



(21)申請案號：113107343

(22)申請日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 01 日

(51)Int. Cl. :

A61K31/7068(2006.01)

A61K31/675 (2006.01)

A61K31/337 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K31/655 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2023/03/03 中國大陸 2023102016022

(71)申請人：大陸商河南真實生物科技有限公司 (中國大陸) HENAN GENUINE BIOTECH CO.,LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：李 磐 LI, PAN (US) ； 賈麗敏 JIA, LIMIN (CN) ； 秦志勇 QIN, ZHIYONG (CN) ；
王朝陽 WANG, ZHAOYANG (CN)

(74)代理人：張耀暉 ； 呂昆餘 ； 莊志強

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：7 共 26 頁

(54)名稱

包含阿茲夫定和化療試劑的抗腫瘤藥物組合物

(57)摘要

本發明公開了一種包含阿茲夫定和化療試劑的藥物組合物，本發明的藥物組合物在抗腫瘤方面表現出較好的協同作用，並且可以降低化療製劑的用量，提高療效和安全性，從而達到延長患者生存期的目標。

指定代表圖：

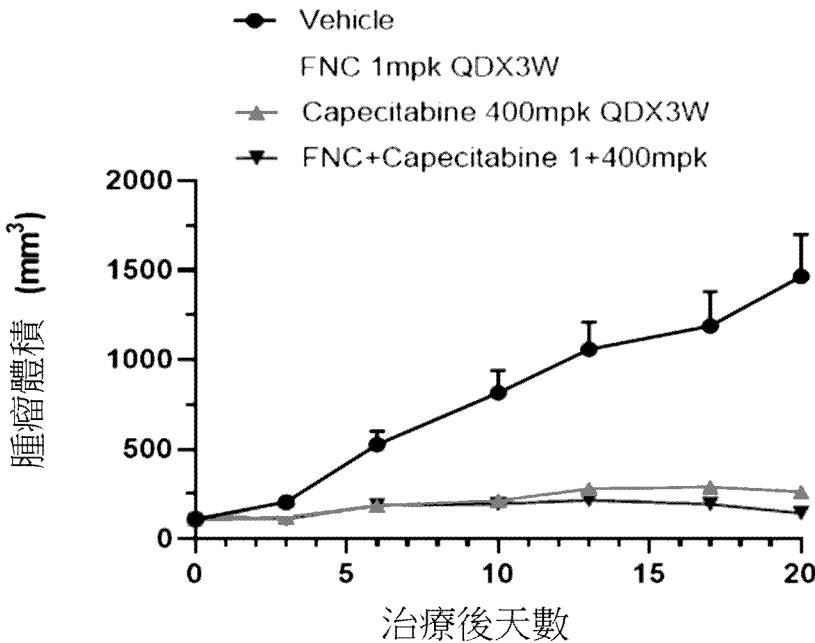


圖 1

【發明摘要】

【中文發明名稱】 包含阿茲夫定和化療試劑的抗腫瘤藥物組合物

【中文】

本發明公開了一種包含阿茲夫定和化療試劑的藥物組合物，本發明的藥物組合物在抗腫瘤方面表現出較好的協同作用，並且可以降低化療製劑的用量，提高療效和安全性，從而達到延長患者生存期的目標。

【指定代表圖】 圖1。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 包含阿茲夫定和化療試劑的抗腫瘤藥物組合物

【技術領域】

【0001】 本發明屬於藥物領域，具體地關於一種包含阿茲夫定的抗腫瘤藥物組合物。

【先前技術】

【0002】 去氧胞苷激酶（DCK）是一種具有廣泛的底物特異性的酶，它可以磷酸化嘧啶和嘌呤去氧核苷，是去氧核苷酸生物合成補救途徑中的關鍵酶，能夠維持正常DNA代謝並磷酸化多種抗病毒和抗癌的核苷類似物藥物，這些藥物只有在磷酸化後才能被活化，從而抑制腫瘤生長。在過去的幾十年裡，細胞凋亡被廣泛研究，針對細胞凋亡的放射治療策略成為腫瘤治療的重要手段之一。

【0003】 阿茲夫定（FNC）是一種廣譜RNA病毒抑制劑，作為一種人工合成的病毒RNA依賴的RNA聚合酶（RdRp）的核苷類似物，在細胞內代謝成具有抗病毒活性的5'-三磷酸鹽代謝物（阿茲夫定三磷酸鹽），其靶點是病毒的RdRp，可在宿主細胞中，藉由抑制RdRp的活性，阻斷RNA鏈的合成和複製。2021年7月，阿茲夫定片在我國獲批上市，用於治療高病毒載量的成年HIV-1感染患者。

【0004】 專利文獻CN201010506595.X公開了阿茲夫定用於治療腫瘤，例如結腸癌、肝癌、胃癌、食道癌、肺癌、乳腺癌、宮頸癌、白血病、淋巴瘤等。發現，阿茲夫定對多種人癌細胞及動物移植性腫瘤均具有明顯的抑制作用。

【0005】 傳統治療腫瘤方法中，化療由於其治療效果強，藥效高等特點成為目前使用最廣的腫瘤臨床治療方式。然後，目前臨床上所使用的化療藥大多選擇性差，對腫瘤組織進行治療的同時，也會對人體正常組織造成較大損傷，會導致嚴重的毒副作用。

【0006】 單一藥物治療存在理化性質差、生物利用度低、療效不佳等缺陷，若化療藥物可以聯合阿茲夫定，則可以提高腫瘤效果，基於兩藥在抗腫瘤作用

機制之間的互補協同，藉由雙靶向腫瘤細胞，實現化療-免疫協同增強抗腫瘤功效。

【發明內容】

【0007】 本發明提供一種阿茲夫定（FNC）與化療試劑的藥物組合物、以及該藥物組合物在製備預防或治療腫瘤疾病的藥物中的用途。

【0008】 本發明的藥物組合物相比於各單藥，具有以下優點：

- 1.聯用後提高了各單藥的抑制腫瘤作用；
- 2.延緩耐藥性產生，提高療效和安全性，從而達到延長患者生存期的目標。

【0009】 為了解決本發明的技術問題，本發明提供了一種藥物組合物，其包括：

（i）阿茲夫定（Azvudine）或其藥學上可接受的鹽，立體異構體或者同位素衍生物；

（ii）化療試劑。

【0010】 在本發明的較佳技術方案中，其中，所述的化療試劑選自卡培他濱、卡鉑、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、順鉑、克拉屈濱、氟法齊明、環磷醯胺、阿糖胞苷、達卡巴嗪、放線菌素D、柔紅黴素、紫杉醇、多西他賽、多柔比星、表柔比星、依託泊苷、氟達拉濱、氟尿嘧啶、吉西他濱、羥基脲、伊達比星、異環磷醯胺、伊立替康、亞葉酸、多柔比星脂質體、柔紅黴素脂質體、洛莫司汀、美法侖、巯嘌呤、美司鈉、甲氨蝶呤、絲裂黴素、米托蒽醌、奧沙利鉑、帕立他塞、培美曲塞、噴司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、沙鉑、鏈唑星、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、塞替派、硫鳥嘌呤、托泊替康、曲奧舒凡、長春鹼、長春新鹼、長春地辛、長春瑞濱或其組合的任意一種或其任意地組合。

