

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012年12月13日 (13.12.2012)

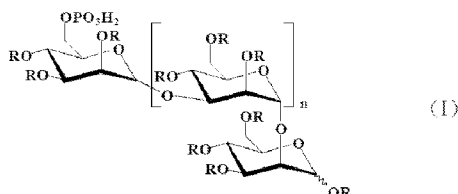


(10) 国际公布号
WO 2012/167434 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/7024 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/075512
- (22) 国际申请日: 2011年6月9日 (09.06.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 基亚生物科技股份有限公司 (MEDIGEN BIOTECHNOLOGY CORP.) [CN/CN]; 中国台湾省台北市南港区园区街3号14楼, Taiwan (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 张世忠 (CHANG, Stanley) [CN/CN]; 中国台湾省台北市南港区园区街3号14楼, Taiwan (CN)。 赖冠郎 (LAI, Kuan-Lang) [CN/CN]; 中国台湾省台北市南港区园区街3号14楼, Taiwan (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR INHIBITING RECURRENCE, AGGRAVATION AND METASTASIS OF HEPATOCARCINOMA

(54) 发明名称: 用于抑制肝癌复发、恶化或转移之医药组合物



(57) Abstract: A pharmaceutical composition for inhibiting recurrence, aggravation and metastasis of hepatocarcinoma comprising at least one compounds represented by formula (I) and pharmaceutically acceptable carriers.

(57) 摘要: 本案提出一种用于抑制肝癌复发、恶化或转移的医药组合物, 该医药组合物包含至少一通式 (I) 化合物及一医药上可接受的载体。



WO 2012/167434 A1

用于抑制肝癌复发、恶化或转移之医药组合物

技术领域

本发明是关于一种医药组合物，尤指一种用于抑制肝癌复发、恶化或转移的医药组合物。本发明另关于一种制备药物的方法，尤指一种制备供抑制肝癌复发、恶化或转移的药物的方法。

背景技术

依据癌症国际杂志(International Journal of Cancer)的信息，肝癌(Liver Cancer)是全球发生率第五高的恶性肿瘤，肝癌大部份乃属肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)，约占所有肝癌患者的70%~85%，目前多透过手术切除(Resection)、局部消融疗法(Local Ablation)及肝脏移植进行治疗，但仅对15~20%的患者适用。虽然肝癌早期发现与治疗能提高存活率，但即使是接受手术切除的病人，往往在治疗后肝癌仍会复发。外科手术年报(Annals of Surgery)的数据显示60%的肝癌病患在手术后12个月内会复发，而肝癌的微小转移(micro-metastasis)能在手术时透过灵敏的检测技术测得，其发现患者在术后一年时仍有30~40%的复发率。此外，手术后余留下来的病变肝组织亦有可能进一步重新形成肝癌。肝癌的复发将大幅缩短患者的整体存活期，因此，如何避免或延迟肝癌患者在接受手术治疗后再度复发，仍是一有待解决的大问题。

过去有许多试验在于寻找降低术后肝癌复发率的有效方式，例如动脉化学治疗(trans-arterial chemotherapy)、类视色素(retinoids)、辅助性干扰素(adjunct interferon)、过继性免疫疗法(adoptive immunotherapy)及动脉内放射性碘油(intra-arterial radioactive lipiodol)等。虽然上述方法具有降低肝癌复发风险或提高患者存活率的潜力，却都未通过临床试验的验证，而尚未能成为肝癌术后辅助治疗的标准疗法，因此对于新药物或新治疗方法仍然有迫切的需求。

从肝癌形成的角度进行分析，肝癌具有高度血管化的特性，且其发展与血管新生因子(angiogenic factors)有很大的关联。包括研究血管新生的权威科学家 Judah Folkman 在内的研究人员，已从学理上以及实验上指出抗血管新生药物合并其他疗法可以在癌症治疗上得到更好的效果(Christopher

Rice, L Eric Huang. From antiangiogenesis to hypoxia: current research and future directions. *Cancer Management and Research*. 2011:3 9-16)。

此外，细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的成分之一，硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)的降解已被证实为肿瘤的侵犯与转移的关键因素。

5 参与此一降解过程的主要酶之一即为类肝素酶(heparanase)。

类肝素酶是一内源性葡萄糖醛酸酶，能降解细胞外基质中的硫酸乙酰肝素侧链，并且是惟一能降解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的内源性葡萄糖醛酸酶，其可在特定部位裂解硫酸乙酰肝素以促进肿瘤的浸润和转移。类肝素酶透过参与细胞外基质的降解、血管生长因子的释放以及血管重构等过程，在肿瘤转移与血管生成中产生关键影响。此外，硫酸乙酰肝素经过类肝素酶的裂解后会释放具有生物活性的血管生长因子于细胞外基质中，这些血管生长因子会促成血管生长进而促进癌细胞增生、转移与癌症的恶化。因此，抑制类肝素酶可能对抑制肿瘤生长及转移产生效果，类肝素酶的过量表现与否成为预防或治疗恶性肿瘤的重要目标。

15 过去的相关研究发现类肝素酶在许多类型的肿瘤中有较高级度的表现，且与致病过程的发展有所关联，导致许多研究报告是以抑制此一酶作为癌症治疗的策略，包括小分子药物、经化学修饰的天然物，以及中和性抗体(neutralizing antibodies)的开发等等。

