



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105147683 B

(45)授权公告日 2019.01.22

(21)申请号 201510353115.3

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2009.10.06

A61K 31/444(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00(2006.01)

申请公布号 CN 105147683 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2015.12.16

FULDE K ET AL. "Efficiency of Hemoperfusion materials at removing the fungal toxin orellanine from human plasma".《DIE PHARMAZIE》.1998,第53卷(第1期),58-59.

(30)优先权数据

HEUFLER,C.ET AL. "Investigations on the".《Agents and Actions》.1987,第21卷(第1/2期),203-208.

61/195,312 2008.10.06 US

RUEDL C ET AL. "THE TOXIC ACTION OF ORELLANINE AND OTHER DIPYRIDYLS ON DIFFERENT EPITHELIAL CELL CULTURES LLC-PK-1 CACO-2 AND OK".《MYCOLOGIA HELVETICA》.1990,第4卷(第1期),99-109.

12/586,849 2009.09.29 US

NILSSON ET AL. "The fungal nephrotoxin".《FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE》.2008,第44卷(第8期),1562-1569.

(62)分案原申请数据

审查员 刘桂英

200980139366.4 2009.10.06

权利要求书2页 说明书15页 附图8页

(73)专利权人 奥科瑞纳有限公司

地址 瑞典哥德堡S-411 26艾瑞克-达尔伯格斯格坦街11A

(72)发明人 燕妮·尼斯特伦 莉萨·布瓦尔

乌尔夫·尼尔松
伯耶·哈拉尔德松

(74)专利代理机构 北京乾诚五洲知识产权代理
有限责任公司 11042

代理人 付晓青 李广文

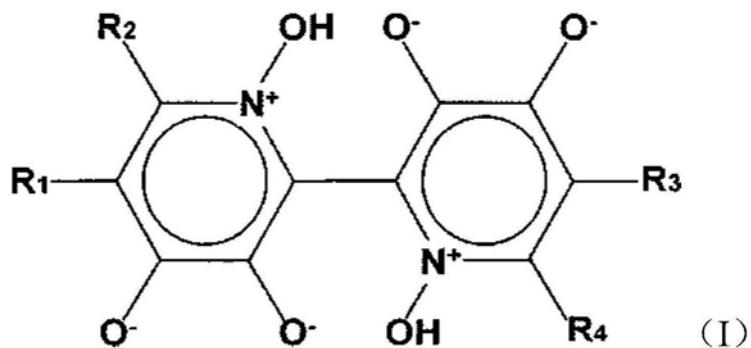
(54)发明名称

用于肾脏细胞癌的治疗的3,3',4,4'-四羟基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物

(57)摘要

本发明提供了通过利用特定的施用方案和给药方式来施用某些3,3',4,4'-四羟基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物化合物,特别是3,3',4,4'-四羟基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物(奥来毒素)治疗肾脏癌症的方法,以及适用于所提供的治疗方法的药物组合物。

1. 一种根据式I的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患有肾细胞癌或对肾细胞癌易感的患者的药物中的应用，



其中：

R1、R2、R3和R4选自：氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐、氟、氯、溴、C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6烯氧基，其每一个任选进一步被氨基、巯基、羧基、磷酸盐、氟、氯、溴取代；

所述化合物以两个或更多个剂量中施用，并且每个剂量为0.5mg/kg到10mg/kg之间的所述化合物。

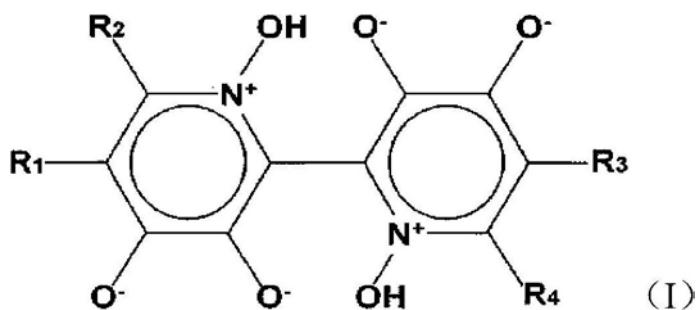
2. 如权利要求1所述的应用，其中，R₁、R₂、R₃和R₄是氢。

3. 如权利要求1或2所述的应用，其中，连续的剂量以两到七天之间的间隔施用。

4. 如权利要求1或2所述的应用，其中，每天施用所述化合物。

5. 如权利要求4所述的应用，其中，在静脉内、皮下或腹膜内施用所述化合物。

6. 一种用于治疗肾细胞癌的药物组合物，所述药物组合物包含至少一种药学上可接受的载体和5mg到2,500mg的根据式(I)的化合物：



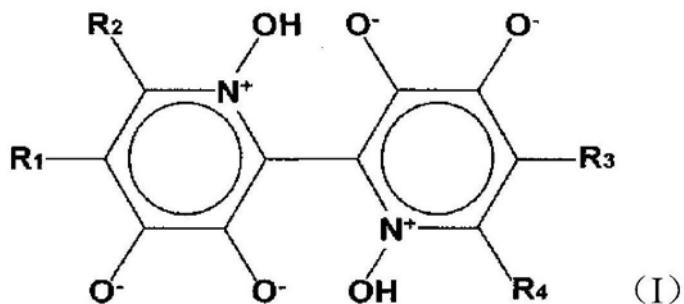
其中：

R₁、R₂、R₃和R₄选自：氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐、氟、氯、溴、C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6烯氧基，其每一个任选进一步被氨基、巯基、羧基、磷酸盐、氟、氯、溴取代，或等摩尔数量的其药学上可接受的盐。

7. 如权利要求6所述的药物组合物，其中，R₁、R₂、R₃和R₄是氢。

8. 如权利要求6或7所述的药物组合物，其中，所述组合物被配制用于向患者静脉内、皮下或腹膜内施用。

9. 一种用于治疗患有肾细胞癌的试剂盒，所述试剂盒包含至少一种药学上可接受的载体和5mg到2,500mg根据式(I)的化合物：



其中：

R₁、R₂、R₃和R₄选自：氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐、氟、氯、溴、C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6烯氧基，其每一个任选进一步被氨基、巯基、羧基、磷酸盐、氟、氯、溴取代，或等摩尔数量的其药学上可接受的盐。

10. 如权利要求9所述的试剂盒，其中，组合所述根据式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体一起施用，从而所述根据式(I)的化合物或其药学上可接受的盐完全地或基本上溶于所述载体中。

11. 如权利要求9或10所述的试剂盒，其中，所述化合物被配制用于向患者静脉内、皮下或腹膜内施用。

用于肾脏细胞癌的治疗的3,3',4,4'-四羟基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物

发明领域

[0001] 本发明通常涉及癌症治疗。更具体地，本发明涉及3,3',4,4'-四羟基-2,2'-联吡啶-N,N'-二氧化物，特别是3,3',4,4'-四羟基-2,2'-二吡啶-N,N'-二氧化物(奥来毒素，Orellanine)用于肾脏癌症、特别是来源于近端肾小管细胞的肾细胞癌的治疗的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 癌症以超过100种不同的形式出现，影响身体的几乎每一个部分。在整个生命过程中，身体中的健康细胞以受控的方式分裂、生长和替换自身。当指示这种细胞分裂的基因功能失常以及细胞开始不受控制地增殖和生长时产生癌症。这些异常细胞的团块或簇集物被称为肿瘤。不是所有肿瘤都是癌性的。良性肿瘤，例如，痣，停止生长，并且不波及身体的其他部分。然而，癌性或恶性肿瘤继续生长和覆盖健康细胞，干扰身体功能，从身体组织抽取营养。恶性肿瘤可以通过称为转移的过程扩散到身体的其他部分。来自“母体肿瘤”的细胞脱离，取决于肿瘤而经由血液或淋巴管、或是在胸部、腹部或骨盆内迁移，并且它们最终在身体其他部位形成新的肿瘤。

[0004] 肾脏的癌症构成了所有实体肿瘤的约3%。约85%的肾脏肿瘤被分类为肾细胞癌(RCC)。约80%诊断的RCC发源于肾脏的成尿管、肾小管的近端部分内衬的上皮细胞。取决于它在显微镜下的外观，这种癌症类型被称为肾脏透明细胞癌(RCCC, 65%)或肾脏乳头状细胞癌(RPCC, 15%)。虽然RCCC和RPCC构成诊断的RCC的80%，RCCC和RPCC是接近100%的来自肾细胞癌的死亡的原因。

[0005] 在预测预后中最重要的因子是期。期描述了癌症的大小和它传播超出肾脏的深度。美国癌症联合委员会(AJCC)的分期系统被称为TNM系统。跟随有从1到3的数字的字母T描述了肿瘤的大小和对附近组织的波及。更高的T数字表明更大的肿瘤和/或对肾脏附近组织的更广泛的波及。跟随有从0到2的数字的字母N表明癌症是否波及肾脏附近的淋巴结，以及如果波及，有多少淋巴结受到影响。跟随有0或1的字母M表明癌症是否波及远端器官。

[0006] I期:肿瘤是7cm(约2 3/4英寸)或更小，并且限于肾脏。没有对淋巴结或远端器官的扩散。

[0007] II期:肿瘤大于7.0cm但仍然限于肾脏。没有对淋巴结或远端器官的扩散。

[0008] III期:包括任何大小的肿瘤，有或者没有对肾脏周围脂肪组织的扩散，有或者没有进入从肾脏到心脏的大静脉的扩散，有对一个附近的淋巴结的扩散，但是没有对远端淋巴结或其他器官的扩散。III期还包括扩散到肾脏周围的脂肪组织和/或扩散到从肾脏到心脏的大静脉的肿瘤，其没有扩散到任何淋巴结或其他器官。

[0009] IV期:这个期包括已经直接扩散环绕肾脏的整个脂肪组织和筋膜韧带样组织的任何癌症。IV期还包括已经扩散超过一个靠近肾脏的淋巴结、不靠近肾脏的任何淋巴结，或已经扩散任何其他器官(例如，肺、骨骼或大脑)的任何癌症。

[0010] 肾肾脏细胞癌的T、N、M类别和期组群的详细定义：

[0011] 原发性肿瘤(T):

- [0012] TX:未能评估原发性肿瘤
- [0013] T0:无原发性肿瘤证据
- [0014] T1:肿瘤7cm或更小,限于肾脏
- [0015] T2:肿瘤大于7cm,限于肾脏
- [0016] T3:肿瘤扩展到主要静脉/肾上腺/肾周组织;不超过杰氏筋膜(Gerota's fasica)
- [0017] T3a:肿瘤侵入肾上腺/肾周的脂肪
- [0018] T3b:肿瘤扩展到肾静脉或隔膜下的腔静脉
- [0019] T3c:肿瘤扩展到隔膜上的腔静脉
- [0020] T4:肿瘤侵入杰氏筋膜以外
- [0021] N-局部淋巴结
- [0022] NX:未能评估局部淋巴结
- [0023] N0:没有局部淋巴结转移
- [0024] N1:单个局部淋巴结中的转移
- [0025] N2:超过一个局部淋巴结的转移
- [0026] M-远距离转移
- [0027] MX:未能评估远距离转移
- [0028] M0:没有远距离转移
- [0029] M1:远距离转移