【0011】 在本發明的較佳技術方案中，其中，所述的化療試劑選自卡培他濱、環磷醯胺、達卡巴嗪、紫杉醇或其任意地組合。

【0012】 除此之外，本發明還提供了另一種藥物組合物：其包括：

- (i) 阿茲夫定或其藥學上可接受的鹽，立體異構體或者同位素衍生物；
- (ii) 阿瓦斯汀 (Avastin)。

【0013】 在本發明的較佳技術方案中，其中所述的 (i) 和 (ii) 同時、分開、順序給藥或者所述的 (i) 和 (ii) 存在於同一劑型中。

【0014】 在本發明的較佳技術方案中，用於治療腫瘤有關的疾病。

【0015】 在本發明的較佳技術方案中，其中，所述的腫瘤有關的疾病選自乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑色素瘤、腦瘤、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、結腸直腸癌、肺癌、腎癌、皮膚癌、成膠質細胞瘤、神經母細胞瘤、肉瘤、脂肪肉瘤、骨軟骨瘤、骨瘤、骨肉瘤、精原細胞瘤、睪丸腫瘤、子宮癌、頭頸腫瘤、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤、真性紅細胞增多症、白血病、甲狀腺腫瘤、輸尿管腫瘤、膀胱腫瘤、膽囊癌、非小細胞肺癌、膽管癌或絨毛膜上皮癌。

【0016】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1-100mg，所述化療試劑的劑量選自1-500mg。

【0017】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1-100mg，所述貝伐單抗(Avastin)的劑量選自1-500mg。

【0018】 本發明中所述的阿茲夫定的劑量選自1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、18mg、19mg、20mg、21mg、22mg、23mg、24mg、25mg、26mg、27mg、28mg、29mg、30mg、31mg、32mg、33mg、34mg、35mg、36mg、37mg、38mg、39mg、40mg、41mg、42mg、43mg、44mg、45mg、46mg、47mg、48mg、49mg、50mg、51mg、52mg、53mg、54mg、55mg、56mg、57mg、58mg、59mg、60mg、61mg、62mg、63mg、64mg、65mg、66mg、67mg、68mg、69mg、70mg、71mg、72mg、73mg、74mg、75mg、76mg、77mg、78mg、79mg、80mg、81mg、82mg、83mg、84mg、85mg、86mg、87mg、88mg、89mg、90mg、91mg、92mg、93mg、94mg、95mg、96mg、97mg、98mg、99mg、100mg。

【0019】 本發明所述的化療試劑的劑量選自1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、18mg、19mg、20mg、21mg、22mg、23mg、24mg、25mg、26mg、27mg、28mg、29mg、30mg、31mg、32mg、33mg、34mg、35mg、36mg、37mg、38mg、39mg、40mg、41mg、42mg、43mg、44mg、45mg、46mg、47mg、48mg、49mg、50mg、51mg、52mg、53mg、54mg、55mg、56mg、57mg、58mg、59mg、60mg、61mg、62mg、63mg、64mg、65mg、66mg、67mg、68mg、69mg、70mg、71mg、72mg、73mg、74mg、75mg、76mg、77mg、78mg、79mg、80mg、81mg、82mg、83mg、84mg、85mg、86mg、87mg、88mg、89mg、90mg、91mg、92mg、93mg、94mg、95mg、96mg、97mg、98mg、99mg、100mg、110 mg、120 mg、130 mg、140 mg、150 mg、160mg、170mg、180mg、190mg、200mg、210 mg、220 mg、230 mg、240 mg、250 mg、260mg、270mg、280mg、290mg、300mg、310 mg、320 mg、330 mg、340 mg、350 mg、360mg、370mg、380mg、390mg、400mg、410 mg、420 mg、430 mg、440 mg、450 mg、460mg、470mg、480mg、490mg、500mg。

【0020】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1-100mg，給藥頻次可以是一日一次、一日二次或一日三次，所述化療試劑的劑量選自1-500mg，給藥頻次可以是一日一次、一日二次或一日三次。

【0021】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1-50mg，給藥頻次可以是一日一次或一日二次，所述化療試劑的劑量選自1-100mg，給藥頻次是一日一次。

【0022】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1-20mg，給藥頻次可以是一日一次或一日二次，所述化療試劑的劑量選自1-40mg，給藥頻次是一日一次。

【0023】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1-10mg，給藥頻次可

以是一日一次或一日二次，所述化療試劑的劑量選自1-10mg，給藥頻次是一日一次。

【0024】 在一些實施方案中，所述化療試劑的劑量選自1mg、2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、18mg、19mg、20mg、21mg、22mg、23mg、24mg、25mg、26mg、27mg、28mg、29mg、30mg、31mg、32mg、33mg、34mg、35mg、36mg、37mg、38mg、39mg、40mg、41mg、42mg、43mg、44mg、45mg、46mg、47mg、48mg、49mg、50mg，給藥頻次是一日一次或一日二次，所述化療試劑的劑量選自10mg、20mg、40mg、60mg，給藥頻次是一日一次。

【0025】 在一些實施方案中，所述阿茲夫定的劑量選自1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、18mg、19mg、20mg，給藥頻次是一日一次或一日二次，所述阿茲夫定的劑量選自1mg、2mg、4mg、6mg，給藥頻次是一日一次。

【0026】 在一些實施方案中，所述化療試劑的劑量選自1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg，給藥頻次是一日一次或一日二次，所述化療試劑的劑量選自10mg、20mg、40mg、60mg，給藥頻次是一日一次。

【0027】 在一些實施方案中，所述化療試劑的劑量選自1mg、2mg、4mg、6mg、8mg，給藥頻次是一日一次或一日二次，所述化療試劑的劑量選自1mg、2.5mg、5mg、10mg，給藥頻次是一日一次。

【0028】 本發明所述聯合的給藥途徑自經口給藥、胃腸外給藥、經皮給藥，所述胃腸外給藥包括但不限於靜脈注射、皮下注射、肌肉注射，較佳口服給藥。

【0029】 本發明還提供一種上述阿茲夫定與化療試劑以及一種或多種藥用載體、賦形劑、稀釋劑的藥物組合物。所述藥物組合物可以製成藥學上可接受的任一劑型。例如，可以配製為片劑、膠囊劑、丸劑、顆粒劑、溶液劑、混懸劑、糖漿劑、注射劑(包括注射液、注射用無菌粉末與注射用濃溶液)、栓劑、吸

