申請日期	88 年 11 月 30 日
案號	88117984
類別	

A4
C4

（以上各欄由本局填註）

發明 新型 專利說明書

一、發明 新型 名稱	中文	
	英文	
二、發明 創作 人	姓名	⑷ 羅曼諾 達柴契 Deghenghi, Romano
	國籍	⑷ 法國凡斯尼特市帝洛達巷一〇六號 106 Ch. De Ronde, 78110-Le Vesinet, France
	住、居所	
三、申請人	姓名（名稱）	
	國籍	
	住、居所（事務所）	
	代表人姓名	

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（由本局填寫）

承辦人代碼：	A6 B6
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

本案已向：

國（地區）	申請專利，申請日期：	案號：	，□有　□無主張優先權
美國	1998 年 11 月 16 日	09/192,406	☑有主張優先權

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1　)

本發明的範圍

本發明關於一種用來減少癌細胞增生的方法，此方法是藉著給予所要治療對象生長激素釋出肽類及其拮抗劑來進行的。

本發明的背景

生長激素（ＧＨ）的分泌是由二種視丘下的肽類來調節：（ａ）ＧＨ－釋出激素（ＧＨＲＨ），它可刺激ＧＨ的釋出，（ｂ）生長抑素，它對ＧＨＲＨ的釋出有抑制效果。在最近幾年中，有幾位研究者已證實ＧＨ的分泌它可經由稱爲ＧＨ－釋出肽類（ＧＨＲＰ）的合成之寡肽類來刺激，如：〝六嚬啉〞（Hexarelin）及不同的〝六嚬啉〞類似物（吉可等人所著，歐洲內分泌期刊，１３６，４４５－４６０，１９９７）。這些化合物是通過一種不同於ＧＨＲＨ之機制的機制來作用（Ｃ．Ｙ．鮑爾斯，於〝異生物質的生長激素促泌劑〞，Ｅｄｓ．Ｂ．伯辜和Ｒ．Ｆ．瓦克，Ｐ．９－２８，史賓格－維賴，紐約１９９６）並藉著與位於下視丘和腦下垂腺的特殊受體間的相互作用（（ａ）Ｇ．慕奇利等人著，內分泌期刊，１５７，９９－１０６，１９９８；（ｂ）Ｇ．慕奇利等，〝人類ＧＨＲＰ受體的組織分佈〞歐洲內分泌等的進展摘要Ⅳ，賽威拉，西班牙，１９９８）來進行作用。最近證明：ＧＨＲＰ受體不只存於下視丘和腦下腺的系統也分佈在一般來說與ＧＨ釋出無關的許多人類組織中（Ｇ．慕

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(2　)

奇利等人著，見上述（ａ））。

ＧＨＲＰｓ和其拮抗劑說明於如下列之文獻中：Ｃ．Ｙ．鮑爾斯，supra, Ｒ．狄格非，〝生長激素釋出肽〞，ibidem, 1996, p.85-102；Ｒ．狄格非等人著，〝做爲生長激素強力釋出劑的小型肽類〞J. Ped. End. Metab., 8, p. 311-313, 1996；Ｒ．狄格非，〝用來做爲生長激素促泌劑之不透水肽的發展〞，Acta Paediatr. Suppl., 423, p. 85-87, 1997；Ｋ．維利利嘉納凡等人著，〝連結至豬前腦下腺和下視丘膜的生長激素釋出肽（ＧＨＲＰ）〞，生命科學，50, p. 1149-1155, 1992；和Ｔ．Ｃ．索摩斯等人著，〝低分子量之擬肽的生長激素促泌劑〞，ＷＯ　９６／１５１４８（５月２３日，１９９６年）。

本發明的摘要

本發明關於一種用來治療哺乳動物體內之腫瘤的方法，它包含了給予需要此種治療之哺乳動物一有效量的生長激素釋出肽（ＧＨＲＰ）或其拮抗劑，或者，根據本發明所使用的化合物可以被定義爲生長激素促泌劑或其拮抗劑。這些化合物的量可有效降低或抑制哺乳動物體內生瘤細胞的增生。在另一種體系中，這些化合物的特性是它們可取代哺乳動物之含瘤組織中的放射活性標記 ^{125}I－Ｔｙｒ－Ａｌａ－Ｈｉｓ－Ｄ－Ｍｒｐ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｄ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ－NH_2（^{125}I－Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嚕啉）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(3　)

此處所揭示的化合物顯示出它們可連接在生瘤組織上並在給予病人後會作用在特定的受體上，因此，可使生瘤細胞的數目減少。較佳的情況是，所治療的腫瘤是肺、乳房、甲狀腺或胰臟腫瘤。

上述化合物包括了某些已知的化合物（參考上述），但其它有些用於本發明的化合物以前並未發表過，這些化合物包括了一種螺內醯胺，雙環或三環的擬肽單位。本發明中所有這些有用的化合物的共同特徵是至少有一種賴胺酸單位存在。

圖形的簡單說明

第一圖是一種說明^{125}I－Tyr－Ala－六嗤啉對細胞膜之特定連接的圖形，這些細胞膜是來自不同起源之非內分泌和內分泌的人類腫瘤。

第二圖是一種說明^{125}I－Tyr－Ala－六嗤啉連接至來自非內分泌之肺腫瘤細胞膜的圖形。

第三圖是一種說明由不同化合物取代^{125}I－Tyr－Ala－六嗤啉以連接至來自非－內分泌肺腫瘤細胞膜上的圖形。縱座標代表結合率，這是以對照組的百分比來表示（即：在無標記的競爭物中的特定連接）。

第四圖說明了六嗤啉，Ala－六嗤啉，Tyr－Ala－六嗤啉，EP80317（HAIC－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2），D－$(Lys)_3$－GHRP6（His－D－

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(4　)

Trp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2）及MK0677（N－〔1（R）（〔1，2－二氫－1－甲磺醯螺－（3H－吲哚，3，4´－六氫吡啶－1´基）－2－（苯甲氧基）乙基〕－2－胺基－甲基丙醯胺－甲磺酸酯）等在人類肺癌細胞中對基底和經EGF刺激之^3H－胸腺啶鑲嵌作用的效果。

第五圖說明了如下群體在人類肺癌細胞中對經EGF刺激之^3H－胸腺啶鑲嵌作用的效果：六嘧啉，Ala－六嘧啉，Tyr－Ala－六嘧啉EP80317，D－（Lys）$_3$－GHRP6和MK0677，此圖形是以劑量反應曲線表示。

第六圖是一種說明六嘧啉在人類肺癌細胞之增生作用上的效果的圖形。

第七圖是一種說明六嘧啉（a）和Ala－六嘧啉（b）在人類乳癌（T47D）之細胞增生作用上的效果的圖形。

第八圖是六嘧啉（a）和Ala－六嘧啉（b）在人類乳癌（MDA－MB231）之細胞增生作用上的效果。

較佳體系的詳細說明

在本說明中，使用了下列：D是右旋的鏡像體，G是生長激素，Mrp是2－甲基－Trp，IMA是咪唑基乙醯，GAB是γ－胺丁炔基，INIP是isopecotinyl，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(5　)

ＡＩＢ是胺基異丁炔基，Ｎａｌ是β－萘基氨基丙酸，ＴＸＭ是抗血纖溶環基，也就是４－（胺甲基）－環己烷羰基，Ｄ－ＨＮＨ是Ｄ－１，２，３，４，５，６－六氫－norharman－３－羧酸酯，ＨＡＩＣ是（２Ｓ，５Ｓ）－５－胺基－１，２，４，５，６，７－六氫－氮雜草〕３，２，１－ｈｉ〕吲哚－４－酮－噻－１－氮雜－雙環〔３．４．０〕壬－２－羧酸酯，而Ａｌａ，Ｌｙｓ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，Ｈｉｓ，Ｔｈｒ，Ｃｙｓ，Ｔｙｒ，Ｌｅｕ和Ｉｌｅ各是胺基酸丙胺酸、賴胺酸、苯基丙胺酸、色胺酸、組胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、白胺酸和異白胺酸。