[0030] 根据经验,I或II期的癌症通过受累肾脏的外科去除来治疗并且预后恢复良好。相比之下,III或IV期的肾脏癌症与极低的存活率相关,并且国家癌症研究所(National Cancer Institute)在其网站上声称“患有IV期肾脏细胞癌的患者几乎没有能被治愈的”

[0031] 国家癌症学会估计在2009年美国诊断了49,096例肾脏癌症新病例($16/10^5$ 居民)中有11,033例确定死亡($3.6/10^5$ 居民)。欧盟的相应数字(2006)是诊断65,051个($7.8/10^5$ 居民)和27,326例死亡($3.3/10^5$ 居民)(European Cancer Observatory:<http://eu-cancer.iarc.fr/cancer-19-kidney.html,en>)。在世界范围内估计(2006)年是209,000例诊断的病例($3.2/10^5$ 居民)和102,000例死亡($1.6/10^5$ 居民)(Gupta et al.Cancer Treat.Rev.34,193-205;2008)。在美国看来似乎表面上较高的发生率取决于是由于NCI将一同报告肾盂的癌症(其是相对容易治疗的)与和肾细胞癌一起共同报告的事实。较低的全球发生率和死亡率可能(至少部分)取决于在第三世界的广大区域中过低的诊出。

[0032] 如上所述,常规技术的主要问题是被诊断患有肾脏癌症的任一患者的结果主要由诊断的时机来决定。如果疾病在肿瘤传播到肾脏外部之前被诊断,存活的机会是良好的,不然大多数患者死于该疾病。它的主要原因是,对于使用抑制细胞和细胞毒素药物的所有常规疗法,肾细胞癌是难治的,所述药物例如顺铂、卡铂、多西他赛、紫杉醇、氟脲嘧啶、卡培他滨、吉西他滨、伊立替康、托泊替康、依托泊苷、丝裂霉素、吉非替尼、长春新碱、长春碱、阿霉素、环磷酰胺、塞来考昔、罗非考昔和/或伐地考昔。

[0033] 现有技术中描述了各种方法。由于较低的有效性和大量的副作用,针对肾细胞癌的常规化学治疗大部分是治疗不当的。因而寻求可替代的治疗形式,它们可以分成几个类别:

- [0034] 1)抗血管生成。在这种方法中,通过对供应肿瘤组织所必需的血管的形成的抑制,

切断肿瘤的营养物和氧气。这可以以几种方式实现：1a) 通过针对这些生长因子的抗体治疗，抑制循环生长因子，例如，VEGF、PDGF和PIGF，；1b) 使用针对受体的抗体对目标细胞上血管生长因子受体的阻断；和1c) 使用干扰受体功能的更小的分子治疗，使得血管生长因子与它的受体的结合不能引发生理学的血管生成效果。

[0035] 2) 免疫调节治疗。这种方法试图刺激内源的免疫系统来将肿瘤细胞识别为异源并开始对抗它们。作为针对肾脏癌症的治疗的免疫刺激采取两种主要途径：2a) 用白细胞介素2 (IL-2) 治疗；和2b) 干扰素 α (IFN α) 治疗。

[0036] 上述所有可替代的治疗策略显著地延长了患有肾脏癌症处于晚期的某些患者的生命期。然而，效果仅在几个月的级别上，而且治疗与许多严重的副作用相关。经常地，肿瘤适应了治疗，然后治疗不能继续，之后肿瘤加速的生长。Garcia et al. ("Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma." *CA Cancer.J.Clin.* 57 (2) : 112-25 (2007)) 和Atkins et al. ("Innovations and challenges in renal cell carcinoma: summary statement from the Second Cambridge Conference." *Clin.Cancer.Res.* 13 (2Pt 2) :667s-670s (2007)) 综述了肾脏癌症治疗的新近的方法。

[0037] 文献的综述表明，许多治疗方法来源于或多或少特异性的癌症标志物的识别，以及这些标志物对于引发对抗侵入性肿瘤组织的宿主免疫应答的用途。因而，US2006134708公开了肾脏和尿路膀胱癌症的几种分子标志物，即用于诊断目的的IGFBP-3 (胰岛素样生长因子结合蛋白3)、ANGPTL4 (血管生成素样4) 和铜蓝蛋白 (ceruloplasmin)，以及对抗所述标志物的单克隆抗体，用于诊断用途。描述了对抗所公开的标志物的反义化合物在肽和核酸水平上的应用。并且，轭合到细胞毒性试剂、对抗所述标志物的单克隆抗体的使用作为这样的治疗实施方式也是预期的，即与取决于抗体(也称为“魔弹 (magic bullet)”概念)提供的靶向的较少的细胞毒性试剂的严重副作用联系在一起。基于不同肿瘤相关抗原的类似方法在CN1359941中被采用。

[0038] US6403373公开了与结肠、肾脏和胃癌相关的核酸分子，其肽产物引发了宿主中的抗体生成。所述肽在疫苗方法中的用途是预期的。EP0160250公开了用于肾癌的诊断的单克隆抗体，并且提及了将这些抗体轭合到各种细胞毒性试剂的可能性。

[0039] WO2007059082公开了在卵巢和肾脏癌症中抗原TIM-1 (T细胞，免疫球蛋白或粘蛋白结构域1) 的发现，其与细胞增殖相关。教导了针对 TIM-1产生的抗体用于治疗卵巢和肾脏癌症的用途，也教导了作为肿瘤细胞的靶向杀伤方式的治疗试剂(毒素、放射性同位素或化学治疗试剂) 与所述抗体的轭合。

[0040] US6440663公开了由肾脏癌症细胞来示性的许多基因，其产物引起宿主中的抗体生成。描述了引发或增加宿主中针对使所公开基因示性的组织的免疫反应的各种方法，包括细胞毒性T细胞的引发和用公开的基因或其片段对宿主细胞的转染，随后是所述细胞向宿主中的再导入。

[0041] U US 2005261178公开了对抗在大部分肾脏癌症上表达的抗原(碳酸酐酶IX)的单克隆抗体(G250)与细胞因子白细胞介素-2或干扰素- α 的共同施用。以比仅用细胞因子治疗时使用的更低的剂量施用细胞因子。达22周或更久的疾病稳定或“目标反应”在患有晚期肾脏癌症的群体的约30%患者中实现。

[0042] 其他方法基于在新的治疗方案中使用已知的治疗物质。例如，WO2007044015公开

了根据新的施用方案的对在前已知的二甲烷磺酸酯化合物、特别是NSC-281612的使用,以治疗肾脏癌症。当对裸鼠中的异种移植物测试时,NSC-281612的施用在某些情况下导致了肿瘤块的表面上完全的根除。

[0043] JP2001288110公开了干扰素- α 与聚乙二醇(PEG)的轭合物以试图提高循环半衰期和降低最小治疗有效剂量。

[0044] RU2188026公开了使用长春新碱、亚德里亚霉素和depo-安宫黄体酮(depo-provera)的多化疗方法。声称这提高了无复发时间和减少了转移形成。

[0045] 最后,在少数情况中,对新的原始物质建立了建议的疗法。因而, WO2004075887公开了1-(2-氯乙烷)-1-亚硝基-3-(2-羟基乙基)脲(HECNU)用于许多癌症类型、包括肾脏癌症的治疗的用途。HECNU的主要特征是与早先已知的相应的化合物二-(2-氯乙基)-1-亚硝基-脲(BCNU)相比改善的水溶性。

[0046] EP1712234公开了4-吡啶甲基-酞嗪衍生物作为VEGF受体抑制物在肾脏癌症的治疗中的用途,特别是用于转移性生长的抑制。发现的是,4-吡啶甲基-酞嗪衍生物与多种常规的化学治疗剂的任一种的共同施用具有协同效应,即使所述肿瘤细胞是单独的化学治疗难以治疗的。进一步的,组合治疗与显著的更小的副作用相关联。

[0047] Suthpin et al. ("Targeting the Loss of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Renal Carcinoma Cells", Cancer. Res. 67 (12), 5896-5905 (2007)) 研究了色霉素A3在肾脏癌症对不表达VHL基因的选择性效应(这种肿瘤抑制基因在所有肾脏透明细胞癌症的约70%中是不存在的)。色霉素A3显著地延迟了异种移植的裸鼠中的肿瘤生长,而不影响表达VHL基因的正常的肾脏组织。

[0048] 在此本发明利用的奥来毒素(式I),其是在丝膜菌(Cortinarius)科的几个真菌物种中以相对大量存在的选择性的肾脏毒素。在混淆丝膜菌真菌与食用菌类之后奥来毒素的中毒经常地在欧洲、俄国和北美洲发生。在摄食含有奥来毒素的真菌之后,有几天到3周没有症状或仅轻微的、流感样症状的时期。下一阶段,当一般寻求医学帮助时,特征是由于急性肾功能衰竭的尿毒症。尽管在科学文献中奥来毒素毒害有许多描述,除了仅提及肾脏的毒性之外,奥来毒素的其他效果没有被报道(Danel VC, Saviuc PF, Garon D: Main features of Cortinarius spp. poisoning:a literature review. Toxicon 39, 1053-1060 (2001).)。这种选择性最可能归于事实,奥来毒素由一种细胞类型特异性地接收,即,肾小管上皮细胞,特别是近端肾小管上皮细胞(Prast H, Pfaller W: Toxic properties of the mushroom Cortinarius orellanus (Fries) II. Impairment of renal function in rats. Arch Toxicol 62, 89-96 (1988).)。奥来毒素的毒性机制没有被阐明,除了维持透析同时等待看肾脏是否恢复之外,没有可用的治疗。最后的结局主要取决于摄食的毒素的数量,根据经验,一种真菌的摄食产生暂时的问题,两种真菌导致部分肾脏功能的永久丧失,而三种或更多种真菌引起肾脏功能的完全丧失和需要终身的透析或肾脏替换治疗。

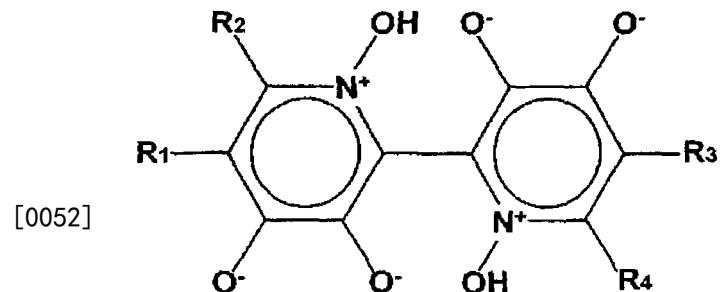
[0049] 申请人近来公开了奥来毒素在健康大鼠作用方式的首次研究(Nilsson UA et al. The fungal nephrotoxin Orellanine simultaneously increases oxidative stress and down-regulates cellular defenses. Free Rad. Biol. Med. 44:1562-9 (2008).)。这项研究显示了在肾脏皮层组织中提高的氧化压力伴随几种关键的抗氧化基因的显著降低的表达。在这项工作期间,认识到奥来毒素对肾小管上皮细胞的看来的绝对

