

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780014343.1

[51] Int. Cl.

A61K 31/70 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 101426509A

[22] 申请日 2007.4.23

[21] 申请号 200780014343.1

[30] 优先权

[32] 2006.4.21 [33] US [31] 11/408,000

[86] 国际申请 PCT/US2007/067225 2007.4.23

[87] 国际公布 WO2007/124489 英 2007.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.21

[71] 申请人 杰姆制药公司

地址 美国亚拉巴马州

[72] 发明人 理查德·D·奥尔森

杰拉尔德·M·沃尔什

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

代理人 孟 锐

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 4 页

[54] 发明名称

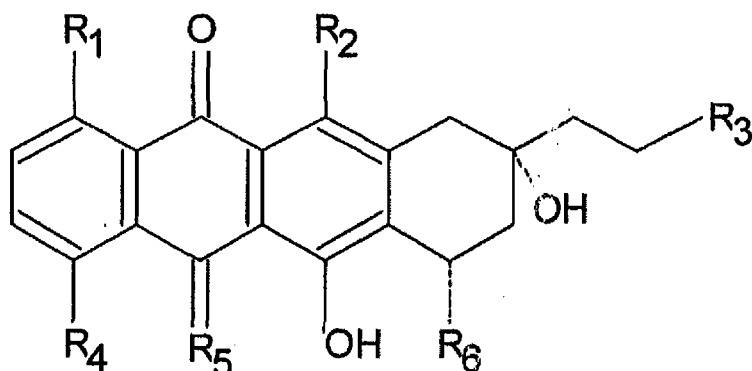
使用紫杉烷和 13 - 脱氧蒽环霉素的组合的抗癌治疗

[57] 摘要

可同时、分开、相继或连续向患者投与 13 - 脱氧蒽环霉素和紫杉烷以产生治疗抗癌作用，其中与仅投与等效量的任一化合物相比，毒性和副作用分布有所降低。 也提供产生有效抗癌治疗作用的 13 - 脱氧蒽环霉素和紫杉烷的组合物或制剂。

1. 一种抗癌组合物，其包含：

a) 具有下式的 13-脱氧蒽环霉素：



其中

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地为 H 或 OH；

R_4 为 H、OH、烷基或 O-烷基；

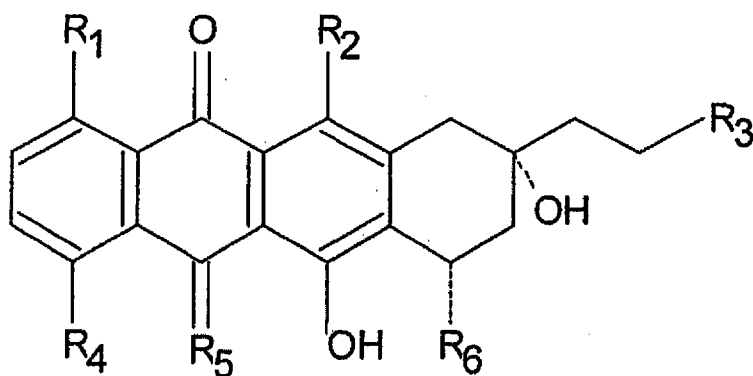
R_5 为 O 或 NH；且

R_6 为糖部分，其医药学上可接受的盐和其前药；和

b) 紫杉烷。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述 13-脱氧蒽环霉素选自由以下各物组成的群组：13-脱氧阿霉素（13-deoxydoxorubicin）、13-脱氧道诺霉素（13-deoxydaunorubicin）、13-脱氧洋红霉素（13-deoxycarminomycin）、13-脱氧表阿霉素（13-deoxyepirubicin）、13-脱氧伊达比星（13-deoxyidarubicin）、13-脱氧脂质体蒽环霉素（13-deoxyannamycin）、13-脱氧氨柔比星（13-deoxyamrubicin）和其 5-亚氨基类似物，且所述紫杉烷为太平洋紫杉醇或多烯紫杉醇（docetaxel）。
3. 一种医药组合物，其包含根据权利要求 1 所述的组合物和医药学上可接受的载剂或赋形剂。
4. 一种医药组合物，其包含根据权利要求 2 所述的组合物和医药学上可接受的载剂或赋形剂。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述糖部分为道诺糖胺 (daunosamine)、表道诺糖胺 (epidaunosamine) 或鼠李糖烯 (rhamnal) 糖。
6. 一种治疗癌症的方法, 其包含向有需要的哺乳动物投与治疗有效量的具有下式的 13-脱氧蒽环霉素:



其中

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地为 H 或 OH;

R_4 为 H、OH、烷基或 O-烷基;

R_5 为 O 或 NH; 且

R_6 为糖部分; 其医药学上可接受的盐和其前药;

和治疗有效量的紫杉烷。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述糖部分为道诺糖胺、表道诺糖胺或鼠李糖烯糖。
8. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述 13-脱氧蒽环霉素选自由以下各物组成的群组: 13-脱氧阿霉素、13-脱氧道诺霉素、13-脱氧洋红霉素、13-脱氧表阿霉素、13-脱氧伊达比星、13-脱氧脂质体蒽环霉素、13-脱氧氨柔比星和其 5-亚氨基类似物, 且所述紫杉烷为太平洋紫杉醇或多烯紫杉醇。
9. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述 13-脱氧蒽环霉素和所述紫杉烷同时、以任一顺序分开、以任一顺序相继或以任一顺序连续投与以提供抗癌作用。

使用紫杉烷和 13-脱氧蒽环霉素的组合的抗癌治疗

技术领域

本揭示案涉及通过投与诸如太平洋紫杉醇（paclitaxel）或多烯紫杉醇（docetaxel）的紫杉烷和 13-脱氧蒽环霉素进行的抗癌治疗。本揭示案使得有可能实现增强的抗癌作用，而无累积的不可逆心脏毒性。本揭示案也涉及包含紫杉烷和 13-脱氧蒽环霉素的组合物。

背景技术

最为大众所熟知的蒽环霉素抗癌药物是阿霉素（doxorubicin）和道诺霉素（daunorubicin），其含有 13-酮基。美国专利第 3,590,028 号中所揭示的阿霉素具有广泛抗癌效用且用于治疗白血病、淋巴瘤和实体肿瘤。美国专利第 3,616,242 号中所揭示的道诺霉素适用于治疗急性白血病。然而，这些药物的效用受心脏毒性的严重副作用限制，以致可给予患者的药物的总量不能超过 550 mg/M^2 （伊·阿·莱福拉克（E.A. Lefrak）等人，癌症（Cancer），32:302, 1973）。甚至在所推荐的最大总累积剂量（430-650 mg/M^2 ）下或在接近所述剂量时，60%的患者出现明显且持续的心脏功能异常且 14%的患者显现充血性心力衰竭（阿·爵士达勒（A.Dresdale）等人，癌症（Cancer），52:51, 1983）。因此，虽然这些药物适用于抑制癌肿瘤生长，但患者也可能因药物的严重心脏毒性副作用而死于充血性心力衰竭。

