



(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 I735413 B

(45) 公告日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 11 日

(21) 申請案號：104117852

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 02 日

(51) Int. Cl. : A61K31/496 (2006.01)

A61K31/5415 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P35/04 (2006.01)

(30) 優先權：2014/06/02 美國

62/006,630

(71) 申請人：國立陽明交通大學 (中華民國) NATIONAL YANG MING CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

臺北市北投區立農街 2 段 155 號 (陽明校區)

(72) 發明人：黃奇英 HUANG, CHI-YING (TW)；張牧新 CHANG, PETER MU-HSIN (TW)；陳冠宇 CHEN, KUAN-YU (TW)；吳駿翹 WU, CHUN-HUNG (TW)；鄭大山 CHENG, TAI-SHAN (TW)；余晟豪 YU, CHENG-HAO (TW)

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：7 共 33 頁

(54) 名稱

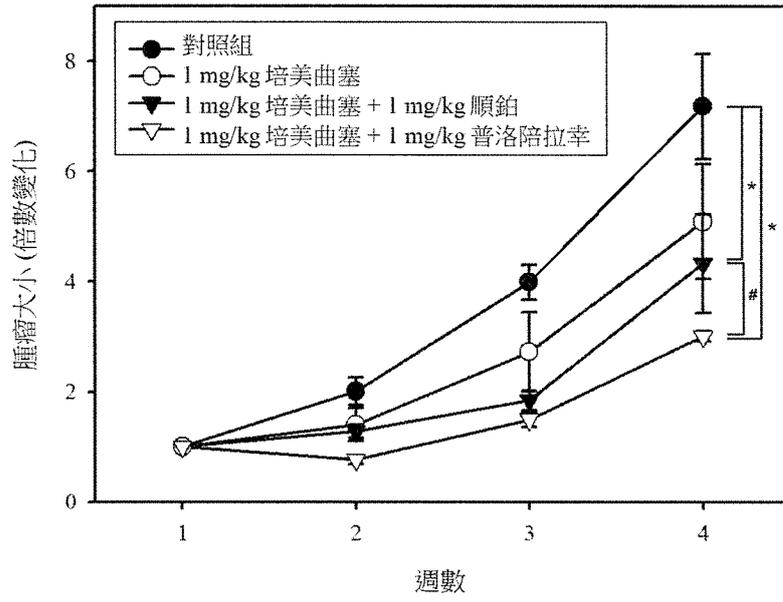
抗藥性癌症之治療方法

(57) 摘要

本發明係有關一種治療具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體之方法，包含對該個體組合投予一治療有效量之普洛陪拉幸(prochlorperazine)或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及該化療藥物。本發明亦有關一種以普洛陪拉幸及化療藥物組合之組合預防癌症轉移之方法。

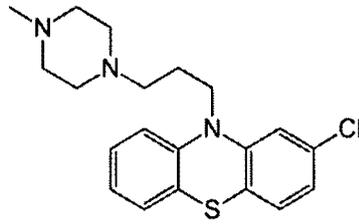
The present invention relates to a method for treating a subject with a cancer resistant to a chemotherapeutic drug comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of prochlorperazine or its analog or metabolite, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination of the chemotherapeutic drug. The present invention also relates to a method for preventing cancer metastasis with the combination of prochlorperazine in combination of a chemotherapeutic drug.

指定代表圖：



【圖3B】

特徵化學式：



【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗藥性癌症之治療方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR TREATING DRUG RESISTANT CANCER

【中文】

本發明係有關一種治療具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體之方法，包含對該個體組合投予一治療有效量之普洛陪拉幸(prochlorperazine)或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及該化療藥物。本發明亦有關一種以普洛陪拉幸及化療藥物組合之組合預防癌症轉移之方法。

【英文】

The present invention relates to a method for treating a subject with a cancer resistant to a chemotherapeutic drug comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of prochlorperazine or its analog or metabolite, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in combination of the chemotherapeutic drug. The present invention also relates to a method for preventing cancer metastasis with the combination of prochlorperazine in combination of a chemotherapeutic drug.

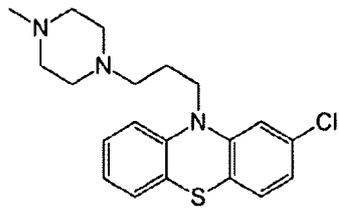
【指定代表圖】

【圖3B】

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗藥性癌症之治療方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR TREATING DRUG RESISTANT CANCER

【參考相關申請案】

【0001】 本申請案係主張於2014年6月2日提申之美國臨時專利申請號62/006,630之優先權，其揭示內容在此併入本案以作為參考資料。

【技術領域】

【0002】 本發明係有關以止吐藥(anti-emetic drug)與化療藥物組合治療抗藥性癌症之方法。

【先前技術】

【0003】 化學療法，具體而言是與抗癌藥劑之組合，為非定域腫瘤之治療選擇，該腫瘤無法以手術或放射線治療。然而，一些病患甚至於很短時間內復發，且對第二療程之化療無反應。

【0004】 大多數惡性腫瘤對細胞毒性藥物展現某些敏感性。據此，以該些藥物治療通常能緩解並使腫瘤收縮，其可能持續數週至數月。儘管如此，在許多情況下，腫瘤會再生，且此再生對進一步之細胞毒性療法具抗性。

【0005】 理論上，藉組合投予不同作用方式之藥物，應能解決此問題。此療法係基於在相同細胞自發性出現二或多個不同藥物之抗藥性之機率極小。合併性化學治療(combination chemotherapy)似乎能避免抗藥性腫瘤細胞的問題。

【0006】 後續研究係針對與抗癌藥物組合投藥之方法。新開發之藥物及數十年前之合併性化學治療，於一些兒童白血病及何杰金氏病(Hodgkin's disease)

產生高治癒率。然而，主要致死癌症，如肺癌、乳癌、及腸胃道癌症，仍對化療具抗性。合併性化學治療之失效未被釐清。為解釋該現象，有許多理論被提出，但該些理論中僅少數可被適當驗證。

【0007】 儘管治療癌症之醫藥組合物之開發已有長足進展，新的抗藥性癌症之治療方法仍是需要的。

【發明內容】

【0008】 根據本發明，意外發現，普洛陪拉幸(prochlorperazine)與化療藥物之組合展現出協同效應，可減少癌細胞之體積與數目，且抑制具抗藥性之癌細胞之生長。

【0009】 在一方面，本發明係提供一種治療具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體之方法。該方法包含對該個體組合投予一治療有效量之普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及化療藥物。

【0010】 再一方面，本發明提供一種預防癌症轉移之方法。該方法包含對有需求之個體組合投予一治療有效量之普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及化療藥物。

【0011】 又一方面，本發明提供一種醫藥組合物或組合，以治療具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體或預防癌症轉移，其包含一治療有效量之普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及與化療藥物之組合，及與化療藥物之組合。

【0012】 又另一方面，本發明係提供一種普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，用於製造治療具有對化療藥物具抗藥性的癌症之個體之藥劑，並與化療藥物組合之用途。

【0013】 又再一方面，本發明提供一種普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，用於製造預防癌症轉移之藥劑，並與化療藥物組合之用途。

【0014】 於本發明之一具體實施例，化療藥物係選自於由吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)、培美曲塞(pemetrexed)、順鉑(cisplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、歐洲紫杉醇(docetaxel)、吉西他濱(gemcitabine)、長春瑞賓(navelbine)、伊立替康(irinotecan)、阿瓦斯丁(avastin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、胺甲喋呤(methotrexate)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、替加氟-吉瑪瑞西-歐特拉西兒(tegafur-gimeracil-oteracil potassium ; TS-1)、表皮生長因子受體(EGFR)-酪胺酸激酶抑制劑及其組合組成之群組。

【圖式簡單說明】

【0015】 前面之摘錄，以及本發明之下列詳盡說明，結合附圖時將被更好地理解。於圖式中：

【0016】 圖1顯示普洛陪拉幸誘導肺鱗狀細胞癌細胞株CL152球體細胞凋亡，且結合吉西他濱可協同性增進細胞毒性；其中

【0017】 圖1A顯示以普洛陪拉幸治療48小時後，收集肺鱗狀上皮細胞癌細胞株CL152球體並以流式細胞儀分析。普洛陪拉幸導致劑量依賴性增加之細胞凋亡。

【0018】 圖1B顯示普洛陪拉幸與吉西他濱對於肺鱗狀上皮細胞癌細胞株CL152球體具協同效應。

【0019】 圖1C顯示於普洛陪拉幸治療後，普洛陪拉幸抑制細胞遷移。

【0020】 圖1D顯示普洛陪拉幸增加 β -半乳糖苷酶陽性細胞之數目，且於以普洛陪拉幸處理24小時的A549細胞誘導老化。肺腺癌細胞株A549細胞以50 μ M白藜蘆醇(resveratrol)處理，作為老化(senescent)陽性對照組。

【0021】 圖2顯示普洛陪拉幸減少癌症類幹細胞之百分比，且強化化療藥劑與吉非替尼誘導之細胞毒性；其中

【0022】 圖2A顯示普洛陪拉幸減少肺腺癌細胞株CL141癌症類幹球體細胞之細胞存活，且增進培美曲塞之抗癌活性；

【0023】 圖2B顯示普洛陪拉幸減少肺腺癌細胞株CL97癌症類幹球體細胞之細胞存活，且增進吉非替尼之抗癌活性；

【0024】 圖2C顯示普洛陪拉幸抑制肺腺癌細胞株HCC827細胞之球體形成活性，且增進順鉑之抗癌活性；

【0025】 圖2D顯示普洛陪拉幸抑制非小細胞肺癌細胞株H1299細胞之球體形成活性，且增進順鉑之抗癌活性；

【0026】 圖3係提供體內監測普洛陪拉幸介導之抗腫瘤功效，其係單獨及與標準化療藥劑組合；其中：

【0027】 圖3A顯示 5×10^5 個H441腫瘤實質細胞係皮下注射至NOD/SCID小鼠右腹側，其隨後分成載體組(對照組)及普洛陪拉幸組(5 mg/kg/天，每週5次)。以測徑器測量腫瘤負荷(tumor burden)，並繪製隨時間之腫瘤大小倍數變化；我方初步結果證實，於此濃度時，單獨之普洛陪拉幸抑制(或延緩)體內腫瘤形成。於後續實驗中，我方以普洛陪拉幸及標準化療藥劑之組合探討腫瘤抑制功效。

【0028】 圖3B指出，相較於對照組、培美曲塞單獨組(1 mg/kg，每週5次)、及培美曲塞(1 mg/kg，每週5次)與順鉑(1 mg/kg，每週2次)之組合組，培美曲塞(1 mg/kg，每週5次)與普洛陪拉幸之組合組(1 mg/kg，每週5次)提供最顯著之腫瘤抑制功效。

