



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I483938 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：099126507

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 09 日

(51)Int. Cl. : C07D403/04 (2006.01)

C07D403/12 (2006.01)

A61K31/506 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/10 美國

61/232,687

(71)申請人：美國德州系統大學評議委員會(美國) THE BOARD OF REGENTS, OF THE
UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US)

美國

(72)發明人：費德勒 伊沙哈 J FIDLER, ISAIAH J. (US) ; 金善鎮 KIM, SUN-JIN (KR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

LINICAL CANCER RESEARCH, 2008, Vol:14, Nr:5, Page(s):1464 -1469

審查人員：傅玉妃

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：22 共 68 頁

(54)名稱

以內皮素受體抑制劑處理星狀腫瘤細胞

TREATMENT OF ASTROCYTES-TUMOR CELLS WITH INHIBITORS OF ENDOTHELIN
RECEPTORS

(57)摘要

本發明係關於一種內皮素受體拮抗劑，其係與細胞毒性化學治療劑、放射療法或二者組合用於預防或治療腦轉移。該內皮素受體拮抗劑可為例如波生坦(bosentan)、馬西替坦(macitentan)或波生坦與馬西替坦之混合物。

The disclosure relates to an endothelin receptor antagonist for use in the prevention or treatment of brain metastases in combination with a cytotoxic chemotherapy agent, radiotherapy or both. The endothelin receptor antagonist may for example be bosentan, macitentan or a mixture of bosentan and macitentan.

(無元件符號說明)

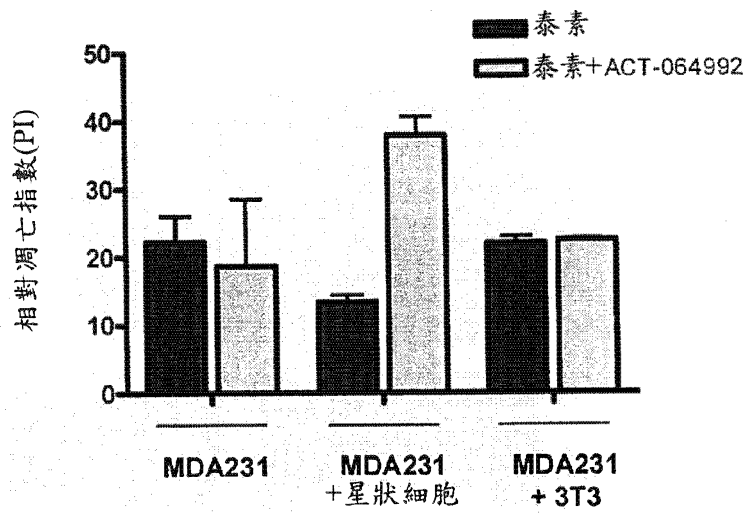


圖 15

六、發明說明：

【先前技術】

腦轉移係腫瘤學面對之最為艱巨之挑戰之一。轉移性腫瘤對大多數化學治療劑有抗性。對腦轉移之治療主要為全腦及聚焦式放射療法，且在少數情形下會手術切除腫瘤。大多數化學療法方案涉及2至3種藥劑，例如順鉑(cisplatin)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、絲裂黴素(mitomycin)、伊立替康(irinotecan)、長春瑞濱(vinorelbine)、依託泊苷(etoposide)、異環磷醯胺(ifosfamide)、替莫唑胺(temozolomide)及氟尿嘧啶(flourouracil) (5-FU)。該等藥劑與放射療法組合投予。該等化學療法通常使存活期延長不到一年的時間。一種相當新穎之腦腫瘤化學療法係同時使用替莫唑胺與全腦照射。雖然僅為初步結果，但與單獨放射相比替莫唑胺似乎對應答率具有一些有限影響且在II期試驗中與放射組合似乎具有一些臨床活性。

儘管作了極大努力，但可用於腦轉移之有限的醫療可選方案仍非常差且通常僅具有緩解效果而非有效治療效果。吾人早已認識到此事態，但迄今仍未獲得重大進展。因此，當前在醫療上急迫需要有效治療腦轉移之新穎治療途徑及藥品。

下文之本發明內容論述與腦轉移相關之內皮素受體拮抗劑。內皮素-1(下文中稱為「ET-1」)係一種血管活性肽，

其主要在內皮、血管平滑肌及上皮細胞中產生。ET-1經由兩種高親和性G蛋白偶合受體發揮其生理學效應：內皮素-A(下文中稱為「ET_A」)及內皮素-B(下文中稱為「ET_B」)受體。內皮素受體拮抗劑(ERA)係得到認可之能夠抑制該等內皮素受體(下文中稱為「ETR」)之一類化合物。該類包括對ET_A或ET_B具有特異性之拮抗劑亞類及有效對抗二者之亞類(雙重特異性)。波生坦係該雙重特異性亞類之一個成員，其目前被批准用於治療肺動脈高血壓。

已針對在癌症療法中之使用對某些ERA進行研究。[Nelson JB等人，Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*，2008年11月1日；113(9):2376-8.；Chiappori AA等人，Phase I/II study of atrasentan, an ET_A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*，2008年3月1日；14(5):1464-9.]該等研究在很大程度上排除了患有現有腦轉移之患者。出處同上。此排除係基於現有腦轉移不會響應治療且因此由該等轉移引起之發病及症狀會掩蓋測試治療對原發性腫瘤之效果的普遍觀點。[Carden CP等人，Eligibility of patients with brain metastases for phase I trials: time for a rethink? *The Lancet Oncology*，第9卷，第10期，第1012-1017頁，2008年10月，數位物件識別符：10.1016/S1470-2045(08)70257-2.]該標準臨床試驗設

計策略突出了有效對抗原發性腫瘤且甚至非腦轉移腫瘤之療法不能有效治療腦轉移腫瘤之一般預期。

【發明內容】

定義

如本文所用，在申請專利範圍及/或說明書中，詞語「一(a或an)」在與術語「包含」結合使用時可意指「一個」，但亦與「一或多個」、「至少一個」及「一個或一個以上」之含義吻合。此外，術語「具有」、「含有」、「包括」及「包含」可互換，且熟習此項技術者應認識到該等術語係開放式術語。

本文所用之術語「治療(treating及treatment)」係指向個體投予治療有效之醫療干預(例如化學療法)以使個體之與癌症相關之參數得以改善。該改善係任何可觀察到或可量測之改善，包括癌症腫瘤大小之改變、癌症腫瘤生長速率之降低、或由癌症腫瘤引起之疼痛的主觀或客觀指標。因此，熟習此項技術者應認識到，治療可能改善患者之病狀但可能不能完全治癒疾病。

本文所用之術語「有效量」或「治療有效量」係指使疾病或病狀之症狀得以改善或醫治的量。

本文所用之術語「現有腦轉移腫瘤」係指被GFAP陽性星狀細胞包圍且浸潤有GFAP陽性星狀細胞之多細胞腦腫瘤及腦轉移。現有腦轉移性腫瘤具有兩種臨床上不同之類型：微轉移，其太小以致於不能藉由放射學手段看見；及可見轉移，該等腫瘤足夠大能夠藉由諸如磁共振成像、電

腦化斷層掃描或正子發射斷層掃描等臨床放射學手段辨別。該等轉移性病變與體循環中之轉移性癌細胞及滲入腦組織中或靜止停留於其中之單一癌細胞不同。[通常參見 Johanna A. Joyce及Jeffrey W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, Nat Rev Cancer 9, 239-252 (2009年4月)|數位物件識別符：10.1038/nrc2618.]本文所用之「微轉移」較佳定義為最大寬度尺寸大於0.2 mm及/或具有多於200個細胞至最大寬度2 mm之匯合癌細胞群。更佳地，「微轉移」定義為最大寬度介於0.2 mm至2 mm之間的匯合癌細胞群。參見The AJCC Cancer Staging Manual and Handbook，第7版(2010)，Edge, S.B.; Byrd, D.R.; Compton, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A.(編輯)，ISBN：978-0-387-88440-0。

本文所用之術語「星狀細胞調介之保護」係指星狀細胞降低化學品對與星狀細胞直接物理接觸之另一細胞類型之細胞毒性的能力。該物理接觸包括星狀細胞尤其經由縫隙連接通訊(GJC)與癌細胞連結。

本文所用之術語「細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡」係指藉由細胞毒性化學品誘導細胞凋亡或壞死性細胞死亡。大多數醫學上使用之化學治療劑以此方式行使快速殺死分裂之腫瘤細胞之職責。

本文所用之術語「內皮素受體拮抗劑」係指本身如業內所認識之一類化合物，且尤其係指當交付本專利申請案中所述之「用於測定ET_A或ET_B IC₅₀之測試」時具有等於或

小於 1 μM 之對抗 ET_A 、對抗 ET_B 或對抗 ET_A 及 ET_B 二者之 IC_{50} 的化合物。ERA 係阻斷內皮素受體與 ET-1 之相互作用或阻止 ETR 響應結合之 ET-1 的藥物。存在兩種主要的 ERA 種類：影響 ET_A 受體之選擇性 ERA，例如西他生坦 (sitaxentan)、安倍生坦 (ambrisentan) 及阿曲生坦 (atrasentan)；及影響 ET_A 及 ET_B 受體二者之雙重 ERA，例如波生坦。ERA 類化合物之實例性成員可參見 [HAM Mucke 「Small-molecule endothelin receptor antagonists: A review of patenting activity across therapeutic areas」 IDrugs 2009 12:366-375.] 中所引用之專利文獻。已在人類臨床試驗中進行研究或批准用於醫療使用之代表性 ERA 包括西他生坦、替唑生坦 (tezosentan)、克拉生坦 (clazosentan)、安倍生坦、波生坦、馬西替坦 (亦稱為 ACT-064992) 及/或阿曲生坦。

本文所用之術語「 ET_A 拮抗劑」係指當交付本專利申請案中所述之「用於測定 ET_A 或 ET_B IC_{50} 之測試」時具有等於或小於 1 μM 之對抗 ET_A 之 IC_{50} 的化合物。

本文所用之術語「 ET_B 拮抗劑」係指當交付本專利申請案中所述之「用於測定 ET_A 或 ET_B IC_{50} 之測試」時具有等於或小於 1 μM 之對抗 ET_B 之 IC_{50} 的化合物。

