

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；1998 年 03 月 30 日； 09/050,662

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

概略而言本發明係關於用於治療腫瘤、自體免疫病及再狹窄之醫藥組合物領域。本發明亦係關於抗癌劑之醫藥製劑領域，例如帕克里達瑟爾(紫杉酚(Taxol))及杜西達瑟爾(紫杉萜(Taxotere))，特別藉接合藥物至水溶性部分使帕克里達瑟爾變成水溶性。

【先前技術】

帕克里達瑟爾為一種抗微細管劑，萃取自太平洋紫杉樹一短葉紅豆杉(*Taxus brevifolia*)--之針葉及樹皮，顯示用於人體癌症之第 I 期研究及第 II 及 III 期早期試驗具有顯著抗腫瘤效果(Horwitz 等人，1993)。報告主要用於惡化的卵巢癌及乳癌。用於小細胞及非小細胞肺癌、頭頸癌及轉移性黑素瘤於文獻也記載具有顯著活性。但帕克里達瑟爾開發用於臨床試驗之主要困難為其不溶於水。

杜西達瑟爾係由 10-去乙醯基漿果赤黴素 III，一種非細胞毒性前驅物萃取自歐洲紅豆杉(*Taxus baccata*)針葉且以化學合成支鏈酯化半合成生產(Cortes 及 Pazdur, 1995)。多種癌細胞系包括乳癌、肺癌、卵巢癌及結腸直腸癌，及黑素瘤皆顯示對杜西達瑟爾有反應。臨床試驗中，杜西達瑟爾用於乳癌、卵巢癌、頭頸癌及惡性黑素瘤可獲得完整或部分效果。

帕克里達瑟爾典型配方為濃溶液含有帕克里達瑟爾，6 毫克／毫升克莫佛(Cremophor)EL(聚氧乙基化蓖麻油)及

脫水醇 (50 % v/v) , 投藥前須進一步稀釋 (Goldspiel, 1994) 。帕克里達瑟爾 (紫杉酚) 用於人體癌症包括乳癌、卵巢癌、非小細胞肺癌及頭頸癌顯示顯著活性 (Rowinsky 及 Donehower, 1995) 。用於患有惡化乳癌且已經使用多種化學治療劑治療之病人也顯示顯著活性 (Foa 等人, 1994) 。但如同大半化學治療劑般, 帕克里達瑟爾的最大忍受劑量受其毒性所限。用於人體, 帕克里達瑟爾於 100-250 毫克/平方米劑量的主要毒性為粒狀血球減少 (Holmes 等人, 1995) ; 症候性周邊神經病變為其主要非血液方面毒性 (Rowinsky 等人, 1993) 。

輸送需要量之帕克里達瑟爾之克莫佛 EL 用量顯著於高於任何其它使用克莫佛配方的藥物。數種毒性係來自於克莫佛, 包括血管擴張、呼吸困難及血壓下降。此種賦形劑也顯示於實驗動物及人體引發嚴重過敏 (Weiss 等人, 1990) 。事實上, 藉靜脈大劑量注射投予小鼠之最大帕克里達瑟爾劑量係受克莫佛賦形劑之臨床致死毒性所限 (Eiseman 等人, 1994) 。此外, 克莫佛 EL 為界面活性劑已知可由聚乙烯基氯袋及靜脈投藥管路中滲濾出酶酸酯增塑劑如二 (2-乙基己基) 酶酸酯 (DEHP) 。已知 DEHP 引起動物肝毒性而對齧齒類動物具有致癌性。此種帕克里達瑟爾製劑也顯示隨著時間的經過形成粒狀物質, 如此在投藥前需要過濾 (Goldspiel, 1994) 。因此對帕克里達瑟爾溶液劑的製備及投藥上需要特別注意才能安全地投藥病人, 此等要求無可避免地造成成本增高。

先前嘗試獲得水溶性帕克里達瑟爾包括製備帕克里達瑟爾前藥, 係經由將增溶部分如丁二酸酯, 磺酸, 胺基

酸類及磷酸鹽衍生物置於 2'-羥基或 7-羥基位置 (Deutsch 等人, 1989; Mathew 等人, Zhao 及 Kingston, 1991, 1992; Nicolaou 等人, 1993; Vyas 等人, 1995, Rose 等人, 1997)。雖然若干前藥具有充分水中溶解度, 但少數仍具有可媲美親代藥物的抗腫瘤活性 (Deutsch 等人, 1989; Mathew 等人, 1992; Rose 等人, 1997)。若干衍生物由於中性 pH 之水溶液中不穩定, 故不適合靜脈注射。例如 Deutsch 等人 (1989) 報告帕克里達瑟爾之 2'-丁二酸酯衍生物, 但鈉鹽之水中溶解度僅約 0.1%, 三乙醇胺鹽及 N-甲基麩胺鹽溶解度僅約 1%。此外, 據報告胺基酸酯不穩定。類似結果亦由 Mathew 等人 (1992) 報告。

晚近 Nicolaou 等人 (1993) 報告合成及於試管試驗生物評估一類新穎稱作「原紫杉酚 (protaxols)」之前藥。此等化合物具有較高水中溶解度, 經由分子內水解機轉轉成帕克里達瑟爾作為活性藥物。但無法獲得原紫杉酚抗腫瘤活性之活體試驗資料。Greenwald 等人報告合成高度水溶性帕克里達瑟爾之 2'-及 7-聚乙二醇酯 (Greenwald 等人, 1994)。使用聚合物鏈聯策略, 其它仍開發水溶性聚乙二醇 (PEG)-接合帕克里達瑟爾 (Li 等人, 1996; Greenwald 等人, 1996)。雖然此等接合物之水溶性絕佳, 但其療效不優於自由態帕克里達瑟爾。此外, PEG 於聚合物鏈各端僅有兩個反應性官能基, 如此有效限制 PEG 所能攜帶的帕克里達瑟爾 (U.S. 5,362,831)。

其它嘗試解決此等問題包括將帕克里達瑟爾微包囊於脂小體及微球 (Bartoni 及 Boitard, 1990)。脂小體配方據報告如同自由態帕克里達瑟爾般有效, 但唯有含低於 2

% 帕克里達瑟爾的脂小體配方才具有物理穩定性 (Sharma 及 Straubinger, 1994)。不幸，微球配方證實有毒。因此仍然需要有一種水溶性帕克里達瑟爾配方其可輸送有效量之帕克里達瑟爾及杜西達瑟爾，而無藥物不溶性引發的缺點。

廣泛使用帕克里達瑟爾之另一障礙為帕克里達瑟爾的生產來源有限，造成帕克里達瑟爾之治療昂貴。例如每個療程達數千美元。另一缺點為並非全部腫瘤皆對帕克里達瑟爾治療有效，原因可能為帕克里達瑟爾無法進入腫瘤內部之故。因此，迫切需要一種有效帕克里達瑟爾及相關藥物配方，其為水溶性且具有長血清半生期用於治療腫瘤，自體免疫病如類風濕性關節炎，以及防止血管受到創傷例如血管成形術及植入移植模後再狹窄。

【發明內容】

本發明追求克服此等及其它先前技術之特有缺點，經由提供組合物包括一種化學治療藥及／或抗血管生成藥如帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類藥物接合至水溶性聚合物如水溶性聚胺基酸，或接合至水溶性金屬螯合劑。本發明之另一具體例為一種包含帕克里達瑟爾及聚麩胺酸之接合物的組合物於動物模式時具有驚人的抗腫瘤活性，且又此種組合物於此處驗證為一種新穎紫杉烷 (taxane)，其具有與帕克里達瑟爾不同的醫藥性質。此等組合物顯示作為抗腫瘤劑對範例腫瘤模式具有驚人效果，預期至少如同帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類藥物對已知紫杉烷類或紫杉類有效的疾病或病情同等有效。本發明組合物提供水溶性紫杉類藥物可克服

藥物本身不溶性關聯的缺點，也提供改良效果及控制釋放之優點，故以動物模式說明之腫瘤於單次靜脈投藥如提供新穎紫杉烷後被清除。聚-(1-麩胺酸)接合帕克里達瑟爾於後述實例中顯示具有新穎藥物活性；此外具有改良之輸送至腫瘤及提供控制釋放。

此處所述方法也包括製造其它治療劑、對比劑及藥物之水溶性聚合物接合物，包括帕克里達瑟爾，塔莫西芬(taxoxifen)，紫杉萜，伊托賽(etoposide)，丹托賽(teniposide)，富達必(fludarabine)，多索汝必辛(doxorubicin)，道諾黴素(daunomycin)，伊莫定(emodin)，5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)，FUDR，雌二醇(estradiol)，喜樹鹼(camptothecin)，維生素A酸類(retinoids)，維洛密(verapamil)，伊波西隆(epothilones)，環孢靈(cyclosporin)，及其它紫杉類(taxoids)。特別，具有自由羥基之藥劑藉此處對帕克里達瑟爾所述類似化學反應接合至聚合物。此種接合為化學業界人士眾所周知，如此不屬於本發明之請求專利範圍。該等藥劑包括但非限於伊托賽，丹托賽，喜樹鹼及伊波西隆。如此處使用，接合至水溶性聚合物表示藥物共價接合至聚合物或螯合劑。

亦須了解本發明之水溶性接合物可連同其它藥物包括其它抗腫瘤劑或抗癌劑投藥。此種組合為業界眾所周知。水溶性帕克里達瑟爾，杜西達瑟爾或其它紫杉類，或於本發明之較佳具體例中，聚-(1-麩胺)酸接合帕克里達瑟爾(PG-TXL)於某些治療類型可合併鉑藥物、抗腫瘤劑如多索汝必幸或道諾黴素(daunorubicin)或其它與紫杉酚

合併使用之藥物或合併外部或內部放射線照射，換言之由外部來源或由系統性例如注射或舌服放射性質如含放射性同位素配方投予放射線治療。

化學治療藥與聚合物接合為降低身體毒性及改良治療指數之具有吸引力的辦法。分子量大於 30kDa 之聚合物不易擴散通過正常微血管及腎絲球體內皮，因此正常組織幾乎不會受到不相關藥物媒介之毒性 (Maeda 及 Matsumura, 1989; Reynolds, 1995)。它方面，已經確定惡性腫瘤具有病害之微血管內皮且比正常組織血管系有較大之滲透性 (Maeda 及 Matsumura, 1989; Fidler 等人, 1987)。腫瘤常缺乏淋巴血管系來去除滲透入腫瘤組織內部的大分子 (Maeda 及 Matsumura, 1989)。如此聚合物-藥物接合物通常可保留於血管系由血管中選擇性滲濾進入腫瘤內部，結果導致腫瘤內堆積活性治療藥。水溶性聚合物例如較佳具體例之 PG-TXL 具有與未接合藥物 (亦即帕克里達瑟爾) 不同的藥理性質。此外聚合物-藥物接合物可作為長效藥物用於持續釋放，使腫瘤細胞長期暴露於藥物。最後，水溶性聚合物 (例如水溶性聚胺基酸) 可用於穩定藥物，以及增溶其它不可溶之藥物。目前已經檢驗多種合成及天然聚合物之促進腫瘤特異性藥物輸送的能力 (Kopecek, 1990, Maeda 及 Matsumura, 1989)。但據發明人所知僅有少數目前正在進行臨床評估包括日本之 SMANCS 及英國之 HPNA-Dox (Maeda, 1991; Kopecek 及 Kopeckova, 1993)。

本發明揭示內容中，需了解紫杉類包括帕克里達瑟爾類及杜西達瑟爾等化合物，以及其它具有紫杉烷主幹的

化合物 (Cortes 及 Pazdur, 1995), 可由天然來源如杉木、由細胞培養或化學合成分子分離; 較佳紫杉烷為具化學通式 $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 之化學品包括 [2aR- [2a α , 4 β , 4 $\alpha\beta$, 6 β , 9 α (α R*, β S*), 11 α , 12 α , 12a α , 12b α]] - β (苯甲醯胺基) - α - 羥苯丙酸 6, 12b-貳 (乙醯氧) - 12- (苯甲醯氧) - 2a, 3, 4, 4a, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b-十二氫 - 4, 11-二羥 - 4a, 8, 13, 13-四甲基 - 5-氧基 - 7, 11-低甲基 - 1H-環癸 [3, 4] 苯并 - [1, 2-b] 一氧肆園 - 9-基酯。需了解帕克里達瑟爾及杜西達瑟爾比其它對抗某型腫瘤之藥物更有效, 於本發明實務中, 對特定紫杉類較為敏感的腫瘤將使用該種水溶性紫杉類或紫杉烷接合物治療。

於帕克里達瑟爾接合至水溶性金屬螯合劑之具體例中，組合物進一步包含至螯合金屬離子。本發明之螯合金屬離子可為任一種離子形式包括鋁，硼，鈣，鉻，鈷，銅，鐳，銦，鎢，釅，釷，鈾，鈹，鎂，錳，鎳，鉑，銻，銩，釷，釕，鈰，鈉，鉍，鈦，錫，釷或鋅。若干較佳具體例中，螯合金屬離子為放射性核種，亦即所列舉金屬之一之放射性同位素。較佳放射性核種包括但非限於 ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , $^{114\text{m}}\text{Sn}$ 及 $^{193\text{m}}\text{Pt}$ 。

用於本發明實務之較佳水溶性螯合劑包括但非限於二伸乙基三胺五乙酸 (DTPA)，伸乙基二胺四乙酸 (EDTA)，1,4,7,10-吡環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸酯 (DOTA)，四吡環十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸 (TETA)，羥亞乙基二膦酸酯 (HEDP)，二巯丁二酸 (DMSA)，二伸乙基三胺四亞甲基膦酸 (DTTP) 及 1-(對-胺基苄基)-DTPA，1,6-二胺基

己烷-N,N',N',N'-四乙酸，DPDP，及伸乙基貳(氧伸乙基脞基)-四乙酸，以 DTPA 為最佳。本發明之較佳具體例亦為包含獎 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾及 Na-DTPA-帕克里達瑟爾之組合物。

本發明之若干具體例中，帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類可接合至水溶性聚合物，聚合物較佳接合至帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類之 2' 或 7-羥基或二者。聚-麩胺酸(PG)為可於本發明提供若干優點之聚合物。首先，含有大量分支鏈羧基官能基可供藥物附接。第二，PG 易由溶小體酶分解成為其無毒基本成分：L-麩胺酸，D-麩胺酸及 DL-麩胺酸。最後，據報告麩胺酸納可防止帕克里達瑟爾誘發神經病變的表現，如此可忍受更高劑量帕克里達瑟爾(Boyle 等人，1996)。較佳聚合物包括但非限於聚(L-麩胺酸)，聚-(D-麩胺酸)，聚(DL-麩胺酸)，聚(L-天冬酸)，聚(D-天冬酸)，聚(DL-天冬酸)，聚(L-離胺酸)，聚(D-離胺酸)，聚(DL-離胺酸)，前述聚胺基酸與聚乙二醇、聚己內酯、聚乙醇酸、及聚乳酸之共聚物，以及聚(2-羥乙基 L-麩胺)，角質聚糖，羥甲基葡萄糖聚糖，玻璃酸，人血清白蛋白及褐藻酸；其中以聚麩胺酸為特佳。於分子量之低限，本發明之聚合物較佳具有分子量約 1,000，約 2,000，約 3,000，約 4,000，約 5,000，約 6,000，約 7,000，約 8,000，約 9,000，約 10,000，約 11,000，約 12,000，約 13,000，約 14,000，約 15,000，約 16,000，約 17,000，約 18,000，約 19,000，約 20,000，約 21,000，約 22,000，約 23,000，約 24,000，約 25,000，約 26,000，約 27,000，約 28,000，約 29,000，

約 30,000，約 31,000，約 32,000，約 33,000，約 34,000，
 約 35,000，約 36,000，約 37,000，約 38,000，約 39,000，
 約 40,000，約 41,000，約 42,000，約 43,000，約 44,000，
 約 45,000，約 46,000，約 47,000，約 48,000，約 49,000，
 至約 50,000kd。於分子量之高限，本發明之聚合物較佳
 具有分子量約 51,000，約 52,000，約 53,000，約 54,000，
 約 55,000，約 56,000，約 57,000，約 58,000，約 59,000，
 約 60,000，約 61,000，約 62,000，約 63,000，約 64,000，
 約 65,000，約 66,000，約 67,000，約 68,000，約 69,000，
 約 70,000，約 71,000，約 72,000，約 73,000，約 74,000，
 約 75,000，約 76,000，約 77,000，約 78,000，約 79,000，
 約 80,000，約 81,000，約 82,000，約 83,000，約 84,000，
 約 85,000，約 86,000，約 87,000，約 88,000，約 89,000，
 約 90,000，約 91,000，約 92,000，約 93,000，約 94,000，
 約 95,000，約 96,000，約 97,000，約 98,000，約 99,000，
 約 100,000kd。此等範圍內聚合物之分子量較佳於約 5,000
 至約 100,000kd 之範圍，以約 20,000 至約 80,000 為佳，
 或甚至以約 25,000 至約 50,000 為更佳。

本發明之另一方面為本發明組合物如 PG-TXL 也可接合
 至第二親脂性或不良溶解性抗腫瘤劑如喜樹鹼，伊波西
 隆，西普定(cisplatin)，梅法蘭(melphalan)，紫杉萜，
 伊托賽，丹托賽，富達必，維洛密，或環孢靈(舉例)，
 或甚至結合至水溶性劑如 5-氟尿嘧啶(5 FU)或氟去氧尿
 苷(FUDR)，多索汝必辛或道諾黴素。

需了解本發明組合物可分散於下述醫藥可接受性載劑
 溶液。此等溶液為無菌或具防腐性，且包括水、緩衝液、

等張劑及業界已知投予動物體或人體時不會引起過敏或其它有害反應的成分。因此，本發明也可敘述為醫藥組合物包含化學治療劑或抗癌藥如帕克里達瑟爾，杜西達瑟爾或其它紫杉類接合至高分子量水溶性聚合物或螯合劑。醫藥組合物包括聚乙二醇，聚麩胺酸類，聚天冬胺酸類，聚離胺酸或螯合劑，較佳 DTPA。也需了解放射性核種可用作抗腫瘤劑或藥物，及本醫藥組合物可包括治療量之螯合放射性異構物。

若干具體例中，本發明可描敘述為一種決定腫瘤組織攝取化學治療藥如帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類之方法。此種方法包含獲得藥物與帶有螯合金屬離子之金屬螯合劑之接合物，腫瘤組織接觸組合物，及檢測螯合金屬離子於腫瘤組織的出現情況。腫瘤組織存有螯合金屬離子表示被腫瘤組織攝取。螯合金屬離子可為放射性核種，其檢測為閃爍攝影術。腫瘤組織也可含於動物體或人體而將組合物投予該個體。

本發明於若干具體例也可描述為於個體治療腫瘤之方法。該方法包括獲得一種組合物包含化學治療藥如帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類接合至水溶性聚合物或螯合劑，及分散於醫藥可接受性溶液，將該溶液以可有效治療腫瘤用量投予個體。較佳組合物包含帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類接合至水溶性聚胺基酸，包括但非限於聚(1-天冬胺酸)，聚(d-天冬胺酸)，聚(d1-天冬胺酸)，聚(1-離胺酸)，聚(d-離胺酸)，或聚(d1-離胺酸)，及更佳接合至聚(1-麩胺酸)，聚-(d-麩胺酸)，或聚(d1-麩胺酸)。需了解本發明組合物可有效對

抗任何未接合紫杉類已經顯示有效之癌症，包括但非限於乳癌、卵巢癌、惡性黑素瘤、肺癌、頭頸癌。本發明組合物也可用於對抗胃癌、攝護腺癌、結腸癌、白血病、或卡波西氏肉瘤。如此處使用「治療」癌症一詞需了解表示任何患有腫瘤的個體之醫事處置。該詞包括抑制腫瘤生長或轉移，或任何嘗試抑制、減慢或阻止腫瘤生長或轉移。該方法包括藉細胞死亡之非細胞凋零程序(apoptotic)以及細胞凋零程序機轉殺死癌細胞。腫瘤治療方法包括於投予治療藥物前預先使帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾攝取於腫瘤，使用方法包括但非限於大劑量注射或輸注，以及動脈內、靜脈、腹內或腫瘤內部投予藥物。

此種方法包括前述任何造影技術，其中帕克里達瑟爾-螯合劑-螯合金屬投予個體並於腫瘤檢測。此步驟提供具成本效益之方式決定特定腫瘤，因藥物未到達腫瘤而不期待該種腫瘤對 DTPA-帕克里達瑟爾治療無效。預期造影技術可用於預測對帕克里達瑟爾的反應以及識別可能反應的病人，可節省重大費用及關鍵時間。假設若無合理量之化學治療劑沈積於腫瘤，則腫瘤對該藥劑的反應相當小。

本發明之若干具體例可描述為獲得個體身體造影之方法。身體造影之獲得方式係投予有效之放射性金屬離子螯合至帕克里達瑟爾-螯合劑接合物，並測量放射性金屬之閃爍攝影信號來得知影像。

本發明也可於某些廣義方面描述為減少至少一種全身性自體免疫症狀之方法，包含對患有全身性自體免疫病

病人投予有效量之組合物包含帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾拘侖至聚合物，以聚胺基酸為較佳，而以聚麩胺酸為更佳。特別令人感興趣之揭示內容為治療類風濕性關節炎，其已知於某些病例中當投予標準克莫佛配方時，對帕克里達瑟爾有效(美國專利 5,583,153，併述於此以供參考)。如同治療腫瘤，預測本發明之水溶性紫杉類或紫杉烷之效果不會因接合至水溶性部分而消失。因此，本發明之組合物預期對類風濕性關節炎如同帕克里達瑟爾般有效。帕克里達瑟爾為抗血管生成劑。類風濕性關節炎產生新形成的血管積聚而彌爛鄰近關節。也需了解本發明之紫杉類或紫杉烷組合物可合併其它藥物使用，例如血管生成抑制劑(AGM-1470)(Oliver 等人，1994)或其它腫瘤藥如梅索瑞(methotrexate)。

發現帕克里達瑟爾也可於汽球血管成形術後抑制再狹窄，指示本發明之水溶性帕克里達瑟爾及杜西達瑟爾可有多種超出直接腸外投藥的用途(WO 9625176，併述於此以供參考)。例如預測水溶性帕克里達瑟爾可用作植入醫療裝置的塗層，如管路、分流管、導管、人工植入物、針、電力植入物例如心跳節律器，及特別動脈或靜脈移植模包括可藉汽球擴張的移植模。此等具體例中，預期水溶性帕克里達瑟爾可結合至可植入醫療裝置，或另外水溶性帕克里達瑟爾可被動吸附於可植入裝置表面。例如移植模可浸泡於聚合物-藥物溶液或噴灑此種溶液，而塗布以聚合物-藥物接合物。可植入裝置之適當材料包括生物相同且無毒材料，可選自金屬如鎳-鈦合金、不鏽鋼或生物相容聚合物、水凝膠類、聚胺基甲酸酯類、聚乙

烯類、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物等。較佳具體例中，水溶性帕克里達瑟爾特別 PG-TXL 接合物塗布於移植模上用於汽球血管成形術後插入動脈或靜脈內。因此就某些廣義方面而言，本發明可描述為一種於血管創傷後抑制動脈再狹窄或動脈阻塞之方法，包含對有需要之個體投予一種組合物包含帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾接合至聚麩胺酸或其它水溶性聚胺基酸。該方法之實施用中，個體可為冠狀動脈繞道、血管手術、器官移植或冠狀動脈或任何其它動脈血管成形術病人(舉例)，及組合物可直接經靜脈投藥，或甚至塗布於移植模上待植入血管創傷位置。

因此本發明之一具體例為一種可植入醫藥裝置，其中該裝置塗布以可有效抑制平滑肌細胞增生的組合物，包含帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾接合至聚麩胺酸或水溶性聚胺基酸。較佳裝置為此處所述塗布以本發明組合物之移植模，及於若干較佳具體例中，移植模適合於汽球血管成形術期間或其後使用，該塗層可有效抑制再狹窄。

若干較佳具體例中，本發明可敘述為一種組合物包含聚麩胺酸接合至帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類之 2' 或 7 羥基或二者；或甚至一種組合物包含水溶性聚胺基酸接合至帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類之 2' 或 7 羥基或二者。

如此處使用「聚麩胺酸」一詞包括聚(1-麩胺酸)，聚-(d-麩胺酸)及聚(d1-麩胺酸)，「聚天冬胺酸」一詞包括聚(1-天冬胺酸)，聚(d-天冬胺酸)，聚(d1-天冬胺酸)；「聚離胺酸」一詞包括聚(1-離胺酸)，聚(d-離胺酸)，聚(d1-離胺酸)；及「水溶性聚胺基酸」或「水溶性胺基

酸聚合物」一詞包括但非限於聚麩胺酸，聚天冬酸，聚離胺酸，及胺基酸鏈包含麩胺酸、天冬酸及／或離胺酸混合物。若干具體例中，「水溶性聚胺基酸」或「水溶性胺基酸聚合物」一詞包括胺基酸鏈包含 d 及／或 l 異構物構物之構型之麩胺酸及／或天冬胺酸及／或離胺酸組合。若干較佳具體例中，此種「水溶性聚胺基酸」含有一或多種麩胺酸、天冬胺酸及／或離胺酸殘基。此種「水溶性聚胺基酸」也包含此處所述任何天然、改質或非尋常胺基酸，只要大半殘基，亦即超過 50% 殘基，包含麩胺酸及／或天冬胺酸及／或離胺酸即可。若干具體例中，含有多於一型不同胺基酸殘基之水溶性胺基酸聚合物，偶而於此處稱作「共聚物」。