【0029】 圖3C顯示腺癌腫瘤模式之實驗結果，其中以標準化療法係培美曲塞(50 mg/kg)與順鉑(3 mg/kg)之組合；且結果顯示，以普洛陪拉幸(5 mg/kg)加入標準療法產生最小腫瘤負荷，接著為普洛陪拉幸單獨組(5 mg/kg)、培美曲塞(50 mg/kg)與順鉑之組合組(3 mg/kg)、及載體對照組。

【0030】 圖3D顯示以標準治療及吉西他濱與順鉑之組合於鱗狀模式之實驗結果；其指出，以普洛陪拉幸(5 mg/kg)加入標準治療(60 mg/kg吉西他濱與3 mg/kg順鉑之組合)提供最大腫瘤抑制功效，接著為普洛陪拉幸單獨組(5 mg/kg)、吉西他濱與順鉑組合組、及載體對照組。

【0031】 圖3E顯示以吉非替尼加上普洛陪拉幸於吉非替尼抗藥性NSCLC模式之治療結果；其中吉非替尼(100 mg/kg)與普洛陪拉幸(5 mg/kg)之組合組顯示最高程度之腫瘤抑制，接著為普洛陪拉幸單獨組(5 mg/kg)；吉非替尼單獨組(100 mg/kg)及載體對照組顯示相似之腫瘤負荷。

【0032】 圖4提供一些影像，顯示以普洛陪拉幸用於肺鱗狀細胞癌病患之個案研究結果，其中，該病患為右下肺罹患肺鱗狀細胞癌之81歲男性，並轉移至右上肺。病患由於咳血，故右下肺原發病灶接受放射線治療；接著自2010年5月19日起接受Tarceva™ (含厄洛替尼為活性成分)。病情維持穩定且首次CT顯示0.5 cm之右上肺轉移。此病灶於2013年5月20日發展為2 cm，伴隨惡化之咳嗽與呼吸困難。由於高齡且整體狀況差，該病患選擇繼續服用Tarceva™，且僅加入普洛陪拉幸。於服用普洛陪拉幸後，咳嗽與呼吸困難獲改進，且三個月後之追蹤CT顯示病情穩定。療法繼續，直到2014年6月10日之最終追蹤CT，顯示腫瘤惡化。病患死於2014年終。

【0033】 圖5提供一些影像，顯示以普洛陪拉幸用於肺腺癌病患之個案研究結果。具EGFR-L858R突變之肺腺癌病患(50歲女性，LUL)，自2012年起首先以吉非替尼治療(具惡性胸腔積液)，且自2013年8月24日起以培美曲塞治療。病

患之後於2013年11月11日服用普洛陪拉幸伴隨培美曲塞。療法繼續，直到2014年7月19日之最終追蹤CT，顯示腫瘤及胸腔積液明顯減少。病患現仍存活。

【0034】 圖6提供一些影像，顯示以普洛陪拉幸用於戒指細胞癌病患之個案研究結果。戒指細胞癌病患(58歲女性)，具多重腹腔內轉移，其平均中位數存活期為7-8個月，係自2012年7月16日起以數種化療藥物治療(順鉑、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、吉西他濱、阿瓦斯丁、TS-1、奧沙利鉑、紫杉醇/5-氟尿嘧啶、及阿瓦斯丁/吉西他濱/TS-1)。病患於2013年2月25日服用普洛陪拉幸。療法繼續，直到2014年6月18日之最終追蹤CT，顯示腫瘤穩定。病患死於2014年終。

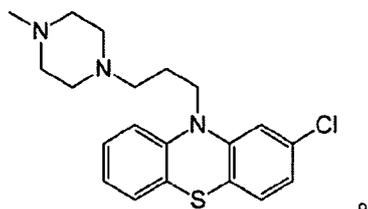
【0035】 圖7A及圖7B顯示臨床過程及添加普洛陪拉幸作為維持療法。所有個案係根據臨床指導方針治療。所有病患之預期壽命低於3個月。加入普洛陪拉幸以作為搶救治療，延長其有效時間以防抗藥性。此維持療法之目的為協助控制疾病免於惡化，使病患活得更久。於普洛陪拉幸治療後，客觀反應率(objective response rate；ORR)、無惡化存活期(progression-free survival；PFS)、及整體存活期(overall survival；OS)顯示，使用維持治療的確有效維持疾病狀態穩定且延長存活期。中位數ORR為-6.2% (-79.8%~4.3%)。於普洛陪拉幸治療後，中位數PFS及OS分別為12.8 (7.0-20.1)個月及13.5 (7.4-21.4)個月。

【實施方式】

【0036】 除非另有定義，本文使用之所有技術性及科學性術語，具有本發明領域具通常知識者所能常規理解的意義。

【0037】 除非另有指明，本文使用之單數形式「一」、「一者」、及「該」包括複數參考體。因此，舉例而言，參考「一樣本」包括複數個本領域具通常知識者習知之此類樣本及其等同物。

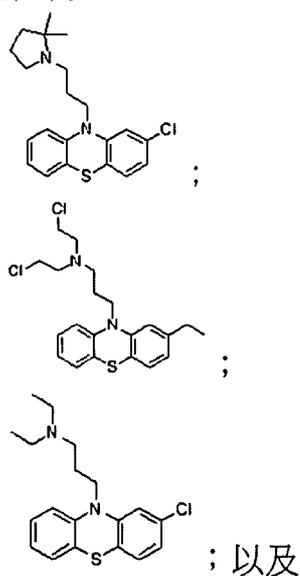
【0038】 本文使用之「普洛陪拉幸」乙詞是指多巴胺(D2)受體拮抗劑，其係用於噁心及眩暈之止吐治療。普洛陪拉幸之結構為

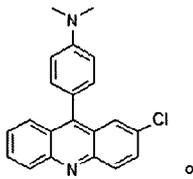


【0039】 本文使用之「醫藥上可接受鹽類」乙詞是指普洛陪拉幸之任何醫藥上可接受鹽類。醫藥上可接受鹽類包括銨鹽、鹼金屬鹽如鉀及鈉(包括單、二、三鈉)鹽(其係較佳)、鹼土金屬鹽如鈣及鎂鹽、有機鹼鹽如二環己基胺鹽、N-甲基-D-葡萄糖胺、及胺基酸鹽如精胺酸、離胺酸等。

【0040】 本文使用之「代謝物」乙詞是指代謝作用之任何中間物及產物。普洛陪拉幸代謝物之一些實例包括但不侷限於，N-去甲基普洛陪拉幸、普洛陪拉幸亞砒、及普洛陪拉幸亞砒4'-N-氧化物。於一特定實例，該代謝物為N-去甲基普洛陪拉幸。

【0041】 本文使用之「類似物」乙詞是指任何具相同功能或活性之化學結構改變之化合物。普洛陪拉幸類似物之一些實例包括但不侷限於，具下列結構之化合物：





【0042】 本文使用之「個體」乙詞是指任何溫血物種，如人類及動物。欲根據本發明治療之個體(如人類)實際上可為任何人類群體、男性或女性之個體，其可分成孩童、成人、或老年人。該些病患族群之任一者係與本發明之具體實施例相關。

【0043】 本發明提供一種具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體之治療方法。本方法包含投予該個體一治療有效量之普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，並結合化療藥物。

【0044】 於本發明之一些實例，普洛陪拉幸與化療藥物之組合呈現協同效應，減少癌細胞之大小及數目。於本發明之其他實例，普洛陪拉幸與化療藥物之組合呈現協同效應，抑制癌細胞生長。

【0045】 本文使用之「化療藥物」乙詞是指任何提供抗癌功效之藥物，包括但不限於，吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、培美曲塞、順鉑、紫杉醇、歐洲紫杉醇、吉西他濱、長春瑞賓、伊立替康、阿瓦斯丁、5-氟尿嘧啶、胺甲喋呤、奧沙利鉑、替加氟-吉瑪瑞西-歐特拉西兒(TS-1)、表皮生長因子受體(EGFR)-酪胺酸激酶抑制劑及其組合。較佳之實例包括吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、培美曲塞、順鉑、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、吉西他濱、阿瓦斯丁、TS-1、奧沙利鉑。於一特定實例中，化療藥物為吉非替尼。

【0046】 於本發明之實例中發現，一些代謝物具如同普洛陪拉幸之細胞毒性活性，如表2所示。

【0047】 於本發明之實例中亦發現，一些類似物具如同普洛陪拉幸之成株活性(clonogenic activities)，如表3所示。

【0048】 本文使用之「治療有效量」乙詞是指足以提供癌症治療功效之量，其取決於投予方式及欲治療之條件，包括年齡、體重、症狀、療效、投予途徑、及治療時間。

【0049】 於本發明中，可以本發明方法治療各種癌症。於一些具體實施例中，癌症為實體癌，如實體瘤。於其他具體實施例中，癌症為「液體」癌症或血液癌症。該癌症係選自於由肺癌、肝癌、大腸癌、腦癌、乳癌、胰腺癌、胃癌、腺癌、鱗狀細胞癌、及大細胞癌組成之群組。

【0050】 於本發明之實例中發現，普洛陪拉幸於各類型癌症呈現細胞毒性，該癌症包括腺癌、鱗狀細胞癌、大細胞癌、肝癌、腸腺癌、腦癌、乳癌、胰腺癌、及骨髓瘤，參見表1。

【0051】 本發明提供一種治療具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體之方法。該方法包含對該個體組合投予一治療有效量之普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及化療藥物。於本發明之一實例中，癌症為肺癌，如非小細胞肺癌(NSCLC)。

【0052】 另一方面，本發明提供一種預防癌症轉移之方法。該方法包含對有需求之個體組合投予一治療有效量之普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，及化療藥物。於本發明之一實例中，癌症為肺癌，如肺鱗狀細胞癌。於本發明之另一實例中，癌症為胃癌，如戒指細胞癌。

【0053】 於本發明之一實例中，普洛陪拉幸及厄洛替尼之組合提供預防肺癌(如肺鱗狀細胞癌)轉移之功效。於本發明之另一實例中，普洛陪拉幸及化療藥物，其係選自於由順鉑、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、吉西他濱、阿瓦斯丁、TS-1、奧沙利鉑、及其結合物組成之群組，之組合提供預防胃癌(如戒指細胞癌)轉移之功效。

【0054】 此外，本發明提供普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，用於製造治療具有對化療藥物具抗藥性之癌症的個體之藥劑之用途。本發明亦提供普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類，用於造預防癌症轉移之藥劑之用途。