在本發明的一種體系中，可用來給予欲治療之哺乳動物的有用化合物爲通式Ｉ所示的化合物：

$AA^1-AA^2-AA^3-AA^4-Lys-R$　　（Ｉ）

其中

AA^1是ＩＭＡ，ＧＡＢ，ＩＮＩＰ，ＴＸＭ，ＡＩＢ，Ｈｉｓ－Ｄ－Ｔｒｐ－，Ｈｉｓ－Ｄ－Ｍｒｐ，Ｔｈｒ－Ｄ－Ｔｒｐ，Ｔｈｒ－Ｄ－Ｍｒｐ，Ｄ－Ｔｈｒ－Ｄ－Ｔｒｐ，Ｄ－Ｔｈｒ－Ｄ－Ｍｒｐ，Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ｎａｌ，ＩＭＡ－Ｄ－Ｔｒｐ，ＩＭＡ－Ｄ－Ｍｒｐ，Ｄ－Ｔｈｒ－Ｈｉｓ－Ｄ－Ｔｒｐ，Ｄ－Ｔｈｒ－Ｈｉｓ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(6　)

－D－Mrp，Cys－Tyr－GAB，Ala－His－Trp，

Ala－His－D－Mrp，Tyr－Ala－His－D－Trp，Tyr－Ala－His－D－Mrp，

D－Ala－D－Trp，

或D－Ala－D－Mrp；

AA^2是Ala，D－Nal，D－Lys，D－Mrp，或Trp；

AA^3是D－Trp，D－Nal，D－Trp，Mrp，D－Mrp，Phe，或D－Phe；

AA^4是D－Trp，Mrp，D－Mrp，Phe，或D－Phe；且

R是$－NH_2$，$Thr－NH_2$，或$D－Thr－NH_2$。

含有D－Mrp單位者是較佳的化合物。

在另一個體系中，有用的化合物包括那些在美國專利申請號09／089，954（於1998年6月3日提出）中所說明的化合物。這些化合物是通式II所示的肽類：

$$A－B－D－Mrp－C－E \qquad (II)$$

其中：

A是H或Tyr；

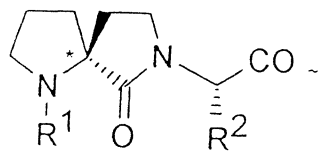
B是一種通式III所示的螺內醯胺

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

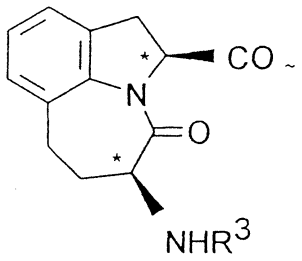
裝　訂　線

五、發明說明 (7　)



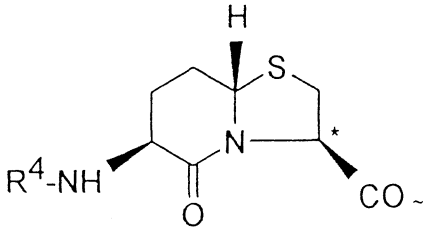
(III)

此處 R^1 是 H 或 Tyr，R^2 代表任何一種天然產生之胺基酸的側鏈，且在*處的結構是（R），（S）或其混合物；一種式Ⅳ所示的三環化合物



(IV)

此處 R^3 是 H 或 Tyr 且在*處的結構是（R），（S）或其混合物；一種式Ⅴ所示的雙環化合物



(V)

此處，R^4 是 H 或 Tyr 且在*處的結構是（R），（S）或其混合物；D－Mrp 是右旋－2－甲基－Trp；C 是 Trp－Phe－Lys，D－Trp－Phe－Lys，Mrp－Phe－Lys，D－Mrp－Phe－Lys，Trp－Lys，D－Trp－Lys，Mrp－Lys，D－Mrp－Lys，Ala－Trp－D－Phe－Lys，Ala

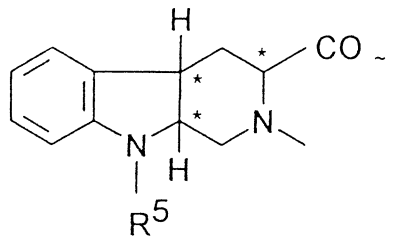
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (8　)

－Mrp－D－Phe－Lys，

Ala－D－Mrp－D－Phe－Lys，D－Lys－Trp－D－Phe－Lys，D－Lys－Mrp－D－Phe－Lys，

D－Lys－D－Mrp－D－Phe－Lys，或一種式VI所示的三環化合物



(VI)

此處R^5是H或SO_2Me且在*處的結構是不是（R），（S）就是其混合物；且當C是先前定義之三環化合物時，E是Lys－NH_2或－NH_2（假設E是Lys－NH_2）。

根據本發明，可發現：GH釋出化合物及不會釋出GH之化合物二者都可用來治療腫瘤。較佳的情況是，根據本發明所要治療的腫瘤是肺、乳房、甲狀腺或胰臟腫瘤。

通式I所示之特別好的GH釋出化合物包括下列：

His－D－Trp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

His－D－Trp－Ala－Mrp－D－Phe－Lys－NH_2，

D－Thr－His－D－Mrp－Ala－Trp－D

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (9　)

－Phe－Lys－NH_2，

Thr－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

IMA－D－Mrp－D－Trp－Phe－Lys－NH_2，

IMA－D－Mrp－D－Nal－Phe－Lys－NH_2，

GAB－D－Mrp－D－Mrp－D－Mrp－Lys－NH_2，

D－Ala－D－Nal－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

INIP－D－Nal－D－Nal－Phe－Lys－NH_2，

INIP－D－Nal－D－Trp－Phe－Lys－NH_2，

IMA－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

INIP－D－Mrp－D－Trp－Phe－Lys－NH_2，

INIP－D－Mrp－D－Nal－Phe－Lys－NH_2，

GAB－D－Mrp－D－Trp－Phe－Lys－NH_2，

TXM－D－Mrp－D－Trp－Phe－Lys－

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (10)

NH_2，

GAB－D－Mrp－Mrp－Phe－Lys－NH_2，

Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－Thr－NH_2，

His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

D－Thr－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

GAB－D－Mrp－D－Nal－Phe－Lys－NH_2，

GAB－D－Mrp－D－Mrp－Mrp－Lys－NH_2，

Cys－Tyr－GAB－D－Mrp－D－Mrp－Mrp－Lys－NH_2，

Tyr－Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，及

D－Ala－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

而不會釋出GH之通式I所示的較佳化合物包括：

His－D－Trp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (11)

His－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

His－Ala－D－Trp－Lys－Mrp－D－Phe－Lys－NH_2，

His－D－Mrp－D－Lys－Mrp－D－Phe－Lys－NH_2，

His－Ala－D－Trp－Ala－Mrp－D－Phe－Lys－NH_2，及

His－D－Trp－Ala－Mrp－D－Phe－Lys－NH_2。

較佳之通式II所示之化合物包括下列：

〔S，S－螺（Pro－Leu）〕－D－Mrp－D－Trp－Phe－Lys－NH_2，

〔S，S－螺（Pro－Leu）〕－D－Mrp－Mrp－Lys－NH_2，

〔S，S－螺（Pro－Leu）〕－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

〔S，S－螺（Pro－Leu）〕－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

Tyr－〔S，S－螺（Pro－Leu）〕－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

〔S，S－螺（Pro－Ile）〕－D－Mrp－D－

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (12)

Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

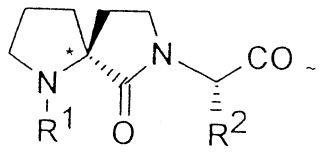
〔S，S－螺（Pro－Leu）〕－D－Mrp－D－HNH－（SO_2CH_3）－Phe－Lys－NH_2，

HAIC－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，及

ATAB－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2，

此處，S，S－螺（Pro－Leu）和S，S－螺（Pro－Ile）各是4－甲基－2S〔6´－酮基－（5´－S），1´，7´－二氮雜螺〔4，4〕壬－7´－基－〕戊酸酯和3－甲基－2S〔6´－酮基－（5´－S）1´，7´－二氮雜螺〔4，4〕壬－7´－基－1〕戊酸酯。

這些單位具有式（Ⅲ）



(III)