本文所用之術語「雙重內皮素受體拮抗劑」或「雙重 ERA」係指當交付本專利申請案中所述之「用於測定 ET_A 或 ET_B IC_{50} 之測試」時具有等於或小於 1 μM 之對抗 ET_A 之 IC_{50} 及等於或小於 1 μM 之對抗 ET_B 之 IC_{50} 的化合物。雙重

ERA包括波生坦及馬西替坦。

本文所用之術語「細胞毒性化學治療劑」係指誘導細胞凋亡或壞死性細胞死亡之物質。可與本發明ERA組合使用之細胞毒性化學治療劑的實例包括：

- 烷基化劑(例如氮芥(mechlorethamine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、環磷醯胺、異環磷醯胺、鏈脲菌素(streptozocin)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、美法侖(melphalan)、白消安(busulfan)、達卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺、噻替哌(thiotepa)或六甲蜜胺(altretamine))；
- 鉑藥物(例如順鉑、卡鉑(carboplatin)或奧沙利鉑(oxaliplatin))；
- 抗代謝物藥物(例如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、卡培他濱(capecitabine)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、胺甲喋呤(methotrexate)、吉西他濱(gemcitabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟達拉濱(fludarabine)或培美曲塞(pemetrexed))；
- 抗腫瘤抗生素(例如柔紅黴素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)、放線菌素-D(actinomycin-D)、博來黴素(bleomycin)、絲裂黴素-C(mitomycin-C)或米托蒽醌(mitoxantrone))；及
- 有絲分裂抑制劑(例如紫杉醇(paclitaxel)、多西他賽(docetaxel)、伊沙匹隆(ixabepilone)、長春鹼

(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、長春瑞濱(vinorelbine)、長春地辛(vindesine)或雌莫司汀(estramustine))；及

- 拓撲異構酶抑制劑(例如依託泊苷、替尼泊苷、托泊替康(topotecan)、伊立替康、二氟替康(diflomotecan)或依洛替康(elomotecan))。

「促敏感作用(Super-sensitization)」或「促敏感(Super-sensitize)」定義為與星狀細胞物理接觸時由細胞毒性化學治療劑引起之細胞死亡與不存在星狀細胞或與星狀細胞無直接物理接觸時所見之細胞死亡相比相對增加。

當提及治療用途時，「同時地」或「同時」在本申請案中意指所涉及治療用途係在相同時間經由相同途徑投予兩種或更多種活性成份。

當提及治療用途時，「單獨地」或「單獨」在本申請案中意指所涉及治療用途係在大約相同時間經由至少兩種不同途徑投予兩種或更多種活性成份。

所謂「經一段時間」治療性投予在本申請案中意指在不同時間投予兩種或更多種成份，且尤其意指一種投予方法，根據此方法，一種活性成份之整個投予完成之後再開始投予其他一或多種活性成份。如此，可投予一種活性成份達數天、數週或數月，然後投予其他一或多種活性成份。在此情形下，未實施同時投予。

揭示內容

在腦實質中，星狀細胞保持內穩態之作用已得到廣泛認

可。星狀細胞使用特化的終足(end-feet)包裹每一條血管且與其他腦細胞(例如神經元)進行通訊。此獨特結構使得星狀細胞能夠自循環轉運必需營養素(例如葡萄糖及胺基酸)至依賴的神經元，且最近顯示星狀細胞中之糖酵解可調控神經元活性，即所謂的「神經元-星狀細胞代謝偶合」。在病理條件(例如缺氧、缺血及變性病狀)下，星狀細胞會激活並表現稱為GFAP之蛋白。已顯示，GFAP反應性星狀細胞可保護神經元免於各種攻擊並拯救神經元脫離由麩胺酸鹽堆積而引起之興奮性中毒的危險。激活的星狀細胞亦可保護神經元免於由乙醇、過氧化氫及銅催化之半胱胺酸細胞毒性而引起之細胞凋亡。

臨床腦轉移通常被激活的(GFAP陽性)星狀細胞包圍且浸潤有該等星狀細胞。[Yoshimine T 等人 (1985) Immunohistochemical study of metastatic brain tumors with astroprotein (GFAP), a glia-specific protein. Tissue architecture and the origin of blood vessels. J Neurosurg 62: 414-418.]本發明者已證實此現象可在下文異種移植模型中再現。

下文提供本發明之各個實施例：

1)本發明首先係關於與細胞毒性化學治療劑、放射療法或二者組合用於預防或治療腦轉移之內皮素受體拮抗劑。

2)根據實施例1)之一個主要變化形式，內皮素受體拮抗劑將與細胞毒性化學治療劑組合使用。

3)根據實施例2)之一個子實施例，細胞毒性化學治療劑

包含(且尤其係)烷基化劑。

4)具體而言，實施例3)之烷基化劑選自由下列組成之群：氮芥、苯丁酸氮芥、環磷醯胺、異環磷醯胺、鏈脲菌素、卡莫司汀、洛莫司汀、美法侖、白消安、達卡巴嗪、替莫唑胺、噻替派及六甲蜜胺。

5)根據實施例2)之另一子實施例，細胞毒性化學治療劑包含(且尤其係)鉑藥物。

6)具體而言，實施例5)之鉑藥物選自由下列組成之群：順鉑、卡鉑及奧沙利鉑。

7)根據實施例2)之再一子實施例，細胞毒性化學治療劑包含(且尤其係)抗代謝物藥物。

8)具體而言，實施例7)之抗代謝物藥物選自由下列組成之群：5-氟尿嘧啶、卡培他濱、6-巰基嘌呤、胺甲喋呤、吉西他濱、阿糖胞苷、氟達拉濱及培美曲塞。

9)根據實施例2)之又一子實施例，細胞毒性化學治療劑包含(且尤其係)抗腫瘤抗生素。

10)具體而言，實施例9)之抗腫瘤抗生素選自由下列組成之群：柔紅黴素、多柔比星、表柔比星、伊達比星、放線菌素-D、博來黴素、絲裂黴素-C及米托蒽醌。

11)根據實施例2)之另一子實施例，細胞毒性化學治療劑包含(且尤其係)有絲分裂抑制劑。

12)具體而言，實施例11)之有絲分裂抑制劑選自由下列組成之群：紫杉醇、多西他賽、伊沙匹隆、長春鹼、長春新鹼、長春瑞濱、長春地辛及雌莫司汀。

13)根據實施例2)之再一子實施例，細胞毒性化學治療劑包含(且尤其係)拓撲異構酶II抑制劑。

14)具體而言，實施例13)之拓撲異構酶II抑制劑選自由下列組成之群：依託泊苷、替尼泊苷、托泊替康、伊立替康、二氟替康及依洛替康。

15)在實施例2)之一較佳子實施例中，細胞毒性化學治療劑選自由下列組成之群：紫杉醇、多柔比星、長春鹼、長春新鹼、5-氟尿嘧啶、順鉑、環磷醯胺、依託泊苷、替尼泊苷、絲裂黴素-C、伊立替康、長春瑞濱、異環磷醯胺及替莫唑胺(且尤其選自紫杉醇及替莫唑胺)。

16)具體而言，實施例15)之細胞毒性化學治療劑選自紫杉醇、替莫唑胺及紫杉醇與替莫唑胺之混合物。

17)根據實施例16)之一較佳變化形式，實施例16)之內皮素受體拮抗劑選自由下列組成之群：波生坦、馬西替坦及馬西替坦與波生坦之混合物(且特別為馬西替坦)。

18)本發明亦係關於與實施例2)至17)中之一者中所提及之至少一種細胞毒性化學治療劑及與放射療法組合使用之內皮素受體拮抗劑。

19)根據本發明之一較佳實施例，實施例1)至18)中所用之內皮素受體拮抗劑包含(且尤其係)雙重內皮素受體拮抗劑。

20)具體而言，實施例19)之雙重內皮素受體拮抗劑選自由下列組成之群：波生坦、馬西替坦及波生坦與馬西替坦之混合物。

21)在一尤佳實施例中，實施例20)之雙重內皮素受體拮抗劑係馬西替坦。

22)根據實施例1)至21)之一個變化形式，內皮素受體拮抗劑與細胞毒性化學治療劑係單獨投予。

23)根據實施例1)至21)之另一變化形式，內皮素受體拮抗劑與細胞毒性化學治療劑係同時投予。

24)根據實施例1)至21)之再一變化形式，內皮素受體拮抗劑與細胞毒性化學治療劑係經一段時間投予。

25)根據實施例1)之再一主要變化形式，內皮素受體拮抗劑將與放射療法(在這裏此放射療法較佳為全腦放射療法或立體定位性放射外科手術)組合使用。

26)根據本發明之一較佳實施例，實施例25)中所用之內皮素受體拮抗劑包含(且尤其係)雙重內皮素受體拮抗劑。

27)具體而言，實施例26)之雙重內皮素受體拮抗劑選自由下列組成之群：波生坦、馬西替坦及波生坦與馬西替坦之混合物。

28)在一尤佳實施例中，實施例27)之雙重內皮素受體拮抗劑係馬西替坦。

29)在本發明之另一主要變化形式中，根據實施例2)至23)之一與細胞毒性化學治療劑一起使用之內皮素受體拮抗劑將與放射療法(在這裏此放射療法較佳為全腦放射療法或立體定位性放射外科手術)一起使用。

30)本發明之另一主要變化形式(可與前述實施例1)至29)中之任一或多者組合)係內皮素受體拮抗劑用於治療個體

之現有腦轉移腫瘤，其中該現有腦轉移腫瘤係微轉移腫瘤，例如選自由下列組成之群之微轉移腫瘤：肺癌、乳癌、結腸癌、黑色素瘤或腎癌腦微轉移腫瘤。

31)本發明亦係關於抑制星狀細胞調介之對腦轉移細胞之保護的方法，該方法包含向腦轉移細胞及星狀細胞投予有效量之內皮素受體拮抗劑以抑制星狀細胞調介之保護。

32)本發明進一步係關於實施例31)之方法，其進一步包含向腦轉移細胞投予有效量之至少一種細胞毒性化學治療劑。

33)本發明另外係關於實施例31)之方法，其進一步包含使腦轉移細胞經受放射療法(在這裏此放射療法較佳為全腦放射療法或立體定位性放射外科手術)。

34)本發明另外係關於實施例31)之方法，其進一步包含向腦轉移細胞投予有效量之至少一種細胞毒性化學治療劑及使腦轉移細胞經受放射療法(在這裏此放射療法較佳為全腦放射療法或立體定位性放射外科手術)。