【0055】 於本發明中，普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類(「活性化合物」)可配製成醫藥組合物或製劑，其可以任何適當途徑投予，包括但不限於，口服或非經口投予。於本發明之一實例中，含有普洛陪拉幸或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類之組合物或製劑係經由口服途徑投予，其可為固體或液體形式。固體組合物或製劑包括片劑、丸劑、膠囊、可分散粉劑、顆粒劑、及其類似物。口服組合物亦包括漱口劑，其係黏於口腔，及舌下片劑。膠囊包括硬膠囊及軟膠囊。於此口服用固體組合物或製劑，活性化合物之一或多者可僅混合或伴隨稀釋劑、黏合劑、崩解劑、潤滑劑、安定劑、增溶劑，且隨後以常規方法配製成製備物。當有需要時，此類製備物可以塗佈劑塗佈，或其可以二或多個塗層塗佈。另一方面，口服投予之液體組合物包括醫藥上可接受水溶液、懸浮液、乳液、糖漿、醃劑、及其類似物。於此類組合物，活性化合物之一或多者可溶解、懸浮、或乳化於常用之稀釋劑(如純水、乙醇、或其混合物等)。除了此類稀釋劑以外，該組合物亦可含有潤濕劑、懸浮劑、乳化劑、甜味劑、調味劑、香料、防腐劑、緩衝劑、及其類似物。

【0056】 非經口投予之醫藥組合物包括溶液、懸浮液、乳液、及固體注射組合物，其係於使用前立即溶解或懸浮於溶劑。注射劑可藉將活性成分之一或多者溶解、懸浮、或乳化於稀釋劑而製備。該稀釋劑之實例為注射用蒸餾水、生理鹽液、植物油、酒精、及其組合。此外，注射劑可含有安定劑、增溶劑、懸浮劑、乳化劑、撫慰劑、緩衝劑、防腐劑等。注射劑係於最終配製步驟除菌，或藉無菌程序製備。本發明之醫藥組合物亦可配製成無菌固體製備物，例如，

藉冷凍乾燥，且可於除菌後使用，或於使用前立即溶於無菌注射水或其他無菌稀釋劑。

【0057】 下列實施例應當解釋為僅具說明性，而非以任何方式侷限本發明之其餘部分。毋須進一步詳盡說明，據信本領域具通常知識者可基於本文之描述，最大限度地使用本發明。

【0058】 實施例

【0059】 I. 細胞培養及化學物質

【0060】 A549、CL141、及H441為*EGFR*野生型肺腺癌細胞株；HCC827具*EGFR*外顯子19缺失；且CL97為*EGFR* T790M與G719A點突變肺腺癌細胞株。CL152、H2170、及H226為肺鱗狀細胞癌細胞株，且H1299為非小細胞肺癌細胞株。A549-ON細胞株係A549細胞過度表現*Oct4*與*Nanog*，發明人視其為類幹細胞癌症細胞株(22)。所有細胞株皆維持於RPMI培養基，且補充10%胎牛血清(FBS，Invitrogen)、2 mM L-麩醯胺酸、100 U/mL青黴素、及100 µg/mL鏈黴素。於細胞培養實驗方面，10 mM普洛陪拉幸儲液係溶於二甲基亞砷(DMSO；Sigma)。普洛陪拉幸、順鉑、吉西他濱係購自Sigma。

【0061】 II. 細胞毒性及磺基玫瑰紅B (sulforhodamine B)試驗

【0062】 細胞以每孔2000個細胞之密度三重複分盤於96孔培養盤。細胞於第三天(以確保適當分盤效率及活力)處理指定藥劑48小時。細胞係以不同濃度之普洛陪拉幸、順鉑、吉西他濱、或例如，普洛陪拉幸與吉西他濱之組合處理。以磺基玫瑰紅B (SRB)試驗評估細胞毒性(23)。簡言之，移除培養基，且各孔之附著細胞係於4°C下以100 µl之冷的10%三氯乙酸(w/v)固定1小時。於固定後，細胞於室溫下以每孔100 µl之0.4% (w/v，溶於1%乙酸) SRB溶液染色30分鐘，隨後以1%乙酸清洗5次。於空氣風乾後，將100 µl之10 mM Tris鹼加入各孔，並於530 nm讀取吸光值。細胞毒性係以藥物處理孔中相對於僅溶劑之對照組細胞數目(設

定為100%)之細胞百分比表示。各實驗以三重複單獨進行至少2次，且細胞毒性以平均值±SD表示。

【0063】 III. 成株試驗

【0064】 受測細胞係分別種植於6孔培養盤中14天，其中每孔 10^4 個細胞。於細胞種植後24小時，加入普洛陪拉幸及其他受測藥物。每隔4天置換培養基及普洛陪拉幸。於處理後，細胞以PBS清洗，且細胞群落以固定液(甲醇:乙酸 = 3:1)固定，並以溶於甲醇之0.5%結晶紫染色。於小心移除結晶紫且以自來水清洗後，手動計數細胞群落。各實驗以三重複獨立進行至少2次，且細胞毒性以平均值±SD表示。

【0065】 IV. 腫瘤球體試驗

【0066】 簡言之，單類細胞係分盤於6孔超低附著培養盤(Corning Inc.)，其以每毫升2,000個細胞之密度培養於腫瘤球體培養基DMEM/F12，並補充1% N2補給物(Invitrogen)、10 ng/mL鹼性纖維細胞生長因子(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL表皮生長因子(Invitrogen)、及1%青黴素/鏈黴素(Invitrogen)，培養條件為37°C之95%空氣與5% CO₂之潮濕環境，細胞每週培養2次。當繼代培養時，收取腫瘤球體。球體係以TrypLE™ (Invitrogen)分離。以台酚藍排除法(Trypan Blue Exclusion method)計數球體細胞。

【0067】 V. 以流式細胞術進行側群分析及純化

【0068】 細胞之單類細胞懸浮液係以胰蛋白酶-EDTA (Invitrogen)自培養盤分離，並以每毫升 1×10^6 個細胞懸浮於補充3%胎牛血清及10 mM HEPES之漢克氏平衡鹽液(Hank's balanced salt solution; HBSS)。該些細胞隨即於37°C下以20 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma Chemical, St. Louis, MO)培養90分鐘。將ABC運輸蛋白抑制劑維拉帕米(verapamil)(Sigma)加入，使其最終濃度為50 µM，以確認流式細胞術之閘控區域。以指定藥物培養90分鐘後，細胞立即於300 g及4°C下離心

5分鐘，並再懸浮於冰冷之HBSS。將細胞保持於冰上，以防Hoechst染料流出，並加入1 µg/mL碘化吡啶(PI, BD)，以區分死細胞。最終，該些細胞係過濾通過40 µm細胞過濾器(BD)，以取得單類懸浮細胞。於雙雷射FACS Vantage SE (BD)進行細胞雙波長分析及純化。Hoechst 33342可於355 nm紫外光下激發，並以450/20帶通(BP)濾波器發散藍色螢光，及以675 nm邊緣濾波器長通(EFLP)發散紅色螢光。以610 nm分色鏡短通(DMSP)分開該發散波長。將PI陽性(死)細胞排除於分析之外。

【0069】 VI. Aldefluor試驗

【0070】 高醛去氫酶(ALDH)酵素活性係用於檢測肺癌幹細胞群。根據製造商指導方針進行Aldefluor試驗(StemCell Technologies)。簡言之，取自細胞培養基之單類細胞係於37°C下培養於Aldefluor試驗緩衝液50分鐘，該緩衝液含有ALDH受質(乙醛縮-胺基乙醛(bodipy-aminoacetaldehyde, BAAA))。作為陰性對照組，取自各樣本之一部分細胞係於ALDH抑制劑(二乙基胺基苯甲醛, DEAB)存在下培養於相同條件。以流式細胞術測量ALDH陽性細胞群。

【0071】 VII. 普洛陪拉幸介導之抗肺癌功效之體內檢驗

【0072】 於第一試驗中，人類肺腺癌細胞株NCI-H441 (購自ATCC, 1百萬個細胞/注射)細胞係皮下注射至NOD/SCID小鼠右腹側(雌性, 4-6週大)。當腫瘤變得可觸知時，以測徑器記錄其大小，且小鼠係隨機分成對照組(DMSO載體)及普洛陪拉幸處理組(5 mg/kg, 5天/週, 腹腔注射)。經過4週時間，於兩組別形成之腫瘤係每週以測徑器測量。腫瘤大小之變化係以倍數改變表示，並隨時間繪圖。相較於載具對照組，以普洛陪拉幸處理似乎抑制及/或延緩腫瘤生長 (** $p < 0.01$)。

【0073】 於第一藥物結合測試中，表現螢火蟲螢光素酶之NCI-H441細胞 (6×10^5 個細胞/注射)係經由側尾靜脈注射至NOD/SCID小鼠(4-6週齡)，以建立腫

瘤模式。於腫瘤注射後一週，小鼠係隨機分成不同組別：載體組、普洛陪拉幸(1 mg/kg)與培美曲塞(1 mg/kg)組合組(NSCLC之標準化療藥劑)、培美曲塞(1 mg/kg)+順鉑(1 mg/kg)治療組、及培美曲塞(1 mg/kg)+普洛陪拉幸(1 mg/kg)治療組。以測徑器記錄不同組別之腫瘤負荷。腫瘤大小之變化係以倍數改變表示，並隨時間繪圖。隨後，我們進行另一組藥物結合測試。我們以二主要標準化療法結合普洛陪拉幸。於肺腺癌方面，標準藥物組合為培美曲塞與順鉑，而吉西他濱與順鉑則用於肺鱗狀癌。於帶有CL97 (肺腺癌)腫瘤之小鼠，結合培美曲塞+順鉑+普洛陪拉幸提供最顯著之腫瘤抑制功效，其優於培美曲塞+順鉑組及普洛陪拉幸單獨組。於帶有CL152 (肺鱗狀細胞癌)腫瘤之小鼠，標準療法(吉西他濱+順鉑)加上普洛陪拉幸似乎亦抑制腫瘤形成，其優於普洛陪拉幸單獨組及吉西他濱+順鉑組。接著，我們證實，吉非替尼抗藥性CL97肺癌細胞於體內對普洛陪拉幸具敏感性。CL97癌細胞(1.5×10^6 個細胞/注射)係皮下注射至NOD/SCID小鼠，以建立體內腫瘤模式。小鼠係隨機分成4個組別：對照組、吉非替尼單獨組(100 mg/kg, PO, 5次/週)、普洛陪拉幸單獨組(5 mg/kg, IP, 5次/週)、及吉非替尼+普洛陪拉幸組。於腫瘤注射後5週，觀察到普洛陪拉幸單獨組及吉非替尼+普洛陪拉幸組產生顯著之腫瘤抑制功效。於腫瘤注射後第6週，吉非替尼+普洛陪拉幸組顯示最顯著之腫瘤抑制功效，接著為普洛陪拉幸單獨組，其後對照組及吉非替尼單獨組兩者顯示類似腫瘤負荷。

【0074】 結果

【0075】 普洛陪拉幸於NSCLC細胞株之細胞毒性

【0076】 我們首先探討普洛陪拉幸於各種NSCLC細胞株之細胞毒性功效。A549、A549-ON、CL97、CL141、HCC827、及H441為肺腺癌細胞株。CL152、H2170、及H226為肺鱗狀細胞癌細胞株。以SRB試驗測定細胞存活力。以各濃度之普洛陪拉幸處理48小時後，所有癌細胞株之IC₅₀值為約20 μM (參見表1)。進