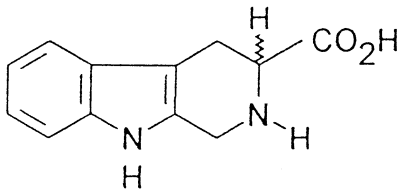
此處R^1是H且R^2是Leu或Ile的側鏈（見P．華德等人著，醫學化學期刊，33，1848（1990）。還有，該三環化合物HNH是經由將相對應之四氫－norharman－3－羧酸進行傳統氫化作用來取得的，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (13)



(VII)

由根據式Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ的單位所組成的擬肽單位其優點是它們鎖住一種β－旋動的結構，因此可以模擬天然的胺基酸。

這些化合物之藥學上可接受的鹽如需要時也可拿來使用。此類鹽包括有機或無機的加成鹽，如：氫氯酸鹽、氫溴酸鹽、磷酸鹽、硫酸鹽、醋酸鹽、琥珀酸鹽、菸碱酸鹽、酒石酸鹽、葡糖酸鹽、苯甲酸鹽、蘋果酸鹽、富馬酸鹽、硬脂酸鹽或４，４´－亞甲基雙（３－羥基－２萘羧酸鹽）。

所有化合物都可以根據傳統上肽化學之一般方法來合成，如：①固相肽合成法，如：由Ｅ．艾瑟頓及Ｒ．Ｃ．雪佰在〝固相肽合成法〞（牛津大學出版公司的ＩＲＬ印刷，１９８９）中所說明者，②溶液相合成法，如：由Ｊ．瓊斯在〝肽類之化學合成法〞（克　如登出版公司，牛津，１９９４）中所說明者，③固相和溶液相二種方法的組合法。

固相合成法是從化合物之Ｃ－終端來開始的。合適的起始物質可以經由下述方法來製備，如：將所需要之受保護的α－胺基酸附著至如下群體：氯甲基化樹脂，羥甲基化樹脂，benzhydrylamine resin（ＢＨＡ）例如：可取得之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（14）

氯甲基化樹脂是由加州里奇蒙市，拜爾瑞德實驗室（BioRad Laboratories）所出品的BIOBEADS SX1。羥甲基化樹脂的製備方法說明於〝邦丹史凱等人所著之〝Chem. Ind.（倫敦）38, 15997 (1966)〞中。BHA樹脂在〝比塔和馬歇所著，Chem. Comm., 650 (1970)〞中有所說明並由加州貝爾曼市，潘寧舒拉實驗室（Peninsula Laboratories）製成商品。

經過開始時的附著作用後，α－胺基酸的保護基團可以用不同的酸試劑來移除，如：室溫下，溶於有機溶劑中的三氟醋酸（TFA）或氫氯酸（HCl）。在移除α－胺基酸的保護基團之後，剩餘之受保護的天然胺基酸或相對應於根據通式Ⅲ，Ⅳ，Ⅴ和Ⅵ之單位的羧酸（它們也構成胺基酸）可以依所需要的順序一步一步地進行偶合。各受保護的胺基酸一般可以利用合適的羧基活化基團在約超過三倍量的情況下來反應，這類活化基團有，如：溶解的二環己基碳化二亞胺（DCC）或二異丙基碳化二亞胺，它們可溶於如：二氯甲烷（CH_2Cl_2），二甲基甲醯胺（DMF）或其混合物中。在完成所需要之胺基酸性的序列後便可將所需要之化合物以一種試劑，如：氟化氫（HF），來處理使其從支撐樹脂分裂出來，該種試劑不僅可將化合物從樹脂中分裂出來，也可把側鏈的保護基團分裂出來。當所使用的爲氯甲基化樹脂時，以HF來處理會形成具有終端酸基團的化合物並且是以游離的型態存在。當使用的是一種BHA或對－Me－BHA時，以HF來

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（15）

直接處理會形成具有終端醯胺基團的化合物，它們也是以游離形態存在。

可用來治療哺乳動物（包括人）體中腫瘤的藥品可以含一種根據本發明之化合物或其藥學上可接受的鹽，或根據本發明之化合物或其藥學上可接受之鹽類的組合體，並隨意地與下列物質一起混合：載體、賦性劑、媒介、稀釋劑、母質或延遲釋出之包膜，這些物質可見於〝明頓藥物科學，18版，賓州伊斯登之A.R.詹納如，Ed.馬克出版公司，Easton, PA1990〞。

根據本發明的任一化合物可以由內行人士進行製劑以提供適用於下列給藥途徑的藥品：腸胃道的、肛門的、直腸的、陰道的、經皮膚的、肺部的或口服的藥品。

藥品製劑的型態包括：根據所需要之遞送速度所選擇的化合物。例如：若要迅速遞送化合物的話，則鼻部或血管內的途徑爲較佳者。

這些藥物可以以有效的治療劑量給予哺乳動物（包括人類在內），這個劑量可以很容易地由內行人士來決定，並可依病人的人種、年齡、性別、體重而不同，亦可因給予的途徑而有不同。例如：對人類而言，當以靜脈途徑給予時，較合適的劑量範圍爲每公斤體重約1微克至25微克的化合物。而經由口服途徑給予時通常需要較高的劑量，例如，對人類而言，經由口服給予的劑量，通常是每公斤體重約30微克至1000微克的化合物。正確的劑量可以很容易地根據前述揭示的內容來決定。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 16）

實施例

下列實施例說明本發明中用來治療腫瘤之最佳化合物的效果

1．物質和方法

a）化學藥品

六噃啉（His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2），Ala－六噃啉（Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2），Tyr－Ala－六噃啉（Tyr－Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2），MK0677（N－〔1（R）（〔1，2－二氫－1－甲磺醯基螺－（3H－吲哚，3，4´－六氫吡啶）－1´基〕－2－（苯甲氧基）乙基〕－2－胺基－甲基丙醯胺－甲磺酸酯），EP80317（HAIC－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2）及D－（Lys）$_3$－GHRP6（His－D－Trp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2）是由歐洲肽所供應的（法國，阿根提爾）。人體GHRH（GHRH 1－44）和生長抑素（生長抑素1－14）是從〝貝肯〞（Bachem）公司（瑞士，布邊多

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 17）

）購買來的。人類之重組的表皮生長因子（ＥＣＦ）和所有的組織培養試劑都是從史格馬化學公司（ Sigma, Chemical Co.,美國密蘇里州聖路易市）所購得的。^{3}Ｈ－胸腺嘧啶是從義大利之法馬西亞－艾默森公司購得（義大利，米蘭）。

ｂ）人類組織

從吐林（ Turin ）大學〝生醫科學和人類癌症部門〞（病理科）收集手術的腫瘤樣本。將相鄰在用於組織病理診斷之腫瘤旁的腫瘤片段立刻於－８０℃下冷凍並貯存２至６０個月直到再經進一步處理以供連接研究。使用的樣本包括：１３個侵入性乳癌（１０個導管性的，３個小葉性的），１４個非內非泌性肺癌（５個鱗狀細胞和９個腺癌），１１個內分泌性肺腫瘤，９個內分泌性胰臟腫瘤及１２個甲狀腺癌（７個濾泡源的，５個骨髓源的）。相關器官之非－腫瘤正常組織也與各腫瘤一起做平行分析。

ｃ）腫瘤細胞株

人類肺癌細胞（ＣａＬｕｌ），Ｔ４７Ｄ和ＭＤＡ－ＭＢ２３１，與人類雌激素有關以及與雌激素無關之乳癌細胞株從ＡＴＣＣ（美國，馬利蘭州，洛克維爾）購得。將這些細胞依常例在３７℃，５％ＣＯ$_{2}$和９５％的大氣溫度下，培養於２５ｃｍ^{3}的培養盒內以加有１０％ＦＣＳ，青黴素－鏈黴素和兩性黴素的ＲＰＭＩ爲其介質。當達到

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（18）

次融合的階段時，以胰蛋白酶／ＥＤＴＡ將細胞從培養盒分離出來。

ｄ）ＧＨＲＰ受體的分析

依Ｇ．慕奇歐利等人在〝內分泌期刊，１５７，９９－１０６，１９９８〞中的說明，利用^{125}Ｉ－Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘧啉做爲配體於腫瘤細胞膜上測量ＧＨＲＰ受體。計算特定連接來做爲沒有過量之未經標識Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘧啉存在時的連接和有過量之未經標識Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘧啉存在時的連接二者間的差異，而其表示法是以所加入之放射活性的百分比來表示。以GraphPAD Prism 2程式（GraphPAD軟體，美國加州聖地牙哥）來分析飽和性和競爭性連接的研究。