入劑或噴霧劑；所述藥物組合物還可以製成同一劑型，例如可以將阿茲夫定和化療試劑配製為複合片劑、複合膠囊劑、複合丸劑、複合顆粒劑、複合溶液劑、複合混懸劑、複合糖漿劑、複合注射劑(包括注射液、注射用無菌粉末與注射用濃溶液)、複合栓劑、複合吸入劑或複合噴霧劑。

【0030】 本發明還提供了一種治療腫瘤疾病的方法，包括向患者施用有效量上述阿茲夫定與有效量的上述化療試劑。

【0031】 本發明還提供了一種用於治療腫瘤疾病的藥物中的用途的藥物試劑盒，其中包裝有本發明所述的阿茲夫定與化療試劑的藥物組合物。

【0032】 本發明將阿茲夫定與化療試劑聯合給藥，從而增強了治療腫瘤疾病的藥物中的效果。

【0033】 本發明中所述的“聯合”是一種給藥方式，是指在一定時間期限內給予至少一種劑量的阿茲夫定和至少一種劑量的化療試劑，其中兩種物質都顯示藥理學作用。所述的時間期限可以是一個給藥週期內，較佳4周內，3周內，2周內，1周內，或24小時以內，更佳12小時以內。可以同時或依次給予阿茲夫定和化療試劑。這種期限包括這樣的治療，其中藉由相同給藥途徑或不同給藥途徑給阿茲夫定和化療試劑。

【圖式簡單說明】

【0034】 圖1是表示阿茲夫定、卡培他濱單用或二者合用對人結腸癌COLO 205腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【0035】 圖2是表示阿茲夫定、卡培他濱單用或二者合用對人結直腸癌LoVo腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【0036】 圖3是表示阿茲夫定、環磷醯胺單用或二者合用對人Burkitt's淋巴瘤細胞Daudi腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【0037】 圖4是表示阿茲夫定、環磷醯胺單用或二者合用對人急性淋巴母細胞白血病細胞MOLT4腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【0038】圖5是表示阿茲夫定、紫杉醇單用或二者合用對人卵巢癌OVCAR-8腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【0039】圖6是表示阿茲夫定、Avastin單用或二者合用對人卵巢癌OVCAR-8腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【0040】圖7是表示阿茲夫定、達卡巴嗪單用或二者合用對人黑色素瘤A2058腫瘤模型中的皮下異種移植腫瘤體積的影響的圖。

【實施方式】

【0041】以下將結合實施例更詳細地解釋本發明，本發明的實施例僅用於說明本發明的技術方案，並非限定本發明的實質和範圍。

【0042】實驗材料

【0043】實驗動物及飼養環境

【0044】實驗動物

【0045】BALB/c Nude小鼠，雌性，7-8周（腫瘤細胞接種時的小鼠周齡），體重15.7-20.7g，68隻（48隻加20隻富餘小鼠）。購自北京維通利華實驗動物技術有限公司，飼養環境：SPF級。實驗動物均飼養於恆溫恆濕的獨立通風盒內，飼養室溫度20-26°C，濕度40-70%，10-20次/小時換氣，晝夜明暗交替時間12h/12h；持續供給鈷60放射滅菌鼠全價顆粒飼料，不限量自由攝取，飲用自來水（高壓蒸汽滅菌後使用），飲水瓶不間斷供水，自由攝取。飼養鼠盒是聚砜鼠盒，高壓滅菌後使用，規格為325 mm ×210 mm×180 mm。

【0046】實施例1 測試阿茲夫定（FNC）聯合卡培他濱（Capecitabine）在Colo 205人源結腸癌模型中的抗腫瘤作用研究結果和討論

【0047】細胞培養

【0048】Colo 205細胞培養在含10% 胎牛血清的RPMI1640培養液中。收集指數生長期的Colo 205細胞，PBS重懸至適合濃度並與Matrigel 1:1混合後用於小鼠皮下腫瘤接種，將雌性小鼠右側皮下接種 5×10^6 Colo 205細胞，接種當天定義

為第0天。待腫瘤平均體積110.26 mm³時，根據腫瘤大小隨機分組。

【0049】 相對腫瘤增殖率，T/C %，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。計算公式如下：

療效評價標準

$T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ （ T_{RTV} ：治療組平均RTV； C_{RTV} ：溶媒對照組平均RTV； $RTV = V_t / V_0$ ， V_0 為分組時該動物的瘤體積， V_t 為治療後該動物的瘤體積）；

或 $T/C \% = T_{TW} / C_{TW} \times 100\%$ （ T_{TW} ：治療組實驗終結時平均瘤重； C_{TW} ：溶媒對照組實驗終結時平均瘤重）。

相對腫瘤抑制率，TGI（%），計算公式如下： $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$.
（T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積（RTV）或瘤重（TW））。

【0050】 腫瘤接種後第25天（分組後第20天），Vehicle組小鼠平均腫瘤體積為1465.47 mm³，測試藥單藥組阿茲夫定，1 mg/kg治療組平均腫瘤體為985.14 mm³，相較對照組統計學上沒有顯著性差異（p=0.540），相對腫瘤抑制率TGI(%)為32.43%，Capecitabine，400 mg/kg治療組平均腫瘤體積分別為264.96mm³，相較對照組統計學上存在顯著性差異（p<0.001），相對腫瘤抑制率TGI(%)為81.93%，聯合組阿茲夫定，1 mg/kg聯合Capecitabine，400 mg/kg組平均腫瘤體積分別為144.76 mm³，相較對照組統計學上有顯著性差異（<0.001），相對腫瘤抑制率TGI(%)為90.14%。

【0051】 表1. 不同劑量的測試藥在COLO 205人結腸癌腫瘤模型中的抗腫瘤作用實驗設計

組別	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期
空白組	-	p.o.	QD×3 周
阿茲夫定	1	p.o.	QD×3 周
卡培他濱	400	p.o.	QD×3 周
阿茲夫定+卡培他濱	1+400	p.o.	QD×3 周

【0052】 表2. 在Colo 205人源結腸癌模型中各組藥效分析表

受試品	接種第 25 天內（分組後第 20 天） ^a			
	腫瘤體積	TGI(%)	T/C(%)	P ^b
Vehicle	1465.47 ±233.57(6)	--	--	--
阿茲夫定（1mpk）	985.14 ±108.58(6)	32.43	67.57	0.540
卡培他濱(400mpk)	264.96±38.65(6)	81.93	18.07	<0.001
阿茲夫定+卡培他濱 （1+400mpk）	143.76±23.45(6)	90.14	9.86	<0.001