行成株試驗，以測定普洛陪拉幸之抗腫瘤活性。曝露於不同濃度之普洛陪拉幸後，NSCLC細胞株之成株性(clonogenicity)以濃度依賴性方式降低。癌症幹細胞(CSC)係假定存在獨特擁有自我更新能力及治療抗性之腫瘤細胞群。由於普洛陪拉幸預期偏好抑制肺臟CSC，我們接著檢測是否NSCLC (具野生型EGFR之肺鱗狀細胞癌細胞)球體之比例可藉普洛陪拉幸處理而減少。欲測定是否側群(SP)細胞，係指具CSC特性之細胞群，存在於NSCLC細胞株，我們以螢光染料Hoechst 33342將細胞染色，並以流式細胞術分析細胞。根據散射信號排除死細胞及細胞碎片後，NSCLC細胞含有一小群具SP細胞特性之細胞。以2.5、5、及10 μM 之普洛陪拉幸培養48小時後，SP細胞之比例係劑量依賴性減少(參見表1)。

【0077】 普洛陪拉幸減少側群細胞及ALDH⁺細胞之比例

【0078】 普洛陪拉幸處理是否能消耗ALDH表現細胞之百分比(ALDH為造血及NSCLC CSCs兩者之習知標記)亦被探討。如表1所示，普洛陪拉幸處理亦以劑量依賴方式減少ALDH⁺ CL152群體。總結，普洛陪拉幸於NSCLC細胞顯示低或最小細胞毒性功效。

表1

普洛陪拉幸於各類癌症之細胞毒性

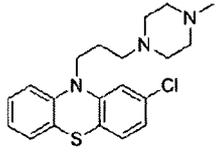
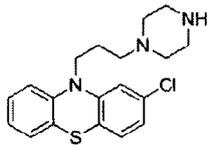
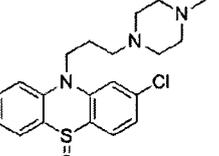
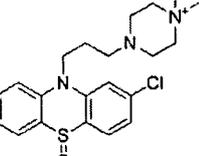
癌症類型	細胞株	EGFR 突變狀態	普洛陪拉 幸之IC50 (μM)	成株試驗 (μM)	球體形成 (μM)	側群 (μM)	ALDH ⁺ 試 驗 (μM)
腺癌	A549	WT	21.5 ± 1.1	5 - 10			< 5
	A549-ON (過度表現Oct4 與Nanog)	WT	21 ± 1.4				
	CL97	G719A/ T790M	13 ± 1.04	5 - 10	0 - 2.5	< 5	< 5
	CL141	WT	12.7 ± 1	5 - 10	0 - 2.5	> 10	< 5
	HCC827	外顯子19 缺失	> 20		5 - 10		
	H441	WT	17.7 ± 1.3		0 - 2.5	< 5	< 10
鱗狀細胞癌	CL152	WT	16.6 ± 2.4	5 - 10	0 - 5	< 5	< 5
	H2170	WT	24.7 ± 0.4				
	H226	WT	21.2 ± 1.1		0 - 5		
大細胞癌	H1299	WT	27.6 ± 8.8	5 - 10	0 - 5		
肝癌	Mahlavu		> 10		> 5		
	SK-Hep1		> 20		> 5		

	HepG2		> 10				
腸腺癌	HT29		13.5 ± 0.05		0 - 2.5		
腦癌	GBM8401		~ 10	3.33 - 10		> 10	
	U87MG				10 - 15	>10	
乳癌	MDA-MB-231				5 - 10		
胰腺癌	PANC-1				10 - 20		
骨髓瘤	J5				> 5		

【0079】 此外，以SRB試驗及台酚藍排除法檢驗普洛陪拉幸代謝物於NSCLC親代及球體細胞之細胞毒性。其發現N-去甲基普洛陪拉幸於NSCLC細胞株顯示優於其他受測代謝物之細胞毒性功效(參見表2)。

表2

普洛陪拉幸代謝物之IC50

普洛陪拉幸代謝物之IC ₅₀ (μM)				
化合物	普洛陪拉幸	N-去甲基普洛陪拉幸	普洛陪拉幸亞砒	普洛陪拉幸亞砒 4'-N-氧化物
結構				
CL141	10-20	5-10	> 20	> 20
CL152	10-20	~ 10	> 20	> 20
CL141球體	< 5	< 5	5-10	> 10
CL152球體	< 5	< 5	> 10	> 10

【0080】 同時，檢驗普洛陪拉幸類似物對CL141成株性之功效，其中將大約1,000個細胞種植於6孔培養盤並以不同類似物處理；於14天後，細胞群落以結晶紫染色、拍攝、及計數。結果顯示於表3，顯示四種普洛陪拉幸類似物降低NSCLC細胞成株性。

表3

普洛陪拉幸類似物之成株試驗

普洛陪拉幸類似物之成株試驗(μM)				
化合物	NSC 14948	NSC 166184	NSC 169470	NSC 406619

結構				
CL141	5-10	1-2.5	5-10	2.5-5

【0081】 普洛陪拉幸誘導CL152球體細胞凋亡且與吉西他濱組合協同性地增進細胞毒性

【0082】 以普洛陪拉幸處理48小時後，收集CL152球體並以流式細胞術分析。普洛陪拉幸導致細胞凋亡呈現劑量依賴性增加(圖1A)。吉西他濱為常用於NSCLC治療之化療藥劑。接著，以球體形成試驗探討普洛陪拉幸與吉西他濱組合之功效。結果證實，普洛陪拉幸與吉西他濱於CL152球體顯示協同效應(圖1B)。

【0083】 普洛陪拉幸抑制肺癌細胞遷移及誘導老化

【0084】 歷經表皮間質轉化(epithelial-mesenchymal transition; EMT)之癌細胞被發現顯示增加的細胞凋亡及特定化療藥物之抗性。EMT於調節癌症幹性上亦扮演關鍵角色。EMT之特徵在於增進之細胞遷移及侵襲。以透孔遷移試驗(transwell migration assay)測定是否普洛陪拉幸之亞細胞毒性濃度能抑制A549細胞之體外細胞活動。相較於DMSO對照組(圖1C)，於24小時後，以10 μ M普洛陪拉幸處理明顯抑制A549細胞之細胞遷移。此外，我們檢驗了普洛陪拉幸對A549細胞老化之功效。以老化檢測套組(BioVision Inc.)檢測 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)活性。以1 μ M普洛陪拉幸及作為陽性對照組之50 μ M白藜蘆醇處理24小時後，A549細胞增加 β -半乳糖苷酶活性且誘導 β -半乳糖苷酶活性，陽性細胞係以200x視野之顯微鏡計數(圖1D)。該些數據顯示，普洛陪拉幸於低濃度時能誘導NSCLC細胞老化。

【0085】 普洛陪拉幸顯著抑制NSCLC癌症球體之自我更新

【0086】 欲評估是否單獨之普洛陪拉幸或與臨床藥物、化療藥劑、及EGFR-酪胺酸激酶抑制劑吉非替尼之組合之治療，能體外抑制NSCLC癌症類幹球體細胞。CL141球體細胞(圖2A)及CL97球體細胞(圖2B)係以單獨之普洛陪拉幸、單獨之培美曲塞(CL141球體)或吉非替尼(CL97球體)、或組合治療48小時。普洛陪拉幸(1、2.5、5、及10 μ M)係濃度依賴性減少CL141及CL97細胞球體數目(圖2A及圖2B)。相較於單獨之培美曲塞或吉非替尼，以普洛陪拉幸與臨床藥物之組合共治療亦明顯減少球體細胞數目(圖2A及圖2B)。欲進一步探索普洛陪拉幸與順鉑之組合於CSC之功效，我們進行二NSCLC細胞株(包括HCC827及H1299)之球體形成試驗。普洛陪拉幸抑制球體形成能力(圖2C及圖2D)。有趣的是，與順鉑組合時，該些NSCLC細胞之球體數目似乎比以單獨之普洛陪拉幸或順鉑治療之細胞的低。總之，該些數據顯示，普洛陪拉幸於該些受測球體具抗CSC能力，且普洛陪拉幸與化療藥劑或EGFR-酪胺酸激酶抑制劑之組合對癌症治療具效益。

【0087】 體內檢驗普洛陪拉幸之腫瘤抑制功效

【0088】 於第一試驗中(圖3A)，NCI-H441 (1×10^6 個細胞/注射)細胞係皮下注射至NOD/SCID小鼠右腹側(雌性，4-6週大)。當腫瘤變得可觸知時，以測徑器記錄其大小，且小鼠係隨機分成對照組(DMSO載具)及普洛陪拉幸處理組(5 mg/kg，5天/週，腹腔注射)。於處理後四週，清楚發現，相較於載體對照組，普洛陪拉幸於5 mg/kg時有效抑制腫瘤生長(** $p < 0.01$)。

【0089】 於藥物組合測試中(圖3B)，表現螢火蟲螢光素酶之NCI-H441細胞(6×10^5 個細胞/注射)係經由側尾靜脈注射至NOD/SCID小鼠(4-6週齡)，以建立腫瘤模式。於腫瘤注射後一週，小鼠係隨機分成不同組別：對照組、普洛陪拉幸(1 mg/kg)與培美曲塞(1 mg/kg) (NSCLC之標準化療藥劑)之組合組、培美曲塞(1 mg/kg)與順鉑(1 mg/kg)結合組、及培美曲塞(1 mg/kg)與普洛陪拉幸(1 mg/kg)之

組合組。有趣的是，我們發現，使用我們的投劑療法，順鉑(1 mg/kg)與培美曲塞之組合之腫瘤生長抑制功效未明顯異於培美曲塞單獨組(1 mg/kg)(參見圖3B)。然而，普洛陪拉幸與培美曲塞之組合提供明顯比其他組別更好的腫瘤抑制功效(* p <0.05)。

【0090】 於其他藥物結合測試中，CL97 (圖3C)及CL152 (圖3D)細胞係皮下注射至NOD/SCID小鼠右腹側(雌性，4-6週大)。於腫瘤注射後一週，小鼠係隨機分成不同組別：對照組(DMSO載體)與普洛陪拉幸處理組(5 mg/kg)、標準治療組(50 mg/kg培美曲塞或60 mg/kg吉西他濱與3 mg/kg順鉑組合)、及組合組(標準治療與5 mg/kg普洛陪拉幸組合)。由動物數據可知，普洛陪拉幸單獨組可抑制腫瘤生長(* p <0.05，*** p <0.001)；標準治療與普洛陪拉幸之組合顯示比其他處理組更顯著之腫瘤生長抑制功效(** p <0.01，*** p <0.001)。