ｅ）細胞增生的研究

ＤＮＡ的合成是依Ｇ．慕奇利等人所著，〝內分泌學期刊，１５３，３６５－３７１，１９９７〞中所說明的^{3}Ｈ－胸腺嘧啶嵌入法來進行評估的。將飢餓細胞以單獨的介質（基質）或ＥＧＦ（１毫微克／毫升）在沒有或有不同濃度（從10^{-8}至10^{-6}莫耳／升）之六嘧啉，Ａｌａ－六嘧啉，Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘧啉，ＭＫ０６７７，（Ｄ－Ｌｙｓ）$_3$－ＧＨＲＰ６或ＥＰ８０３１７的存在下進行培養。在培養２０小時後，加入^{3}Ｈ－胸腺嘧啶並繼續培養４小時。終止反應後，將細胞收至玻璃纖維製的濾紙片

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（19）

上。以閃爍計數器來計算所嵌入的^{3}H－胸腺嘧啶。

依P．卡所尼（Cassoni）等人所著，於Virchows Archiv, 425, 467-472, 1994，中所說明的方法來研究細胞的生長情形。將細胞種在一個帶有24個槽的培養盤中，細胞密度爲5000－100000細胞／毫升，共重複三組。在植入24小時後，更換介質。於所需要的槽中加入濃度從10^{-8}至10^{-6}莫耳／升的六嚕啉或Ala－六嚕啉。每48小時更換一次介質。在處理後的48及72或96小時計算細胞數，計算方法是由二名各自獨立的檢查者以血球計數器進行雙盲分析。

f）統計分析

數據是以平均值（第1圖和第2圖）或平均值±S.E.M.（第3至7圖）來表示（除非另外註明）。統計上是否具有意義是利用曼－懷特尼測驗（Mann-Whitney test）（第1至3圖）或單向ANOVA（第4至7圖）來決定的。每一種實驗都至少重複進行三次。

2．結果

a）鑑定GHRP及其拮抗劑在不同的人類腫瘤中的受體

第1圖顯示經放射標識之Tyr－Ala－六嚕啉在來自不同來源之內分泌及非－內分泌性人類腫瘤細胞膜上的連接分佈情形（*P＜0.01對相對應之非腫瘤組織）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 20）

。肺和乳房之非－內分泌性腫瘤以及胰臟和甲狀腺（濾泡型）的內分泌癌所具有的中間特定連接值在統計學上高於在相對應之非腫瘤正常組織中所發現的數值。相反的，肺部或甲狀腺（骨髓型）的正常組織和內分泌腫瘤的特定連間值之間並沒有差異。

b）GHRP及其拮抗劑受體的生化特徵

爲了測定^{125}I－Tyr－Ala－六噯啉對腫瘤細胞膜的連接是否具有配體－受體交互作用之典型性質，本發明者在一種起源於肺部的非內分泌性癌（此種組織具有最高的特定連接值）中更詳盡地檢查放射追蹤劑的連接情形。第2圖爲放射配體之增加濃度的函數，此函數是描述^{125}I－Tyr－Ala－六噯啉對腫瘤細胞膜的連接情形。此研究顯示出可飽和特定連接的證明，而〝史卡卻分析〞（較上方的表）表示有一組高親和性部位的存在。

^{125}I－Tyr－Ala－六噯啉連接至腫瘤連接部位的專一性是以不同化合物與放射配體競爭的能力來決定的（cf.第3圖）。放射追蹤劑對腫瘤細胞膜的連接力是由如下群體以一種依劑量決定的型式來取代：六噯啉、Ala－六噯啉，Tyr－Ala－六噯啉及GHRP拮抗劑，如：D－(Lys)$_3$－GHRP6和EP80317，一種六噯啉之（胺基一 azepino－吲哚）$_1$－D（Lys）$_3$衍生物，此衍生物在新生老鼠中不會釋出GH。在有MK0677存在時可觀察到一種可忽略的取代行爲（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（21）

ＭＫ０６７７是一種連接至腦下垂體ＧＨＲＰ受體的非－peptidyl ＧＨＲＰ模擬物）。相反的，在有ＧＨＲＨ或生長抑素存在時沒有任何競爭行爲可觀察到。

ｃ）ＧＨＲＰ及其拮抗劑對^{3}Ｈ－胸腺嘧啶嵌入作用的效果

濃度爲１０$^{-6}$莫耳／升的六嘌啉可以抑制在人類肺癌細胞中之基本及經ＥＧＦ刺激的二種^{3}Ｈ－胸腺嘧啶嵌入作用（ｃｆ．第４圖；*Ｐ＜０．０５，**Ｐ＜０．０１相對於對照組）。當將細胞在有１０$^{-6}$莫耳／升Ａｌａ－六嘌啉，Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘌啉或ＧＨＲＰ拮抗劑，如：（Ｄ－Ｌｙｓ）$_{3}$－ＧＨＲＰ６和ＥＰ８０３１７的存在下進行培養時，可觀察到抗增生效果。相反的，當有ＭＫ０６７７的存在時，可觀察到些微的抑制作用。經由增加六嘌啉，Ａｌａ－六嘌啉，Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘌啉，（Ｄ－Ｌｙｓ）$_{3}$－ＧＨＲＰ６和ＥＰ８０３１７（ｃｆ．第５圖）的濃度可顯示出這些化合物會抑制在人類肺癌細胞上的ＥＧＦ增生效果，而且是以根據劑量的型式來作用的。ＥＰ８０３１７的ＥＣ$_{50}$數值爲５．６×１０$^{-8}$莫耳／升，Ｔｙｒ－Ａｌａ－六嘌啉爲６．５×１０$^{-8}$莫耳／升，六嘌啉爲８×１０$^{-8}$莫耳／升。

ｄ）ＧＨＲＰ在細胞生長上的效果

在人類肺癌細胞中，濃度爲１０$^{-8}$莫耳／升的六嘌啉在與對照組進行比較時，待經過９６小時後會具有明顯的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（22）

降低肺癌細胞數目的效果（－47%）。此效果在濃度爲10^{-7}莫耳／升和10^{-6}莫耳／升時，在任何測試時間點觀察都會有更明顯的增加（cf.第6圖；**P＜0.001；***P＜0.0001 vs.對照組）。

在人類乳癌T47D細胞中，濃度爲10^{-8}莫耳／升的六嚕啉在與對照組進行比較時，待經過96小時後會有很明顯的降低乳癌細胞數目的效果（－54%）。此效果在濃度爲10^{-7}莫耳／升和10^{-6}莫耳／升時，於任何測試時間點觀察時都會時顯地增加（cf.第7a圖；**P＜0.001；***P＜0.0001 vs.對照組）。Ala－六嚕啉在這些腫瘤細胞上也表現出類似的抗增生效果（cf.第7b圖；**P＜0.001；***P＜0.0001 vs.對照組）。

在人類乳癌MDA－MB231細胞中，濃度爲10^{-8}莫耳／升的六嚕啉在與對照組進行比較時，於72小時後可具有明顯的降低癌細胞的效果（－33%）。濃度爲10^{-7}莫耳／升和10^{-6}莫耳／升的六嚕啉於任何測試時間點觀察時都可觀察到更進一步的效果（cf.第8a圖；*P＜0.01；**P＜0.001；***P＜0.0001 vs.張照雄）〔cf.第8b圖；*P＜0.01；**P＜0.001；***P＜0.0001 vs.對照組）

這些結果證明合成的生長釋出肽及其拮抗劑可抑制體外人類癌細胞的生長。而此抗增生效果是由一種特殊受體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（23）

所促成的。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：包含釋出生長激素之化合物或其拮抗劑以治療腫瘤之藥學組成物）

一種用於哺乳動物治療腫瘤之藥學組成物，其包含有效量之釋出生長激素之化合物或其拮抗劑以降低或抑制該哺乳動物之腫瘤生成細胞之增生。特別是，所要治療的腫瘤包括了：肺、乳房、甲狀腺或胰臟腫瘤。較佳的化合物爲某些含甲基色胺酸和賴胺酸單位的肽類。