若干具體例中，多種天然、不尋常或化學改質胺基酸之取代可製作於「水溶性聚胺基酸」或特別「聚麩胺酸」之胺基酸組合物來產生本發明之紫杉類-聚胺基酸接合物，且仍然獲得具有類似或期望的溶解度及／或療效特性。聚胺基酸例如聚麩胺酸，聚天冬胺酸，聚離胺酸，或水溶性胺基酸鏈或聚合物包含麩胺酸、天冬胺酸及／或離胺酸混合物於胺基酸取代範圍之下限可含有約 1，約 2，約 3，約 4，約 5，約 6，約 7，約 8，約 9，約 10，約 12，約 13，約 14，約 15，約 16，約 17，約 18，約 19，約 20，約 21，約 22，約 23，約 24 或約 25 或更多個麩胺酸、天冬胺酸或離胺酸殘基由此處所述天然、改質或不尋常胺基酸取代。本發明之其它方面，聚胺基酸如聚麩胺酸、聚天冬胺酸、聚離胺酸或包含若干或全部三種胺基酸之混合物之聚胺基酸鏈於其下限可含有約 1%，約

2%，約 3%，約 4%，約 5%，約 6%，約 7%，約 8%，約 9%，約 10%，約 11%，約 12%，約 13%，約 14%，約 15%，約 16%，約 17%，約 18%，約 19%，約 20%，約 21%，約 22%，約 23%，約 24% 或約 25% 或以上麩胺酸、天冬胺酸或離胺酸殘基由任何此處所述天然、改質或不尋常胺基酸取代。

本發明之另一方面，聚胺基酸例如聚麩胺酸、聚天冬胺酸或聚離胺酸於胺基酸取代範圍之上限可含有約 25%，約 26%，約 27%，約 28%，約 29%，約 30%，約 31%，約 32%，約 33%，約 34%，約 35%，約 36%，約 37%，約 38%，約 39%，約 40%，約 41%，約 42%，約 43%，約 44%，約 45%，約 46%，約 47%，約 48%，約 49% 至約 50% 左右麩胺酸、天冬胺酸或離胺酸殘基由此處所述之任一種天然、改質或不尋常胺基酸取代，只要大半殘基包含麩胺酸及／或天冬胺酸及／或離胺酸即可。於多種水溶性胺基酸聚合物之胺基酸取代中，以具有親水性指數為+1 或以上之殘基為佳。

本發明之某些方面，每個水溶性聚合物接合的抗腫瘤藥物量可改變。於其下限，此種組合物包含約 1%，約 2%，約 3%，約 4%，約 5%，約 6%，約 7%，約 8%，約 9% 或約 10%，約 11%，約 12%，約 13%，約 14%，約 15%，約 16%，約 17%，約 18%，約 19%，約 20%，約 21%，約 22%，約 23%，約 24%，至約 25% (w/w) 抗腫瘤藥物相對於接合物質量。於上限，此種組合物包含約 26%，約 27%，約 28%，約 29%，約 30%，約 31%，約 32%，約 33%，約 34%，約 35%，約 36%，約 37%，

約 38%，約 39%，至約 40% 或以上 (w/w) 抗腫瘤藥相對於接合物質量。較佳抗腫瘤藥包含帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾其它紫杉類，及較佳水溶性聚合物包含水溶性胺基酸聚合物。

本發明之某些其它方面，每分子水溶性聚合物接合的抗腫瘤藥分子數可改變。於下限，此種組合物包含約 1，約 2，約 3，約 4，約 5，約 6，約 7，約 8，約 9，約 10，約 12，約 13，約 14，約 15，約 16，約 17，約 18，約 19 至約 20 或以上個分子抗腫瘤藥／每分子水溶性聚合物。於上限，此種組合物包含約 21，約 22，約 23，約 24，約 25，約 26，約 27，約 28，約 29，約 30，約 31，約 32，約 33，約 34，約 35，約 36，約 37，約 38，約 39，約 40，約 41，約 42，約 43，約 44，約 45，約 46，約 47，約 48，約 49，約 50，約 51，約 52，約 53，約 54，約 55，約 56，約 57，約 58，約 59，約 60，約 61，約 62，約 63，約 64，約 65，約 66，約 67，約 68，約 69，約 70，約 71，約 72，約 73，約 74，約 75 或以上分子或以上抗腫瘤藥／每分子水溶性聚合物。較佳抗腫瘤藥包括帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其它紫杉類，及其較佳水溶性聚合物包括水溶性胺基酸聚合物。較佳每分子水溶性聚合物接合的抗腫瘤藥分子束為約 7 分子抗腫瘤藥／每分子水溶性聚合物。

具有各種殘基取代接合至帕克里達瑟爾、杜西達瑟爾或其他紫杉類之水溶性胺基酸聚合物稱作「生物功能相當物」。「生物功能相當物」構成接合至紫杉類之「水溶性聚胺基酸」定義之一部分，且由此處所述檢定分析

以及任何其它業界人士已知之適用檢定分析識別，該等檢定分析用於測量比較用於生產特定水溶性胺基酸聚合物-紫杉類組合物的未接合紫杉類具有改良的水中溶解度。本發明之其它方面，水溶性胺基酸-紫杉類聚合物之「生物功能相當物」可進一步藉由此處所述檢定分析以及業界人士已知之任何適用的檢定分析經由測量比較用於生產特定水溶性胺基酸聚合物-紫杉類組合物的非接合水溶性胺基酸聚合物之抗腫瘤細胞活性具有改良之抗腫瘤細胞活性而予識別。此處用於說明本發明之此方面之「生物功能相當物」容後詳述。

除非另行定義，否則此處使用全部技術及科學術語皆具有如本發明所屬業界人士一般了解的定義。又如此處使用，「一」一詞包括「一或多」之定義。雖然任何類似或相當於此處所述之方法及材料皆可用於實施或測試本發明，但現在說明較佳方法及材料。

【實施方式】

本發明源自於發現新穎水溶性帕克里達瑟爾及杜西達瑟爾配方，以及此等配方對活體內腫瘤細胞之出人意外的活性。以聚(1-麩胺酸)接合物帕克里達瑟爾(PG-TXL)投予帶有卵巢癌(OCA-I)之小鼠，比投予相等劑量帕克里達瑟爾但不含PG者引起顯著延遲腫瘤生長。單獨使用帕克里達瑟爾或使用自由態帕克里達瑟爾及PG組合處理小鼠最初顯示腫瘤生長延遲，但於10日後腫瘤再度生長至可媲美未處理對照組的程度。此外，於PG-TXL接合物之最大忍受劑量(MTD)(160毫克當量帕克里達瑟爾／千克)，腫瘤生長完全受抑制，腫瘤萎縮，治療後觀察小鼠

2 個月仍然未患腫瘤 (MTD)：定義為單次靜脈注射後 2 週內可產生 15% 或以下體重損失的最大劑量)。平行研究中，檢視 PG-TXL 用於患有大鼠乳腺癌 (13672F) 之大鼠之抗腫瘤活性。再度觀察到於 40-60 毫克當量帕克里達瑟爾／千克 PG-TXL 可完全清除腫瘤。此出入意外的結果驗證聚合物-藥物接合物 PG-TXL 於單次靜脈注射後可於小鼠及大鼠成功地清除已經相當成長的實體腫瘤。

除了於同質基因小鼠具有顯著抗腫瘤 (乳癌、卵巢癌等) 之數據外，PG-TXL 用於裸小鼠對抗人乳癌 (MDA-435) 及卵巢癌 (SKOV3ip1) 之良好活性也觀察得知。裸小鼠為特殊動物其免疫系統不完全，因此可生長人體腫瘤。此處所示數據使發明人歸結 PG-TXL 為一種新穎紫杉類物種，其藥理性質與先前帕克里達瑟爾或紫杉酚製劑不同。例如 PG-TXL 於血漿內之分布與自由態帕克里達瑟爾不同。雖然帕克里達瑟爾停留於小鼠血漿極短時間，但 PG-TXL 顯然可停留遠更長時間。預期如此提供腫瘤長期暴露於藥物，造成反應增強的優點。PG-TXL 轉成帕克里達瑟爾之速率緩慢，注射帕克里達瑟爾-聚合物複合體後 48 小時內由放射性標記 PG-TXL 回收為放射性帕克里達瑟爾之放射性低於 1%。此項發現提示新穎藥物 PG-TXL 可以非單純由於徐緩釋放帕克里達瑟爾本身之方式於腫瘤細胞內造成死亡。

PG-TXL 新穎性之進一步證據為注射後短時間內腫瘤細胞內出現相對高放射性來自放射性標記 PG-TXL。但腫瘤細胞內僅有小量放射性係來自自由態帕克里達瑟爾之釋放。又腫瘤組織內來自帕克里達瑟爾本身之放射活性百

分比隨著時間的經過並無些許增高，再度提示 PG-TXL 為緩慢釋放帕克里達瑟爾之前藥。也於特化人類結腸腺癌細胞轉移系統研究 PG-TXL 相對於帕克里達瑟爾之攝取。雖然放射性標記 PG-TXL 關聯的放射性容易進入細胞，但僅其中 10% 係來自於自由態帕克里達瑟爾。此等數據與組織分布研究所見者相似，再度提示 PG-TXL 不同於帕克里達瑟爾，有若干機轉或方式導致癌細胞死亡。

另一項研究中，發現新鮮製備 PG-TXL 不會支援帕克里達瑟爾依賴性細胞系的生長，提示自由態帕克里達瑟爾僅緩慢由聚合物-帕克里達瑟爾複合體釋放，以及聚合物-帕克里達瑟爾複合體本身對藥理表現不似「紫杉酚」。老化可促進 PG-TXL 的分解，且確實提高所得物質支援帕克里達瑟爾依賴性細胞生長的能力，但程度比自由態帕克里達瑟爾更低。

近晚由使用帕克里達瑟爾處理小鼠所得腫瘤細胞分析，提示如所預期，此種藥物可於腫瘤本身內部形成許多細胞凋零體。細胞凋零程序為一種機轉，其中細胞自行自殺或走上程式規劃的細胞死亡，係有機體用於傷口癒合及組織重新模式化的自然過程。接受 PG-TXL 處理小鼠之腫瘤比自由態帕克里達瑟爾更少細胞凋零體，但腫瘤壞死及水腫發生率增高，提示帕克里達瑟爾及 PG-TXL 可以兩種分別不同路徑導致腫瘤細胞死亡。

此等研究及特定實例所述研究驗證 PG-TXL 為新穎紫杉烷，其不僅對乳癌及及卵巢癌極為具有活性，同時副作用有限。現已清楚帕克里達瑟爾之聚合物接合生成一種化合物 (PG-TXL)，其具有新穎且較強之總體抗腫瘤活性。

本發明之另一方面包括聚合物組合物之分子，其可將治療組合物鎖定在疾病或腫瘤部位或特定器官或組織目標。多種鎖定目標分子為業界已知，且可接受物至本發明之水溶性抗腫瘤組合物。此等分子或化學劑之例包括但非限於抗體如抗腫瘤抗體；抗細胞受體抗體；組織特異性異體；激素劑如歐瑞泰(octreotide)，雌二醇及塔莫西芬；生長因子；細胞表面受體配基；酶；缺氧作用劑如密索尼唑(misonidazole)及赤絲硝咪唑(erythronitroimidazole)；及抗血管生成劑。

本發明之另一組成物為 DTPA-帕克里達瑟爾，此處也顯示於使用 B16 黑素瘤細胞系進行之試管試驗抗腫瘤強度檢定分析證實與帕克里達瑟爾同等有效。DTPA-帕克里達瑟爾於單次注射 40 毫克／千克體重劑量時，對 MCa-4 乳癌之抗腫瘤效果比帕克里達瑟爾並無顯著差異。此外，¹¹¹銾標記 DPTA-帕克里達瑟爾藉伽瑪閃爍攝影術證實堆積於 MCa-4 腫瘤內部，驗證本發明之螯合劑接合抗腫瘤藥為有用有效的腫瘤造影劑。

本發明之新穎化合物及方法提供優於先前方法及組合物之顯著優點，以水溶性帕克里達瑟爾來改良以帕克里達瑟爾為基礎之抗癌治療效果，提供水溶性與控制釋放之帕克里達瑟爾衍生組合物，其亦具有與未修改之帕克里達瑟爾不同的抗腫瘤性質。此等組合物可免除先前帕克里達瑟爾組合物副作用之相關溶劑。此外，放射性標記帕克里達瑟爾顯示保有抗腫瘤活性，也可用於腫瘤造影。又本發明可藉閃爍攝影、單光子發射電腦斷層掃描術(SPECT)或正子發射斷層掃描術(PET)決定帕克里達瑟

爾是否被特定腫瘤攝取。此項決定可用於預測抗癌治療效果。該資訊也有助於指導臨床醫師選擇接受螯合劑-帕克里達瑟爾治療病人。

帕克里達瑟爾可以多種方式變成水溶性：亦即經由接合帕克里達瑟爾至水溶性聚合物作為藥物載劑，及經由使用水溶性螯合劑衍生抗癌藥物。後述辦法也提供以放射性核種（例如 ^{111}In , ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）標記用於核造影及／或放射治療研究。帕克里達瑟爾、聚乙二醇-帕克里達瑟爾（PEG-帕克里達瑟爾）、聚麩胺酸-帕克里達瑟爾接合物（PG-TXL）及二伸乙基三胺五乙酸-帕克里達瑟爾（DTPA-帕克里達瑟爾）之結構示於第 1 圖。

本發明之某些具體例中，DTPA-帕克里達瑟爾或其它帕克里達瑟爾-螯合劑接合物如 EDTA-帕克里達瑟爾，DTTP-帕克里達瑟爾或 DOTA-帕克里達瑟爾可製備成水溶性鹽（鈉鹽，鉀鹽，四丁基銨鹽，鈣鹽，鐵鹽等）。此等鹽可用作腫瘤治療劑。其次，DTPA-帕克里達瑟爾或其它帕克里達瑟爾螯合劑可用作診斷劑，其當以放射性核種如 ^{111}In 或 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 標記時，可作為放射性追蹤劑合併核成像技術檢測某些腫瘤。需了解除帕克里達瑟爾（紫杉酚TM）及杜西達瑟爾（紫杉萜）外，其它紫杉烷衍生物可配合用於本發明組合物及方法，所有此等組合物及方法皆涵蓋於本發明之範圍。

至於本發明之水溶性聚合物如水溶性聚胺基酸或水溶性金屬螯合劑結構可進行之修改及變化且仍然獲得具有類似或所需特性者，此種「生物功能相當物」或「功能相當物」也涵蓋於本發明之範圍。

例如業界人士了解某些於聚胺基酸結構中某些胺基酸可以其它胺基酸取代，包括水溶性胺基酸聚合物如聚麩胺酸、聚天冬胺酸或聚離胺酸，而未可察覺的損失與結構式例如化學治療藥或抗血管生成藥如帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾等之交互作用結合活性。此外，接合至化學治療劑及／或抗腫瘤生成劑如帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾等之水溶性聚胺基酸之胺基酸取代範例包括但非限於 PG-TXL，仍可保有此處揭示之部分或全部新穎藥理性質。由於交互作用活性及蛋白質性質定義蛋白質之生物功能活性，故可於聚胺基酸序列作出某些胺基酸序列取代，但仍獲得具有類似(促效)性質的聚胺基酸。如此，發明人預期於藥物接合物例如但非限於 PG-TXL 之水溶性聚胺基酸順序可作種變化而未可察覺地喪失其生物用途或活性。

就功能相當物而言，業界人士眾所周知「水溶性聚胺基酸之生物功能相當物」定義中特有的構想為於部分分子內作出有限數目改變，而仍獲得具有可接受的相等生物活性之分子。水溶性聚胺基酸之生物功能相當物如此於此處定義為水溶性聚胺基酸，其中某些但非全部胺基酸可經非水溶性胺基酸包括天然，不尋常或化學改質胺基酸取代。

特別當考慮長度較短的水溶性聚胺基酸時，預期於特定肽可作出較小胺基酸。較長領域具有中等變化數目。如此處所述，最長水溶性聚胺基酸鏈對大量變化的忍受性最高。當然，具有不同取代之多種不同水溶性聚胺基酸例如但非限於聚麩胺酸，聚天冬胺酸或聚離胺酸容易

製造且用於本發明。

眾所周知，某些殘基對聚胺基酸之生物或結構性質特別重要，此等殘基通常不可交換。藉此方式，功能相當於此處定義為保有實質量之其天然生物活性的水溶性聚胺基酸。

胺基酸取代通常係基於胺基酸分支鏈取代基之相對類似性，例如其疏水性、其親水性、電荷、大小等。分析胺基酸分支鏈取代基之大小、形狀及類型顯示精胺酸、離胺酸及組胺酸全部皆為帶正電荷殘基；丙胺酸、甘胺酸及絲胺酸全部皆具有類似大小；及苯基丙胺酸、色胺酸及酪胺酸全部皆具有概略類似形狀。因此基於此等考慮重點，精胺酸、離胺酸及組胺酸；丙胺酸、甘胺酸及絲胺酸；及苯基丙胺酸、色胺酸及酪胺酸；於此處定義為生物功能相當物。

為進行更量化之變化，考慮胺基酸之水路徑指數。各胺基酸基於其疏水性及電荷特性被指定一個水路徑指數分別為；異白胺酸(+4.5)；纈胺酸(+4.2)；白胺酸(+3.8)；苯基丙胺酸(+2.8)；半胱胺酸／胱胺酸(+2.5)；蛋胺酸(+1.9)；丙胺酸(+1.8)；甘胺酸(-0.4)；蘇胺酸(-0.7)；絲胺酸(-0.8)；色胺酸(-0.9)；酪胺酸(-1.3)；脯胺酸(-1.6)；組胺酸(-3.2)；麩胺酸鹽(-3.5)；麩胺(-3.5)；天冬胺酸鹽(-3.5)；天冬醯胺(-3.5)；離胺酸(-3.9)；及精胺酸(-4.5)。

胺基酸之水路徑指數對蛋白質以及對應之聚胺基酸提供交互作用生物功能之重要性為業界所知(Kyte & Doolittle, 1982, 併述於此以供參考)。已知某些胺基酸

可取代其它具有類似水路徑指數或分數，而仍然保有類似生物活性的胺基酸。基於水路徑指數作其它變化時，以水路徑指數於 ± 2 範圍內之胺基酸取代為佳，於 ± 1 以內者為特佳，及 ± 0.5 以內者為又更特佳。

業界也了解類似胺基酸之取代基於親水性變有效。如美國專利 4,554,101 詳細說明，下列胺基酸之親水性質如後：精胺酸(+3.0)；離胺酸(+3.0)；天冬胺酸鹽(+3.0 ± 1)；麩胺酸鹽(+3.0 ± 1)；絲胺酸(+0.3)；天冬醯胺(+0.2)；麩胺(+0.2)；甘胺酸(0)；蘇胺酸(-0.4)；脯胺酸(-0.5 ± 1)；丙胺酸(-0.5)；組胺酸(-0.5)；半胱胺酸(-1.0)；蛋胺酸(-1.3)；纈胺酸(-1.5)；白胺酸(-1.8)；異白胺酸(-1.8)；酪胺酸(-2.3)；苯基丙胺酸(-2.5)；色胺酸(-3.4)。基於類似親水性數值作改變時，以親水性值於 ± 2 範圍內之胺基酸取代為佳，以 ± 1 以內者為特佳，及以 ± 0.5 以內者為又更特佳。如此參照親水性，精胺酸、離胺酸，天冬胺酸及麩胺酸於此處定義為生物為功能相當物，特別用於水溶性麩胺酸聚合物。

除此處所述水溶性聚胺基酸-化學治療劑及／或抗血管生成藥物化合物，例如帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾接合至水溶性胺基酸等，例如但非限於 PG-TXL 化合物外，發明人也意圖含括其它立體性質類似之化合物可調配成模擬水溶性聚胺基酸結構之關鍵部分。此等化合物定義為擬肽素(peptidomimetics)可以本發明之肽之相同方式使用，因此亦屬功能相當物。

某些模擬物可模擬蛋白質二級結構元素，述於 Johnson 等人(1993)。使用肽模擬物潛在的理論為蛋白質之肽主

幹包括聚胺基酸主要可使胺基酸分支鏈定向為有助於分子交互作用，例如抗體與抗原的交互作用。如此蛋白質模擬物設計為允許產生類似天然分子之分子交互作用。肽模擬物構想之若干成功用途集中於蛋白質內部之 β -轉彎模擬物，其已知具有高度抗原性。同理，多肽內部的 β -轉彎結構也可藉此處討論之基於電腦的演算法預測。一旦該轉彎的成分胺基酸經決定，可構成模擬物而達到類似胺基酸分支鏈必要元素的類似空間取向。

其它結構相當物或模擬物的產生可藉業界人士已知之模式化及化學設計技術達成。受體模式化技術為今日眾所周知，藉此此等方法可設計然後合成可結合至水溶性胺基酸之化學品。需了解所有此等經過立體設計的構成體皆屬於本發明之範圍。

除了透過遺傳密碼提供的 20 種「標準」胺基酸外，改質或不尋常胺基酸也意圖用於本發明。範例改質或不尋常表提供如後，但非僅限於此。

表 1 改質及不尋常胺基酸

縮寫	胺基酸	縮寫	胺基酸
Aad	2-胺基己二酸	EtAsn	N-乙基天冬醯胺
bAad	3-胺基己二酸	Hyl	羥離胺酸
bAla	β -丙胺酸, β -胺基丙酸	aHyl	別-羥離胺酸
Abu	2-胺基丁酸	3Hyp	3-羥脯胺酸
4Abu	4-胺基丁酸, 六氫吡啶酸	4Hyp	4-羥脯胺酸

表 1 續
表 1 改質及不尋常胺基酸

縮寫	胺基酸	縮寫	胺基酸
Acp	6-胺基己酸	Ide	異鎖鏈離胺酸
Ahe	2-胺基庚酸	alle	別-異別胺酸
Abi	2-胺基異丁酸	MeGly	N-甲基甘胺酸，肌胺酸
BAib	3-胺基異丁酸	MeIle	N-甲基異白胺酸
Apm	2-胺基庚二酸	MeLys	6-N-甲基離胺酸
Dbu	2,4-二胺基丁酸	MeVal	甲基纈胺酸
Des	鎖鏈離胺酸(Desmosine)	Nva	新穎胺酸
Dpm	2,2'-二胺基庚二酸	Nle	新白胺酸
Dpr	2,3-二胺基丙酸	Om	鳥胺酸
EtGly	N-乙基甘胺酸		

DTPA-帕克里達瑟爾之毒性研究、藥力學及組織分布研究顯示於小鼠 DPTA-帕克里達瑟爾單劑靜脈注射之 LD₅₀ (50% 致死劑量) 為約 100 毫克／千克體重。難以直接與帕克里達瑟爾比較，原因為帕克里達瑟爾之溶解度有限造成劑量-容積限制，以及靜脈注射關聯的媒劑毒性。但鑑於此處揭示，化學治療業界人士可於人體臨床研究決定有效及最大忍受劑量 (MTD)。

本發明之若干具體例中，以聚合物-帕克里達瑟爾接合物塗佈的移植模可用於防止汽球血管成形術後動脈血管開口的再狹窄。晚近使用可藉汽球膨脹的移植於冠狀血管成形術之臨床研究顯示比較標準汽球血管成形術具有可專利性及再狹窄減少的明顯效果 (Serruys 等人，1994)。根據傷害反應假說，血管內膜新生形成與血管細

胞增生增加有關。目前，一般觀點認為臨床手術導致血管損傷造成自發及加速血管粥瘤硬化者為平滑肌細胞(SMC)增生。(Phillips-Hughes 及 K 及 arpa, 1996)。因動脈受傷後 SMC 表現型細胞增生類似腫瘤細胞增生，故抗癌藥物可用於防止血管內膜新生的 SMC 堆積。塗布以聚合物鍵聯抗增生劑可長時間以足夠濃度釋放此等藥劑的移植模可防止血管內膜的過度增植向內生長進內管腔內部，因而減少再狹窄。

因帕克里達瑟爾顯示可於小鼠模式抑制膠原誘發關節炎(Oliver 等人 1994)，故本發明配方也預期可用於治療自體免疫病及／或發炎病如類風濕性關節炎。帕克里達瑟爾結合於微管蛋白移動穩定微細管聚合物平衡，因而使此種藥物阻斷後期 G2 有絲分裂階段的細胞而可作為真核細胞複製的強力抑制劑。若干機轉涉及受帕克里達瑟爾抑制的關節炎。例如帕克里達瑟爾之分期特異性細胞毒性效應可能影響快速增生的發炎細胞，此外帕克里達瑟爾可抑制細胞有絲分裂、遷移、趨化性、細胞內輸送及嗜中性血球產生過氧化氫。此外，帕克里達瑟爾經由阻斷配價接合內皮細胞遷移而具有抗血管生成活性(Oliver 等人 1994)。因此，本發明之水溶性聚胺基酸接合帕克里達瑟爾可用於治療類風濕性關節炎。此處揭示之聚合物接合物接合配方也可提供控制釋放藥物及溶解度增高的優點。配方可注射或直接植入患部關節之關節療法也構成本發明之一方面。