35)本發明另外係關於製造根據前述1)至34)中之任一者及其任一組合使用之藥劑的方法。較佳地，根據上文製造之藥劑進一步封裝於市售包裝中，並附有實施1)至34)中之一或多者及其任一組合之說明書。

【實施方式】

實驗部分

實驗1-腦轉移之免疫螢光分析。

材料及方法

實驗性腦轉移係藉由以下來產生：將人類肺腺癌細胞PC14Br4注射至裸小鼠之頸內動脈中(S1)。5週後殺死小鼠，並如前文所述在用於冷凍切片之OCT化合物中對組織試樣進行處理(S2)。將組織切片(8-10 μm)，固定於帶正電荷之載玻片上，並空氣乾燥30分鐘。利用由在丙酮、50:50 (v/v)丙酮:氯仿及丙酮之冰冷溶液中之三次連續浸沒(每次均5分鐘)組成之方案來實施組織固定。隨後將試樣用PBS洗滌三次，與於PBS中含有5%正常馬血清及1%正常山羊血清之蛋白質阻斷溶液在室溫下一起培育20分鐘，且隨後與1:400稀釋之兔抗-GFAP多株抗體(Biocare Medical, Concord, CA)在4°C下一起培育18小時。將試樣用PBS沖洗四次，每次持續3分鐘，且隨後與1:1500稀釋之山羊抗-兔Cy5抗體(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)一起培育1小時。使用相同濃度之同種型對照抗體及山羊抗-兔Cy5抗體來標記對照試樣。沖洗所有試樣且隨後與sytox綠色核酸染色劑(Eugene, OR)一起短暫培育。使用含有0.1 mol/L沒食子酸丙酯(Sigma)之甘油/PBS溶液固定載玻片以使螢光漂白降低至最低程度。在Zeiss LSM 510雷射掃描顯微鏡系統(Carl Zeiss公司，Thornwood, NY)上採集共焦圖像，該系統配備有電動Axioplan顯微鏡、氬氣雷射器、HeNe雷射器、LSM 510控制及圖像採集軟體及適當的濾光器(Chroma Technology公司，Brattleboro, VT)。

利用Photoshop軟體(Adobe Systems公司，Mountain

View, CA)製作18幅合成圖像。

結論

自以免疫組織化學方式反應之試樣的彩色圖像(未顯示)測定結果。腫瘤細胞被GFAP陽性(紅色)星狀細胞包圍且浸潤有該等星狀細胞。此實驗證實了先前的臨床腦轉移試樣浸潤有星狀細胞之觀察結果。使用同基因鼠科動物小鼠模型觀察到相同的GFAP陽性星狀細胞浸潤。在C57小鼠之腦中對小鼠Lewis肺癌(3LL)進行免疫組織化學分析。分裂的3LL細胞(PCNA陽性, 藍色)浸潤有激活的星狀細胞(GFAP陽性, 褐色)且被其包圍。總之, 該等實驗驗證鼠科動物-人類異種移植物模型可再現臨床人類試樣及同基因小鼠模型中所見之現象。因此, 本發明之一個態樣係可用於例如研究人類轉移性腦癌現象之活體內小鼠-人類腦轉移細胞模型。

實驗2-掃描電子顯微術研究

已經確定在腦轉移形成過程中鼠科動物星狀細胞以與原始人類臨床樣本中所見相同之方式在活體內與人類腫瘤細胞相互作用, 故本發明者在簡化之共培養系統中於活體外對該兩種細胞類型之相互作用進行了檢測。尚不確定該系統是否導致任何細胞與細胞相互作用, 對與上文所述活體內情形是否具有直接生理學相關性更知之甚少。因此, 人類轉移性癌細胞系與鼠科動物星狀細胞在活體外達成細胞間相互作用係令人驚奇之發現。

材料及方法

細胞系及培養條件。將人類乳癌細胞系MDA-231 (S3)、人類肺腺癌細胞系PC14Br4之腦轉移性變體(Si)及鼠科動物NIH 3T3成纖維細胞以單層培養物形式保持於完全鷹氏最低必需培養基(complete Eagle's minimum essential medium) (CMEM)中，該培養基補加有10%胎牛血清(FBS; HyClone, Logan, UT)、L-麩醯胺酸丙酮酸鹽、非必需胺基酸、兩倍維生素溶液及青黴素(penicillin)鏈黴素(streptomycin) (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA)。用於組織培養之所有試劑均不含內毒素，如藉由蠟變形細胞裂解物分析(Associate of Cape Cod, Woodshole, MA)所測定，且細胞系不含以下鼠科動物病原體：黴漿菌屬(Mycoplasma spp)、漢坦病毒(Hantan virus)、肝炎病毒、細小病毒、腺病毒(MAD1、MAD2)、巨細胞病毒、鼠痘病毒、乳酸脫氫酶升高病毒、多瘤病毒及仙台病毒(Sendai virus)(由 Research Animal Diagnostic Laboratory, University of Missouri, Columbia, MO進行分析)。用於此研究之細胞來自冷凍原液，且所有實驗均在解凍後之10次活體外傳代內實施。

鼠科動物星狀細胞之分離及保持。使溫度敏感性SV40大T抗原純合型新生小鼠(H-2Kb-tsA58小鼠；CBA/ca x C57BL/10 雜合體；Charles River Laboratories，Wilmington，MA)在二氧化碳室中無痛致死，並以標準方式製備用於手術之皮膚(S4)。使用無菌微型鑷子(Roboz Surgical Instrument公司，Gaithersburg, MD)自顱骨取皮

膚，並使用微型剪刀自左耳孔道至右耳孔道產生一個環狀後側切口。沿腦中線作另一切口，並將顱骨分開以能夠進入顱腔。剪斷視神經並使用平頭鑷子取出腦，並置於100 ml冰冷磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中。解剖整個新皮質，並取出海馬及內部結構，僅留下皮質層。揭掉腦膜，並使用解剖刀切碎皮質層，並在37°C下於含有0.1%膠原酶(150 U/ml; Worthington Biochemical公司, Lakewood, NJ)及40 pg/ml去氧核糖核酸酶(Sigma Chemical公司, St. Louis, MO)之杜貝克氏改良必需培養基(Dulbecco's modified essential medium) (DMEM)中消化30分鐘。隨後將皮質組織在含有10% FBS之DMEM中研磨並通過50 pm無菌篩網過濾。將所得單細胞懸浮液鋪板於75 cm²之先前已塗敷5 µg/ml小鼠層黏連蛋白(Sigma)之組織培養瓶上。使細胞在含有10% FBS及補加物(見上文)之DMEM中，在8%二氧化碳氛圍中(以在33°C下達成pH之適當緩衝)生長7天。此時，星狀細胞與於頂層生長之神經元、少突膠質細胞及纖維細胞形成匯合單層。藉由在溫暖室內，以250轉數/分鐘旋轉振盪燒瓶過夜，來移除該等雜質細胞。所得培養物由超過95%星狀細胞組成，如藉由使用針對GFAP之抗體之免疫反應性所測定。擴增該等培養物，重複該程序，且測定該等培養物中星狀細胞之百分比超過99%。

所培養腫瘤細胞及星狀細胞之掃描電子顯微鏡成像。將人類乳癌MDA-MB-231細胞及鼠科動物星狀細胞於含有5% FBS之DMEM中，以 2.4×10^4 個細胞之密度鋪板於24孔板

中之無菌玻璃蓋玻片上。48小時後，取出蓋玻片並在室溫下，在於0.1 M二甲基胂酸鹽緩衝液(pH 7.3)中含有3%戊二醛/2%多聚甲醛/7.5%蔗糖之溶液中固定1小時。隨後使用0.1 m二甲基胂酸鹽緩衝液洗滌試樣，並使用含有7.5%蔗糖之1%二甲基胂酸鹽緩衝之四氧化錳後固定1小時。使用0.1 M二甲基胂酸鹽緩衝液、隨後蒸餾水洗滌試樣，並繼續在黑暗中使用微孔過濾之水性1%鞣酸處理30分鐘，在黑暗中，於蒸餾水及微孔過濾之1%水性乙酸雙氧鈾中洗滌1小時。用蒸餾水徹底沖洗試樣，通過濃度連續遞增之乙醇脫水，且隨後各經5分鐘轉移至分級的濃度遞增系列之六甲基二矽氮烷中，並以空氣乾燥過夜。將試樣固定至先前已固定至鋁樣本座(Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA)上之雙層厚碳接頭片(tab)(Ted Pella公司，Redding，CA)上。隨後在真空中使用Balzer MED 010蒸發器(Technotrade International, Manchester, NH)使用鉑合金塗敷試樣，厚度為25 nm，且隨後立即在真空中快速塗敷碳。隨後將試樣轉移至乾燥器中待以後檢測使用。使用JSM-5910掃描電子顯微鏡(JEOL公司，Peabody，MA)以5 kV之加速電壓檢測試樣。

結論

結果顯示於圖1中。藉由掃描電子顯微術來評價MDA-MB-231乳癌細胞(T)及鼠科動物星狀細胞(A)之活體外培養物。星狀細胞(延伸之肢腳(extending pods-feet))與腫瘤細胞間之直接接觸較明顯。單一星狀細胞能夠接觸多個腫瘤

細胞。該等似乎為中樞神經系統之星狀細胞與神經元之間所見種類之完整形式的縫隙連接。使用黑色素瘤、乳癌及肺癌細胞系觀察到類似結果(未顯示)。

實驗3-縫隙連接分析

為進一步驗證圖1中所示縫隙連接之功能性質，本發明者實施染料轉移實驗以確定實驗2中所見之縫隙連接樣結構是否具有功能。

材料及方法

縫隙連接通訊。藉由流式細胞術量測染料轉移來分析受體腫瘤細胞(MDA-MB-231)與供體細胞(星狀細胞、3T3細胞、MDA-MB-231)間之縫隙連接通訊。簡言之，將受體細胞(300,000個細胞/孔)鋪板至6孔板中並培養過夜。此時，將供體細胞使用1 $\mu\text{g/ml}$ 綠色鈣黃綠素-AM (Molecular Probes)標記45分鐘，隨後充分洗滌。將供體細胞(60,000個細胞/孔)與受體細胞直接或於通透性支持物室(transwell chamber)(Transwell-Boyden室，0.4 μm 孔徑；Costar，Corning，NY)中共培養5小時。收穫細胞，洗滌，固定於乙醇中，並藉由流式細胞術進行分析。以偏移FITC峰之百分比來計算縫隙連接形成(S9-S11)。