【0053】 腫瘤重量抑制結果

【0054】 表3. 在Colo 205人源結腸癌模型中各組瘤重分析表

受試藥物	瘤重（mg）	TGI	T/C(%)	P (相較於 對照組)
Vehicle	1373.15±200.04(6)	--	--	--
阿茲夫定（1mpk）	986.10±107.78(6)	71.81	28.19	0.926
卡培他濱(400mpk)	193.35±28.54(6)	14.08	85.92	<0.001
阿茲夫定+卡培他濱 （1+400mpk）	98.80±20.27(6)	7.2	92.8	<0.001

【0055】 實施例2 阿茲夫定聯合卡培他濱在人源結腸癌LoVo細胞的藥效學研究

【0056】 細胞培養

【0057】 人結腸癌細胞LoVo（貨號：ECACC-87060101）體外單層培養，培養條件為F12K培養基中加10%胎牛血清，100 U/mL青黴素和100 µg/mL鏈黴素，37°C 5% CO₂孵箱培養。一周兩次用胰酶-EDTA進行常規消化處理傳代。當細胞

飽和度為80%-90%，數量到達要求時，收取細胞，計數，接種。

【0058】 將 0.1 mL（10×10⁶）LoVo細胞皮下接種於每隻小鼠的右後背，腫瘤平均體積達到約147mm³時開始分組給藥。

【0059】 表4. 不同劑量的測試藥在COLO 205人結腸癌腫瘤模型中的抗腫瘤作用實驗設計

組別	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期
空白組	-	p.o.	QD×3 周
阿茲夫定	1	p.o.	QD×3 周
卡培他濱	400	p.o.	QD×3 周
阿茲夫定+卡培他濱	1+400	p.o.	QD×3 周

【0060】 實驗結果

【0061】 給予Lovo細胞皮下異種移植腫瘤BALB/c nude小鼠受試藥治療後各組腫瘤體積變化（給藥後21天）如表5所示，腫瘤重量變化如表6所示。

【0062】 表5 受試藥物對LoVo異種移植瘤模型的抑瘤藥效評價（基於給藥後第21天腫瘤體積計算得出）

受試品	給藥第 21 天後			
	腫瘤體積(mm ³)	T/C(%)	TGI(%)	P(%)
Vehicle	1481 ±311	--	--	--
阿茲夫定（1mpk）	902 ±163	62.00	43.40	0.635
卡培他濱(400mpk)	919±190	60.94	42.11	0.696
阿茲夫定+卡培他濱 （1+400mpk）	676±115	48.18	60.29	0.282

【0063】 表6 受試藥物對LoVo異種移植瘤模型的抑瘤藥效評價（基於給藥後

第21天腫瘤重量計算得出)

受試品	給藥第 21 天後		
	腫瘤重量(g)	T/C(%)	P(%)
Vehicle	1.411 ±0.304	--	--
阿茲夫定 (1mpk)	0.937 ±0.142	66.37	0.827
卡培他濱(400mpk)	0.893±0.173	63.27	0.799
阿茲夫定+卡培他濱 (1+400mpk)	0.643±0.091	45.56	0.368

【0064】 在本實驗中，評價了受試物在LoVo異種移植瘤模型中的體內藥效。各組在給藥21天後的腫瘤體積、腫瘤重量分別如表5，表6及2所示。開始給藥後21天，空白對照組荷瘤鼠的瘤體積達到1481mm³，受試物阿茲夫定(1mg/kg)與空白對照組相比有較小的抑瘤作用，腫瘤體積為902mm³，T/C為62.00%，TGI為43.40%，p值為0.086。受試物Capecitabine (400mg/kg)與空白對照組相比有較小的抑瘤作用，腫瘤體積為919mm³，T/C為60.94%，TGI為42.11%，p值為0.696。

【0065】 受試物聯合組阿茲夫定+ Capecitabine (1+400mg/kg)與空白對照組相比有明顯的抑瘤作用，腫瘤體積為676 mm³；T/C為48.18%；TGI為60.29%；p值0.282。阿茲夫定+ Capecitabine聯合用藥可以提高單藥Capecitabine在該LoVo結直腸腫瘤中的抑瘤作用，TGI由42.1%提高到60.3%。

【0066】 實施例3 阿茲夫定聯合環磷醯胺對人Burkitt's淋巴瘤細胞Daudi皮下異種移植腫瘤模型的體內藥效學

【0067】 人Burkitt's淋巴瘤細胞Daudi（貨號：DSMZ-ACC129）體外懸浮培養，培養條件為RPMI 1640培養基中加10%胎牛血清，2mM的穀氨醯胺，100 U/mL青黴素和100 µg/mL鏈黴素，37°C 5%CO₂孵箱培養。當細胞飽和度為80%-90%，數量到達要求時，收取細胞，計數，接種。

【0068】 腫瘤細胞接種

【0069】 將 0.2 mL (10×10⁶) Daudi細胞（加基質膠，體積比為1:1）皮下接種於每隻小鼠的右後背，腫瘤平均體積達到約100mm³時開始分組給藥。

組別	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期
空白組	-	p.o.	QD×4 周
阿茲夫定	1	p.o.	QD×4 周
環磷醯胺	50	i.p.	QD×4 周
阿茲夫定+環磷醯胺	1+50	p.o.+i.p.	QD×4 周

【0070】 實驗結果

【0071】 給予Daudi細胞皮下異種移植腫瘤CB 17 SCID小鼠受試藥治療後各組腫瘤體積、腫瘤重量變化如表8、表9所示。

【0072】 表8 給藥27天後腫瘤體積

Treatment	腫瘤體積 (mm ³)	T/C	TGI	p value (%)
	第 27 天	(%)	(%)	
Vehicle	2,895±403	--	--	--
阿茲夫定(1mg/kg)	909±120	30.64	71.09	< 0.0001
環磷醯胺 (50mg/kg)	263±54	8.83	94.17	< 0.0001
阿茲夫定+環磷醯胺 (1+50mg/kg)	13±3	0.42	103.15	< 0.0001

【0073】 表9 給藥27天後腫瘤重量

組別	腫瘤重量 (g)	T/C _{weight}	p 值 ^c
	(第 27 天)	(%)	
Vehicle	2.984±0.439	--	--
阿茲夫定 (1mg/kg)	0.996±0.143	33.38	< 0.0001
環磷醯胺 (50mg/kg)	0.343±0.066	11.49	< 0.0001

阿茲夫定+環磷醯胺 (1+50mg/kg)	0.019±0.004	0.62	< 0.0001
-----------------------	-------------	------	----------