特异性,理论上可以延伸到涵盖它们转化成癌细胞之后的这些细胞。如果证明正确,这样的假说将意味着奥来毒素是针对上皮来源的肾脏癌症的强大的武器,具有甚至在癌症进展的时期和在其他组织中转移时有治愈的可能性。

[0050] 继续这种假说,令人惊讶地发现奥来毒素实际上也在人类肾脏癌症细胞中接受,不论它们来自原发肿瘤还是来自转移性肿瘤组织,以大的效力杀死它们。在对奥来毒素的短暂的暴露之后细胞死亡发展,表明毒素主动地被细胞接受和保持。

发明内容

[0051] 本发明的最初目标是提供治疗发源于上皮细胞的肾脏癌症的方法,所述方法涉及向需要治疗的哺乳动物施用至少一种根据式I的化合物。



式 I

[0053] 本发明的其他目的是提供根据式I的化合物用作药物,以及提供式I 的化合物用于肾细胞癌的治疗。

[0054] 本发明的另一个目的是提供药物组合物,其包含至少一种根据式I 的化合物,任选地包含具有抗癌活性的其他试剂,以及优化所述组合物的有效性所需的载体和任何其他赋形剂。

[0055] 又一个目的是提供一种试剂盒,其在一个或更多个独立的区室中含有上述组合物,以及需要的稀释剂和/或溶剂,从而所述组合物可以容易地制成以备治疗医师或护士使用。

[0056] 在阅读说明书和实施例时,本发明的其他目的和优点对于这个领域中的普通技术人员将变得显而易见,这些目的和优点意图落入本发明的范围之内。

附图简要描述

[0058] 图1:在对400μM奥来毒素(100μg/ml培养基)的24小时暴露后7 天期间,观察来自5 种不同的人类肾细胞癌(原发肿瘤和转移)的细胞的生存力的结果。生存力通过处理的样品中活细胞的数量除以对照样品中活细胞的数量来计算(n=6)。图形中的灰色区域表示奥来毒素孵育的时间(24h)。以后的几天,细胞在没有奥来毒素的完全培养基中培养。在每次生存力测量时更换培养基。

[0059] 图2:根据图1中相同的参数奥来毒素孵育后一周,对人类肾脏癌细胞(菌株786-0)的奥来毒素毒性。左侧的显微照片显示了暴露于赋形剂的细胞,右侧显微照片显示了暴露于400μM奥来毒素24h的细胞。两幅图片都在与奥来毒素/赋形剂繁殖后一周用相同的放大率拍摄。

[0060] 图3:人类肾细胞癌(786-0和SKRC7)的培养基中不同浓度的奥来毒素的剂量/响应效应。奥来毒素剂量和细胞死亡之间的清楚的相关性在5-200 μ g/ml的浓度区间内见到。

[0061] 图4:低剂量的奥来毒素的重复施用的效果。在第一剂量之后24h,在剂量/响应间隔低值的第二剂量(20 μ g/ml)的施用导致活细胞数量的强烈降低,而在72h的第二剂量的施用具有显著更小的,但仍然显著的效应。第一种情况相当于细胞的延长暴露(48h),而第二种情况中的细胞被容许在两个剂量之间在没有奥来毒素的培养基中恢复两天。在添加第一奥来毒素剂量之后96h测量生存力。

[0062] 图5:奥来毒素对肾细胞癌中(786-0和SKRC-52)细胞周期的影响(Western印迹)。细胞周期抑制物p21的蛋白质水平逐渐地上调到6h的孵育的最大值。在24h后,成视网膜细胞瘤蛋白质(Rb)的细胞周期刺激性磷酸化形式消失(显示了两种不同的磷酸化位点)。这些效应汇合来将细胞周期停止在GI/S的检查点。同时,刺激因子cdc2的丧失将细胞周期中止在检查点G2/M,阻止了细胞分裂的开始。

[0063] 图6:在肾脏癌细胞(786-0)中奥来毒素的细胞凋亡的诱导:蛋白质效应。在奥来毒素暴露(OR)之后细胞凋亡p38途径被强烈地增量调节(f-p38),以裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved caspase 3)的形式检测到细胞凋亡。在24h后ERK1/2的强增量调节(f-ERK1/2)被解释为细胞抵抗奥来毒素的细胞凋亡影响的尝试。

[0064] 对于ERK1/2和p38,应当比较磷酸化(f)与总蛋白的比例。裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3应当与加载对照α肌动蛋白比较。

[0065] 图7:在肾脏癌细胞(SKRC-52)中奥来毒素的细胞凋亡的诱导:mRNA效应。细胞凋亡中介体PUMA、Fas配体(FasL)和肿瘤坏死因子α(TNF)的mRNA表达的RT-PCR分析显示了所有三种情况下显著的增量调节。注意到受体mRNA的仅在表达方面有小的改变。细胞与没有奥来毒素的情况下孵育的对照细胞比较。

[0066] 图8:在与奥来毒素孵育期间人类透明细胞癌(SKRC52)中的细胞凋亡。细胞凋亡、空泡形成和细胞皱缩的典型症状在4h孵育后已经是明显的,在24h后进一步加重。

[0067] 发明优选实施方式的详细说明

[0068] 本发明提供了包含吡啶-N-氧化物和联吡啶-N,N-二氧化物化合物的药物组合物,以及向患有肾脏癌症或对肾脏癌症敏感的受试者施用所述药物组合物来治疗肾脏癌症的方法。在此本发明还包括用于治疗患有肾脏癌症或对肾脏癌症敏感的患者的试剂盒。

[0069] 本发明提供了治疗患有肾细胞癌或对肾细胞癌敏感的患者的方法,其中所述方法包括向所述患者施用如早先定义的根据式I的化合物、其药学上可接受的盐或包含所述化合物的药物组合物的步骤。

[0070] 施用给患者的式I的化合物包括其中R1、R2、R3和/或R4基本上不影响奥来毒素的细胞毒性的那些化合物(R1=R2=R3=R4=氢)。因而,R1、R2、R3和/或R4包括,但不限于,氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤素,包括氟、氯和溴、C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6烯氧基,其每一个可以进一步被包括但不限于氨基、巯基、羧基、磷酸和卤素,包括氟、氯和溴的基团取代。在本发明的优选的实施方式中,式I的化合物是奥来毒素,即,R1=R2=R3=R4=氢。

[0071] 在根据本发明的治疗患有肾脏癌症或对肾脏癌症敏感的患者的方法的一个实施方式中,施用给患者的式I的化合物是药学上可接受的盐、水化物或溶剂化物。如在此使用

的,药学上可接受的盐是酸或碱盐,其一般在本领域被认为适用于与人类或动物的组织接触而没有过多的毒性、刺激、变应性应答或其他问题或并发症。这样的盐包括碱性残基,例如胺的矿物和有机酸盐。具体的药物盐包括但不限于,酸的盐,所述酸例如,盐酸、磷酸、氢溴酸、苹果酸、乙二酸、反丁烯二酸、硫酸、氨基磺酸、对氨基苯磺酸、蚁酸、甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、乙烷二磺酸、2-羟基乙基磺酸、硝酸、苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、硬脂酸、水杨酸、谷氨酸、抗坏血酸、帕莫酸(pamoic)、琥珀酸、反丁烯二酸、马来酸、丙酸、羟基马来酸、氢碘酸、苯乙酸、烷酸,例如乙酸、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$,其中n是0-4,等等。

[0072] 在此提供的治疗肾脏癌症的方法中,式I的化合物可以以单次剂量、一系列的每日剂量或以间歇给药形式施用(例如,在1天和约30天之间的间隔、1天和约14天之间的间隔或1天和约7天之间的间隔的多个剂量或剂量序列的施用)。在某些方法中,选择施用方案和式I的化合物来提供在施用方案完成之后肿瘤大小的至少50%的降低,或更优选的肿瘤大小的至少75%、90%或95%的降低,而在某些其他方法中,施用方案和式I的化合物的选择引起肿瘤大小的95%降低、肿瘤大小的99%降低或肿瘤基本上完全消除。在治疗包含单次剂量施用方案的那些方法中,约1mg/kg到约100mg/kg之间根据式(I)的化合物或相等摩尔量的其药学上可接受的盐被施用给患者,而优选的单次剂量包括约2mg/kg到约25mg/kg之间,最优选的约5mg/kg到约15mg/kg的式I的化合物或相等摩尔数量的其药学上可接受的盐被施用给患者。

[0073] 在治疗肾脏癌症的某些其他治疗方法中,式I的化合物或其药学上可接受的盐以两个或更多个剂量被施用给患有肾脏癌症或对肾脏癌症敏感的患者。一般地,每天地或间歇地施用剂量(例如,分隔连续剂量的至少一个非施用天)。在某些方法中,其中式I的化合物或其药学上可接受的盐以多次剂量施用,每个剂量包含约0.5mg/kg到约10mg/kg的化合物,更优选的,每个剂量包含约1mg/kg到约5mg/kg,或更优选的约2mg/kg的式I的化合物或盐。

[0074] 在间歇地施用连续剂量的某些方法中,连续的剂量在两天到七天之间的间隔施用,在包含式I的化合物或盐的间歇施用的其他的方法中,化合物以三、四、五或六次或更多次剂量施用给患者,其中每个剂量以三到五天之间的间隔施用,还有在其他的方法中,所述患者间隔三天到四天之间施用四、五或六次或更多次剂量,其中每个剂量包含约1mg/kg到约20mg/kg的式I的化合物或其药学上可接受的盐,优选的2-10mg/kg,最优选的约5mg/kg。在治疗肾脏癌症的某些其他治疗方法中,患者被施用式I的化合物或其药学上可接受的盐的每日剂量至少两天。施用给患者的一般的每日剂量在0.1和10mg/kg之间、优选的是1和5mg/kg之间,最优选的约2mg/kg。治疗方案一般包括5到约30天之间、或优选的10到20天之间、或最优选的约14天的式I的化合物或其药学上可接受的盐的每日施用。

[0075] 在某些情况下,可能希望的是进行多次如上所述的间歇的施用方案、每日的施用方案或其组合,与静止和/或恢复期组合。因而,在某些情况下,可能希望的是根据在此提供的每日的或间歇的施用方法施用式I的化合物或其药学上可接受的盐,测量对治疗的肿瘤应答,然后根据消除或进一步降低肾脏癌症肿瘤的大小的需要进行随后的每日或间歇施用治疗。这样的施用策略是肿瘤学领域的普通技术人员公知的。

[0076] 在本发明的一个特别优选的实施方式中,患有肾细胞癌的患者用本发明的根据式

1的物质治疗,通过约0.5-5mg奥来毒素/kg b.w. (按重量计算),最优选的约2mg奥来毒素/kg b.w.的每日注射连续约7-21天,最优选的连续约14天。根据式I的化合物的每次每日注射之后1到5小时,最优选的这样的注射之后约2小时,患者进行血液透析1-5h,最优选的约2h,以消除没有被接受进入肿瘤组织的根据式I的化合物,从而最小化可能在细胞间隙中发生的任何非期望的副作用。