結論

如圖2中所示，星狀細胞-轉移性癌細胞共培養物顯示共培養細胞間之染料轉移。因此，本發明者之共培養系統使得在鼠科動物星狀細胞與人類轉移性癌細胞系之間形成活性縫隙連接。對照通透性支持物實驗證實此為真正的細胞

與細胞相互作用。因此，本發明之第二態樣係可用於例如在可操作之離體環境中研究人類轉移性腦癌與星狀細胞之相互作用現象的活體外小鼠星狀細胞-人類轉移細胞共培養系統。

實驗4-化學保護分析

前述活體內模型系統及活體外細胞共培養系統之一主要用途係且將為腦轉移之化學抗性模型。由於基於細胞之共培養系統更適用於實驗操作，故實施進一步評估以確定基於細胞之培養系統是否能夠複製活體內所見之腦轉移化學抗性。

材料及方法

活體外共培養化學保護分析。如先前所述(S5, S6)，使用GFP基因轉染星狀細胞及NIH 3T3成纖維細胞。藉由短暫(2分鐘)暴露於存於0.1% EDTA/PBS溶液中之0.25%胰蛋白酶來自60-70%匯合培養物收穫目標腫瘤細胞、星狀細胞或3T3成纖維細胞。藉由輕輕敲打培養瓶來逐出細胞並再懸浮於CMEM中。將鼠科動物星狀細胞、3T3成纖維細胞及腫瘤細胞單獨或以腫瘤細胞/星狀細胞/3T3細胞1:2之比率作為共培養物鋪板於無菌6孔組織培養多孔培養皿之每一35 mm直徑孔中。使細胞在37°C之增濕培育箱中於6.4%二氧化碳加空氣之氛圍中黏附過夜。隨後洗滌培養物並與新鮮CMEM(陰性對照)或含有各種濃度之泰素(TAXOL)®(紫杉醇；NDC 0015-3476-30，Bristol-Myers Squibb，Princeton，NJ)及其他化學治療藥物(見下文)之培

養基一起培育。72小時後，分選出經GFP標記之星狀細胞或NIH 3T3細胞，並藉由碘化丙啶染色及FACS分析(見下文)來測定腫瘤細胞之凋亡分數。為測定腫瘤細胞與星狀細胞(或用作對照之成纖維細胞)間之直接接觸是否為誘導產生對化學療法之抗性的必要條件，使用Transwell-Boyden室實施共培養分析，即將腫瘤細胞鋪板於室中並將永生化星狀細胞(ImmortalAstrocyte)(或成纖維細胞)鋪板於孔中。培育72小時後，如下文所述來測定腫瘤細胞之相對凋亡指數。

在第二組活體外研究中，測定星狀細胞調介之對腫瘤細胞對化學治療藥物之抗性的誘導是暫時的抑或持久的。將人類肺癌PC14Br4細胞與星狀細胞或3T3成纖維細胞在單獨培養基或含有5 ng/ml紫杉醇之培養基中共培養。72小時後，藉由FACS將星狀細胞或3T3細胞與腫瘤細胞分開，並藉由如下文所述之碘化丙啶染色在多個孔中測定腫瘤細胞之相對凋亡指數。自平行孔收穫存活之腫瘤細胞，並將其再鋪板於不同之星狀細胞或3T3細胞單層上。該等共培養物係腫瘤細胞首先與星狀細胞共培養且隨後與星狀細胞或3T3細胞共培養之培養物，或為腫瘤細胞首先與3T3細胞一起培養且隨後與3T3細胞或星狀細胞一起培養之培養物。第二輪共培養則接受含有5 ng/ml紫杉醇之培養基。72小時後，藉由碘化丙啶染色及FACS分析來測定腫瘤細胞之相對凋亡指數。

碘化丙啶染色及FACS分析之準備。將每一培養皿之含有

浮游細胞之上清液培養基收集至15 ml尖底離心管中。藉由使細胞短暫暴露於存於含有0.1% EDTA/PBS之溶液中的0.25%胰蛋白酶來收穫附著的細胞。將細胞與對應上清液培養基合併。藉由在100 g下離心5分鐘使試樣沉澱。將沉澱物再懸浮於10 ml HBSS中，並在100 g下再離心5分鐘使其沉澱。藉由渦旋來再懸浮試樣，並將細胞在室溫下於1 ml 1%多聚甲醛中固定10分鐘。隨後將試樣轉移至聚丙烯微量離心管中，並在1 ml PBS中洗滌固定的細胞，且隨後在10,000 g下離心1分鐘使其沉澱。藉由渦旋來再懸浮沉澱物，並將細胞在1 ml乙醇中於-20°C下固定過夜。

隨後對細胞實施渦旋，並藉由微量離心機在10,000 g下離心1分鐘使其沉澱。隨後對試樣實施渦旋，並將沉澱物再懸浮於300含有RNA酶(15 µg/ml；目錄號為A7973，Promega，Madison，WI)之碘化丙啶(50 µg/ml；目錄號為P4864，Sigma)中且於其中在37°C下染色20-30分鐘。最後將試樣轉移至5 ml塑膠培養管中以使用Coulter EPICS細胞計數器(Beckman Coulter公司，Fullerton，CA)實施FACS分析。藉由比較腫瘤細胞之凋亡指數/腫瘤細胞及永生化星狀細胞或腫瘤細胞及NIH 3T3成纖維細胞之凋亡指數x 100 (%)來測定相對凋亡指數(S7)。

結論

將人類MDA-MB-231乳癌細胞或人類PC14Br4肺癌細胞與星狀細胞(3T3成纖維細胞並不如此)一起培養可降低與紫杉醇(5 ng/ml)一起培育72小時之腫瘤細胞的相對凋亡

指數(即增加化學抗性)，分別降低 $58.3 \pm 8.9\%$ (平均值 $\pm$ S.D.， $P < 0.01$)及 $61.8 \pm 6.7\%$ (平均值 $\pm$ S.D.， $P < 0.05$)(藉由 Student t 檢驗來比較凋亡指數)(圖3)。此降低依賴於腫瘤細胞與星狀細胞間之直接接觸。本發明者得出此結論係基於顯示以下的數據：當藉由半透性膜(Transwell-Boyden 室，0.4 μ m 孔徑膜；Costar，Corning，NY)將腫瘤細胞與星狀細胞分開時未觀察到星狀細胞之化學保護效應。將腫瘤細胞與3T3成纖維細胞共培養未保護腫瘤細胞對抗化學療法(圖3)。使人類腫瘤細胞與替代對照(使用分離自 H-2k^b-tsA58 小鼠之成纖維細胞)共培養同樣未保護腫瘤細胞對抗化學治療劑(數據未顯示)。利用標準MTT分析測定細胞毒性程度(數據未顯示)觀察到類似結果。[Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG(1991年7月)「Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.」*Cancer Communications* 3 (7): 207-212.]

該等數據驗證本文所揭示之基於細胞的共培養系統可再現腦轉移化學抗性現象。因此，該共培養系統之出乎意料的複製化學抗性之能力使其非常適用於研究化學抗性機制及用於消除現有活體內腦轉移之化學抗性的潛在治療干預。

為擴展該等初始實驗，本發明者對數種其他化學治療劑進行了測試，該等治療劑係使用至今之主要藥物種類的代表。將人類肺癌PC14Br4細胞單獨或與星狀細胞(直接細胞

與細胞接觸)一起在含有P-糖蛋白相關阿黴素(Adriamycin) (200 ng/ml)、紫杉醇(5 ng/ml)、長春鹼(3 ng/ml)、長春新鹼(8 ng/ml)及P-糖蛋白相關5-FU (500 ng/ml)或順鉑(2.4 μ g/ml)之培養基中進行培養。與星狀細胞共培養誘導顯著($P<0.01$)之對抗所有藥物之保護(圖4)。此出人意料之發現進一步驗證了該基於細胞之共培養系統。該細胞培養系統證實星狀細胞以與臨床環境中活體內所見腦轉移化學抗性完全相當之方式誘導之化學抗性的穩健。因此，本發明之第三態樣係基於活體外細胞之化學抗性分析，其可用於例如研究星狀細胞調介之保護腦轉移細胞免於細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡的現象。在特定實施例中，可利用該基於活體外細胞之化學抗性分析來篩選一或多種候選化學治療劑以評估星狀細胞調介之對抗化學治療劑之細胞毒性效應之保護的程度。

概述於圖5中之其他實驗證實，星狀細胞調介之保護腦轉移細胞免於細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡在直接星狀細胞-腦轉移細胞接觸喪失後持續不會長於72小時。此外，已喪失藉由先前星狀細胞接觸而獲得之保護效應的細胞可藉由與星狀細胞第二次共培養以重新獲得星狀細胞調介之對抗化學治療劑之細胞毒性效應的保護而重新被保護。此反映了原發性腫瘤及甚至其他非腦轉移具有化學應答性而其衍生之腦轉移具有化學抗性之臨床觀察結果。

實驗5-星狀細胞調介之化學抗性的機制

本發明者應用上文基於細胞之化學抗性分析來研究該現

象之潛在可能機制。利用基因表現分佈分析(profiling)加上西方墨點法證實蛋白質產生來研究星狀細胞調介之保護腦轉移細胞免於細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡。

材料及方法

藉由RNA微陣列分析之基因表現分佈。在第一組實驗中，將MDA-MB-231或PC14Br4細胞單獨、與鼠科動物星狀細胞一起、或與NIH 3T3成纖維細胞一起在35 mm直徑之6孔板(目錄號為353046, BD Falcon TM, San Jose, CA)中進行培育。為確定細胞與細胞接觸，腫瘤細胞與鼠科動物星狀細胞或NIH 3T3細胞之比率係1:2。72小時後，藉由FACS分選出經GFP標記之鼠科動物星狀細胞或成纖維細胞，並對腫瘤細胞進行處理以用於微陣列分析。在第二組實驗中，測定與腫瘤細胞對化學治療藥物之抗性有關之基因表現是否依賴於與星狀細胞之連續接觸。將MDA-231或PC14Br4細胞與鼠科動物星狀細胞或NIH 3T3細胞一起共培養72小時。分選出鼠科動物星狀細胞或NIH 3T3細胞，並對腫瘤細胞進行處理以藉由微陣列分析來測定基因表現分佈，或將腫瘤細胞鋪板以與鼠科動物星狀細胞或成纖維細胞進行第二輪共培養。因此，首先與鼠科動物星狀細胞一起培養之腫瘤細胞再次與鼠科動物星狀細胞或成纖維細胞共培養，且反之，最初與成纖維細胞一起培養之腫瘤細胞再次與成纖維細胞或星狀細胞共培養。培育72小時後，分選出鼠科動物星狀細胞或成纖維細胞，並對腫瘤細胞進行處理以用於微陣列分析。