【0091】 欲檢驗是否普洛陪拉幸可克服抗藥性問題，CL97 (EGFR T790M與G719A突變)細胞係皮下注射至NOD/SCID小鼠右腹側(雌性，4-6週大)。於腫瘤注射後一週，小鼠係隨機分成不同組別：對照組(DMSO載體)與普洛陪拉幸處理組(5 mg/kg)、標靶治療組(100 mg/kg吉非替尼)、及組合組(100 mg/kg吉非替尼與5 mg/kg普洛陪拉幸組合)。於圖3E中，吉非替尼單獨組無法有效抑制腫瘤生長。然而，普洛陪拉幸單獨組或與吉非替尼之組合顯示顯著的腫瘤生長抑制功效(*** p <0.001)。由證據可知，經由增加化療或標靶治療敏感性，普洛陪拉幸可解決抗藥性問題。此發現顯示，普洛陪拉幸可視為未來化療或標靶治療之臨床佐劑治療劑。

【0092】 普洛陪拉幸治療後之臨床個案

【0093】 為證明本發明之概念，進行普洛陪拉幸(於圖中以藥物P標示)之臨床觀察研究(參見圖4-圖6)。病患包括以Tarceva™ (含有厄洛替尼以作為活性成分)治療之肺鱗狀細胞癌病患(如圖4所示)、以培美曲塞治療之肺腺癌病患(如圖5

所示)、及以數種化療藥劑之組合治療之戒指細胞癌病患，該些化療藥劑包括順鉑、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、吉西他濱、阿瓦斯丁、TS-1、奧沙利鉑、紫杉醇/5-氟尿嘧啶、及阿瓦斯丁/吉西他濱/TS-1 (如圖6所示)，其亦服用普洛陪拉幸。觀察到，病患呈現穩定或腫瘤減少情況。該觀察顯示，以現有治療加上普洛陪拉幸對病患具效益。於其他情況下，數個病患服用普洛陪拉幸一年以上，顯示現有劑量可於副作用最小的情況下耐受。此外，加入普洛陪拉幸可視為一種維持療法，其有助於病患控制疾病而無癌症惡化，使病患活得更久。於普洛陪拉幸治療後，鑑於包括中位數客觀反應率(ORR)、無惡化存活期(PFS)、及整體存活期(OS)等數據，觀察到病患之疾病狀態可有效維持穩定，且存活期延長(圖7A及圖7B)。

【0094】 可結論的是，以普洛陪拉幸與化療組合，可對各種癌症病患提供治療效益，具體而言是克服抗藥性問題及預防癌症轉移。

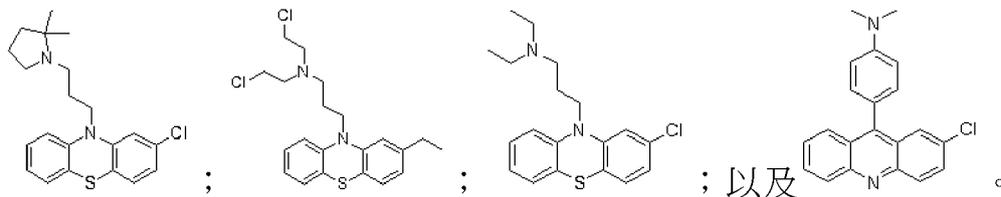
【0095】 據信，本發明領域具通常知識者可基於本文之闡述最大限度利用本發明，而毋須進一步說明。因此，應理解到，所提供之說明及申請專利範圍僅用於示例之目的，而非以任何方式侷限本發明之範疇。

【符號說明】

【0096】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種普洛陪拉幸(prochlorperazine)用於製備治療具有對一化療藥物抗藥性之肺癌病人並延長病人存活期之醫藥組合物之用途，其中該普洛陪拉幸(prochlorperazine)包括普洛陪拉幸(prochlorperazine)或其類似物或代謝物、或其醫藥上可接受鹽類；其中該化療藥物係選自於由吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、培美曲塞(pemetrexed)、順鉑(cisplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、歐洲紫杉醇(docetaxel)、吉西他濱(gemcitabine)、伊立替康(irinotecan)、阿瓦斯丁(avastin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、替加氟-吉瑪瑞西-歐特拉西兒(tegafur-gimeracil-oteracil potassium；TS-1)及其組合組成之群組；其中該普洛陪拉幸代謝物係選自於由 N-去甲基普洛陪拉幸、普洛陪拉幸亞砒及普洛陪拉幸亞砒 4'-N-氧化物組成之群組；其中該普洛陪拉幸類似物係選自於由下列化合物組成之群組：



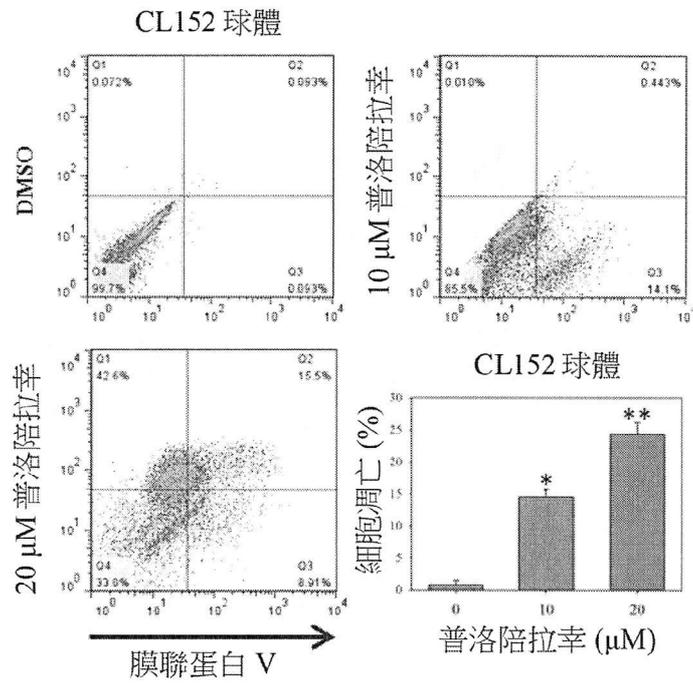
【請求項2】 如請求項 1 之用途，其中該化療藥物係選自於由吉非替尼、厄洛替尼、培美曲塞、順鉑、5-氟尿嘧啶、伊立替康、紫杉醇、吉西他濱、阿瓦斯丁、TS-1、奧沙利鉑或其組合組成之群組。