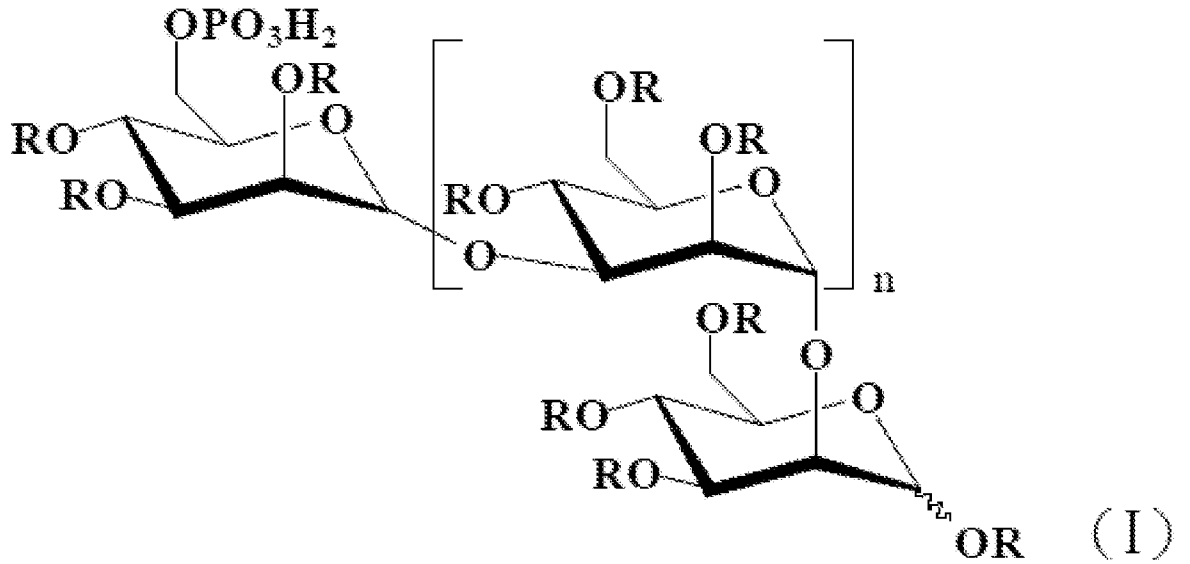
美国第 6,143,730 号专利是揭示一种硫酸化寡糖的制备和应用，该寡糖具有如通式 I: $R_1 - (R_x)_n - R_2$ 的结构，其中 R_1 和 R_2 以及每个 R_x 为单糖单元，其全部可相同或不同，相邻的单糖单元由 $1 \rightarrow 2$ 、 $1 \rightarrow 3$ 、 $1 \rightarrow 4$ 及/或 $1 \rightarrow 6$ 糖苷键所连接，且 n 为 1 至 6 的整数，以及该寡糖作为抗血管生成、抗转移及/或抗发炎剂的用途。前述抗血管生成功效已经体外实验及临床试验数据佐证，而抗转移功效则仅有动物实验数据，皆未有人体临床试验数据验证。

25 综上所述，虽然目前已有部分用于降低肝癌复发风险或提高肝癌患者存活率的方法，却都未有足够的人体临床数据加以验证，因此，对具有安全性及有效性的新医药组合物及治疗方法的需求仍然存在。

发明内容

30 就本案的一方面而言，本案提出一种用于抑制肝癌复发、恶化或转移的医药组合物，其包含一治疗有效量的至少一通式(I)化合物及一医药上可接受的稀

释剂、赋形剂或载体；



其中该通式(I)化合物的n为0至3的整数,且有3n+6或3n+7个R代表SO₃H,

5 其余R皆代表H。

根据上述构想,其中该通式(I)化合物中有3n+7个R代表SO₃H者是为主要组分。

根据上述构想,其中该通式(I)化合物的n为2或3且有3n+7个R代表SO₃H者是为主要组分。

10 根据上述构想,其中该通式(I)化合物的n为3且有3n+7个R代表SO₃H者的相对含量为最高。

根据上述构想,其中该治疗有效量是介于每日80 mg至每日315 mg间。

根据上述构想,其中该治疗有效量较佳是为每日160 mg。

15 于本案所提出的医药组合物中,作为活性成分的通式(I)化合物是以钠盐形式存在与使用,惟亦可以其他医药上可接受的盐,如钙盐或胺盐的形式存在与使用。因此,本案医药组合物的活性成分是包括了通式(I)化合物的钠盐或其他医药上可接受的盐。

前述医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体是包括溶剂、分散介质、填充剂、固体载体、水溶液、抗细菌剂、抗霉菌剂及延迟吸收剂或前述的类似物。

20 除了与活性成份不兼容的传统介质或试剂外,本发明的医药组合物中是使用可相容的介质或试剂。

前述本案所提出的医药组合物是可与至少一治疗方式合并用于抑制肝癌的复发、恶化或转移。前述治疗方式是包括栓塞治疗、标靶药物治疗、化学治疗、放射治疗及肝脏切除手术。

5 根据上述构想，本案医药组合物是用于降低肝癌患者的术后复发率或延长肝癌患者术后复发所需的时间。

就本案的另一方面而言，本案提出一种使用通式(I)化合物制备供抑制肝癌复发、恶化或转移的药物的方法，包括将一治疗有效量的通式(I)化合物与一医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体相结合。

10 根据上述构想，该通式(I)化合物的 n 为 0 至 3 的整数，且有 $3n+6$ 或 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H ，其余 R 皆代表 H。

根据上述构想，其中该通式(I)化合物中有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者是为主要组分。

根据上述构想，其中该通式(I)化合物的 n 为 2 或 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者是为主要组分。

15 根据上述构想，其中该通式(I)化合物的 n 为 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者的相对含量为最高。

根据上述构想，该医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体是为水或以水为溶剂的溶液。

20 根据上述构想，该医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体是为生理食盐水或葡萄糖水溶液。

本案得藉由以下图式与实施方式说明而更易于让在此领域具通常知识者了解本案的精神。

附图说明

25 图 1 是本案医药组合物的活性成分经 LC/ESI-FTMS 分析的总离子色谱图 (Total ion chromatogram, TIC)。

图 2 是试验终止时，对照组、投予剂量为每日 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组及投予剂量为每日 250mg 本案医药组合物活性成分的试验组的受试者群体中，未复发肝癌人数及中途退出试验人数所占的比率。

30 图 3 是比较对照组与投予剂量为每日 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组，随试验的进行 (0 至 48 周)，未复发肝癌人数占该组受试总人数比率

的变化情形。

具体实施方式

5 本案“用于抑制肝癌复发、恶化或转移的医药组合物”将可透过以下的实施例说明而让在此领域具通常知识者了解其创作精神，并可据以完成。然本案的实施并非由下列实施例而限制其实施型态。以下分就本案医药组合物的制备、确认及用途的实施方式分别说明于下。

本案医药组合物的制备

10 本案医药组合物活性成分的原料是来自于酵母菌 *Pichia holstii*，其制备主要可分为酵母菌培养与发酵、产物水解、纯化及磺化等步骤，分别叙述如下：

15 将菌株名为 NRRL Y-2448 的酵母菌 *Pichia holstii* 于有氧气且氮源受限制的培养基中培养，以右旋葡萄糖(D-glucose)作为碳源并提供过量的正磷酸盐(ortho-phosphate)，将产出细胞外的磷酸甘露聚糖(phosphomannan, PS)，其包含多种多糖结构，并以此作为本案医药组合物活性成分的半合成(Semi-synthesis)基本原料。磷酸甘露聚糖是由分子结构高度分枝且具有高分子量(约 $5 \times 10^6 \sim 39 \times 10^6$ Dalton)的磷酸甘露聚糖核(phosphomannan core, PC)所组成。*P. holstii* 的培养、发酵方法及磷酸甘露聚糖的分离是
20 依据 Jeanes, A.; Pittsley, J. E.; Watson, P. R.; Dimler, R. J. Arch. Biochem. Biophys. 1961, 92, 343 - 350 及 Bretthauer, R. K.; Kaczorowski, G. J.; Weise, M. J. Biochemistry 1973, 12, 1251 - 1256 所揭示的信息。一般情况下的产率约为 400L 的发酵规模可产出 20 公斤的磷酸甘露聚糖粗产物。