也发现这些蒽环霉素的心脏毒性是由于 13-酮基部分代谢性还原为 13-二氢醇代谢物而产生（皮·斯·穆士林（P.S. Mushlin）等人，联邦学报（Fed. Proc），45:809, 1986）。在阿霉素完全未代谢为 13-二氢醇代谢物（阿霉素醇（doxorubicinol））的测试系统中，未观察到显著心脏毒性作用（皮·斯·穆士林（P.S. Mushlin）等人，联邦学报（Fed. Proc），44:1274, 1985；里·迪·奥尔森（R.D. Olson）等人，联邦学报（Fed. Proc），45:809, 1986）。相反，在这些相同测试系统中，13-二氢代谢物阿霉素醇和道诺霉素醇（daunorubicinol）在相对较低的浓度下产生心脏毒性（1-2 微克/毫升，里·迪·奥尔森（R.D. Olson）等人，美国癌症研究学会学报（Proceed. Am. Assoc. Cancer Res.），26:227, 1985；里·迪·奥尔森（R.D. Olson）等人，美国癌症研究学会学报（Proceed. Am. Assoc. Cancer Res.），28:441,

1987)。

如果使阿霉素保留在测试系统中,那么即使很短的时间,也会发生特定代谢转化且形成足量 13-二氢代谢物,以致开始显现心脏毒性(利·罗西尼(L. Rossini)等人,毒理学文献增刊(Arch. Toxicol. Suppl.), 9:474, 1986; 米·戴尔·托卡(M. Del Tocca)等人,医药研究与交流(Pharmacol. Res. Commun.), 17:1073, 1985)。因此,已积累确实证据证明诸如阿霉素和道诺霉素的药物的心脏毒性是由其 13-二氢代谢物产生的强心脏毒性作用所引起的(皮·穆士林(P. Mushlin)等人,美国实验生物科学家联合会杂志(FASEB Journal), 2:A1133, 1988; 里·布希克(R. Boucek)等人,生物化学杂志(J. Biol. Chem.), 262:15851, 1987; 以及里·奥尔森(R. Olson)等人,美国科学院院报(Proc. Natl Acad. Sci.), 85:3585, 1988; 福里斯特·吉·利(Forrest GL)等人,癌症研究(Cancer Res), 60:5158, 2000)。

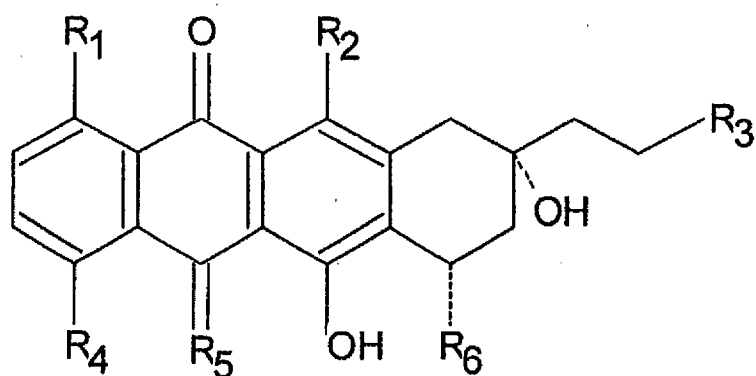
已知阿霉素与诸如太平洋紫杉醇的紫杉烷的组合与仅任一种药物相比对乳癌产生增强的抗癌作用。仅阿霉素对乳癌的抗癌反应率为 35-50%。仅太平洋紫杉醇,反应率为 32-62%。然而,这两种药物的组合可产生 83-94%的反应率(吉安尼·利(Gianni L)等人,临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol.) 13:2688, 1995; 多姆贝诺斯奇·皮(Dombernowsk, P)等人,肿瘤学论文集(Seminars in Oncology), 23:23, 1996)。令人遗憾地,太平洋紫杉醇和阿霉素的组合会在 18-20%的患者中引起临床充血性心力衰竭(吉安尼·利(Gianni L)等人,临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol.), 13:2688, 1995; 以及多姆贝诺斯奇·皮(Dombernowsk, P)等人,肿瘤学论文集(Seminars in Oncology), 23:23, 1996)。太平洋紫杉醇增强阿霉素的心脏毒性,这限制或排除蒽环霉素与紫杉烷的组合使用。充血性心力衰竭的发病率可通过降低阿霉素的剂量而受到限制(左达奴·斯·赫(Giordano SH)等人,临床癌症研究(Clin Cancer Res), 8:3360, 2002),但由此组合的功效也会降低(斯巴拉奴·杰·阿(Sparano JA)等人,临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol), 17: 3828, 1999; 瓦勒罗·凡(Valero V), 等人,肿瘤学论文集(Semi Oncol), 28:15, 2001)。另外,如左心室射血分数的减小所证明,即使低剂量阿霉素与太平洋紫杉醇的组合也会引起心脏毒性(斯巴拉奴·杰·阿(Sparano JA)等人,临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol), 17: 3828, 1999)。

发明内容

本揭示案克服现有技术的问题且提供包含使用某些蒽环霉素的抗癌组合疗法,所述蒽环霉素在与紫杉烷组合时不会产生或至少显著降低心脏毒性且避免不可接受的充血性心力衰竭风险。这与现有疗法相比又提供包括乳癌的癌症的治疗的显著改良。

本揭示案涉及一种治疗癌症的方法,所述方法包含向有需要的哺乳动物(包括人类)

投与治疗有效量的具有下式的 13-脱氧蒽环霉素：



其中

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地为 H 或 OH；

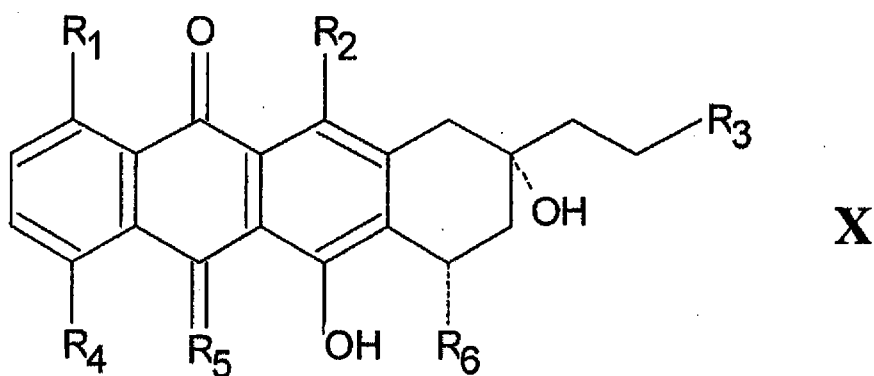
R_4 为 H、OH、烷基或 O-烷基；

R_5 为 O 或 NH；且

R_6 为糖部分；其医药学上可接受的盐、其前药和混合物；

以及治疗有效量的紫杉烷。在执行本揭示案的方法时，13-脱氧蒽环霉素和紫杉烷可同时、以任一顺序分开、以任一顺序相继或以任一顺序连续投与以提供抗癌作用。

本揭示案的另一方面涉及提供适用于治疗癌症的抗癌、抗肿瘤和/或抗赘生作用的组合物。本揭示案的组合物包含由式 X 表示的 13-脱氧蒽环霉素化合物：



其中

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地为 H 或 OH；

R_4 为 H、OH、烷基或 O-烷基；

R_5 为 O 或 NH；且

R_6 为糖部分，其医药学上可接受的盐和其前药；以及紫杉烷化合物，诸如太平洋紫杉醇或多烯紫杉醇。

根据下文实施方式，本揭示案的其他目标和优点对所属领域的技术人员来说将变得显而易见，其中仅简单地以说明最佳模式的方式展示和描述优选实施例。应认识到，在不脱离本揭示案的情况下，本揭示案能够进行其他和不同实施例，且其数个细节能够在多个明显的方面进行修改。因此，本说明书在本质上被视为说明性的而不是限制性的。