[0077] 如上所述的优选的剂量和给药方式是基于体重70kg、具有约1kg的肿瘤负荷的肾细胞癌的人体。然而,如癌症医学领域的普通工作者易于了解的,这样的的优选剂量和给药方式在很大程度上通过患者特征,例如,年龄、性别、体重、一般状况以及尤其是单个患者的肿瘤负荷以及对治疗的应答来调节。一如既往地,选择合适的剂量和治疗策略的最终责任在于负责该患者的医师。

[0078] 本发明提供了治疗患有肾细胞癌或对肾细胞癌敏感的患者的方法。在某些方法中,要治疗的肿瘤位于患者的一个或两个肾脏中。在某些其他方法中,肾细胞癌已经转移,例如,至少一个肾细胞癌肿瘤存在于至少一个非肾脏组织中。一般地,在此提供的方法适用于患有肾细胞癌肿瘤或对肾细胞癌肿瘤敏感的患者的治疗,所述肿瘤存在于肾脏、非肾脏组织或其组合中。在优选的实施方式中,所述肿瘤存在于非肾脏组织中,或肾脏和非肾脏组织的组合中。本发明提供的治疗方法期待能够向肿瘤附近提供治疗有效剂量的式I的化合物的任何施用途径。在此处提供的某些优选的治疗方法中,式I的化合物、或包含式I的化合物的药物组合物被静脉内地、皮下地或腹膜内施用。一般地,式I的化合物或包含式I 的化合物的药物组合物被静脉内地施用。

[0079] 在另一个方面,本发明提供了式I的化合物,其中R1、R2、R3和/ 或R4基本上不影响奥来毒素的细胞毒性(R1=R2=R3=R4=氢),用作药物。本发明还提供了式I的化合物作为药物的用途,其中R1、R2、R3 和/或R4基本上不影响奥来毒素的细胞毒性(R1=R2=R3=R4 =氢)。R1、R2、R3和/或R4包括,但不限于,氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤素,包括氟、氯和溴、C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6 烯氧基,其每一个可以进一步被包括但不限于氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤素,包括氟、氯和溴的基团取代。在本发明的优选的实施方式中,式I的化合物是奥来毒素,即,R1=R2=R3 =R4=氢。本发明的这个方面的其他优选的实施方式根据显现的说明是明显的。

[0080] 在又一个方面,本发明提供了式I的化合物,其中R1、R2、R3和/ 或R4基本上不影响奥来毒素的细胞毒性(R1=R2=R3=R4=氢),用于肾细胞癌的治疗。本发明还提供了式I的化合物用于制造治疗肾细胞癌的药物的用途,其中R1、R2、R3和/或R4基本上不影响奥来毒素的细胞毒性(R1=R2=R3=R4=氢)。R1、R2、R3和/或R4包括,但不限于,氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤素,包括氟、氯和溴、C1-C6烷基、C1-C6 烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6 烯氧基,其每一个可以进一步被包括但不限于氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤素,包括氟、氯和溴的基团取代。在本发明的优选的实施方式中,式I的化合物是奥来毒素,即,R1=R2=R3=R4=氢。本发明的这个方面的其他优选的实施方式根据显现的说明是明显的。

[0081] 在另一个方面,本发明提供了包含至少一种药学上可接受的载体和根据式(I)的化合物的药物组合物,其中R1、R2、R3和/或R4基本上不影响奥来毒素的细胞毒性(R1=R2=R3=R4=氢)。因而,R1、R2、R3 和/或R4例如,但不限于,氢、氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤

素,包括氟、氯和溴、C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C1-C6烷醇基、C1-C6烯醇基、C1-C6烷氧基、C1-C6烯氧基,其每一个可以进一步被包括但不限于氨基、巯基、羧基、磷酸盐和卤素,包括氟、氯和溴的基团取代。在本发明的优选的实施方式中,式I的化合物是奥来毒素,即,R1=R2=R3=R4=氢。

[0082] 在某些其他药物组合物中,式I的化合物作为药学上可接受的盐、水化物或溶剂化物掺入到组合物中。如在此使用的,药学上可接受的盐是酸或碱盐,其一般在本领域被认为适用于与人类或动物的组织接触而没有过多的毒性、刺激、变应性应答或其他问题或并发症。这样的盐包括碱性残基的矿物和有机酸盐,例如胺。具体的药物盐包括但不限于,酸的盐,所述酸例如,盐酸、磷酸、氢溴酸、苹果酸、乙二酸、反丁烯二酸、硫酸、氨基磺酸、对氨基苯磺酸、蚁酸、甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、乙烷二磺酸、2-羟基乙基磺酸、硝酸、苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、硬脂酸、水杨酸、谷氨酸、抗坏血酸、帕莫酸(pamoic)、琥珀酸、反丁烯二酸、马来酸、丙酸、羟基马来酸、氢碘酸、苯乙酸、烷酸,例如乙酸、HOOC-(CH₂)_n-COOH,其中n是0-4,等等。

[0083] 本发明提供的药物组合物适用于使用该组合物的治疗方法所期待的任何施用途径。在本发明的方法中,根据式I的本发明的化合物和其药物组合物可以通过多种途径,包括胃肠外的(包括静脉内的、皮下的、肌肉内的和皮内的)、局部的(包括口腔的、舌下的)、口服、鼻部等等施用给受试者。在此处提供的某些优选的药物组合物中,所述药物组合物是为通过静脉内的、皮下的或腹膜内的注射施用来配制的。一般地,所述药物组合物被配制用于通过静脉内注射来施用。

[0084] 在某些胃肠外施用途径中,药物组合物是包含约0.1mg/ml到约25 mg/ml式I的化合物或其药学上可接受的盐的无菌盐水溶液。用于胃肠外施用的某些优选的药物组合物包含盐水溶液中的约0.5mg/ml到约10 mg/ml的式I的化合物或其药学上可接受的盐,其任选地包含一种或更多种药学上可接受的添加剂。

[0085] 在某些优选的药物组合物中,所述组合物包含约25mg到约5000mg之间,或约5mg到约2500mg之间根据式(I)的化合物或等摩尔数量的其药学上可接受的盐。在本发明的某些其他药物组合物中,所述组合物包含约1mg到约1500mg之间的根据式(I)的化合物或等摩尔数量的其药学上可接受的盐。又配制了其他的药物组合物,包含约20mg、约30 mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、或约100mg的式I的化合物或等摩尔数量的其药学上可接受的盐。

[0086] 在治疗患有癌症或对癌症敏感的患者的某些方法中,根据式I的化合物向患有癌症或对癌症敏感的患者的施用降低了肿瘤大小至少50%或更优选的至少约60%、70%、80%、90%或约95%。在治疗患有癌症的患者的某些其他方法中,根据式I的化合物向患有癌症的患者的施用降低了肿瘤大小至少99%,或降低肿瘤大小直到没有留下可检测的肿瘤。

[0087] 治疗患有癌症的患者的某些优选的方法包括在哺乳动物患者中癌症或其他肿瘤失调的治疗或预防,所述哺乳动物患者包括家畜、陪伴动物(犬、猫、马,等等)、灵长类和人类。

[0088] 本发明的治疗方法一般包括向患者施用治疗有效量的一种或多种式I的化合物。在当前的治疗方法中,治疗有效量足以降低患者中存在的肾细胞癌肿瘤的大小或从患者中

消除肿瘤。适合的患者包括患有在此鉴定的失调或疾病的那些受试者。根据本发明治疗的典型的患者包括哺乳动物,特别是灵长类,特别是人类。其他适合的受试者包括驯养的陪伴动物,例如,犬、猫、马等等,或家畜动物,例如,牛、猪、绵羊等等。

[0089] 本发明的优选的方法包括鉴定和/或选择受试者(例如,哺乳动物,特别是人类),其患有在此公开的状况,特别是患有一种或更多种癌症的受试者。本发明的药物组合物还可以与在此公开癌症的治疗的说明书(例如,书写的,例如,书写的折页),例如,治疗患有癌症的受试者的说明书一起包装。

[0090] 本发明的化合物以水溶性的形式适合地施用给受试者,例如,在适当的化学转变之后获得的作为有机酸的或无机酸的药学上可接受的盐,例如,盐酸盐、硫酸盐、半硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐等等。并且,当化合物上存在酸性基团时,可以采用有机或无机碱的药学上可接受的盐,例如,铵盐、有机胺的盐、碱金属或碱土金属的盐例如钾、钙或钠盐。特别适合的药学上可接受的盐包括与无毒的阳离子,优选的碱金属阳离子如K或Na,碱土金属阳离子例如Mg或Ca,其他无毒的金属阳离子,例如Al或Zn或无毒的非金属阳离子,如NH₄⁺、哌嗪或2-羟基乙基胺形成的那些。适用于本发明的方法的某些优选的化合物是中性形式充分水溶性的,以这样的方式它们可以不需药学上可接受的盐的预先产生来递送。

[0091] 适用于本发明的方法的化合物包括任何和所有不同的单一的纯的同分异构体以及两种或更多种同分异构体的混合物。术语同分异构体意图包括非对映异构物、对映异构体、区域异构体、结构同分异构体、旋转同分异构体、互变异构体,等等。对于含有一个或更多个立体基因核心,例如,手性化合物,本发明的方法可以用对映异构富集的化合物、外消旋物、或非对映异构体的混合物来进行。优选的对映异构富集的化合物具有50%或更高的对映异构体过量,更优选的,所述化合物具有60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%或更高的对映异构体过量。在本发明的方法中使用的根据式I的本发明的化合物可以单独地、或与一种或更多种其他治疗试剂组合地采用,作为与常规赋形剂的混合物中的药物组合物,所述赋形剂即适合于期望的施用途径的药学上可接受的有机或无机载体物质,其不会与活性化合物有害地反应,对其接受者也不是有害的。适合的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液、醇、植物油、聚乙二醇、凝胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、硅酸、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸单酸甘油酯和甘油二酯、petroethra1脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮,等等。药物制品可以被消毒,以及如果需要,可以与不与活性化合物有害地反应的助剂,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂、调味剂和芳香物质等等混合。

[0092] 对于胃肠外的应用,溶液,优选的油或水溶液以及悬浮液、乳剂或植入物,包括栓剂,是特别适合的。安瓿是方便的单位剂量。

[0093] 对于肠内的应用,特别适合的是具有滑石粉和/或碳水化物载体粘合剂等等的片剂、糖衣丸或胶囊,所述载体优选的是乳糖和/或玉米淀粉和/或马铃薯淀粉。可以使用其中采用了加甜味的赋形剂的糖浆、酏剂等等。可以配制持续释放的组合物,包括其中活性成分用不同的可降解的包衣保护的组合物,例如,微型胶囊、多层包衣等等。片剂、胶囊剂和糖浆或其他流体一般是对口服施用优选的。

