

## 五、發明說明 (1)

發明範圍

本發明係關於一種腫瘤胞毒性化學治療法。

本發明另一方面係關於腫瘤胞毒性化學治療組合物。

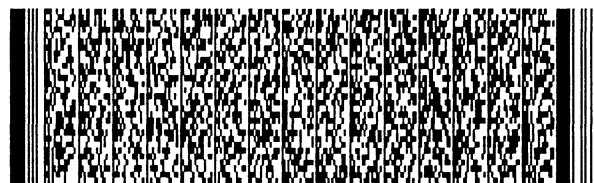
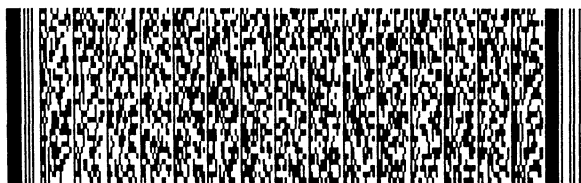
本發明更特別係關於治療人類宿主癌症之腫瘤胞毒性化學治療法和組合物。

發明背景

具腫瘤胞毒性之化學治療劑特別能誘使惡性細胞死亡(凋亡)。由於正常細胞和惡性細胞皆源自相同宿主的相似性，誘使腫瘤細胞凋亡的化學治療劑量對正常細胞也有毒性。為了能減輕疾病，具腫瘤胞毒性之治劑必須時常游走於可接受副作用之極限。最理想的腫瘤胞毒性治劑應該是"選擇性的"，即腫瘤胞毒性化學治療劑能有效誘使腫瘤細胞死亡所需之較低劑量與對病人正常細胞有害之較高劑量間有較大界限。

化學治療的有害副作用包括掉髮、噁心和嘔吐、心臟中毒及續發性癌症。許多胞毒性治劑最常見的副作用毒性表現之一為骨髓閉止，其係能導致免疫抑制和造血功能不全。由於癌症病人死亡的主因之一為感染併發症，所以非常需要提供一種不會有免疫抑制副作用之無毒腫瘤胞毒性化學治療組合物和方法。

具維生素C活性之化合物，如抗壞血酸和抗壞血酸鹽衍生物，不僅非免疫抑制性的，而且是能有效對抗很多癌症的靜脈內胞毒性化學治療劑。Riordan等人，醫學假設，1995，44，207-213。不過，人類組織中沒有維生素C儲存



## 五、發明說明 (2)

機制，而且維生素C都會被代謝和/或排出。此外，由於胃腸併發症，由口服施予抗壞血酸很難在血清中達到並保持高濃度維生素C。因此，為了使血漿中的量足以達到及維持胞毒性，靜脈內施予抗壞血酸被認為是有必要的。所以，提供含維生素C而非抗壞血酸形式的腫瘤化學治療組合物是非常有益的，其係能由口服施予足以高達及維持血清維生素C產生腫瘤胞毒性之劑量。

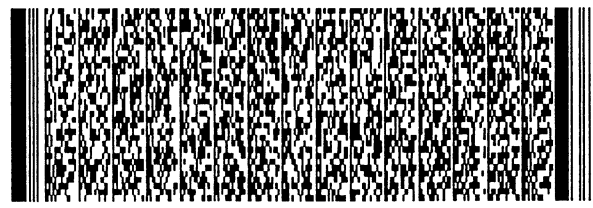
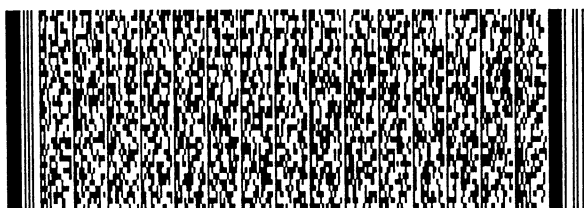
然而，因為若血漿中維生素C濃度夠高時對正常人類細胞有害，所以也很希望提供口服或靜脈內劑量型之選擇性維生素C腫瘤化學治療組合物，利用比抗壞血酸誘發腫瘤細胞凋亡所需之血漿濃度低的血漿濃度完成腫瘤細胞凋亡。因為此種劑量型施予的維生素C腫瘤胞毒性濃度較低，更能達到和維持比正常細胞因維生素C血漿濃度凋亡量低但在化學治療上有效的血漿濃度。

關於本藝

根據Cameron等人評論(癌症研究, 39: 663-81 (1979)), 一些臨床試驗顯示服用維生素C的癌症病人存活時間明顯增加。

Elvin等人(Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 17(7): 759-65(1981))報導抗壞血酸與醛，如甲基乙二醛和乙醯丙烯醛之加合物會抑制老鼠之Ehrlich腹水惡性腫瘤之生長。