附图说明

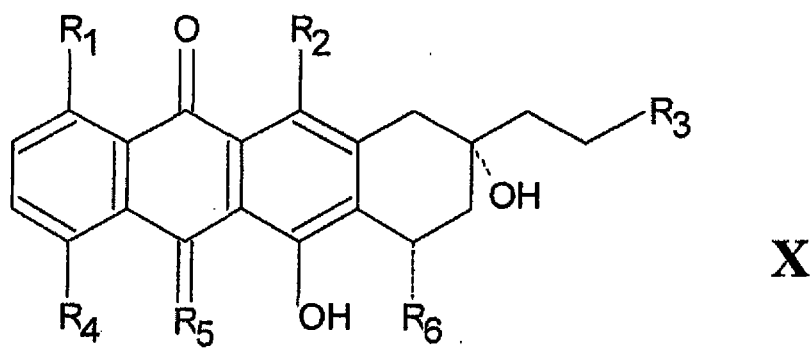
图 1 和 2 说明单独太平洋紫杉醇和在 IC₃₀ 浓度的根据本揭示案的阿霉素、道诺霉素或 13-脱氧蒽环霉素化合物存在下太平洋紫杉醇抑制 MCF-7 细胞生长的剂量-反应关系。

图 3 和 4 说明单独太平洋紫杉醇和在 IC₁₀ 浓度的根据本揭示案的阿霉素、道诺霉素或 13-脱氧蒽环霉素化合物存在下太平洋紫杉醇抑制 P388 鼠类白血病细胞生长的剂量-反应关系。

具体实施方式

虽然下文说明书详述本揭示案的某些实施例，但应理解本揭示案在其应用方面不受随附实例和实验中所述的化合物的组合物和组合的细节限制，因为本揭示案能够进行其他实施例且能够以不同方式实施。

根据本揭示案所采用的 13-脱氧蒽环霉素化合物具有下式 X：



其中

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地为 H 或 OH；

R_4 为 H、OH、烷基或 O-烷基；

R_5 为 O 或 NH；且

R_6 为糖部分；其医药学上可接受的盐和其前药。

更典型的糖部分是道诺糖胺 (daunosamine)、表道诺糖胺 (epi-daunosamine) 或鼠李糖烯 (rhamnal) 糖。更典型的 13-脱氧化合物是 13-脱氧阿霉素 (13-deoxydoxorubicin)、13-脱氧道诺霉素 (13-deoxydaunorubicin)、13-脱氧洋红霉素 (13-deoxycarminomycin)、13-脱氧表阿霉素 (13-deoxyepirubicin)、13-脱氧伊达比星 (13-deoxyidarubicin)、13-脱氧脂质体蒽环霉素 (13-deoxyannamycin) 和其 5-亚氨基类似物。

根据本揭示案的组合疗法进一步包含采用紫杉烷。更典型的紫杉烷是太平洋紫杉醇和多烯紫杉醇；其医药学上可接受的盐和其前药。

根据本揭示案的化合物可在羟基或氨基官能团处使用烷氧基、氨基酸等基团作为前药形成部分而形成前药。举例来说，4 位置处的羟基甲基可形成单、二或三磷酸酯且这些磷酸酯又可形成前药。羟基和羟基甲基可转化为 $-OCH_2P(O)(OH)_2$ 和磷酸酯的前药。羟基甲基的氧原子可转化为 CH_2 ，且接着转化为 $CH_2P(O)(OH)_2$ 和前药。

具有多个氮官能团（氨基、羟基氨基、酰胺等）的化合物的前药形式可包括以下类型的衍生物，其中 R 基团可各自独立地为氢、经取代或未经取代的如先前所定义的烷基、芳基、烯基、炔基、杂环、烷基芳基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、环烷基或环烯基。

(a) 羧酰胺， $-NHC(O)R$ ；

(b) 氨基甲酸酯， $-NHC(O)OR$ ；

(c) 氨基甲酸(酰氧基)烷基酯， $NHC(O)OROC(O)R$ ；

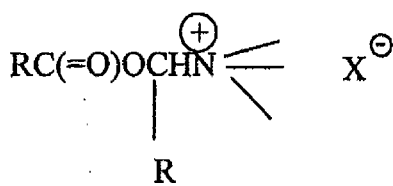
(d) 烯胺， $-NHCR(=CHCO_2R)$ 或 $-NHCR(-CHCONR_2)$ ；

(e) 席夫碱 (Schiff Base)， $-N=CR_2$ ；

(f) 曼尼希碱 (Mannich Base) (由碳二亚胺化合物获得)， $RCONHCH_2NR_2$ 。

所述前药衍生物的制备论述于多个文献源（实例为：亚历山大 (Alexander) 等人，药物化学杂志 (J. Med. Chem.)，1988, 31, 318；阿力格斯·马丁 (Aligas-Martin) 等人，PCT WO pp/41531，第 30 页）中。在制备这些衍生物时转化的氮官能团是本揭示案化合物的一个（或一个以上）氮原子。

本揭示案的具羧基化合物的前药形式包括酯 ($-CO_2R$)，其中 R 基团对应于在身体内通过酶促或水解过程进行的释放将在医药学上可接受的水平下的任何醇。由本揭示案的羧酸形式衍生的另一前药可为由布多 (Bodor) 等人，药物化学杂志 (J. Med. Chem.)，1980, 23, 469 所述的结构季盐类型：



本揭示案化合物的医药学上可接受的盐包括由医药学上可接受的无机或有机酸衍生的盐。合适的酸的实例包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、丁二酸、甲苯对磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲烷磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、三氟乙酸和苯磺酸。由适当的碱衍生的盐包括诸如钠的碱金属和氨。

最近，已发现阿霉素、道诺霉素或其他类似蒽环霉素的 13-脱氧形式不会代谢转化为心脏毒性 13-二氢形式，且因此并无累积的不可逆心脏毒性。尤其，参见 WO99/08687、美国专利 5,948,896 和 5,942,605 以及 PCT/US99/04704，其揭示内容以引用的方式并入本文中。迄今，尚未知晓所述蒽环霉素抗癌剂与紫杉烷的组合是否将具有增强或甚至协同抗癌作用。

按照这些方法，单独太平洋紫杉醇抑制 MCF-7 人类乳腺肿瘤细胞生长的 IC₅₀ 为 221 nM。在弱生长抑制性浓度的本揭示案的 13-脱氧蒽环霉素存在下，太平洋紫杉醇的 IC₅₀ 降低到 0.55-11 nM。虽然仅太平洋紫杉醇对 P388 鼠类白血病细胞生长不具有抑制活性，但在弱生长抑制性浓度的 13-脱氧蒽环霉素存在下，太平洋紫杉醇的 IC₅₀ 为 13-20 nM。在非癌性大鼠衍生的 H9c2 细胞中，太平洋紫杉醇的弱生长抑制性浓度（IC₁₀）使 13-脱氧阿霉素的 IC₅₀ 从 700 nM 降低到 400 nM，使 13-脱氧-5-亚氨基阿霉素的 IC₅₀ 从 1500 nM 降低到 210 nM，但并不降低阿霉素的 IC₅₀，其仍维持原来的 210 nM。本揭示案的 13-脱氧蒽环霉素在与紫杉烷组合时产生增强的高效抗癌、抗肿瘤和/或抗赘生作用。