[0094] 要理解的是,除了上文明确提及的成分之外,本发明的制剂可以包括对于所讨论

的制剂类型中的本领域常规的其他试剂,例如,适于口服施用的可以包括调味剂。

[0095] 根据某些实施方式,式I的化合物可以与其他化合物组合施用,包括例如,化学治疗剂、抗炎试剂、抗热病试剂、辐射敏化试剂、放射保护试剂、泌尿试剂、抗吐试剂和/或抗癫痫试剂,例如,顺铂、卡铂、多西他赛、紫杉醇、氟脲嘧啶、卡培他滨、吉西他滨、伊立替康、托泊替康、依托泊苷、丝裂霉素、吉非替尼、长春新碱、长春碱、阿霉素、环磷酰胺、塞来考昔、罗非考昔、伐地考昔、布洛芬、萘普生、酮洛芬、地塞米松、泼尼松、泼尼松龙、氢化可的松、醋氨酚、米索硝唑、氨磷汀、坦洛新、非那吡啶、昂丹司琼、格拉司琼、阿洛司琼、帕洛诺司琼、异丙嗪、丙氯拉嗪、曲美苄胺、阿瑞吡坦、具有阿托品的地芬诺酯和/或洛哌丁胺。在一个优选的实施方式中,根据式I的化合物与抗血管生成药物组合施用,包括例如针对血管内皮生长因子(VEGF)和胎盘生长因子(P1GF)的单克隆抗体;以及VEGF和P1GF受体的抑制物,包括例如贝伐单抗(bevacizumab)、索拉非尼(sorafenib)、PTK78、SU11248、AG13736、AEE788和ZD6474。在另一个实施方式中,根据式I的化合物与免疫调节药物组合施用,包括例如白细胞介素2(IL-2)和干扰素 α (IFN α)。在又一个实施方式中,根据式I的化合物与干扰细胞生长信号转导的药物组合施用,包括例如雷帕霉素的哺乳动物靶点的抑制物(mTOR)。

[0096] 在本发明的又一其他的实施方式中,根据式I的化合物化学结合到增强目标选择性、甚至进一步通过将式I的化合物特异性靶向癌细胞的分子。这样的分子的实例包括(A)针对与正常肾脏组织相比在目标细胞上特异性地或以更大数量发生的标志物的多克隆和单克隆抗体,以及(B)与正常肾脏组织相比在目标细胞上特异性地或以更大数量发生的受体的配体。这样的导引分子以及将它们结合到根据式I的化合物的技术是本领域已知的,偶联反应可以由普通技术人员无需过度实验来进行。本发明的试剂盒在此包含至少一种药学上可接受的载体和50到3,500mg的根据式I的化合物,或等摩尔数量的如以上讨论的其药学上可接受的盐。在所述试剂盒中,根据式I的化合物或其可接受的盐和药学上可接受的载体优选地位于独立的区室中。根据式I的化合物优选地作为固体存在。对于施用,根据式I的化合物或其药学上可接受的盐优选地与载体组合,从而它完全地或基本上地溶于所述载体中。所述试剂盒可以包含约100mg到约1,500mg之间,最优选的约200mg到约500mg之间的根据式I的化合物或等量的其药学上可接受的盐。

[0097] 本发明的上述说明仅仅是说明性的,要理解的是可以进行变化和修改而不背离在以下权利要求中阐述的本发明的精神和范围。在此提及的每一份文件通过引用合并到本申请的公开内容中。

实施例

[0098] 实施例1:来自丝膜菌蘑菇的奥来毒素的提取和分离

[0099] A.极性的方法:2g干燥的丝膜菌蘑菇进行粉碎,然后用50%甲醇在25℃提取24小时。离心混合物,移出上清液得到5ml的最终体积。在重复添加5vol冷甲醇时,形成沉淀,弃去沉淀直到形成澄清溶液。蒸发溶剂,残余物溶于水中,通过用石油醚提取除去非极性物质。极性相加载到交联葡聚糖,柱(Sephadex)上,用50%乙醇洗脱。产生的级分在薄层纤维素上层析,用丁醇:乙酸:水(3:1:1)洗脱。奥来毒素(Orellanin)被鉴定为Rf0.68下的荧光条带。

[0100] B.非极性方法:4g粉末的丝膜菌蘑菇在二乙醚中回流24小时,弃去溶剂。残余物在

甲醇中回流，随后是溶剂蒸发，用20ml的水洗涤(6h, 4°C)。然后将它们溶解在50%的乙醇水溶液中(pH 7.0)。混合物加载到交联葡聚糖柱上，用50%乙醇洗脱。产生的级分在薄层纤维素上层析，用丁醇：乙酸：水(3:1:1)洗脱。奥来毒素被鉴定为Rf0.68下的荧光条带。

[0101] 实施例2:奥来毒素的合成

[0102] 基本上如他人描述的从商业上可获得的3-羟基吡啶合成奥来毒素。(Tiecco M, Tingoli M, Testaferri L, Chianelli D and Wenkert E: Total synthesis of orellanine, the lethal toxin of *Cortinarius orellanus* Fries Mushroom. *Tetrahedron* 42, 1475-1485 (1986))

[0103] 实施例3:在体外奥来毒素具有对人类肾细胞癌的特异性毒性作用。

[0104] 背景和方法

[0105] 从5种不同的人类肾细胞癌(SKRC-52、786-0、SKRC-17、SKRC-7 和SKRC-21)收获的细胞，代表母本肿瘤和转移性生长，在标准条件下培养。当大约70%汇合和迅速生长时，细胞暴露于含有奥来毒素(400 μM)的培养基24小时。然后培养基变回常规的完全培养基，再观察细胞六天。

[0106] 结果和说明

[0107] 描述的细胞奥来毒素处理的效果在图1中说明。根据附图明显的是，对所有测试的细胞类型奥来毒素是高毒性的。此外，毒性不受在起始的暴露后从培养介质去除奥来毒素的影响。这表明奥来毒素在细胞中积累并保持在其中，即使在不存在细胞外的奥来毒素时。图2显示了24小时奥来毒素暴露之前和一周后细胞的外观。

[0108] 实施例4:奥来毒素的剂量-反应效应

[0109] 背景和方法

[0110] 从2种不同的人类肾细胞癌(SKRC-7、786-0)收获的细胞，代表母本和转移性的生长，在标准条件下培养。当大约70%汇合和迅速生长时，细胞暴露于含有不同浓度的奥来毒素(400μM)的培养基中24小时。然后培养基变回常规的完全培养基，再观察细胞六天。

[0111] 结果和说明

[0112] 如图3所示，在暴露浓度和死亡的细胞部分之间存在清楚的相关性。奥来毒素的单次的24h暴露的剂量反应区间在大约5μg/ml和200 μg/ml之间。

[0113] 实施例5:更小剂量的奥来毒素的重复施用的效果

[0114] 背景和方法

[0115] 从人类肾细胞癌786-0收获的细胞在标准条件下培养。当大约70%汇合和迅速生长时，细胞暴露于含有低浓度的奥来毒素(20μg/ml)的培养基中24小时。然后培养基改变成新的培养基，含有20μg/ml奥来毒素持续24h(中间柱)，或改变回常规的完全培养基持续48h，随后在存在20μg/ml奥来毒素(右侧柱)的情况下另外持续24h。

[0116] 结果和说明

[0117] 对奥来毒素的重复暴露，甚至在单次暴露应答区间的下限的剂量下，产生了对肾脏癌细胞的进一步的、显著的毒性效果。

[0118] 实施例6:奥来毒素对其他细胞类型的效果

[0119] 背景和方法

[0120] 来源于许多人类组织的细胞系和原代细胞(肾小球上皮、来自肾脏组织的足状突

细胞和系膜细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、主动脉内皮、微血管内皮和脐带内皮、肠上皮(十二指肠的、空肠的、回肠的和结肠的)和软骨细胞)在标准条件下培养。当大约70%汇合和处于稳定成长时,细胞暴露于含有选定浓度的奥来毒素以实现剂量反应的培养基中 24h。然后培养基改变回常规的完全培养基,再观察细胞另外六天,随后生存力测定。为了补偿由于添加的大体积奥来毒素溶液的培养介质稀释所引起的任何生长抑制作用,所有细胞补充等体积的奥来毒素缓冲液。

[0121] 结果和说明

[0122] 当根据实施例4的奥来毒素暴露处于高达1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度时,这是可实现的最高的浓度,测试的细胞类型都没有展现对生存力的任何影响。

[0123] 实施例7:奥来毒素通过停止细胞周期诱导生长延滞

[0124] 背景和方法

[0125] 基本上如实施例3中描述培养的肾脏癌症细胞用奥来毒素(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培养基)处理24小时。在这期间,在0、2、6和24h的暴露之后收获细胞。使用针对A) 激酶抑制物p21,B) 磷酸化的成视网膜细胞瘤蛋白质(生长刺激素),和C) 容许细胞进入细胞周期的M期的cdc2蛋白质,在M期时细胞分裂,对收获的带有抗体的材料进行Western印迹。

[0126] 结果和说明

[0127] 奥来毒素暴露对p21、成视网膜细胞瘤蛋白质和cdc2的蛋白质表达的影响在图5中示出。细胞周期抑制物p21的细胞内水平在约6h增加到最大值,而成视网膜细胞瘤蛋白质的细胞周期刺激性磷酸化形式在24h测量时是完全缺乏的。以类似的方式,容许细胞进入细胞分裂期的cdc2 蛋白质在24h显著地减量调节。这清楚地表明,奥来毒素对细胞周期具有深刻的抑制效果,其在至少两个重要的检查点上发挥作用。

[0128] 实施例8:奥来毒素提高几种细胞凋亡诱导途径的活性,引起癌细胞死亡

[0129] 背景和方法

[0130] 培养肾脏癌症是并根据实施例7暴露于奥来毒素,在各个时间收获直到24h。p38MAPK系统、p53系统、Fas配体、肿瘤坏死因子 α (TNF) 和裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3是导致细胞死亡的细胞凋亡途径中的关键因子。Western印迹被用于测定A) p38,B) 裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3,和C) 增殖因子磷酸化的ERK1/2的细胞内水平。定量的 PCR被用于测定D) 细胞凋亡的p53增量调节的调节物(PUMA),其介导p53途径的基本上所有的细胞凋亡效应,E) Fas配体和F) TNF的 mRNA的表达。

[0131] 结果和说明

[0132] 结果在图6-8中概述。在整个24h观察期中存在着磷酸化(活化的) p38的稳定的提高,提高了细胞的细胞凋亡信号强度(图6)。(生长刺激物磷酸化的ERK1/2的同时增量调节被发明人解释为细胞“抵抗”奥来毒素的细胞凋亡影响的尝试)。

[0133] 在mRNA水平上,PUMA的极度的增量调节和死亡受体配体FasL和 TNF构成了强的细胞凋亡刺激(图7)。最后,裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3的数量,细胞凋亡的主要效应物,在对奥来毒素的暴露后24h 显著地提高(图6)。

[0134] 上述结果与图8中呈现的逐渐增多的细胞凋亡的细胞的图像一起,上述结果清楚地表明细胞凋亡是在肾脏癌症细胞中奥来毒素的作用的主要模式。

[0135] 实施例9:奥来毒素消灭了无胸腺大鼠中人类肾细胞癌生长

[0136] 背景和方法

[0137] 无胸腺的T细胞缺陷的大鼠(RNU,Charles River Laboratories,FRG)用作人类肾细胞癌的体内生长的系统。这些动物中基于T细胞的免疫防御的缺乏使得它们耐受异种移植植物。到达动物设施中后一周,10只动物接受5Gy的X光照射剂量,以抑制它们的B细胞介导的应答。