EP-A-0086544提出使用抗壞血酸的縮酮和乙縮醛做為抑制血管生成的治劑。(血管生成指的是腫瘤生長產生新血



## 五、發明說明 (3)

管的方法和所涵括的新血管增殖作用。)

EP-A-0148094 和美國專利第5,032,610號提出口服施予或靜脈內施予5,6-0-亞<sub>下</sub>基-L-抗壞血酸和其鹽及其與L-抗壞血酸之混合物和其鹽具有抗癌特性。

共同施予3-胺基-1,2,4-三唑會加強抗壞血酸對Ehrlich腹水腫瘤細胞之胞毒性，而添加維生素K3(甲基苯醌亞硫酸氫鈉)會增加抗壞血酸有擇腫瘤細胞毒性。Benande等人，腫瘤學，23:33-43(1969)。

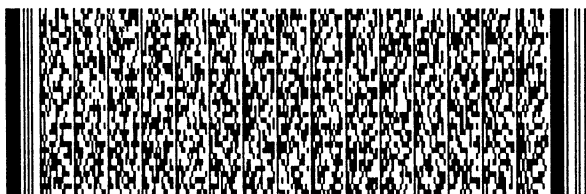
熟於本藝者也已知有催化作用的Cu<sup>2+</sup>濃度會增加抗壞血酸對數種惡性黑瘤細胞株，包括四種獲自人類的菌株之有擇毒性。Bram等人，自然284:629-631(1980)。

據報導獲自病人的數種白血病的、白血病前的和骨髓瘤的祖先細胞在體內對能達到的抗壞血酸濃度敏感，但對正常造血細胞沒有任何毒性。Park等人，癌症研究，4:1062-65(1980); Am. J. Clin. Nutr. 54:1241S-46S (1991)。

圖之說明

圖1是如試驗1所示，本發明較佳操作中使用"無機抗壞血酸鹽加新陳代謝物"組合物說明各種腫瘤細胞型態凋亡的長條圖。

圖2是如試驗1所示，本發明較佳操作中使用"無機抗壞血酸鹽加新陳代謝物"組合物說明各種腫瘤細胞型態對於正常細胞凋亡的選擇性之相似長條圖。

本發明之簡短說明

## 五、發明說明 (4)

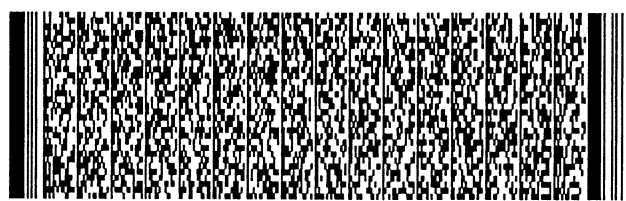
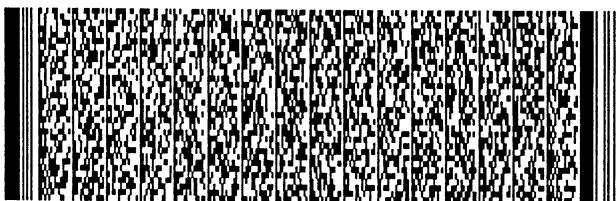
本發明之化學治療法包括腫瘤細胞與含可溶於血漿之無機抗壞血酸鹽和一種或多種選自含醛糖酸、醛糖-內酯、醛糖-丙交酯和醛糖酸之無毒性金屬鹽、脫氫抗壞血酸、蘇糖、赤蘚糖、4-羥基-5-甲基-3-(2H)-呋喃糖、3-羥基曲酸和5-羥基麥芽酚之基團的維生素C代謝物接觸的步驟。

可用於執行本發明方法之本發明新穎化學治療組合物包括可溶於醫藥可接受之靜脈內載體中的此種化學治療組合物之組成份。

本發明之較佳具體實施例

上述化學治療組合物之組成份係簡單地以適當比例混合在一起。確實的比例並不非常重要。該些熟於此藝者不需做過多試驗，如利用像該些敘述如下的體外試驗即可決定可實施且適中之比例，並於一定範圍內變化應用。另根據本發明目前較佳之具體實施例，含有這些比例適中之組成份的可適用無機抗壞血酸鹽-新陳代謝物組合物係由美國亞利桑那州Prescott的Inter-Cal公司以ESTER-C®之註冊商標名販售。這些組合物進一步記載於美國專利第4,822,816號；第4,968,716號；和第5,070,085號，其於此處併入本文為參考。