英文發明摘要（發明之名稱：）

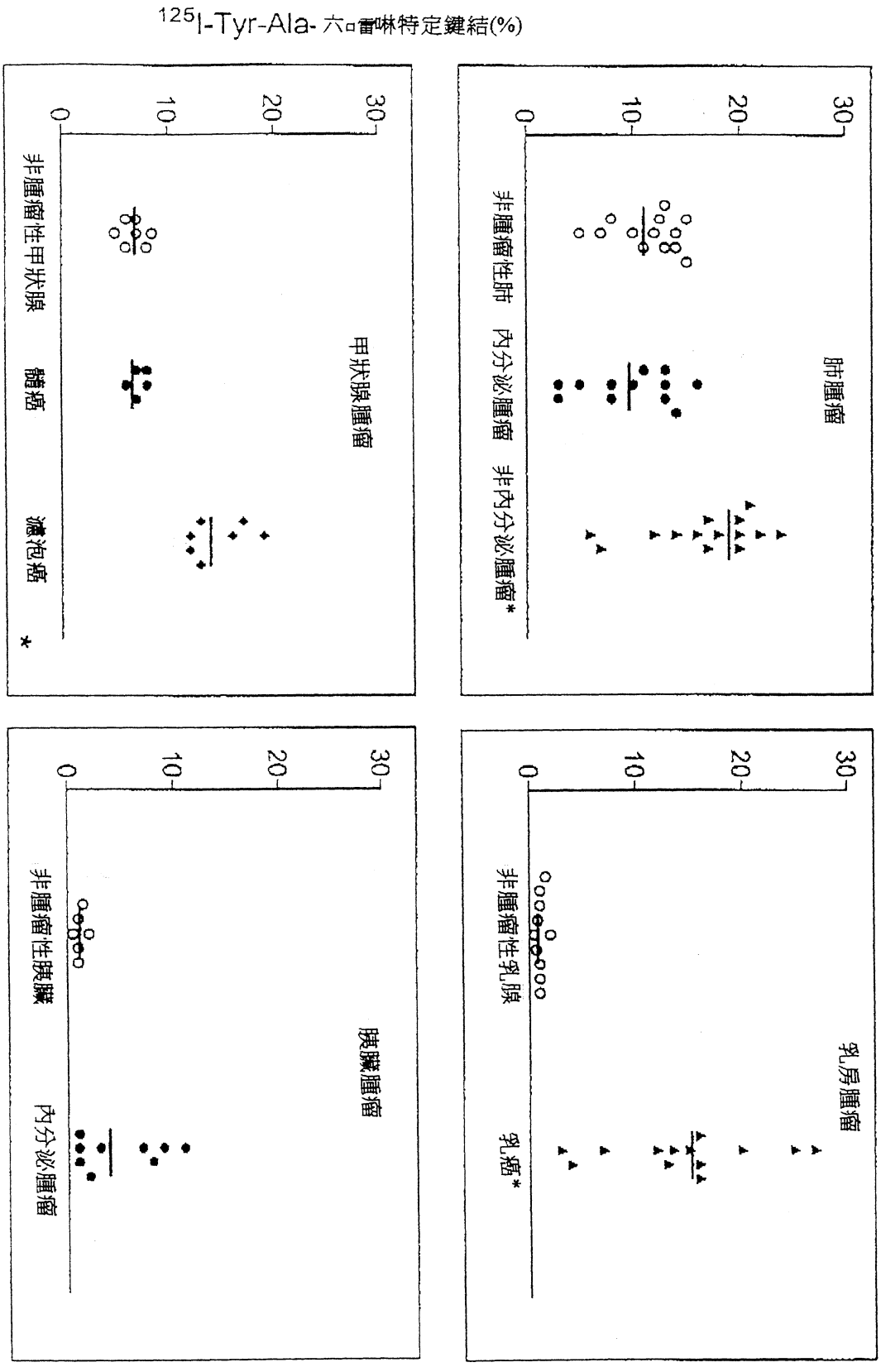
Pharmaceutical composition for treating tumors comprising growth hormone releasing compounds or their antagonists

A pharmaceutical composition for treating tumors in a mammal comprising a growth hormone releasing compounds or an antagonist thereof in an amount effective to reduce or inhibit proliferation of tumorigenic cells in the mammal. In particular, the tumors to be treated include lung, mammary, thyroid or pancreas tumors. The preferred compounds are certain peptides that contain methyl tryptophan and lysine units.

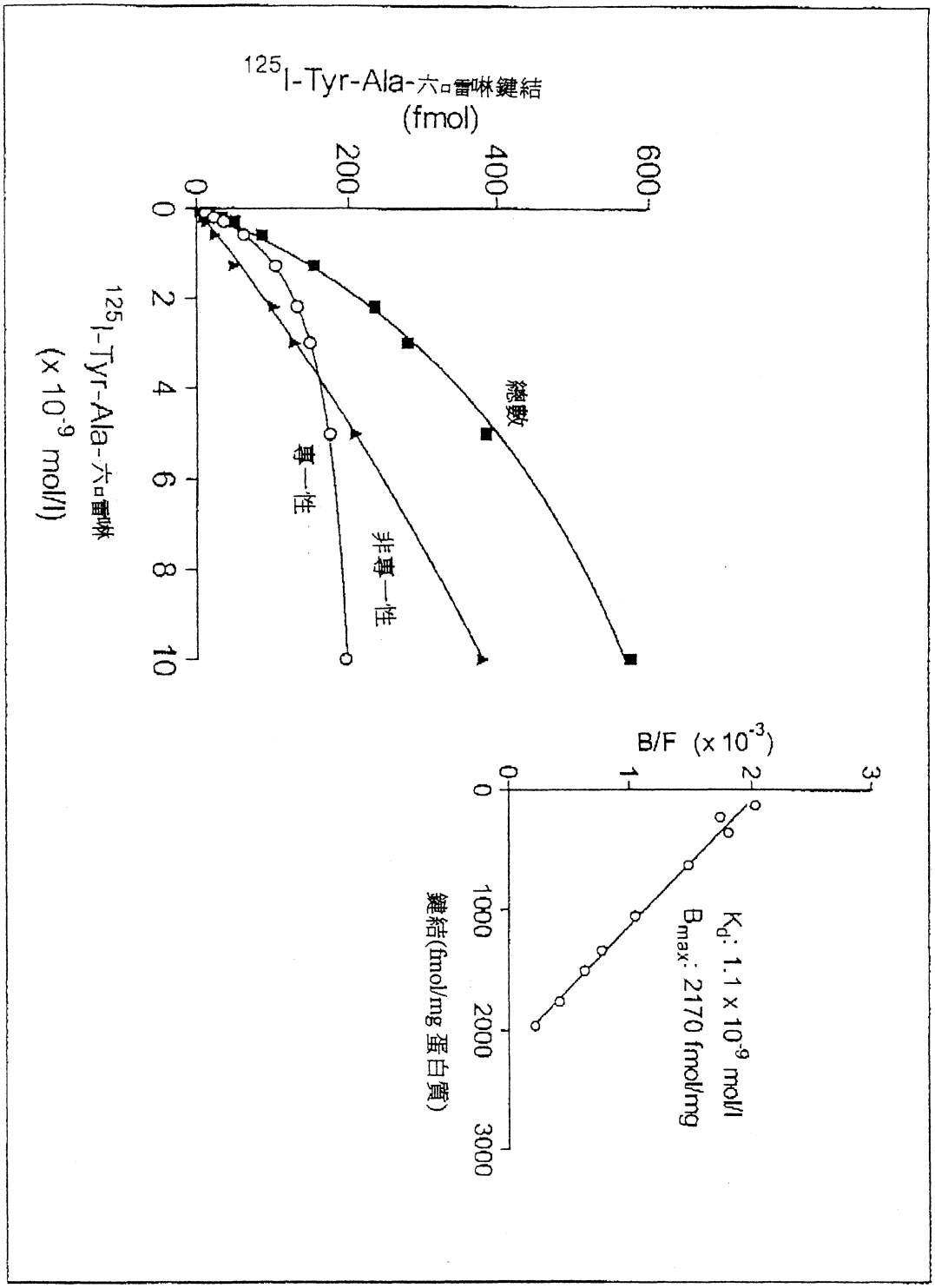
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝 訂 線