【請求項3】 如請求項 1 之用途，其中該化療藥物為吉非替尼。

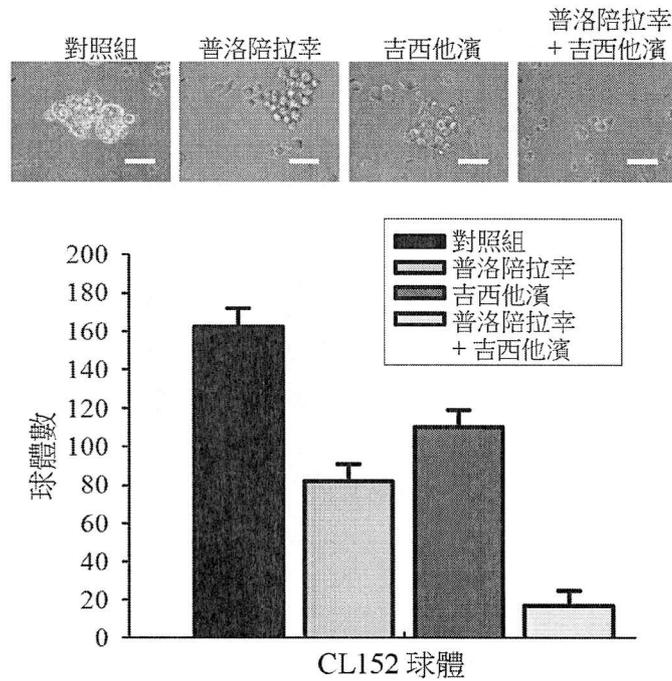
【請求項4】 如請求項 1 之用途，其中該肺癌為非小細胞肺癌(NSCLC)。

【請求項5】 如請求項 1 之用途，其中該普洛陪拉幸代謝物為 N-去甲基普洛陪拉幸。

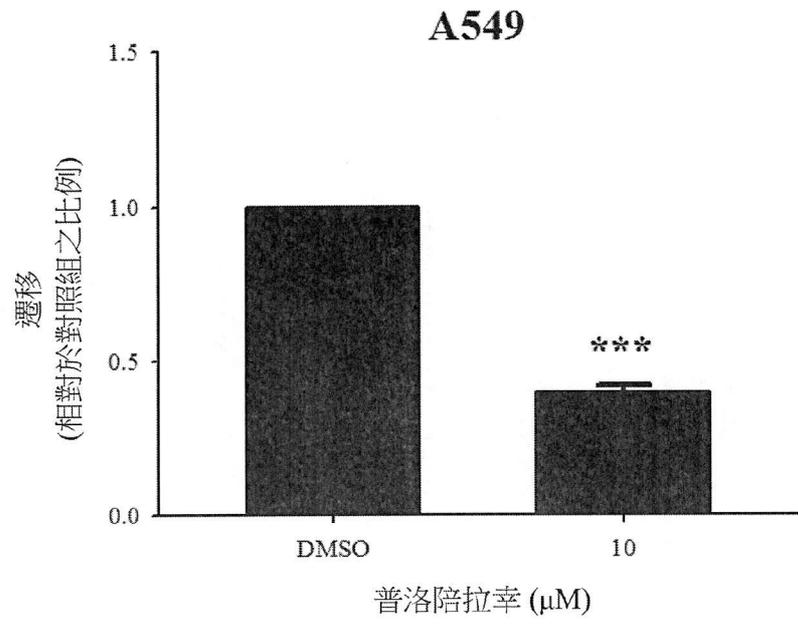
【發明圖式】



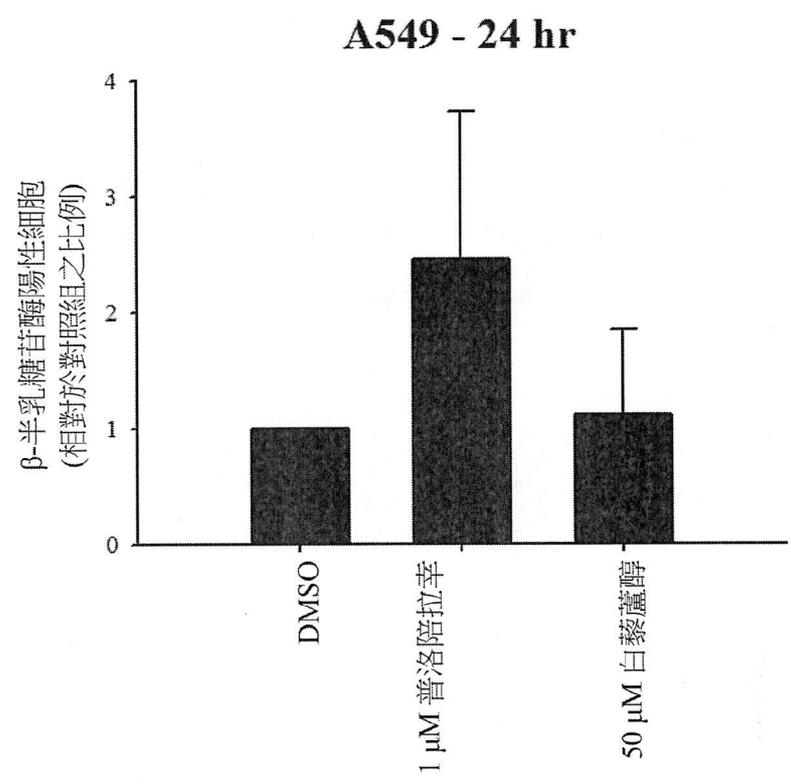
【圖1A】



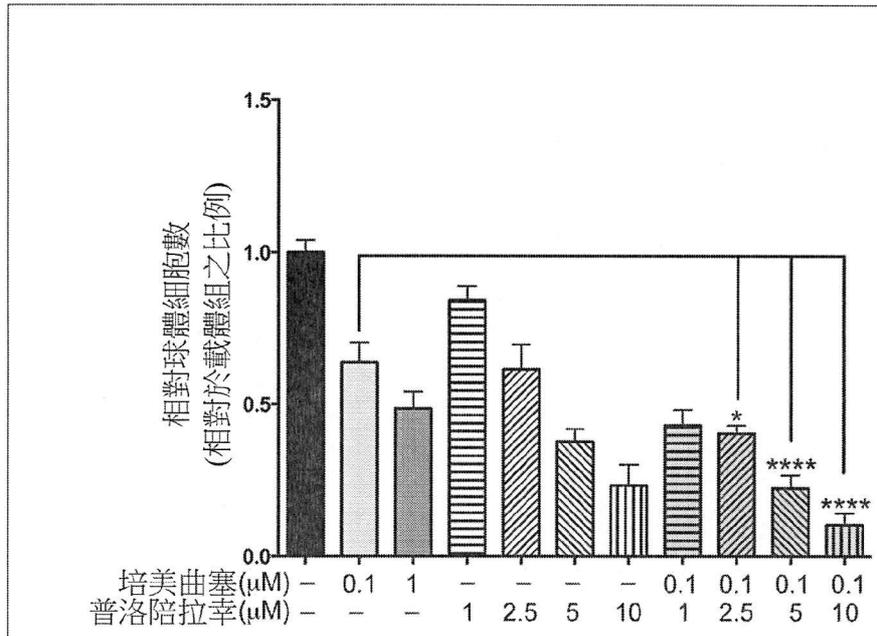
【圖1B】