由本發明之化學治療法和組合物提供的胞毒上有效維生素C血漿濃度會隨著待治療腫瘤細胞的特異型態而變化，而且能以體外試驗，如該些敘述如下者，根據本藝已知技術進行動物試驗和體內人類試驗決定。



## 五、發明說明 (5)

本發明之化學治療組合物係調配成供靜脈內施藥，其中包含將無機抗壞血酸鹽和維生素C新陳代謝組成份溶於醫藥上可接受之靜脈內載體，即溶於載體內成份的無菌、無毒溶液，根據本藝已知技術調配以提供適當的滲透性、酸鹼值等。舉例來說，林格氏乳酸鹽是合適的靜脈內載體。

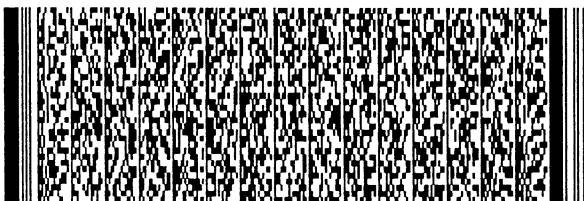
靜脈內載體的維生素C濃度能大幅改變以配合治療需要。譬如，當需要達到血漿抗壞血酸濃度值範圍為150-200毫克/分升時，由無機鹽提供100-150毫克抗壞血酸鹽可成為8小時1000毫升灌輸液的適當劑量。在達到和維持所血漿濃度前，視病人破壞、排出或排泄抗壞血酸鹽系統的容量而定，可能需要重覆數次此種灌輸液。

也可能使用含無機抗壞血酸鹽/維生素C新陳代謝組合物之口服劑量型態達到使這些組合物有效誘發一些腫瘤型態細胞凋亡的最初血漿濃度。根據最新資料，抗壞血酸鹽的口服劑量範圍大約為每天12-15克，血漿濃度(AA當量)約可達足以誘發黑色瘤和肝癌細胞之選擇性細胞凋亡的5毫克/分升。

此外，一旦藉由靜脈內施藥達到誘發選擇性腫瘤細胞凋亡之血漿濃度時，藉由口服劑量型施藥或口服與靜脈內施予組合物能維持該濃度。

## 實施例

以下實施例的目的係對該些熟於此藝者說明本發明之實行和確認其目前較佳的具體實施例，而且該些實施例並不能解釋為受限於本發明範圍內。



## 五、發明說明 (7)

5% FBS 之 25 mM HEPES 和 抗 生 素  
之 Ham's F-12 培 養 基 的 1:1 混 合  
物

所 有 的 培 養 物 皆 保 持 在 37 °C 5% CO<sub>2</sub>/95% 空 氣 的 潮 濕 環  
境 下。培 養 基 和 培 養 試 劑 係 獲 自 生 命 技 術 (Gibco/BRL, 長  
島, 紐 約)。FBS 係 獲 自 Hyclone 實 驗 室 (Logan, UT)。

下 列 試 驗 物 質 獲 自 Inter-Cal 公 司 (Prescott, AZ):

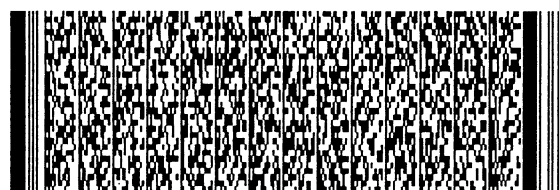
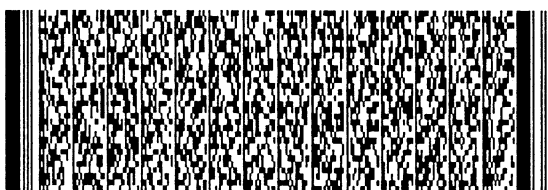
- 試 驗 1 Ester-C<sup>®</sup> 無 機 抗 壞 血 酸 鹽 (見 下 文)
- 試 驗 2 抗 壞 血 酸 鈣 (USP 級), 82.15% 抗 壞 血 酸 (AA) 當 量
- 試 驗 3 蘇 糖 酸 鈣, 87.08% L-蘇 糖 酸 (TA) 當 量
- 試 驗 4 抗 壞 血 酸 鈣 (U.S.P.) + 鈣 U.S.P., 81.21% AA, 1%  
TA 當 量
- 試 驗 5 抗 壞 血 酸

試 驗 1 物 質 包 含 下 列 實 驗 室 分 析:

抗 壞 血 酸 鈣	78.4% AA 當 量
蘇 糖 酸 鈣	.9% TA 當 量
其 它 AA 代 謝 產 物 <sup>1</sup>	10.4% AA 當 量
結 晶 作 用 的 水	餘 量

抗 壞 血 酸 (組 織 培 養 級) 係 獲 自 Sigma 化 學 公 司 (St. Louis,  
MO)。對 照 組 合 物 含 有 生 長 培 養 基 和 適 量 林 格 氏 液 或 無 菌  
水。

<sup>1</sup> 醛 糖 酸、醛 糖-內 酯、醛 糖-丙 交 酯 和 醛 糖 酸 之 無 毒 性  
金 屬 鹽, 脫 氫 抗 壞 血 酸、蘇 糖、赤 蘇 糖、4-羥 基-5-甲 基  
-3-(2H)-呋 喃 糖、3-羥 基 曲 酸 和 5-羥 基 麥 芽 酚。



## 五、發明說明 (8)

所有的操作溶液於使用前立即由主要儲備溶液製備。60 mM AA 主要儲備溶液是於無血清生長培養基內製備並儲存於 $-15^{\circ}\text{C}$ 。操作溶液係以生長培養基稀釋10x的儲備溶液製成。30 mM(1克/%)蘇糖酸鈣儲備溶液是在林格氏液(Fay和Verlangieri, 生命科學, 49: 1377(1991))或溫無菌水中製成。視治療性質, 即短期與持續而異, 操作溶液可製成1X濃儲備溶液(於林格氏液中)或10X儲備溶液(於 $\text{sH}_2\text{O}$ 中), (見下文)。

為了評估試驗1物質, 在溫無菌水中製備1-1.3%試驗物質的主要儲備溶液。使用前立即於無菌水中製成操作儲備溶液(10X濃度)。為了比較評估, 於無菌水中製備試驗2和試驗4溶液的儲備溶液, 其含AA當量的規格與試驗1儲備溶液相同。這些儲備溶液儲存於室溫下供評估之用。

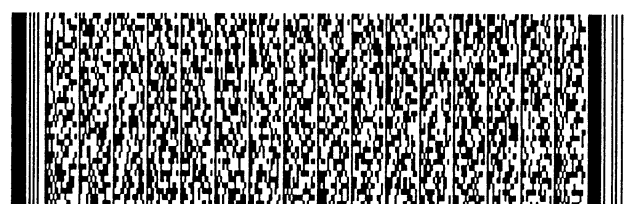
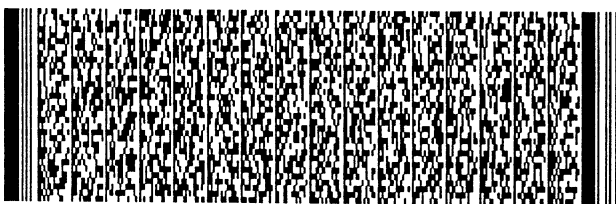
## 實施例2

以抗壞血酸和/或蘇糖酸鈣處理細胞培養物

在增加新鮮製備含抗壞血酸(AA)或抗壞血酸鈣(CA)補充物濃度的情況下, 將 $0.25-1.0 \times 10^5$ 個衍生自腫瘤或正常肝細胞株種入並個別培養於24孔簇形平盤的小孔內。定期再餵加個別補充物, 根據指示決定培養基是否更換。對照組含有加入生長培養基但不添加補充物之細胞。

以蘇糖酸鈣(CT)處理時, 細胞經整夜培養使其黏附。隔日, 使用兩種步驟中的一種開始蘇糖酸鹽處理。

第一種步驟中(短期曝露), 如Fay和Verlangieri敘述, 單層細胞經沖洗後, 在 $37^{\circ}\text{C}$ 直接與1毫升/孔7.5-30 mM蘇



## 五、發明說明 (9)

糖酸鹽(於林格氏液中製備)短期接觸(參考上文)。對照組在相似期間內僅與林格氏液接觸。接觸後，去除溶液並以生長培養基置換。

在另一個步驟(持續接觸)中，將1/10量10X濃的蘇糖酸鹽加進培養基內，並於37°C下繼續培養。利用每天添加新鮮操作溶液重覆此相同處理。

## 實施例3

以抗壞血酸加蘇糖酸鈣處理細胞培養物

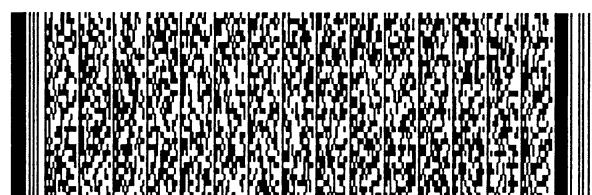
如實施例2，在37°C下以蘇糖酸鈣(CT)處理細胞60分鐘後，加入溶有抗壞血酸(AA)之林格氏液並持續培養30分鐘。處理期間結束時，去除溶液並以1毫升/孔生長培養基置換。