本揭示案使得低剂量的具有本揭示案的化学式的 13-脱氧蒽环霉素有可能增强紫杉烷的抗癌、抗肿瘤和/或抗赘生功效。此外，根据本揭示案的包含紫杉烷和 13-脱氧蒽环霉素的组合物并无心脏毒性或心脏毒性显著降低。本揭示案在使用紫杉烷和 13-脱氧蒽环霉素的组合时与各药物单独使用时所需的剂量相比可在降低的剂量下提供有效治疗。

此外，使用紫杉烷与 13-脱氧蒽环霉素的组合与单独使用各药物时相比可提供更安全且毒性更小的治疗。重要的是，请注意 13-脱氧蒽环霉素和紫杉烷可同时、分开或连续使用。

另外，采用 13-脱氧蒽环霉素和紫杉烷的组合的本揭示案的治疗展现适用于各种类

型的治疗癌症、赘瘤或肿瘤的疗法的抗癌、抗肿瘤和/或抗赘生效效，所述癌症、赘瘤或肿瘤包括白血病、黑色素瘤、肝肿瘤、乳房肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、结肠肿瘤和中枢神经系统肿瘤。本揭示案的治疗提供一种抑制哺乳动物（包括人类）的癌症、肿瘤和/或赘瘤的生长方法。

根据本揭示案的组分的典型组合物、组合、混合物或制剂是式 X 化合物与太平洋紫杉醇或多烯紫杉醇的组合。更典型的组合物、组合、混合物或制剂是选自由以下各物组成的群组的 13-脱氧蒽环霉素与太平洋紫杉醇或多烯紫杉醇的组合：13-脱氧阿霉素、13-脱氧道诺霉素、13-脱氧表阿霉素、13-脱氧伊达比星、13-脱氧脂质体蒽环霉素、13-脱氧洋红霉素、13-脱氧氨柔比星和其 5-亚氨基类似物。

所述组合物、组合、混合物或制剂的组分可同时、分开、相继或连续投与患者。所述组分可以医学上可接受的任何可接受的方式投与患者，包括经口、肠外、局部或植入。经口投药包括投与呈片剂、胶囊、含片、悬浮液、溶液、乳液、散剂、糊浆和其类似物形式的组合物、组合、混合物或制剂的组分。优选投药途径为肠外。

投与组分的实际方法和顺序可根据所利用的式 X 的 13-脱氧蒽环霉素的特定医药配方、所利用的紫杉烷的特定医药配方、所治疗的特定癌症、所治疗的疾病状态的严重程度和所治疗的特定患者而变化。投与组分的剂量范围可随患者的年龄、健康状况、性别和疾病程度而变化且可由所属领域的技术人员确定。

本揭示案的医药组合物包含在医药学上可接受的载剂或赋形剂中与紫杉烷混合在一起的式 X 的 13-脱氧蒽环霉素。本揭示案的这些医药组合物适用于抗癌疗法。

医药学上可接受的载剂或赋形剂为调配化合物呈医药组合物、组合、混合物和制剂形式的领域的一般技术人员所熟知。医药学上可接受的载剂是指一种或一种以上适于向包括人类的哺乳动物投与的相容性固体或液体填充剂、稀释剂或包裹物质。适于肠外投药的医药组合物、组合、混合物和制剂是调配为可为可接受的稀释剂或溶剂中的无菌溶液或悬浮液的无菌形式。

医药组合物中所含的活性成分的量可视诸如投药途径和媒剂的许多因素而十分广泛地变化。在本发明中，医药组合物可含有约 0.1 mg 至 1000 mg 的式 X 的 13-脱氧蒽环霉素和约 0.1 mg 至 1000 mg 的紫杉烷。

在本揭示案的方法中，向有需要的患者投与每平方米体表面积约 0.1 mg 至每平方米体表面积约 1000 mg、更通常每平方米体表面积约 10 mg 至每平方米体表面积约 500 mg 的剂量的式 X 的 13-脱氧蒽环霉素，且更通常通过肠外投药途径投与。向有需要的患者投与约 0.1 mg/m² 至约 1000 mg/m²、更通常约 10 mg/m² 至约 500 mg/m² 的剂量的本揭示

案的紫杉烷，且更通常通过肠外投药途径投与。13-脱氧蒽环霉素和紫杉烷可以单一组合物、组合、混合物或制剂形式一起投与，或可以任一顺序分开、以任一顺序相继或以任一顺序连续投与。当并未一起投与时，通常在投与第一种化合物 72 小时内投与第二种化合物。

部分归因于紫杉烷与 13-脱氧蒽环霉素之间的协同作用，式 X 的 13-脱氧蒽环霉素显著增加紫杉烷的抗癌治疗作用而不增加毒性。可根据需要频繁投与紫杉烷和 13-脱氧蒽环霉素的剂量。投药的实际方法和顺序应根据特定配方、组合物、组合、混合物或制剂、所治疗的特定癌症和所治疗的特定患者而变化。

本揭示案的 13-脱氧蒽环霉素与紫杉烷的组合的增强作用以举例的方式展示于下文测试中，其打算说明本揭示案而不是限制本揭示案。

13-脱氧蒽环霉素的抗癌作用

关于抗癌活性，在鼠类白血病模型中利用注射有 P388 细胞（小鼠衍生的白血病癌细胞）的 CD2F1 小鼠测试阿霉素（化合物 I）、13-脱氧阿霉素（化合物 II）和 5-亚氨基-13-脱氧阿霉素（化合物 III）的活体内抗癌活性。用 100 万个 P388 细胞腹膜内（ip）注射各组的 CD2F1 小鼠。每组 10 只小鼠。在阿霉素组中，在研究的第 1-9 天连续腹膜内投与 0.8 mg/kg，历时 9 天。腹膜内投与 1.6 mg/kg 13-脱氧阿霉素且以与阿霉素相同的方式腹膜内投与 3.2 mg/kg 5-亚氨基-13-脱氧阿霉素。用媒介注射对照组。计算各组的中值存活时间。以存活延长量（治疗组的中值存活除以对照组的中值存活时间，再乘以 100，T/C%）表示化合物的活性。结果展示于表 1 中。阿霉素产生如所示的中值存活时间显著增加 147%的抗肿瘤作用。13-脱氧阿霉素和 5-亚氨基-13-脱氧阿霉素也产生中值存活时间的显著增加，但与阿霉素并无显著不同。这些研究的结果证明 13-脱氧蒽环霉素即使在不同剂量下也具有类似于阿霉素的抗癌功效。