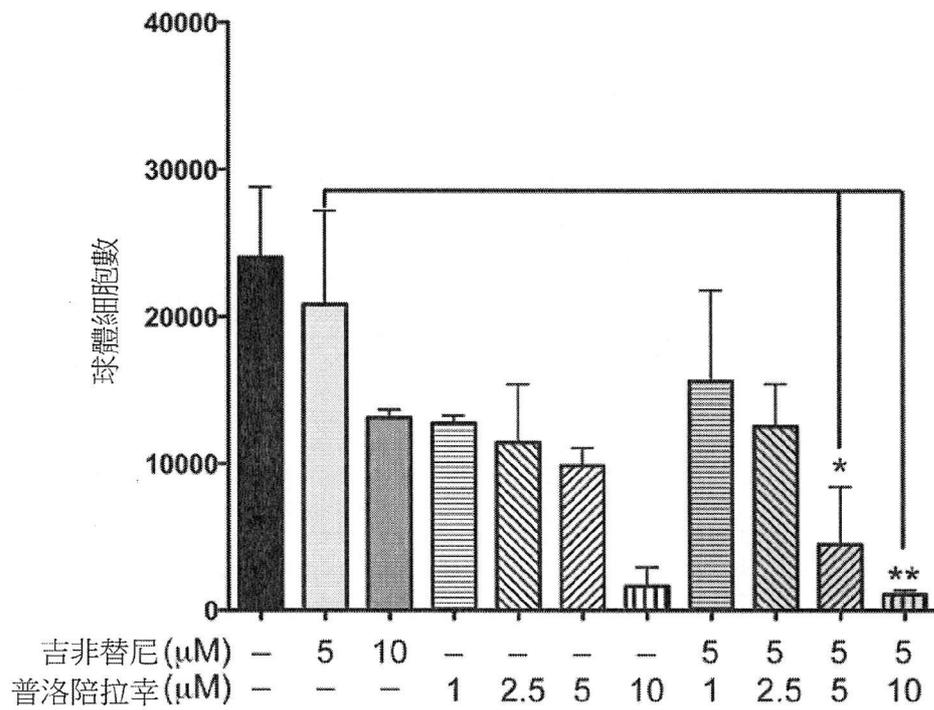
【圖1C】



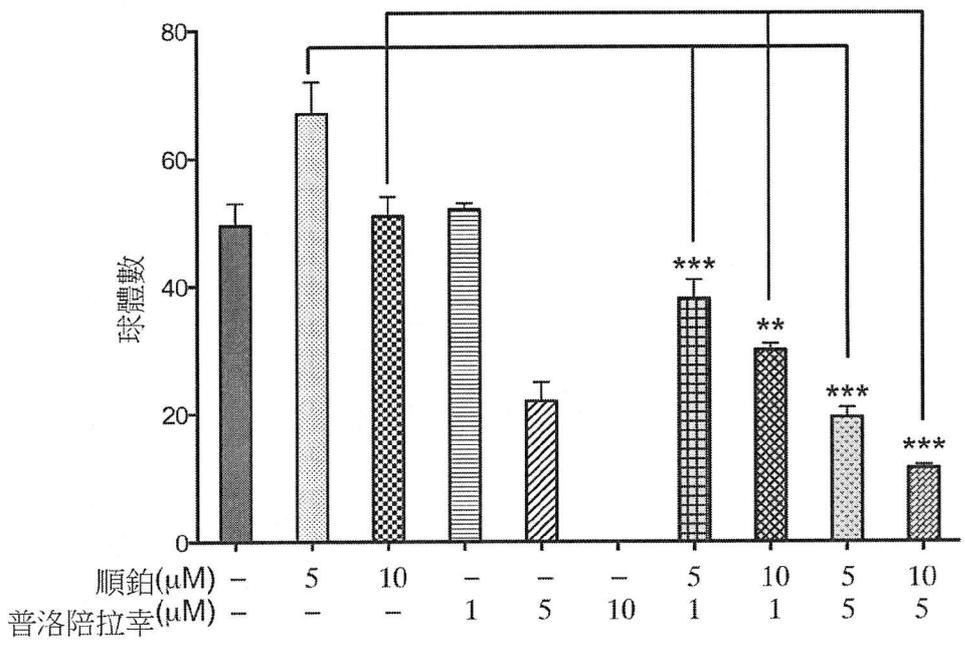
【圖1D】



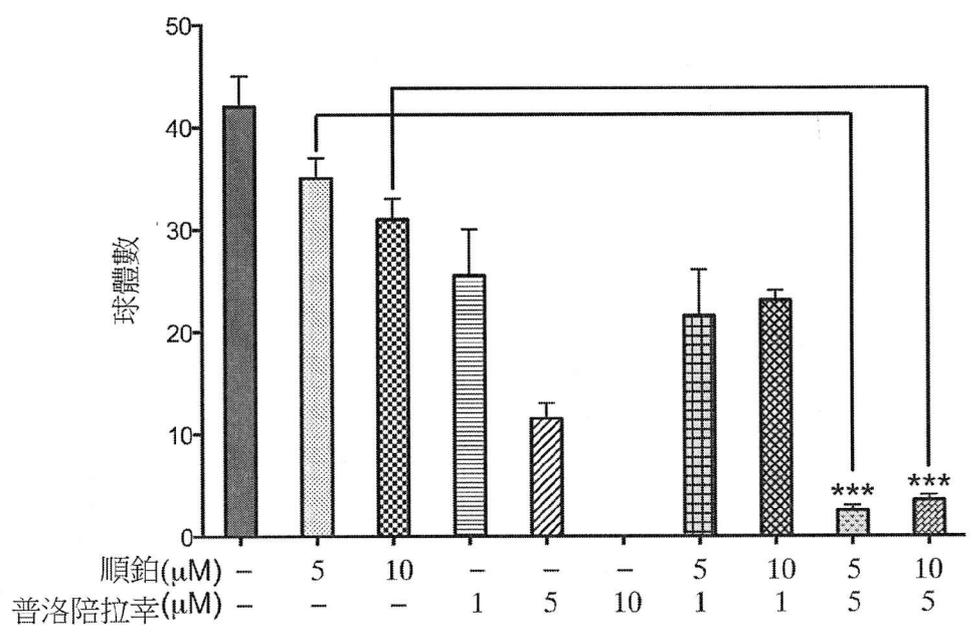
【圖2A】



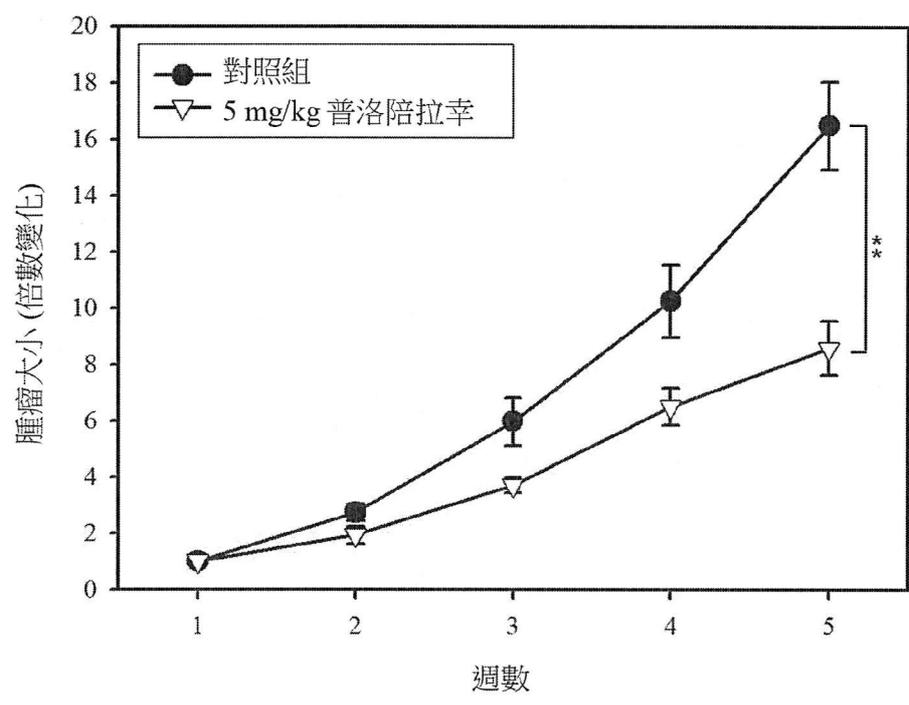
【圖2B】



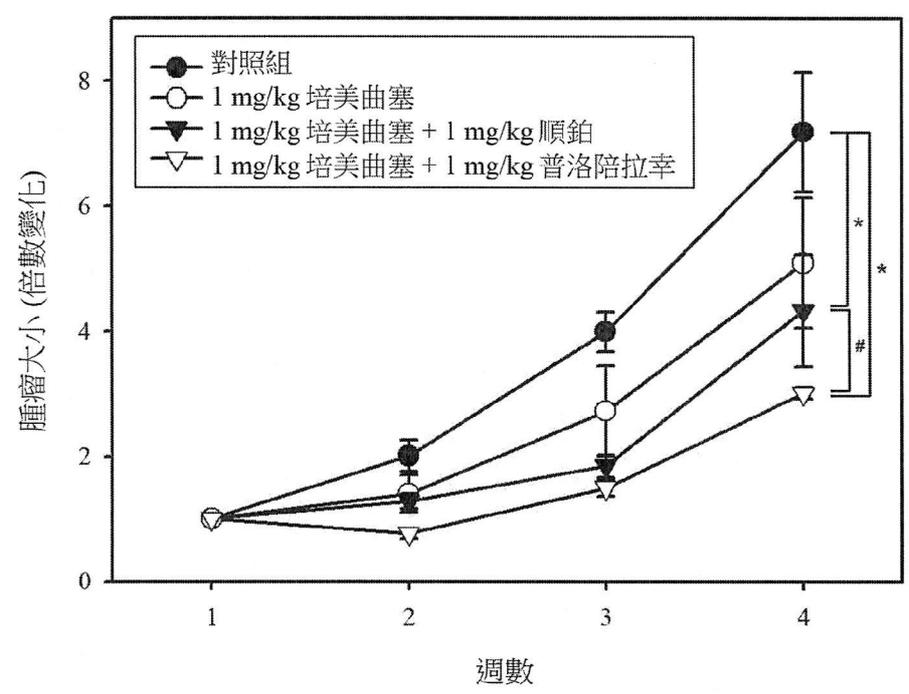
【圖2C】



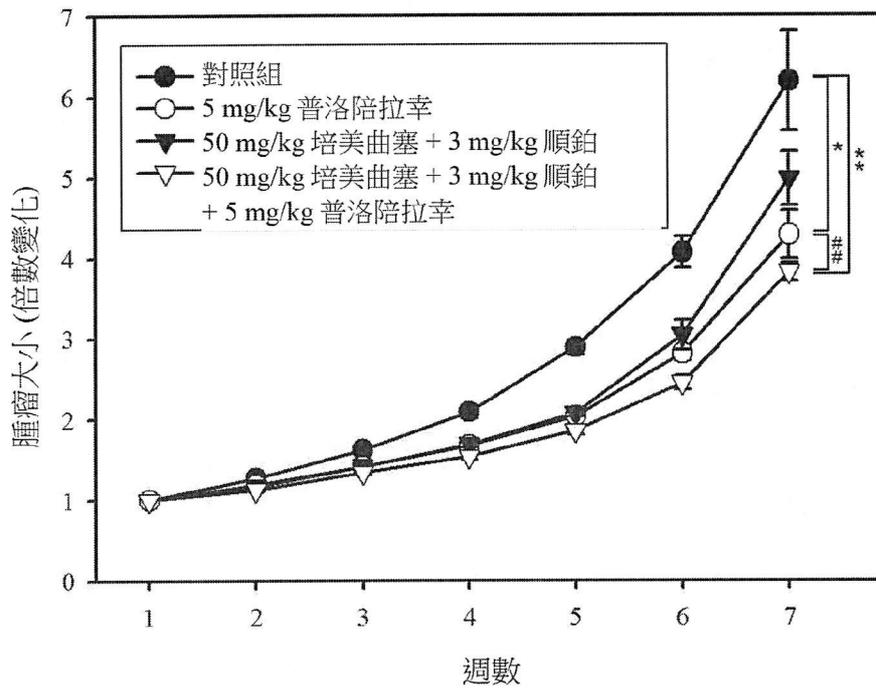
【圖2D】



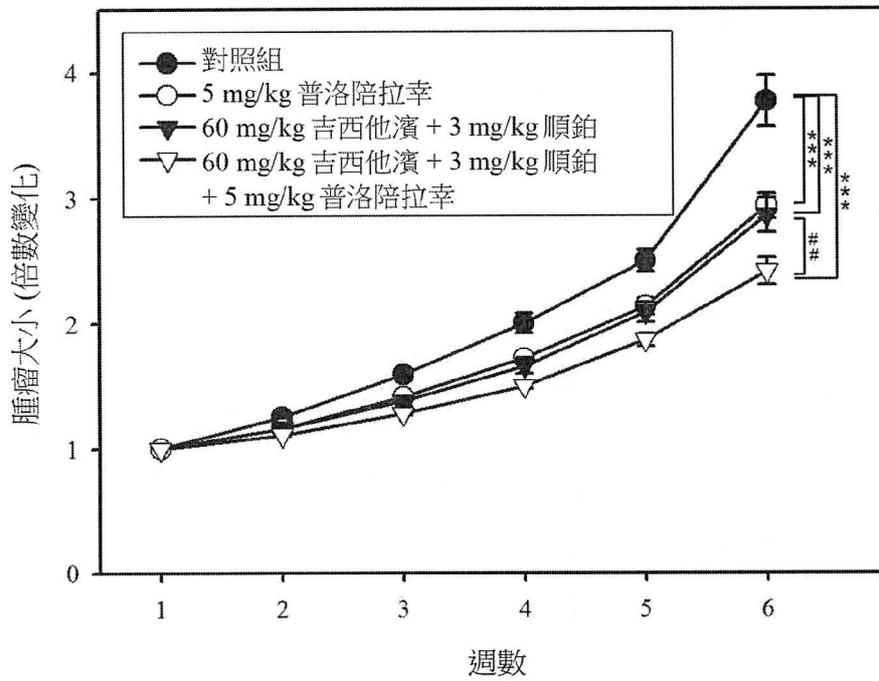