適合注射用之帕克里達瑟爾或杜西達瑟爾醫藥製劑包括無菌水溶液或分散液，及製備無菌注射用溶液劑或分

散液之無菌粉劑。各例中，該等劑型必須無菌且須為流體可供注射。於製造及儲存條件下必須穩定，且須可保藏不受微生物如細菌及黴菌的污染，載劑可為溶劑或分散介質含有例如水，乙醇，多元醇(如甘油，丙二醇，及液體聚乙二醇等)，其適當混合物及植物油。微生物之預防可利用多種抗菌及抗黴菌劑例如對羥苯甲酸酯類，氯丁醇，酚，山梨酸，柳硫汞等。許多例中，較佳包括等張劑例如糖類或氯化鈉。

無菌注射溶液劑之製法係將活性化合物以需要量於適當溶劑攪混多種其它前述成分(視需要而定)，接著經過濾滅菌製備。通常分散液之製法係將多種無菌活性成分攪混於含有基本分散介質之無菌賦形劑，以及前述其它需要成分。於製備無菌注射溶液劑之無菌粉劑之例，較佳製法為真空乾燥及凍乾技術由先前經滅菌過濾之溶液獲得活性成分加任何其它預定成分之粉末。

如此處使用「醫藥可接受性載劑」一詞包括任何及全部溶劑、分散介質、塗層、抗菌及抗黴菌劑及等張劑等。此種介質及藥劑用於醫藥活性物質為業界眾所周知。除非任何習知介質或化學劑與活性成分不相容，否則意圖包括其用於治療組合物。補充用活性成分也可攪混於組合物。

「醫藥可接受性」一詞表示分子實體及組合物其當投予動物或人類時，不會造成過敏等非期望反應。呈水性溶液劑供腸外投藥(舉例)，若有所需溶液劑須經適當緩衝，液體稀釋劑首先使用足量鹽水或葡萄糖調整為等張性。此等特定水溶液劑特別適合供靜脈及腹內投藥。就

此方面而言，鑑於本揭示內容。可使用業界人士已知之無菌水性介質。

含括下列實例驗證本發明之較佳具體例。業界人士了解後文實例揭示之技術代表本發明發現的可於本發明實務發揮良好功能的技術。如此視為構成其實施之較佳模態。但業界人士鑑於本揭示內容，可於未悖離本發明之精髓及範圍下對此處揭示之特定具體例作出多種修改，而仍然獲得相同或類似的結果。

實例 1

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)

本例係有關帕克里達瑟爾接合至水溶性聚合物，聚(1-麩胺酸)(PG)及該製劑對小鼠及大鼠之多種腫瘤的效果。作為藥物載劑之水溶性聚合物之可能性已明確建立(Kopecek, 1990; Maeda 及 Matsumura, 1989)。

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)之合成

PG 被選用作為帕克里達瑟爾之載劑，原因為其易藉溶小體酶分解，於血漿穩定及含有足量官能基供藥物附接。若干抗腫瘤藥包括亞利亞黴素(Adriamycin)(Van Hesswijk 等人，1985; Hose 等人，1984)，環磷醯胺(cyclophosphamide)(Hirano 等人，1979)，作者 Ara-C(Kato 等人，1984)及梅法蘭(meophalan)(作者 Morimoto 等人，1987)曾經接合至 PG。但聚天冬胺酸可使用此處對 PG-TXL 所述反應計劃接合至抗腫瘤藥。

反應計劃示於第 1B 圖。聚(1-麩胺酸)(PG)鈉鹽係得自 Sigma 公司(蒙大拿州，聖路易)。聚合物藉黏度測量具有分子量 36,200，及藉低角雷射光散射(LALLS)測量具有

數均分子 (M_n) 24,000。批次特異性多分散性 (M_w/M_n) 爲 1.15，此處 M_w 爲重均分子量。PG 鈉鹽之 (MW34K, Sigma, 0.35 克) 首先於其質子形式轉成 PG。PG 鈉鹽水溶液之 pH 使用 0.2M HCl 調整至 2.0。收集沈澱，並對蒸餾水透析，及凍乾獲得 0.29 克 PG。

於 PG (75 毫克，重複單位 FW170，0.44 毫莫耳) 於無水 N,N-二甲基甲醯胺 (DMF) (1.5 毫升) 之溶加入 22 毫克帕克里達瑟爾 (0.026 毫莫耳，莫耳比 PG / 帕克里達瑟爾 = 17)，15 毫克二環己基甲二醯亞胺 (DCC) (0.073 毫莫耳) 及微量二甲基胺基吡啶 (DMAP)。帕克里達瑟爾由 H 及 e Tech (德州，休斯頓) 供給，純度藉 HPLC 檢定分析證實爲 99% 或以上。

任反應於室溫進行 12-18 小時。藉層層析術 (TLC，矽膠) 顯示帕克里達瑟爾 ($R_f = 0.55$) 完全轉成聚合物接合物 ($R_f = 0$ ， $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$) 爲了終止反應，將混合物倒入氯仿。收集所得沈澱及真空腔水，獲得 70 毫克聚合物-藥物接合物。經由改變起始物料之帕克里達瑟爾對 PG 之重量比，可合成不等帕克里達瑟爾濃度之聚合物接合物。

PG-TXL 接合物鈉鹽係經由溶解產物於 1.0M 碳酸氫鈉獲得。PG-TXL 水溶液對蒸餾水 (MWCO 10,000) 透析去除低分子量污染及過量碳酸氫鈉鹽。凍乾透析產物獲得 98 毫克產物呈白色粉末。此聚合物接合物之帕克里達瑟爾含量藉紫外光測得爲 20-22% (w/w)。產率：98% (轉成聚合物結合的帕克里達瑟爾，紫外光)。水中溶解度大於 20 毫克帕克里達瑟爾 / 毫升。類似方法單純經由提高帕克里

達瑟爾對 PG 的用量比可用於合成具較高帕克里達瑟爾含量(高達 35%)之 PG-TXL。

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)之鑑定

紫外光光譜係使用相同濃度 PG 水溶液作為對照，而於貝克曼(Beckman)DU-70 分光光度計獲得。PG-TXL 顯示特徵性帕克里達瑟爾吸收，具有 $\lambda_{\max}$ 移位由 228 至 230nm。帕克里達瑟爾於 PG-TXL 接合物之濃度係基於使用已知濃度帕克里達瑟爾於甲醇於 228nm 吸收所得標準曲線估計，假設聚合物接合於水於 230nm 及自由態藥物於甲醇於 228nm 具有相等莫耳消光，且二者皆遵循藍伯特比爾(Lambert Beer)法則。

^1H NMR 光譜係使用 GE 型號 GN 500(500HG)光譜儀於 D_2O 記錄。PG 部分及帕克里達瑟爾部分可區別，聚合物接合至帕克里達瑟爾偶合物光學分割不良，無法以充分準確度測量。於 7.75 至 7.36ppm 之共振可歸因於帕克里達瑟爾之芳族成分，於 6.38ppm($\text{C}_{10}\text{-H}$)，5.97ppm($\text{C}_{13}\text{-H}$)，5.63ppm($\text{C}_{2'}\text{-H}$ ，d)，5.55-5.36ppm($\text{C}_{3'}\text{-H}$ 及 $\text{C}_{2'}\text{-J,m}$)，5.10ppm($\text{C}_5\text{-H}$)，4.39ppm($\text{C}_7\text{-H}$)，4.10ppm($\text{C}_{20}\text{-H}$)，1.97ppm(OCOCH_3)，及 1.18-1.20ppm(C-CH_3)之共振嘗試性歸因於帕克里達瑟爾之脂族成分。其它共振因 PG 的共振而模糊。PG 共振於 4.27ppm($\text{H-}\alpha$)，2.21ppm($\text{H-}\gamma$)，及 2.01ppm($\text{H-}\beta$)係根據純 PG 光譜。但於 5.63ppm 之峰嘗試歸因於 C-2'酯之 C-2'質子，無取代帕克里達瑟爾之 C-2'質子於 4.78ppm 也存在，提示所得接合物含有帕克里達瑟爾取代於 C-2'及 C-7 二位置。接合物之 100 毫克/毫升溶液產生清澈、黏稠但又具有流動性之液體。

此種程序一致產生 PG-TXL 接合物含有 20% 重量比帕克里達瑟爾，亦即各聚合物鏈約接合 7 帕克里達瑟爾分子。

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾 (PG-TXL) 之凝膠滲透層析術研究

PG-TXL 之相對分子量藉凝膠滲透層析術特徵化。PGC 系統係由兩個 LDC 型號 III 泵耦合 LDC 梯度主機，PL 凝膠 GPC 管柱，及 Waters 990 光電二極體陣列檢測器組成。溶離劑 (DMF) 之流速為 1.0 毫升／分鐘，紫外光檢測設定於 270nm。對 PG-TXL 鈉鹽，使用適合分析水溶性聚合物之 TKS-凝膠管柱，系統以 1.0 毫升／分鐘之 0.2Mm pbs (pH6.8) 溶離。帕克里達瑟爾接合至 PG 獲得 PG-TXL 分子量增高，如停留時間由 PG 之 6.4 分鐘移動到至 PG-TXL 接合物之 5.0 分鐘可證。粗產物含有小分子量污染物 (停留時間 8.0 至 10.0 分鐘，及 11.3 分鐘)，其可藉將 PG-TXL 轉成其鈉鹽有效去除，接著透析。

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾 (PG-TXL) 接合物之水解分解

爲了了解帕克里達瑟爾及相關分子物種由 PG-TXL 之釋放動力學，PG-TXL 於各種 pH 之 PBS 測試其水解穩定性。高效液相層析 (PHLC) 證實 PG-TXL 於 PBS 溶液培育可產生帕克里達瑟爾及若干其它物種包括比帕克里達瑟爾更具疏水性的物種 (代謝產物 1)。此等物種皆衍生自帕克里達瑟爾係透過使用 PG- ^3H TXL 進行類似分解研究證實。基於其於 HPLC 之停留時間，代謝產物 -1 可能為 7-表帕克里達瑟爾，此乃帕克里達瑟爾之生物活性異構物。事實上，於 PBS 回收之代謝產物 1 之量於 pH7.4 及 pH9.5 分別培育 5 日及 1 日後超過帕克里達瑟爾之回收量 (第 6

圖)。於 pH5.5 及 pH7.4，代謝產物 1 之側錄圖指示假零級動力學，顯示延遲時間由 3 日 (pH 5.5) 改變成 7 小時 (pH 7.4)，提示代謝產 1 為一種二級產物。顯然 PG-TXL 於酸性溶液比鹼性溶液穩定。

活體內試驗抗腫瘤活性

全部動物研究皆係於 M.D. 及erson 癌症中心動物機構根據該機構的指南進行。C3H/Kam 小鼠經育種，且維持於實驗輻射腫瘤科之無致病原機構內。

藉 PG-TXL 誘發腫瘤生長延遲之情形，係於植入卵巢癌 (OCA-I) 之 C3Hf/Kam 小鼠的乳房中測量。全部腫瘤皆為該種系的同質基因。於雌性 C3H/Kam 小鼠 (25-30 克) 之右大腿肌肉注射 5×10^5 鼠卵巢癌細胞 (OCA-I)、乳癌 (MCa-4)、肝癌 (HCa-I) 或纖維肉瘤 (FSa-II) 產生實體腫瘤。平行研究中，雌費雪 344 大鼠 (125-150 克注射 1.0×10^5 存活 13762F 腫瘤細胞於 0.1 毫升 PBS。當小鼠體內腫瘤生長至 500 立方毫米 (直徑 10 毫米)，或大鼠的腫瘤生長至 2400 立方毫米 (平均直徑 17 毫米) 時開始治療。

PG-TXL 溶解於鹽水 (10 毫克當量帕克里達瑟爾 / 毫升)，及帕克里達瑟爾溶解於克莫佛 EL 媒劑 (6 毫克 / 毫升)。資料係以腫瘤容積之平均 ± 標準差表示。對照研究中，使用鹽水 (0.6 毫升) 克莫佛媒劑 [50 / 50 克莫佛 / 乙醇以鹽水稀釋 (1 : 4)]，PG 溶液於鹽水，及帕克里達瑟爾加 PG。PG-TXL 及帕克里達瑟爾於正常雌性 C3Hf/Kam 小鼠之最大忍受劑量 (MTD) 估計為 160 毫克 / 千克及 80 毫克 / 千克。單劑 PG-TXL 於鹽水或帕克里達瑟爾於克莫佛 EL 媒劑係以 40 至 160 毫克當量帕克里達瑟爾 / 千克

體重之劑量投藥。每日測量三個正交腫瘤直徑而決定腫瘤生長情況(第 7A, 7B, 7C, 7D 及 7E 圖)。腫瘤容積係根據式 $(A \times B \times C) / 2$ 計算。小鼠之絕對生長延遲(AGD)定義為使用各種藥物治療的腫瘤由 500 立方毫米生長至 2,000 立方毫米之日數減使用鹽水對照處理小鼠的腫瘤由 500 立方毫米生長至 2,000 立方毫米之日數。當腫瘤大小達 2000 立方毫米時求出腫瘤生長延遲；腫瘤約 2500 立方毫米時犧牲小鼠。PG-TXL 組為(n=6 及 7)，其它各組為(n=5)。表 2 摘述 PG-帕克里達瑟爾用於大鼠之急性毒性，且與帕克里達瑟爾／克莫佛比較。表 3 摘述有關 PG-TXL 對小鼠 MCa-4, FSa-II 及 HCa-I 腫瘤的效果資料。

結果也摘述於第 7A 至 7E 圖。

表 2 PG-TXL 用於費雪大鼠之急性毒性。

組 別	劑量(毫克 /千克)	中毒死亡 頭數	體重損失 ，%	患病時間 (日數)	全痊癒時間 (日數)
PG-TXL ^a	60	1/4	15.7	7	14
PG-TXL ^a	40	0/4	11.1	6	11
帕克里達瑟爾 ^b	60	1/4	16.7	6	15
帕克里達瑟爾 ^b	40	0/3	17.9	6	16
帕克里達瑟爾 ^b	20	0/5	17.0	5	N/A

* 藥物係以單次靜脈注射投予帶有 13762F 腫瘤之費雪大鼠雌鼠，130 克)

^a G-TXL 溶液係將接合物溶解於鹽水製備(8 毫克當量帕克里達瑟爾／毫升)。於 60 毫克／千克之注射容積為每頭大鼠 0.975 毫升。

- ^b 帕克里達瑟爾克莫佛溶液係將帕克里達瑟爾溶解於乙醇及克莫佛之 1 : 1 混合物製備 (30 毫克 / 毫升)。此備用溶液進一步於注射前以鹽水稀釋 (1 : 4)。帕克里達瑟爾於溶液之終濃度為 6 毫克 / 毫升。於 60 毫克 / 千克之注射容積為每頭大鼠 1.3 毫升。
- ^c PG 溶液係將聚合物溶解於鹽水製備 (22 毫克 / 毫升)。注射劑量為 0.3 克 / 千克 (每頭大鼠 1.8 毫升)，相當於帕克里達瑟爾劑量 60 毫克 / 千克。
- ^d 克莫佛媒劑之製備係以以鹽水稀釋乙醇及克莫佛 (1 : 1) 混合物 (1 : 4)。

表 3 : PG-TXL 對活體內試驗各型鼠腫瘤之抗腫瘤效果

腫 瘤	藥 物 ^a	生長 500-2000	AGD ^c	T-試驗 ^d
		立方毫米時間 ^b		
Mca-4	鹽水	4.8±0.8(5)	-	-
	PG(0.6 克/千克)	9.3±1.4(4)	4.5	0.0114
	克莫佛賦形劑	6.1±0.7(5)	1.3	0.265
	PG-TXL(40 毫克/千克)	8.6±1.2(4)	3.8	0.026
	PG-TXL(60 毫克/千克)	14.2±1.1(5)	9.4	0.0001
	PG-TXL(120 毫克/千克)	44.4±2.9(5)	39.6	<0.0001
	帕克里達瑟爾(40 毫克/千克)	9.0±0.6(4)	4.2	0.0044
	帕克里達瑟爾(60 毫克/千克)	9.3±0.3(5)	4.5	0.0006
Fsa-II	鹽水	1.9±0.1(5)	-	-
	PG(0.8 克/千克)	2.8±0.2(6)	0.9	0.0043
	克莫佛賦形劑	2.2±0.2(6)	0.3	0.122
	PG-TXL(80 毫克/千克)	3.8±0.4(6)	1.9	0.0016
	PG-TXL(160 毫克/千克)	5.1±0.3(13)	3.2	<0.0001
	帕克里達瑟爾(80 毫克/千克)	4.2±0.3(6)	2.3	0.0002
	PG+帕克里達瑟爾	3.0±0.2(6)	1.1	0.0008
Hca-I	鹽水	7.3±0.3(5)	-	-
	PG(0.8 克/千克)	7.7±0.4(4)	0.4	0.417
	克莫佛賦形劑	6.8±0.8(5)	-0.5	0.539
	PG-TXL(40 毫克/千克)	8.2±0.7(5)	0.9	0.21
	PG-TXL(80 毫克/千克)	8.6±0.2(5)	1.3	0.00
	PG-TXL(160 毫克/千克)	11.0±0.8(4)	3.7	0.00
	帕克里達瑟爾(80 毫克/千克)	6.4±0.5(5)	-0.9	0.13
	PG+帕克里達瑟爾	6.7±0.4(5)	-0.9	0.29

^a 右腿帶有 500 立方毫米腫瘤之小鼠使用單次靜脈注射各種劑量 PG-TXL(40-160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)於鹽水或帕克里達瑟爾於克莫佛賦形劑。

對照動物係以鹽水(0.6 毫升)，克莫佛賦形劑(0.5 毫升)，PG 於鹽水溶液，或 PG 加帕克里達瑟爾(80 毫克／千克)處理。

- ^b 腫瘤生長係以卡規每日測量三個正交直徑測定，並以 $(A \times B \times C) / 2$ 計算容積。顯示各組使用的小鼠頭數。由 500 立方毫米生長至 2000 立方毫米之時間(日數)係以平均 ± 標準差表示。
- ^c 絕對生長延遲(AGD)定義為使用各種藥物處理腫瘤由 500 生長至 2000 立方毫米之時間日數減使用鹽水對照處理腫瘤由 500 生長至 2000 立方毫米之時間日數。
- ^d 由 500 生長至 2000 立方毫米之日數時間使用學生 t-試驗對治療組及鹽水組進行比較。P 值為雙邊，且當 P 值小於至等於 0.05 時視為有意義。

由此等研究獲得兩大發現。第一，類似帕克里達瑟爾，水溶性 PG-TXL 之抗腫瘤效果於各種腫瘤間有變化。PG-TXL 對 MCa-4 及 OCA-1 腫瘤最有效。第二，以相等毫克帕克里達瑟爾為基準，PG-TXL 用於 MCa-4, HCa-I 及 OCA-1 腫瘤之案例中比帕克里達瑟爾更有效，且最大忍受劑量(MTD)顯著更高。

平行研究中，檢視 PG-TXL 用於患有已經確定大鼠乳腺癌 13762F 之費雪大鼠之抗腫瘤活性。雌性費雪 344 大鼠(125-150 克)注射 1.0×10^5 活 13762F 腫瘤細胞於 0.1 毫升 PBS。一旦腫瘤到達平均容積 2000 立方毫米(平均直徑 1.6 厘米)，動物使用前述類似方案處理。每日測量三個正交腫瘤直徑測定腫瘤生長。腫瘤容積根據式

$(A \times B \times C) / 2$ 計算。單劑 PG-TXL 於鹽水或帕克里達瑟爾於克莫佛 EL 賦形劑以 20 至 60 毫克當量帕克里達瑟爾／千克體重之不等劑量投藥。於對照研究則使用鹽水，克莫佛 EL 賦形劑〔50／50 克莫佛／乙醇以鹽水稀釋(1：4)〕，PG 溶液於鹽水及帕克里達瑟爾加 PG。再度觀察於 PG-TXL 之 MTD(60 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)腫瘤完全清除。給予較低劑量 40 毫克當量帕克里達瑟爾／千克 PG-TXL 也獲得腫瘤完全退行(第 7B 圖)。相反地，帕克里達瑟爾於克莫佛 EL 之 MTD 小於 20 毫克／千克。於此劑量之帕克里達瑟爾引起腫瘤生長延遲(腫瘤生長延遲定義為使用試驗藥物腫瘤由 2,000 立方毫米生長至 10,000 立方毫米之時間日數減使用鹽水對照處理腫瘤由 2,000 立方毫米生長至 10,000 立方毫米之時間日數)僅 5 日，而相當帕克里達瑟爾劑量之 PG-TXL 可獲得腫瘤生長延遲 23 日(第 7B 圖)。注射人乳癌且使用 PG-TXL 處理之裸鼠研究

裸鼠接受 2×10^6 MDA-435-Lung2 細胞(MDA-MB-432 人乳癌細胞系變異株)注射於乳房脂肪墊。腫瘤達到 5 毫米平均直徑(腫瘤注射後 27 日)時，小鼠接受靜脈注射 PG-TXL 或各種對照處理(參考表 4)。每周測量腫瘤。生長至 1.5 厘米的腫瘤以手術去除。全部小鼠皆於 120 日時犧牲，移出其餘腫瘤並稱重。檢視小鼠之轉移情況，肺臟作用組織學研究，且對器官之單一剖面評分是否存在有顯微轉移腫瘤。

表 4

處理	取腫瘤 ^a	平均腫瘤重量(克) ^b	退行腫瘤數 ^c	肺臟轉移 ^d
PBS	5/6	1.3±0.24	-	4/5(80%)
克莫佛	9/9	1.26±0.67	-	4/8(50%)
PGA	10/10	1.13±0.7	-	4/7(57%)
紫杉酚/克莫	10/10	1.31±0.69	-	3/7(42%)
氟 60 毫克/千克				
PG-TXL 60 毫克	10/10	1.23±0.38	2/10	5/8(62.5%)克/千
克				
PG-TXL 120 毫克	9/10	0.925±0.12	4/8	1/4(25%)
克/千克				

^a 治療時帶有 5 毫米腫瘤之小鼠頭數 / 注射小鼠頭數

^b 屍體解剖時取出之腫瘤平均重量

^c 屍體解剖時已經退行的腫瘤數

^d 帶有肺臟轉移之小鼠頭數(巨觀所見或組織學製備發現) / 患腫瘤小鼠頭數。本欄之取得腫瘤及患腫瘤小鼠頭數間的若干矛盾係由於小鼠因非相關理由被犧牲或死亡，例如出現葡萄球菌性膿痕。PG-TXL 120 毫克組有一頭小鼠由於處理後體重減輕過多故犧牲；否則其它並無顯著與治療相關的死亡。裸鼠無法忍受 160 毫克 / 千克當量 PG-TXL。

由單次大劑量給予 PG-接合帕克里達瑟爾(PG-TXL)研究結果，於藥物相當於 120 毫克 / 千克帕克里達瑟爾時，顯然 MDA-435 腫瘤細胞系對藥物有反應，此種藥物配方比克莫佛作為媒劑時忍受度更佳。

使用 MDA-MB-435 之乳癌研究中，僅較高劑量之 PG-TXL 可抑制乳房脂肪墊腫瘤生長速率。由生長曲線顯然易知單次注射接合物後約 30 日腫瘤恢復生長。但生長曲線並未顯示於 PG-TXL 120 毫克／千克組其中有許多腫瘤退行。如表 3 所示，殘留腫瘤小鼠之肺轉移發生率也減低。雖然研究中之小鼠頭數少，但未提示該治療可有效減少局部腫瘤生長及轉移的發生率。

本研究設計無法區別轉移發生率降低係由於原發部位之腫瘤質量減小，或由於對治療時已經建立的任何顯微轉移的直接作用。

使用多次注射 PG-TXL 於活體內試驗治療人類乳癌

爲了試驗多次注射 PG-TXL 的效果，裸小鼠注射 2×10^6 MDA-435-Lung 2 細胞 (MDA-MB-435 人類乳癌細胞系變異株至乳房脂肪墊。腫瘤達平均 5 毫米直徑時開始治療，且以 14 日間隔 (24，38，52 日) 重複共注射 3 次。每周測量腫瘤。小鼠於注射腫瘤細胞後第 105 日殺死，記錄腫瘤重量及轉移發生率。肺臟作組織學處理，單次剖面記錄是否存在有顯微轉移。結果示於表 5。

表 5

處理	取得腫瘤 a	平均重量(克)b	腫瘤退行 c	轉移 d
無	4／5	1.83±0.15	-	4/4(100%)
PG 對照	6／10	1.7±0.11	-	5/6(83%)
PG-TXL／ 60 毫克	7／10	1.36±0.28	-	6/7(86%)
PG-TXL／ 120 毫克	8／10	0.97±0.22 =0.011e	2/8	2/6(33%)

註：^a 治療時帶有 5 毫米腫瘤之小鼠頭數／注射小鼠頭數

^b 腫瘤平均重量 (±標準差)

^c 屍體解剖時腫瘤退行數目

^d 巨觀或微觀帶有肺轉移小鼠頭數／腫瘤小鼠頭數

^e 非成對 t 試驗比較處理小鼠及對照 PG 組腫瘤重量所得 p 值。

使用 PG-TXL 接合物於活體內試驗治療人卵巢癌

裸鼠腹內注射人卵巢癌細胞系 SKOV3ipl。腫瘤注射後 5 日，小鼠靜脈注射濃度相當於 120 毫克／千克或 160 毫克／千克帕克里達瑟爾之 PG-帕克里達瑟爾 (PG-TXL) 最初計劃以 7 日間隔重複注射，但單次注射 160 毫克／千克劑量殺死 10 頭小鼠中的 5 頭。故僅有 120 毫克／千克組接受三劑注射。研究於第 98 日終止，並殺死任何存活小鼠。結果示於第 14 圖及表 6。