25 在一较佳实施例中，磷酸甘露聚糖的水解反应是在 100℃ 下实行 6 至 10 小时，磷酸甘露聚糖的浓度约控制在 40~50 g/L 之间。水解环境的 pH 值介于 2.2~2.5，以 1M 的 HCl 溶液作为催化剂并在 KCl 的存在下进行水解。在水解反应的初始 1 小时期间，当磷酸甘露聚糖渐与溶液混合时，pH 值将稍微升高约至 3，因此必须再加入 1M 的 HCl 溶液以将酸碱值调整回 pH 2.2~2.5。单次
30 水解反应所处理的磷酸甘露聚糖约为 2.5 公斤(湿重)，水解后的产物包括分子量较低的寡糖磷酸盐级分(oligosaccharide phosphate fraction, OPF)，

将水解产物以 1M 的 NaOH 溶液进行中和，使酸碱值调整至 pH 9~9.5。

在一更佳实施例中，用于进行水解的溶液配制是将 600 克的 KCl 溶于 60L 水中，加入 1M 的 HCl 溶液至酸碱值调整为 pH 2.4，并将此溶液置于 75L 的不锈钢反应容器中。将发酵所得的磷酸甘露聚糖粗产物(湿重 2.49 公斤)经由反应容器的添加口分次加入至溶液中，并将混合后的溶液加热至 100℃，在剧烈搅拌状态下维持 7 小时。反应环境的 pH 值每小时检测一次，并在反应开始后 1 小时加入 1M 的 HCl 使酸碱值调整回 pH 2.3。水解反应终止后，将水解产物冷却至室温并加入 1M 的 NaOH，使酸碱值调整至 pH 9.5。

水解反应后的纯化步骤是利用分子孔径为 10,000 Dalton 的滤膜 (nominal molecular weight cut off membrane, NMWCO membrane) 进行超过滤 (ultrafiltration)，水解产物中的寡糖磷酸盐级分、未磷酸化的寡糖及盐类将通过该滤膜，而分子量较高的磷酸甘露聚糖核则留置于滤膜上，从而使寡糖磷酸盐级分及未磷酸化的寡糖与磷酸甘露聚糖核相分离。前述分离过程是在渗滤 (diafiltration) 模式下以切流式 (tangential) 或扫流式 (cross flow) 过滤系统完成，此一系统能够透过提高可用滤膜面积及流速而轻易地增加处理量，其中滤膜的分子孔径较佳是介于 3,000 至 100,000 Dalton 间，而最佳则为 10,000 Dalton。

在一较佳实施例中，是将水解产物稀释至 70L 并置于一 150L 的不锈钢槽内，接着使用连续两组 Sartorius Hydrosart 10K (NMWCO 10,000) 滤膜匣 (每一滤膜匣的滤膜面积为 0.6 m²) 所组成的超过滤系统，以八倍渗滤体积的纯水进行渗滤。前述渗滤的参数设定为：进气压力 (inlet pressure) 为 200 kPa，排气压力 (outlet pressure) 为 150kPa，在渗滤过程中未能通过滤膜而被保留下的滞留物 (retentate) 的扫流流速 (cross flow rate) 为 15.6 L/min，通透物 (permeate) 的流速则为 66~87 L/h/m² (16~22℃)。经过渗滤后的通透物 (630L，导电度为 1.1 mS / cm) 被分成六批以进行后续的离子交换色谱 (ion-exchange chromatography)。

接着进一步对前述的滤出物进行二次纯化，二次纯化是利用离子交换色谱法。在一较佳实施例中，离子交换色谱法是先使用 30 L 的 DEAE-Spherilose 管柱以 0.01M 的 NH₄HCO₃ 溶液在流速为 1.5 L / min 下达到平衡，接着将前述滤出物 (每次约 100 L，共六次) 由管柱上端加入，以 0.01M 的 NH₄HCO₃ 溶液进行冲提直到流出物 (effluent) 的导电度在 0.2 mS / cm 的基线以内时，中性

级分(neutral fraction)则被冲提出。接下来使用 0.25M 的 NH_4HCO_3 溶液将寡糖磷酸盐级分冲提出,收集 1L 的流出物进行高效液相色谱仪(HPLC)分析。将前述六次冲提所得的适当级分结合并以逆渗透法浓缩至 20L 同时去除盐类。逆渗透是在渗滤模式下持续进行直到滤出物的导电度小于等于 0.2 mS / cm, 5 溶液再浓缩至最终的 6 L。所得产物进行冻干法(lyophilization)后,当中的寡糖磷酸盐级分将以白色、具吸湿性的粉末呈现,约 566 克。产物经 HPLC 检测后纯度约 93%,足以在不须进一步纯化的情况下用于本案医药组合物的制备。

前述的逆渗透步骤可将大量水解产物(每次水解约 50~60 L)快速地减少 10 至后续冻干法可处理的程度,同时也是后续提高产量的关键步骤。此外,逆渗透步骤还能移除级分中大量的无机盐类,从而得到仅含有少许无机盐类的高纯度终产物。

最后,将前述由酵母菌 *Pichia holstii* NRRL Y-2448 经培养、发酵、水解及纯化后所得的磷酸甘露聚糖产物进行磺化(sulfonation),以得到本案 15 医药组合物的活性成分。首先将前述纯化所得的磷酸甘露聚糖产物 478 克与 10 L 的二甲基甲酰胺(Dimethylformamide, DMF)混和,并加入 3.78 公斤的三氧化硫-吡啶复合物(sulfur trioxide pyridine-complex),在 25°C 下搅拌混合三天,届时产物将以厚实的油状(thick oil)物被分离出来。将二甲基甲酰胺抽干,并以 1 L 的乙醇清洗残余物三次后将之溶于约 3L 水中。接着 20 在该溶液中加入 1M 的 NaOH 溶液约 5L 以将酸碱值调整至 pH 9.5,以 3L 的二氯甲烷(Dichloromethane)进行萃取三次以将释出的吡啶移除。水相(aqueous phase)部分以水进行稀释并通过炭过滤(charcoal filter, Cuno R53S)以脱色。将溶液以水稀释至 20L 并以八倍体积的 1M NaCl 溶液进行渗滤,再以纯水渗滤至滤出物的导电度小于 0.2 mS / cm。最后将该溶液以逆渗透法浓缩 25 至 6L,并以孔径 0.2 μm 滤膜进行过滤,经冻干处理后得到白色、具吸湿性、无定形的固体物 760 克,为本案医药组合物的活性成分。

本案医药组合物的确认

本案医药组合物的活性成分所含的组分是经由液相色谱/电洒法-傅立 30 叶变换质谱仪(Liquid Chromatography / Electrospray Ionization - Fourier transform mass spectrometry, LC/ESI-FTMS)进行分析与确认,其

