

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480005179.4

[43] 公开日 2006 年 3 月 29 日

[11] 公开号 CN 1753684A

[22] 申请日 2004.3.12

[21] 申请号 200480005179.4

[30] 优先权

[32] 2003.3.12 [33] US [31] 60/454,125

[86] 国际申请 PCT/US2004/007606 2004.3.12

[87] 国际公布 WO2004/080421 英 2004.9.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.25

[71] 申请人 法马马有限公司

地址 西班牙特里斯康托斯

[72] 发明人 D·巴内杰 J·R·伯蒂诺

G·T·费尔克洛思 S·古拉

J·吉梅诺

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘维升 李连涛

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 15 页

[54] 发明名称

改善的抗肿瘤治疗

[57] 摘要

本发明提供了阿普立定或阿普立定类似物，特别是在联合治疗中，用于治疗癌的应用，特别是在治疗白血病和淋巴瘤的应用。

1. 阿普立定或阿普立定类似物在制备用于通过使用阿普立定或阿普立定类似物与其它药物的联合治疗来治疗原发性癌和/或转移性癌的药物中的应用。

5 2. 权利要求1的阿普立定或阿普立定类似物的应用，其中待治疗的癌是白血病或淋巴瘤。

3. 前述权利要求中任一项的阿普立定或阿普立定类似物的应用，其中阿普立定或阿普立定类似物和其它药物形成同一药物的一部分。

10 4. 权利要求1到3中任一项的阿普立定或阿普立定类似物的应用，其中阿普立定或阿普立定类似物和其它药物作为单独的药物提供，用于相同时间或不同时间给药。

5. 前述权利要求中任一项的阿普立定或阿普立定类似物的应用，其中其它药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、
15 甲泼尼龙和阿霉素。

6. 前述权利要求中任一项的阿普立定或阿普立定类似物的应用，其中阿普立定或阿普立定类似物是阿普立定。

7. 治疗原发性癌和/或转移性癌的方法，包括对需要这种治疗的患者给予治疗有效量的阿普立定或阿普立定类似物和治疗有效量的
20 其它有效治疗癌的药物，其它药物在阿普立定或阿普立定类似物给药之前、过程中或之后给药。

8. 权利要求6的治疗原发性癌和/或转移性癌的方法，其中待治疗的癌是白血病或淋巴瘤。

9. 权利要求7或8的治疗原发性癌和/或转移性癌的方法，其中其它
25 药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。

10. 增加有效治疗癌的药物治疗效力的方法，该方法包括对需要的患者给予一定量的阿普立定或阿普立定类似物，阿普立定或阿普立定类似物在其它药物给药之前、过程中、或之后给药。

30 11. 权利要求10的增加有效治疗癌的药物治疗效力的方法，其中待治疗的癌是白血病或淋巴瘤。

12. 权利要求10或11的增加有效治疗癌的药物治疗效力的方

法，其中药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。

13. 药物组合物，包括阿普立定或阿普立定类似物和其它有效治疗癌的药物。

5 14. 权利要求13的药物组合物，其中其它药物有效治疗白血病和/或淋巴瘤。

15. 权利要求13或14任一项的药物组合物，其中其它药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。

10 16. 用于治疗或预防癌的药包，其包括阿普立定或阿普立定类似物的剂型、其它有效治疗癌的药物剂型、和供治疗或预防癌的联合中供各行为者使用的用法说明。

17. 权利要求16的药包，其中药包用在治疗或预防白血病和/或淋巴瘤中。

15 18. 权利要求16或17的药包，其中其它药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。

19. 阿普立定或阿普立定类似物在制备用于治疗慢性淋巴细胞白血病的药物中的应用。

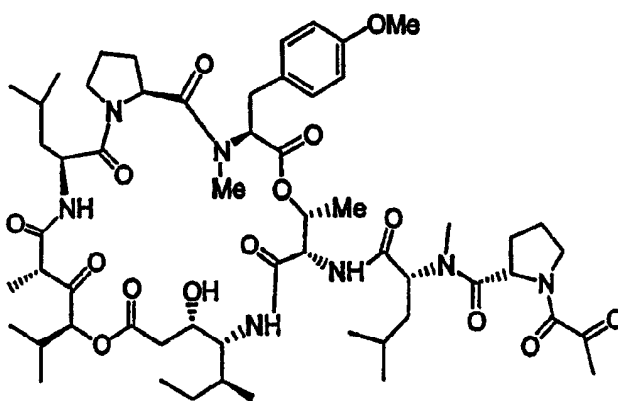
改善的抗肿瘤治疗

技术领域

- 5 本发明涉及阿普立定(aplidine)或阿普立定类似物与其它抗肿瘤药物的联合,这些联合在治疗癌、特别是在治疗白血病和淋巴瘤中的应用。

背景技术

- 10 阿普立定(脱氢膜海鞘素B)是环状缩肽酚(depsipeptide),从地中海海洋被囊类Aplidium albicans中分离出来的,其是W0 9109485的主题。定涉及已知为膜海鞘素的化合物,并具有以下结构:



15

关于阿普立定、阿普立定类似物、其应用、制剂和合成的更多信息可在专利申请W0 98 1352、W0 99 42125、W0 01 76616、W0 01 35974、W0 02 30441和W0 02 02596中找到。我们将这些PCT文本并入本文作为参考文献。

- 20 在动物和人的临床前研究和I期临床研究中都显示了该物质具有对抗包括白血病和淋巴瘤的广谱肿瘤类型的潜在细胞毒作用。例如参见:

Faircloth, G. 等: "Dehydrodidemnin B (DDB) a new marine derived anticancer agent with activity against experimental

tumour models", 第九届 NCI-EORTC 癌症治疗新药研讨会 (Symp New Drugs Cancer Ther) (三月 12-15, Amsterdam) 1996, 摘要第 111 页;

5 Faircloth, G. 等: "Preclinical characterization of Aplidine, a new marine anticancer depsipeptide", Proc Amer Assoc Cancer Res 1997, 38: Abst 692;

Depenbrock H, Peter R, Faircloth GT, Manzanares I, Jimeno J, Hanauske AR.: "In vitro activity of Aplidine, a new marine-derived anti-cancer compound, on freshly explanted
10 clonogenic human tumour cells and haematopoietic precursor cells" Br. J. Cancer, 1998; 78: 739-744;

Faircloth G, Grant W, Nam S, Jimeno J, Manzanares I, Rinehart K. : "Schedule-dependency of Aplidine, a marine depsipeptide with antitumor activity"', Proc. Am. Assoc.
15 Cancer Res. 1999; 40: 394;

Broggini M, Marchini S, D, Incalci M, Taraboletti G, Giavazzi R, Faircloth G, Jimeno J. : "Aplidine blocks VEGF secretion and VEGF/VEGF-R1 autocrine loop in a human leukemic cell line", Clin Cancer Res 2000 ; 6 (suppl) : 4509 ;

20 Erba E, Bassano L, Di Liberti G, Muradore I, Chiorino G, Ubezio P, Vignati S, Codegoni A, Desiderio MA, Faircloth G, Jimeno J 和 D, Incalci M.: "Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumour cells induced by Aplidine", Br J Cancer 2002 ; 86 : 1510-1517;

25 Paz-Ares L, Anthony A, Pronk La Twelves C, Alonso S, Cortes-Funes H, Celli N, Gomez C, Lopez-Lazaro L, Guzman C, Jimeno J, Kaye S.: "Phase I clinical and pharmacokinetic study of Aplidine, a new marine didemnin, administered as 24-hour infusion weekly" Clin. Cancer Res. 2000; 6 (suppl) : 4509;

30 Raymond E, Ady-Vago N, Baudin E, Ribrag V, Faivre S, Lecot F, Wright T, Lopez Lazaro L, Guzman C, Jimeno J, Ducreux M, Le Chevalier T, Armand JP.: "A phase I and pharmacokinetic

study of Aplidine given as a 24-hour continuous infusion every other week in patients with solid tumor and lymphoma", Clin. Cancer Res. 2000; 6 (suppl) : 4510;

Maroun J, Belanger K, Seymour L, Soulieres D, Charpentier D, Goel R, Stewart D, Tomiak E, Jimeno J, Matthews S. : "Phase I study of Aplidine in a 5 day bolus q 3 weeks in patients with solid tumors and lymphomas", Clin. Cancer Res. 2000; 6 (suppl) : 4509;

Izquierdo MA, Bowman A, Martinez M, Cicchella B, Jimeno J, Guzman C, Germa J, Smyth J. : "Phase I trial of Aplidine given as a 1 hour intravenous weekly infusion in patients with advanced solid tumors and lymphoma", Clin. Cancer Res. 2000; 6 (suppl) : 4509.

机理研究表明阿普立定可阻滞ALL-MOLT4细胞中的VEGF分泌，并且在得自儿科患者的AML和ALL样品中观察到其在低浓度（5nM）下具有体外细胞毒活性，所述儿科患者患有新生的或复发的ALL和AML。阿普立定似乎在用药治疗的白血病细胞中体外诱导G1和G2停止。除了下调VEGF受体之外，几乎不知道阿普立定的作用方式。

在阿普立定的I期临床研究中，给予L-肉毒碱作为24小时预处理或共同施用以防止骨髓中毒性，参见例如WO 02 30441。共同施用L-肉毒碱被证实能改善药物诱导的肌肉毒性的恢复并使阿普立定的剂量逐步增加。

因此在I期临床研究中，阿普立定在最大耐受剂量下不引起骨髓中毒性，除了发生轻微的淋巴细胞减少之外。这些特征使得阿普立定成为可能有用的白血病治疗药物。向目前的白血病化疗中加入阿普立定可改善药物效力而没有必要减少具有经证实的抗白血病活性的药物的剂量，因为含有增加的骨髓中毒性。这似乎特别与复发性ALL和新诊断的AML和复发性AML的治疗有关，因为这些疾病具有相对差的预后，目前使用具有骨髓中毒性的药物组合治疗这些疾病。

30

发明概述

我们首次确定了阿普立定和阿普立定类似物增强其它抗癌药物

的效力并因此可成功地用于癌治疗的联合治疗。本发明涉及使用这些联合治疗用于治疗癌的药物组合物，药物剂型，药包和方法。

根据本发明的一个方面，我们提供了使用其它有效治疗癌的药物并基于阿普立定和阿普立定类似物的联合治疗。优选其它药物有效
5 治疗白血病和/或淋巴瘤。最优选其它药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。

本发明的另一个实施方案包括治疗原发性癌和/或转移性癌的方法，该方法包括对需要这种治疗的患者给予治疗有效量的阿普立定
10 或阿普立定类似物、或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水合物，以及治疗有效量的另一种有效治疗癌的药物、或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水合物，所述另一种药物在阿普立定或阿普立定类似物给药之前、过程中、或之后给药。