微陣列分析。按照製造商方案 (Illumina 公司, San Diego, CA) 使用總 RNA (500 ng) 進行標記及雜交。簡言之, 使用 IlluminaR Total Prep RNA 擴增套組 (Applied Biosystem, Austin, TX) 自總 RNA 製備 cDNA。然後, 實施活體外轉錄以將生物素標記之核苷酸納入 cRNA 中, 在 37°C 下持續 4 小時。根據製造商說明書使總共 1500 ng 生物素標記之 cRNA 與 Illumina 之 SentrixR 人類 6-v2 表現珠粒晶片 (Expression BeadChip) 在 58°C 下雜交過夜 (16 小時)。使用 1 µg/ml 花青 3- 抗生蛋白鏈菌素 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 來檢測雜交之生物素化 cRNA, 並使用 Illumina 珠粒陣列讀取器 (BeadArray Reader) (Illumina 公司) 來掃描珠粒晶片。使用 Bead Studio 3.7 (Illumina 公司) 來抽取微陣列數據的結果, 且不進行任何規範化或背景扣除。利用分位數規範化方法在 R 之 LIMMA 程式包中 (www.r-project.org) 對基因表現數據進行規範化 (S12)。將各基因之表現量轉化成 log2, 隨後實施進一步分析。為選擇出在兩個組織群組中差異表現之基因, 吾人使用 BRB 陣列工具 (Array Tools) (v 3.6; Biometrics Research Branch, National Cancer Institute, Bethesda, MD) 中之類別比較工具 (class comparison tool) 作為兩試樣 t-檢驗並估計 FDR 之方法。

西方墨點分析。利用西方墨點法來證實微陣列之結果。簡言之, 使用 1 ml 含有蛋白酶抑制劑混合物 (Roche, Indianapolis, IN) 之裂解緩衝液 (10 mM Tris [pH 8.0]、1 mM EDTA、0.1% SDS、1% 去氧膽酸鹽、1% NP40、0.14

M NaCl、1 $\mu\text{g/ml}$ 亮抑蛋白酶肽、1 $\mu\text{g/ml}$ 抑肽酶及1 $\mu\text{g/ml}$ 胃酶抑素)來製備藉由FACS分選出之腫瘤細胞的全細胞裂解物。藉由在4-12% Nu-PAGE凝膠(Invitrogen)上實施電泳來分離含有等量蛋白質(30 μg)之試樣，並轉移至硝酸纖維素膜上。使用含有5%無脂奶之TTBS (TBS+ 0.1% Tween 20)阻斷後，將膜在4°C下與抗BCL2小鼠單株抗體(1:1,000, BD PharMingen, San Diego, CA)、抗BCL2L1兔多株抗體(1:1,000, Cell Signaling, Beverly, MA)、抗TWIST兔多株抗體(1:1000, Cell Signaling)、抗麩胱甘肽S-轉移酶小鼠單株抗體(1:1,000, BD PharMingen)及抗 β -肌動蛋白小鼠單株抗體(Sigma)一起培育過夜。隨後將墨點暴露於偶聯辣根過氧化物酶之二級抗體(1:3000)，並藉由Amersham (Piscataway, NJ)之增強之化學發光系統來顯現。藉由剝下墨點並使用抗- β -肌動蛋白抗體再次實施探測來證實等蛋白質加載量。

統計學分析。對基因表現分佈進行統計學分析時，將各基因之表現量轉化成 $\log_2$ ，隨後實施進一步分析。測定在與不同宿主細胞共培養之腫瘤細胞間差異表現基因之統計學顯著性所用的方法係用於兩試樣t-檢驗並估計FDR之BRB陣列工具(v3.6; Biometrics Research Branch, National Cancer Institute, Baltimore, MD)中之類別比較工具。藉由單變量檢驗(兩試樣t檢驗)與多變量置換檢驗(10,000次隨機置換)來選擇用於文氏圖(Venn diagram)之基因。使用小於0.001之截止P-值來保留在所檢測兩個組織群組間表現顯著

不同之基因。

結論

本發明者藉由應用兩試樣t檢驗($P < 0.001$)來識別在與星狀細胞共培養後表現通常改變之腫瘤細胞基因。利用該程序，本發明者在MDA-MB-231細胞中識別出1069種差異表現之基因，而在PC14Br4細胞中識別出594種差異表現之基因(圖7)。兩基因列示比較揭示已知與抗-細胞凋亡及存活有關之數種基因的表現增加：麩胱甘肽S轉移酶5(GSTA5)、BCL2L1、TWIST(圖7)。藉由西方墨點分析在蛋白質層面上來證實該等基因之表現(圖8)。隨後本發明者測定與星狀細胞(成纖維細胞並不如此)共培養之腫瘤細胞的經改變基因表現模式是持久的抑或暫時的。本發明者將腫瘤細胞與星狀細胞或成纖維細胞共培養一個週期，且隨後收穫腫瘤細胞，並將其鋪板以與星狀細胞或成纖維細胞進行第二輪共培養。當自兩個共培養實驗週期採集基因表現數據時，第二輪共培養對癌細胞基因表現模式之影響佔優勢。與第一輪共培養條件無關，在第二週期中與星狀細胞共培養之癌細胞呈現在第一週期培養實驗中檢測到之特徵性基因表現信號(GSTA5、BCL2L1及TWIST高表現)，而在第一輪中與星狀細胞共培養之癌細胞在第二輪中與成纖維細胞共培養時喪失特異性基因表現信號(圖9)。該結果與概述於圖5中之活體外化學保護分析結果類似，且證實腫瘤細胞之基因表現模式依賴於與星狀細胞之持續接觸。在第二輪中與星狀細胞共培養之腫瘤細胞亦表現高含量之

TCF4、CD24、CARD14及EFNB2基因(數據未顯示)。臨床研究已顯示，該等基因之腫瘤細胞表現與預後較差有關。因此，本發明之第四態樣係涉及分子診斷作業之基於活體外細胞之化學抗性分析，其可用於例如在離體環境中研究星狀細胞調介之保護腦轉移細胞免於細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡的現象。在某些實施例中，分子診斷作業係一或多個基因表現分佈分析步驟及細胞蛋白質濃度之分析。在具體實施例中，利用預定的基因表現信號來評價實驗干預之(例如)消除星狀細胞調介之保護的效果。本發明之第五態樣係基因表現信號或蛋白質含量分佈的組合，其指示星狀細胞調介之保護腦轉移細胞免於細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡。第六態樣係如上文所述及例示產生該基因信號或蛋白質含量分佈的方法。

實驗6-腫瘤細胞及星狀細胞之內皮素受體的表現

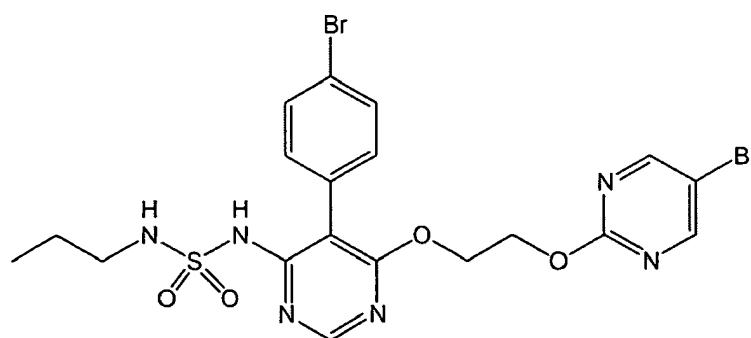
將300,000個MDA-MB-231人類乳癌細胞與600,000個經GFP標記之星狀細胞或與經GFP標記之3T3成纖維細胞一起培養24小時。隨後收集細胞並實施分選以分離MDA-MB-231細胞。提取蛋白質，藉由西方墨點法進行分析，並與抗-ET_AR抗體雜交。顯示於圖10中之數據明確表明，與星狀細胞共培養之腫瘤細胞表現高含量之ET_AR。

在下一組研究中，將10,000個經GFP標記之MDA-MB-231細胞與20,000個星狀細胞在腔室載玻片中共培養。24小時後，將培養物用泰素(15 ng/ml)處理24小時，且隨後針對磷酸化之pAKT進行染色(4% PFA固定)。如圖11中所

示，與星狀細胞(及泰素)共培養之腫瘤細胞表現高含量之pAKT。因此，與星狀細胞共培養使得腫瘤細胞之ETR及與腫瘤細胞對化學治療藥物之抗性增加有關之存活因子的表現增加。使用抗-ET_BR抗體之類似研究揭示ET_BR之表現。

實驗7-內皮素受體拮抗劑不產生對抗腫瘤細胞之細胞毒性效應

利用上文所述之基於活體外細胞的化學抗性分析方案，本發明者測試了兩種具有ET_AR及ET_BR雙重親和性之內皮素受體拮抗劑，以評估星狀細胞調介之對抗化學治療劑之細胞毒性效應之保護的程度。所測試之一種ETR拮抗劑係波生坦，其由EMEA批准用於治療肺動脈高血壓(PAH)。所測試之第二種藥物稱為ACT-064992，其係波生坦之亦具有ET_AR/ET_BR雙重親和性的衍生物。ACT-064992之正式名稱係馬西替坦，且具有結構[N-[5-(4-溴苯基)-6-(2-(5-溴嘧啶-2-基氧基)乙氧基)-嘧啶-4-基]-N'-丙基胺基磺醯胺]：



馬西替坦

Iglarz M等人，Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist, J

Pharmacol Exp Ther. 2008年12月;327(3):736-45。電子出版於2008年9月9日。有關ACT-064992分子、其合成及其藥理學活性之最早揭示內容可參見WO02/053557。ACT-064992與波生坦相比醫藥活性大約強三倍(即，其需要後者劑量的1/3)。本文之詳細數據參考ACT-064992實驗，然而藉由較高劑量之波生坦實驗獲得類似結果。