## 實施例4

以試驗1(Ester-C®抗壞血酸鹽加代謝物)和試驗4(抗壞血酸鈣加蘇糖酸鈣)處理細胞培養物

將1/10量的操作儲備溶液加進已種入融合後細胞培養物單層細胞之24孔簇形平盤內，以獲得濃度範圍為0.006至0.06%的最終試驗1(相當於0.28 mM-2.8 mM抗壞血酸當量)。同一排的孔以含有與試驗1等當量AA之CA+CT和僅以CA儲備溶液做相似處理。對照培養物則以等體積無菌水處理。1-2天期間內，利用直接添加新鮮溶液重覆以這些組合物定期處理(不換生長培養基)。

## 實施例5

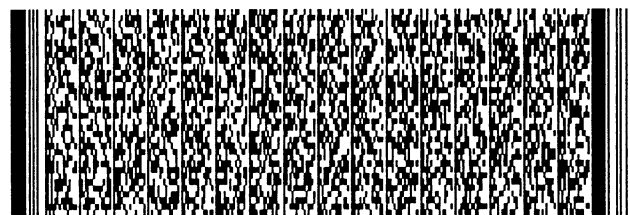
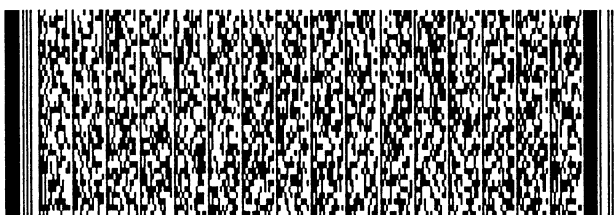
細胞存活和細胞死亡(凋亡)之分析

## 五、發明說明 (10)

在預定期間內藉由使用Neubauer血球計計數活細胞以評估處理後細胞存活率。如先前敘述，活細胞能排出錐蟲藍(Harakeh和Jariwalla，美國臨床營養雜誌54: 1231S-1235S (1991))。使用數據劃出活細胞培養物(細胞數目/毫升)與試驗溶液濃度的相對圖以評估細胞存活效果。

使用Boehringer-Mannheim(Indianapolis, IN)發明的連接酵素的免疫分析法("ELISA")評估以實施例1敘述之試驗組合物和對照物處理各種腫瘤型態細胞後誘發的凋亡。此分析特別能篩選和偵測出現於待處理細胞的胞漿中與組蛋白有關的DNA複合物(核染色體片段)，相對地未處理對照細胞的胞漿內則無此物。使用Boehringer-Mannheim提供之測細胞死亡ELISA套組，根據特定步驟決定不同處理後胞漿溶胞產物中的nucleosomal片段是否存在及其量。

簡言之，ELISA分析係根據下列步驟完成。以試驗組合物處理後的不同期間內，吸出培養基並於室溫下接種200-500微升溶解液30分鐘溶解細胞膜。將細胞胞溶產物收集於Eppendorf管內並於2500 rpm下離心10分鐘分離出核部份。使用含胞漿部份之上清液的等樣部份，以小平盤判讀器於410 nm下由光測偵測法定量nucleosomal片段。數據處理如下：劃出每個處理中測定之試驗化合物濃度與誘發細胞凋亡之劑量在410 nm下平均吸光度的比較圖。誘發細胞凋亡之最小劑量係定義為會使未處理對照組細胞凋亡產生2倍變化(即核蛋白量)的劑量。最多細胞凋亡係定義為使對照組細胞凋亡產生最大倍數變化。



五、發明說明 (11)