优选其它药物有效治疗白血病和/或淋巴瘤。最优选其它药物选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。
15 其它药物可形成同一组合物的一部分，或作为相同时间或不同时间给药的单独组合物。

待治疗的癌优选白血病或淋巴瘤，最优选 ALL、AML、CML、MML 或 CLL。

本发明的另一个方面包括增加有效治疗癌的药物治疗效力的方法，所述药物优选是有效治疗白血病和/或淋巴瘤的药物，最优选
20 是选自氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素的药物，或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水合物，所述方法包括对需要的患者给予一定量的阿普立定或阿普立定类似物、或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水合物。阿普立定或阿普
25 立定类似物在其它药物给药之前、过程中、或之后给药。

阿普立定或阿普立定类似物能够增加某些抗癌药物的治疗效力。在一个方面，联合的结果是优于相加作用的协同作用。这种协同联合代表了本发明的优选方面。协同作用可通过使用 Chou-Talalay 方法或其它方法的使用得以证明。在其它情况中，可发现拮
30 抗作用。

本发明的另一个方面包括药物组合物，该药物组合物包括阿普立定或阿普立定类似物、或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水

合物, 以及另一种有效治疗癌的药物。优选另一种药物有效治疗白血病和/或淋巴瘤。最优选另一种药物选自氮甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素。

本发明还包括用于治疗或预防癌的药包, 该药包包括阿普立定或
5 阿普立定类似物、或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水合物的剂型; 另一种有效治疗癌的药物、或其药学可接受的前药、盐、溶剂化物或水合物的药物的剂型; 供治疗或预防癌的联合中各行为者使用的用法说明。优选其它的药物有效治疗白血病和/或淋巴瘤。最优选其它的药物选自氮甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、
10 甲泼尼龙和阿霉素。

在本发明的另一个方面, 本发明涉及阿普立定在治疗慢性淋巴细胞性白血病中的应用。

附图说明

15 图1, 阿普立定抑制培养基中CLL细胞的生长。

图2, 阿普立定是培养基中preB-ALL细胞的强效抑制剂。

图3, 用阿普立定治疗96小时的CCRF-CEM细胞(图3A)、SKI-DLCL细胞(图3B)和K562细胞(图3C)的细胞毒剂量-应答曲线。

图4, 在CCRF-CEM细胞中阿普立定和AraC联合的Chou-Talalay分
20 析。

图5, 在SKI-DLCL细胞中阿普立定和AraC联合的Chou-Talalay分析。

图6, 在CCRF-CEM细胞中阿普立定和米托蒽醌联合的Chou-Talalay分析。

25 图7, 在SKI-DLCL细胞中阿普立定和米托蒽醌联合的Chou-Talalay分析。

图8, 在CCRF-CEM细胞中阿普立定和甲氮喋呤联合的Chou-Talalay分析。

图9, 在CCRF-CEM细胞中阿普立定和阿霉素联合的Chou-talalay
30 分析。

图10, 在CCRF-CEM细胞中阿普立定和长春碱联合的Chou-talalay分析。

图11,在SKI-DLCL细胞中阿普立定和阿霉素联合的Chou-Talalay分析。

图12,在SKI-DLCL细胞中阿普立定和长春碱联合的Chou-Talalay分析。

5 图13,在SKI-DLCL细胞中阿普立定和甲泼尼龙联合的Chou-Talalay分析。

图14,在培养96小时后的CCRF-CEM细胞(图12A)和SKI-DLCL细胞(图12B)中阿普立定的IC₂₀降低AraC的IC₅₀的联合。

10 图15,阿普立定作为单个药物给药和作为阿普立定与AraC的联合时阿普立定体内对肿瘤大小的作用。

发明详述

15 癌包括肿瘤、肿瘤形成、和任何其它恶性组织或细胞。本发明涉及阿普立定或阿普立定类似物联合在治疗通常的癌中的应用,优选在治疗不同的白血病和淋巴瘤中的应用。

为了研究使用阿普立定后其它抗癌药物的可能的效力增强,我们开始了可能用于白血病和淋巴瘤中的药物联合的系统研究。发现阿普立定是有效对抗患有preB-ALL(DM4)患者的原代细胞、和对抗得自六名慢性淋巴细胞性白血病(CLL)患者的新鲜细胞的体外细胞毒药物。暴露于DM4系3天和暴露于原代CLL样品11天后的IC₅₀值是10 nM。

20 在确立细胞株而非原代细胞上进行了药物联合的研究。我们研究了三种细胞系,即K562、CCRF-CEM和SKI-DLCL,它们分别代表急性骨髓性白血病、成淋巴细胞的淋巴瘤和弥漫性B细胞大细胞淋巴瘤。实施例中的数据表明,在K562、CCRF-CEM和SKI-DLCL细胞中,阿普立定通过降低下述药物的IC₅₀值增强了氨甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙和阿霉素的效力。

25 因此我们发现阿普立定是对抗几种血液学恶性病细胞的强效细胞毒药物。重要地是,我们首次确立了阿普立定抑制培养基中CLL细胞的生长。我们还发现阿普立定提高了在白血病治疗中所用药物的细胞毒性,所述药物如氨甲喋呤(MTX)、阿糖胞苷(AraC)、米托蒽醌(Mitox)、长春碱(Vinb)、甲泼尼龙(Metpred)和阿霉素(DOX)。

白血病根据其发展快慢来分类。急性白血病生长迅速并可在数周

或数月内遍布全身，相比之下，慢性白血病生长迟缓，且随着时间的进行逐渐地恶化。

急性白血病的生血（造血）细胞保持在未成熟状态，因此它们再生和积聚非常迅速。因此，急性白血病需要立即治疗，否则该疾病可能在数月内致命。幸运地是，某些急性白血病亚型响应现有的治疗，并且它们是可医治的。儿童经常发展成为急性白血病类型，对儿童急性白血病的处理不同于成人。

在慢性白血病中，生血细胞最终是成熟的，或分化的，但是它们不是“正常”的。它们存在于血流中的时间远远高于正常白细胞，并且它们不能很好地对抗感染。

白血病也根据白细胞的类型进行分类，白细胞分为淋巴细胞（免疫系统细胞）、粒细胞（细菌破坏性细胞）、或单核细胞（巨噬细胞形成细胞）。如果异常白细胞主要是粒细胞或单核细胞，则白血病称为骨髓性或骨髓性白血病。另一方面，如果异常血细胞源于骨髓淋巴细胞，则白血病称为淋巴细胞白血病。

其它的癌，已知为淋巴瘤，从淋巴结、脾和其它器官内的淋巴细胞产生。这些癌不始发于骨髓，具有不同于淋巴细胞性白血病的生物学行为。

有多于十二种不同类型的白血病，但是四种类型的白血病最常发生。这些分类基于白血病是否是急性或慢性的，是否是骨髓性的或淋巴细胞性的，也就是说：

急性骨髓性白血病 (AML)：又称为急性非淋巴细胞白血病 (ANLL)，是最常见类型的成人白血病。大部分患者处于退休年龄（诊断时的平均年龄=65岁），男性多于女性。幸运地是，因为治疗的最新发展，在经过适当治疗的成人患者中，约60%到70%患者的AML得到缓解（病情减轻）。初始应答率为约65-75%，但是总治愈率更常为约40-50%。

慢性骨髓性白血病 (CML)，又称为骨髓增生病症，是其中骨髓细胞增殖(倍数增长)超过骨髓组织的疾病。CML容易诊断，因为其具有遗传特性、或标记，也就是说，容易在显微镜下识别。约95%的CML患者在他们的白血病细胞中的染色体9和22之间具有遗传移位。费城染色

体引起所有类型的白细胞和血小板（凝血因子）的不受控制的繁殖和增殖。CML通过标准的化学疗法或免疫疗法仍是不可医治的。

5 急性淋巴细胞白血病(ALL)，又称为急性淋巴母细胞性白血病，是由早粒白细胞、或淋巴细胞的异常生长和发展引起的恶性病。白血病发生于骨髓的胚细胞(B细胞)、胸腺(T细胞)、和淋巴结。ALL主要发生在至多4岁的儿童中。

10 慢性淋巴细胞白血病(CLL)，在北美和欧洲是最常见的白血病。它是在年长成人中发生的疾病并且在低于50岁的较年轻的人中很少发生。患有CLL的男性在数量上超过患有CLL的女性，平均为2比1。CLL被认为源于成熟、长命的淋巴细胞的逐渐积聚。因此，这种癌与其说是由过度生长引起的不如说是恶性细胞的极度长命和积累引起的。尽管个体间的积聚率不同，但是广泛的肿瘤负荷最终引起所有
15 CLL患者的并发症。

本发明的组合物可包括在单一的药学可接受制剂形式中的两种组分（药物）。或，所述各组合物可分别配制并彼此联合给药。在本发明中可使用本领域技术人员公知的各种药学可接受制剂。本领域
20 的技术人员可根据给药方式和组合物中个组分的溶解特征来常规地选择本发明所用的适当的制剂。

包含阿普立定或阿普立定类似物的药物组合物的例子包括具有适当组成的静脉内给药用液体(溶液、悬浮液或乳液)，并且它们可含有纯化合物或与任何载体或其它药理学活性化合物的联合。溶解
25 的阿普立定在热和光强度测试条件下发生实质性降解，因此开发了冻干剂型，参见W099/42125，其并入本文作为参考。

本发明的阿普立定或组合物的给药基于剂量给药方案，优选静脉内输液。我们优选使用至多72小时、优选1到24小时的输液时间，最优选约1、约3或约24小时。特别希望短的输液时间，使得无需整夜
30 住进医院即可进行治疗。然而，如果需要，输液可进行约24小时或甚至更长时间。输液可以以适当的间隔以变化的方案进行，例如一周一次、一周两次、或是一周多次，每周重复输液且任选地停药通

常一周。

联合的化合物的正确剂量将根据特定的配制组成、施用方式、治疗的特定部位、宿主和肿瘤的改变而改变。应该考虑到其它因素如年龄、体重、性别、饮食、给药时间、排泄速率、宿主状况、药物联合、反应灵敏性和疾病的严重程度。给药可连续地或周期地在最大耐药量范围内进行。阿普立定给药的进一步指导在W0 0135974中给出，该文献并入本文作为参考。