[0138] 第二天,所有动物装备留置导管用于腹膜透析(PD)。PD治疗将重置肾脏的功能,其作为施用奥来毒素时的副作用丧失。

[0139] 一天之后,5只动物在肩部区域皮下接种约 10×10^6 个人类肾脏癌细胞(SKRC-52)。5只其余的动物通过静脉内注射接受相同数量的细胞。在皮下组中,局部化的肿瘤,1×1×2cm,在2-4周后在动物的皮肤下是明显的。在此时,每个组中的2只动物(对照)用生理盐溶液注射i.p.,其他3只动物接受10mg奥来毒素/kg b.w.i.p.。

[0140] 结果和说明

[0141] 在盐水/奥来毒素的首次注射之后两周,皮下注射组中对照动物的肿瘤大小近乎加倍,而用奥来毒素注射的动物中肿瘤皱缩到小于注射时记录的大小的25%。在此时,5mg奥来毒素/kg b.w.的另一个剂量注射到皮下组中早先接受奥来毒素的3只动物的肿瘤位点中,对照动物接受10mg奥来毒素/kg b.w.进入肿瘤位点。在另外2周之后,在用奥来毒素注射两次的动物中没有肿瘤的病征是明显的,前者对照动物中的肿瘤大小降低超过75%。

[0142] 在第一次盐水/奥来毒素注射之后的一周和两周,静脉内组中的5只动物分别接受5mg/kg奥来毒素或盐水的i.v.注射。在另外一周后,杀死动物,扫描它们的腹腔和胸腔的肿瘤生长。肿瘤体积的鉴别显示了用奥来毒素治疗的动物具有比对照动物的肿瘤的负荷小10%。

[0143] 这清楚地展现了奥来毒素在体内系统中的肿瘤杀伤活性。

[0144] 实施例10:在猪和犬中的长期治疗期间i.v.奥来毒素的安全性

[0145] Gottingen迷你猪系的5只猪和混合培育的5只犬(体重10-15kg)利用为儿童和婴儿设计的装备进行血液透析。动物接受10mg奥来毒素/kg b.w.的起始剂量,24h之后,动物经历大约3h的透析期。在透析之后,动物注射5mg奥来毒素/kg b.w.透析/再注射过程重复一周3次(星期一、星期三、星期五)持续8周。每周进行一次动物一般状况的评估。在实验的结束时,杀死全部的动物,组织病理学评估的样本取自心脏、肺、肾脏、肝脏、脾脏、小肠、大肠、脑、肌肉和皮肤。

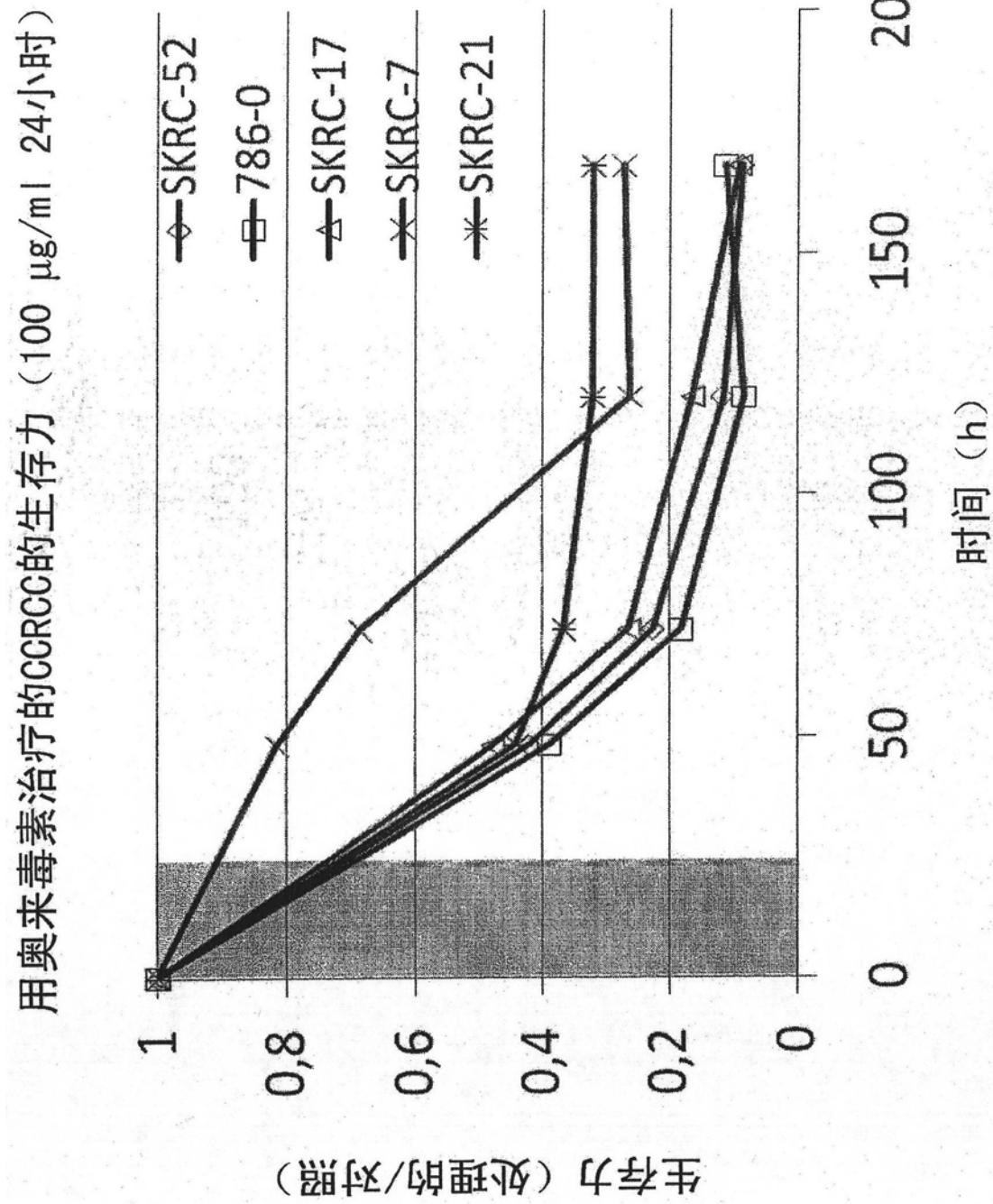
[0146] 动物的行为和一般状况在整个实验周期内保持正常。组织病理学检查揭示了除肾脏之外没有组织损伤,其中存在大面积的肾小管损伤,导致完全的肾衰竭。

[0147] 结果显示了使用高剂量的奥来毒素的长期治疗从肾脏癌症患者的角度看是安全的,具有在非肾脏组织中可忽略的副作用。

[0148] 实施例11:使用奥来毒素对患有晚期肾细胞癌的人类患者的治疗

[0149] 需要治疗肾癌的患者给与一系列每天10次的奥来毒素静脉内注射。患者的起始的肿瘤负荷被确定为大约2kg。基于这个值,适合的日剂量被确定为280mg(4mg/kg b.w.70kg)。在第一次注射之前,患者准备血液透析或腹膜透析,因为奥来毒素治疗在杀死癌细胞的同时会不可避免地破坏健康的肾脏上皮组织,因而使患者丧失肾脏功能。在每次注射后2小时,开始血液透析并持续2小时。伴随较小数量的奥来毒素的重复施用的这个过

程,具有引起奥来毒素逐步积累至肿瘤组织的死亡的水平的优点,所述肿瘤组织主动地接受所述物质,而毒素的细胞外浓度保持低于引起副作用的水平。任选地,如果疾病是单侧的,未受影响的肾脏可以外科手术移出并在治疗期间保存,在治疗结束之后尝试再植入术。监视患者的进展一个月,此后根据抑制肾癌生长的需要给与奥来毒素的另外的连续施用。在治疗期间,患者中肿瘤组织的团块减小,在治疗结束时,肾脏癌症被完全地消灭,展现了奥来毒素针对肾脏透明细胞癌的效力。



在奥来毒素孵育后一周的786-0细胞
对照细胞
奥来毒素处理的(24h, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