各組之存活中間值為：未處理 = 47 日，PG 對照 = 43 日，PG-TXL(120 毫克／千克) = 83 日，PG-TXL(160 毫克／千克) = 83 日〔注射此非包括因藥物初始毒性死亡的小鼠〕。

表 6

處理	取得腫瘤 ^a	存活中間值(範圍) ^b	腹水 ^c	平均容積(毫升) ^d
無	10/10	56(38-98)	8/10	2.2±1.6
PG 對照	8/9	45(39-98)	8/8	2.2±1.6
PG-120	7/8	82(59-98)	3/7	2.7±1.4
PG-120	3/5 ^e	84(34 -98)	0/3	-

註：^a 腫瘤發生率／注射小鼠頭數

^b 存活時間中間值，日數

^c 腹水發生率／帶腫瘤之小鼠頭數

^d 腹水平均容積(及標準差)

^e 僅接受單劑 PG-帕克里達瑟爾 160 毫克／千克之小鼠而不包括於治療 5 日內死亡的小鼠。

^f 於第 34 日殺死的小鼠極少帶有腫瘤但下身麻痺(可能毒性?)。

PG-TXL 120 毫克／千克比較單獨注射 PG 的小鼠可顯著延長帶有腹內 SKOV3ipl(人卵巢癌細胞系其過度表現 HER2／neu)小鼠的存活時間。多劑及／或提高接合物劑量除了延長存活時間外，也可顯著減少腫瘤發生。

前述裸鼠研究中，生長曲線顯示雖然乳癌的生長僅藉帕克里達瑟爾檢驗，特別使用較高劑量接合 PG 檢驗，但治療後約 1 個月腫瘤大小仍持續加大。第二(或第三)回合治療可使腫瘤生長變成平台狀態，或使更多腫瘤退行。生長曲線不包括已經退行的腫瘤，如表 4 所示，使用最高劑量 PG-TXL 處理小鼠之 50% 腫瘤收縮／消失，其中 4 頭於研究結束時帶有漸進生長的腫瘤，僅有一頭於肺臟有顯微轉移。故該處理可減少原發腫瘤的生長，也降低轉移發生。其它各治療組包括克莫佛及 PG 對照組之轉移發生率皆低於 PBS 對照組，故無法陳述紫杉酚／克莫佛組之轉移發生率降低為一項有意義的發現。

實例 2

DTPA-帕克里達瑟爾

DTPA-帕克里達瑟爾之合成：

於帕克里達瑟爾(100 毫克，0.117 毫莫耳)於無水

DMF(2.2 毫升)之溶液於 0℃加入二伸乙基三胺五乙酐(DTPAA)(210 毫克, 0.585 毫莫耳)。反應混合物於 4℃攪拌隔夜。懸浮液經過濾(0.2 微米密利波(Millipore)濾膜)去除未反應之 DTPA 酐。濾液傾注於蒸餾水, 於 4℃攪拌 20 分鐘及收集沈澱。粗產物於 C₁₈ 矽膠板藉製備性 TLC 純化, 及於乙腈/水(1:1)展開。帕克里達瑟爾具有 R_f 值 0.34。帕克里達瑟爾上方具有 R_f 值 0.65 至 0.75 之帶藉刮下取出, 以乙腈/水(1:1)混合物溶離, 去除溶劑獲得 15 毫克 DTPA-帕克里達瑟爾呈產物(產率 10.4%) : mp : >226℃分解。紫外光譜(鈉鹽於水)顯示最大吸收於 228nm, 其亦為帕克里達瑟爾之特徵。質譜 : (FAB)m/e 1229(M+H)⁺, 1251(M+Na), 1267(M+K)。¹H NMR 譜(DMSO-d₆)中, DTPA 之 NCH₂CH₂N 及 CH₂COOH 共振出現為複合系列信號於 δ 2.71-2.96ppm 及呈多峰於 δ 3.42ppm。於 4.10ppm 之 C7-H 之共振於帕克里達瑟爾移至 5.51ppm, 提示 7-位置酯化。光譜其餘部分符合帕克里達瑟爾光譜。

DTPA-帕克里達瑟爾之鈉鹽之獲得方式係將 DTPA-帕克里達瑟爾於乙醇溶液加入等量 0.05M 碳酸氫鈉, 接著凍乾獲得水溶性固體粉末(溶解度>120 毫克當量帕克里達瑟爾/毫升)。

DTPA-帕克里達瑟爾之水解安定性 :

DTPA-帕克里達瑟爾之水解安定性係於加速條件下研究。簡言之, 1 毫克 DTPA-帕克里達瑟爾溶解於 1 毫升 0.5M 碳酸氫鈉水溶液(pH9.3)及藉 PHLC 分析。PHLC 系統係由 Waters 150×3.9(內徑)毫米 Nova-Pak 管柱填

裝 C184 微米矽膠，Perkin-Elmer 等角 LC 泵，PE Nelson 900 系列介面，Spectra-Physics UV/Vis 檢測器及資料站組成。溶離劑(乙腈／甲醇／0.02M 乙酸銨 = 4 : 1 : 5)以 1.0 毫升／分鐘於 228nm 使用紫外光檢測進行。DTPA-帕克里達瑟爾及帕克里達瑟爾之停留時間分別為 1.38 及 8.83 分鐘。峰面積經量化，且與標準曲線比較來決定 DTPA-帕克里達瑟爾於 0.5M 碳酸氫鈉溶液之半生期估值於室溫為約 16 日。DTPA-帕克里達瑟爾用於試管試驗對 B16 小鼠黑素瘤生長的效果：

細胞以 2.5×10^4 細胞／毫升播種於 24 孔平板，及於 50 : 50 杜別克(Dublecco)改質最低必需培養基(DEM)及 F12 培養基含有 10% 小牛血清於 37°C 於 97% 潮濕 5.5% 二氧化碳氣氛下培育 24 小時。然後培養基以新鮮培養基含帕克里達瑟爾或 DTPA-帕克里達瑟爾濃度於 5×10^9 M 至 75×10^9 M 之範圍替代。40 小時細胞利用胰蛋白 18 分解釋放，且於庫特(Coulter)計數器計算數目。DMSO(用於溶解帕克里達瑟爾)及 0.05M 碳酸氫鈉溶液(用於溶解 DTPA-帕克里達瑟爾)於細胞培養基之終濃度低於 0.01%。此種溶解量藉對照研究測定對細胞生長不造成影響。

DTPA-帕克里達瑟爾對 B16 黑素瘤細胞生長的影響示於第 2 圖。以不等濃度培養 40 小時後，就細胞毒性比較 DTPA-帕克里達瑟爾及帕克里達瑟爾。帕克里達瑟爾及 DTPA-帕克里達瑟爾之 IC^{50} 分別為 15nM 及 7.5nM。對乳癌 MCa-4 腫瘤模組之抗腫瘤效果：

雌性 C3Hf/Kam 小鼠於右大腿肌肉(5×10^5 細胞／小鼠)

接種乳癌 (MCa-4)。腫瘤生長至 8 毫米 (約 2 周) 時，以 10、20 及 40 毫克當量帕克里達瑟爾 / 千克體重投予單劑帕克里達瑟爾或 DTPA-帕克里達瑟爾。對照研究使用鹽水及以鹽水稀釋的絕對醇 / 克莫佛 50 / 50 (1 : 4)。每日測量三個正交腫瘤直徑而決定腫瘤的生長。腫瘤直徑達 12 毫米時，計算腫瘤生長延遲。腫瘤約 15 毫米時犧牲小鼠。腫瘤生長曲線示於第 3 圖。比較對照，帕克里達瑟爾及 DTPA-帕克里達瑟爾於 40 毫克 / 千克劑量皆顯示抗腫瘤效果。也分析資料決定腫瘤直徑 12 毫米之平均日數。統計分析顯示 DTPA-帕克里達瑟爾比鹽水處理對照於 40 毫克 / 千克劑量可顯著延遲腫瘤生長 ($p < 0.01$)。腫瘤生長達直徑 12 毫米之平均時間對 DTPA-帕克里達瑟爾為 12.1 日，比較帕克里達瑟爾為 9.4 日 (第 4 圖)。

使用 ^{111}In 對 DTPA-帕克里達瑟爾作放射性標記

2 毫升之 V 字形小瓶內循序加入 40 微升 0.6M 乙酸鈉 (pH5.3) 緩衝液，40 微升 0.06M 檸檬酸鈉緩衝液 (pH5.5)，20 微升 DTPA-帕克里達瑟爾溶液於乙醇 (2% w/v)，及 20 微升 $^{111}\text{InCl}_3$ 溶液 (1.0mCi) 於乙酸鈉緩衝液 (pH5.5)。於室溫培育 30 分鐘後，經標記的 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾藉通過 C18 Sep-Pac 卡匣使用鹽水隨後使用乙醇作動相純化。藉鹽水移出游離 ^{111}In -DTPA (<3%)，同時收集 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾於乙醇洗液。乙醇於氮氣下蒸發，經標記產物於鹽水中重構。放射化學產率：84%。

^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾之分析：

HPLC 用於分析反應混合物及 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾純度。系統係由 LDC 二元泵， 100×8.0 毫米 (內徑) Waters 柱填裝 ODS 5 微米矽膠組成。管柱以 1 毫升/分鐘流速使用水及甲醇之梯度混合物 (經 15 分鐘由 0% 至 85% 甲醇梯度) 溶離。梯度系統使用碘化鈉晶體檢測器及 Spectra-Physics UV/Vis 檢測器監控。由 HPLC 分析可證藉 Sep-Pak 卡匣純化可去除大半 ^{111}In -DTPA，其停留時間為 2.7 分鐘。 ^{111}In -DTPA 可能衍生自 DTPA-帕克里達瑟爾中之微量 DTPA 污染物。 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾之放射性層析圖與其紫外光層析圖之交互關係指出於 12.3 分鐘之峰值確實為目標化合物。於相同層析條件下，帕克里達瑟爾之停留時間為 17.1 分鐘。最終製劑之放射性化學純度藉 HPLC 分析測得為 90%。

全體閃爍攝影術：

雌性 C3Hf/Kam 小鼠於右大腿肌肉接種乳癌 (MCa-4) (5×10^5 細胞)。腫瘤生長至直徑 12 毫米時，將小鼠分成兩組。第 I 組小鼠藉腹內注射戊基巴比妥鈉麻醉，接著經尾靜脈注射 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾 (100-200mCi)。配備有中能準直儀的 γ -攝影機安置於小鼠 (每組 3 頭)。於注射後 5, 30, 60, 120, 240 分鐘及 24 小時收集每 5 分鐘之數據。第 II 組遵循相同程序，但小鼠注射 ^{111}In -DTPA 作為對照。第 5 圖顯示注射 ^{111}In -DTPA 及 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾小鼠之伽瑪閃爍相片。 ^{111}In -DTPA 之特徵為由血漿快速廓清，於尿中快速高度排泄，於腎臟停留時間極短，於腫瘤、肝臟、腸及其它器官或身體部分的停留時間可忽略。相反地，

^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾具有類似帕克里達瑟爾之藥理輪廓圖 (Eiseman 等人, 1994)。腦部之放射性可忽略。肝及腎具有最大組織：血漿比。放射性標記 DTPA-帕克里達瑟爾或其代謝產物之肝膽分泌為藥物由血中廓清的主要的途徑之一。不似帕克里達瑟爾。顯著量之 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾也經由腎臟分泌，腎臟於帕克里達瑟爾之廓清上面顯示次要角色。腫瘤顯著攝取 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾。結果驗證獎 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾可檢測某些腫瘤及定量 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾於腫瘤的攝取，而其又有助於選擇接受帕克里達瑟爾治療病人。相反地，較小的 PG-TXL 接合物具有與 DTPA-帕克里達瑟爾不同的分布部分局限於試驗動物肝臟及腫瘤。

實例 3

聚乙二醇-帕克里達瑟爾

聚乙二醇-帕克里達瑟爾 (PEG-帕克里達瑟爾) 之合成

合成係以二步驟完成。首先根據報告程序製備 2'-丁二醯基-帕克里達瑟爾 (Deutsch 等人, 1989)。帕克里達瑟爾 (200 毫克, 0.23 毫莫耳) 及丁二酐 (288 毫克, 2.22 毫莫耳) 於無水吡啶 (6 毫升) 於室溫反應 3 小時。然後蒸發去除吡啶，及殘餘物以水處理，攪拌 20 分鐘及過濾。沈澱溶解於丙酮，緩慢加水，及收集細小晶體獲得 180 毫克 2'-丁二醯基-帕克里達瑟爾。PEG-帕克里達瑟爾係藉 N-乙氧羰基-2-乙氧-1,2-二氫喹啉 (EEDQ) 媒介的偶合反應合成。2'-丁二醯基-帕克里達瑟爾 (160 毫克, 0.18 毫莫耳) 及甲氧聚氧伸乙基胺 (PEG-NH₂, MW5000, 900 毫克, 0.18 毫莫耳) 於二氯甲烷之溶液內加入 EEDQ (180

毫克，0.72 毫莫耳)。反應混合物於室溫攪拌 4 小時。粗產物於矽膠層析，使用乙酸乙酯接著藉氯仿-甲醇 (10:1) 溶離。獲得 350 毫克產物。 ^1H NMR 譜 (CDCl_3) δ 2.76(m, 丁二酸, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$) , δ 3.63(PEG, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) , δ 4.42(C7-H) 及 δ 5.51(C2'-H)。最大紫外光吸收係於 288nm，其亦為帕克里達瑟爾之特徵。附著於 PEG 大為改良帕克里達瑟爾之水中溶解度 (>20 毫克當量帕克里達瑟爾 / 毫升水)。

PEG-帕克里達瑟爾拉之水解安定性

PEG-帕克里達瑟爾以 0.4mM 濃度溶解於各種 pH 之磷酸鹽緩衝液 (0.01M)，溶液以溫和振搖於 37°C 培育。於選定的時間間隔取出整分 (200 微升) 及凍乾。所得乾粉再度溶解於二氯甲烷接受凝膠滲透層析術 (GPC 分析)。GPC 系統係由 Perkin-Elmer PL 凝膠混合床管柱，Perkin-Elmer 等 LC 泵，PE Nelson 900 系列介面，Spectra-Physics UV/Vis 檢分器及資料站組成。溶離劑 (二氯甲烷) 係以 1.0 毫克 / 分鐘流過。紫外光檢測器設定於 228nm。PEG-帕克里達瑟爾及帕克里達瑟爾之停留時間分別為 6.1 及 8.2 分鐘。定量峰面積及計算剩餘 PEG-帕克里達瑟爾百分率及釋放帕克里達瑟爾百分率。於 pH7.4 藉線性最小平方測得 PEG-帕克里達瑟爾半生期為 54 分鐘。於 pH9.0 之半生期為 7.6 分鐘。於 pH7.4 帕克里達瑟爾由 PEG-帕克里達瑟爾之釋放側錄圖顯示於第 8 圖。

於試管試驗使用 B16 小鼠黑素瘤細胞進行 PEG-帕克里達瑟爾之細胞毒性研究。

遵照使用 DTPA-帕克里達瑟爾之細胞毒性研究所述程序，黑素瘤細胞以 2.5×10^4 細胞／毫升濃度播種於 24 孔平板，及於 50：50 杜別克改質最低必需培養 (DME) 及 F12 培養基含 10% 小牛血清於 37°C 於 97% 濕化 5.5% 二氧化碳氣氛生長 24 小時。然後培養基以新鮮培養基含帕克里達瑟爾或其衍生物濃度於 $5 \times 10^{-9}M$ 至 $75 \times 10^{-9}M$ 之範圍替代。40 小時後，細胞藉胰蛋白 18. 分解釋放並於庫特計數器計算數目。DMSO (用於溶解帕克里達瑟爾) 及 0.05M 碳酸氫鈉溶液 (用於溶解 PEG-帕克里達瑟爾) 於細胞培養基之終濃度低於 0.01%。此種溶劑量藉對照研究決定對細胞生長無影響。此外，PEG 於使用濃度範圍產生帕克里達瑟爾當量濃度由 $5 \times 10^{-9}M$ 至 $75 \times 10^{-9}M$ 至也不影響細胞增生。

PEG-帕克里達瑟爾用於小鼠對 MCa-4 腫瘤之抗腫瘤效果

爲了評估 PEG-帕克里達瑟爾對實體乳房腫瘤的抗腫瘤效果，MCa-細胞 (5×10^5 細胞) 注射於雌 (C3Hf/Kam 小鼠) 之右大腿肌肉。如實例 1 以 DTPA-帕克里達瑟爾所述，當腫瘤生長至 8 毫米 (約 2 周) 時，以 10、20 及 40 毫克當量帕克里達瑟爾／千克體重注射單劑帕克里達瑟爾或 PEG-帕克里達瑟爾。帕克里達瑟爾最初溶解於含等量容積克莫佛之絕對乙醇。此備用溶液進一步以無菌生理鹽水於注射的 15 分鐘以內稀釋 (1：4 容積比)。PEG-帕克里達瑟爾溶解於鹽水 (6 毫克當量帕克里達瑟爾／毫升)，及經無菌濾膜 (密利玻，4.5 微米) 過濾。鹽水、帕克里達瑟爾媒劑、絕對醇：克莫佛 (1：1) 以鹽水 (1：4) 稀釋，及 PEG 溶液於鹽水 (600 毫克／千克體重) 用於對

照研究。每日測量三根正交腫瘤直徑決定腫瘤生長。當腫瘤大小達直徑 12 毫米時，計算腫瘤生長延遲。

腫瘤生長曲線顯示於第 9 圖。於 40 毫克／千克劑量，PEG-帕克里達瑟爾及帕克里達瑟爾皆可有效延遲腫瘤生長。帕克里達瑟爾比 PEG-帕克里達瑟爾更有效，但差異不具有統計學意義。帕克里達瑟爾處理腫瘤需 9.4 日才能達到 12 毫米直徑，而 PEG-帕克里達瑟爾處理腫瘤需要 8.5 日。統計學上此等數值比較其對應之對照組有意義 ($p>0.05$)，其對照組對帕克里達瑟爾媒劑為 6.7 日，及 PEG 鹽水為 6.5 日(第 4 圖)。

實例 5

聚(1-麩胺酸)-帕克里達瑟爾(PG-TXL)及帕克里達瑟爾藥理性質

本研究目標係比較 PG-TXL 及帕克里達瑟爾於試管試驗促進微管蛋白組合，對大鼠乳房腫瘤細胞系 13762F 及人乳房腫瘤細胞系抑制腫瘤細胞生長，誘發 p53 蛋白質，及挽救帕克里達瑟爾相關性突變細胞系等藥理性質。帕克里達瑟爾於活體內由 PG-TXL 釋放，經測量而決定 PG-TXL 之作用機轉是否係歸因於自由態帕克里達瑟爾。

使用聚麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)及帕克里達瑟爾進行微細管聚合

為了測試完整 PG-TXL 對促進微管蛋白聚合是否具有生物活性，比較帕克里達瑟爾，PG-TXL，及「老化」PG-TXL 於試管試驗中促進經純化之牛腦微管蛋白組合的相對能力。微管蛋白組合反應係於 32℃ 於 PEM 緩衝液(80mM PIPES 緩衝液，1mM EGTA，1mM $MgCl_2$ ，pH6.9)於微管

蛋白(牛腦, Cytoskeleton 公司, 科羅拉多州, 伯多)濃度 1 毫克/毫升($10\ \mu\text{M}$)於有或無藥物($1.0\ \mu\text{M}$ 當量帕克里達瑟爾)及 1.0mM 鳥糞 2',5'-三磷酸(GTP)存在下進行。「老化」PG-TXL 係將 PG-TXL 於 PBS(pH7.4)於 37°C 放置 3 日獲得。微管蛋白聚合反應係藉隨著時間之經過測量溶液於 340nm 之吸光率追蹤。添加 $1\ \mu\text{M}$ 帕克里達瑟爾至微管蛋白於組合緩衝液溶液造成微管蛋白聚合成爲微細管, 導致光散射增加的明確吸光率增高。相反地, $10\ \mu\text{M}$ 帕克里達瑟爾當量 PG-TXL 對聚合不具影響。於 PBS(pH7.4)於 37°C 「老化」3 日之接合物溶液具有增高的活性, 但其促進微管蛋白聚合能力仍顯著低於帕克里達瑟爾(第 10 圖)。

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)於試管試驗對大鼠及人腫瘤細胞系生長的影響

爲了評估於動物觀察得 PG-TXL 之優異抗腫瘤活性是否來自於細胞毒性增高, PG-TXL 及帕克里達瑟爾比較其對已經建立的大鼠乳房腫瘤細胞系 13762F 之抑制細胞生長能力。PG-TXL 對細胞生長的效果係藉 α -接種效率檢定分析檢驗。大鼠 13762F 細胞播種(200 細胞)於 60 毫米培養皿含藥物濃度由 0 至 200nM 於生長培養基(α 改質最低培養基 [α -MEM] 含 5% 胎牛血清, 50 單位/毫升青黴素, 及 50 微克/毫升鏈黴素)。生長 6 日後, 細胞使用 0.1% 甲基藍染色並計算菌落數目。然後計算可產生 50% 菌落形成抑制之藥物濃度(IC_{50})。連續暴露 6 日後之概算 IC_{50} 值爲帕克里達瑟爾(2nM), PG-TXL(100nM), 「老化」(參見下文)PG-TXL(50nM)。顯然 PG-TXL 之強度比帕克里達瑟爾本身低約 30-50 倍。當

PG-TXL 於 37°C 於磷酸鹽緩衝鹽水溶液 (PBS, pH7.4) 培育 3 日而獲得「老化」溶液時，僅釋放約 10% 帕克里達瑟爾。因「老化」溶液比新鮮溶解 PG-TXL 強，故 PG-TXL 於試管試驗分解或釋放活性藥物顯然對 PG-TXL 發揮此種生物活性相當重要。但即使於「老化」後，PG-TXL 的強度仍比帕克里達瑟爾低 25 倍。

類似研究中，PG-TXL 對人乳癌細胞系之細胞生長效果於連續暴露 3 日後藉 MTT 檢定分析檢驗。雖然 PG-TXL 比帕克里達瑟爾對 MDA330 及 MDA-MB453 細胞系強 8 倍及 30，但 PG-TXL 對 MCF7/her-2 及 MCF7 細胞系之效果比帕克里達瑟爾低 2 倍及 3 倍。此等結果提示 PG-TXL 及帕克里達瑟爾並不同細胞系的活性不同。PG-TXL 可為具有與帕克里達瑟爾不同藥理性質的產物。

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾 (PG-TXL) 於試管試驗支援帕克里達瑟爾依賴型細胞系的能力

發明人研究 PG-TXL 拯救帕克里達瑟爾依賴型突變細胞系的能力。Tax 18 為對帕克里達瑟爾具抗性的 CHO 細胞系，為已經明確特徵化之突變株，發現其需要連續存在有帕克里達瑟爾才能細胞分裂。於無藥藥物存在下，功能有絲分裂者器件無法形成 (Cabral 等人，1983)。細胞週期的有絲分裂期延長結果無法分開染色體分成子細胞。雖言如此，細胞仍然通過細胞週期進展並增生 DNA，結果導致生成大型多套細胞最終由於基因不穩定死亡 (Cabras 及 Barlow，1991)。低濃度帕克里達瑟爾經由允許微細管組合及形成足量有絲分裂軸纖維而拯救突變的表現型。如此，此等細胞對可促進微細管

組合之藥劑提供方便的生物檢定方法。帕克里達瑟爾依賴型 CHO 突變株 Tax-18 細胞生長係於 24 孔組織培養皿上進行。約 100 個細胞加至含生長培養基之孔內，且含 0 至 $1.0 \mu\text{M}$ 之當量帕克里達瑟爾。於 37°C 培育 6 日後，移出培養基，細胞以甲基藍染色。

於無藥物存在下細胞數目少或未增加，但 $0.05\text{--}0.2 \mu\text{M}$ 濃度之帕克里達瑟爾明確支援此細胞系生長。較高濃度帕克里達瑟爾由於如同正常細胞觀察者般，微細管過度穩定，因此推定對細胞有毒。它方面，新鮮製備 PG-TXL 即使於最高試驗帕克里達瑟爾當量濃度 ($1 \mu\text{M}$) 拯救 Tax-18 細胞生長的能力極低。當 PG-TXL 於 37°C 於 PBS 「老化」6 日時，其支援 Tax-18 細胞生長的能力部分恢復。此等資料指示 PG-TXL 不會促進微細管組合，「老化」PG-TXL 之試管試驗生物活性係歸因於由聚麩胺酸-帕克里達瑟爾 (PG-TXL) 釋放的帕克里達瑟爾。

於活體內由 PG- $[^3\text{H}]$ TXL 釋放 $[^3\text{H}]$ 帕克里達瑟爾

爲了評估帕克里達瑟爾於活體內之藥力學及釋放特性，正常雌性 C3Hf/Kam 小鼠 (25-30 克) 於尾靜脈注射 20 毫克當量劑量之 $[^3\text{H}]$ 帕克里達瑟爾或 PG- $[^3\text{H}]$ 帕克里達瑟爾。各頭小鼠接受 $6 \mu\text{Ci}$ 放射性標記藥物。 $[^3\text{H}]$ 帕克里達瑟爾溶解於克莫佛 EL 賦形劑，而 PG- $[^3\text{H}]$ 帕克里達瑟爾溶解於鹽水。注入各頭小鼠的容積爲 0.2 至 0.3 毫升。於注射後 0、5、15、30 分鐘及 1、2、4、8、16、24、48 小時，犧牲動物並收集血樣 (每個時間點 4-5 點小鼠)。使用 10 微升整分血漿藉液體閃爍計數 (Beckman