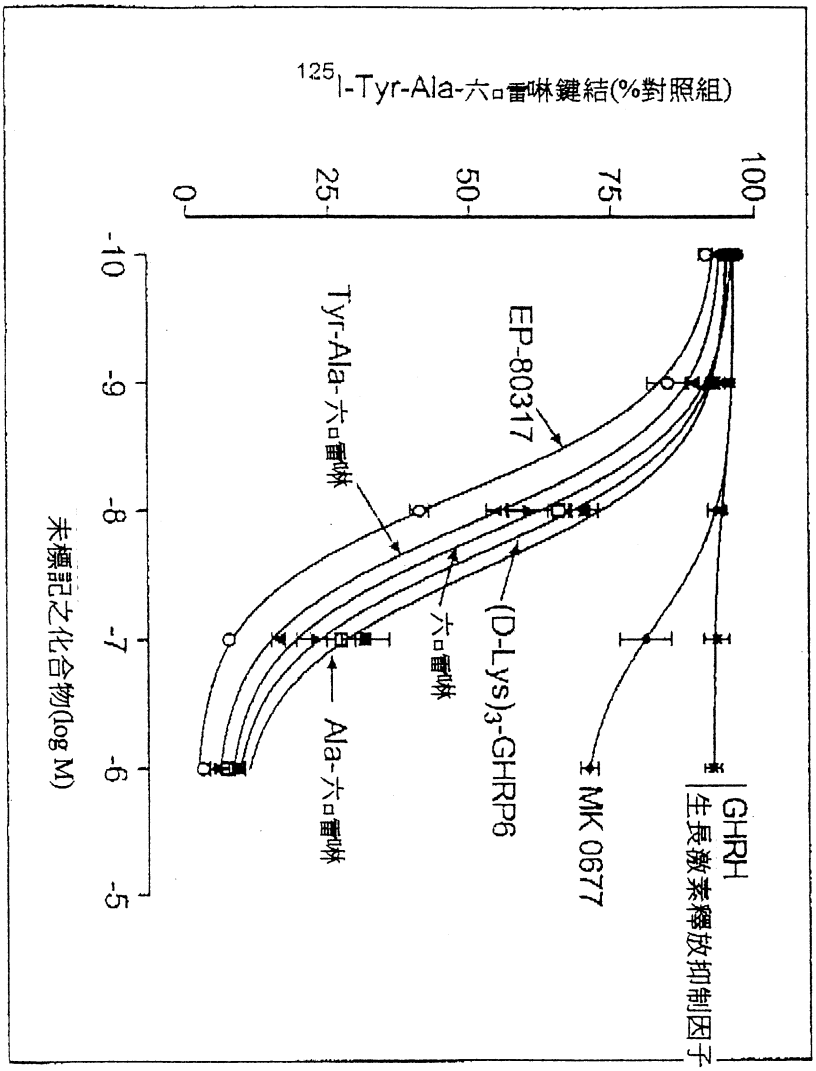
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製


125I-Tyr-Ala- 六□雷啉特定鍵結(%)
肺腫瘤
非腫瘤性肺
內分泌腫瘤
非內分泌腫瘤*
乳房腫瘤
非腫瘤性乳腺
乳癌*
甲狀腺腫瘤
非腫瘤性甲狀腺
髓癌
濾泡癌
*
胰臟腫瘤
非腫瘤性胰臟
內分泌腫瘤
0
10
20
30

第 1 圖

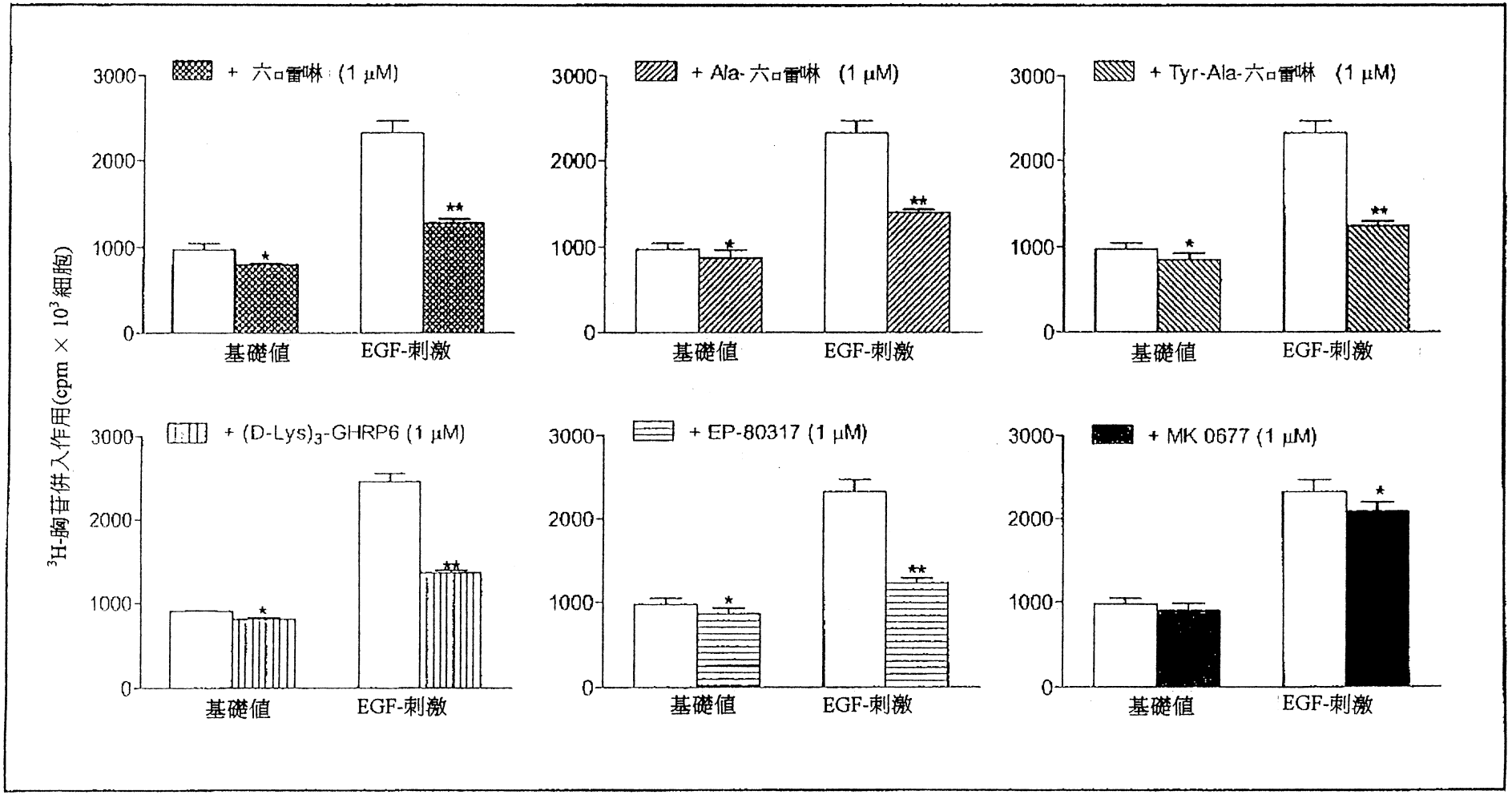

125I-Tyr-Ala-六□醯胺鍵結
(fmol)
0
200
400
600
125I-Tyr-Ala-六□醯胺
(x 10-9 mol/l)
0
2
4
6
8
10
總數
專一性
非專一性
B/F (x 10-3)
0
1
2
3
0
1000
2000
3000
鍵結(fmol/mg 蛋白質)
Kd: 1.1 x 10-9 mol/l
Bmax: 2170 fmol/mg

第 2 圖


125I-Tyr-Ala-六□雷咻鍵結(%對照組)
100
75
50
25
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
未標記之化合物(log M)
GHRH
生長激素釋放抑制因子
MK 0677
EP-80317
(D-Lys)3-GHRP6
六□雷咻
Tyr-Ala-六□雷咻
Ala-六□雷咻