【0074】 在本實驗中，我們評價了受試物在Daudi異種移植瘤模型中的體內藥效。各組在不同時間點的瘤體積如表8，表9所示。開始給藥後27天，空白對照組荷瘤鼠的瘤體積達到2,895mm³，受試物阿茲夫定(1mg/kg)與空白對照組相比有明顯的抑瘤作用，腫瘤體積分別為909mm³；T/C為30.64%；TGI為71.09%；p值為< 0.0001。受試物環磷醯胺 (50mg/kg)與空白對照組相比有明顯的抑瘤作用，腫瘤體積分別為263mm³；T/C為8.83%；TGI為94.17%；p值為<0.0001。受試物聯合組阿茲夫定+環磷醯胺(1+50mg/kg)與空白對照組相比有明顯的抑瘤作用，腫瘤體積為13mm³；T/C為0.42%；TGI為103.15%；p值為< 0.0001。

【0075】 在該實驗中，受試物阿茲夫定(1mg/kg)聯合環磷醯胺可以提高單藥CTX在該人 Burkitt's 淋巴瘤細胞 Daudi 中的抑瘤作用，TGI 由 94.17% 提高到 103.15%。

【0076】 實施例4 阿茲夫定聯合環磷醯胺對人急性淋巴母細胞白血病細胞 MOLT4細胞皮下異種移植腫瘤模型的體內藥效學研究

【0077】 細胞培養

【0078】 人急性淋巴母細胞白血病細胞MOLT4（貨號：ECACC-85011413）體外懸浮培養，培養條件為RPMI1640培養基中加10%胎牛血清， 100 U/mL 青黴素和100 µg/mL鏈黴素，37°C 5%CO₂孵箱培養。當細胞飽和度為80%-90%，數量到達要求時，收取細胞，計數，接種。

【0079】 腫瘤細胞接種

【0080】 將 0.2 mL（10×10⁶個）MOLT4細胞（加基質膠，體積比為1:1）皮下接種於每隻小鼠的右後背，腫瘤平均體積達到約148 mm³時開始分組給藥。

組別	劑量(mg/kg)	給藥方式	給藥週期
空白組	-	p.o.	QD×4 周

阿茲夫定	1	p.o.	QD×4 周
環磷醯胺	50	i.p.	QD×4 周
阿茲夫定+環磷醯胺	1+50	p.o.+i.p.	QD×4 周

【0081】 給予MOLT4細胞皮下異種移植腫瘤SCID Beige小鼠受試藥治療後各組腫瘤體積和重量變化如表10、表11所示。

【0082】 表10 給藥28天後腫瘤體積

Treatment	腫瘤體積 (mm ³)	T/C	TGI	p value (%)
	第 28 天	(%)	(%)	
Vehicle	2,896±247	--	--	--
阿茲夫定(2mg/kg)	986±179	33.55	69.49	<0.0001
環磷醯胺(50mg/kg)	716±76	24.53	79.34	<0.0001
阿茲夫定+環磷醯胺 (1+50mg/kg)	253±36	8.75	96.14	<0.0001

【0083】 表11 給藥28天後腫瘤重量

組別	腫瘤重量 (g)	T/C _{weight}	p 值
	(第 28 天)	(%)	
Vehicle	2.971±0.228	--	--
阿茲夫定 (1mg/kg)	1.168±0.145	39.31	< 0.0001
環磷醯胺(50mg/kg)	0.822±0.065	27.65	< 0.0001
阿茲夫定+環磷醯胺 (1+50mg/kg)	0.344±0.050	11.56	< 0.0001

【0084】 在本實驗中，我們評價了受試物在MOLT4異種移植瘤模型中的體內藥效。各組在不同時間點的瘤體積如表10，表11所示。開始給藥後28天，空白對照組荷瘤鼠的瘤體積達到2,896mm³，受試物阿茲夫定(1mg/kg)與空白對照組相比有抑瘤作用，腫瘤體積為979mm³，T/C為33.89，TGI為69.73%，p值<0.0001。環磷醯胺CTX(50mg/kg)與空白對照組相比有顯著抑瘤作用，腫瘤體積為

716mm³，T/C為24.53%，TGI為79.34%，p值為<0.0001。受試物聯合組阿茲夫定+環磷醯胺 (1+50mg/kg)與空白對照組相比有顯著的抑瘤作用，腫瘤體積為253mm³，T/C為8.75%，TGI為96.14%，p值為<0.001。受試物聯合組腫瘤重量的分析及統計結果與瘤體積資料基本一致。

【0085】 在本實驗中，受試物阿茲夫定 (1mg/kg)，環磷醯胺(50mg/kg)和阿茲夫定+環磷醯胺(1+50mg/kg)在受試劑量下對MOLT4異種移植瘤生長有明顯抑制作用，在該實驗中，受試物阿茲夫定 (1mg/kg) 聯合環磷醯胺可以提高單藥環磷醯胺在MOLT4人急性淋巴母細胞白血病腫瘤中的抑瘤作用，TGI由79.34%提高到96.14%。

【0086】 實施例5 阿茲夫定聯合紫杉醇在人卵巢癌OVCAR-8腫瘤模型中的療效評價

【0087】 OVCAR-8細胞培養在含10% 胎牛血清的RPMI1640培養液中。收集指數生長期的OVCAR-8細胞，PBS重懸至適合濃度並與 Matrigel 1:1混合後用於小鼠皮下腫瘤接種。

【0088】 雌性小鼠右側皮下接種 1×10^7 OVCAR-8細胞。待腫瘤平均體積174.25 mm³時，根據腫瘤大小隨機分組。

【0089】 本實驗過程中動物實驗的實驗方案均通過CrownBio IACUC委員會審核並批准通過。實驗過程中，動物實驗操作均根據AAALAC的要求。腫瘤接種後，常規監測包括了腫瘤生長及治療對動物正常行為的影響，具體內容有實驗動物的活動性，攝食和飲水情況，體重增加或降低（體重每週測量2次）情況，眼睛、被毛及其它異常情況。實驗過程中觀察到的臨床症狀均記錄在原始資料中。腫瘤體積計算公式：腫瘤體積（mm³）= $1/2 \times (a \times b^2)$ （其中a表示長徑，b表示短徑）。

【0090】 相對腫瘤增殖率，T/C %，即在某一時間點，治療組和對照組相對腫瘤體積或瘤重的百分比值。計算公式如下：

$T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ (T_{RTV} ：治療組平均 RTV； C_{RTV} ：溶媒對照組平均 RTV； $RTV = V_t / V_0$ ， V_0 為分組時該動物的瘤體積， V_t 為治療後該動物的瘤體積)；

或 $T/C \% = T_{TW} / C_{TW} \times 100\%$ (T_{TW} ：治療組實驗終結時平均瘤重； C_{TW} ：溶媒對照組實驗終結時平均瘤重)。