型號 LS6500，加州，富林頓)測量血漿之總放射性。200 微升血漿使用 3 倍量乙酸乙酯根據 Longnecker 等人 (1987) 萃取。帕克里達瑟爾之萃取效率為 80%。樣本於 2500rpm 離心 5 分鐘，分離上清液並乾燥。乾燥後之萃出物以 195 微升 HPLC 動相重新調製，混合 5 微升冷帕克里達瑟爾 (0.2 毫克/毫升)，及 100 微升注入 HPLC 用於測定自由態帕克里達瑟爾放射性。藥力學參數係使用 WinNonlin 套裝輪藉非腔室模式分析。產生的各資料點為 4-5 頭小鼠平均值。

兩種藥物中血漿之廓清率顯示於第 11 圖。雖然帕克里達瑟爾於小鼠血漿之半生期極短 ($t_{1/2}$ ，29 分鐘)，PG-TXL 半生期顯著延長 ($t_{1/2}$ ，317 分鐘)。PG-TXL 自由中之廓清較慢為聚合物-藥物接合物的設計特點，用於改良腫瘤攝取目的。出乎意外地，PG-TXL 轉成帕克里達瑟爾之轉化速率慢，於藥物注射後 144 小時內呈 [^3H] 帕克里達瑟爾由 PG- $[\text{}^3\text{H}]$ TXL 回收的放射性低於 0.1% (第 11 圖)。

分開研究中，如前述準備帶有 OCA-1 腫瘤的小鼠。腫瘤達 500 立方毫米時，動物尾靜脈注射 20 毫克當量帕克里達瑟爾/千克之 [^3H] 帕克里達瑟爾或 PG- $[\text{}^3\text{H}]$ TXL。動物於注射後 2、5、9、24、48 及 144 小時殺死。取出腫瘤、稱重及與 3 倍容積 PBS(w/v) 均化。每克組織之注入劑量百分比係基於腫瘤相關總放射性計算，放射性係藉計數製妥的組織均化物整分測定。一整分組織均化物混合組織增溶劑，接著加入閃爍溶劑，並計算總放射性。計算效率可藉標準添加方法證實。另外，組織均化

物整分使用乙酸乙酯萃取並藉 HPLC 分析自由態帕克里達瑟爾。HPLC 系統係由 150×3.9 毫米 Nova-Pak 管柱 (Waters, 麻省, 密利佛), 液相層析術泵 (Waters 型號 510), UV/Vis 檢測器設定於 228nm (Waters 型號 486), 流動閃爍分析儀 (Packard 型號 500TR, 伊利諾州, 道尼灣), 及 Packard 放射性計數軟體供資料分析組成。溶離溶劑 (甲醇 : 水 = 2 : 1) 流速為 1.0 毫克 / 分鐘。OCA-1 腫瘤攝取的總藥物量係以每克組織之投藥劑量百分比表示, OCA-1 腫瘤內部呈自由態帕克里達瑟爾結合的放射性係以每克組織 dpm 表示。

腫瘤攝取定量評估顯示比較放射性標記帕克里達瑟爾, 於注射後不久腫瘤組織內出現的來自放射性標記 PG-TXL 之放射活性程度相當高 (第 12A 圖)。但腫瘤組織內僅有小量放射性係來自於釋放自由態帕克里達瑟爾 (第 12B 圖)。第 12A 及 12B 圖所示資料係每個時間點由 3 頭小鼠所得平均 ± 標準差。腫瘤組織內部之來自帕克里達瑟爾之放射性百分比隨著時間的經過不會可察覺地增高, 提示 PG-TXL 並非單純為逐漸釋放帕克里達瑟爾的前藥。

與帕克里達瑟爾相反, 使用 PG-TXL 進行試管試驗研究無論製備成新鮮溶液或甚至於緩衝液「老化」後, 皆明白顯示複合體並非強力生物毒性物種。複合體既不會強力支援微管蛋白聚合, 也不會支援帕克里達瑟爾依賴型 CHO 細胞系的生長及純化。此外, 得自藥力學研究資料指示帕克里達瑟爾於血漿釋放程度及速率極慢 (144 小時低於 0.1%)。雖然使用相當抗腫瘤劑量時, PG-TXL

之攝取比帕克里達瑟爾之攝取高約 5 倍，但得以進入組織且存在於組織的主要形式顯示並非自由態帕克里達瑟爾。

實例 6

聚合物結構對水溶性聚胺基酸-帕克里達瑟爾接合物活性的影響

本研究評估聚合物-帕克里達瑟爾接合物之抗腫瘤活性是否受藥物用於接合的聚胺基酸結構影響。帕克里達瑟爾根據前述程序偶合至聚(1-麩胺酸)，聚(d-麩胺酸)，及聚(1-天冬胺酸)。此等聚胺基酸-帕克里達瑟爾接合物具有類似的帕克里達瑟爾含量、水中溶解度及分子量(30-40K)。帶有鼠 OCA-1 卵巢癌(處理時為 500 立方毫米)之 C3Hf/Kam 小鼠單次靜脈注射聚(1-麩胺酸)-帕克里達瑟爾，劑量為 80 毫克當量帕克里達瑟爾／千克體重，相對於鹽水處理對照產生腫瘤生長延遲 21 日。聚(d-麩胺酸)-帕克里達瑟爾效果同聚(1-麩胺酸)-帕克里達瑟爾。但與聚(1-天冬胺酸)接合的帕克里達瑟爾對 OCA-1 腫瘤完全無活性。分開研究中，比較不同分子量(1K, 13K 及 36K)聚合物-帕克里達瑟爾接合物之抗腫瘤活性。較低分子量接合物顯著比較高分子量接合物無效。高於 50,000 之較高分子量太過黏稠。

實例 7

聚麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)誘生之細胞凋零程序比帕克里達瑟爾少

為了評估 PG-TXL 關聯的抗腫瘤活性機轉，檢視由帕克里達瑟爾及 PG-TXL 處理小鼠切除的 OCA-1 腫瘤的組

織切片。帶有 OCA-1 腫瘤小鼠如前述製備。當腫瘤體積達 500 立方毫米時，動物注射帕克里達瑟爾 (80 毫克／千克) 或 PG-TXL (160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)。於處理後 0 至 144 小時的不同時間點，腫瘤作組織學分析根據 Milas 等人 (1995) 定量其有絲分裂及細胞凋零活性。小鼠藉斬首殺死，即刻切除腫瘤並置於中性緩衝液福馬林內，然後處理組織並以 hematoxylin 及伊紅染色。有絲分裂及細胞凋零皆係於有初度的玻片上藉 400 倍放大顯微鏡檢查評分。於各個組織學檢體隨意選擇五區非壞死區，於各區記錄每 100 個核之細胞凋零核及有絲分裂細胞數目，並以百分比表示。該值係基於每個時間點得自 3 頭鼠之 1500 個細胞核評分。

於帕克里達瑟爾處理組小鼠觀察得之變化就定量方面而言類似前述者 (Milas 等人, 1995)。腫瘤細胞顯示明顯細胞核分段，且生成細胞凋零體，於第 1 日特別顯著 (第 13 圖)。至 144 小時此等腫瘤仍然存在有帶有正常絲分裂的存活腫瘤細胞團塊，指示此種腫瘤最終再度生長。使用 PG-TXL 處理僅導致有絲分裂暫停細胞及凋零細胞的輕度增加，推定由於 PG-TXL 釋放出少量自由態帕克里達瑟爾故 (第 13 圖)。至 96 小時，PG-TXL 處理組小鼠之腫瘤出現全面水腫及壞死，僅殘存少量邊緣存活腫瘤細胞。至 144 小時時，殘餘腫瘤團塊比較對照組係由較大的、較為多行性的、且顯示較低有絲分裂活性的細胞組成。

此等資料提示本揭示之水溶性 PG-TXL 接合物具有優異抗腫瘤效果，毒性比習知自由態帕克里達瑟爾製劑

此等修改皆涵蓋於本發明之範圍。

動物研究

此等研究係於大鼠及小獵犬進行，各種藥物劑量約研究 3 頭動物。劑量提高至發現威脅生命之毒性為止。動物進行血液試驗及屍體檢驗而決定對此種藥物毒性敏感的器官系統，預測於人體研究的副作用。一旦決定可引起 10% 動物死亡的毒性，則推薦該劑量的 $1/10$ 作為人體研究之開始劑量。此乃食品藥物管理局 (FDA) 一般推薦作為第 I 期人體研究的初劑量。

第 I 期研究

此藥藥物之第 I 期研究係使用動物研究定義的開始劑量進行。藥物以數分鐘時間注射入靜脈，或可以至多約 0 至 15 分鐘之短時間輸注。溶劑容積為 10 毫升至約 100 毫升，取決於採用何種靜脈注射方法，藥物每隔 3 周投藥。此種用法係基仿早期動物研究，以及帕克里達瑟爾於克莫佛之用法。三位病人以動物研究決定的最低劑量開始，以注射 PG-TXL 治療。於基線及每週進行血液試驗來評估血球數目；每 3 週測肝功能及腎功能。預期血球數目及生理參數於前次治療後 3 週之下個處理週期時，可由 PG-TXL 充分恢復。若為此情況時，則處理將每 3 週重複一次。若第一期三位病人可忍受藥物 3 週，則此等病人允許以尋常用於第 I 期研究的預定用法用量提高劑量。一旦三位病人已經忍受過第一週期，則其次 3 位病人開始接受次一較高劑量。此種提高劑量過程連續至 3 位人中至少有 2 位於使用該劑量之副作用太嚴重，而無法繼續投藥為止。此種情況下，恰

於毒性劑量前的劑量被視為隨後研究之投藥劑量。6 至 10 位病人接受第 II 期研究之推薦劑量來證實其忍受性。一旦決定適當劑量及評估藥物的急性毒性副作用，則開始第 II 期研究。

第 II 期研究

PG-TXL 之第 II 期研究係於數種類型腫瘤進行。各研究係遵照 Gahan 或 Simon 設計以尋常標準第 II 期方式設計。簡言之，對特定腫瘤類型約 14 位病人開始接受治療，若該腫瘤類型並無抗癌活性證據，則放棄 PG-TXL 用於該型腫瘤的進一步研究。但若至少一位病人有臨床效果，定義為腫瘤垂直剖面直徑之積之和至少縮小 50%，則使用 PG-TXL 治療的該型腫瘤病人數將增至 30，此等研究允許定義 PG-TXL 於各型腫瘤的活性，並精密考慮有關藥物副作用資訊。PG-TXL 特定感興趣的腫瘤類型為對帕克里達瑟爾及杜西達瑟爾顯示良好反應的類型。包括卵巢癌、乳癌及肺癌。對 PG-TXL 有反應之腫瘤進行聚麩胺酸-帕克里達瑟爾與帕克里達瑟爾之比較研究。此種研究稱作第 III 期研究。

PG-帕克里達瑟爾之第 III 期研究

基於帕克里達瑟爾於卵巢癌、乳癌及肺癌之活性，採用此等腫瘤類型進行 PG-TXL 及帕克里達瑟爾之比較研究。鑑於此種隨機研究需要大量病人，發明人預期可能需要多研究機構研究。發明人之研究機構係利用合作社區腫瘤計劃 (CDDP) 及多個其它多機構研究小組。除了 PG-TXL 相對於帕克里達瑟爾之可能臨床效果外，也適合評估兩種藥物的經濟衝擊。預期短時間輸注 PG-TXL

成本較低。因此預期 PG-TXL 相對於帕克里達瑟爾之單一療法具有成本效益。不僅輸注時間較短，也預期不存在有克莫佛之副作用，因此副作用較低，也不再需要包括類固醇及靜脈注射 H_2 及 H_1 遮斷劑之前期給藥處理。所有此等因素將導致治療成本下降。

結語

預期初期動物毒性評估需時 6 個月。隨後若可取得藥物配方，則第 I 期人體研究又需 6 至 9 個月。一旦此研究完成，於各型腫瘤之第 II 期研究又需時 6 至 9 個月。此時發明人獲得此種藥物有效的觀點，因而設計並開始鎖定目標的第 III 期研究。也可能第 II 期研究顯示充分臨床活性，因此縮短第 III 期研究或無需第 III 期研究。

實例 12

藉聚(L-麩胺酸)-帕克里達瑟爾接合物促進鼠卵巢癌之腫瘤放射性反應

引言

化學治療及放射性治療合併用於治療各型腫瘤已經使得完全反應及存活率顯著改善(Rotman, 1992)。試管研究及活體研究皆驗證帕克里達瑟爾可強力增強腫瘤之放射性反應。動物研究中，隨腫瘤類型、藥物濃度及用法量而定，增強因數於 1.2 至大於 2.0 之範圍。此項研究係了解聚(L-麩胺酸)-帕克里達瑟爾(PG-TXL)之放射性敏化效果。

實驗方法

PG-TXL 如此處所述係由聚(L-麩胺酸)(Sigma, 黏度

分子量：31K)合成。接合物含有 20% 帕克里達瑟爾 (w/w) 透過酯鍵聯偶合至 PG。雌性 C3Hf/Kam 小鼠於右後腿肌肉接種 5×10^5 卵巢 OCa-1 癌細胞。當腫瘤直徑達 8 毫米時，將小鼠隨機分成 12 組，每組含 6 至 12 頭小鼠。第 1-5 組的小鼠給予鹽水，第 14 組單獨以 Gy 照射，或單獨 PG-TXL 以 48、80 或 120 毫克當量帕克里達瑟爾／千克處理。第 6-9 組小鼠給予 PG-TXL 以 47 毫克當量帕克里達瑟爾／千克，及於 PG-TXL 處理後 2、24、48 及 144 小時接受 14Gy 局部照射。第 10 組給予 PG-TXL 80 毫克當量帕克里達瑟爾／千克，及於 PG-TXL 處理後 24 小時接受 14Gy 照射。第 11 及 12 組給予 PG-TXL 120 毫克當量帕克里達瑟爾／千克，及於 PG-TXL 處理前 24 小時或後 24 小時接受 14Gy 照射。PG-TXL 以單次靜脈注射投藥。腫瘤之局部伽瑪附線照射係由 ^{37}Cs 施照體以每分鐘 7Cy 劑量照射。藉測量三條正交腫瘤直徑決定腫瘤生長延遲至腫瘤直徑達 14 毫米為止。

結果與討論

PG-TXL 之放射性敏化效果與劑量有關。於 47 毫克當量帕克里達瑟爾／千克之較低 PG-TXL 劑量，觀察得低於加成效果。隨放射性照射時間而定，平均促進因數由 0.54 變化至 0.75。但於較高 PG-TXL 劑量觀察得超過加成效果。當 PG-TXL 係於照射前 24 小時給藥，且 PG-TXL 劑量由 47 加至 80 及 120 毫克當量帕克里達瑟爾／千克時，平均促進因數由 0.75 增加至 1.8 及 4.2(表 7)。使用 PG-TXL 較低劑量觀察得化學放射性治療之低於成效果可能原因為細胞殺死不足，而存活細胞重新快速增

長。於較高劑量時，PG-TXL 對週期循環腫瘤細胞族群及／或腫瘤之再氧合產生顯著效果，結果獲得放射性敏化效果顯著增高。令人感興趣地，當腫瘤使用 PG-TXL 120 毫克當量帕克里達瑟爾／千克處理前以 14Gy 照射時，觀察得超過加成效果，促進因數為 4.3(表 7)。此項結果係於帕克里達瑟爾於放射線照射後給藥誘發放射線抗性之先前觀察現象相反(Ingram 及 Redpath, 1997)。

表 7

PG-TXL 對鼠卵巢 OCa-1 腫瘤之放射性反應之影					
處理	放射性 (14Gy)	腫瘤由 8 生長至 14 毫米日數(平均±標準差)	絕對生長 延遲日數 ^a	規度化生長 延遲(平均 ±標準差) ^b	促進因數 (95% C.I.) ^c
鹽水	否	17.2±2.2			
PG-TXL 47 毫 克當量/千克	否	19.8±0.98	2.7		
PG-TXL 80 毫 克當量/千克	否	25.3±3.9	8.1		
PG-TXL 120 毫 克當量/千克	否	29.7±3.2	12.5		
14Gy 單獨照射	是	37.9±6.1	20.7		
PG-TXL 47 毫 克當量/千克	是	35.3±4.7	18.2	15.5±4.7	0.75(0.5-0.98)
PG-TXL 80 毫 克當量/千克	是	62 ± 4.6	45.6	37.5±4.6	1.8(1.5-2.2)
PG-TXL 120 毫 克當量/千克	是	115 ± 3	98.4	85.9±3.0	4.2(3.9-4.3) ^c
PG-TXL 120 毫 克當量/千克	是	117±1.2	100.5	88 ± 1.2	4.3(4.1-4.4) ^c

^a. 絕對生長延遲定義為處理組腫瘤由 8 生長至 15 毫米日數減鹽水處理組腫瘤由 8 生長至 14 毫米日數。

- ^b. 規度化生長延遲定義為接受 PG-TXL 及放射性合併處理組小鼠之腫瘤由 8 生長至 14 毫米日數減單獨使用 PG-TXL 處理組小鼠腫瘤由 8 生長至 14 毫米日數。
- ^c. 促進因數係將接受 PG-TXL 加放射性處理小鼠之規度化腫瘤生長延遲除以單獨使用放射性處理小鼠之絕對生長延遲獲得。
- ^d. 放射性係於 PG-TXL 處理前 24 小時照射。其它組合組：放射性係於 PG-TXL 處理後 24 小時照射。
- ^e. 資料係基於第 120 日時再度生長的腫瘤。兩組 6 頭小鼠中有 2 頭的腫瘤於第 120 日仍然無法測量。

討論

本研究結果指出 PG-TXL 合併放射性治療可有效用於放射性照射前或後來促進放射性敏化。此等結果進一步提示放射性敏化劑及抗癌藥物接合至水溶性聚合物載劑，可提供較強的放射性敏化效果。鑑於本揭示內容，業界人士了解可改變 PG-TXL 及此處揭示之其它組合物劑量，以及經外部或內部投藥（亦即由外部輻射來源投藥或經系統性投藥，例如藉注射或吞服放射性物質如含放射性同位素配方）之輻射劑量。處理計劃及劑量可因應人而異，考慮例如病人體重及年齡、接受治療的腫瘤類型、病情嚴重程度、先前及／或同時接受的治療處置、投藥方式等因素，業界人士容易依此等因素決定治療計劃及劑量。例如預期 PG-TXL 之較佳劑量範圍於相等帕克里達瑟爾劑量時為約 0.5 倍至約 2 倍 TXL 之最大忍受劑量。PG-TXL 之投藥量可於整個放射性治療過程分成小劑量投藥。也預期較佳照射範圍為約 50 至 70 蓋格 (Gy) 經約 5 至週投

藥，或約每週 10 蓋格。較佳投藥劑量包括於照射前約 1 至約 2 日，或照射後約 1 至約 2 日投予 PG-TXL。當然 PG-TXL 及其它聚合物-抗腫瘤藥或螯合劑-抗腫瘤藥組合物之投藥劑量可由業界人士判定對各病人獲得最大效益而改變及／或重複。

雖然已經就較佳具體例說明本發明組合物及方法，業界人士顯然易和可對此處所述組合物、方法及方法步驟或方法步驟順序作出變化而未悖離本發明之構想、精髓及範圍。特別顯然某些藥劑具有化學及／或生理相關性，其它水溶性聚合物-藥物接合物可替代此處揭示之藥劑而仍達成相同或類似的效果。所有此等業界人士顯然易知之類似替代及修改皆視為屬於如隨附之申請專利範圍界定之本發明之精髓、範圍及構想範圍內。

參考文獻

下列參考文獻提供此處所述之補充範例程序及其它細節，特別併述於此以供參考。

Bartoni 及 Boitard, "自由態及包囊紫杉酚之試管及活體試驗抗腫瘤活性", 微包囊期刊, 7: 1919-197, 1990。

Berstein 等人, "道諾黴素連結至葡萄聚糖之較高抗腫瘤效果: 試管及活體研究", 國家癌症協會期刊, 60: 379-384, 1978。

Boyle 等人, "藉麩胺酸鹽防止紫杉酚誘發神經病變", 癌症研究, 37: 290, 1996。

Cabral 及 Barlow, "對抗有絲分裂劑之抗性作為微細管結構及功能之基因探針", 醫藥治療學, 52: 159-171,

1991。

Cabral、Wible、Brenner、Brinkley，"紫杉酚需要中國倉鼠卵巢細胞之變異株附有受損的有絲分裂心軸總成"，細胞生物學研究，97：30-39，1983。

Cortes, J.E.及 Pazdur, R., "杜西達瑟爾 (Docetaxel)"，臨床腫瘤學期刊，13：2643-2655，1995。

Deutsch 等，"同源物及原體之合成。3 具有強力抗腫瘤活性之帕克里達瑟爾之水溶性原體"，醫藥化學期刊，32：788-792，1989。

Duncan 等，"抗腫瘤劑耦合至 N-(2-羥丙基)甲基丙基醯胺共聚物。3 亞力亞黴素接合物於活體試驗對小鼠白血病 L1210 之評估"，控制釋放期刊，10：51-63，1989。

Eiseman 等，"帕克里達瑟爾 CD2F1 小鼠之血漿藥物動力學及組織分佈"，癌症化學治療藥理學，34：465-471，1994。

Fidler、Gersten、Hart，"癌症侵襲與轉移之生物學"，先進癌症研究，28：149-250，1987。

Foa、Norton、Seidman，"紫杉酚 (帕克里達瑟爾)：藉由顯著抗腫瘤活性之抗微細管劑"，國際臨床實驗室研究期刊，24：6-14，1994。

Goldspiel，"紫杉酚醫藥議題：製備、投藥、穩定性以及與其他藥物的配伍性"，藥理治療學年度演講，28：S23-26，1994。

Greenwald 等，"高度水溶性紫杉酚衍生物：2'-聚乙二醇酯作為強力產物"，生物有機及醫藥化學函件，4：2465-2470，1994。

Greenwald 等，"高度水溶性紫杉酚衍生物，7-聚乙二醇酯作為強力產物"，有機化學期刊，60：331-336，1995。

Greenwald 等，"藥物輸送系統：水溶性紫杉酚 2'-聚(乙二醇)酯原體設計及活體試驗效果"，醫藥化學期刊，39：424-431，1996。

Hirano 等，"活化環磷醯胺之聚合物衍生物作為抗腫瘤治療之藥物輸送系統"，巨分子化學，180：1125-1130，1979。

Hoes 等，"抗腫瘤抗生素亞力亞黴素之巨分子原體之最適化"，控制釋放期刊，2：205-213，1985。

Holmes、Kudelka、Kavanagh、Huber、Ajani、Valero，"帕克里達瑟爾及杜西達瑟爾之臨床研究現況"於；紫杉烷抗癌劑：基本科學及目前狀態，Georg、Chen、Ojima、Vyas 編輯，美國化學會，華盛頓特區，31-57，1995。

Horwitz 等，"紫杉酚，作用及抗性機轉"，國家癌症研究院期刊單篇，No.15，pp.55-61，1993。

Ingram 及 Redpath，"放射性與紫杉酚於活體試驗之次加成交互作用"，國際放射性腫瘤學生物物理學期刊，37：1139-1144，1997。

Kato 等，"1-巴拉丙諾(barabino)(七)喃糖基胞2.接合聚麩胺酸及其衍生物之抗腫瘤活性"，癌症研究，44：25-30，1984。

Kopecek 及 Kopeckova，"鎖定目標之水溶性聚合物抗癌藥物：成就及未解決的問題"，國際控制釋放生物活性物質研討會議事錄，20：190-191，1993。

Kopecek，"水溶性聚合物載劑用於鎖定目標且為部位

特異性藥物輸送之潛力"，控制釋放期刊，11：279-290，1990。

Li 等，水溶性聚乙二醇帕克里達瑟爾接合物作為帕克里達瑟爾原體之合成及評估"抗癌藥物，7：642-648，1996。

Li、Yu、Newman、Cabral、Stephens、Hunter、Milas、Wallace，"使用新穎水溶性(L-麩胺酸)帕克里達瑟爾接合物使用明確建立的腫瘤完全退行"癌症研究，58：2404-2409，1998。