表 1

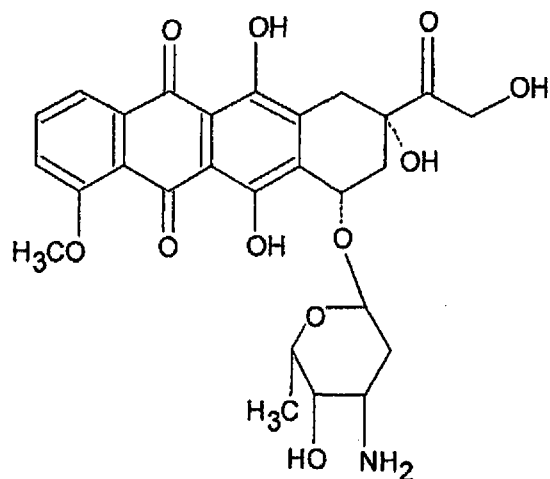
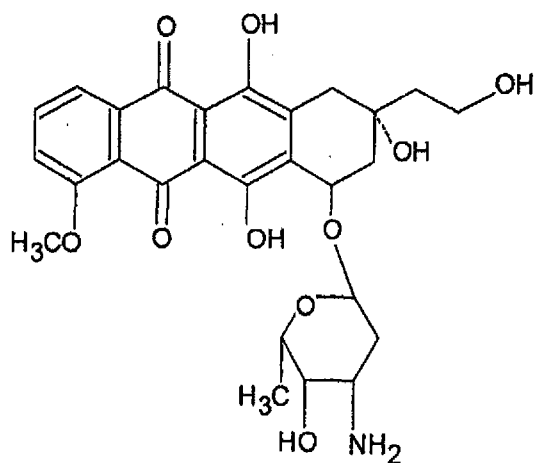
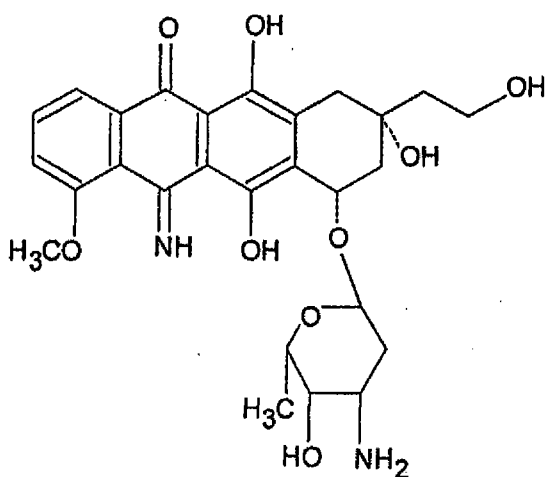
阿霉素和 13-脱氧蒽环霉素在患有 P388 鼠类白血病的小鼠中的抗癌作用（T/C = 经治疗小鼠的中值存活时间除以对照小鼠的中值存活时间 × 100；n = 10）

组	剂量 (毫克/公斤/天)	中值存活时间 (天)	T/C%
对照	0	19	100
阿霉素 (I)	0.8	28	147*
化合物 II	1.6	27	142*
化合物 III	3.2	27	142*

*相对于对照, $p < .05$ 。

13-脱氧蒽环霉素的心脏毒性评估

将 24 只龄期匹配的重 3.0 kg 的新西兰白兔 (New Zealand white rabbit) 随机分为四组 ($N = 6$ 只兔子/组)。长期用阿霉素、13-脱氧阿霉素 (II)、5-亚氨基-13-脱氧阿霉素 (III) 或媒剂 (0.9% NaCl) 治疗各组。每周两次向耳静脉中静脉内投与各剂量的药物或媒剂。每周获得血清和血液样品且每周或每隔一周执行 M-模式心脏超声波以获得左心室缩短分数 (left ventricular fractional shortening, LVFS), 从而评定心脏功能。每日测量食物消耗且每周测量体重。给对照兔子喂食与用阿霉素治疗的兔子相同量的食物 (成对喂食)。在处死时, 获得顶部和左心室游离壁样品且将其保存在 10% 缓冲福尔马林 (formalin) 中以进行组织学评分和经由光学显微术分析。也获得左心室组织样品以评定蒽环霉素和代谢物的心脏含量; 当兔子变得具有心脏毒性 (LVFS $< 30\%$ 或 LVFS 降低 10% 单位, 即从 42% 降低至 32% LVFS)、展现危急生命或虚弱性毒性 (即, 重度骨髓抑制或粘膜炎) 或研究开始后 13 周时, 将其处死。

**I****II****III**

13-脱氧阿霉素的最佳抗肿瘤剂量约为阿霉素剂量的两倍，而 5-亚氨基-13-脱氧阿霉素的剂量高达阿霉素最佳剂量的 7 倍。因此，13-脱氧阿霉素和 5-亚氨基-13-脱氧道诺霉素的剂量为阿霉素的累积心脏毒性剂量（17.5 mg/kg）的两倍（13-脱氧阿霉素）和 7 倍（5-亚氨基-13-脱氧阿霉素）。每周两次投与 1.25 mg/kg 阿霉素历时 7 周（累积剂量为 17.5

mg/kg), 每周两次投与 2 mg/kg 13-脱氧阿霉素历时 10 周 (累积剂量为 40 mg/kg) 且每周两次投与 5 mg/kg 5-亚氨基-13-脱氧阿霉素历时 12 周 (累积剂量为 120 mg/kg)。

在处死时, 移出心脏且从心脏、心室顶部和左心室游离壁对两种类型的组织取样且将其保存在 10%福尔马林中。准备对各组织进行三种不同的染色: H&E、甲苯胺蓝和三色 (trichrome)。使用比林汉姆标度 (Billingham scale) 的修改对组织评分 (盲性)。评分标度为 0-4, 其中 $\leq 10\%$ 细胞或组织病变, 0; 10%-19% 细胞或组织病变, 1; 20%-29% 细胞或组织病变, 2; 30%-39% 细胞或组织病变, 3; 40% 或 40% 以上细胞或组织病变, 4。单独分析心室顶部和左心室游离壁。各得到单核浸润、纤维化和细胞质空泡形成的评分。因此, 各兔子具有 6 个评分, 顶部 3 个 (单核浸润、纤维化和细胞质空泡形成) 和左心室游离壁 3 个 (单核浸润、纤维化和细胞质空泡形成)。通过观察所有三种染色获得各评分。对各兔子的 6 个评分求平均值以给予各兔子总的单一评分, 且接着对各治疗组求平均值。

另外, 在处死时分离左心房, 将其分成两半, 且对两半都进行研究以评定组织浴中的活体外心脏功能, 其中在整个研究过程中, 后负荷和前负荷保持恒定。以应答由经由位于各肌肉制剂底部的点状电极产生的电刺激所诱导的收缩的最大力收缩率 (maximum rate of force development, dF/dt) 衡量心肌收缩力。

这些研究的结果呈示于表 2 中。与媒剂对照组相比且与其它两个治疗组相比, 阿霉素产生统计上显著的左心室缩短分数 (FS%) 降低。化合物 II 和 III 不改变左心室缩短分数。与媒剂对照组相比, 所有三种药物同等程度地降低红细胞压积 (hematocrit)。与媒剂对照组相比且与其它两个治疗组相比, 阿霉素显著降低在处死时获得且在活体外测量的经分离心房的心肌收缩性 (dF/dt)。化合物 II 和 III 不改变心肌收缩性。类似地, 与媒剂对照组相比且与其它两个治疗组相比, 阿霉素显著增加组织病理学病变, 且化合物 II 和 III 不产生组织病理学病变。这些结果展示阿霉素在慢性给药期间在兔子中产生严重的心脏毒性, 但化合物 II 和 III 在这一模型中在与阿霉素所使用的剂量可相当的剂量下无心脏毒性。认为化合物 II 和 III 无心脏毒性是归因于无 13-酮基且不形成醇代谢物。

太平洋紫杉醇与 13-脱氧蒽环霉素的组合

活体外测量阿霉素 (I)、13-脱氧阿霉素 (II)、5-亚氨基-13-脱氧阿霉素 (III)、道诺霉素 (IV)、13-脱氧道诺霉素 (V) 和 5-亚氨基-13-脱氧道诺霉素 (VI) 对 MCF-7 人类乳腺肿瘤细胞和 P388 鼠类白血病细胞的生长的抑制效应。利用根据美国典型微生物菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 方案的方案, 培养并维持用于这些研究的 MCF-7 和 P388 细胞系。MCF-7 培养基为伊氏最低要求培养基 (EMEM,