对于本发明，可使用阿普立定的类似物代替APL（阿普立定本身）。代表性的这种化合物如W0 0202596中定义。本发明化合物的例子包括在W0 0202596中给出的优选化合物，我们特别地向本说明书中引入了优选化合物的讨论和在W0 0202596中给出的有关方面。更优选地，类似物在结构上接近阿普立定，通常在一个氨基酸或末端侧链方面与阿普立定不同。不同的氨基酸可位于分子的环状部分内或位于侧链内。这种化合物的许多例子在W0 0202596中给出，它们是供本发明之用的候选药物。

实施例

实施例 1

试验了阿普立定对抗多种得自血液学恶性病患者的原代细胞的作用。使用的细胞是：

- 得自六名慢性淋巴细胞白血病患者的新鲜细胞
- 得自preB-ALL (DM4) 患者的原代细胞。

患者样品的获得经过事先的同意，CLL细胞通过密度梯度离心法在histopaque上分离。使用的介质是补充有10%自体血清和L-谷氨酰胺的RPMI。培养基使用10 nM 阿普立定培养，测量3、7、11和18天的细胞生存力，并与未经处理的细胞和STI 571 (0.5mM)的生存力比较。

这些研究的结果示于图 1-2 中。

实施例 2

为了研究其它抗癌药物的可能的效力增强，我们进行了可用于白血病和淋巴瘤的药物联合的研究。

药物联合研究在确立细胞株上而不是在原代细胞上进行。我们研究了三种细胞系，既K562（作为急性骨髓性白血病的模型），CEM（表示急性淋巴细胞白血病），和SKI-DLCL（表示弥漫性大细胞淋巴瘤）。研究了IC₂₀剂量的阿普立定和IC₅₀剂量范围的氨甲喋呤、阿糖胞苷和阿霉素的联合，以确定阿普立定是否可增强这些药物的效力。

这些结果示于表 1 中：

附加的药物	IC ₅₀ 阿霉素	IC ₅₀ 氨甲喋呤	IC ₅₀ 阿糖胞苷
无阿普立定	18nM	5nM	30nM
IC ₂₀ 阿普立定 (0.5nM)	1nM	500pM	6nM

p<0.01, p<0.05, p<0.05

这些数据清楚地表明了阿普立定通过显著地降低了所述药物的IC₅₀值而增强了阿霉素、氨甲喋呤和阿糖胞苷的效果。

实施例 3: 测定阿普立定作为单一药物对 CCRF-CEM、SKI-DLCL 和 K562 细胞系的作用的体外试验。

CCRF-CEMS、SKI-DLCL和K562细胞保持在补充有10% FCS的RPMI 1640中。为了测定阿普立定对所有细胞系的细胞毒效力，以及为了获得阿普立定在这些细胞系中的IC₅₀，将细胞装入96孔板中并在湿润的含有5% CO₂的培育箱中培养96小时。在自动读板器中通过XTT试验测量了细胞生存力。我们发现阿普立定对所有细胞系具有细胞毒性，IC₅₀剂量为0.5-1.0nM（图3）。

实施例 4: 对阿普立定+药物的联合对所有细胞系的体外效果研究，该联合具有 IC₅₀: IC₅₀ 的固定剂量。

与阿普立定联合测量了氨甲喋呤、阿糖胞苷C(ara-C)、米托蒽醌、甲泼尼龙、长春碱和阿霉素。

使用Chou-Talalay分析法分析了药物联合。当通过这种分析法获得的联合指数(CI)小于1时，药物发生协同作用；当CI等于1时，药物是相加作用；如果CI大于1，则药物发生拮抗作用。

通过使用XTT或MTS进行所有细胞毒性研究。我们首先测定了这些

药物在SKI-DLCL、CCRF-CEM和K562细胞系中的IC₅₀剂量。我们研究了使用IC₅₀(阿普立定) : IC₅₀(药物X)固定比的药物联合。

在表2中表明了CCRF-CEM细胞中剂量为(IC₅₀ : IC₅₀)的阿普立定和Ara-C的联合。

5

表 2

比	APL 的剂量	AraC 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5 nM	0	52.7
IC ₅₀ (AraC)	0	10nM	56.4
X16	8nM	160nM	4.7
X8	4nM	80nM	7.9
X4	2nM	40nM	7.6
X2	1nM	20nM	7.8
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	10nM	10.6
X 1/2	0.25nM	5nM	16.2
X 1/4	1.125nM	2.5nM	36.7
X 1/8	0.0625nM	1.25nM	70.8

在CCRF-CEM细胞中阿普立定和Ara-C联合的Chou-talalay分析结果示于图4。在CCRF-CEM细胞中该联合的CI值是0.469。

10

在表3中表明了SKI-DLCL细胞中剂量为(IC₅₀: IC₅₀)的阿普立定和Ara-C的联合。

表 3

比	APL 的剂量	AraC 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5 nM	0	50
IC ₅₀ (AraC)	0	30nM	50
X16	8nM	480nM	12
X8	4nM	240nM	10.7
X4	2nM	120nM	14.1
X2	1nM	60nM	17.4
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	30nM	23.1
X 1/2	0.25nM	15nM	25.4
X 1/4	1.125nM	7.5nM	25.5
X 1/8	0.0625nM	3.75nM	50.8

5 在SKI-DLCL细胞中阿普立定和Ara-C联合的Chou-Talalay分析结果示于图5中。在SKI-DLCL细胞中这些联合的CI值是0.306。

在表4中表明了K562细胞中剂量为 (IC₅₀ : IC₅₀) 的阿普立定和Ara-C的联合。

表 4

比	APL 的剂量	AraC 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	1nM	0	50
IC ₅₀ (AraC)	0	30nM	50
X16	16nM	480nM	11.8
X8	8nM	240nM	15.2
X4	4nM	120nM	15.5
X2	2nM	60nM	17
IC ₅₀ : IC ₅₀	1nM	30nM	22.1
X 1/2	0.5nM	15nM	25.6
X 1/4	0.25nM	7.5nM	31.1
X 1/8	0.125nM	3.75nM	44.2

5 在 K562 细胞中这一联合的 CI 值是 0.502。

在表 5 中表明了 CCRF-CEM 细胞中剂量为 (IC₅₀ : IC₅₀) 的阿普立定和米托蒽醌的联合。

表 5

比	APL 的剂量	米托蒽醌 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5nM	0	50
IC ₅₀ (Mitox)	0	30nM	56
X16	8nM	480nM	9.9
X8	4nM	240nM	11.6
X4	2nM	120nM	11.9
X2	1nM	60nM	13.8
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	30nM	20.6
X 1/2	0.25nM	15nM	39.7
X 1/4	1.125nM	7.5nM	60.7
X 1/8	0.0625nM	3.75nM	76.5

- 5 在 CCRF-CEM 细胞中阿普立定和米托蒽醌联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 6 中。在 CCRF-CEM 细胞中阿普立定和米托蒽醌联合的 CI 值是 0.911。

在表 6 中表明了 SKI-DLCL 细胞中剂量为 (IC₅₀: IC₅₀) 的阿普立定和米托蒽醌联合。

表 6

比	APL 的剂量	米托蒽醌 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5nM	0	50
IC ₅₀ (Mitox)	0	5nM	50
X16	8nM	80nM	17
X8	4nM	40nM	29
X4	2nM	20nM	22.6
X2	1nM	10nM	19.9
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	5nM	32.2
X 1/2	0.25nM	2.5nM	53.1
X 1/4	1.125nM	1.25nM	58.6
X 1/8	0.0625nM	0.625nM	70.1

- 5 在 SKI-DLCL 细胞中阿普立定和米托蒽醌联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 7 中。在 SKI-DLCL 细胞中阿普立定和米托蒽醌联合的 CI 值是 0.646。

在表 7 中表明了 K562 细胞中剂量为 (IC₅₀: IC₅₀) 的阿普立定和米托蒽醌联合。

表 7

比	APL 的剂量	米托蒽醌 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	1nM	0	50
IC ₅₀ (Mitox)	0	7.5nM	50.7
X16	16nM	120nM	9.9
X8	8nM	60nM	11.6
X4	4nM	30nM	11.9
X2	2nM	15nM	13.8
IC ₅₀ : IC ₅₀	1nM	7.5nM	20.6
X 1/2	0.5nM	3.75nM	39.7
X 1/4	0.25nM	1.8nM	60.7
X 1/8	0.125nM	0.9nM	76.5

5 在 K562 细胞中这一联合的 CI 值是 0.487。

在表 8 中表明了 CCRF-CEM 细胞中剂量为 (IC₅₀ : IC₅₀) 的阿普立定和氮甲喋呤的联合。

表 8

比	APL 的剂量	米托蒽醌 的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5nM	0	50
IC ₅₀ (MTX)	0	10nM	50
X16	8nM	160nM	5
X8	4nM	80nM	13
X4	2nM	40nM	11
X2	1nM	20nM	12
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	10nM	20
X 1/2	0.25nM	5nM	30
X 1/4	1.125nM	2.5nM	88
X 1/8	0.0625nM	1.25nM	100

- 5 在 CCRF-CEM 细胞中阿普立定和氨甲喋呤联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 8 中。在 CCRF-CEM 细胞中阿普立定和氨甲喋呤联合的 CI 值是 0.950。

在 CCRF-CEM 细胞中阿普立定和阿霉素联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 9 中。在 CCRF-CEM 细胞中这一联合的 CI 值是 1.952。

- 10 在 CCRF-CEM 细胞中阿普立定和长春碱联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 10 中。在 CCRF-CEM 细胞中这一联合的 CI 值是 2.046。

在表 9 中表明了 SKI-DLCL 细胞中剂量为 (IC₅₀ : IC₅₀) 的阿普立定和阿霉素的联合。

表 9

比	APL 的剂量	阿霉素的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5nM	0	50
IC ₅₀ (Doxo)	0	5nM	50
X16	8nM	80nM	9.4
X8	4nM	40nM	8.6
X4	2nM	20nM	8
X2	1nM	10nM	9.7
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	5nM	21
X 1/2	0.25nM	2.5nM	40
X 1/4	1.125nM	1.25nM	45
X 1/8	0.0625nM	0.625nM	49

5 在 SKI-DLCL 细胞中阿普立定和阿霉素联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 11 中。在 SKI-DLCL 细胞中这一联合的 CI 值是 0.478。

在表 10 中表明了 SKI-DLCL 细胞中剂量为 (IC₅₀ : IC₅₀) 的阿普立定和长春碱的联合。

表 10

比	APL 的剂量	长春碱的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0.5nM	0	50
IC ₅₀ (Vinb)	0	4nM	50
X16	8nM	64nM	15
X8	4nM	32nM	17
X4	2nM	16nM	17
X2	1nM	8nM	21
IC ₅₀ : IC ₅₀	0.5nM	4nM	29
X 1/2	0.25nM	2nM	25
X 1/4	1.125nM	1nM	28
X 1/8	0.0625nM	0.5nM	38