表 1  
數據摘要  
最小細胞凋亡劑量 細胞凋亡時最大倍數增加量

組合物	細胞株	劑量濃度(%)	處理次數	劑量濃度(%)	處理次數	細胞凋亡時最大 倍數增加量
[抗壞血酸鈣+ 新陳代謝物]	Malme-3	0.025	2	0.033	2	3.58
	Malme-3M	0.006	1	0.025	2	116
	WRL-68	0.006-0.012	3	0.025	2	2.04
	SK-Hep-1	0.006	3	0.033	3	14.9
	SK-N-MC	0.008	2	0.033	4	13.6
	T-84	0.015	3	0.02-0.03	4	4
[抗壞血酸鈣+ 蔗糖酸鈣]	Malme-3	0.025	2	0.025	2	2.16
	Malme-3M	0.012	2	0.025	2	65.7
	WRL-68	>0.05	3	0.0125	2	1.68
	SK-Hep-	0.006	3	0.033	3	9.31
	SK-N-MC	0.015	4	0.033	4	7.02
	T-84	>0.06	3	0.033	3	1.5
抗壞血酸鈣	Malme-3	0.025	2	0.025	2	2.16
	Malme-3M	0.012	2	0.025	2	92.8
	WRL-68	0.012	3	0.012	3	2.22
	SK-Hep-1	0.006	3	0.033	3	12.04
	SK-N-MC	0.015	4	0.015	4	5.03
	T-84	>0.06	3	0.033	3	1.77



## 五、發明說明 (12)

上表1中，"最小細胞凋亡劑量"是必須使對照組產生兩倍細胞凋亡變化的組合物濃度。"處理次數"是以組合物處理的總數。"細胞凋亡時的最大倍數增加量"是細胞凋亡時和對照組相比的最大倍數變化，而"最大劑量"是與對照組相比誘發"最大倍數細胞凋亡"之組合物濃度。

結論

上述試驗結果產生下列結論：

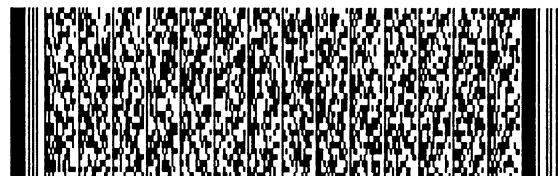
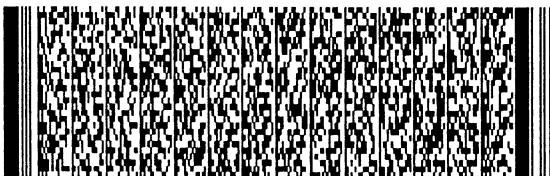
由試驗1組合物說明之無機抗壞血酸鹽/維生素C代謝組合物會依劑量方式誘發各種腫瘤細胞型的選擇性細胞死亡(細胞凋亡)。

無機抗壞血酸鹽/維生素C代謝組合物(如試驗1組合物說明)達到細胞凋亡(即細胞死亡速率最小兩倍增加)的濃度，比單以無機抗壞血酸鹽(如試驗2組合物說明)或單以抗壞血酸必須達到此種減少量的濃度低。

以無機抗壞血酸/維生素C代謝組合物(如試驗1組合物說明)處理特殊細胞型態時可達到細胞凋亡的最大量比以無機抗壞血酸鹽或單以抗壞血酸可達到細胞凋亡的量高。

需要誘發腫瘤細胞中細胞凋亡之無機抗壞血酸/維生素C代謝組合物(如試驗1組合物說明)的AA當量濃度比誘發正常細胞細胞凋亡濃度低，正常細胞中的細胞死亡程度比腫瘤細胞小得多。

以抗壞血酸(AA)和/或蘇糖酸鈣(CT)(如實施例2說明)處理細胞培養物時，肝癌和黑色瘤細胞會比其各自的正常細胞相對物容易產生選擇性劑量依賴性細胞死亡(細胞凋



五、發明說明 (13)