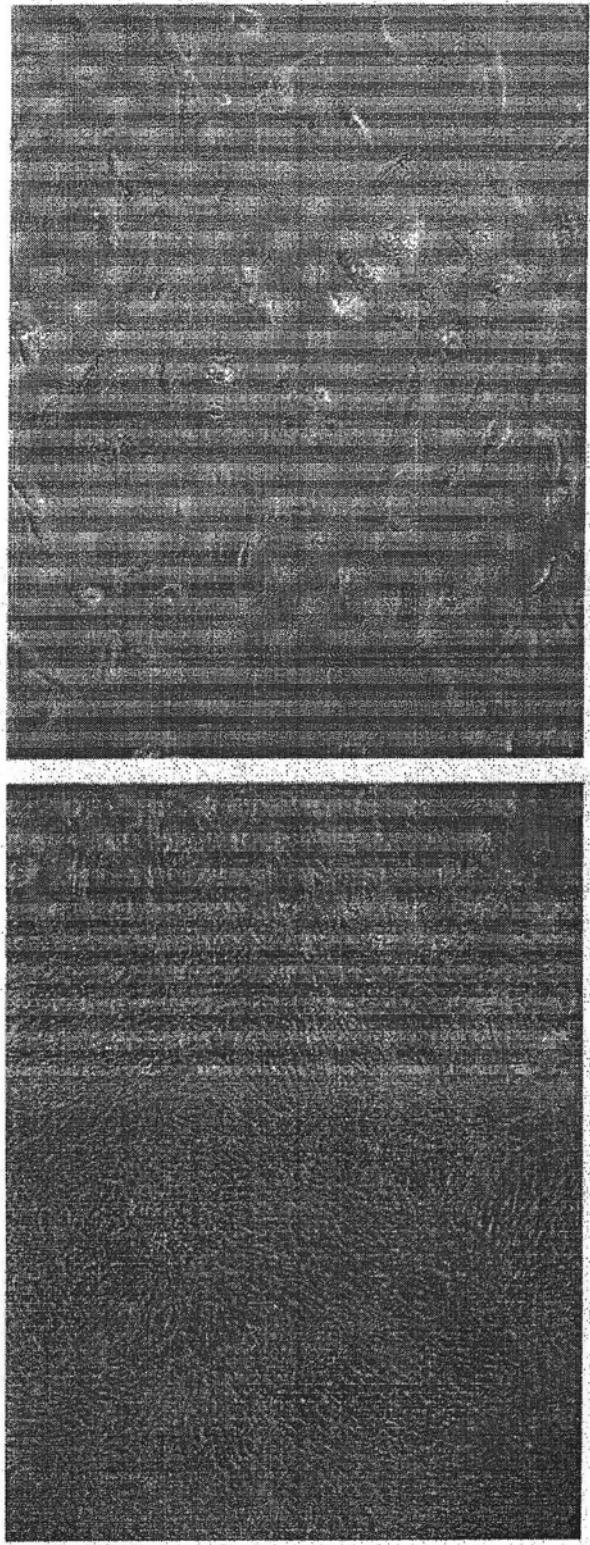


图2

在CCRCC系786-0和SKRC7中与奥来毒素
24小时孵育之后96小时的响应

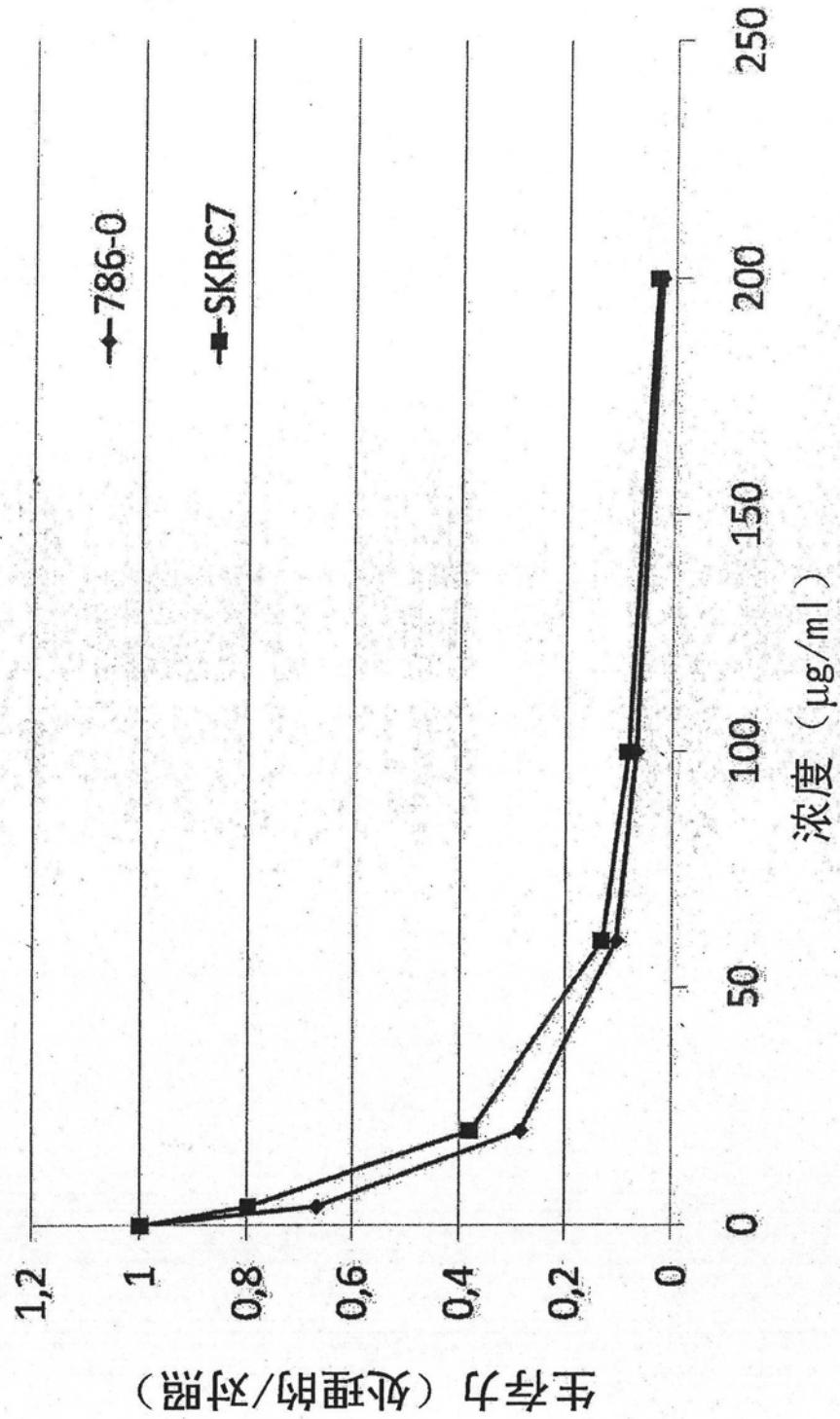


图3

在20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 奥来毒素的两次重复剂量之后的CCRC生存力 ($n=3$)