將ACT-064992 (100 nM)添加至上文所述之基於細胞之共培養分析中，保持48小時，其中腫瘤細胞:星狀細胞或腫瘤細胞:3T3成纖維細胞之比率為1:2，且如上文所述量測細胞凋亡程度。如圖12(MDA-231乳癌)及圖13(PC14肺癌)中所示，單獨添加ACT-064992或與星狀細胞或與3T3成纖維細胞一起未產生任何可量測之細胞毒性效應。

實驗8-內皮素受體拮抗劑與化學治療劑組合

上文所示ETR拮抗劑作為單一藥劑化學療法無效。此陰性結果使得ETR拮抗劑作為組合療法之組份時所觀察到之顯著效果非常出人意料。在共培養實驗中，細胞培養比率係1:2腫瘤細胞:星狀細胞(50,000:100,000)，且使用紫杉醇(泰素(TAXOL)®)(6 ng/ml)及/或ACT-064992 (100 nM)處理48小時(圖15；* $p < 0.01$)。使用MDA-MB-231細胞進行對照實驗時，發生與先前實驗中相同之星狀細胞所調介對抗紫杉醇之保護作用。自該等組合實驗獲得兩個令人驚奇之結果。第一，在缺少星狀細胞之對照組中，紫杉醇與ACT-064992之組合所造成之細胞死亡未比單獨使用紫杉醇時顯著增加。在至少三個獨立實驗中觀察到此結果(圖15)。使

用人類肺癌細胞PC14Br4時再現該等結果(圖16)。因此，在測試條件下，組合中之ETR拮抗劑同樣無效，與在實驗6中作為單一藥劑時所觀察到的一樣。在腫瘤細胞-星狀細胞共培養物中，ACT-064992顯示出人意料之消除星狀細胞所調介對抗紫杉醇之保護作用的能力。甚至更令人驚奇的是，與不含星狀細胞之對照實驗相比，ACT-064992竟然增強紫杉醇之功效，促使轉移性腫瘤細胞對紫杉醇超敏感。向星狀細胞與腫瘤細胞之共培養物中添加ACT-064992會抑制存活因子pAKT及pMAPK之表現(圖17)。此抑制與化學治療藥物所介導之腫瘤細胞死亡增加直接相關。由於缺少星狀細胞之實驗未展示一樣的加性效應，故此協同作用甚至更令人驚奇。該等引人注目的結果顯示本文所揭示新穎共培養篩選方法之重要性，此乃因組合療法中ETR拮抗劑之效果未出現在缺少共培養星狀細胞之標準腫瘤細胞系分析方案中。因此，本發明之第七態樣係使用內皮素受體拮抗劑與一或多種其他細胞毒性化學治療劑及/或放射療法之組合來治療個體之現有腦轉移腫瘤。在特定實施例中，此組合療法促使現有腦轉移對與ETR拮抗劑共投予之細胞毒性化學治療劑及/或放射療法超敏感。

針對現有腦轉移之活體內內皮素受體拮抗劑療法

內皮素受體拮抗劑及共投予之化學治療劑的活體內遞送可藉由相同的先前提出且在先前臨床試驗中用於此類化合物各個成員之經口及/或全身遞送來達成。該等治療方案之提出及最優化在業內係常規程序。[Clinical trials: a

practical guide to design, analysis and reporting, Ameet Bakhai及Duolao Wang編輯. Remedica, London 2005.]對腦癌而言特異性之一個問題係血腦屏障之影響。儘管長期以來此問題一直作為阻礙全身治療用於腦轉移之一個技術問題被提及，但業內現已認識到，甚至在微轉移中血腦屏障也部分被破壞。[Cavaliere R.及Schiff D., Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality? Neurosurg Focus. 2007年3月15日;22(3):E6.]因此，可以合理地預期內皮素受體拮抗劑之全身遞送將透入腦轉移腫瘤且對其產生治療效果。另外，某些內皮素受體拮抗劑家族成員具有跨過甚至完整血腦屏障之能力，由此使其尤其適用於活體內腦轉移腫瘤療法。[Vatter H等人，Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. J Neurosurg. 2005年6月;102(6):1108-14.]最後，在轉移性腫瘤之大小使得直接腫瘤輸注或注射內皮素受體拮抗劑可行的情況下，該途徑可能適宜。

用於小鼠腦轉移之活體內療法

為進一步驗證內皮素受體拮抗劑療法對現有腦轉移之功效，本發明者使用小鼠實施實例性活體內實驗。經由頸內動脈給裸小鼠注射10,000個能存活之MDA231細胞。初步病理學工作顯示在注射後兩週形成可見的確定轉移(數據

未顯示)。因此，本發明者在此時間點開始治療。

實驗9-ACT-064992及替莫唑胺對活體內腫瘤生長之影響

將10,000個能存活之MDA231細胞注射至裸小鼠之頸內動脈中。在注射後兩週時治療組係：對照(媒劑)(圖18A)；替莫唑胺(「TMZ」)，以10 mg/kg每天經口投予一次(圖18B)；ACT-064992，以50 mg/kg每天經口投予一次(圖18C)；或TMZ+ ACT-064992之組合(圖18D)。

在治療第28天殺死所有小鼠。將腦切片固定並染色。以目測方式評價腦轉移。實例性樣本以相同的放大倍率顯示於圖18A-D中。在圖18E中可更詳細地觀察到，與單獨TMZ相比，TMZ與ACT-064992之組合顯著降低轉移腫瘤之大小及密度。此表明，上文所述之細胞培養系統結果與觀察到之活體內效果直接相關。

實驗10-ACT-064992及紫杉醇對活體內腫瘤生長之影響

將10,000個能存活之MDA231細胞注射至雌性裸小鼠(10-12週齡)之頸內動脈中。在注射後兩週，當腦轉移已確立時，將小鼠隨機分成四個治療組(n=10)：1)對照(注射媒劑溶液)；2)紫杉醇(以8 mg/kg每週經腹膜內投予一次)；3)ACT-064992(以50 mg/kg每天經口投予一次)；及4) ACT-064992與紫杉醇之組合。在治療28天後對所有小鼠施以無痛致死，並進行屍體剖檢。採集腦以用於組織學研究及免疫組織化學。實例性結果顯示於圖19中。對照(19A)、ACT-064992 (19B)及紫杉醇(19C)皆具有非常確定之轉移性腫瘤。相比之下，ACT-064992+紫杉醇群組(19D)具有遠遠

較小之腫瘤細胞集落。

使用替莫唑胺及紫杉醇之結果表明，內皮素受體拮抗劑療法通常使腦轉移對化學治療劑敏感。

實驗 11-ACT-064992 及紫杉醇對活體內腫瘤細胞增殖之影響

針對 CD31(內皮細胞標記)及 Ki67(細胞增殖標記)對四個治療組之代表性腦切片進行染色。對照小鼠、僅使用紫杉醇或僅使用 ACT-064992 治療之小鼠的腦含有大量增殖細胞。與此形成鮮明對比的是，使用紫杉醇及 ACT-064992 二者治療之小鼠的腦僅含有少數分裂細胞。分別見圖 20A、B、C 及 D。

實驗 12-ACT-064992 及紫杉醇對活體內腫瘤細胞凋亡之影響

藉由原位末端去氧核苷酸轉移酶 dUTP 切口末端標記法 (TUNEL) 對不同治療組小鼠之腦切片進行分析。Negoescu A 等人，J Histochem Cytochem. 1996 年 9 月;44(9):959-68. 對照、泰素治療及 ACT-064992 治療小鼠之腦均具有很少至無凋亡細胞。圖 21A-C。與此形成鮮明對比的是，使用 ACT-064992 加泰素之組合治療之小鼠的腦具有大量凋亡腫瘤細胞(綠色)及內皮細胞(黃色)(圖 21D)。

實驗 13

對四個治療組小鼠之腦切片進行免疫染色，ETAR(紅色)及磷酸絲胺酸(綠色)共區域化產生橙-黃色。對照腦表現磷酸化之 ETAR，此與使用紫杉醇治療之小鼠的腦一樣(圖

22A-B)。單獨使用 ACT-064992 治療及使用 ACT-064992+ 紫杉醇治療阻止 ETAR 磷酸化。(圖 22C-D)。該結果證實內皮素受體拮抗劑活性與轉移性腫瘤對化學治療劑之敏感作用的相關性。

用於測定 ET_A 或 ET_B IC_{50} 之測試：

實施競爭結合研究時，使用表現人類重組 ET_A 或 ET_B 受體之 CHO 細胞的膜。製備重組 CHO 細胞之微粒體膜，並如先前所述實施結合分析 (Breu V. 等人，FEBS Lett. (1993), 334, 210)。

該分析係在 200 μ L 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中於聚丙稀微量滴定板中實施，該緩衝液包括 25 mM $MnCl_2$ 、1 mM EDTA 及 0.5% (w/v) BSA。將含有 0.5 μ g 蛋白質之膜與 8 pM [^{125}I] ET-1 (4000 cpm) 及增加濃度之未經標記拮抗劑一起在 20°C 下培育 2 h。分別在不含有及含有 100 nM ET-1 之試樣中估計最大及最小結合。2 h 後，在含有 GF/C 過濾器 (Unifilterplates，來自 Canberra Packard S.A. Zürich, Switzerland) 之過濾板上過濾該等膜。向每一孔中添加 50 μ L 閃爍混合劑 (MicroScint 20, Canberra Packard S.A. Zürich, Switzerland)，並在微板計數器 (TopCount, Canberra Packard S.A. Zürich, Switzerland) 中對過濾板實施計數。

所有測試化合物均溶解、稀釋及添加於 DMSO 中。該分析係在 2.5% DMSO 存在下實施，已發現其不會明顯干擾結合。 IC_{50} 計算為抑制 50% 之 ET-1 的特異性結合之拮抗劑濃度。

背景參考文獻：

1. HAM Mucke 「 Small-molecule endothelin receptor antagonists: A review of patenting activity across therapeutic areas」 IDrugs 2009 12:366-375。
2. Yoshimine T等人，(1985) Immunohistochemical study of metastatic brain tumors with astroprotein (GFAP), a glia-specific protein. Tissue architecture and the origin of blood vessels. J Neurosurg 62: 414-418。
3. Nelson JB 等人，Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. Cancer. 2008年11月1日;113(9):2376-8。
4. Chiappori AA 等人，Phase I/II study of atrasentan, an endothelin A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2008年3月1日;14(5):1464-9。
5. Carden CP 等人，Eligibility of patients with brain metastases for phase I trials: time for a rethink? The Lancet Oncology，第9卷，第10期，第1012-1017頁，2008年10月，數位物件識別符：10.1016/S1470-2045(08)70257-2。
6. Johanna A. Joycel及Jeffrey W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, Nature Reviews Cancer 9,