5 在 SKI-DLCL 细胞中阿普立定和长春碱联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 12 中。在 SKI-DLCL 细胞中这一联合的 CI 值是 0.760。

在表 11 中表明了 SKI-DLCL 细胞中剂量为 (IC₅₀ : IC₅₀) 的阿普立定和甲泼尼龙的联合

表 11

比	APL 的剂量	甲泼尼龙的剂量	生存力 (相对于对照的百分数)
对照	0	0	100
IC ₅₀ (APL)	0. 5nM	0	50
IC ₅₀ (Metpred)	0	160nM	51
X16	8nM	2560nM	10. 8
X8	4nM	1280nM	17. 3
X4	2nM	640nM	16. 7
X2	1nM	320nM	17. 4
IC ₅₀ : IC ₅₀	0. 5nM	160nM	24. 7
X 1/2	0. 25nM	80nM	32. 4
X 1/4	1. 125nM	40nM	39. 1
X 1/8	0. 0625nM	20nM	50

5 在 SKI-DLCL 细胞中阿普立定和甲泼尼龙联合的 Chou-Talalay 分析结果示于图 13 中。在 SKI-DLCL 细胞中这一联合的 CI 值是 0. 646。

实施例 5

10 我们还研究了 IC₂₀ (APL) 与变化剂量的 AraC 的联合对 CCRF-CEM 和 SKI-DLCL 细胞系的细胞毒作用。阿普立定在两种细胞系中都增强了 AraC 的效果，AraC 的 IC₅₀ 剂量在 SKI-DLCL 细胞系中从 30 nM 降低到 1. 6 nM，在 CCRF-CEM 细胞系中从 10 nM 降低到 0. 8 nM (图 14)。在细胞培养 96 小时后获得数据并使用 XTT 试验。结果表示三次不同试验的平均
15 值。

实施例 6: 体内研究

我们进行了体内试验,以研究单独的阿普立定以及阿普立定与其它药物联合在淋巴性恶性病中的效果。

在C. B.-17 scid/scid (SCID小鼠)中测定最大耐受剂量(MTD)

我们使用了人淋巴瘤在SCID小鼠中的体内模型用于上述目的。具体而言，我们使用了CCRF-CEMS细胞和CB. 17 scid/scid小鼠。我们具有使用这一模型的丰富经验，并使用这种异种移植评价药物治疗

5 (Lacerda J. F.等 Blood 85 (10): 2675-2679 (1995))。我们发现五次日剂量的总量为1毫克/千克/周是小鼠可耐受的阿普立定的最大剂量。

10 阿普立定作为单个药物以及阿普立定与AraC的联合在SCID小鼠异种移植模型中的体内抗癌效果的测定

SCID小鼠右肋皮下接种 10^7 CEM-T白血病细胞。每周观察两次接种部位的肿瘤形成。当确立了明显的肿瘤之后，注射单独的阿普立定，和注射阿普立定与几种剂量的AraC的联合，测量抗癌效果。随机分配小鼠，接受单独的阿普立定，剂量为0.75毫克/千克和1毫克/

15 千克，单独的AraC，剂量为50毫克/千克，或阿普立定和AraC的联合，剂量为所有剂量联合。选择为用于上述联合的AraC的剂量是肿瘤生长受到抑制但是不发生肿瘤消退的剂量。所有药物腹膜内给药，与未接受任何治疗的小鼠的对照组比较肿瘤大小，与接受单个药物治疗的肿瘤大小比较联合给药的肿瘤大小。

20

最有效的联合是AraC-50毫克/千克+阿普立定-0.75毫克/千克(图15)。

这些关于阿普立定的发现可外延到阿普立定类似物、衍生物和有关的化合物。例如，本发明提供了如WO 02 02596中公开的化合物与抗癌药物的联合，所述抗癌药物优选为抗白血病药物或抗淋巴瘤药物，特别是氮甲喋呤、阿糖胞苷、米托蒽醌、长春碱、甲泼尼龙或阿霉素。

25

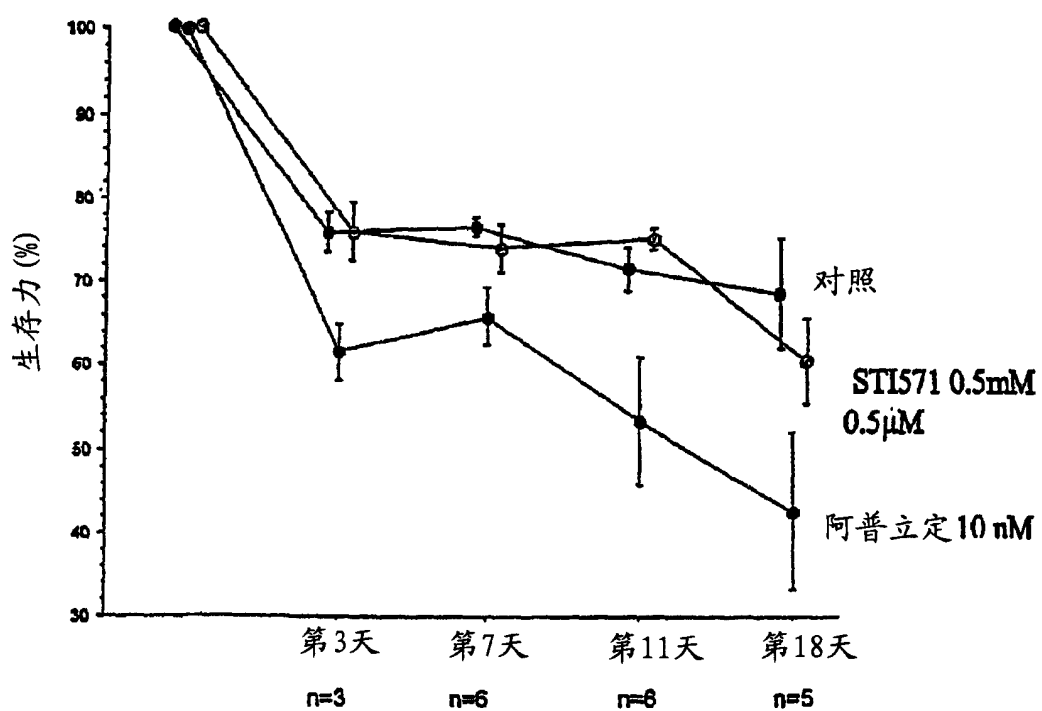


图 1

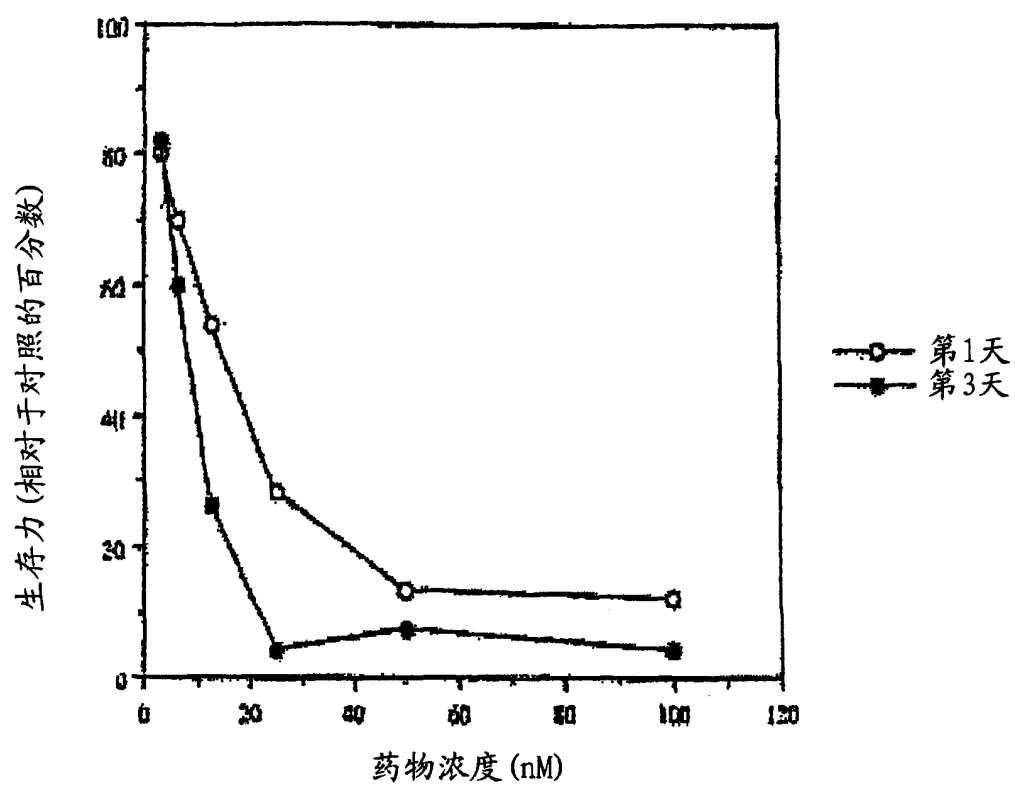


图 2

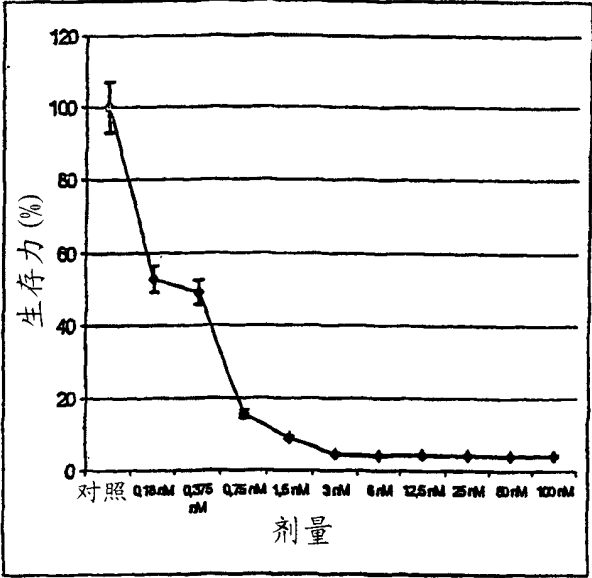


图 3A (CCRF-CEM)