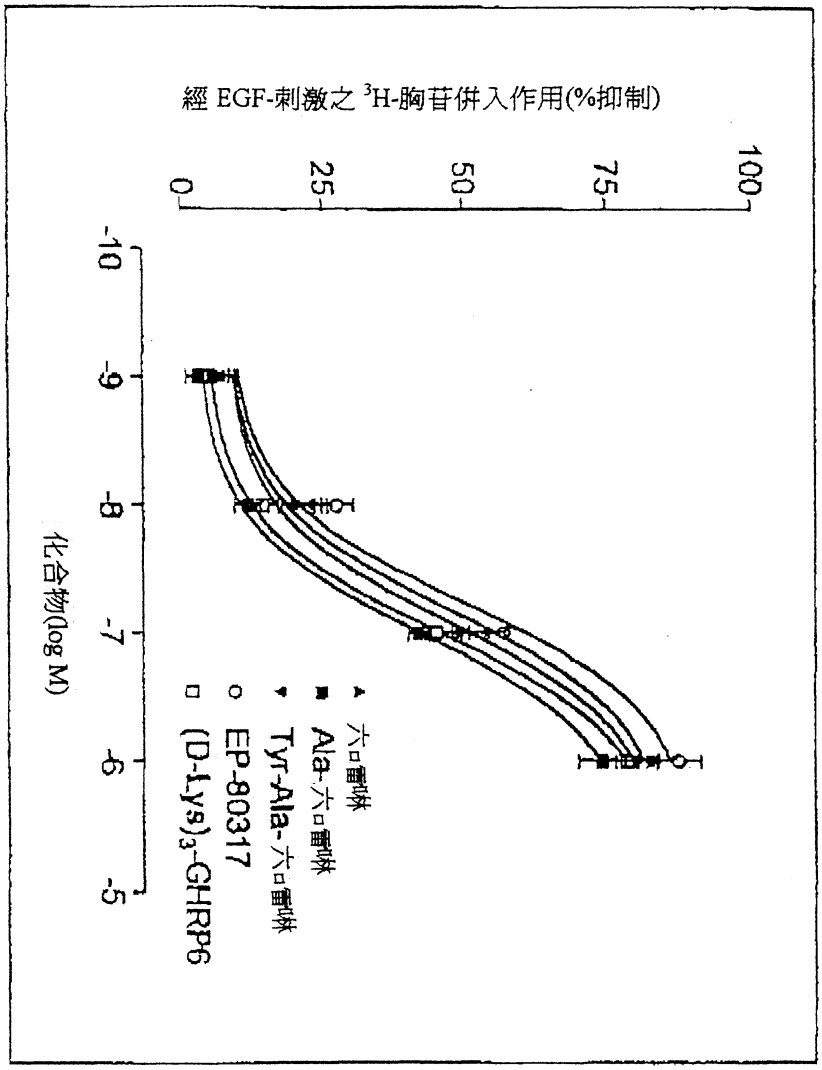
第 3 圖

29-NOV-1999 15:25 AWD GMBH PATENTABT. +49 351 834 1945 S.05

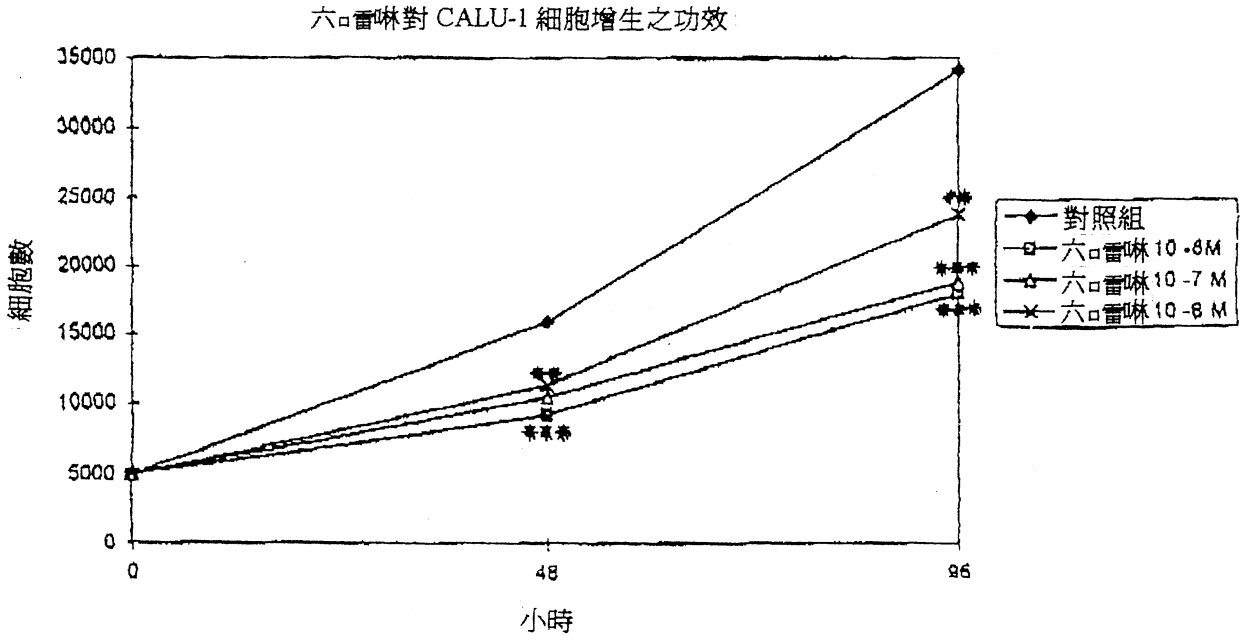


第 4 圖

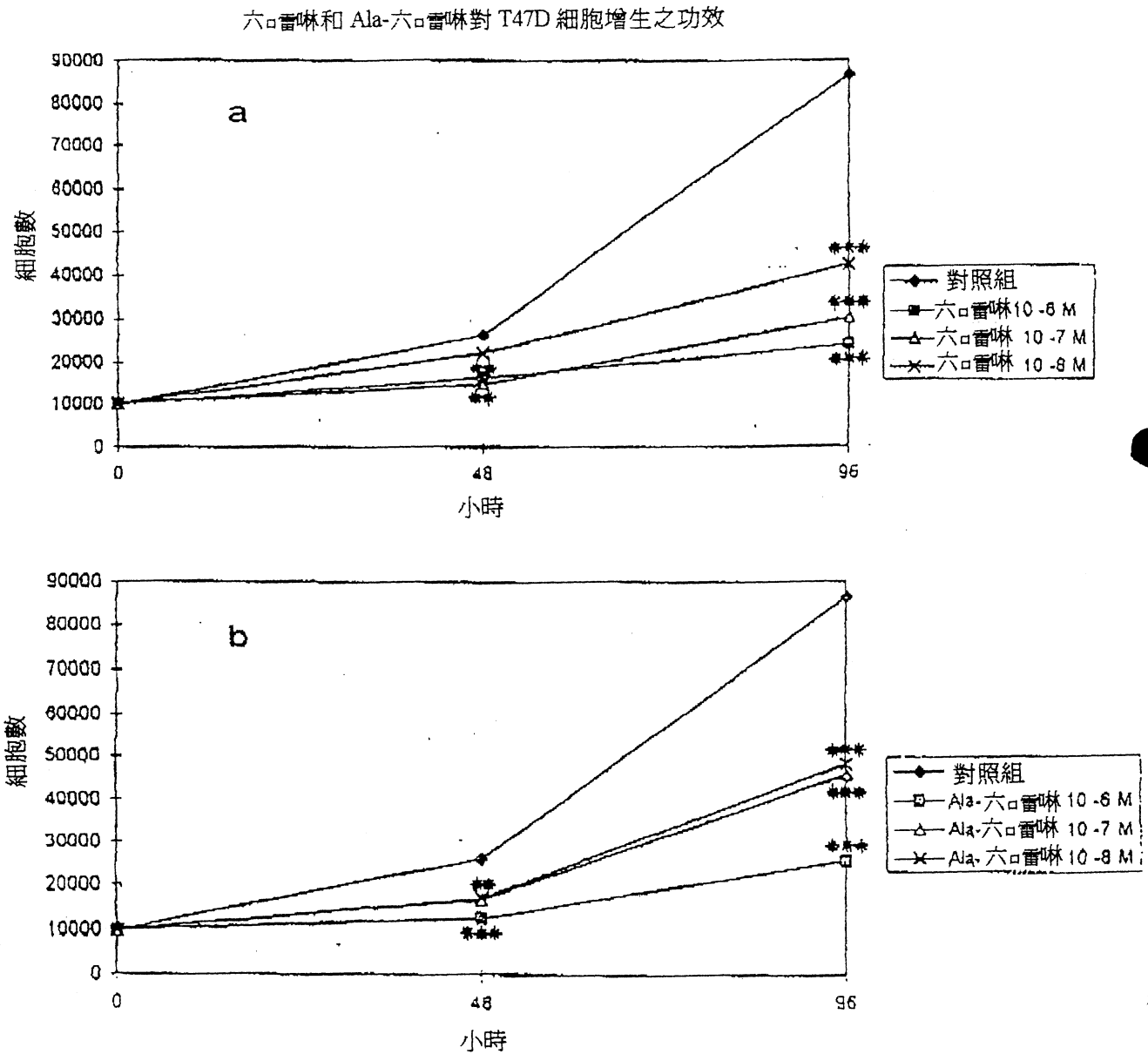
I237565


經 EGF-刺激之 ^{3}H-胸苷併入作用(%抑制)
0
25
50
75
100
-10
-9
-8
-7
-6
-5
化合物(log M)
▲ 六□雷啉
■ Ala-六□雷啉
▼ Tyr-Ala-六□雷啉
○ EP-80317
□ (D-Lys)$_3$-GHRP6

第 5 圖

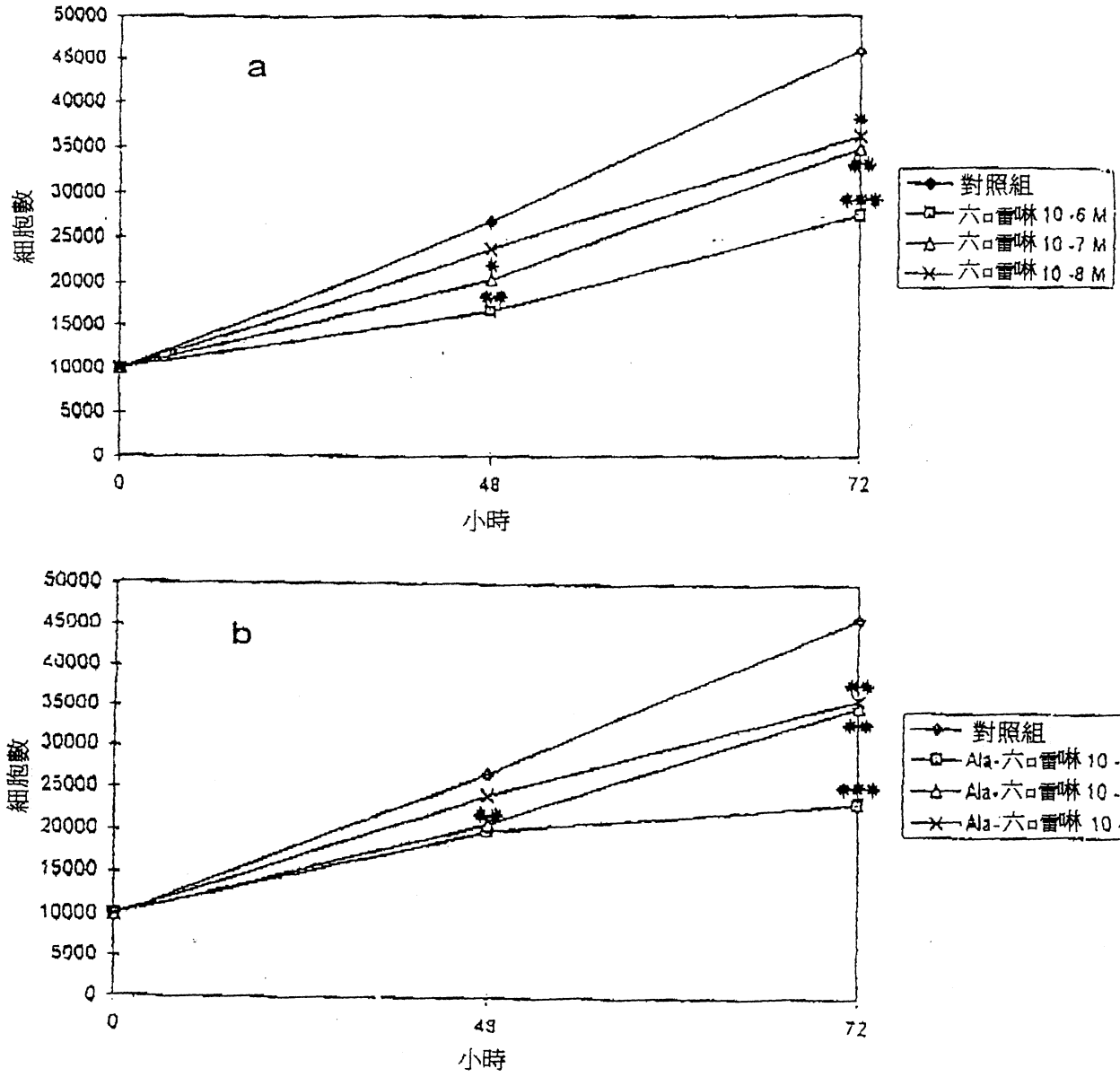

六□雷啉對 CALU-1 細胞增生之功效
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
細胞數
0
48
96
小時
對照組
六□雷啉 10 -8M
六□雷啉 10 -7 M
六□雷啉 10 -6 M

第 6 圖


六□雷啉和 Ala-六□雷啉對 T47D 細胞增生之功效
a
細胞數
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
48
96
小時
對照組
六□雷啉10 -6 M
六□雷啉 10 -7 M
六□雷啉 10 -8 M
b
細胞數
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
48
96
小時
對照組
Ala-六□雷啉 10 -6 M
Ala-六□雷啉 10 -7 M
Ala-六□雷啉 10 -8 M

第 7 圖

六□雷咪和 Ala-六□雷咪對 MDA-MB231 細胞增生之功效



第 8 圖

公告本

附件: 三A第88117984號修正後無劃線之
中文說明書替換頁　民國93年7月26日呈

I237565

申請日期	88年11月30日
案號	88117984
類別	A61K 38/08, 38/29

A4
C4

（以上各欄由本局填註）

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	包含釋出生長激素之化合物或其拮抗劑以治療腫瘤之藥學組成物
	英文	Pharmaceutical composition for treating tumors comprising growth hormone releasing compounds or their antagonists