检测分析条件描述如后。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC) 部分的条件设定: 高效液相色谱系统为 Shimadzu LC-20ATvp Shimadzu LC-20ADvp pumps, Shimadzu SIL-20AC 自动注射器(Autosampler) 以及 Shimadzu SCL-20A System Controller; 紫外线检测器(UV Detector) 为 Shimadzu SPD-20AV Detector 并设定于波长 280 nm; 数据系统(Data System) 为 Xcalibur 2.0.7; 高效液相色谱管柱是使用 ACE3, C18-AR, 4.6 x 150 mm; 保护管柱(guard column) 是使用 ACE3, C18, 3.0 μ m, 3.2 x 10mm; 管柱温度为周围环境温度; 自动注射器温度为 4 $^{\circ}$ C; 流动相 A (mobile phase A) 为含有 5mM 二丁基醋酸铵(dibutyl ammonium acetate) 且由水: 甲醇体积比 8:2 所混合配置的溶液; 流动相 B (mobile phase B) 为含有 5mM 二丁基醋酸铵(dibutyl ammonium acetate) 且由水: 甲醇体积比 1:9 所混合配置的溶液。冲提梯度表则如下表 1 所示:

表 1、高效液相色谱所使用的冲提梯度表(Gradient Table)。

时间(分钟)	流速(毫升/分钟)	流动相 A 比例	流动相 B 比例
0	0.7	70%	30%
40	0.7	0	100%
45	0.7	0	100%
47	0.7	70%	30%
62	0.7	70%	30%

15

质谱仪部分的条件设定为: 质谱仪是采用 Thermo LTQ Orbitrap XL, 数据系统(Data System) 为 Xcalibur 2.0.7; 离子化模式(Ionization Mode) 为电洒法的负离子模式; 离子喷洒电压(Ion Spray Voltage) 为 4.5kV; 毛细管温度(Capillary Temperature) 为 350 $^{\circ}$ C, 毛细管电压(Capillary Voltage) 为 -18V; 管透镜(Tube Lens) 为 -100V, 鞘流气体流速(Sheath Gas Flow) 为 60 单位, 辅助气体流速(Auxiliary Gas Flow) 为 30 单位, 扫流气体流速(Sweep Gas Flow) 为 5 单位; 碰撞气体为氦气(Helium)。

20

经前述方法分析后, 本案医药组合物的活性成分所含的组分呈现如下表 2。

表 2、本案医药组合物的活性成分所含组分及其结构、分子式及分子量。

名称	结构	分子式(分子量)
组分1		n=0 C ₁₂ H ₂₃ O ₁₃ PS ₆ (901.8229)
组分3		n=1 C ₁₈ H ₃₃ O ₁₉ PS ₉ (1303.7461)
组分5		n=2 C ₂₄ H ₄₃ O ₂₆ PS ₁₂ (1705.6694)
组分7		n=3 C ₃₀ H ₅₃ O ₃₃ PS ₁₅ (2107.5927)
组分2		n=0 C ₁₂ H ₂₃ O ₁₃ PS ₇ (981.7797)
组分4		n=1 C ₁₈ H ₃₃ O ₁₉ PS ₁₀ (1383.7030)
组分6		n=2 C ₂₄ H ₄₃ O ₂₆ PS ₁₃ (1785.6262)
组分8		n=3 C ₃₀ H ₅₃ O ₃₃ PS ₁₆ (2187.5495)

如表 2 所示，本案医药组合物的活性成分在排除同分异构物的情况下，
5 包含组分 1 至组分 8 共八种组分。其基础结构是为由二至五个甘露糖(mannose)单元透过 1→3 及/或 1→2 糖苷键(glycosidic bond)所连接而成的寡糖分子。进一步言之，除与末端糖单元是透过 1→2 糖苷键连接外，其余糖单元间皆透过 1→3 糖苷键相连接。若对应表 1 中的结构通式，当 n=0 时即代表双糖、n=1 时代表三糖、n=2 时代表四糖而 n=3 时即代表五糖。

10 依据前述的基础结构，本案医药组合物活性成分的各组分在首个糖单元的 6 号碳(C6)位置上的羟基(OH group)，其 H 被取代为 P03H2 或其盐类，其余 3n+7 个羟基中，则有 3n+6 或 3n+7 个羟基其 H 被取代为磺基(S03H)或其盐类。若对应表 2 中的结构通式，其中组分 1、组分 3、组分 5 及组分 7 是分别为有 3n+6 个羟基其 H 被取代为 S03H 或其盐类的双糖、三糖、四糖及五糖，
15 亦即除首个糖单元的 6 号碳(C6)位置上的羟基外，仅有一羟基未被 S03H 或其盐类所取代；而组分 2、组分 4、组分 6 及组分 8 是分别为有 3n+7 个羟基其 H 被取代为 S03H 或其盐类的双糖、三糖、四糖及五糖，亦即除首个糖单元的 6 号碳(C6)位置上的羟基外，所有羟基皆被取代为 S03H 或其盐类。

图 1 是本案医药组合物的活性成分经 LC/ESI-FTMS 分析的总离子色谱图 (Total ion chromatogram, TIC)。如图 1 所示, 本案医药组合物的活性成分中, 组分 8 及组分 6 是为主要的组分, 亦即通式(I)化合物中, n 为 2 或 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 $S03H$ 者是为主要组分。此外, 图 1 亦显示本案医药组合物的活性成分中, 组分 8 的相对含量为最高, 亦即通式(I)化合物中, n 为 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 $S03H$ 者的相对含量为最高。

由图 1 亦可得知, 本案医药组合物的活性成分中, 除组分 1 至组分 8 外, 亦可能包含其他成分, 如滞留时间 1.86 分钟、9.33 分钟、37.75 分钟及 40.53 分钟所对应者。

10 依据前述 LC/ESI-FTMS 的总离子色谱图分析结果所得的各组分数据, 包括峰顶所对应的滞留时间 (Apex Retention Time)、波峰面积、波峰面积所占比例、波峰高度及波峰高度所占比例如下表 3 所示。

表 3、本案医药组合物经 LC/ESI-FTMS 分析后各组分的相关数据

名称	峰顶所对应的滞留时间(分钟)	波峰面积	波峰面积所占比例	波峰高度	波峰高度所占比例
组分 1	12.31	699406	0.09%	25711	0.1%
组分 2	16.17	21279900	2.89%	422185	1.72%
组分 3	20.55	10764686	1.46%	159934	0.65%
组分 4	23.57	50971043	6.92%	942431	3.84%
组分 5	25.62	30026265	4.08%	477234	1.95%
组分 6	28.05	249954793	33.94%	9663862	39.39%
组分 7	29.38	17374916	2.36%	532147	2.17%
组分 8	31.36	355469535	48.26%	12308532	50.17%