亡)。

先以CT處理肝癌再使用AA會比僅以AA或CT相應劑量處理誘發較大量細胞凋亡。

本發明已敘述關於如何使該些熟於此藝者能了解和操做此項目，並且也已敘述目前其較佳具體實施例，故本發明之專利申請範圍為：



圖式

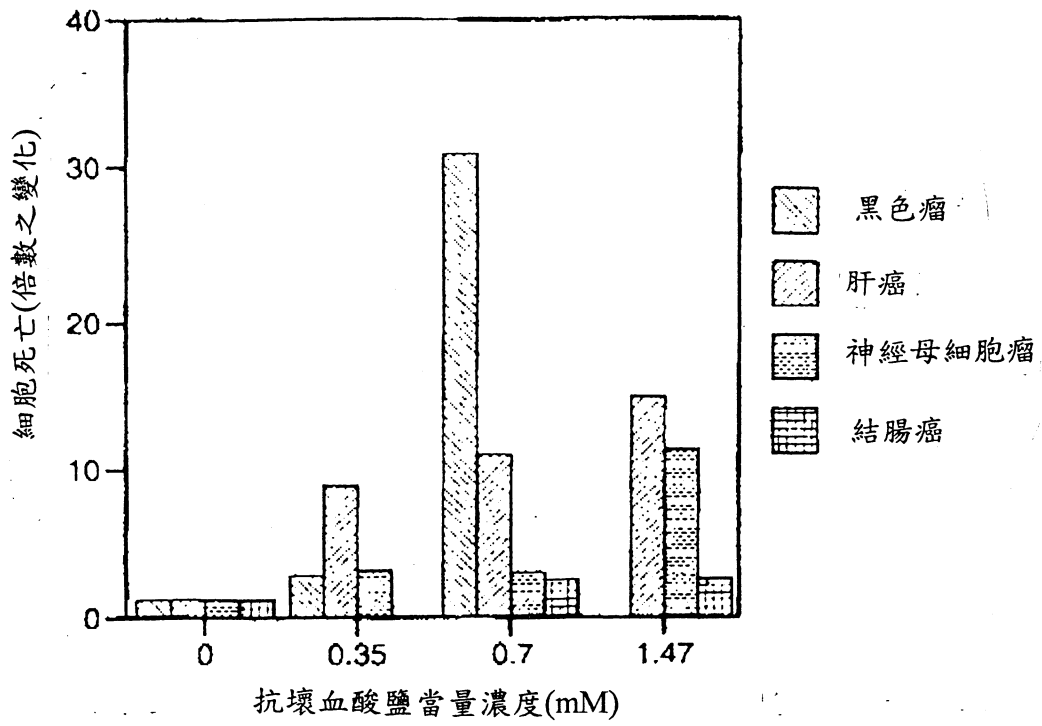


圖 1

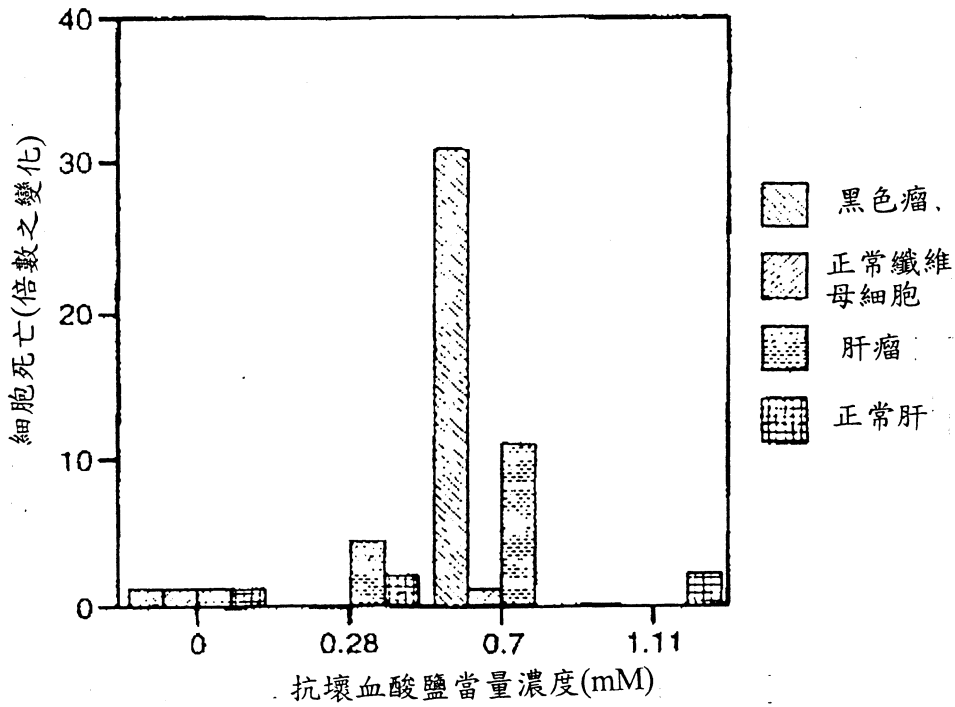


圖 2

修正  
 本年 月 日  
 補充 91.9.18

91年9月18日

修正頁

申請日期：88.9.23

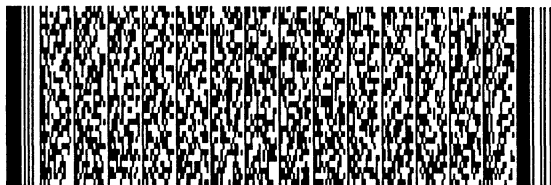
案號：88116389

類別：A61k 9/08

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	選擇性癌化學治療之組合物
	英文	COMPOSITION FOR SELECTIVE CANCER CHEMOTHERAPY
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 雷克斯特 J. 查里華拉
	姓名 (英文)	1. RAXIT J. JARIWALLA
	國籍	1. 美國
	住、居所	1. 美國加州薩拉度加市維尼爾德大道19120號
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 美商奧克斯蓋爾實驗股份有限公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. OXYCAL LABORATORIES, INC.
	國籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國亞歷桑那州珮斯考特市麥迪遜大道533號
	代表人 姓名 (中文)	1. 米歇爾 R. 米高斯
	代表人 姓名 (英文)	1. MICHELLE R. MICHELS