二、發明創作人	姓名	(1) 蓋曼皮洛　孟卡爾林 Muccioli, Gianpiero (2) 莫洛　帕波提 Papotti, Mauro (3) 伊利歐　奇哥 Ghigo, Ezio
	國籍	(1) 義大利瑞法爾巴市（杜林）派薩科麥納爾十號 Piazza Comunale 10, 10090 Rivalba (Turin), Italy
	住、居所	(2) 義大利杜林市薩林諾街三十七號 Str. del Salino 37, 10133 Turin, Italy (3) 義大利巴比瑟洛多林尼斯市蘇波里歐街五十三號 Straada Superoa 53, 10020 Balbissero Torinese, Italy
三、申請人	姓名（名稱）	(1) 辛塔瑞斯股份有限公司 Zentaris AG
	國籍	(1) 德國
	住、居所（事務所）	(1) 德國法蘭克福威思蒂勒街四十五號 Weismullerstrasse 45, D-60314 Frankfurt, Germany
	代表人姓名	(1) 岡特・諾沃德 Nauwald, Gunter 克里斯汀　吉思 Gierth, Christine

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

六、申請專利範圍

附件 2A:　　第 88117984 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

94年6月14日 修正 補充

民國 94 年 4 月14 日修正

1．一種用於哺乳動物治療腫瘤之藥學組成物，其包含治療上有效量之1或多個選自下述之化合物：

His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2；

Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2；

Tyr－Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2；

His－D－Trp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2；及

HAIC－D－Mrp－D－Lys－Trp－D－Phe－Lys－NH_2。

2．如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該腫瘤是肺、乳房、甲狀腺或胰臟腫瘤。

3．如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該化合物自含有腫瘤之哺乳動物組織取代放射活性標記 ^{125}I－Tyr－Ala－His－D－Mrp－Ala－Trp－D－Phe－Lys－NH_2。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製