 和 83mg/m², 每天通过 IV 给药, 连续 3 天, 无严重毒性。在通过每天 IV 给予 83mg/m² IPM • (LYS)₂ 3 天后, 1 位具有直肠癌的患者的疾病保持稳定。

[0278] 实施例 10

[0279] 本实施例描述了对进展成转移性浸润性中度分化腺癌的非小细胞肺癌的治疗。可以通过 CAT 扫描证实该病的状态。

[0280] 以每天 350mg/m² 连续 3 天静脉内给药异磷酰胺氮芥赖氨酸盐。在 21- 天休整期后, 重复 1 次该 3- 天治疗方案。在治疗过程中监测每天血液流体化学和血液学研究。通过 CAT 扫描监测癌症状态。

[0281] 实施例 11

[0282] 本实施例证实了胺盐形成对化合物稳定性的作用。

[0283] 在不同条件下储存冻干的异磷酰胺氮芥及其赖氨酸盐样品并且检测纯度。将结果列在下表中:

[0284]

| 化合物 | 0 个月 | 1 个月 | 3 个月 | 1 年 |
|----------------|------|------|------|------|
| IPM, -23°C | 97% | 88% | 70% | |
| IPM-LYS, -23°C | 98% | | 98% | 100% |
| IPM-LYS, 环境 | 98% | 98% | 65% | |