Liu 等，"酪胺酸磷酸化作用於紫杉酚誘發人類卵巢腫瘤細胞系之細胞凋零程序之關聯證據"，生化藥理學，48：1265-1272，1994。

Longnecker 等，"紫杉酚於人類血漿及尿液之高效液相層析檢定分析及第一期試驗之藥理學"，癌症治療學 71：53-59，1987。

Maeda 及 Matsumura，"巨分子藥物之親腫瘤細胞及親淋巴細胞原理"，治療藥物載劑系統之關鍵綜論，6：193-210，1989。

Maeda，"SMANCS 及聚合物接合巨分子藥物：癌症化學治療之優點"，先進藥物輸送綜論，6：181-193，1991。

Maeda、Seymour、Miyamoto，"抗癌劑與聚合物之接合體：活體試驗中巨分子治療學之優點"，生物接合化學，3：351-362，1992。

Magri 及 Kingston，"改質紫杉酚。2 紫杉酚之氧化產物"，有機化學期刊，51：797-802，1986。

Mathew 等，"具有抗腫瘤活性之紫杉酚之若干水溶性原

體及衍生物之合成與評估"，醫藥化學期刊，35：145-151，1992。

Milas 等，使用紫杉酚治療鼠乳癌及弱卵巢癌之有絲分裂停止及細胞凋零程序之動力學"，美國癌症化學治療藥理學會議事錄，35：297-303，1995。

Mosmann, T, "細胞生長及存活之快速比色檢定分析：應用於增生及細胞毒性檢定分析"，免疫方法期刊，65：55-63，1983。

Nicolaou、Riemer、Kerr、Rideout、wrasidio，"原紫杉酚之設計、合成及生物活性"，自然，364-464-466，1993。

Oliver, S.J.等"使用血管生成抑制劑，AGM-1470 及微細管安定劑紫杉酚抑制膠原誘發的關節炎"，細胞免疫學，157：291-299，1994。

Phillips-Hughes 及 Kandarpa，"血管再度狹窄：病理生理及預防策略"，JVIR 7：321-333，1996。

Reynolds, T.，"聚合物輔助引導癌症藥物至腫瘤目標且將其維持於該處"，國家癌症研究所期刊，87：1582-1584，1995。

Rose 等"水溶性帕克里達瑟爾衍生物之臨床前抗腫瘤活性"，癌症化學治療之藥理學，39：486-492，1997。

Rotman，"化學刺激：癌症治療的新啓示。1991 年 RSNA 放射性腫瘤學年度演講"，放射學，184-319-329，1992。
owinsky 及 Donehower，"綜論帕克里達瑟爾(紫杉酚)"，新英格蘭醫學期刊，332-1004-1014，1995。

Rowinsky, Chaudhry, Cornblath, Donehower，"帕克

里達瑟爾及具有題粒細胞群落刺激因子之西鉑丁之第一期及藥理學研究：神經肌肉毒性具有劑量限制性"，臨床腫瘤學期刊，11：2010-2020，1993。

Scudiero 等"可溶性四唑鎢／呋贊用於人類及其他腫瘤細胞系培養之細胞生長及藥物敏感性檢定分析評估"，癌症研究，48：4827-4733，1988。

Serruys, De Jaegere, Kiemeneij 等"汽球擴張移植模植入與汽球血管整形術用於冠心病病人之比較"，新英格蘭醫藥期刊，331：489-495，1994。

Sharma 及 Straubinger，"新穎紫杉酚配方：含紫杉酚脂小體之製備及特徵化"，藥物研究，11：889-896，1994。

Trouet 等"道諾汝必新及蛋白質與血清穩定的共價鍵聯以及藉溶小體水解酶逆轉，如對親溶小體藥物載劑接合物所需：試管試驗及活體試驗研究"，美國國家學術科學議事錄，79：626-629，1982。

美國專利 5,362,831

美國專利 5,583,153

van Heeswijk 等"多肽-亞力亞黴素接合物之合成及特徵化及其與亞力亞黴素之錯合物。第一部"，控制釋放期刊，1：301-315，1985。

Vyas 等，磷酸酶活化帕克里達瑟爾原體"，紫杉烷抗癌劑：基礎科學及現況，Georg、Chen、Ojima、Vyas 編輯，美國化學會，華盛頓特區，124-137，1995。

Weiss 等"紫杉酚之過敏反應"，臨床腫瘤學期刊，8：1263-1268，1990。

Zhao, Z. 及 Kingston, D.G.I., "改質紫杉酚。6 水溶性

紫杉酚酚酸鹽之製備"，自然產物期刊，54：1607-1611，1991。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖：帕克里達瑟爾，PEG 帕克里達瑟爾達瑟爾及 DTPA-帕克里達瑟爾之化學結構式。

第 1B 圖：PG-TXL 之生產之化學結構式及反應圖。

第 2 圖：帕克里達瑟爾，PEG-帕克里達瑟爾及 DTPA-帕克里達瑟爾用於 B16 黑素瘤細胞增生的效果。

第 3 圖 DTPA-帕克里達瑟爾用於 MCa-4 乳房腫瘤之抗腫瘤效果。

第 4 圖：使用帕克里達瑟爾，DTPA-帕克里達瑟爾及 PEG-帕克里達瑟爾治療後，腫瘤直徑達 12 毫米之時間中間值(日數)。

第 5 圖帶有 MCa-4 腫瘤小鼠於靜注射 ^{111}In -DTPA-帕克里達瑟爾及 ^{111}In -DTPA 之伽瑪閃爍相片。箭頭指示腫瘤。

第 6 圖：在不同 pH 值，以時間為函數，於 PBS 中測定 PG-TXL 之水解分解情形。-◇-表示釋放的帕克里達瑟爾百分比，-○-表示產生的代謝產物 -I。

第 7A 圖：PG-TXL 用於雌性 C3Hf/Kam 小鼠對抗同質基因 OCA-I 卵巢癌之抗腫瘤效果。藥物以單劑靜脈注射。數據以腫瘤容積之平均±標準差表示。a 為帶有 OCA-1 腫瘤之小鼠注射 -□-，PG 對照(800 毫克／千克；n=9)；-▲-，帕克里達瑟爾(80 毫克／千克；n=7)；-△-，帕克里達瑟爾(80 毫克／千克)加 PG(800 毫克／千克；n=5)；-●-，PG-TXL(80 毫克當量帕克里達瑟爾 n=7)；或 -○-，為 PG-TXL(160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克；n=6)。

第 7B 圖：PG-TXL 用於雌性小鼠對抗 13762F 腫瘤之抗腫瘤效果。-□-表示 PG 對照(220 毫克／千克；n=7)；-▲-表示帕克里達瑟爾(20 毫克／千克；n=5)；-△-表示帕克里達瑟爾(40 毫克／千克；n=7)；-●-表示 PG-TXL(20 毫克當量帕克里達瑟爾 n=5)，-○-表示 PG-TXL(40 毫克或 60 毫克當量帕克里達瑟爾／千克；n=9)。

第 7C 圖：PG-TXL 用於帶有 MCa-4 乳癌小鼠之抗腫瘤效果。-□-表示對單劑靜脈注射鹽水的反應，-△-表示對單劑靜脈注射 PG(0.6 克／千克)之反應；-◆-表示對 PG-TXL(40 毫克／千克)之反應，-◇-表示對 PG-TXL(60 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)之反應，-○-表示對 PG-TXL(120 毫克／千克)之反應。

第 7D 圖：PG-TXL 用於小鼠對軟組織肉瘤(FSa-II)之抗腫瘤效果。-□-表示對單劑靜脈注射鹽水的反應，-◇-表示對單劑靜脈注射 PG(0.8 克／千克)之反應；-○-表示對帕克里達瑟爾(80 毫克／千克)之反應，-△-表示對 PG-TXL(160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)之反應。

第 7E 圖：PG-TXL 用於小鼠對同質基因肝癌細胞(HCa-I)之抗腫瘤效果。-□-表示對單劑靜脈注射鹽水的反應，-△-表示對單劑靜脈注射 PG(0.8 克／千克)之反應；-○-表示對 PG-TXL(80 毫克／千克)之反應，-△-表示對 PG-TXL(160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)之反應。

第 8 圖：由 PEG-帕克里達瑟爾於磷酸鹽緩衝液(pH7.4)釋放帕克里達瑟爾之輪廓(profile)。顯示由 PEG-帕克里達瑟爾(-○-)於 pH7.4 釋放帕克里達瑟爾(-X-)之輪廓。

第 9 圖：PEG-帕克里達瑟爾用於 MCa-4 乳房腫瘤之抗

腫瘤效果。-□-表示單劑靜脈注射 PEG 鹽水溶液(60 毫克／毫升)之反應，-■-表示對克莫佛／醇媒劑之反應，-○-表示對單劑 40 毫克／千克體重帕克里達瑟爾之反應，-●-表示 PEG-帕克里達瑟爾於 40 毫克當量帕克里達瑟爾／千克體重。

第 10 圖：於 32°C 於 1.0mM GTP 及 1.0 毫克／毫升微管蛋白(tubulin)存在下進行微管蛋白聚合檢定分析。-□-表示帕克里達瑟爾(1.0 μ M)，-△-表示 PG-TXL(10 μ M 當量帕克里達瑟爾)於 PBS(pH7.4)於 37°C 培育 3 日，-○-表示新鮮溶解 PG-TXL。

第 11 圖：於 C3Hf/Kam 小鼠靜脈注射 PG-[3 H] 帕克里達瑟爾及 [3 H] 帕克里達瑟爾後，放射性之血漿廓清率。-□-表示注射 6 μ Ci 放射性標記 PG-[3 H] 帕克里達瑟爾(20 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)後之 PG-TXL 放射性，-x-表示注射 6 μ Ci 放射性標記 [3 H] 帕克里達瑟爾(20 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)後之帕克里達瑟爾放射性，-○-表示由注射的 PG-[3 H] 帕克里達瑟爾釋放的「帕克里達瑟爾」放射性。

第 12A 圖：注射 PG-[3 H] 帕克里達瑟爾及 [3 H] 帕克里達瑟爾至小鼠體內後，與時間關聯之 OCA-1 腫瘤之放射性含量。空心柱表示注射 6 μ Ci 放射性標記 PG- 3 H] 帕克里達瑟爾(20 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)後之 KPG-TXL 放射性，實心柱表示注射 6 μ Ci 放射性標記 [3 H] 帕克里達瑟爾(20 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)後之帕克里達瑟爾放射性。

第 12B 圖：PG-[3 H] 帕克里達瑟爾於 OCA-1 腫瘤內部

轉成〔 ^3H 〕帕克里達瑟爾。注射 $6\ \mu\text{Ci}$ 放射性標記 PG-〔 ^3H 〕帕克里達瑟爾後測得之總放射性顯示於空心柱，由注射的〔 ^3H 〕帕克里達瑟爾釋放的「帕克里達瑟爾」衍生放射性顯示於實心柱。

第 13 圖：OCA-1 腫瘤於單劑靜脈注射 160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克 PG-TXL(MTD)及 80 毫克／千克帕克里達瑟爾(MTD)後之細胞凋零程序動力學。-□-表示對單劑靜脈注射 PG-TXL(160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克 MTD)之反應，-○-表示對帕克里達瑟爾(80 毫克帕克里達瑟爾／千克 MTD)之反應。

第 14 圖：帶有人卵巢癌細胞(SKOV3ipl)之裸小鼠使用 PG-TXL 治療之存活率。腫瘤注射後 5 日，小鼠靜脈注射 PG-帕克里達瑟爾(PG-TXL)或 PG 對照。PG-TXL 之注射係每 7 日(▼)投予 120 毫克／千克組，但未投予 160 毫克／千克組。-■-表示未經處理小鼠，-▲-表示對靜脈注射多劑 PG 的反應。-▼-表示對靜脈注射一劑 PG-TXL(120 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)之反應，-◆-表示對靜脈注射一劑 PG-TXL(160 毫克當量帕克里達瑟爾／千克)之反應。

第 15 圖含麩胺酸之聚胺基酸之生產化學結構式及反應圖。

五、中文發明摘要

揭示水溶性喜樹鹼 (camptothecin) 之組成物，係經由接合喜樹鹼至水溶性聚合物如聚麩胺酸、聚天冬胺酸或聚離胺酸而形成。也揭示使用該組成物治療腫瘤。自體免疫病症如類風濕性關節炎之方法。其他具體例包括塗布可植入移植模以防再狹窄。

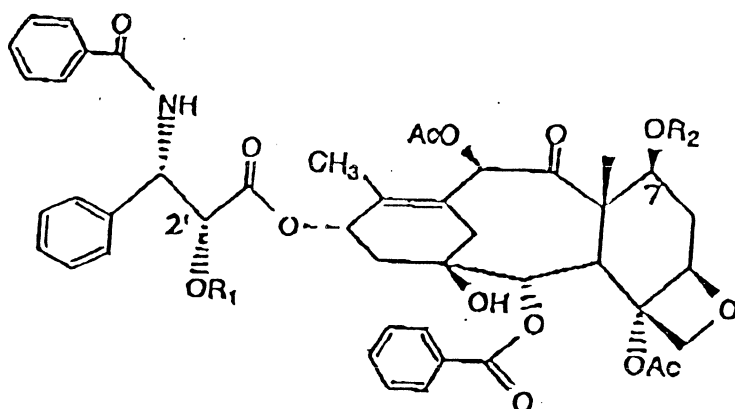
六、英文發明摘要

Disclosed are water soluble compositions of camptothecin formed by conjugating the camptothecin to a water soluble polymer such as poly-glutamic acid, poly-aspartic acid or poly-lysine. Also disclosed are methods of using the compositions for treatment of tumors, autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis.

93/56237

分割案

第1A圖



帕克里達瑟爾: $R_1 = R_2 = H$

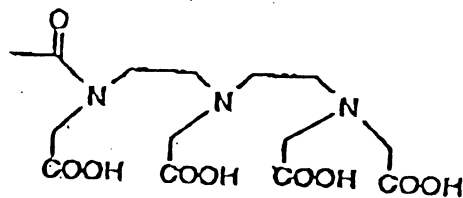
PEG-帕克里達瑟爾

$R_1 = -COCH_2CH_2CONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nOCH_3$
 $R_2 = H$