15 由表 3 数据中各组分波峰面积所占比例亦可得知, 本案医药组合物的活性成分中, 组分 8 及组分 6 是为主要的组分, 该二组分波峰面积所占比例总合为 82.2%, 亦即通式(I)化合物中 n 为 2 或 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 $S03H$ 者是为主要组分。此外, 表 3 亦显示本案医药组合物的活性成分中, 组分 8 的相

对含量为最高，其波峰面积所占比例为 48.26%，亦即通式(I)化合物中 n 为 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者的相对含量为最高。若以结构中羟基被取代为磺基 (SO_3H) 的情形加以区隔，由表 3 的分析结果亦可得知，通式(I)化合物中，除首个糖单元的 6 号碳(C6)位置上的羟基外，其余 $3n+7$ 个羟基皆完全被取代为磺基者，即组分 2、组分 4、组分 6 及组分 8，其波峰面积加总所占的比例为 92.01%；而通式(I)化合物中，其 $3n+7$ 个羟基中有 $3n+6$ 个羟基被取代为磺基者，即组分 1、组分 3、组分 5 及组分 7，其波峰面积加总所占的比例为 7.99%，足见本案医药组合物的活性成分中，是以 $3n+7$ 个羟基皆完全被取代为磺基者为主要组分。

10

本案医药组合物的用途

本案的医药组合物目前是由于作为肝癌治疗过程中的辅助疗法，在一较佳实施例中，本案的医药组合物是由于抑制肝癌复发、恶化或转移；再进一步言之，本案医药组合物的临床功效是在于延长肝癌患者术后复发所需的时间，或降低肝癌患者的术后复发率。以下针对本案医药组合物的适用病症、药理作用、有效剂量、使用方法、药理试验方法及结果进行实施例说明，以证明本案医药组合物的实际医药用途。

15

本案医药组合物的适用病症为肝癌(Liver Cancer)，其可与栓塞、标靶药物治疗、化学治疗、放射治疗或肝脏切除手术等治疗方式中的至少一种合并用于抑制肝癌的复发、恶化或转移。在一较佳实施例中，本案医药组合物是适用于接受肝脏切除手术(hepatectomy)后的肝癌患者。本案医药组合物的药理作用是透过抑制类肝素酶及血管生长因子的活性，而抑制肝肿瘤转移与肝肿瘤血管新生，以达到抑制肝癌复发、恶化或转移的效果。在一较佳实施例中，本案医药组合物的安全性、初步有效性及有效剂量已透过人体临床试验而确认，且可有效延长肝癌患者术后复发所需的时间，或降低肝癌患者的术后复发率。该人体临床试验方法为一多试验机构(multi-center)、随机分派(randomized)且平行试验形式(parallel-group)的临床试验设计。

20

25

本案医药组合物在临床使用时的给药途径是采注射方式，因其水溶性强，因此可以水为溶剂。可使用的注射溶剂包括但不限于灭菌水、以灭菌水为溶剂的生理食盐水或葡萄糖水溶液等，此外亦不排除其他油性溶剂。在一较佳实施例中，是使用等张的生理食盐水(normal saline)作为溶剂。

30

本案医药组合物是配制为单位剂量的形式以便于施用及剂量的均一化。每单位剂量包含了定量的活性成分,该活性成分与一医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体混合时,可提供预期的治疗效果。

本案医药组合物的活性成分在水中的溶解度大于 400 mg/ml,因此 160 mg
5 本案医药组合物的活性成分可完全溶解于 0.4 ml 水中。在一较佳实施例中,每一剂药物中是包含 215 mg 本案医药组合物的活性成分及 1ml 的生理食盐水,混和溶解后的浓度为 200 mg/ml,从中取 0.8 ml 进行注射,等同于本案医药组合物的活性成分含量为 160 mg。

10 临床试验所使用的疗效及安全分析群体(efficacy / safety population)为意图治疗(Intent-to-treat, ITT)分析群体,意图治疗分析群体的定义为所有具试验资格且经随机分派的受试者均列入分析,然而未服用任何一剂试验用药或在随机分派后未具有任何纪录者则被排除于分析之外。

前述人体临床试验是将 172 名接受过肝脏切除手术的肝癌患者随机分为三组,一组为未投药的无临床处置对照组(58 人),一组为每日投予剂量为
15 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组(57 人),另一组为每日投予剂量为 250mg 本案医药组合物活性成分的试验组(57 人)。试验组的受试者在接受肝脏切除手术后的 4 到 6 周开始接受投药,投药以 4 周为一个循环,在每个循环的前 3 周当中,每周连续 4 天以皮下注射方式给药,每个循环的第 4 周则不投药。连续进行 9 个循环(共 36 周)后,接着 12 周的追踪期(follow-up
20 period)。两组试验组的受试者在 36 周的投药期间,每隔 4 周进行例行的检查与追踪,在后续 12 周的追踪期间则每隔 6 周检查一次。对照组的受试者不投予对照药物或安慰剂,且对照组的受试者在总计 48 周的受试期间内,固定每隔 6 周进行一次例行检查与追踪。

在每个循环开始前,受试者须进行医病史的确认、理学检查(physical
25 examination)、合并用药(concomitant medication)情形确认,以及包括 α 胎儿蛋白(α -fetoprotein, AFP)在内的例行实验检查。每月对所有受试者进行腹部超音波检测。在第 4 个循环及第 7 个循环的首日进行腹部断层扫描,另外若受试者被怀疑有肝癌复发的情况时亦须进行腹部断层扫描。胸部 X 光检查、骨骼扫描及脑部断层扫描亦于第 4 个循环及第 7 个循环的首日进行以
30 监测肝脏外的肿瘤复发情形(extra-hepatic tumor recurrence)。

血清中的 α 胎儿蛋白及腹部超音波检查是例行地作为肝脏内肿瘤复发

的初步评估依据。当 α 胎儿蛋白浓度升高或腹部超音波检查结果显示可能有新的肝肿瘤形成时，则须进行腹部断层扫描检查复发肿瘤的血管结构。一旦该肿瘤在断层扫描显影的动脉期(arterial phase)显示出典型的多血管性(hypervascular)，且显影剂(contrast medium)于静脉期(venous phase)快速地被冲洗掉时，则该病灶即被定义为肝癌的复发(HCC recurrence)。若受试者的病灶已接受过组织切片检查或外科切除手术，则肝癌的复发亦可透过组织学检查来确认。

前述人体临床试验的主要疗效试验指标(primary efficacy endpoint)为试验终止时肝癌的未复发率(non-recurrence rate of HCC)。而次要疗效试验指标(secondary efficacy endpoint)为首次复发所需时间(time to first recurrence)，首次复发所需时间的计算是从随机分派之日起，至透过计算机断层扫描或组织学检查确认肿瘤复发之日止。