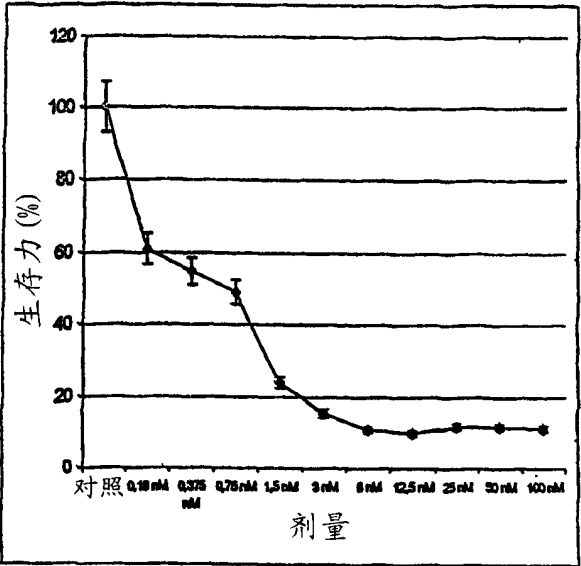


图 3B (SKI-DLCL)

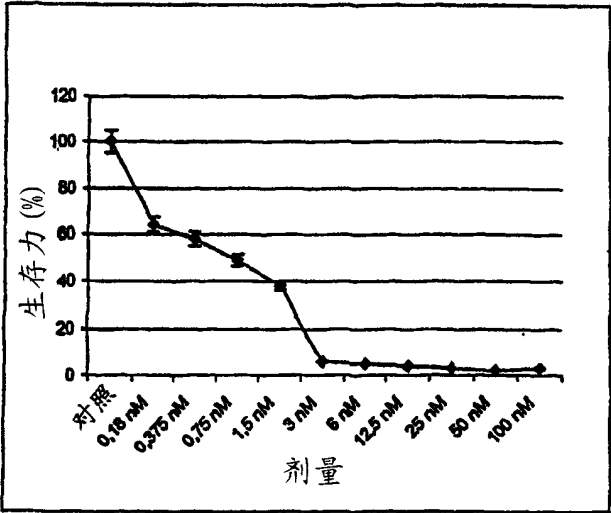


图 3C (K562)

图 3

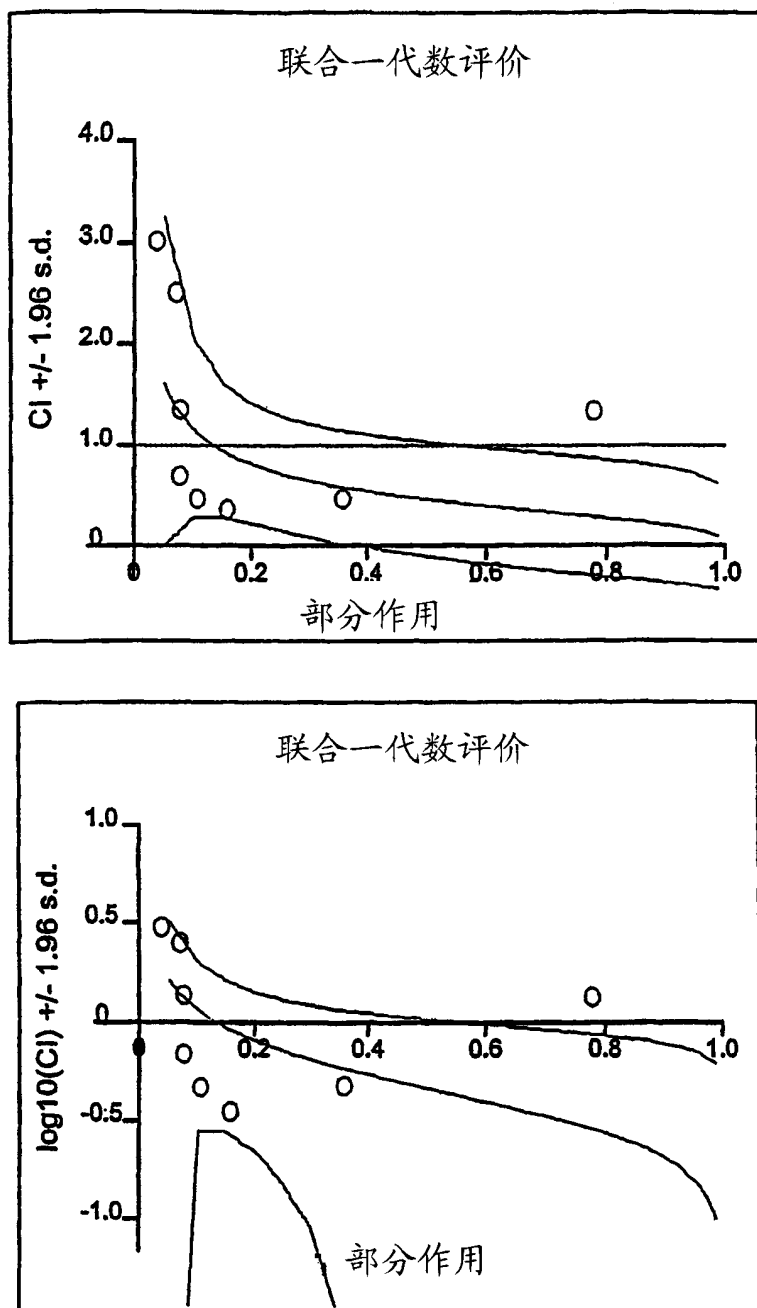


图 4

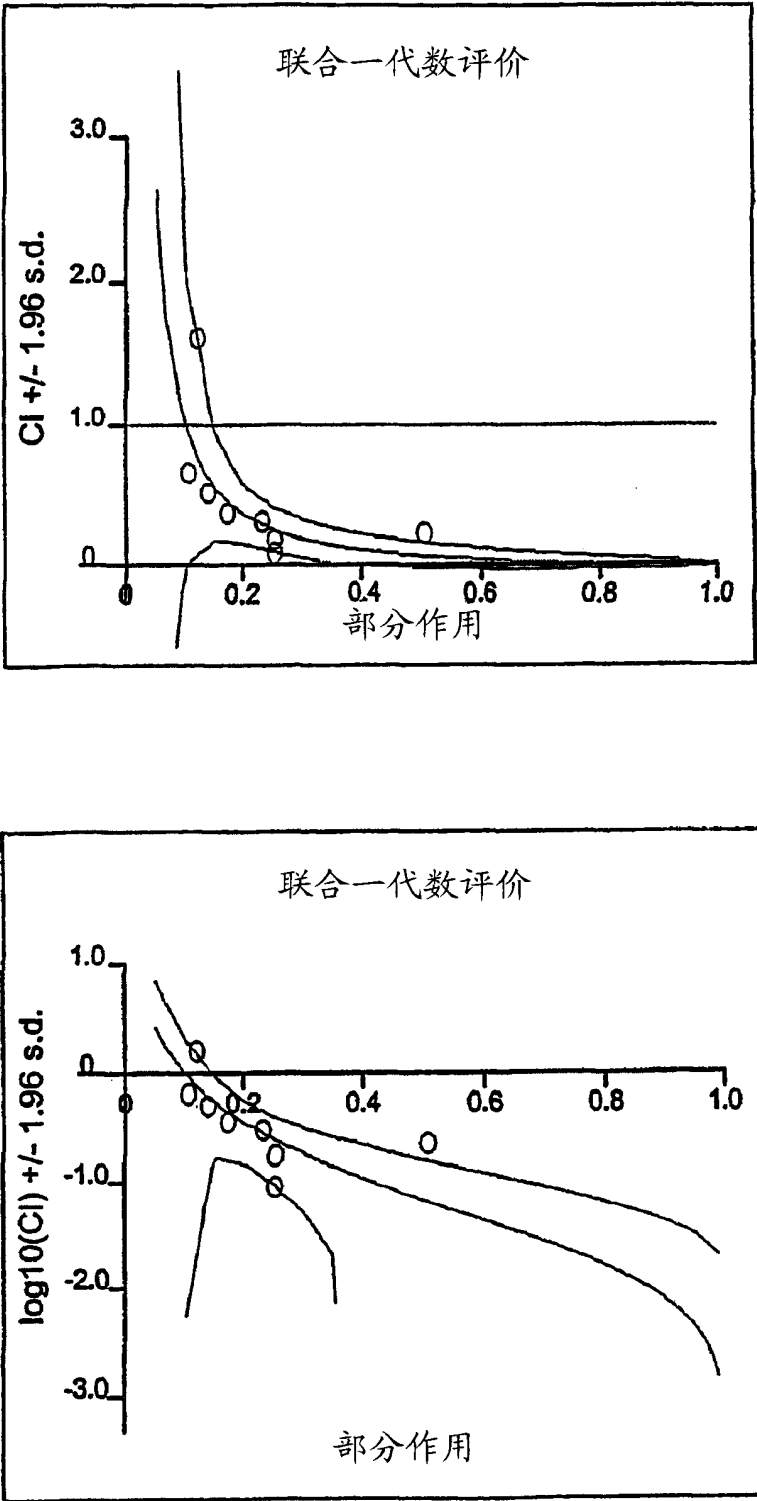


图 5

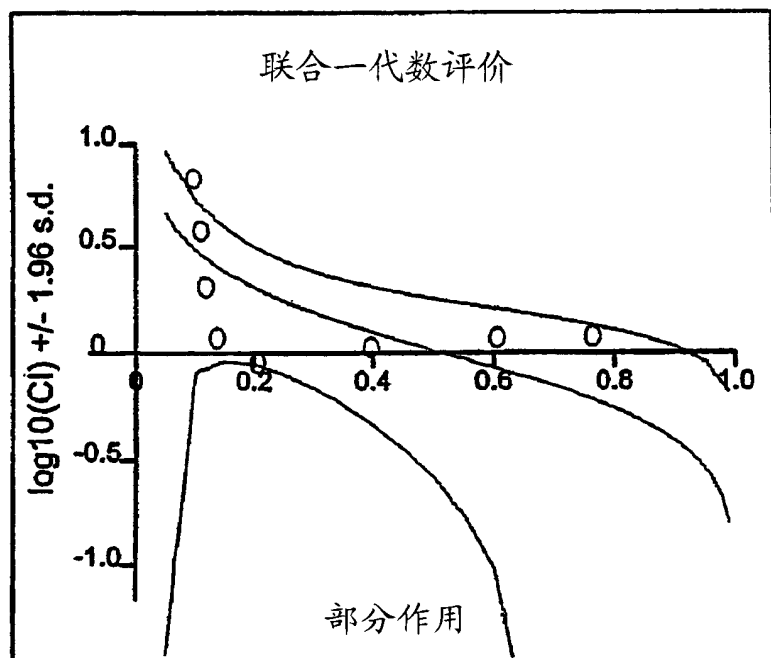
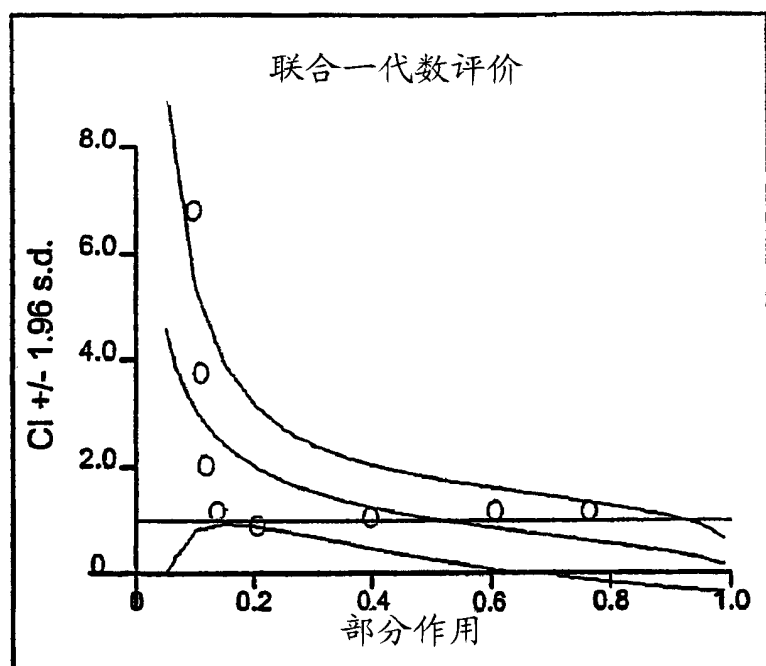