7-DTPA-帕克里達瑟爾

$R_1 = H$

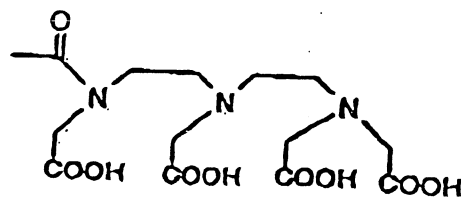
$R_2 =$



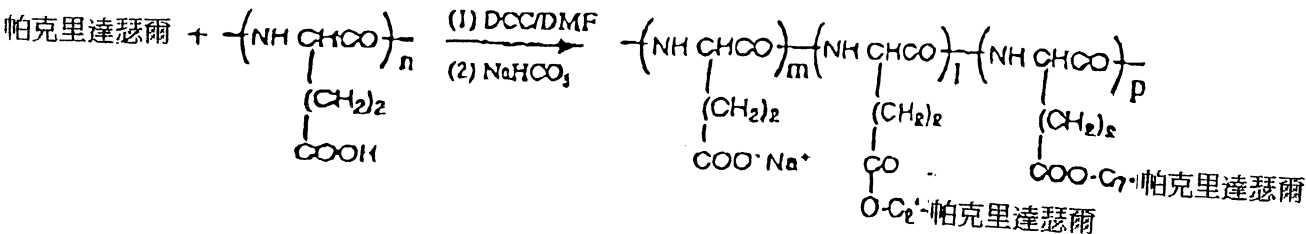
2'-DTPA-帕克里達瑟爾

$R_1 =$

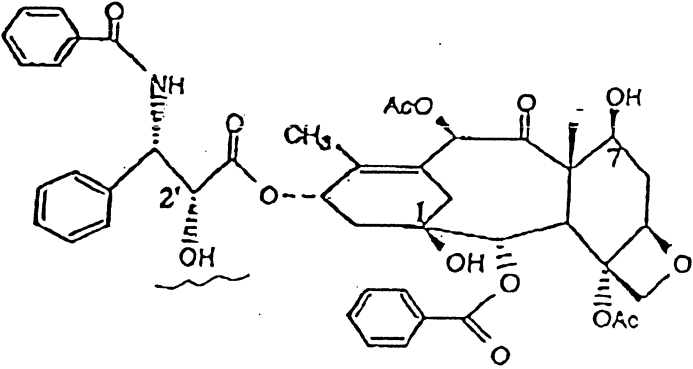
$R_2 = H$



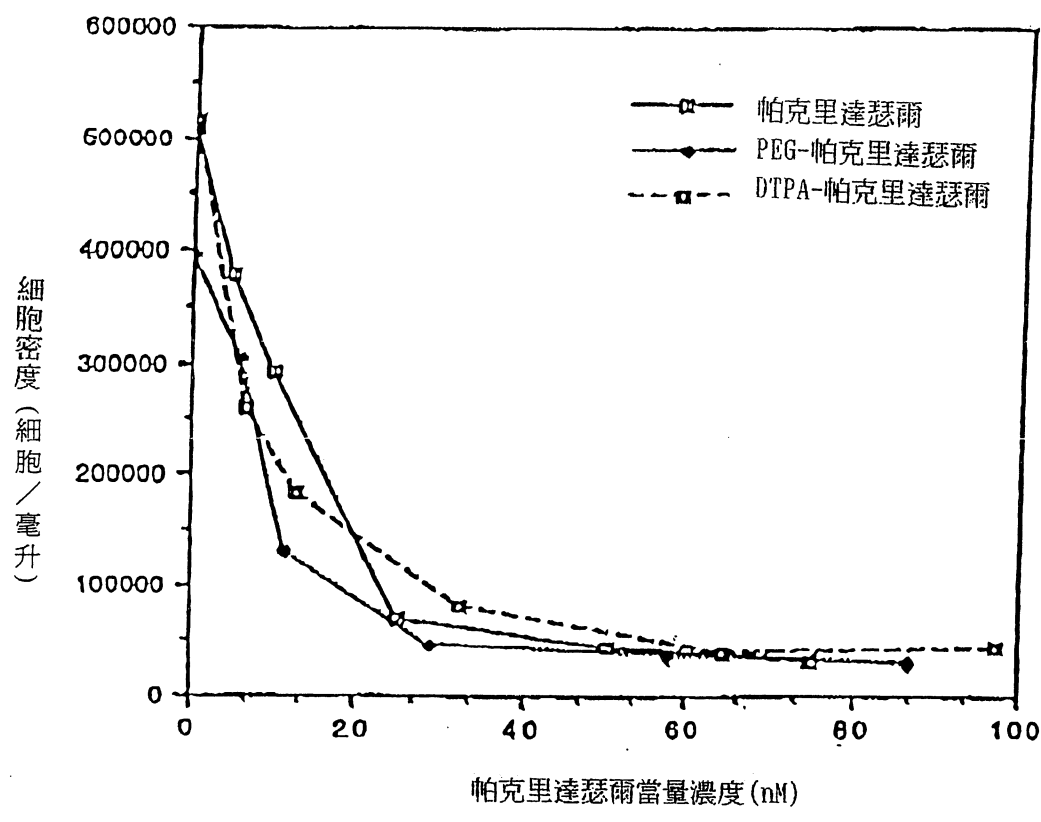
第1B圖



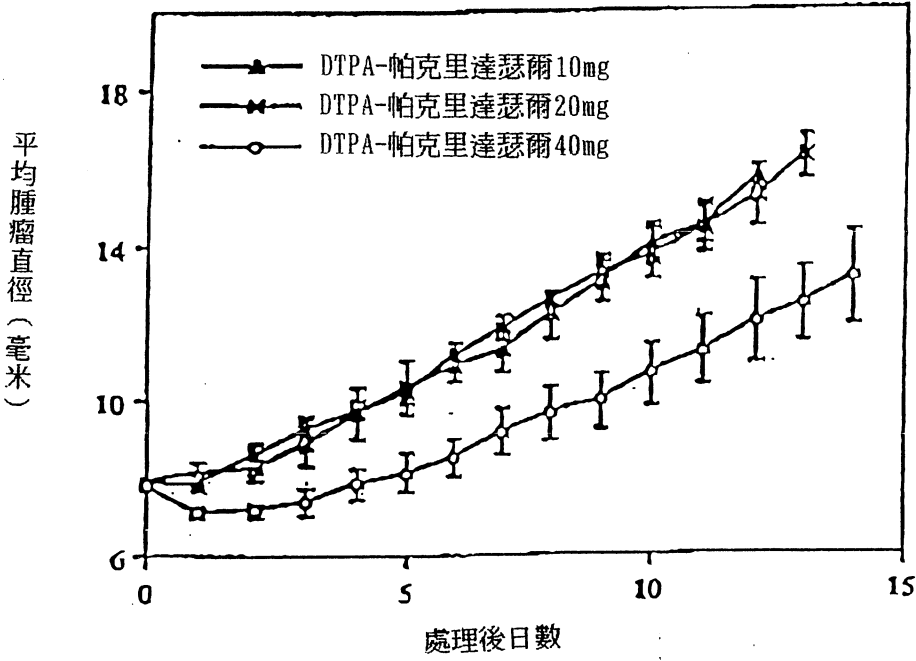
帕克里達瑟爾 =



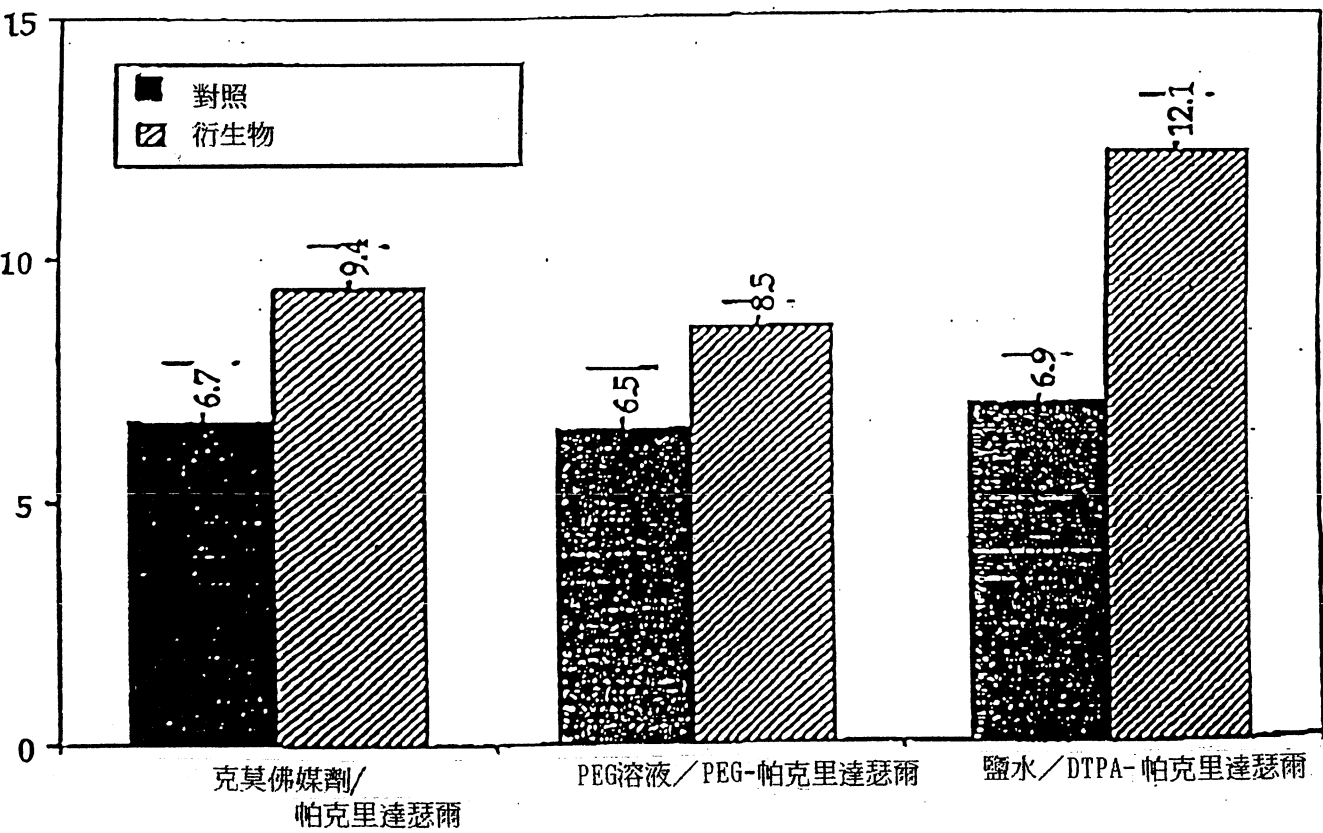
第 2 圖



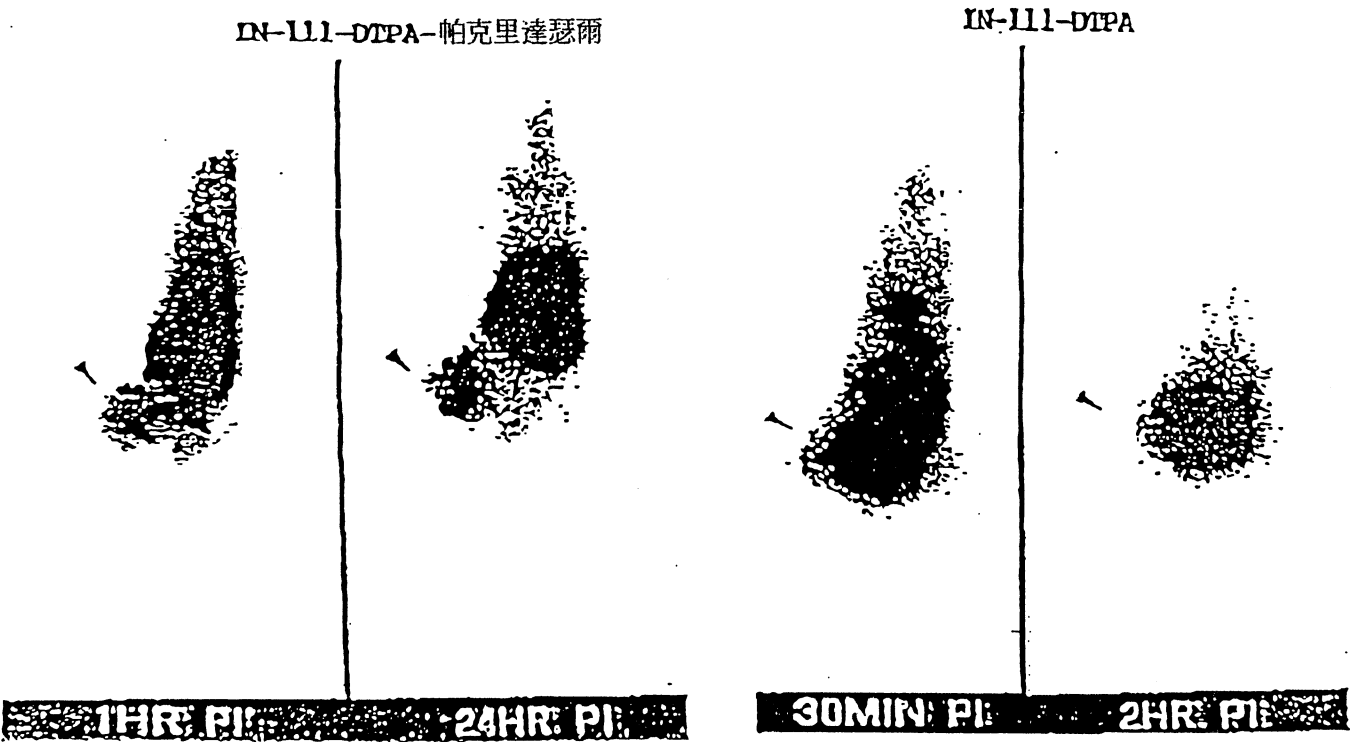
第 3 圖



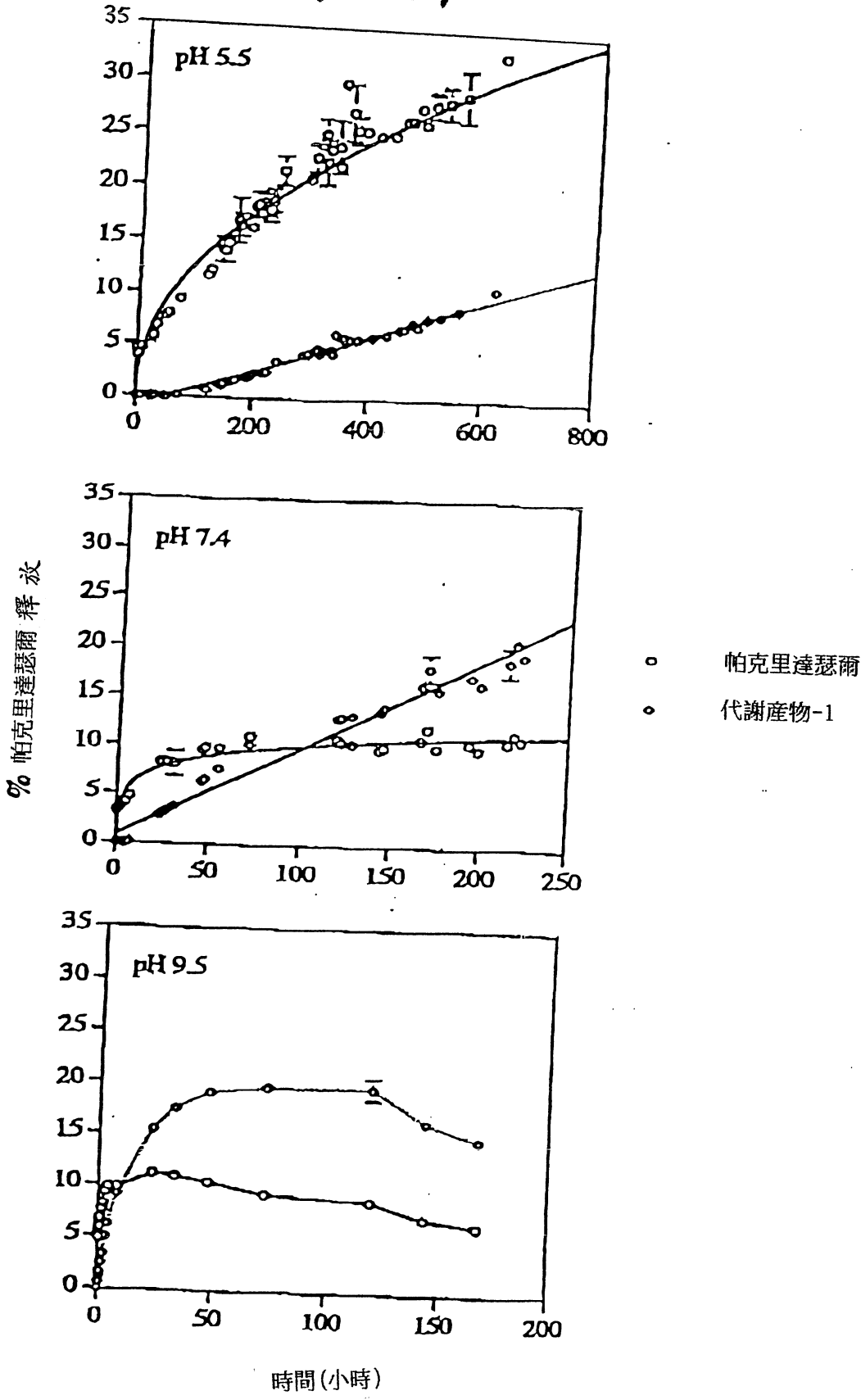
第 4 圖



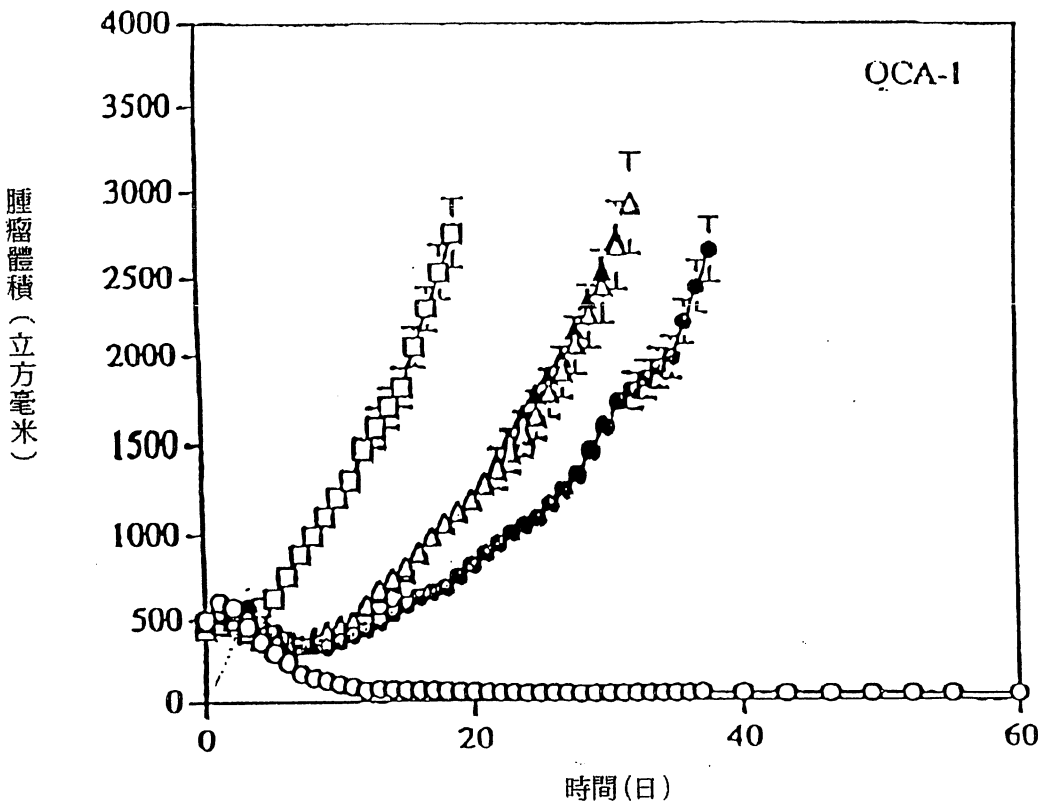
第 5 圖



第 6 圖

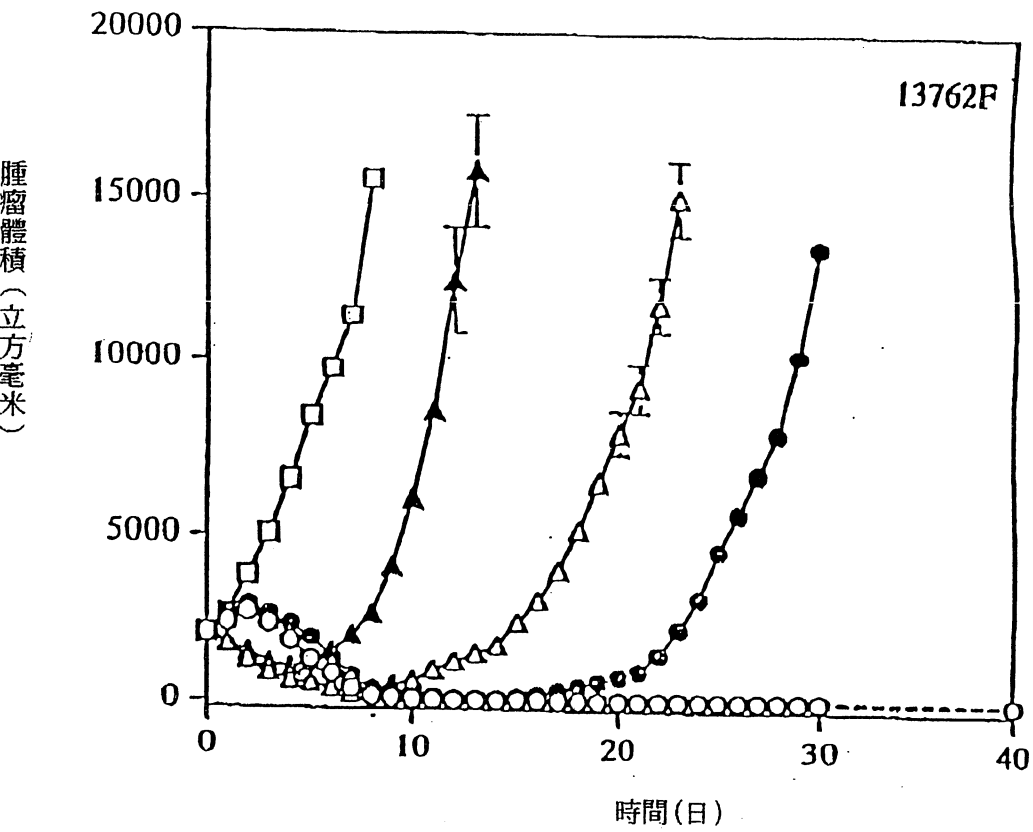


第7A圖



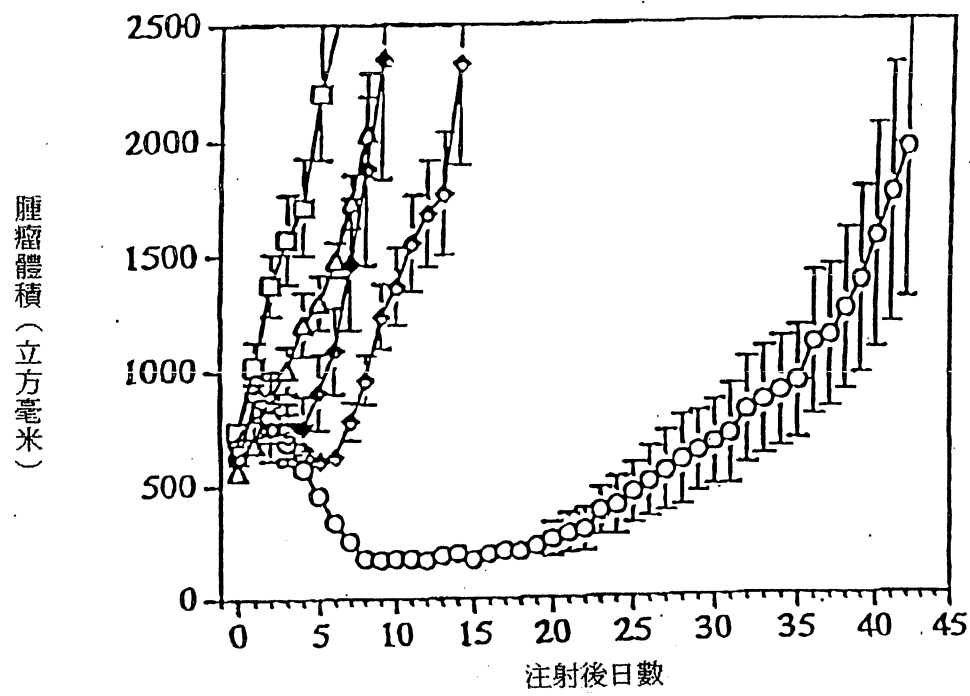
- , PG對照(800 毫克/千克)
- ▲-, 帕克里達瑟爾(80 毫克/千克)
- △-, 帕克里達瑟爾(80 毫克/千克)+PG(800 毫克/千克)
- , PG-TXL(80毫克當量帕克里達瑟爾/千克)
- , PG-TXL(160毫克當量帕克里達瑟爾/千克)

第7B圖



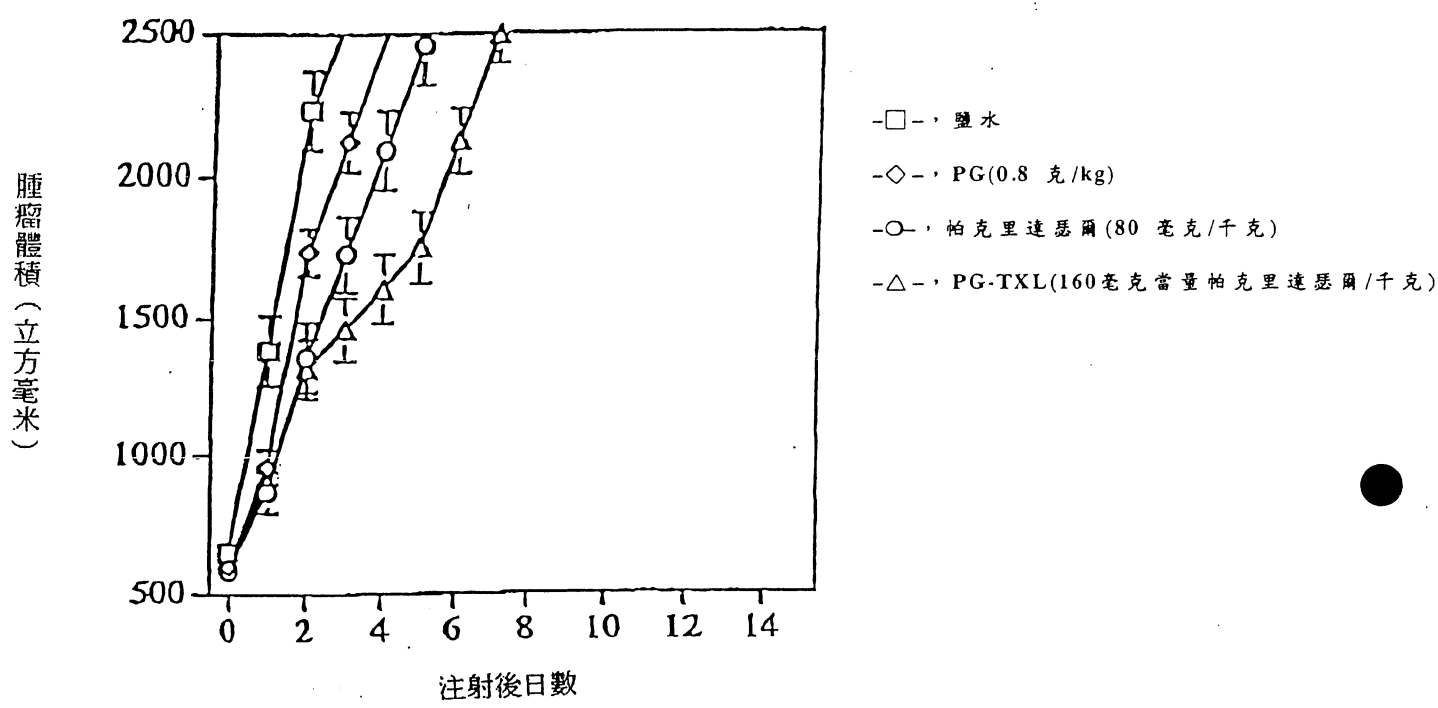
- , PG對照(220 毫克/千克)
- ▲-, 帕克里達瑟爾(20 毫克/千克)
- △-, 帕克里達瑟爾(40 毫克/千克)
- , PG-TXL(20毫克當量帕克里達瑟爾/千克)
- , PG-TXL(40或60毫克當量帕克里達瑟爾/千克)

第7C圖

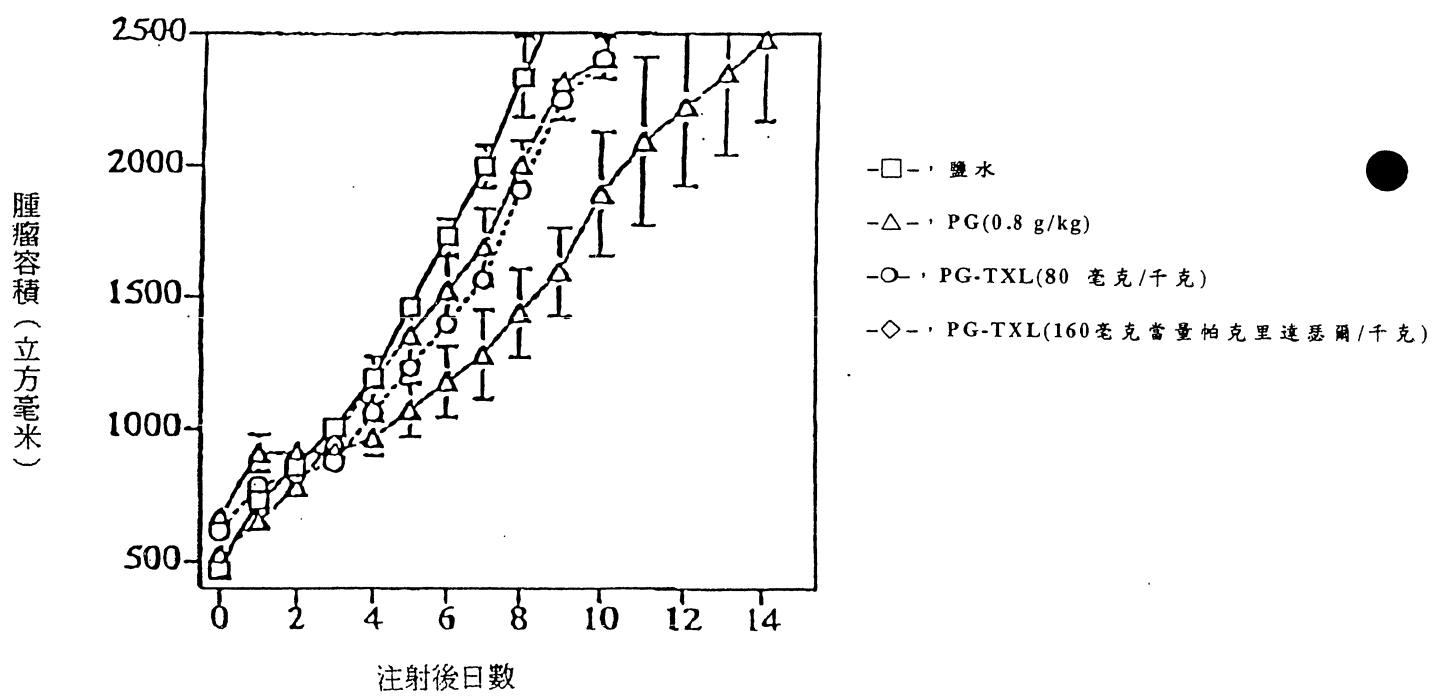


- , 鹽水
- △-, PG(0.6 克/千克)
- ◆-, PG-TXL(40 毫克/千克)
- ◇-, PG-TXL(60 毫克當量帕克里達瑟爾/千克)
- , PG-TXL(120 毫克/千克)