相對腫瘤抑制率，TGI (%)，計算公式如下： $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。
(T 和 C 分別為治療組和對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積 (RTV) 或瘤重 (TW))。

【0091】為比較不同處理組某天的腫瘤體積，首先我們使用Bartlett檢驗來驗證所有組間的方差齊性假設。當Bartlett檢驗的p值不小於0.05時，單因素方差分析將被用於檢驗所有組均值是否相等。若單因素方差分析的p值小於0.05，我們將用Tukey HSD檢驗進行所有組之間兩兩比較，或用Dunnett's t檢驗進行每個治療組和對照組之間的兩兩比較。當Bartlett檢驗的p值小於0.05時，Kruskal Wallis檢驗將被用於檢驗所有組的中位數是否相等。若Kruskal Wallis檢驗的p值小於0.05，我們將用Conover檢驗進行所有組之間兩兩比較或每個治療組和對照組之間的兩兩比較，並根據多重檢驗的組數進行相應的p值校正。

【0092】此外，基於探索性資料分析的目的，我們進行了任意時間點所有組之間的兩兩比較。因為這種比較只使用了特定時間點待比較兩組的腫瘤體積資料，所以不需要進行多重檢驗校正。首先我們使用Bartlett檢驗來驗證兩組之間的方差齊性假設，當Bartlett檢驗的p值 不小於0.05時，我們用Welch's t檢驗來比較兩組均值是否相等；當Bartlett檢驗的p值 小於0.05時，我們用Mann Whitney U檢驗來比較兩組中位數是否相等。

【0093】所有的統計分析和圖形繪製都在R語言環境中進行 (3.3.1版)。非特別說明的情況下，所有檢驗均為雙尾檢驗，p值小於0.05時被認為具有統計顯著性。

【0094】 實驗結果

【0095】 給藥後第34天，溶媒對照組腫瘤體積為558.68 mm³，測試藥阿茲夫定 1 mg/kg治療組，陽性藥Paclitaxel 15 mg/kg治療組、陽性藥Avastin 10mg/kg治療組的平均腫瘤體積分別為460.67mm³，403.40 mm³，456.04 mm³，相較對照組統計學上沒有顯著性差異（p=0.952，0.769和0.957），相對腫瘤抑制率TGI(%)分別為18.09%，26.49%和17.70%，測試藥阿茲夫定 1 mg/kg聯合Paclitaxel 15 mg/kg治療組平均腫瘤體積為157.34 mm³，相較對照組統計學上有顯著性差異（p=0.00707），相對腫瘤抑制率TGI(%)為71.57%。測試藥阿茲夫定與Paclitaxel聯合給藥後，顯著提高了Paclitaxel單藥的抗腫瘤作用（TGI為26.5%）。測試藥阿茲夫定1 mg/kg聯合Avastin 10mg/kg治療組平均腫瘤體積為294.36 mm³，相較對照組統計學上有顯著性差異（0.140），相對腫瘤抑制率TGI(%)為48.61%。測試藥阿茲夫定與Avastin聯合給藥後，顯著提高了Avastin單藥的抗腫瘤作用（TGI為17.70%）各治療組和對照組腫瘤生長情況見表12。

【0096】 表12. 在阿茲夫定聯合紫杉醇或Avastin在OVCAR-8人源卵巢癌模型中各組藥效分析表

實驗組	分組第 34 天			
	腫瘤體積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P Value (相較於對照組)
第 1 組 Vehicle	558.68 ± 136.75(6)	--	--	--
第 2 組 阿茲夫定 1 mg/kg	460.67 ± 105.37(6)	18.09	81.91	0.952
第 3 組 Paclitaxel 15 mg/kg	403.40 ± 69.43(6)	26.49	73.51	0.769

第 4 組 阿茲夫定+ Paclitaxel 1+15mg/kg	157.34 ± 33.68(6)	71.57	28.43	0.00707
第 5 組 Avastin 10mg/kg	456.04 ± 110.65(6)	17.70	82.30	0.957
第 6 組 阿茲夫定+ Avastin 1+10mg/kg	294.36 ± 90.69(6)	48.61	51.39	0.140

【0097】 實施例6 阿茲夫定聯合達卡巴嗪對人黑色素瘤A2058細胞皮下異種移植腫瘤模型的體內藥效學研究

【0098】 人黑色素瘤細胞A2058（貨號：CRL-11147）體外單層培養，培養條件為DMEM培養基中加10%胎牛血清， 100 U/mL 青黴素和100 µg/mL鏈黴素，37°C CO₂孵箱培養。一周兩次用胰酶-EDTA進行常規消化處理傳代。當細胞飽和度為80%-90%，數量到達要求時，收取細胞，計數，接種。

【0099】 腫瘤細胞接種

【0100】 將 0.2 mL（5×10⁶）A2058加Matrigel細胞皮下接種於每隻小鼠的右後背，腫瘤平均體積達到約136 mm³時開始分組給藥。

【0101】 實驗結果分析

【0102】 表13. 阿茲夫定聯合達卡巴嗪對A2058異種移植瘤模型的抑瘤藥效評價（基於給藥後第14天腫瘤體積計算得出）

Treatment	腫瘤體積 (mm ³) ^a	T/C	TGI ^b	p value (%)
	第 14 天	(%)	(%)	
Vehicle	2,724±259	--	--	--
阿茲夫定 (1mg/kg)	2.253±335	79.67	18.22	0.518

Dacarbazine (60mg/kg)	1,255±186	44.77	56.74	0.002
阿茲夫定+Dacarbazine (1+60mg/kg)	910±247	31.52	70.07	< 0.001

【0103】 在本實施例中，我們評價了受試物在A2058異種移植瘤模型中的體內藥效。各組在不同時間點的瘤體積如表13所示。開始給藥後14天，空白對照組荷瘤鼠的瘤體積達到2724mm³，受試物阿茲夫定 (1mg/kg)與空白對照組相比有較小的抑瘤作用，腫瘤體積為2253mm³，T/C為79.67%，TGI為18.22%，p值為0.518。Dacarbazine (60mg/kg)與空白對照組相比有抑瘤作用，腫瘤體積為1255mm³，T/C為44.77%，TGI為56.74%，p值為0.002。受試物聯合組阿茲夫定+Dacarbazine (1+60mg/kg)與空白對照組相比有明顯的抑瘤作用，腫瘤體積為910mm³，T/C為31.52%，TGI為70.07%，p值為<0.001。

【0104】 雖然以上描述了本發明的具體實施方式，但是本領域的技術人員應當理解，這些僅是舉例說明，在不背離本發明的原理和實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改。因此，本發明的保護範圍由所附申請專利範圍限定。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種藥物組合物，其包括：