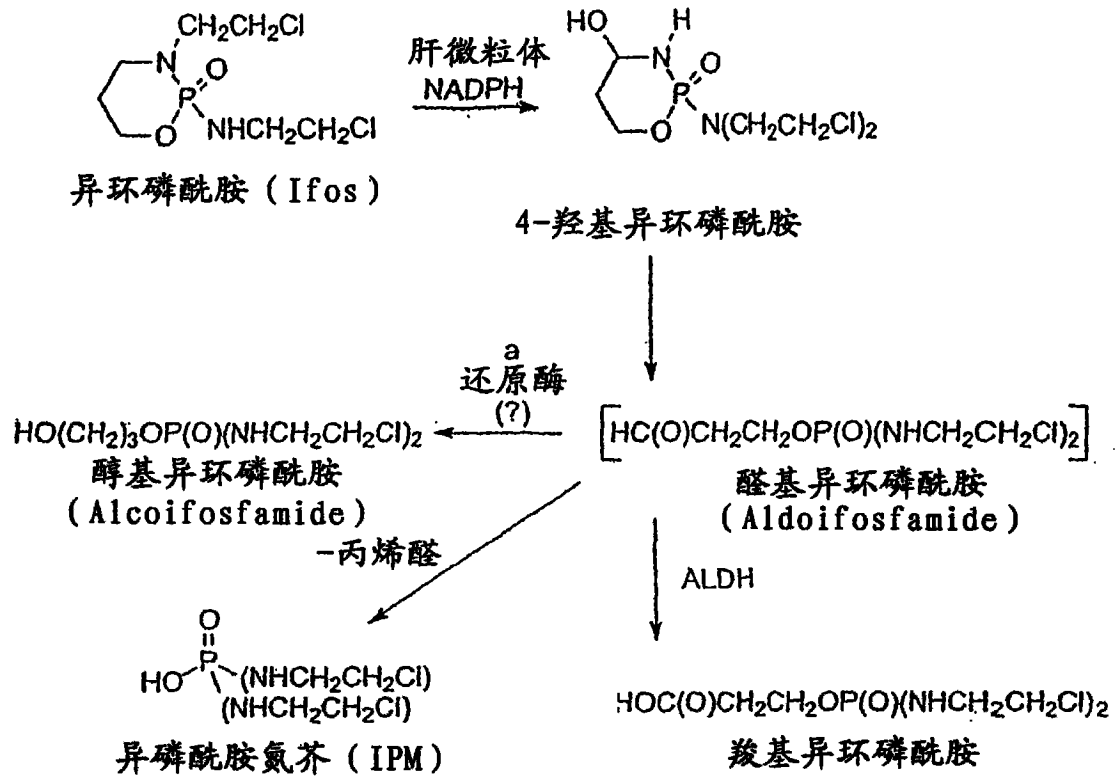


图 1

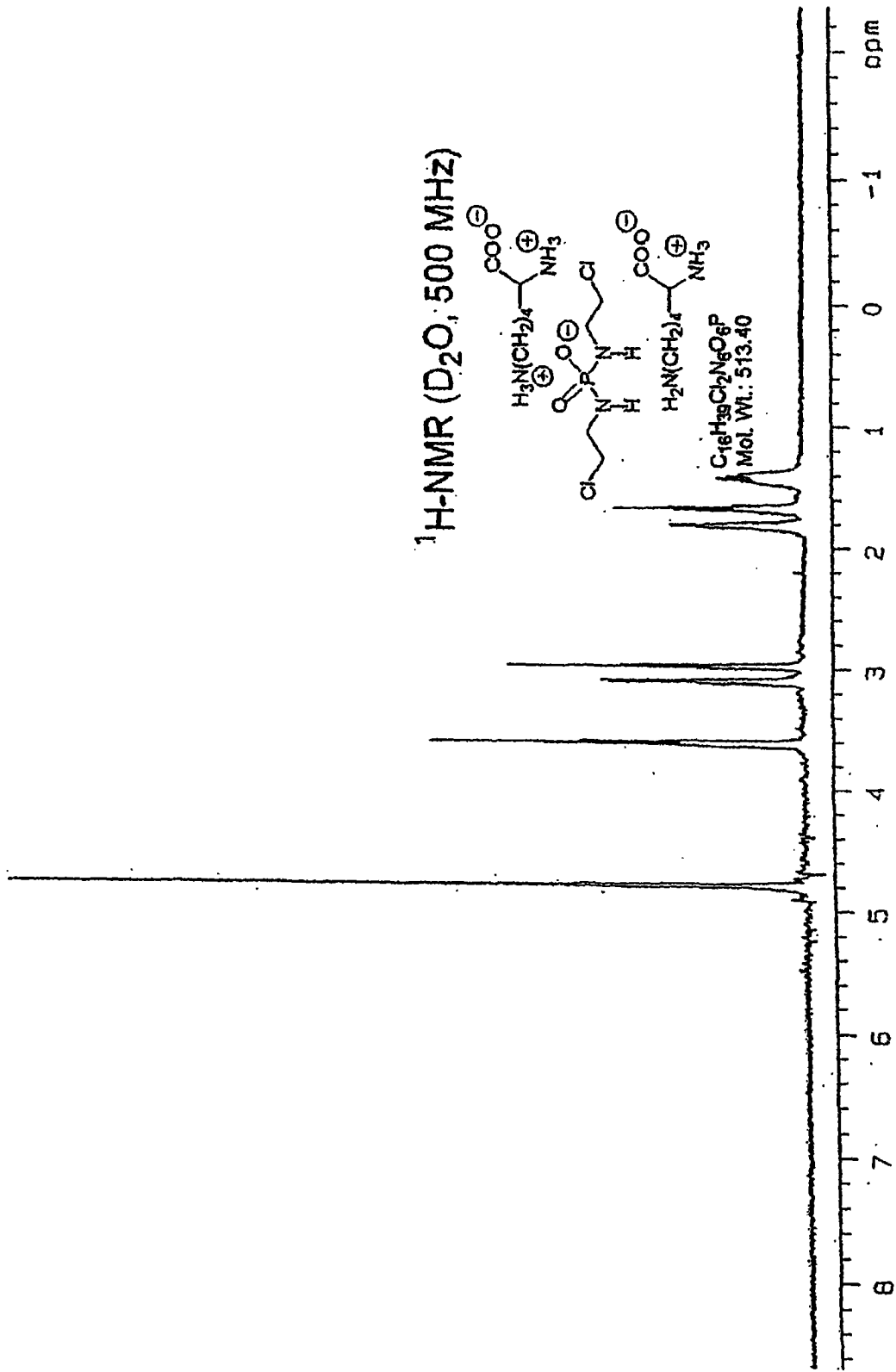


图2