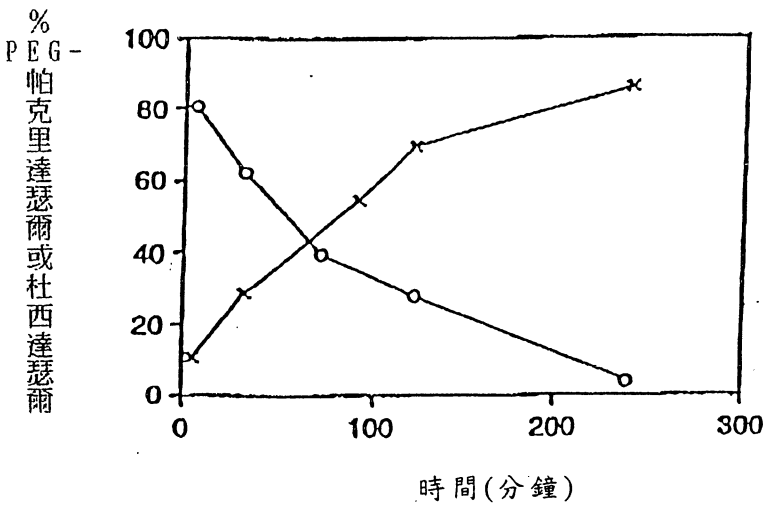
第7D圖



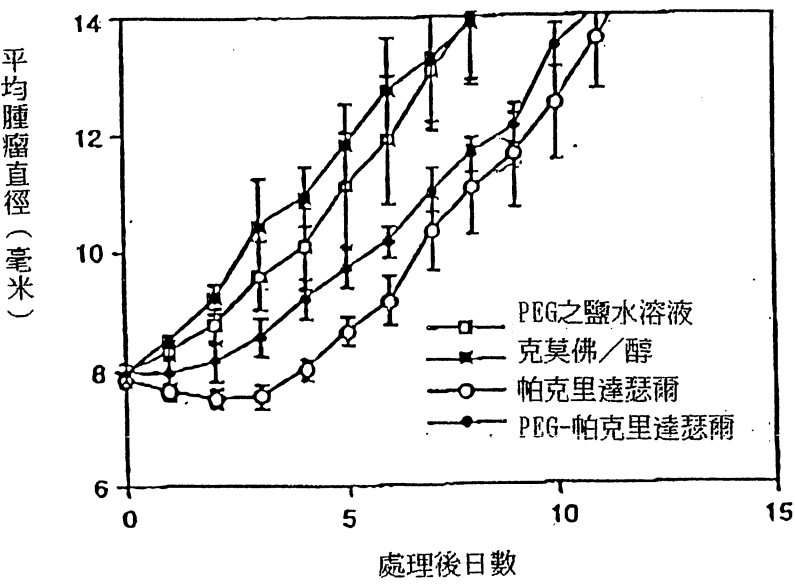
第7E圖



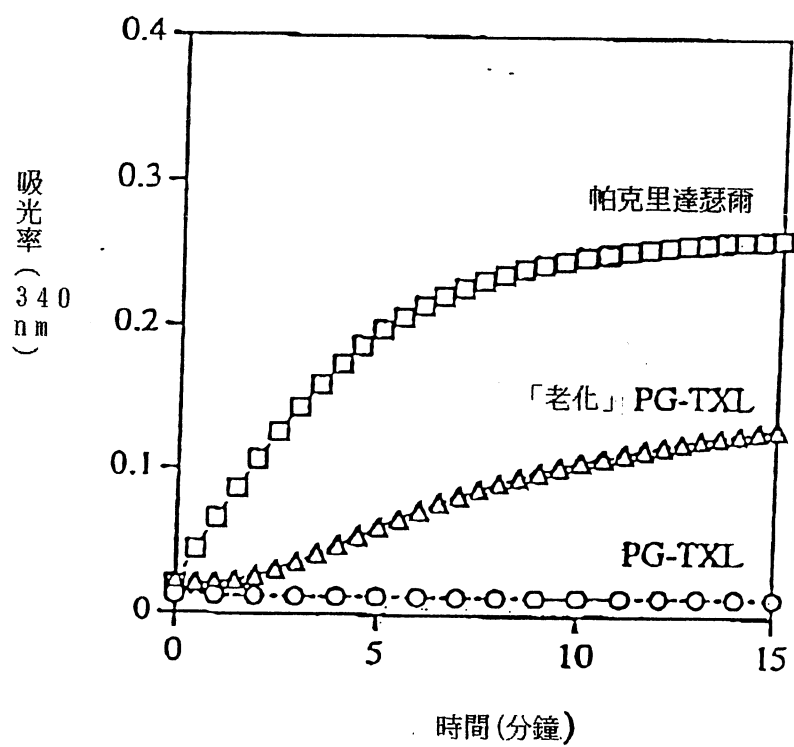
第 8 圖



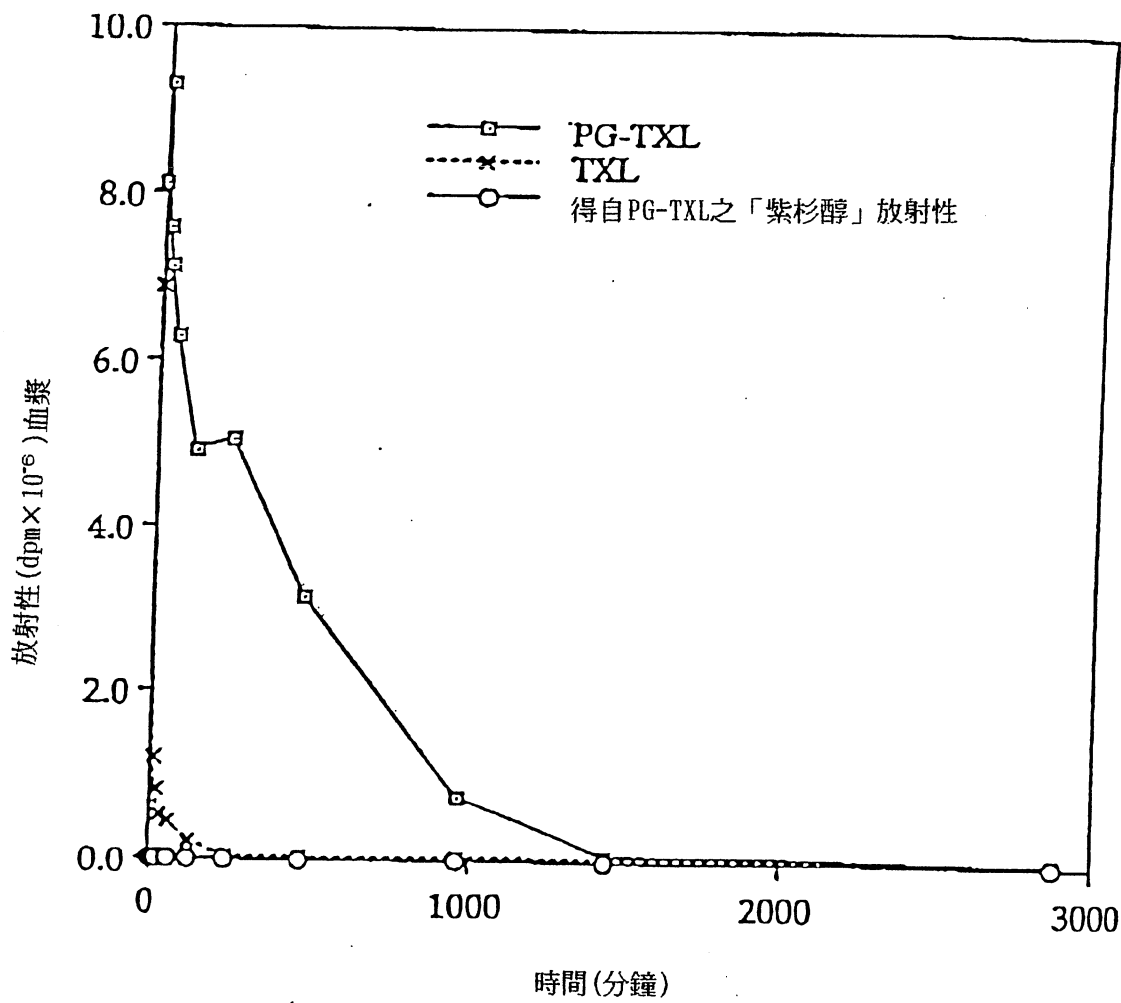
第 9 圖



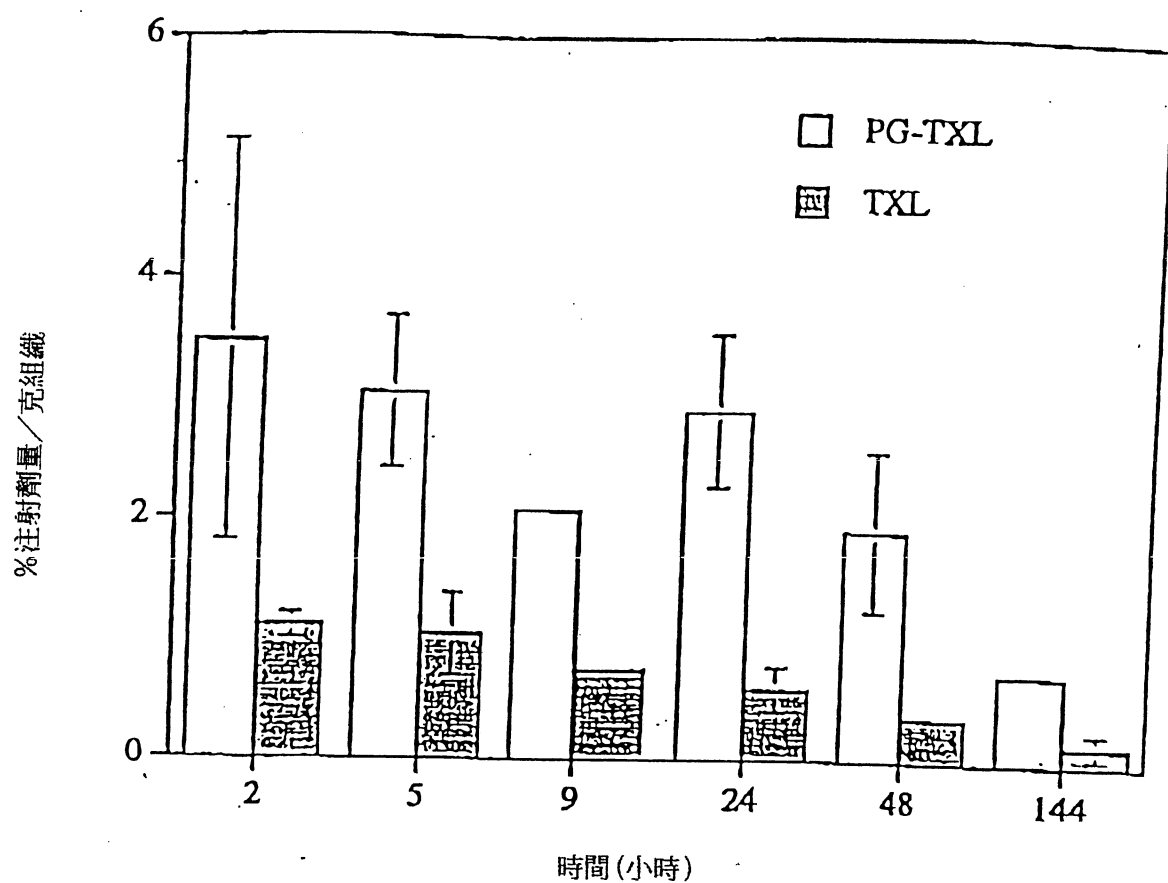
第10圖



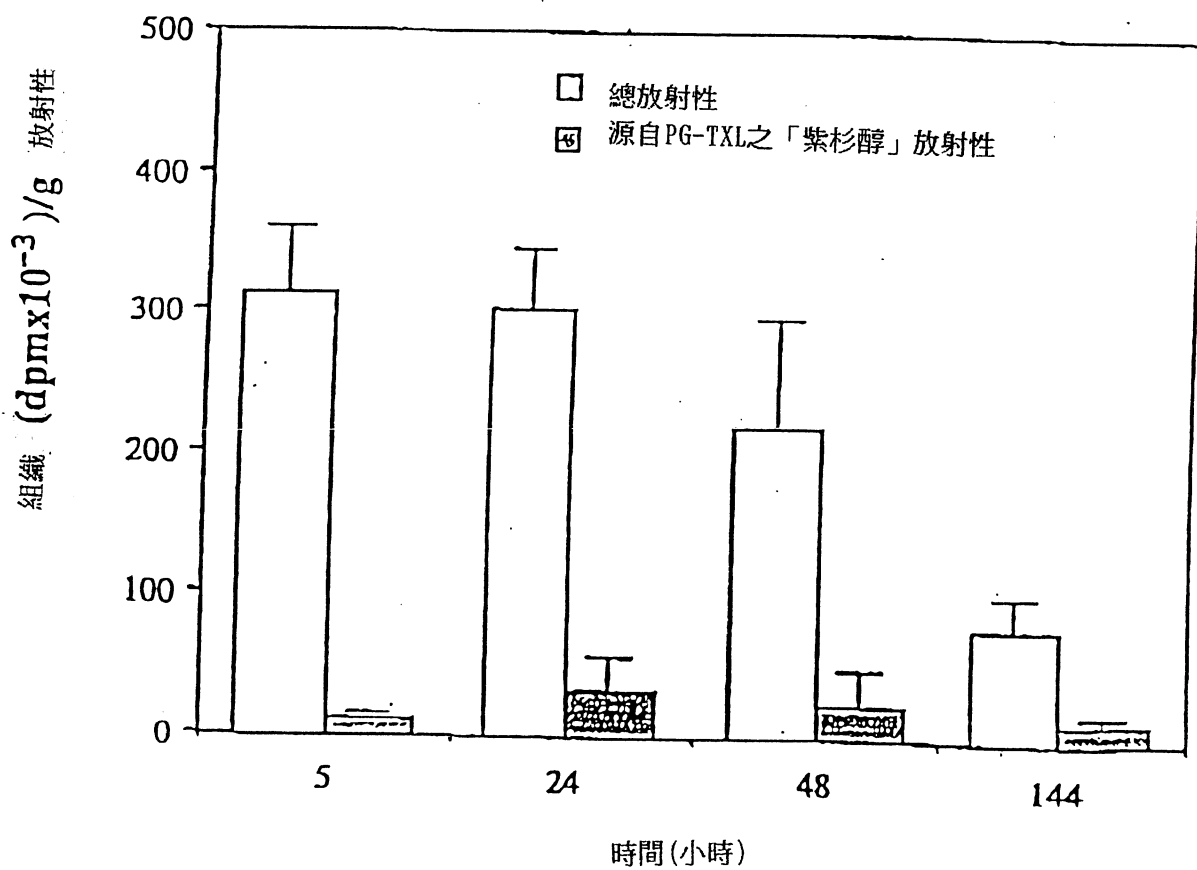
第11圖



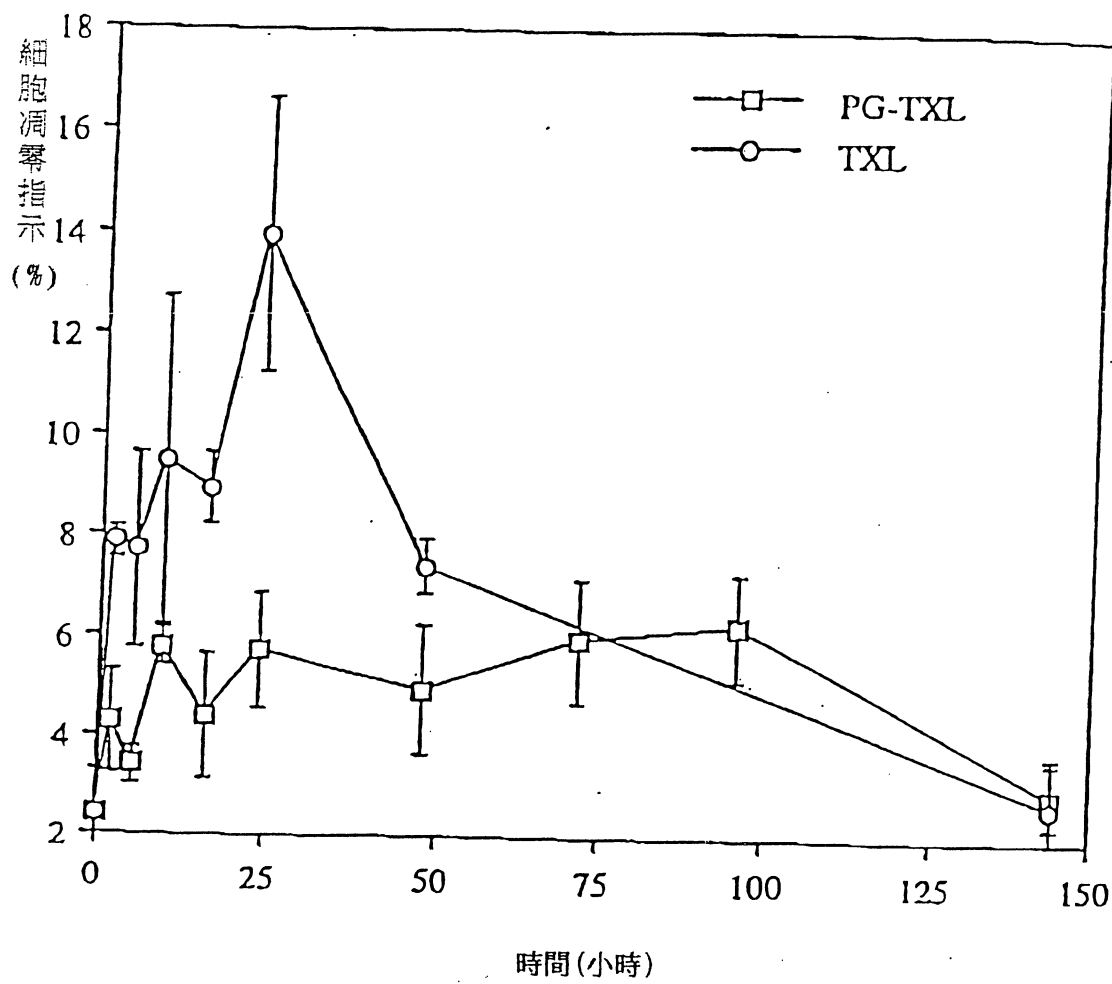
第12A圖



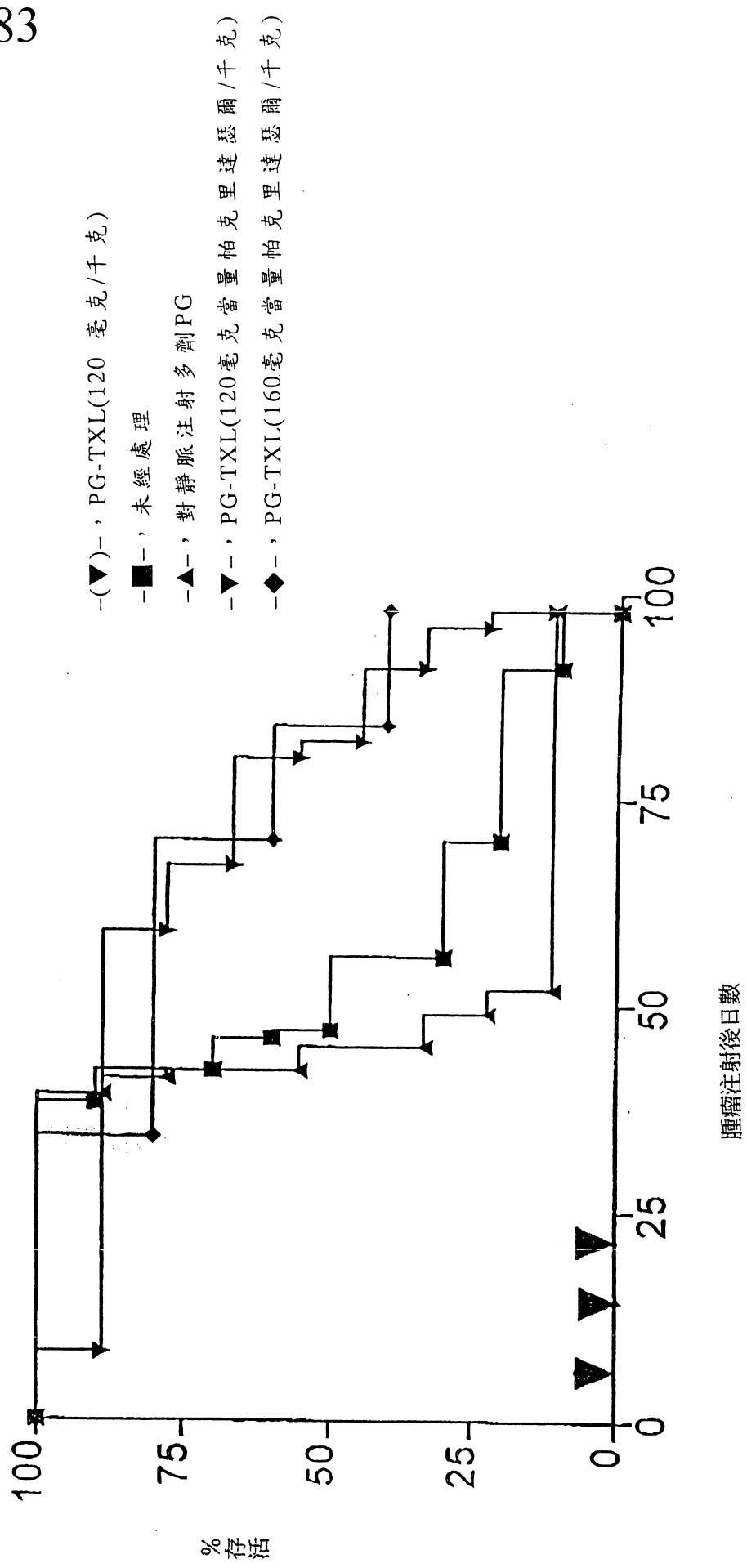
第12B圖



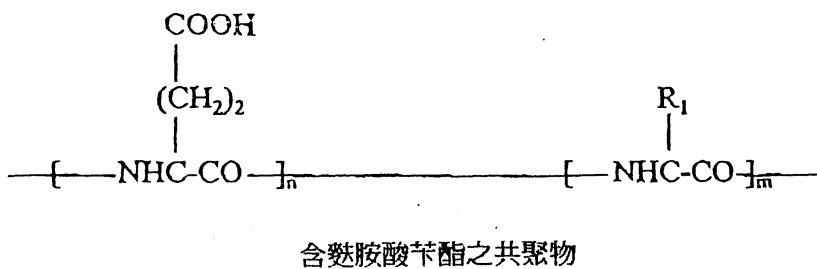
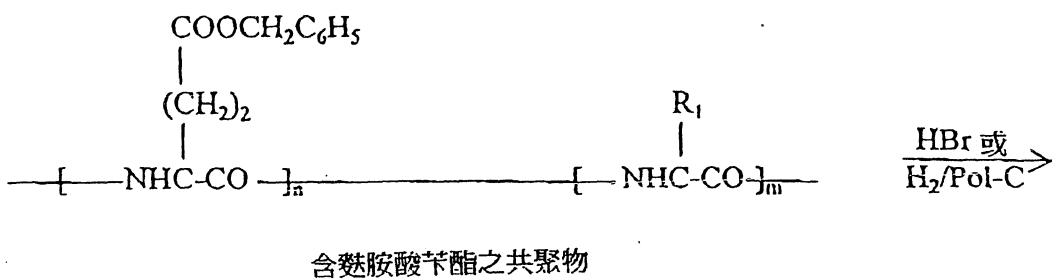
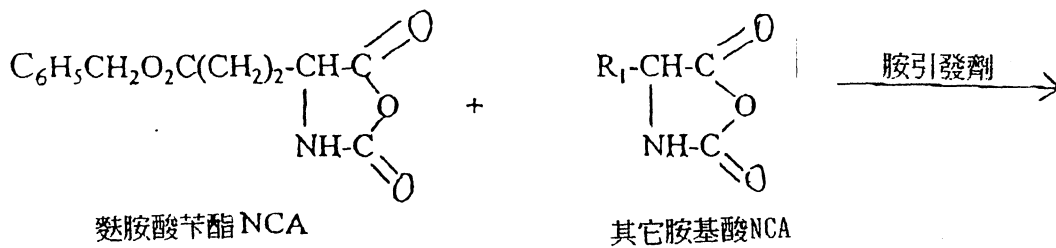
第13圖



第14圖



第15圖



七、指定代表圖：無

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

發明專利分割說明書

(2005 年 8 月修正)

※ 申請案號： 73130287

※ 申請日期： 88.3.30

※ IPC 分類： A61K 31/617 31/615

原申請案號： 88104989

31/617, 47/48, 4618356

一、發明名稱：(中文/英文)

治療腫瘤用之水溶性喜樹鹼之醫藥組成物

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF WATER SOLUBLE CAMPTOTHECIN FOR THE
TREATMENT OF A TUMOR

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

PG-TXL 股份有限公司

PG-TXL COMPANY, INC.

代表人：(中文/英文)

席尼華雷斯 (SIDNEY WALLACE)

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國德州 77005 休斯頓匹茲堡街 3324 號

3324 PITTSBURG ST. HOUSTON, TX 77005 U. S. A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / U. S. A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 皮席尼華雷斯 (SIDNEY WALLACE)

2. 黎淳 (CHUN LI)

3. 余東方 (DONG-FANG YU)

4. 楊 J. 大衛 (DAVID J. YANG)

國 籍：(中文/英文) 1.~4. 皆 美國 / U. S. A.

修正
補充
本 15 年 1 月 2 日

低。雖然原先設計為水溶性形式帕克里達瑟爾，但今日顯然用於增溶帕克里達瑟爾之藥劑可促成此種新穎複合體之總體抗腫瘤活性。資料指示 PG-TXL 可以與釋放自由態帕克里達瑟爾分開且除了自由態帕克里達瑟爾產生之細胞凋零以外方式造成細胞死亡。

實例 8

聚麩胺酸-喜樹鹼 (PG-CPT) 接合物之合成

PG-CPT 之合成係遵照前述 PG-TXL 之類似合成反應。於 80 毫克 PG 聚合物於 2.5 毫升無水 DMF 內加入 20 毫克 CPT(H 及 e Tech.)，34 毫克 DCC 及微量 DMAP 作為催化劑。於室溫攪拌隔夜後，反應混合物倒入氯仿及收集沈澱。無水沈澱再度溶解於碳酸鈉溶液，對 0.05M 磷酸鹽緩衝液 (pH4.5) 透析、過濾及凍乾。CPT 於聚合物接合物之含量係藉螢光光譜儀 (Perkin-Elmer 型號 MPF-44A) 使用發光波長 430nm 及激光波長 370nm 測定。含量：2% 至 5% (w/w)，溶解度：>200 毫克接合物 / 毫升。

實例 9

聚離胺酸 (PL)-TXL 接合物 (PL-TXL) 之合成

聚離胺酸 (MW>30,000, Sigma) 之全部可接近胺官能基經由聚離胺酸與丁二酐、戊二酐或 DTPA 反應而轉成羧酸官能基。聚離胺酸中剩餘之未反應 NH_2 基係經由改質聚合物與乙酐反應被封阻。TXL、杜西達瑟爾、其它紫杉類、伊托賽、丹托賽、喜樹鹼、伊波西隆或其它抗腫瘤藥係根據前文合成 PG-TXL 所述程序接合至所得聚合物。

實例 10

其它用於接合 TXL 之聚胺基酸之合成

含麩胺酸之聚胺基酸共聚物可經由對應胺基酸之 N-羧酐(NCA)與 γ -苄基-L-麩胺酸酯 NCA 共聚合合成。所得含麩胺酸苄酯之共聚物經由去除苄基保護基轉成含麩胺酸共聚物(第 15 圖)。TXL、杜西達瑟爾、其它紫杉類、伊托賽、丹托賽、喜樹鹼、伊波西隆或其它抗腫瘤藥物係根據前文合成 PG-TXL 或 PG-CPT 所述程序接合至所得聚合物。

實例 11

PG-TXL 用於人體

引言

聚-L-麩胺酸-帕克里達瑟爾(PG-TXL)為聚-L-麩胺酸與帕克里達瑟爾之接合物。此種化合物為水溶性，且基於早期動物研究顯示可以短時間亦即數分鐘靜脈投藥。基於試管研究及早期動物研究，顯然此種化合物對腫瘤至少如同單體帕克里達瑟爾於克莫佛般有效，且副作用較低。基於此等觀察，將此等藥物用於人體研究。研究首先需將化合物調配於常用於靜脈輸注溶劑。發明人預期生理食鹽水、5%葡萄糖於水或無菌水可用作溶劑。然後 PG-TXL 配方投予至少兩種試驗動物例如大鼠及犬測定藥物於此等動物之毒性，並決定犬的劑量，其隨後可用作第 I 期人體研究之最低開始劑量。第 I 期人體研究定義可用於隨後第 II 期病人研究之 PG-TXL 劑量。第 II 期研究係於若干腫瘤類型進行而決定 PG-TXL 用於各種癌症的活性。業界人士了解可對下述實例揭示之方法之投藥、動物模式選擇及用法用量作出多種修改，而

十、申請專利範圍：

修正
補充 本 15 年 1 月 2 日

第 93136237 號「治療腫瘤用之水溶性喜樹鹼之醫藥組成物」專利案

(2006 年 1 月修正)

1. 一種用於治療腫瘤之醫藥組成物，其包含 (A) 喜樹鹼 (camptothecin) 接合至水溶性聚麩胺酸聚合物之接合物作為活性成分，以及 (B) 一種醫藥可接受性載劑；其中該聚麩胺酸聚合物具有分子量介於 30,000 至 50,000 道耳吞。
2. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該聚合物為聚 (L-麩胺酸)。
3. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該接合物包含 2 重量 % 至 35 重量 % 喜樹鹼。
4. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其可用於放射線治療促進腫瘤對照射之反應，其中該接合後之喜樹鹼相對於對應之未接合藥物具有增強之水溶性、效果及於腫瘤內部之堆積性。
5. 如申請專利範圍第 4 項之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係於照射前投藥。
6. 如申請專利範圍第 4 項之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係於照射後投藥。
7. 如申請專利範圍第 4 項之醫藥組成物，其中該照射劑量為每週約 10 蓋格，及該醫藥組成物係於照射後 1-2 日內投藥。
8. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該腫瘤為乳癌、卵巢癌、惡性黑素瘤、肺癌、胃癌、攝護腺癌、結

腸癌、頭頸癌、白血病或卡波西氏肉瘤。

9. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中喜樹鹼分子對聚麩胺酸分子之比例為 1-75:1。