图 6

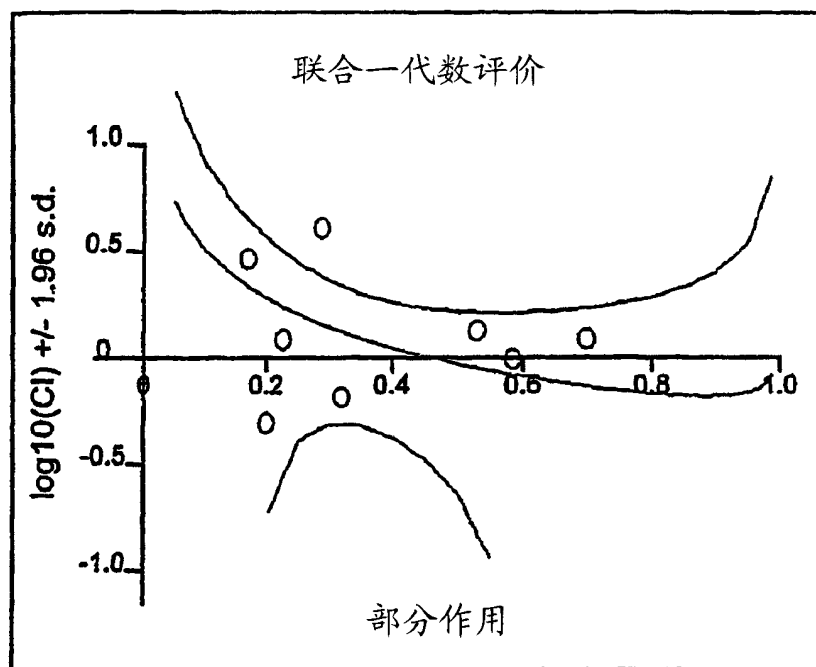
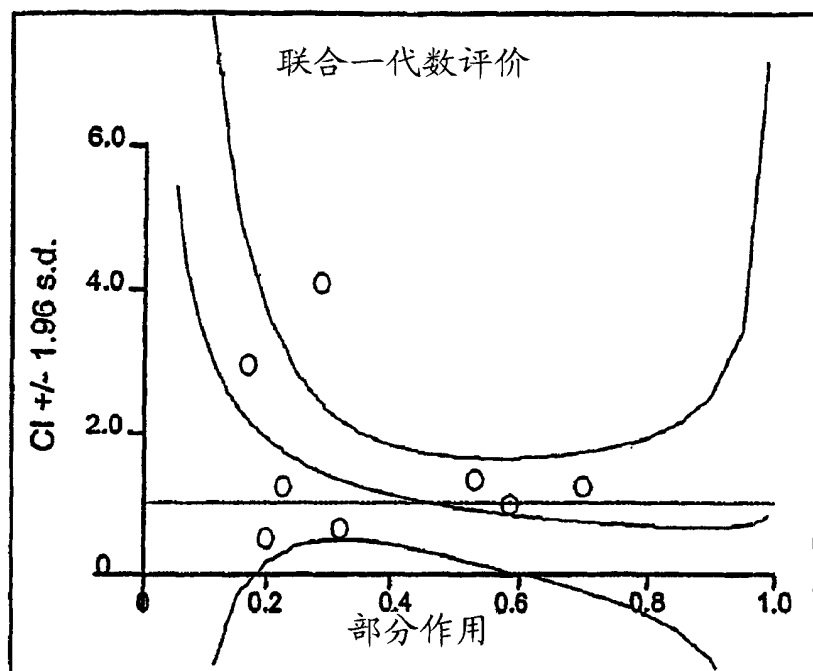


图 7

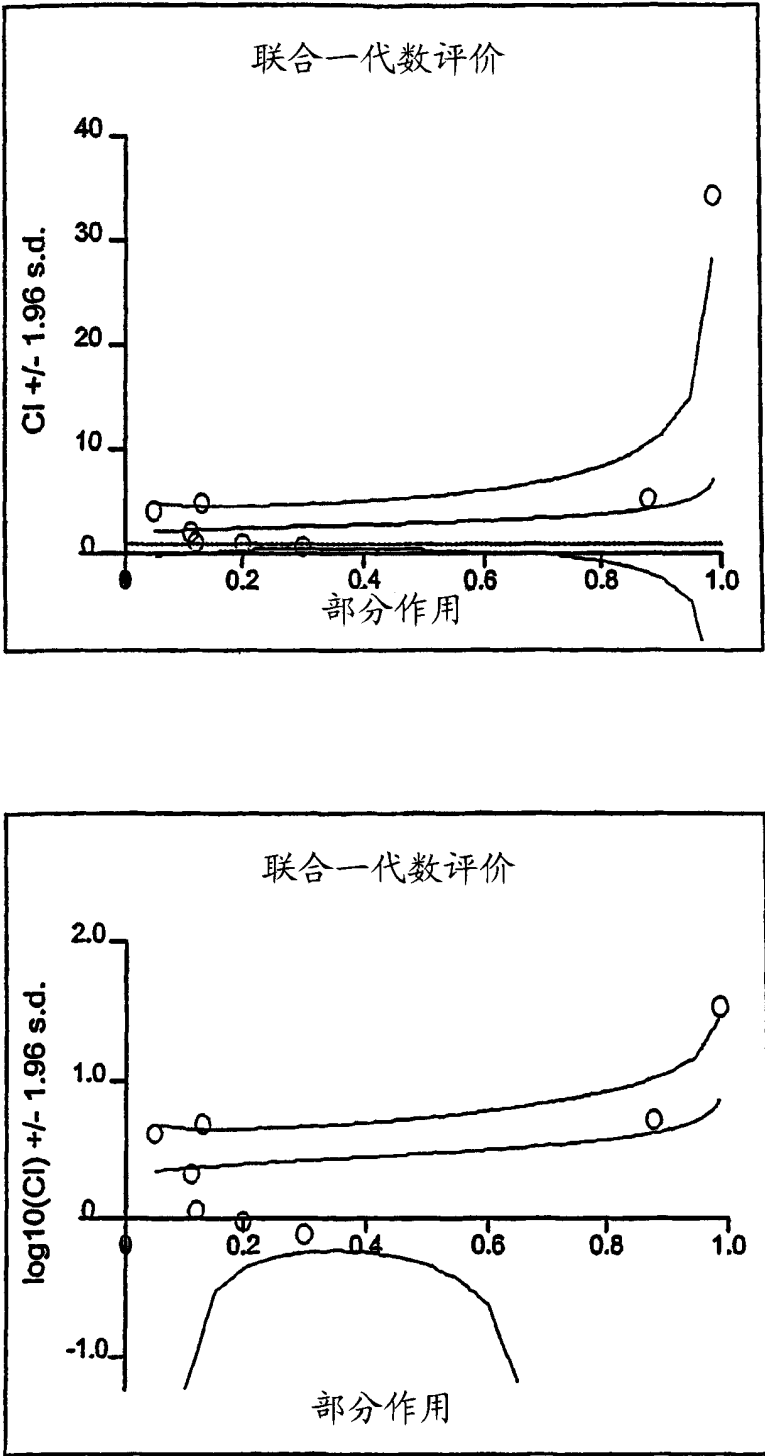


图 8

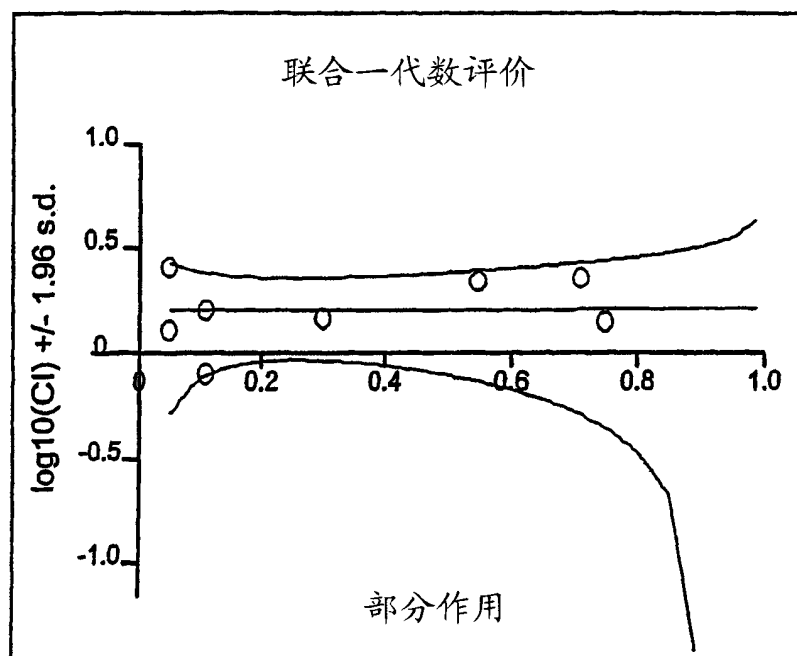
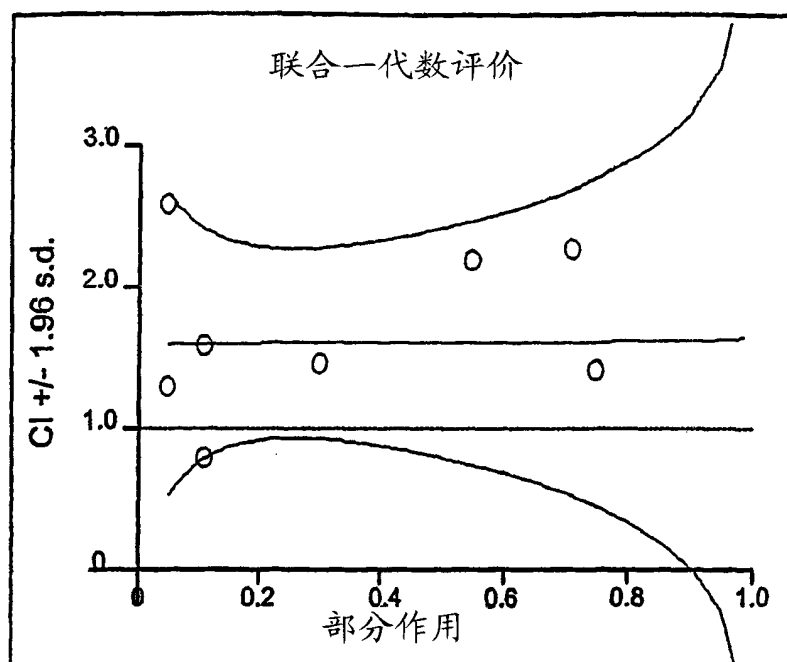