239-252(2009 年 4 月)|數位物件識別符：10.1038/nrc2618。

7. Cavaliere R.及 Schiff D. , Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality? Neurosurg Focus. 2007年3月15日; 22(3):E6。
8. Vatter H 等人 , Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. J Neurosurg.2005年6月; 102(6):1108-14。
9. Iglarz M 等人 , Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist, J Pharmacol Exp Ther. 2008 年 12 月;327(3):736-45。電子出版於2008年9月9日。
10. WO 02/053557。

技術參考文獻：

- S. Yano 等人 , Clin. Cancer Res. 6, 957-965 (2000)。
- S. J. Kim 等人 , J Natl. Cancer Inst. 98, 783-793 (2006)。
- D. Chelouche Lev 等人 , Clin. Cancer Res. 11, 306-314 (2005)。
- R. R. Langley 等人 , Cancer Res. 64, 3727-3730 (2004)。
- T. Dull 等人 , I Virol. 72, 8463-8471 (1998)。

J. Galipeau 等人，Cancer Res. 59, 2384-2394 (1999)。

L. Zamai 等人，Cytometry 44, 57-64 (2001)。

D. Fan 等人，Cancer Res. 50, 3619-3626 (1990)。

M. H. Wade, J. E. Trosko, M. Schindler, Science 232, 525-528 (1986)。

J. H. Lin 等人，Nat. Neurosci. 1, 494-500 (1998)。

P. C. Fonseca 等人，Cytometry 69A, 487-493 (2006)。

B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Astrand, T. P. Speed, Bioinformatics 19, 185-193 (2003)。

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG(1991年7月)。

「Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.」Cancer communications 3 (7): 207-12。

Clinical trials: a practical guide to design, analysis and reporting，Ameet Bakhai及Duolao Wang編輯。Remedica, London 2005。

Negoescu A 等人，J Histochem Cytochem. 1996年9月;44(9):959-68。

所有引用或與本文有關之參考文獻的全文且尤其是引用時所針對之任何具體資訊皆以引用方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1：藉由掃描電子顯微術來評價MDA-MB-231乳癌細胞(T)及鼠科動物星狀細胞(A)之活體外培養物。星狀細胞(延伸之肢腳)與腫瘤細胞間之直接接觸較明顯；

圖 2：星狀細胞-轉移性癌細胞共培養物顯示共培養細胞間之染料轉移；

圖 3：將人類MDA-MB-231乳癌細胞或人類PC14Br4肺癌細胞與星狀細胞(3T3成纖維細胞並不如此)一起培養可降低與紫杉醇(5 ng/ml)一起培育72小時之腫瘤細胞的相對凋亡指數(增加抗性)，分別降低 $58.3 \pm 8.9\%$ (平均值 $\pm$ S.D.， $P < 0.01$)及 $61.8 \pm 6.7\%$ (平均值 $\pm$ S.D.， $P < 0.05$)(藉由 Student t 檢驗來比較凋亡指數)；

圖 4：將人類肺癌PC14Br4細胞單獨或與星狀細胞(直接細胞與細胞接觸)一起在含有P-糖蛋白相關阿黴素(200 ng/ml)、紫杉醇(5 ng/ml)、長春鹼(3 ng/ml)、長春新鹼(8 ng/ml)及P-糖蛋白相關5-FU (500 ng/ml)或順鉑(2.4 μ g/ml)之培養基中進行培養；

圖 5：星狀細胞調介之保護腦轉移細胞免於細胞毒性化學療法誘導之細胞死亡在直接星狀細胞-腦轉移細胞接觸喪失後持續不會長於72小時；

圖 6：鼠科動物與人類mRNA之基因轉錄分佈分析條件不同；

圖 7：在MDA-MB-231細胞中有1069種基因差異表現，而在PC14Br4細胞中有594種基因差異表現。兩基因列示比較揭示已知與抗-細胞凋亡及存活有關之數種基因的表現增加：麩胱甘肽S轉移酶5 (GSTA5)、BCL2L1、TWIST；

圖 8：藉由西方墨點分析在蛋白質層面上來證實數種抗-細胞凋亡及存活基因之表現；

圖 9：自兩個共培養實驗週期採集基因轉錄數據；

圖 10：與星狀細胞共培養之MDA-MB-231人類乳癌細胞中ETA-R之表現增加，但與成纖維細胞(3T3)共培養者並不如此；

圖 11：與星狀細胞/泰素共培養之MDA-MB-231人類乳癌細胞的pAKT表現；

圖 12：單獨添加ACT-064992至MDA-MB-231人類乳癌細胞中或與星狀細胞或與3T3成纖維細胞一起未產生任何可量測之細胞毒性效應；

圖 13：單獨添加ACT-064992至PC14肺癌細胞中或與星狀細胞或與3T3成纖維細胞一起未產生任何可量測之細胞毒性效應；

圖 14A-D：在數種轉移性腦癌之活體內實驗模型中針對ET_AR及ET_BR進行免疫染色顯示與腫瘤而非正常腦組織特定相關之相對高表現；

圖 15：紫杉醇與ACT-064992之組合療法用於與星狀細胞或3T3成纖維細胞共培養之MDA-MB-231人類乳癌細胞；

圖 16：紫杉醇與ACT-064992之組合療法用於與星狀細胞或3T3成纖維細胞共培養之人類肺癌細胞PC14Br4；

圖 17：向星狀細胞與腫瘤細胞之共培養物中添加ACT-064992抑制存活因子pAKT及pMAPK之表現；

圖 18：固定腦切片並染色以使腦轉移可見。對照(媒介)(圖 18A)；替莫唑胺(「TMZ」)，以10 mg/kg每天經口投予一次(圖 18B)；ACT-064992，以50 mg/kg每天經口投

予一次(圖 18C)；或 TMZ+ACT-064992 之組合(圖 18D)；
TMZ+ACT-064992 之組合，在較高放大倍率下(圖 18E)；

圖 19：固定腦切片並染色以使腦轉移可見。A. 對照(注射媒劑溶液)；B. 紫杉醇(以 8 mg/kg 每週經腹膜內投予一次)；C. ACT-064992(以 50 mg/kg 每天經口投予一次)；及 D. ACT-064992 與紫杉醇之組合；

圖 20：針對 CD31(內皮細胞標記)及 Ki67(細胞增殖標記)對四個治療組之代表性腦切片進行染色：A. 對照小鼠；B. 僅用紫杉醇治療之小鼠；C. 僅用 ACT-064992 治療之小鼠；D. 用紫杉醇及 ACT-064992 治療之小鼠；

圖 21：藉由原位末端去氧核苷醣轉移酶 dUTP 切口末端標記法(TUNEL)對不同治療組小鼠之腦切片進行分析：A. 對照；B. 用紫杉醇治療；C. 用 ACT-064992 治療；D. 用 ACT-064992 加紫杉醇之組合治療；

圖 22：對四個治療組小鼠之腦切片進行免疫染色，ET_A(紅色)及磷酸絲胺酸(綠色)共區域化產生橙-黃色。A. 對照腦；B. 用紫杉醇治療之小鼠的腦；C. 僅用 ACT-064992 治療之小鼠的腦；D. 用 ACT-064992+紫杉醇治療之小鼠的腦。

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99126507

C07D403/04 (2006.01)

※申請日： 99. 8. 9

C01D 403/12 (2006.01)

※IPC 分類：A61K31/506 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

Ab/p³⁵/_∞ (2006.01)

以內皮素受體抑制劑處理星狀腫瘤細胞

TREATMENT OF ASTROCYTES-TUMOR CELLS WITH INHIBITORS
OF ENDOTHELIN RECEPTORS

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種內皮素受體拮抗劑，其係與細胞毒性化學治療劑、放射療法或二者組合用於預防或治療腦轉移。該內皮素受體拮抗劑可為例如波生坦(bosentan)、馬西替坦(macitentan)或波生坦與馬西替坦之混合物。

三、英文發明摘要：

The disclosure relates to an endothelin receptor antagonist for use in the prevention or treatment of brain metastases in combination with a cytotoxic chemotherapy agent, radiotherapy or both. The endothelin receptor antagonist may for example be bosentan, macitentan or a mixture of bosentan and macitentan.