- (i) 阿茲夫定或其藥學上可接受的鹽，立體異構體或者同位素衍生物；及
- (ii) 化療試劑。

【請求項2】 如請求項1所述之藥物組合物，其中，所述化療試劑選自卡培他濱、卡鉑、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、順鉑、克拉屈濱、氟法齊明、環磷醯胺、阿糖胞苷、達卡巴嗪、放線菌素D、柔紅黴素、紫杉醇、多西他賽、多柔比星、表柔比星、依託泊苷、氟達拉濱、氟尿嘧啶、吉西他濱、羥基脲、伊達比星、異環磷醯胺、伊立替康、亞葉酸、多柔比星脂質體、柔紅黴素脂質體、洛莫司汀、美法侖、巯嘌呤、美司鈉、甲氨蝶呤、絲裂黴素、米托蒽醌、奧沙利鉑、帕立他塞、培美曲塞、噴司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、沙鉑、鏈唑星、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、塞替派、硫鳥嘌呤、托泊替康、曲奧舒凡、長春鹼、長春新鹼、長春地辛、長春瑞濱或其組合的任意一種或其任意地組合。

【請求項3】 如請求項1或2所述之藥物組合物，其中，所述化療試劑選自卡培他濱、環磷醯胺、達卡巴嗪、紫杉醇或其任意地組合。

【請求項4】 一種藥物組合物，其包括：

- (i) 阿茲夫定或其藥學上可接受的鹽，立體異構體或者同位素衍生物；及
- (ii) 阿瓦斯汀（Avastin）。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項所述之藥物組合物，其中，所述的(i)和(ii)同時、分開、順序給藥或者所述的(i)和(ii)存在於同一劑型中。

【請求項6】 如請求項1至5中任一項所述之藥物組合物，其係用於治療腫瘤有關的疾病。

【請求項7】 如請求項6所述之藥物組合物，其中，所述腫瘤有關的疾病選自乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑色素瘤、腦瘤、食道癌、胃癌、肝癌、胰

腺癌、結腸直腸癌、肺癌、腎癌、皮膚癌、成膠質細胞瘤、神經母細胞瘤、肉瘤、脂肪肉瘤、骨軟骨瘤、骨瘤、骨肉瘤、精原細胞瘤、睪丸腫瘤、子宮癌、頭頸腫瘤、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤、真性紅細胞增多症、白血病、甲狀腺腫瘤、輸尿管腫瘤、膀胱腫瘤、膽囊癌、非小細胞肺癌、膽管癌或絨毛膜上皮癌。