图 9

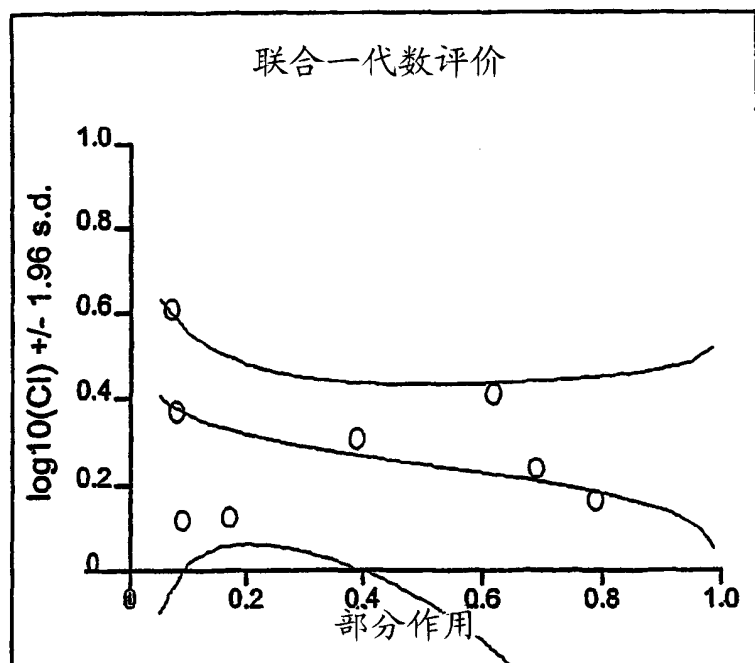
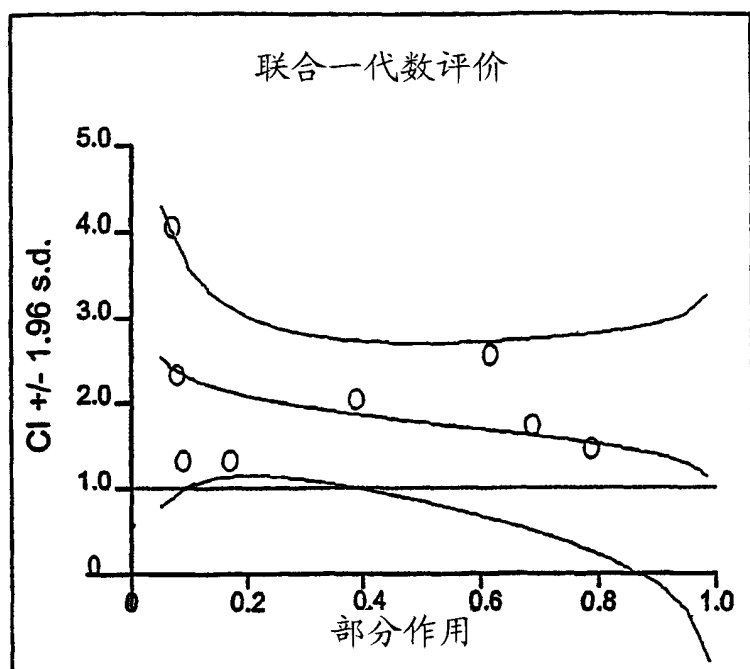


图 10

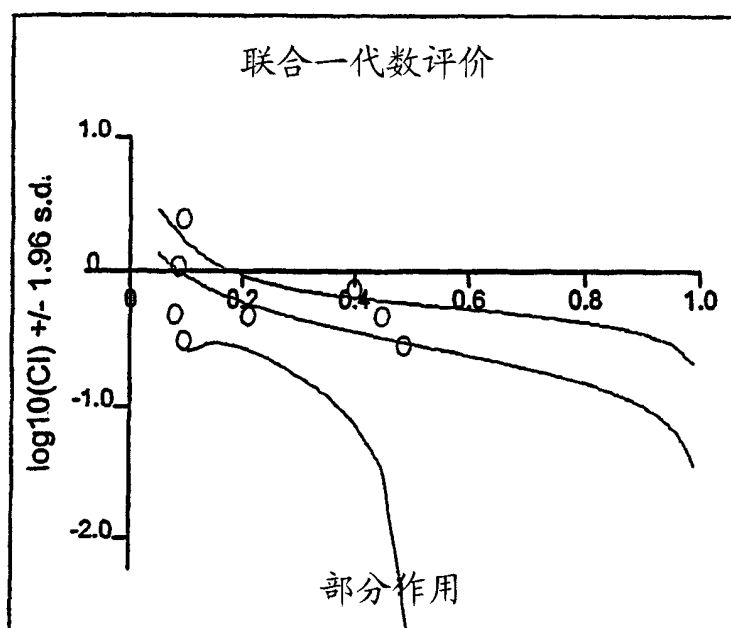
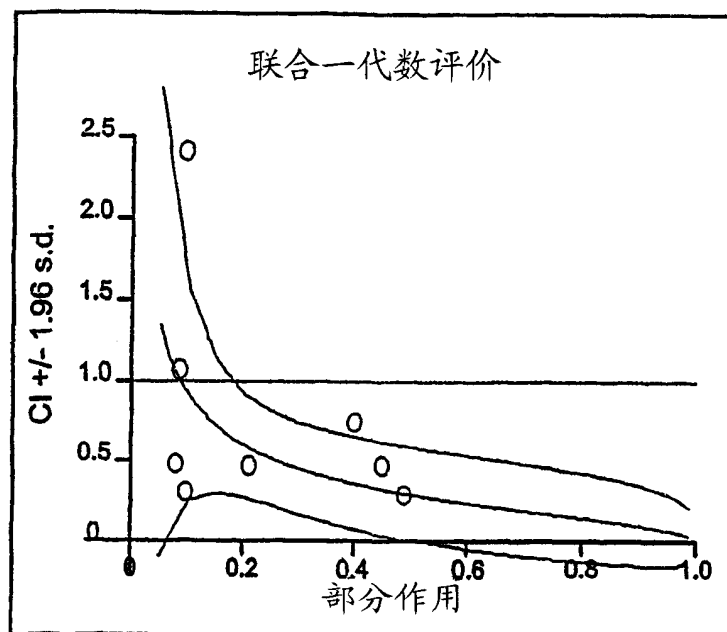


图 11

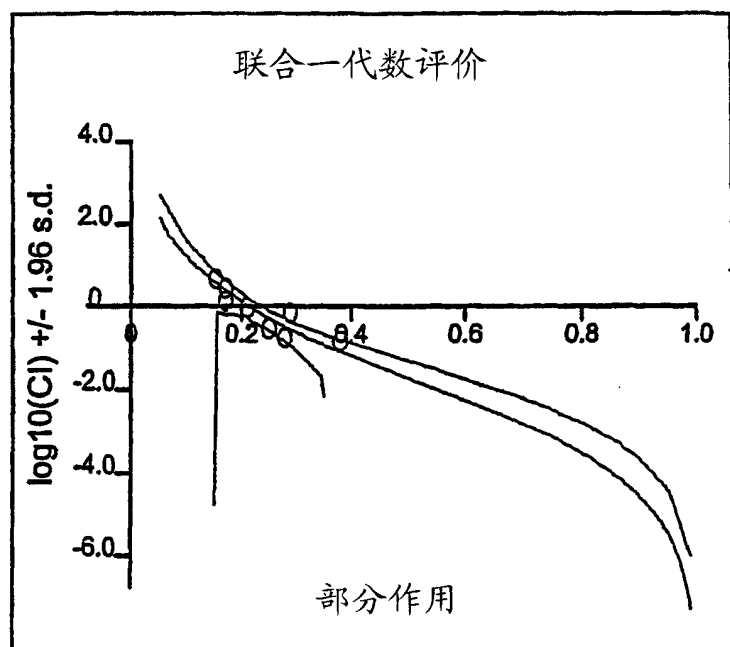
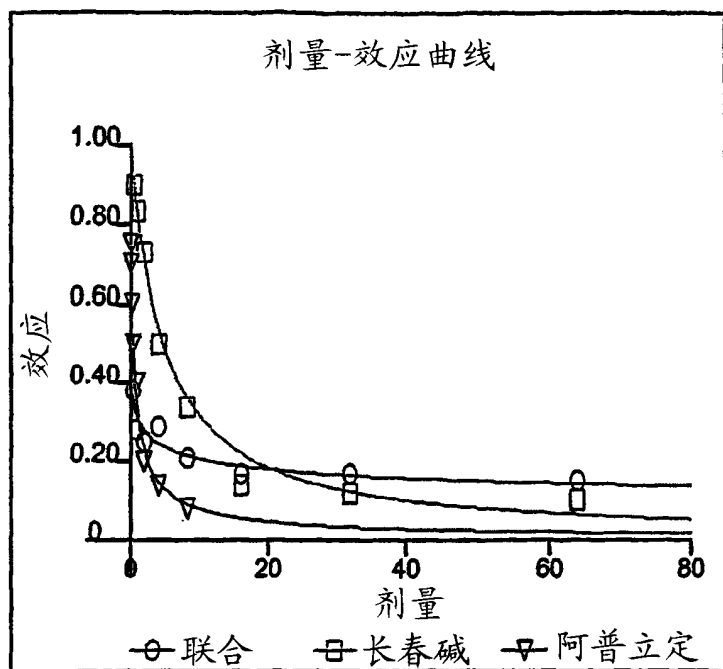