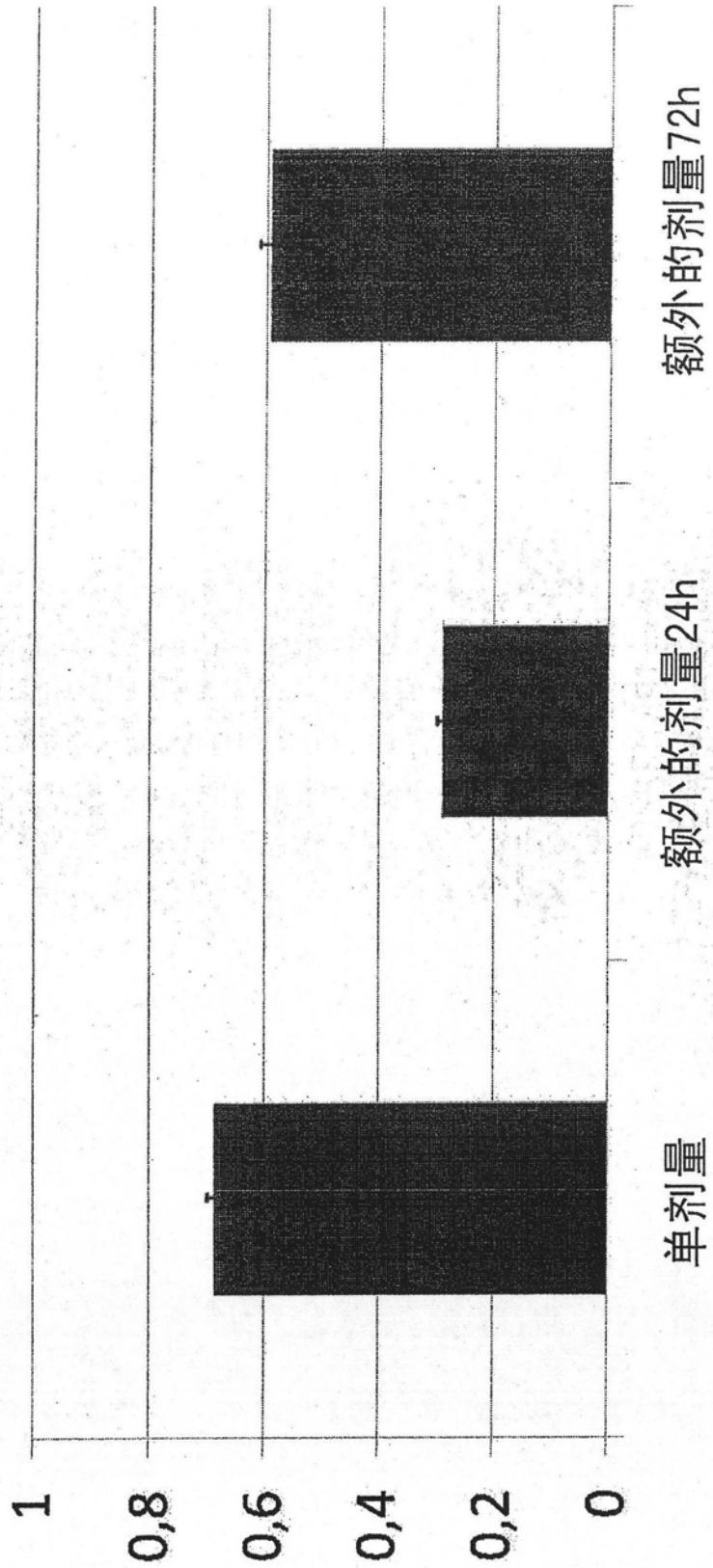


图4

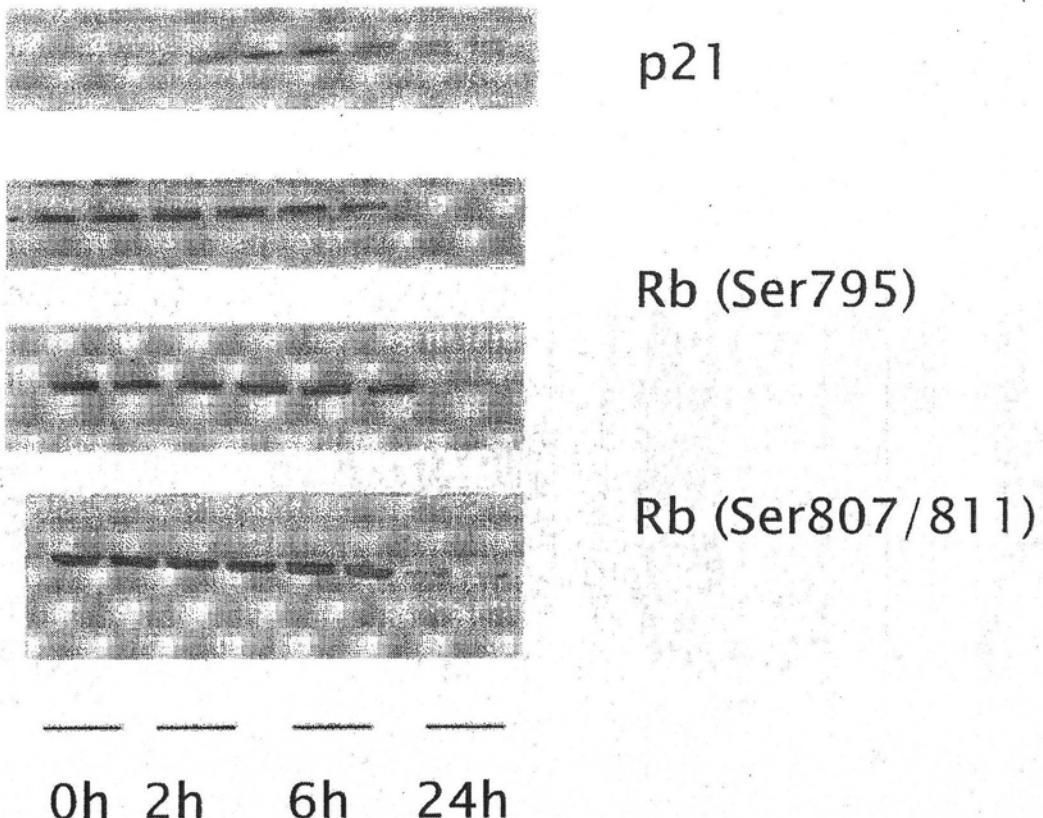


图5

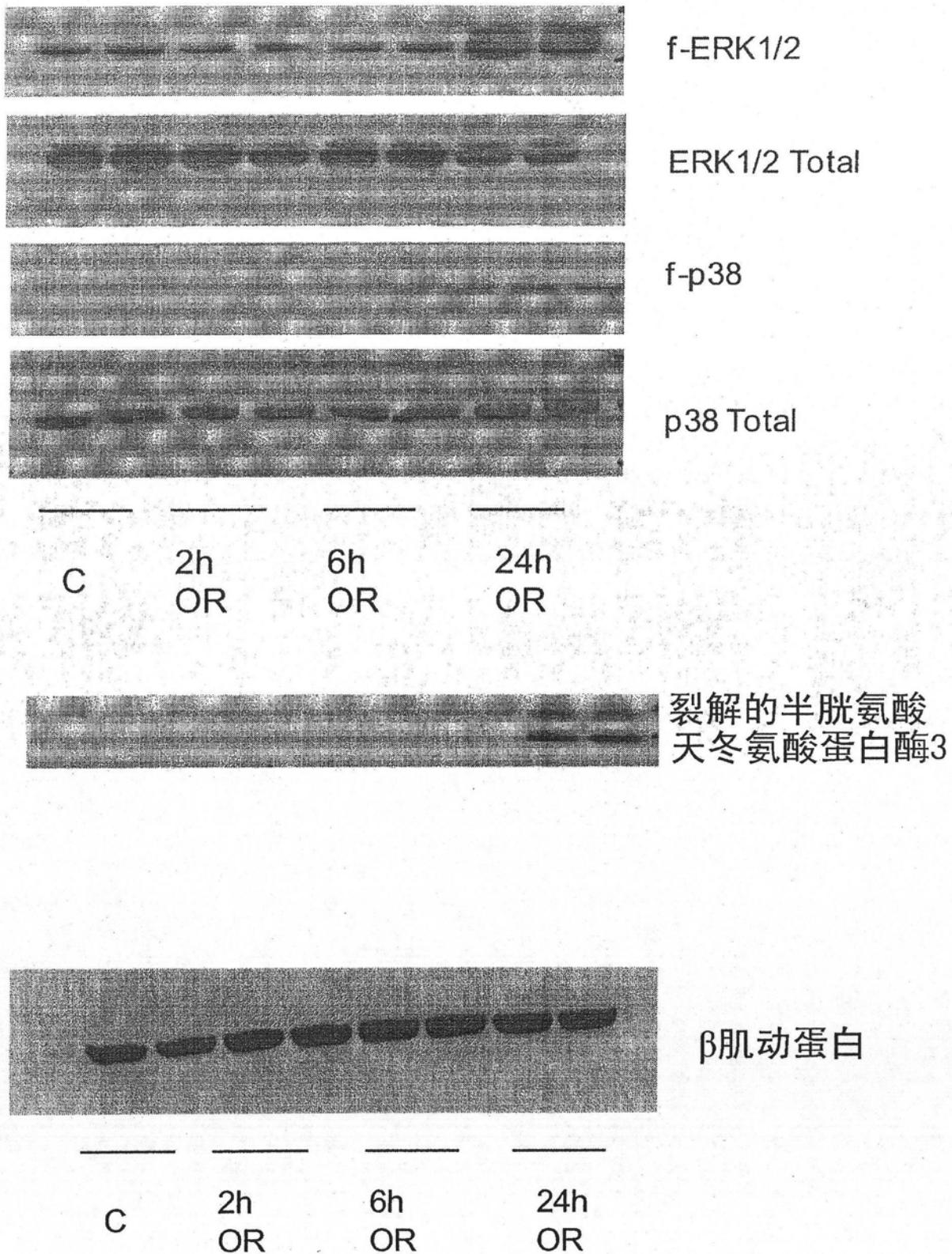


图6

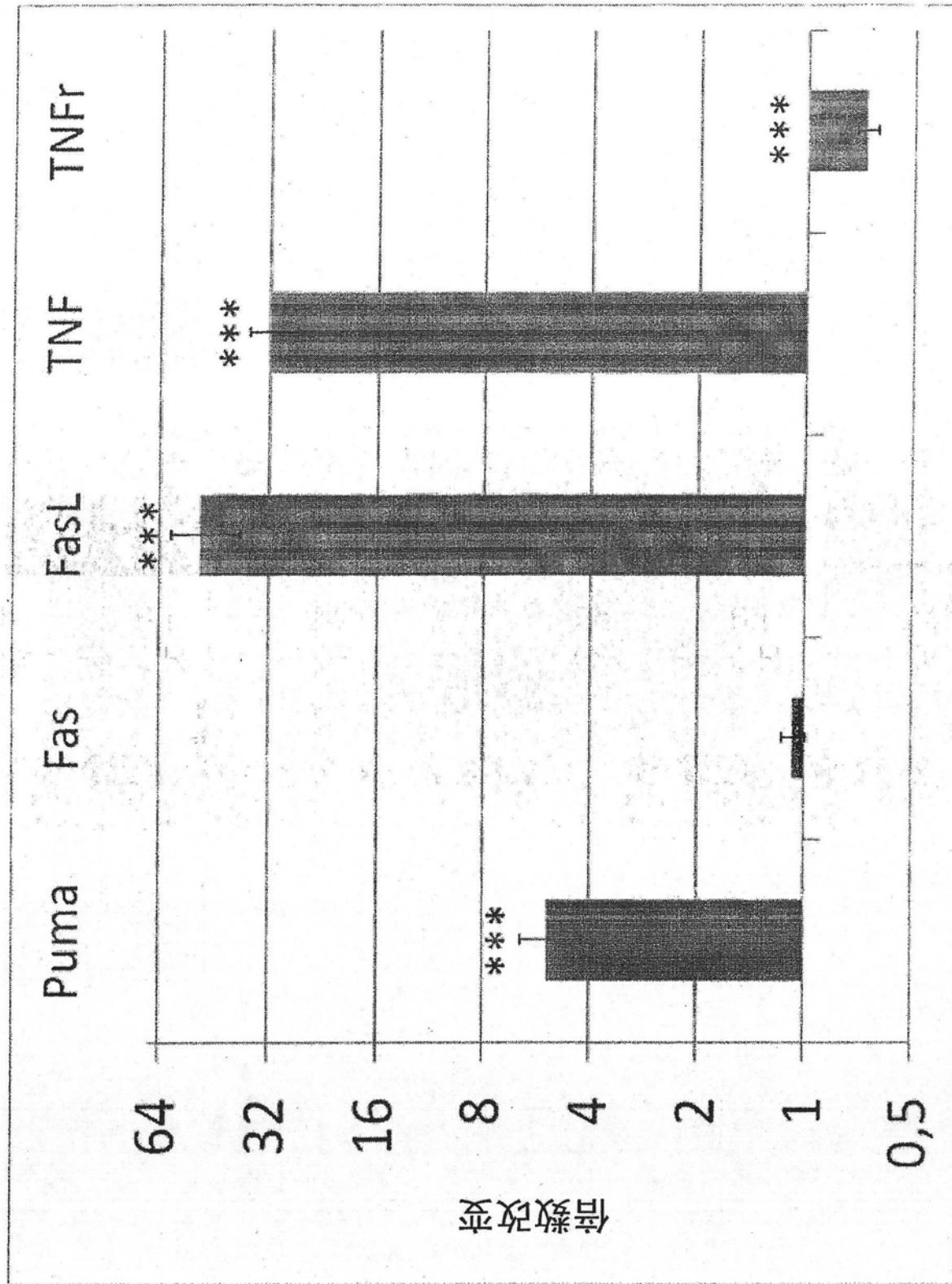


图7

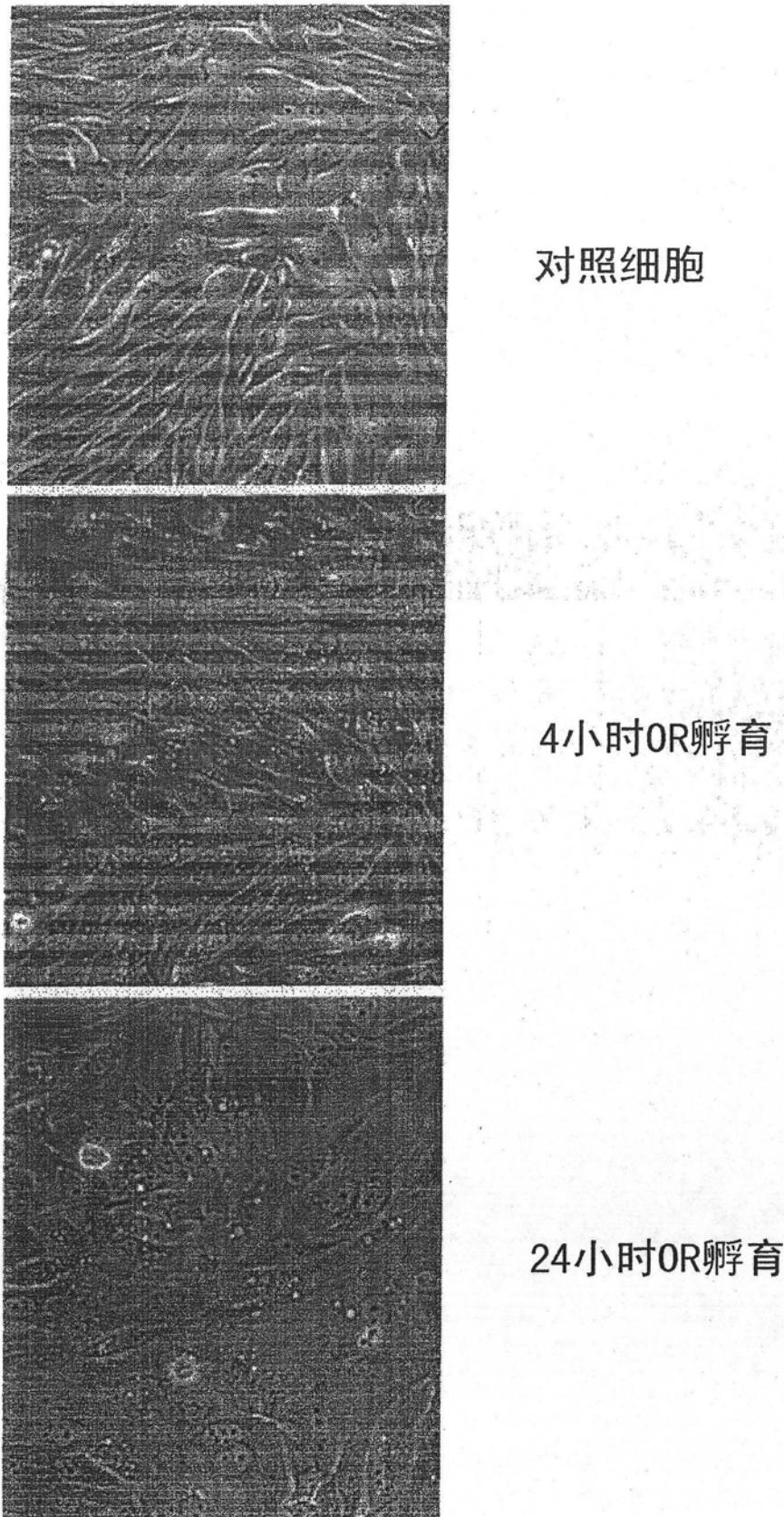


图8