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

專利合作條約-PCT

1999/08/30 PCT/US99/19449

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



修正

本 年 月 日

補充 91.9.18 案號 88116389

91 年 9 月 18 日

修正頁

## 五、發明說明 (6)

利用Ester-C®(抗壞血酸鈣加新陳代謝物)與抗壞血酸鈣(CA)、蘇糖酸鈣(CT)和抗壞血酸鈣加蘇糖酸鈣(CA+CT)及無菌水(sH<sub>2</sub>O)四種其它試驗組合物試驗數種腫瘤細胞株和相應之正常非惡性細胞株的細胞凋亡。

## 實施例1

## 試驗步驟

細胞株包括：

- Malme-3M 人類黑色素瘤(ATCC號碼為HTB-64)  
 Melme-3 正常人類皮膚纖維母細胞(ATCC號碼為HTB-102)  
 SK-Hep-1 人類肝腺癌(ATCC號碼為HTB-52)  
 WRL 正常人類肝細胞(ATCC號碼為CL-98)  
 SK-N-MC 人類神經母細胞瘤(ATCC號碼為HTB-10)  
 T-84 人類結腸癌(ATCC號碼為CCL-248)

儲備細胞生長於下列生長培養基內：

## 細胞株

## 生長培養基

SK-Hep-1, SK-N-MC 和  
WRL88

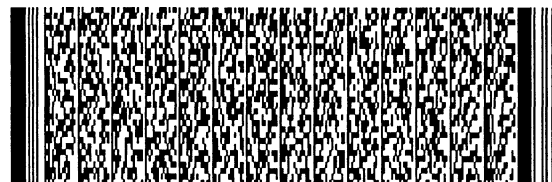
溶有添加2mM L-麩胺酸、  
1mM 丙酮酸鈉、10% 胎牛血清  
(FBS)和抗生素(青黴素、鏈黴  
素、安弗西林B)之依耳司氏鹽  
的依格氏最基本培養基

Malme-3 和 Malme 3-M

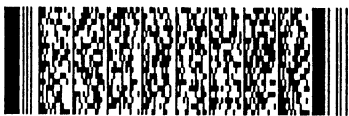
含L-麩胺酸、15% FBS及抗生素  
之麥考氏培養基

T-84

Dulbecco's 改良型MEM與含L-  
麩胺酸、吡哆醛氫氯化物、加



圖式簡單說明



修正 1245643

補充 91.9.18 案號 88116389

91年9月18日

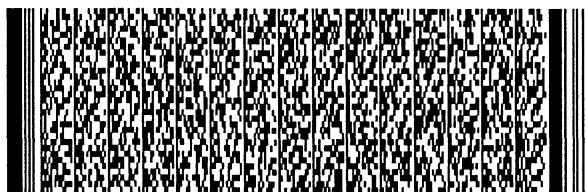
修正頁

四、中文發明摘要 (發明之名稱：選擇性癌化學治療之組合物)

本發明係一種選擇性癌化學治療法，其係包括以無機抗壞血酸/維生素C代謝組合物接觸腫瘤細胞的步驟。該化學治療組合物包括可溶於藥理學上可接受的靜脈內載體內之無機抗壞血酸/維生素C代謝物組合物。

英文發明摘要 (發明之名稱：COMPOSITION FOR SELECTIVE CANCER CHEMOTHERAPY)

A selective chemotherapy method includes the step of contacting tumor cells with a mineral ascorbate/vitamin C metabolite composition. A chemotherapeutic composition comprises the mineral ascorbate/vitamin C metabolite composition in a pharmacologically acceptable intravenous carrier.



## 六、申請專利範圍

1. 一種用於選擇性癌化學治療之醫藥組合物，其包含：

(a) 抗壞血酸之可溶血漿鈣鹽；

(b) 一種或多種選自包括下列基團之維生素C代謝物：

(i) 醛糖酸和醛糖-內酯、醛糖-丙交酯及其無毒性金屬鹽，和

(ii) 脫氫抗壞血酸、蘇糖、赤蘚糖、4-羥基-5-甲基-3-(2H)-呋喃糖、3-羥基曲酸和5-羥基麥芽酚；和

(c) 蘇糖酸鈣，

其係於醫藥上可接受之靜脈內載體。