试验结果的数据如下，对照组 58 人中共 58 人为可纳入资料分析的意图治疗分析群体，其中 26 人于试验结束时已复发肝癌，约占 45%，其中 29 人于试验结束时未复发肝癌，约占 50%，其中 3 人于试验中途退出(dropout)，约占 5%。投予剂量为每日 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组 57 人中共 56 人为可纳入资料分析的意图治疗分析群体，其中 16 人于试验结束时已复发肝癌，约占 29%，其中 35 人于试验结束时未复发肝癌，约占 63%，其中 5 人于试验中途退出(dropout)，约占 9%。投予剂量为每日 250mg 本案医药组合物活性成分的试验组 57 人中共 54 人为可纳入资料分析的意图治疗分析群体，其中 21 人于试验结束时已复发肝癌，约占 39%，其中 22 人于试验结束时未复发肝癌，约占 41%，其中 11 人于试验中途退出(dropout)，约占 20%。

图 2 是试验终止时，对照组、投予剂量为每日 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组及投予剂量为每日 250mg 本案医药组合物活性成分的试验组受试者群体中，未复发肝癌人数及中途退出试验人数所占的比率。参阅图 2，投予剂量为每日 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组，其未复发肝癌的比率为 63%，而未投药的对照组其未复发肝癌的比率为 50%，依统计方法判断为具有差异($P = 0.07$)，亦即本案医药组合物在活性成分剂量为每日 160mg 以皮下注射方式对接受过肝脏切除手术的肝癌患者进行周期性投药，能够降低患者的肝癌复发率。

前述试验结果亦显示，投予剂量为每日 250mg 本案医药组合物活性成分

的试验组，其与未投药的对照组相较之下，并无显著降低患者肝癌复发率的效果。

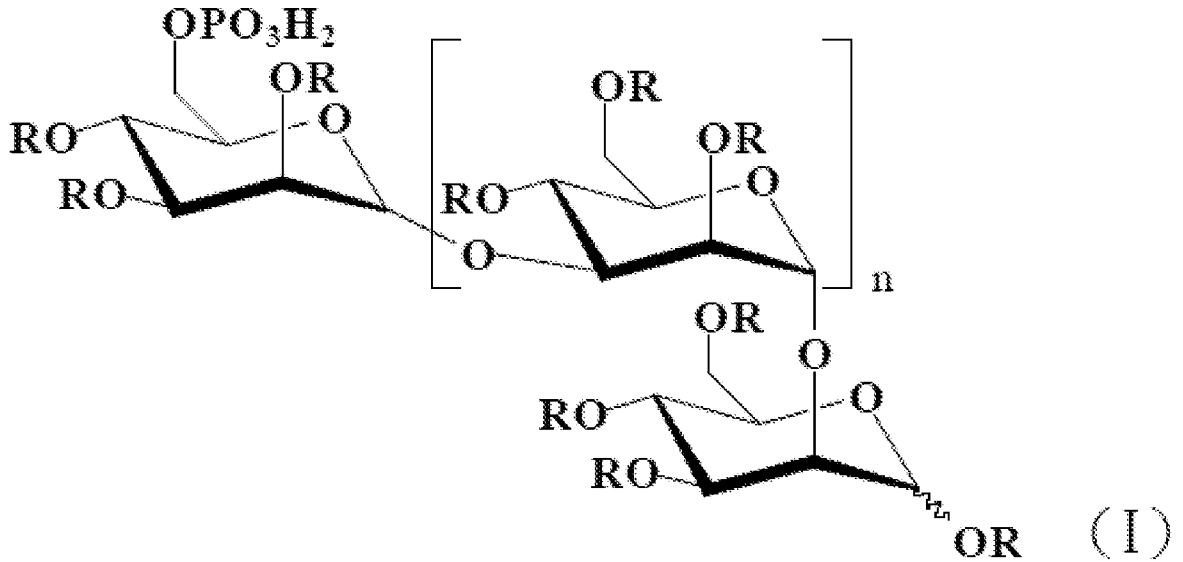
图 3 是比较对照组与投予剂量为每日 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组，随试验的进行(0 至 48 周)，未复发肝癌人数占该组受试总人数比率的变化情形，其中虚线是表示两组受试者群体从试验开始至达到 70%受试者未复肝癌所需的时间。参阅图 3，对照组的受试者群体自试验开始至达到 70%受试者未复肝癌所需时间为 27 周；而每日投予剂量为 160mg 本案医药组合物活性成分的试验组受试者群体，其自试验开始至达到 70%受试者未复肝癌所需时间为 48 周。前述结果显示，在本实施例中，本案医药组合物在活性成分
5 剂量为每日 160mg 以皮下注射方式对接受过肝脏切除手术的肝癌患者进行周
10 期性投药，能够显著延长患者肝癌复发所需的时间。

此外，另有临床实验数据显示，每日投予剂量为 80mg 本案医药组合物活性成分予受试者时，仍有抑制肿瘤变大的效果。而当每日投予剂量为 315mg 本案医药组合物活性成分予受试者时，可能产生严重血小板低下(severe
15 thrombocytopenia)的情形。

以上所提仅是本案的较佳实施例方式，并不是用于限定本案的实施范围；任何本领域技术人员，在不脱离本案的精神与范围下所作的诸般变化与修饰，都不脱如附权利要求所欲保护者。

权 利 要 求

1. 一种用于抑制肝癌复发、恶化或转移的医药组合物，其包含一治疗有效量的至少一通式 (I) 化合物及一医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体；



5

其中该通式 (I) 化合物的 n 为 0 至 3 的整数，且有 $3n+6$ 或 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H ，其余 R 皆代表 H 。

2. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者为主要组分。
10 分。

3. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中 n 为 2 或 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者为主要组分。

4. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中 n 为 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者的相对含量为最高。
15

5. 如权利要求 1 至 4 任一所述的医药组合物，其中该治疗有效量是介于每日 80mg 至每日 315mg 间。
20

6. 如权利要求 5 所述的医药组合物，其中该治疗有效量为每日 160mg。

7. 如权利要求 6 所述的医药组合物，其可与至少一治疗方式合并用于抑制肝癌的复发、恶化或转移，该治疗方式包括栓塞治疗、标靶药物治疗、化学治疗、放射治疗及肝脏切除手术。

5

8. 如权利要求 7 所述的医药组合物，其是用于降低肝癌患者的术后复发率或延长肝癌患者术后复发所需的时间。

9. 一种使用如权利要求 1 中所述的通式(I)化合物制备供抑制肝癌复发、恶
10 化或转移的药物的方法，包括将一治疗有效量的该通式(I)化合物与一医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体相结合，其中该通式(I)化合物的 n 为 0 至 3 的整数，且有 $3n+6$ 或 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H ，其余 R 皆代表 H。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者为主要组分。