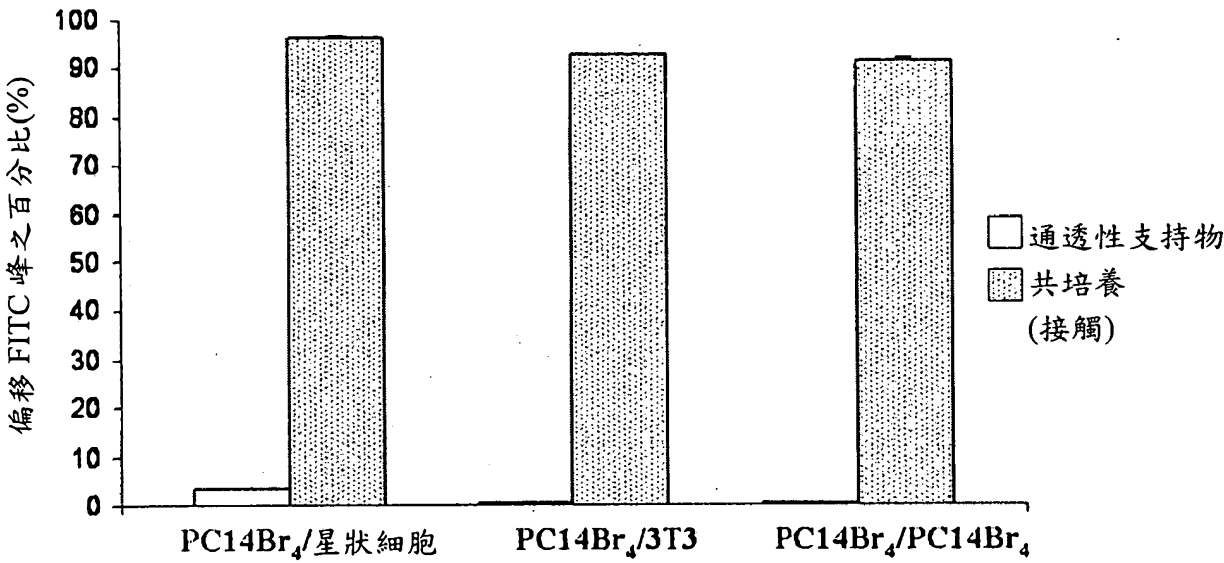


圖 2

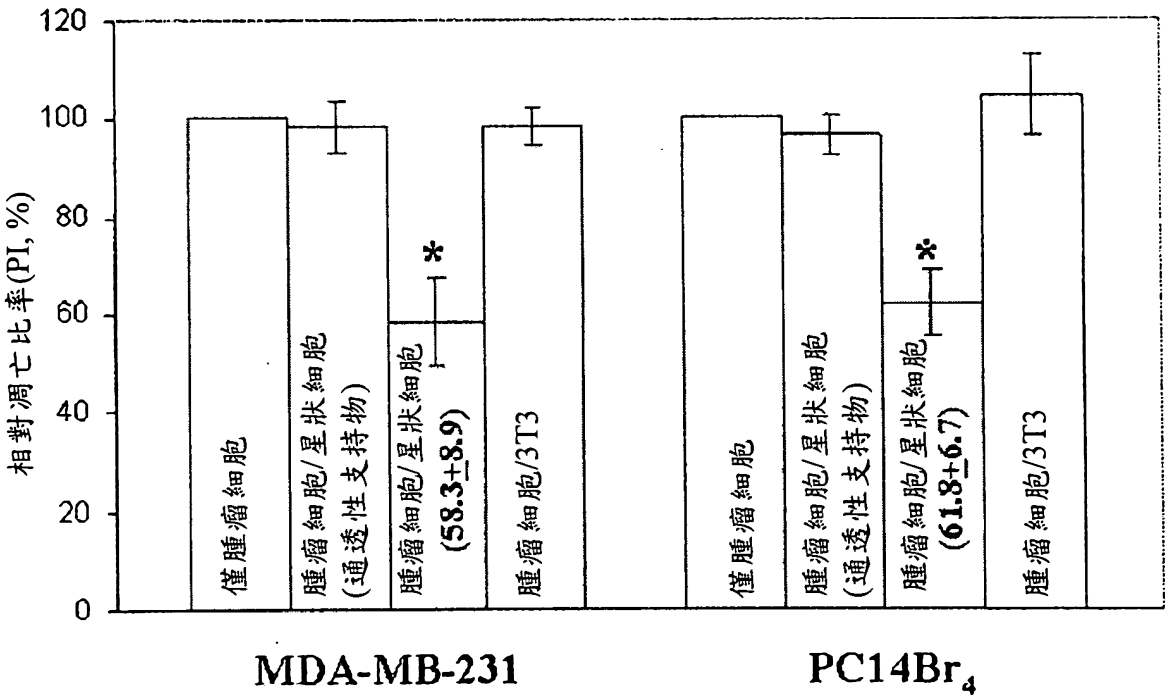


圖 3

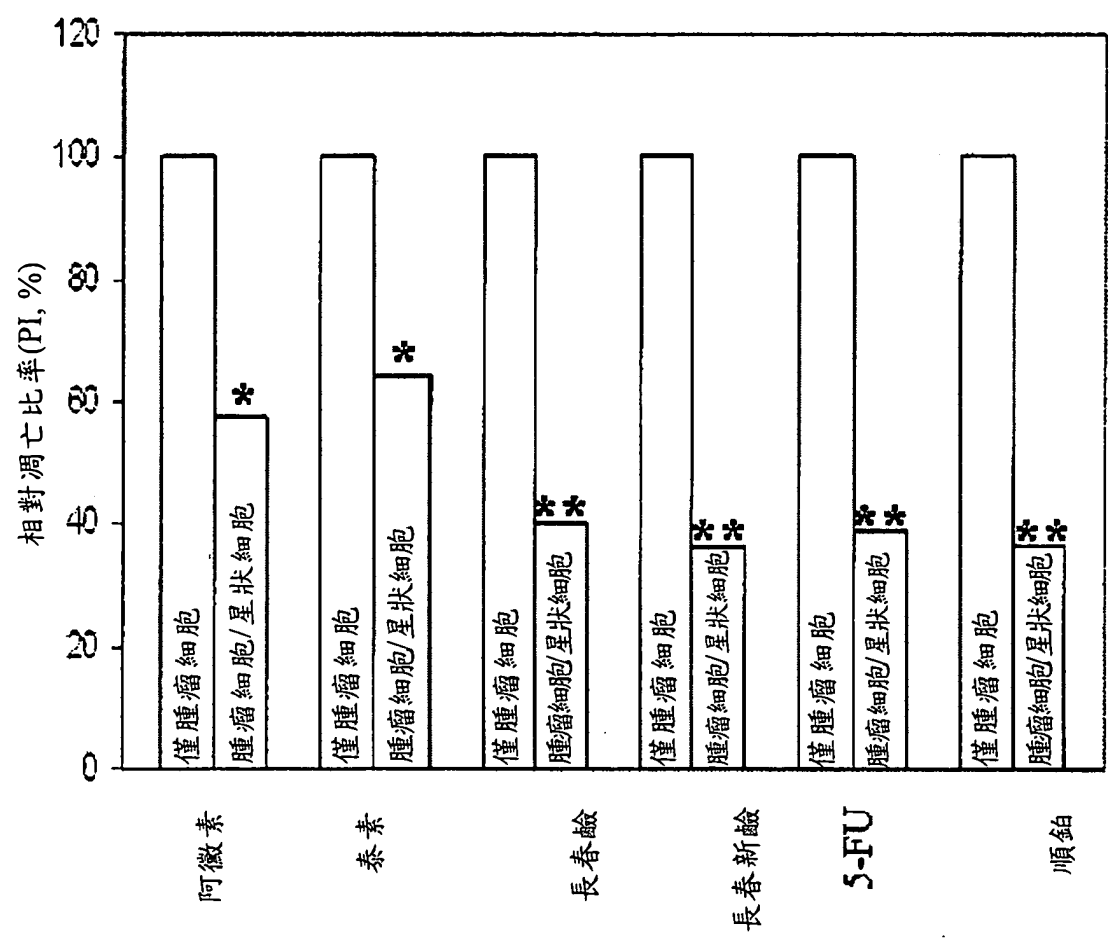


圖 4

星狀細胞調介之保護腫瘤細胞對抗化學療法

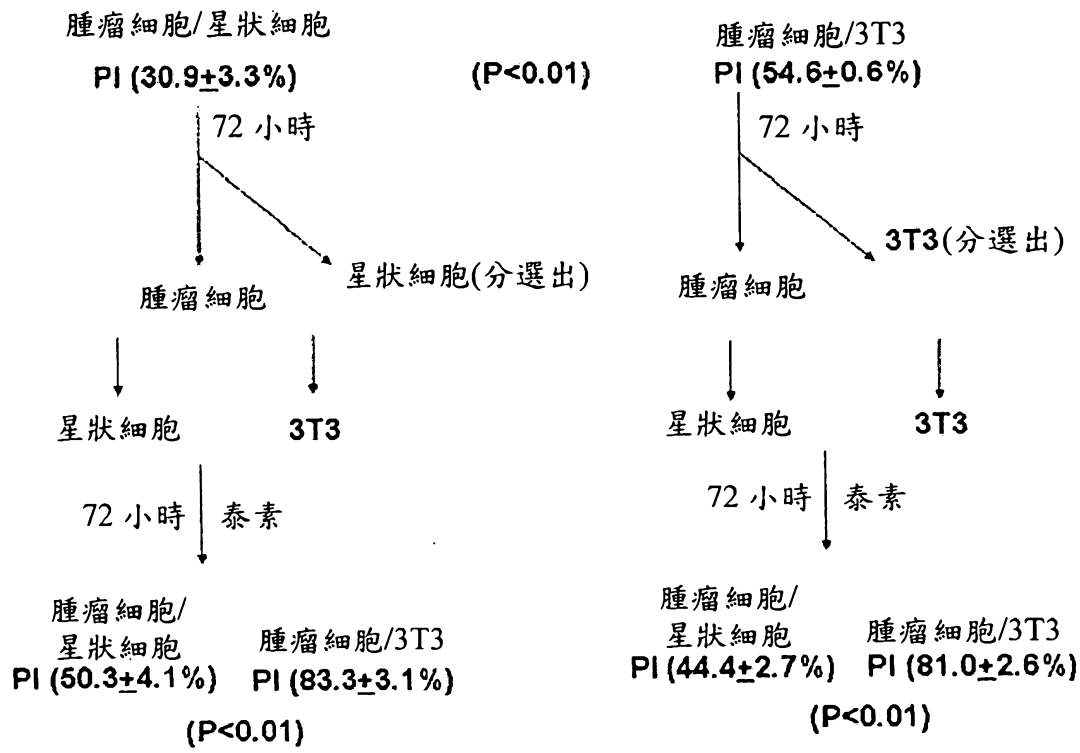


圖 5

四、指定代表圖：

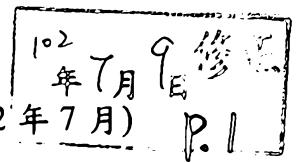
(一)本案指定代表圖為：第 (15) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)



七、申請專利範圍：

1. 一種馬西替坦用於製造預防或治療腦轉移的藥劑之用途，其中該藥劑與選自於紫杉醇、替莫唑胺及紫杉醇與替莫唑胺之混合物之細胞毒性化學治療劑、與放射療法、或與放射療法及選自於紫杉醇、替莫唑胺及紫杉醇與替莫唑胺之混合物之細胞毒性化學治療劑兩者組合用於製造預防或治療腦轉移的藥劑。
2. 如請求項1之用途，其中該藥劑係與選自於紫杉醇、替莫唑胺及紫杉醇與替莫唑胺之混合物之細胞毒性化學治療劑組合。
3. 如請求項1之用途，其中該藥劑係與放射療法組合。
4. 如請求項3之用途，其中該放射療法係全腦放射療法或立體定位性放射外科手術。
5. 如請求項1之用途，其中該藥劑係與放射療法及選自於紫杉醇、替莫唑胺及紫杉醇與替莫唑胺之混合物之細胞毒性化學治療劑兩者組合。
6. 如請求項1至5中任一項之用途，特徵在於降低腦轉移之風險及/或減低腦轉移之擴張速率。