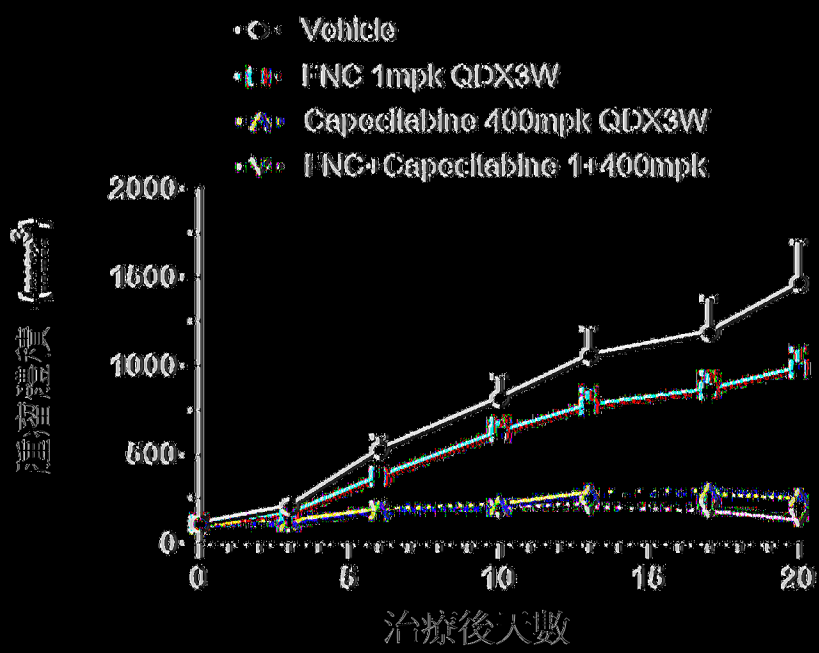


圖1

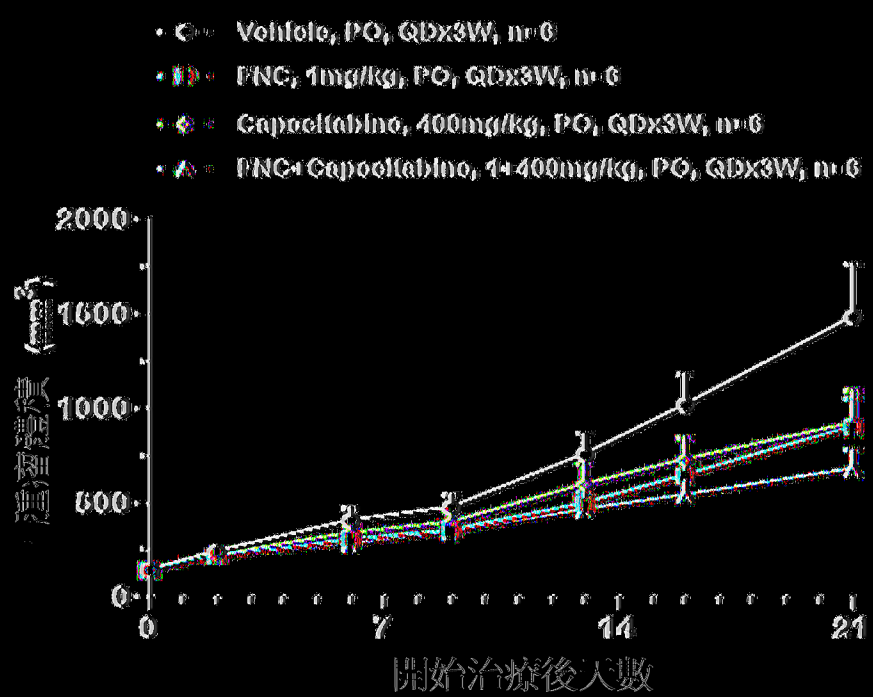


圖2

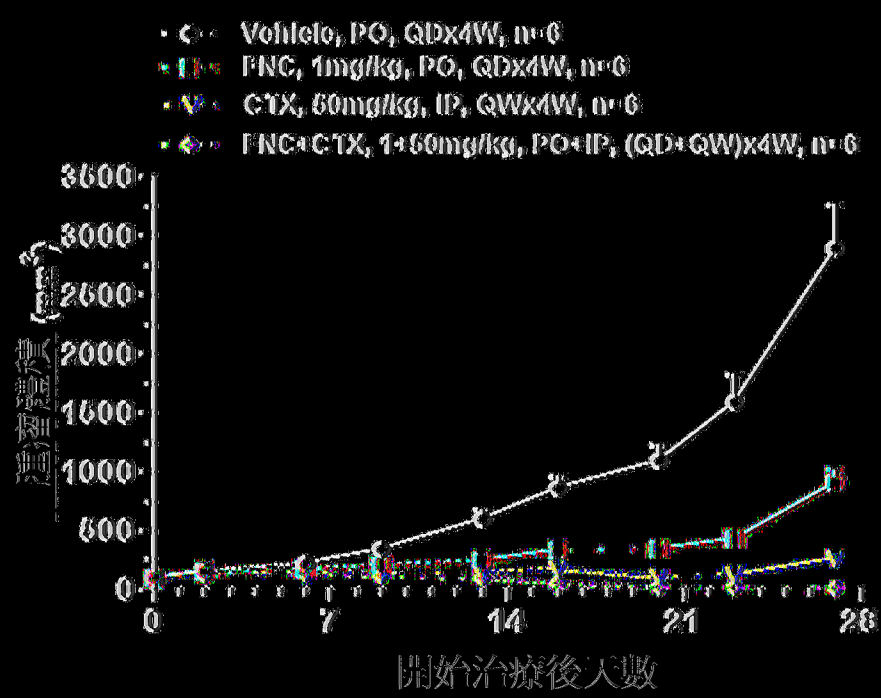


圖3

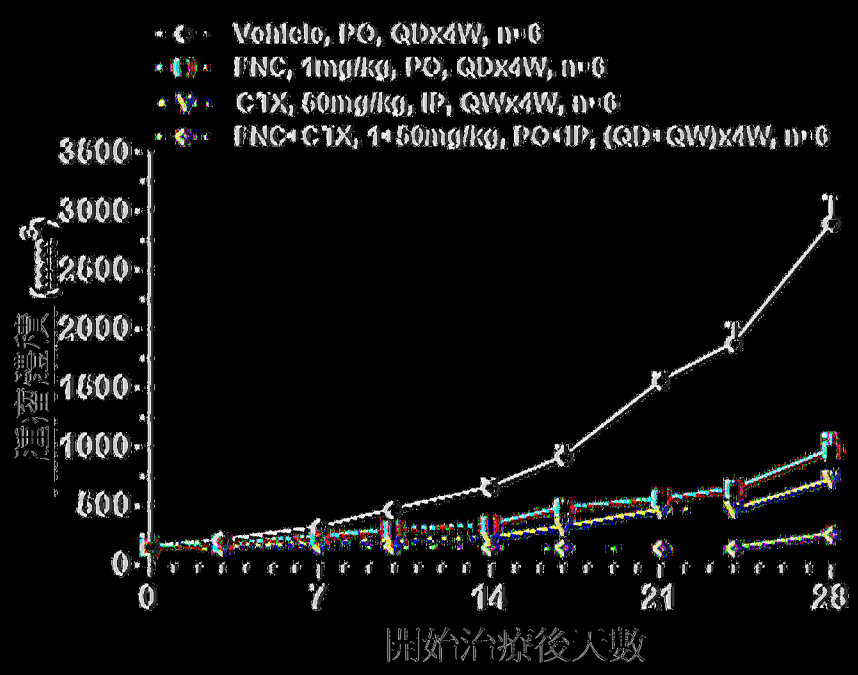


圖4

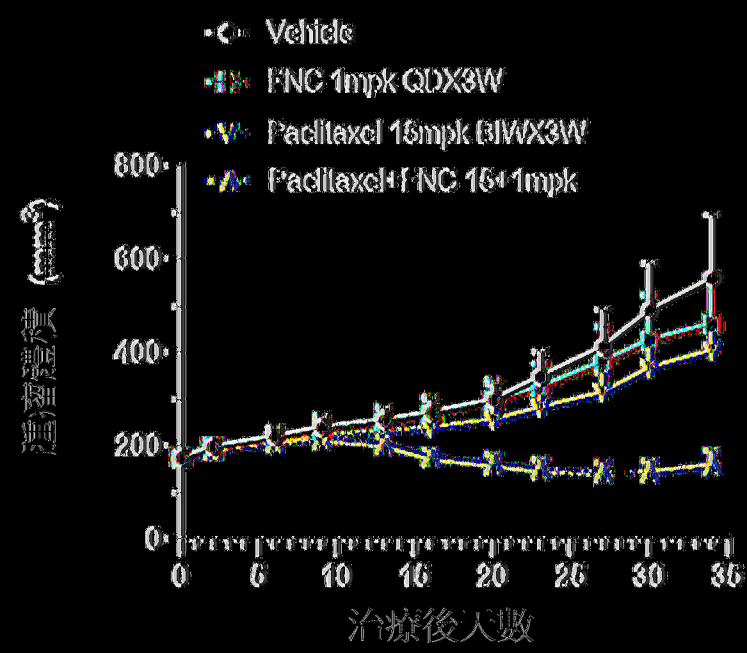


圖5

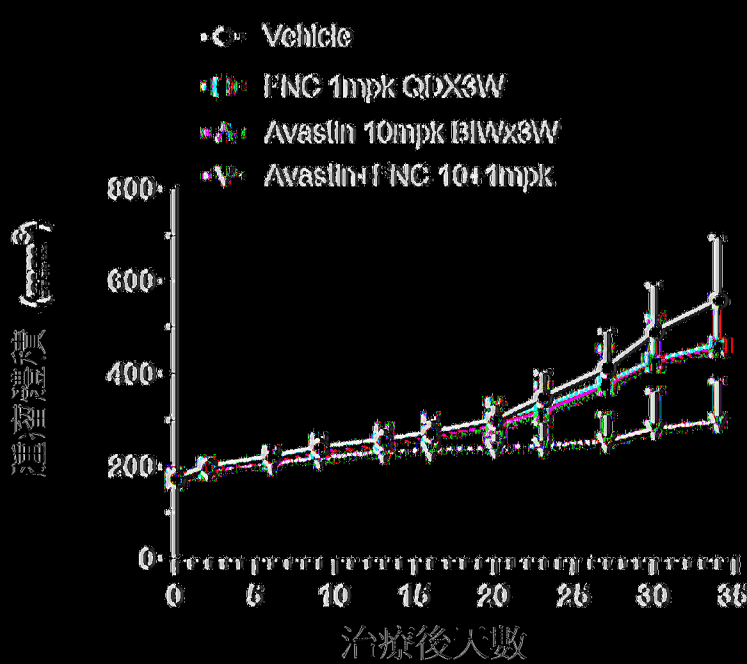


圖6