15

11. 如权利要求 9 所述的方法，其中 n 为 2 或 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者为主要组分。

12. 如权利要求 9 所述的方法，其中 n 为 3 且有 $3n+7$ 个 R 代表 SO_3H 者的
20 相对含量为最高。

13. 如权利要求 9 至 12 任一所述的方法，该医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体为水或以水为溶剂的溶液。

25 14. 如权利要求 13 所述的方法，该医药上可接受的稀释剂、赋形剂或载体为生理食盐水或葡萄糖水溶液。

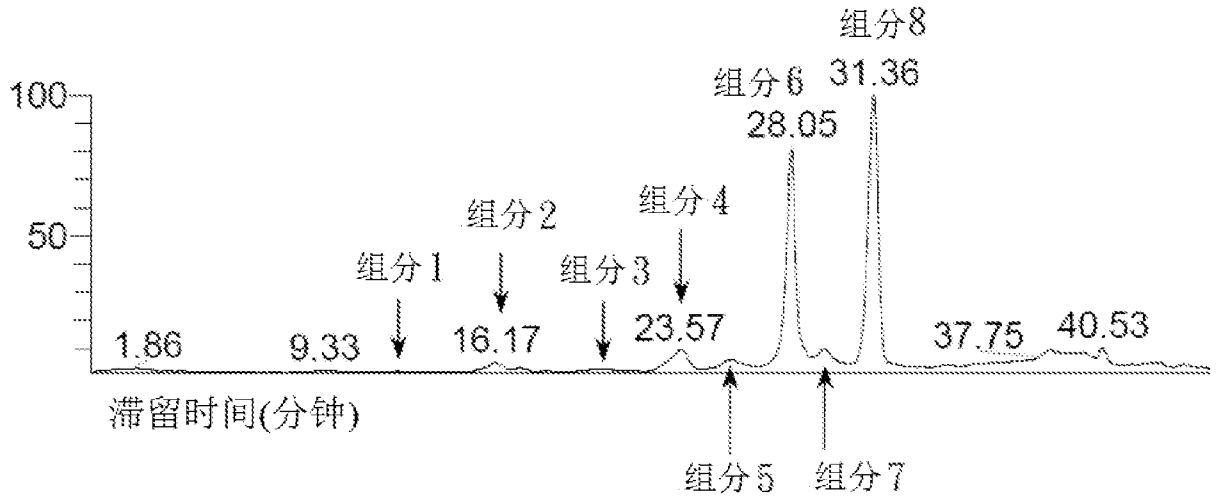


图 1

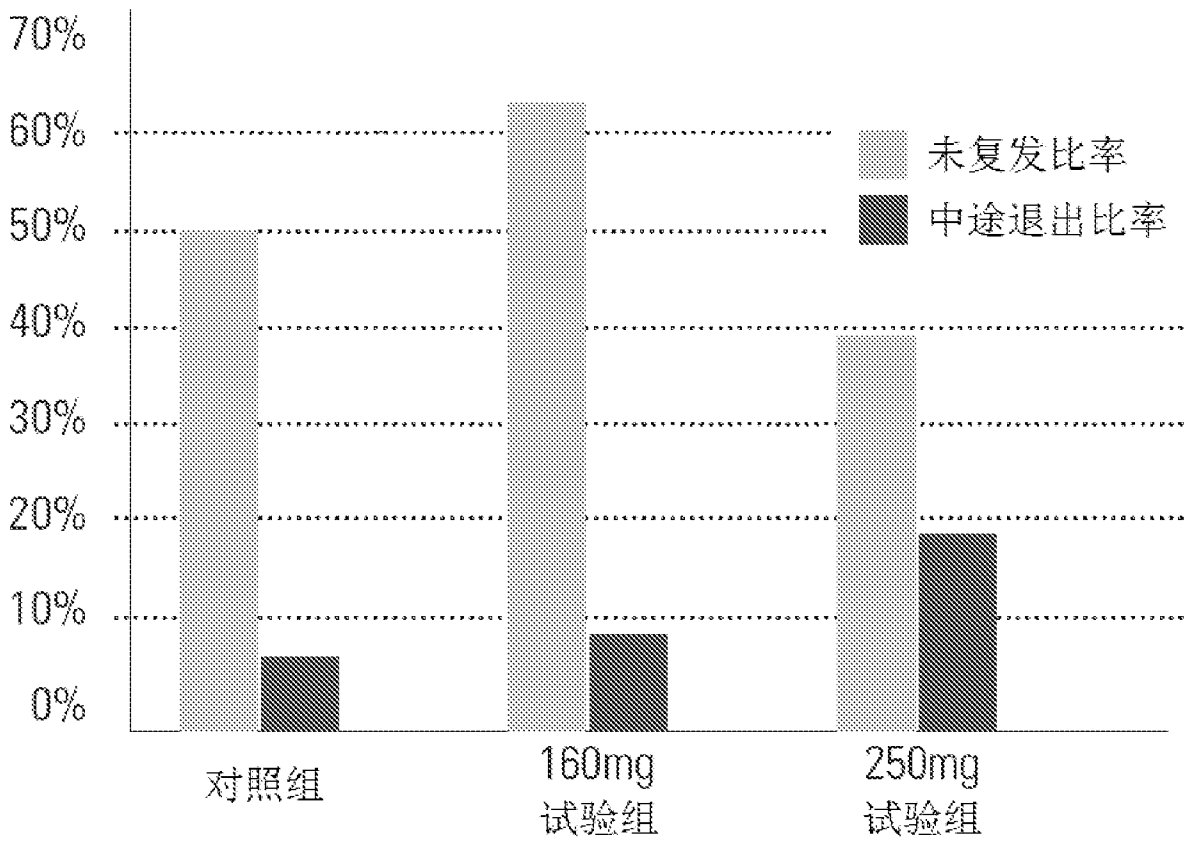


图 2

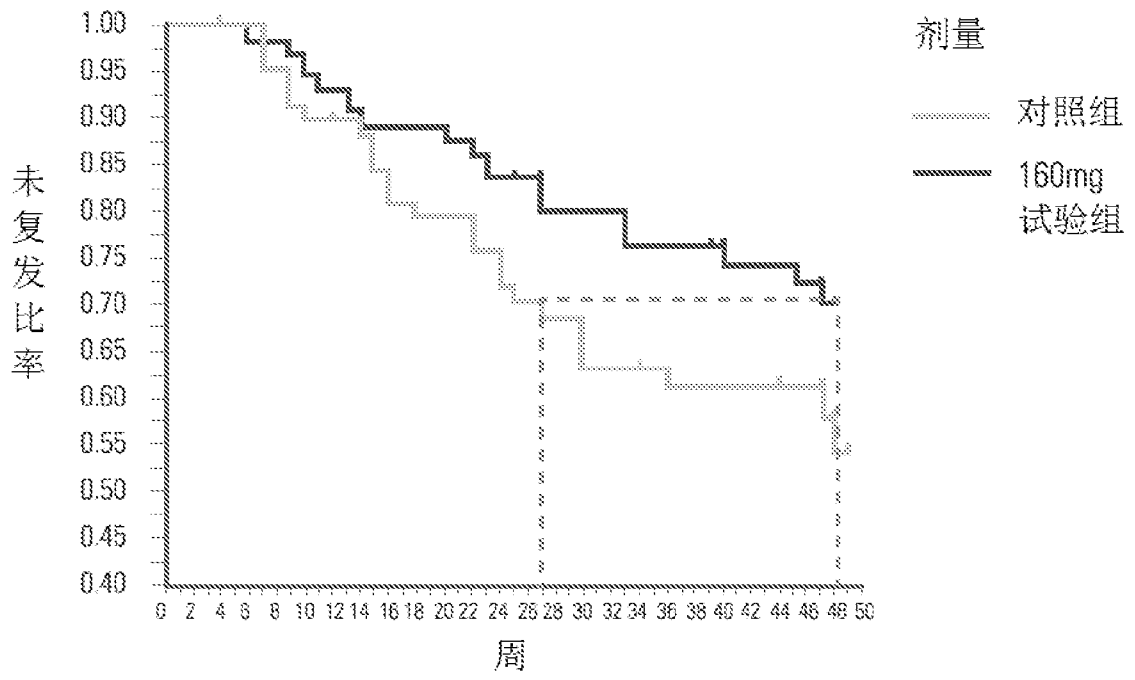


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/075512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CPRS(CN), CNKI(CN), REG, CAPLUS:

PI-88, phosphomannopentaose sulfate, cancer, tumor, liver, hepatocellular, hepatocarcinoma, metastasis, recurrence

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIAO Chuyao et al. Novel anticancer agents: PI-88 and its mimetics. Journal of International Pharmaceutical Research. Dec. 2008 (12.2008) 35(6): 411-414	1-14
X	Jon K. Fairweather et al. Synthesis and heparanase inhibitory activity of sulfated mannooligosaccharides related to the antiangiogenic agent PI-88. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16 (2008) 699-709	1-14
Y	Chun-Jen Liu et al. Heparanase inhibitor PI-88 as adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma after curative resection: A randomized phase II trial for safety and optimal dosage. Journal of Hepatology. 50 (2009) 958-968	1-14
Y	CN 1989146 A (PROGEN IND LTD) 27 Jun. 2007 (27.06.2007) description page 2 paragraph 2	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 Feb. 2012 (29.02.2012)	Date of mailing of the international search report 22 Mar. 2012 (22.03.2012)
--	--

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

HUANG Yijie

Telephone No. (86-10)62411202

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/075512

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1989146 A	27.06.2007	WO2005085264A1	15.09.2005
		EP1720889A1	15.11.2006
		NO20064489A	27.11.2006
		AU2005219456A1	15.09.2005
		US2007185037A1	09.08.2007
		BRPI0508144A	24.07.2007
		KR20070007815A	16.01.2007
		JP2007526257A	13.09.2007
		MXPA06010049A	01.04.2007
		INDELNP200604808E	31.08.2007
		ZA200607057A	30.04.2008
		TW200602351A	16.01.2006
		MX274439B	11.03.2010
		RU2392281C2	20.06.2010
		US7875592B2	25.01.2011
		AU2005219456B2	07.04.2011
		US2011130354A1	02.06.2011
IL177870A	31.08.2011		
US 6172208 B1	09.01.2001	WO9401448 A1	20.01.1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/075512

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7024 (2006.01) i