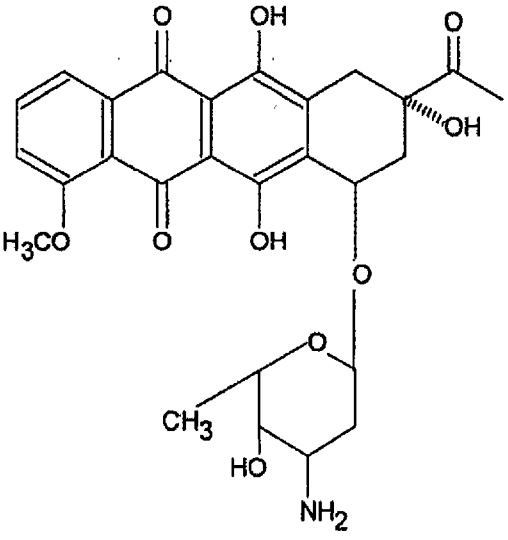
Eagle Minimum Essential Medium; ATCC) 且 P388 培养基为杜氏改良伊氏培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, ATCC)。MCF-7 和 P388 的工作培养基 (working media) 是通过向 450 ml EMEM 培养基 (MCF-7) 或 DMEM (P388) 中添加 50 ml 胎牛血清 (FBS, MCF-7) 或 50 ml 马血清 (ATCC, P388) 而制备的。也向 DMEM (P388) 中添加 4.5 g/L 葡萄糖 (西格玛 (Sigma))。向 MCF-7 和 P388 工作培养基中添加 5 ml 青霉素/链霉素 (P/S, 吉布可 (Gibco))。使细胞在 37℃ 下在 5% CO₂ 中生长 1 周, 且添加 25 ml 新制培养基。当细胞密度达到 1-2×10⁶ 个细胞/毫升时, 通过转移到含有新制培养基的新烧瓶中使细胞传代。

表 2

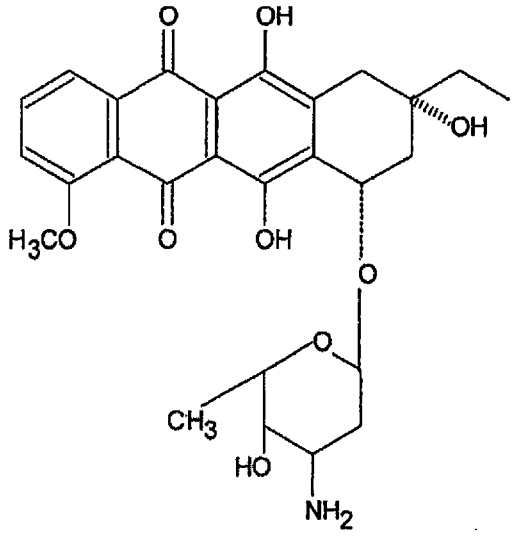
长期用 13-脱氧蒽环霉素治疗的兔子中不存在心脏毒性作用 (值是平均值±SE, n = 6)

	对照		阿霉素 (I)		化合物 II		化合物 III	
	前	后	前	后	前	后	前	后
FS%	37.5±0.3	36.8±1.2	37.1±0.4	27.4* ⁺ ±1.8	38.1±0.7	37.4±1.0	37.3±1.1	35.6±0.7
HCT%	34.4±0.4	38.7±0.6	35.0±0.5	27.5* ⁺ ±1.4	35.0±0.7	23.8* ⁺ ±2.0	34.4±0.7	33.3* ⁺ ±1.0
dF/dt (克/秒); 3 Hz		29.1±4.3		15.1* ⁺ ±1.9		24.4±4.4		30.2±4.9
组织病理学评分		0.97±0.2		1.81* ⁺ ±0.4		0.97±0.1		0.64±0.2

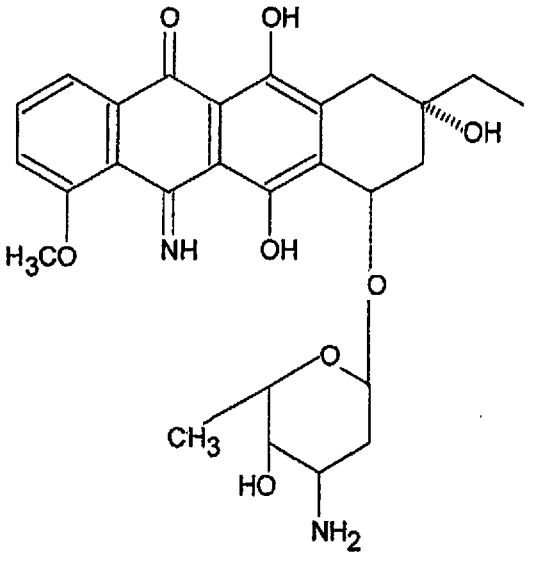
相对于对照, p< .05; +相对于化合物 I 和 II p< .05; 前=治疗前, 后=治疗后。



IV



V



VI

使用无菌技术，从 T-75 烧瓶中通过移出并舍弃培养基来收集 MCF-7 细胞。向各烧瓶中添加 5 ml 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液（西格玛（Sigma））以分离细胞。将烧瓶放置

在培育箱中 5-10 分钟以有助于分散。添加 10 ml 完全生长培养基, 将其直接倾析于 50 ml 试管中, 然后在 $200\times g$ 下离心 10 分钟。通过将培养基直接倾析于 50 ml 试管中并在 $200\times g$ 下离心 10 分钟来收集 P388 细胞。使小球 (MCF-7 和 P388) 再悬浮 5 ml 中且通过使细胞缓慢通过安装于注射器上的 18 g 针挤出来分散细胞。使用血细胞计数器计数细胞并用培养基将其稀释到 150,000 个细胞/毫升。将经稀释细胞移液到 96 孔板中, 浓度为 15,000 个细胞/孔, 100 μ l。覆盖各板且在 37°C 下培育 48 小时。

在细胞特异性无血清培养基中制备蒽环霉素和太平洋紫杉醇的稀释液。向 50 μ l 等分试样的所有孔中添加适当浓度的药物且使细胞在药物 (蒽环霉素/太平洋紫杉醇) 存在下生长 24 小时。将氘化胸腺嘧啶 (ICN) 稀释于无血清细胞特异性培养基中, 浓度为 1 $\mu\text{Ci}/50\ \mu\text{l}$ 。用 50 μ l 含氘化胸腺嘧啶的培养基的等分试样激发用于分析的所有孔。暴露于同位素 4 小时后, 通过用去离子水低渗溶解细胞且使用布兰德尔 (Brandel) 细胞收集器在华特门 (Whatman) GF-C 过滤器上收集细胞内容物来测量 DNA 中的氘化胸腺嘧啶并入。在收集 MCF-7 细胞之前, 抽吸培养基, 向各孔中添加 150 μL 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 以分离细胞。使过滤器干燥, 将其放置在含有 5 ml 闪烁混合物的 7 ml 闪烁管中且在闪烁计数器中计数。在初步实验中, 确定将对 MCF-7 细胞产生 30% 生长抑制的蒽环霉素的浓度 (抑制性浓度 30, IC30) 和对 P388 细胞产生 10% 生长抑制的蒽环霉素的浓度 (IC10)。结果展示于表 3 和表 4 中。