图 12

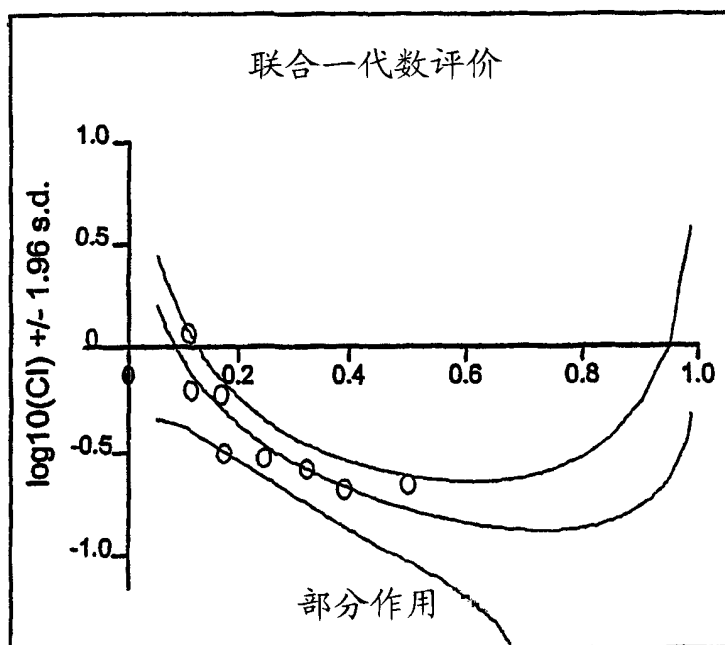
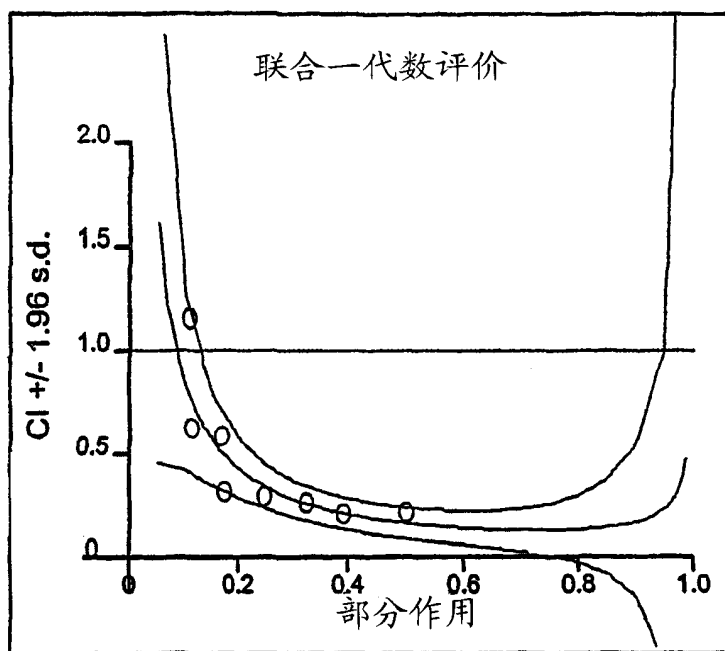


图 13

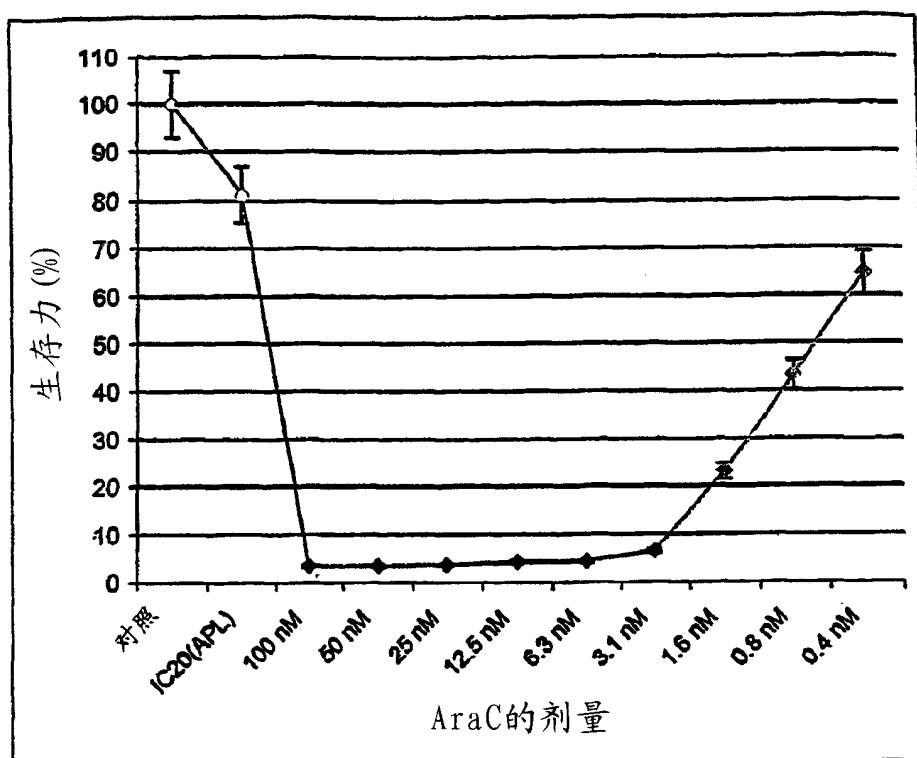


图 14A

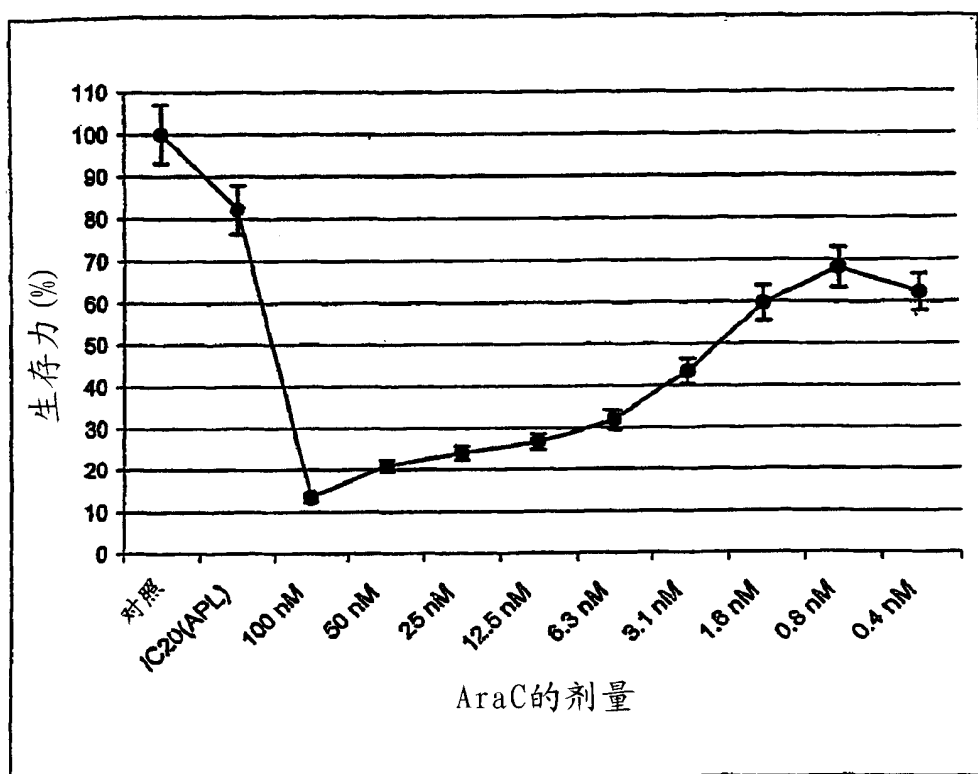


图 14B

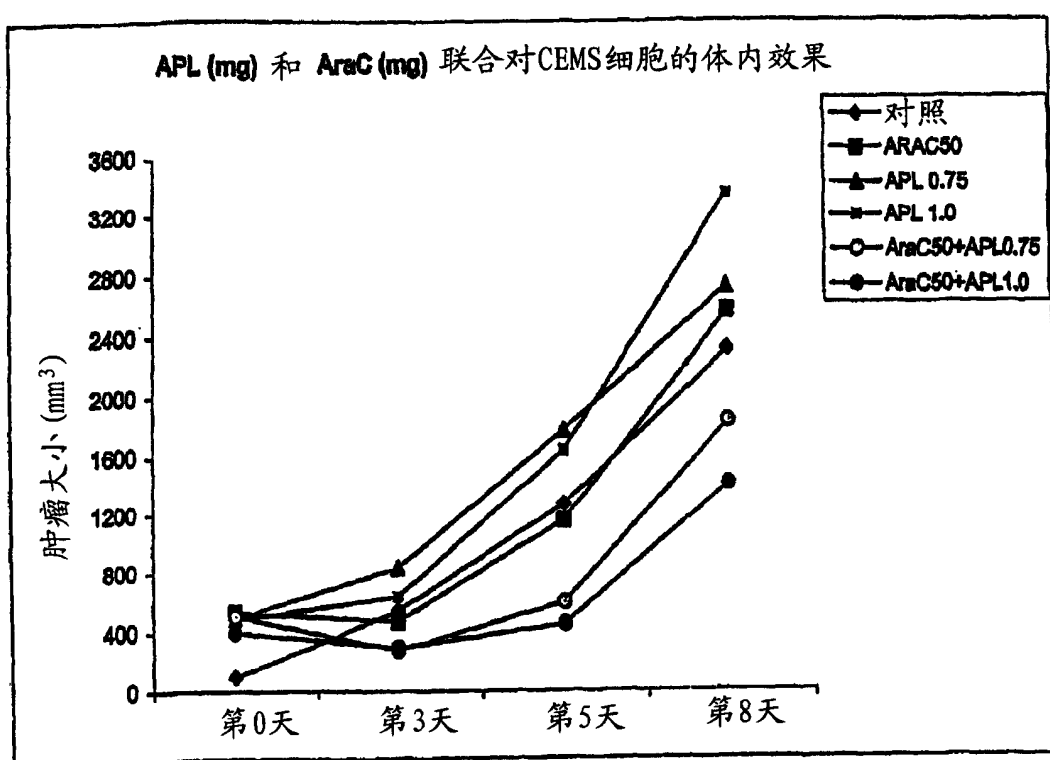


图 15