【圖3A】



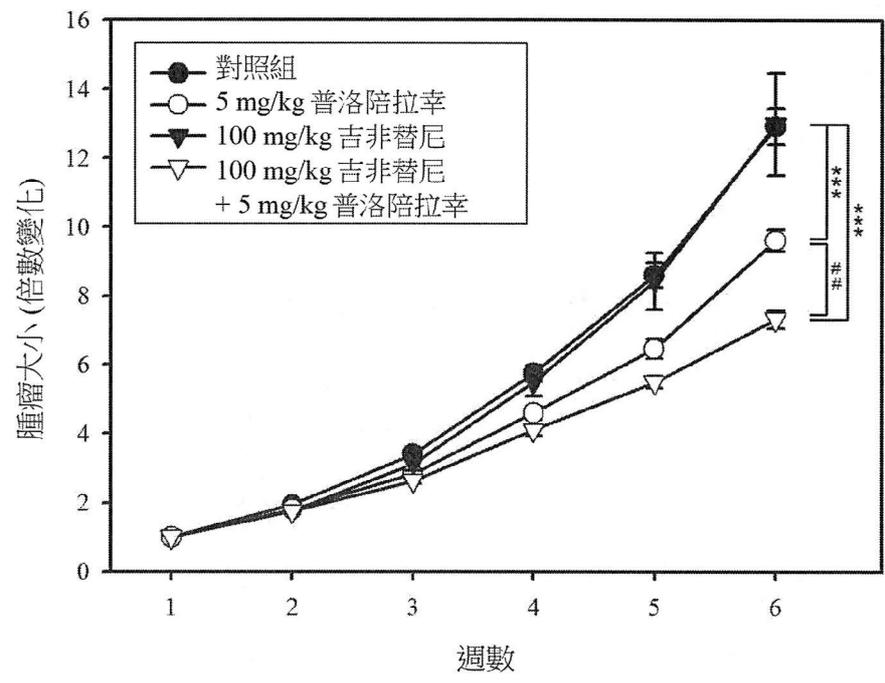
【圖3B】



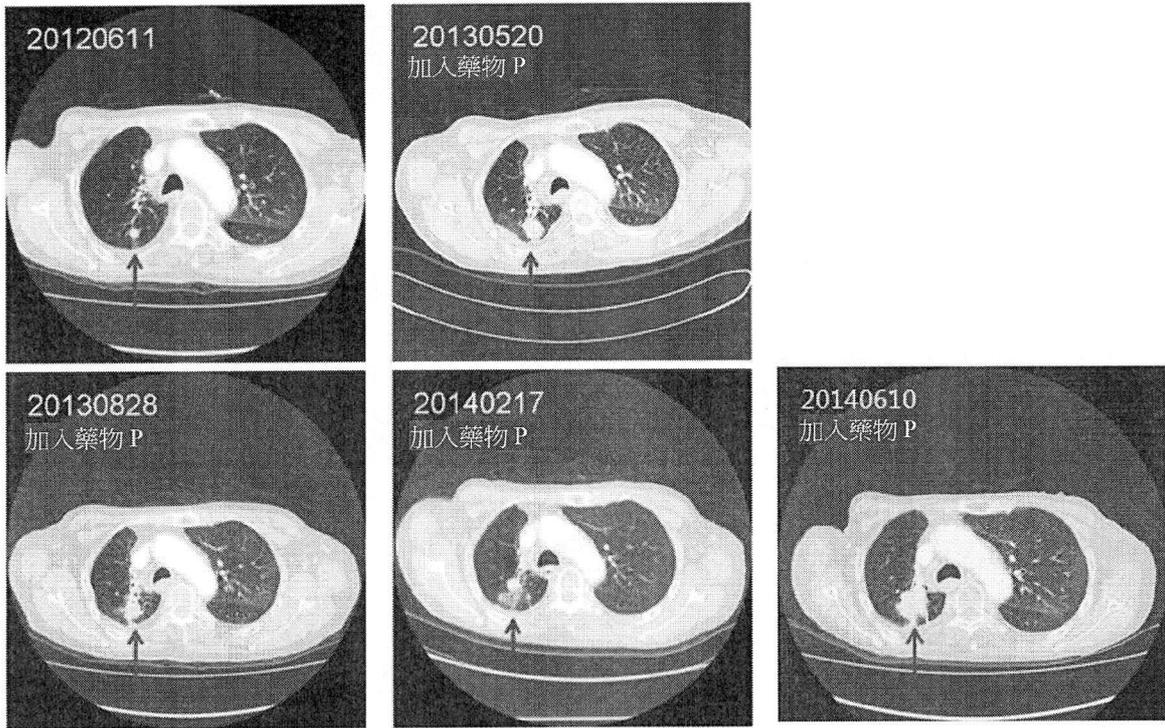
【圖3C】



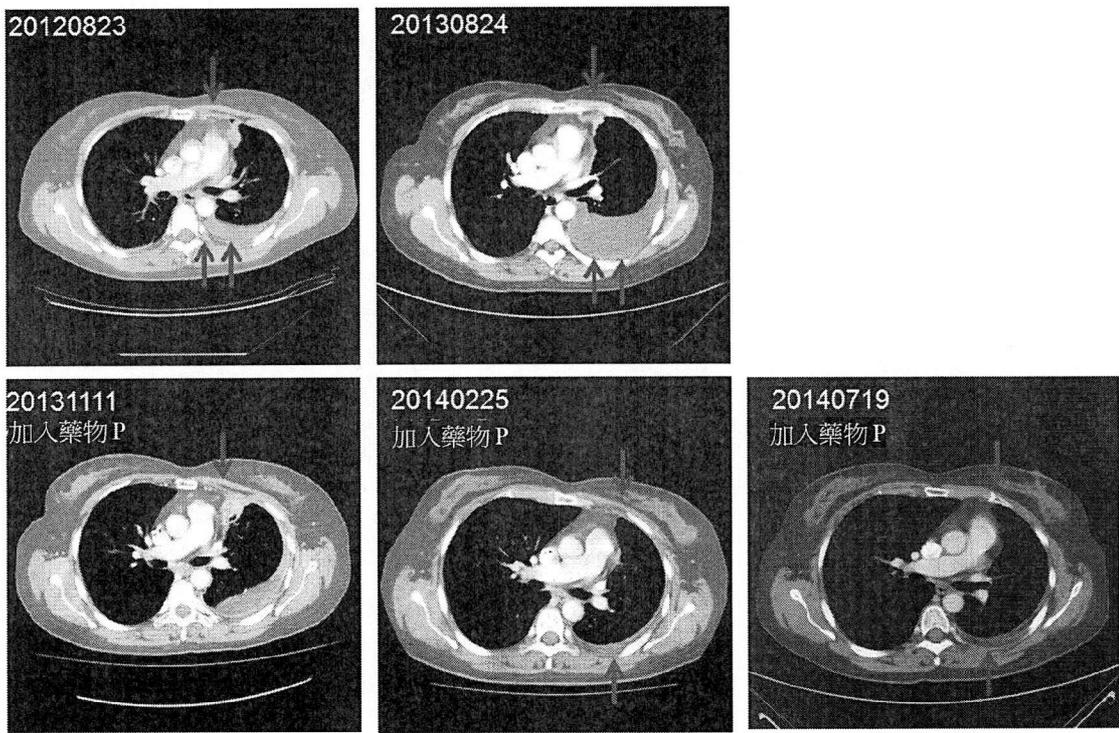
【圖3D】



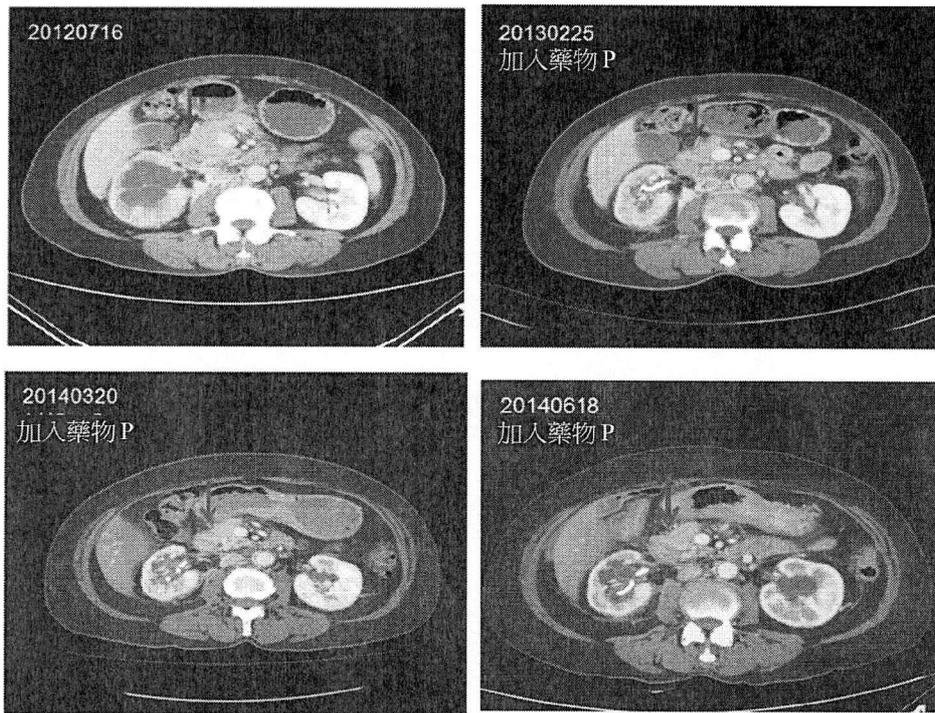
【圖3E】



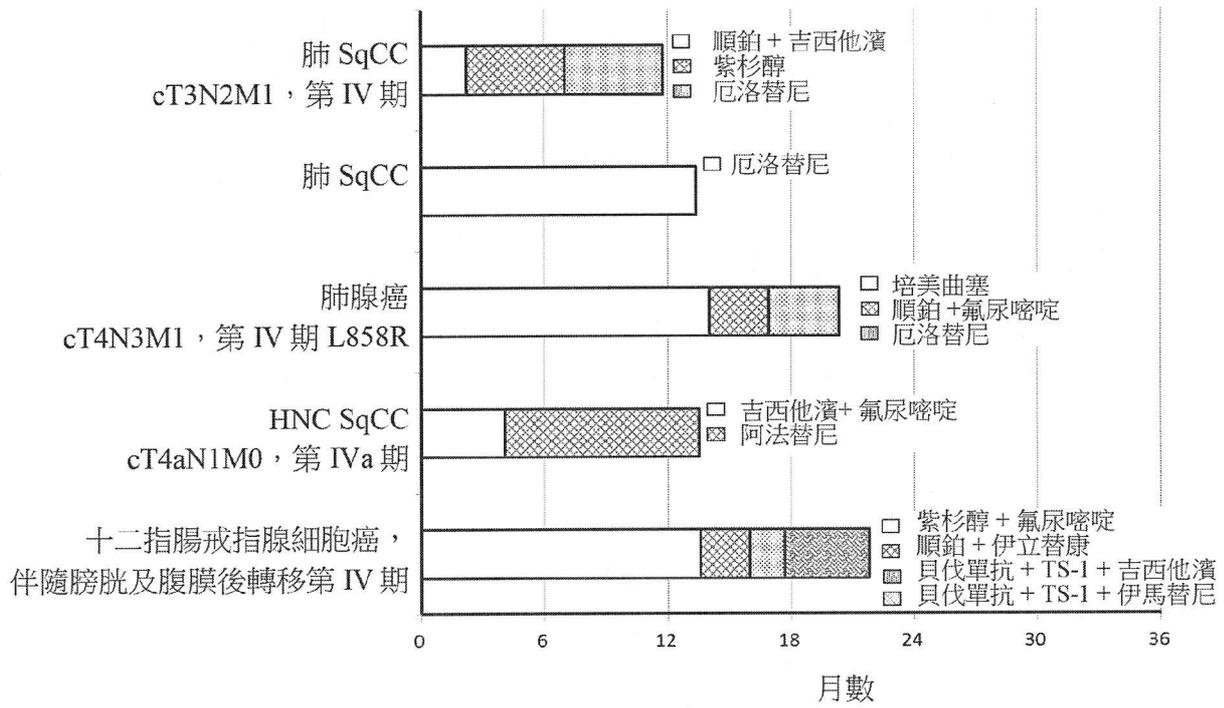
【圖4】



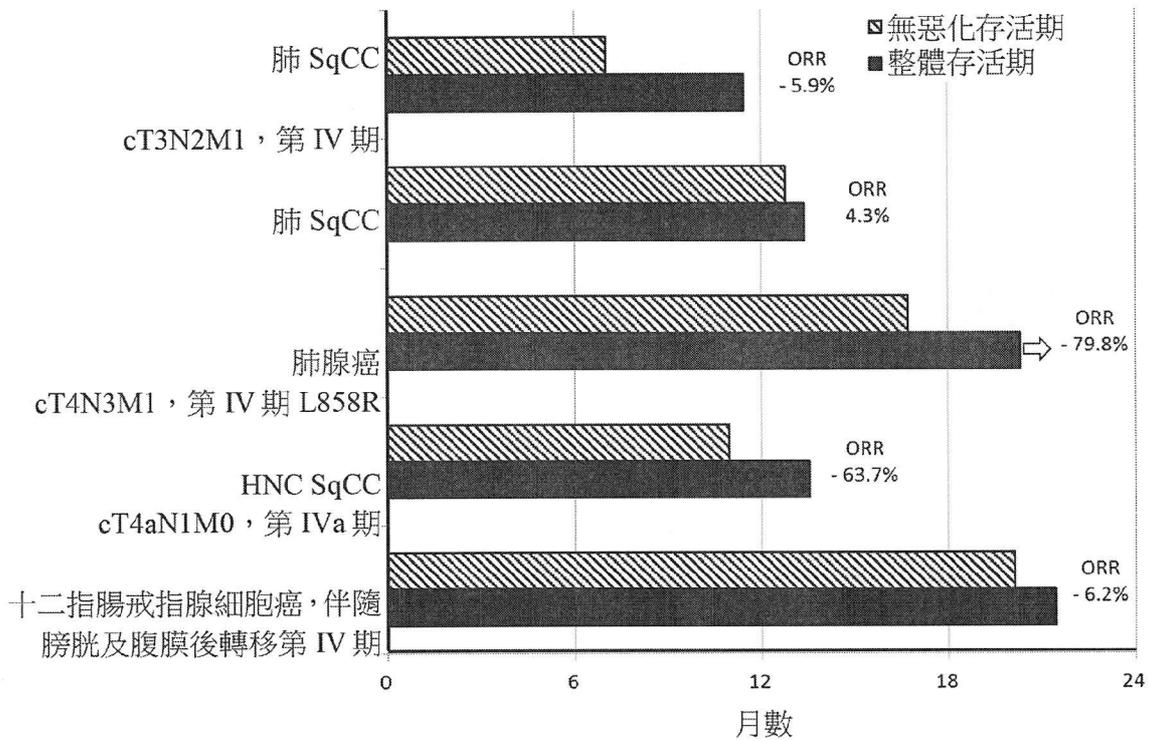
【圖5】



【圖6】



【圖7A】



【圖7B】