表 3

抑制 MCF-7 人类乳腺肿瘤细胞生长的阿霉素、道诺霉素和 13-脱氧蒽环霉素的 IC30

	IC30 (nM)
阿霉素 (I)	100
化合物 II	450
化合物 III	750
道诺霉素 (IV)	750
化合物 V	645
化合物 VI	875

表 4

抑制 P388 鼠类白血病细胞生长的阿霉素、道诺霉素和 13-脱氧蒽环霉素的 IC10

	IC10 (nM)
阿霉素 (I)	250
化合物 II	1100
化合物 III	3500
道诺霉素 (IV)	300
化合物 V	700
化合物 VI	1700

单独太平洋紫杉醇和在 IC30 浓度的阿霉素、道诺霉素或化合物 II、III、V 或 VI 存在下太平洋紫杉醇抑制 MCF-7 细胞生长的剂量-反应关系展示于图 1 和 2 中。由这些剂量-反应曲线，计算太平洋紫杉醇的 IC50，且将其呈现于表 5 中。

表 5

在 IC30 浓度的阿霉素、道诺霉素或 13-脱氧蒽环霉素存在下太平洋紫杉醇抑制 MCF-7 人类乳腺肿瘤细胞生长的 IC50 (nM)。值是平均值+标准误差，n = 3

太平洋紫杉醇的 IC50 (nM)

太平洋紫杉醇	221±8
太平洋紫杉醇+阿霉素 (I)	78±6*
太平洋紫杉醇+化合物 II	11±9* ^x
太平洋紫杉醇+化合物 III	1±0* ^x
太平洋紫杉醇+道诺霉素 (IV)	0.6±0* ^x
太平洋紫杉醇+化合物 V	0.55±0* ^x
太平洋紫杉醇+化合物 VI	0.75* ^x

*相对于太平洋紫杉醇 p < .05; ^x相对于太平洋紫杉醇+道诺霉素 p < .05。

阿霉素使太平洋紫杉醇的癌症生长抑制效价产生 2.8 倍的增加。化合物 II 产生 20 倍增加且化合物 III 产生 220 倍增加。道诺霉素和化合物 V 和 VI 使太平洋紫杉醇的生长抑制效价产生 295 至 400 倍增加。与其它化合物相比，阿霉素是太平洋紫杉醇的癌症生长抑制效价的相对较弱的增效剂。

单独太平洋紫杉醇和在 IC10 浓度的阿霉素、道诺霉素或化合物 II、III、V 或 VI 存在下太平洋紫杉醇抑制 P388 鼠类白血病细胞生长的剂量-反应关系展示于图 3 和 4 中。由这些剂量-反应曲线，计算太平洋紫杉醇的 IC60，且将其呈现于表 6 中。

表 6

在 IC10 浓度的阿霉素、道诺霉素或 13-脱氧蒽环霉素存在下太平洋紫杉醇抑制 P388 鼠类白血病细胞生长的 IC50 (nM)。

值是平均值+标准误差, $n = 3$

太平洋紫杉醇的 IC_{50} (nM)

太平洋紫杉醇	失活
太平洋紫杉醇+阿霉素 (I)	16 ± 0.58
太平洋紫杉醇+化合物 II	16 ± 0.50
太平洋紫杉醇+化合物 III	20 ± 0.67
太平洋紫杉醇+道诺霉素 (IV)	$916 \pm 83^*$
太平洋紫杉醇+化合物 V	13 ± 0
太平洋紫杉醇+化合物 VI	14 ± 0.83

*相对于化合物 I、II、IV、V 和 VI, $p < 0.05$ 。

单独太平洋紫杉醇针对 P388 细胞失活, 从而不对生长产生抑制。然而, 在蒽环霉素存在下, 太平洋紫杉醇成为生长的有效抑制剂。在除道诺霉素以外的所有蒽环霉素存在下, 太平洋紫杉醇的效价在低纳摩尔浓度范围内, 而道诺霉素的效价在高纳摩尔浓度范围内。

当投与两种药物的组合的药理学作用超过分开投与两种药物的叠加效应时, 发生增强效应。举例来说, 假定第一种药物产生 30%反应的剂量是 100 个单位且第二种药物产生 30%反应的剂量是 10 个单位。如果 100 个单位的第一种药物加 10 个单位的第二种药物产生 60%反应, 那么这两种药物之间存在叠加效应。然而, 如果 100 个单位的第一种药物加 10 个单位的第二种药物产生 90%反应, 那么这两种药物之间存在协同或超叠加效应。在仅抑制 30%生长的浓度的具有本发明化学式的 13-脱氧蒽环霉素存在下, 对 MCF7 细胞不产生生长抑制效应的浓度 (1 至 50 nM) 的太平洋紫杉醇将产生 50%至 95%生长抑制。同样地, 在仅抑制 10%生长的浓度的具有本揭示案化学式的 13-脱氧蒽环霉素存在下, 在高达 2000 nM 的浓度下不对 P388 细胞产生生长抑制效应的太平洋紫杉醇将产生 65%至 95%的生长抑制。因此, 本揭示案的 13-脱氧蒽环霉素与太平洋紫杉醇以增强方式或协同作用以产生对抑止癌细胞生长高度有效的组合物、组合、混合物或制剂。

前述说明书局限于本揭示案的特定实施例。然而, 将明显看出, 为实现本发明的某些或所有优点且在不脱离本发明精神和范畴的情况下, 所属领域的技术人员可对本揭示案的所揭示实施例进行改动和修改。举例来说, 在非癌性大鼠衍生的 H9c2 细胞中, 太平洋紫杉醇的弱生长抑制性浓度 (IC_{10}) 使 13-脱氧阿霉素的 IC_{50} 从 700 nM 降低到 400 nM, 使 13-脱氧-5-亚氨基阿霉素的 IC_{50} 从 1500 nM 降低到 210 nM, 但不降低阿霉素的 IC_{50} , 其仍维持原来的 210 nM。因此, 紫杉烷增加 13-脱氧蒽环霉素的效价。对所属领

域的技术人员来说显而易见的临床疗法中通常所碰到的各种条件和参数的合适的修改和改编在本揭示案的范畴内。

前述说明书说明和描述本揭示案。另外，本揭示案仅展示和描述优选实施例，但如以上所提及，应了解，在本文中所表达的、与上述教导和/或相关领域的技术或知识相称的本发明概念的范围内，本揭示案能够在不同其它组合、修改和环境中使用且能够变化或修改。上文所述的实施例进一步打算解释申请者已知的最佳实施方式且使得所属领域的其它技术人员能够以这些或其它实施例且以特定应用和其用途所需的不同修改来利用本揭示案。因此，本说明书不打算将本发明局限于本文中所揭示的形式。同时，打算解释附加权利要求书以包括替代实施例。