A61P 35/04 (2006.01) i

A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
A61K, A61P,		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI, EPODOC, CPRS(CN), CNKI(CN), REG, CAPLUS: 磷酸甘露戊糖硫酸酯, 肝癌, 复发, 转移, PI-88, phosphomannopentaose sulfate, cancer, tumor, liver, hepatocellular, hepatocarcinoma, metastasis, recurrence		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	肖楚瑶 等. 新型抗肿瘤药 PI-88 及其类似物. 国际药学研究杂志. 12 月 2008 (12.2008), 35(6):411-414	1-14
X	Jon K. Fairweather 等. Synthesis and heparanase inhibitory activity of sulfated manooligosaccharides related to the antiangiogenic agent PI-88. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16 (2008) 699-709	1-14
Y	Chun-Jen Liu 等. Heparanase inhibitor PI-88 as adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma after curative resection: A randomized phase II trial for safety and optimal dosage. Journal of Hepatology. 50 (2009) 958-968	1-14
Y	CN 1989146 A (普罗吉恩工业有限公司) 27.6 月 2007 (27.06.2007) 说明书 第 2 页第 2 段	1-14
Y	Guangli Yu 等. Preparation and anticoagulant activity of the phosphosulfomannan PI-88. European Journal of Medicinal Chemistry 37 (2002) 783-791	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“&” 同族专利的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期	29.2 月 2012 (29.02.2012)	国际检索报告邮寄日期 22.3 月 2012 (22.03.2012)
ISA/CN 的名称和邮寄地址:	中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 黄轶洁 电话号码: (86-10) 62411202

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Vito Ferro 等. Large-scale preparation of the oligosaccharide phosphate fraction of <i>Pichia holstii</i> NRRL Y-2448 phosphomannan for use in the manufacture of PI-88. Carbohydrate Research 332 (2001) 183-189	1-14
A	US 6172208 B1 (GENZYME CORP) 09.1 月 2001 (09.01.2001)权利要求 4	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/075512

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1989146 A	27.06.2007	WO2005085264A1	15.09.2005
		EP1720889A1	15.11.2006
		NO20064489A	27.11.2006
		AU2005219456A1	15.09.2005
		US2007185037A1	09.08.2007
		BRPI0508144A	24.07.2007
		KR20070007815A	16.01.2007
		JP2007526257A	13.09.2007
		MXPA06010049A	01.04.2007
		INDELNP200604808E	31.08.2007
		ZA200607057A	30.04.2008
		TW200602351A	16.01.2006
		MX274439B	11.03.2010
		RU2392281C2	20.06.2010
		US7875592B2	25.01.2011
		AU2005219456B2	07.04.2011
		US2011130354A1	02.06.2011
US 6172208 B1	09.01.2001	IL177870A	31.08.2011
		WO9401448 A1	20.01.1994

主题的分类:

A61K 31/7024 (2006.01) i

A61P 35/04 (2006.01) i