在本说明书中所引用的所有公开案和专利申请案以引用的方式并入本文中，且在任何情况下，程度就如同各个别公开案或专利申请案特定并个别地以引用的方式并入一样。

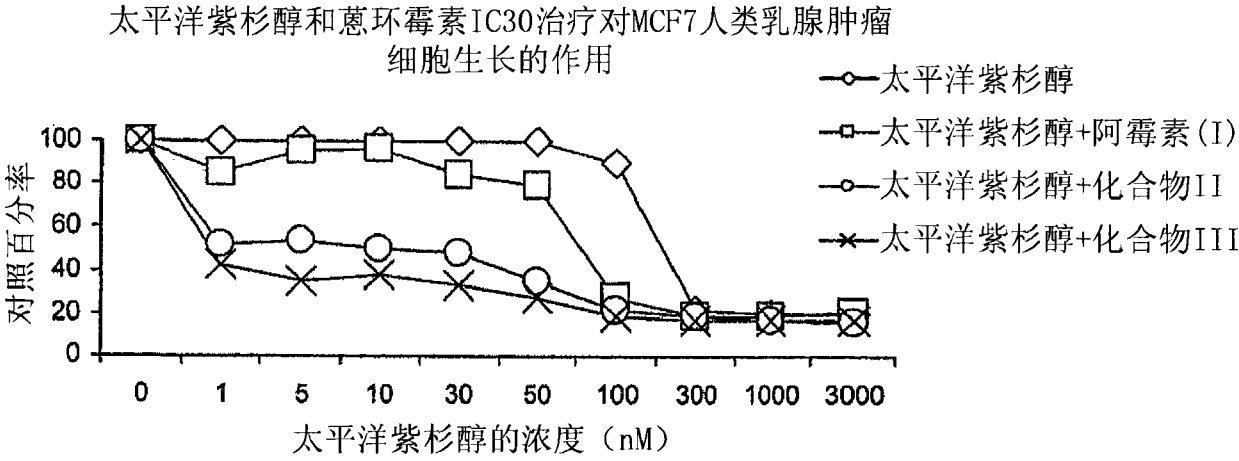


图1

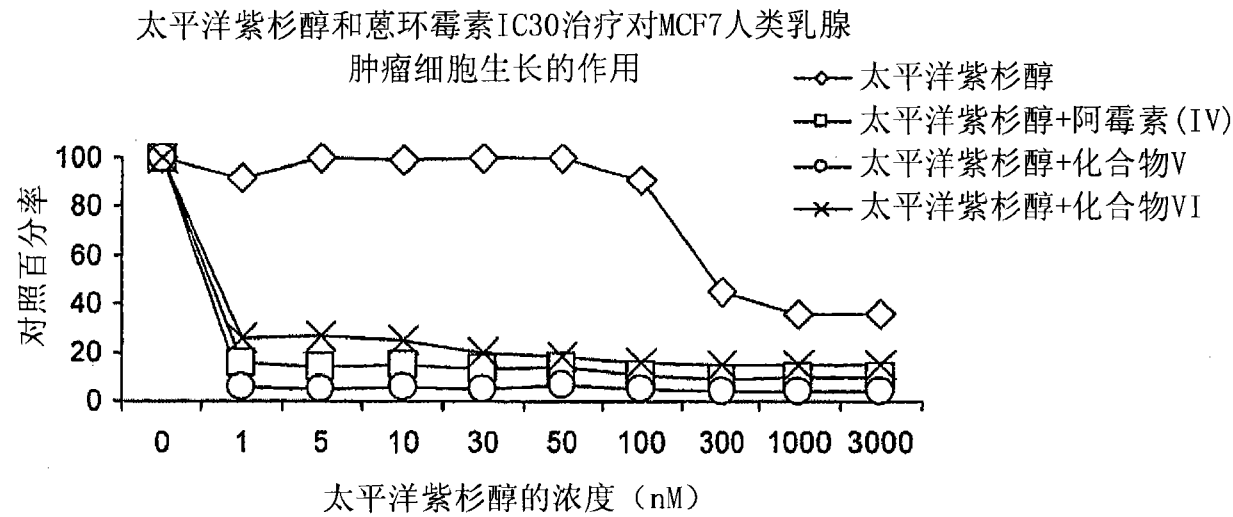


图2

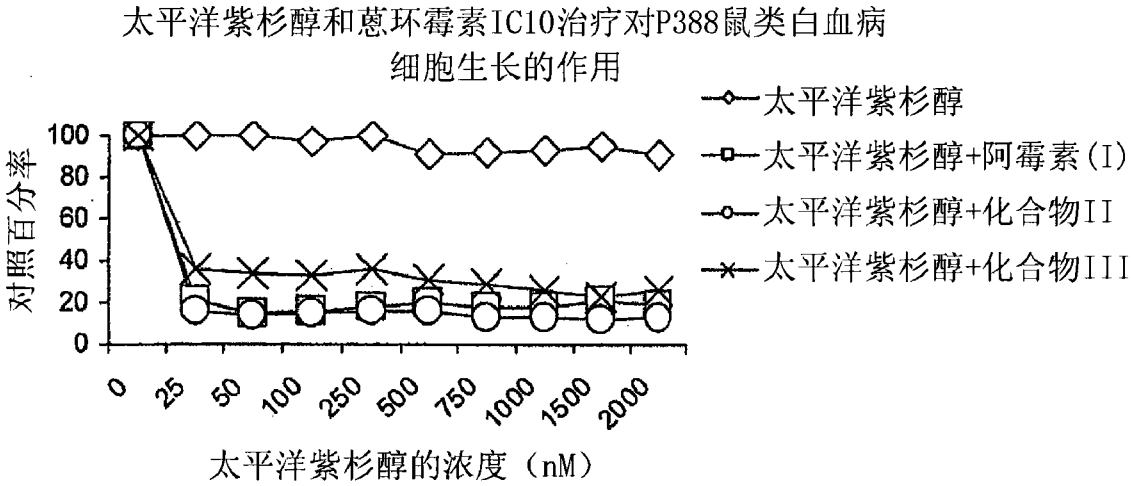


图3

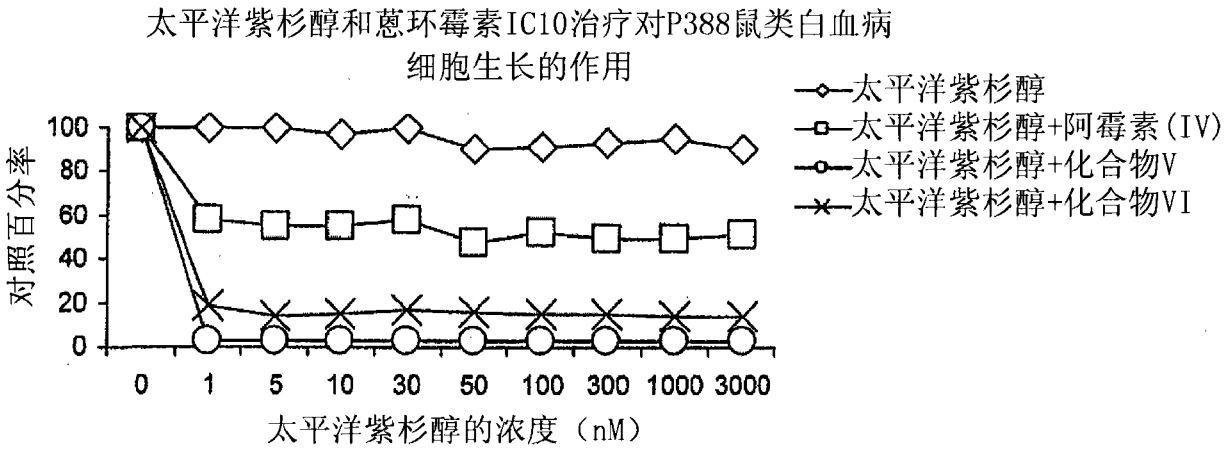


图4