

(由本局填寫)

|        |
|--------|
| 承辦人代碼： |
| 大類：    |
| IPC分類： |

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權

日本

2001年01月30日 特願2001-022394 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於：

寄存日期：

，寄存號碼：

裝

訂

線

## 五、發明說明(2)

經由兔慢性實驗模型中顯示其遠弱於阿黴素(doxorubicin) (Invest. New Drug, 15, 219-225(1997))。

蒽環類抗生素(Anthracyclin)化合物雖具有類似構造，如下所述，已知其適應症狀及作用機制等有所不同。及柔紅黴素(daunorubicin)以及去甲柔紅黴素(idarubicin)具有對白血病之療效，但不具對定型癌症之療效。另一方面，阿黴素(doxorubicin)、表阿黴素(epirubicin)、吡喃阿黴素(pirarubicin)以及阿克拉黴素(aclarubicin)則具有對定型癌症之療效(日本醫藥品集第23版2000、藥業時報社)。柔紅黴素及阿黴素阻礙DNA合成與RNA合成之程度相當，但阿克拉黴素及馬柔塞若黴素對於RNA合成之阻礙較DNA合成強，其抗腫瘤效果之表現機制全然不同(JJSHP, 27, 1087-1110(1991))。由此可知根據癌的種類，即使相同的蒽環類抗生素藥劑，其藥效並不相同。此外，即使相同的抗癌劑，其根據癌的種類不同，其藥效亦不相同。因此，關於某特定之腫瘤(癌)，其特定的抗癌劑是否有效，必須藉由實驗而具體確認之。

關於氟柔比星方面，目前已有報告提出：於活體外利用與其他抗癌劑併用而顯示其相乘性效果(Investigational New Drugs, 14, 357-363(1996))。例如，對於人類T細胞白血病MOLT-3細胞株及人類骨肉瘤MG-63細胞株，已有報告指出利用鹽酸氟柔比星及順鉑等之併用造成相加性效果。再者，亦有報告指出經由使用鼠(Mouse)白血病P388細胞株之實驗，氟柔比星及順鉑於活體內(In Vivo)之併

### 五、發明說明(3)

用效果(柳義和等、癌學會要旨集、講演No. 2168 (1989))。然而，對於肺癌則尚未有關於氮柔比星及順鉑併用之報告。

順鉑雖為優良之抗癌劑，已知其具有腎毒性等問題之副作用。

#### 發明之開示

經本發明者致力於研究之結果，發現併用氮柔比星及順鉑後，相較於各單獨藥劑其副作用並未增加，且可顯著地治療肺癌，此外並發現氮柔比星及順鉑之併用下，減少各投與量而同時維持其治療效果時，可大量減低其副作用之情形，進而完成本發明。

意即本發明之要旨如以下所示。

- (1) 一種肺癌治療劑，其係用於與順鉑之併用，並以氮柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分。
- (2) 如(1)所記載之肺癌治療劑，其中肺癌為小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌以及肺大細胞癌。
- (3) 如(1)之肺癌治療劑，其中肺癌為小細胞肺癌。
- (4) 如(1)~(3)中任一項之肺癌治療劑，其有效成分為鹽酸氮柔比星。
- (5) 如(1)~(4)中任一項之肺癌治療劑，其係同時與順鉑投與、分離投與，或持續投與者。
- (6) 如(1)~(5)中任一項之肺癌治療劑，其係以氮柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分，並用於投與順鉑後，或預定投與之肺癌患者。

## 五、發明說明(4)

- (7) 一種肺癌治療劑，其係用於與順鉑併用之(1)~(6)中任一項之肺癌治療劑，其中將氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以單次約60~約135 mg/m<sup>2</sup>或分為2~5次投與之方式包裝者。
- (8) 如(7)之肺癌治療劑，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以單次投與約110~約130 mg/m<sup>2</sup>投與之方式包裝。
- (9) 如(7)之肺癌治療劑，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以一日一次約25~約50 mg/m<sup>2</sup>投與三日之方式包裝。
- (10) 如(7)之肺癌治療劑，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以一日一次約35~約45 mg/m<sup>2</sup>投與三日之方式包裝。
- (11) 如(9)或(10)之肺癌治療劑，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以連續三日投與。
- (12) 如(7)~(11)中任一項之肺癌治療劑，其中併用之順鉑單次投與約35~約90 mg/m<sup>2</sup>。
- (13) 如(7)~(11)中任一項之肺癌治療劑，其中併用之順鉑單次投與約50~約70 mg/m<sup>2</sup>。
- (14) 如(1)~(13)中任一項之肺癌治療劑，其中作為其有效成分之氮柔比星或其藥學上許可之鹽類係用於：因副作用而無法持續順鉑治療，且接受投與使副作用減輕之順鉑量之肺癌患者。
- (15) 一種氮柔比星或其藥學上許可之鹽類的使用，其係

## 五、發明說明 ( 5 )

用於製造與順鉑併用之肺癌治療劑。

- (16) 一種肺癌之治療方法，其係投與氮柔比星或其藥學上許可之鹽類及順鉑。

圖面之簡單說明

圖1表示在鹽酸氮柔比星最大耐受量(MTD)之0.5倍量與順鉑最大耐受量之0.5倍量併用時，小細胞肺癌細胞之增殖抑制效果。○為鹽酸氮柔比星單獨投與群，△為順鉑(CDDP)單獨投與群，◆表示併用投與群。

圖2表示在鹽酸氮柔比星最大耐受量之0.5倍量與順鉑最大耐受量之0.5倍量併用時，其副作用之體重減少效應。○為鹽酸氮柔比星單獨投與群，△為順鉑單獨投與群，◆表示併用投與群。

圖3表示在鹽酸氮柔比星最大耐受量之0.8倍量與順鉑最大耐受量之0.8倍量併用時，小細胞肺癌細胞之增殖抑制效果。○為鹽酸氮柔比星單獨投與群，△為順鉑單獨投與群，●表示併用投與群。

圖4表示在鹽酸氮柔比星最大耐受量之0.8倍量與順鉑最大耐受量之0.8倍量併用時，其副作用之體重減少效應。○為鹽酸氮柔比星單獨投與群，△為順鉑單獨投與群，●表示併用投與群。

圖5表示在鹽酸氮柔比星最大耐受量之1.0倍量與順鉑最大耐受量之1.0倍量併用時，小細胞肺癌細胞之增殖抑制效果。○為鹽酸氮柔比星單獨投與群，△為順鉑單獨投與群，■表示併用投與群。

裝  
訂  
線

## 五、發明說明(6)

圖6表示在鹽酸氮柔比星最大耐受量之1.0倍量與順鉑最大耐受量之1.0倍量併用時，其副作用之體重減少效應。○為鹽酸氮柔比星單獨投與群，△為順鉑單獨投與群，■表示併用投與群。

實施本發明之最佳形態

本發明之肺癌治療劑係一種以氮柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分之肺癌治療劑，其有效成分為，其係與順鉑併用。

氮柔比星或其藥學上許可之鹽類可依據如 J. Org. Chem., 52, 4477-4485(1987) 製造。氮柔比星之藥學上許可之鹽類，可舉出含酸基鹽類以及含鹼基鹽類。含酸基鹽類可列舉：鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、氫碘酸鹽、硝酸鹽、磷酸鹽等無機酸鹽；檸檬酸鹽、草酸鹽、醋酸鹽、蟻酸鹽、丙酸鹽、安息香酸鹽、三氟醋酸鹽、反丁烯二酸鹽、馬來酸鹽、酒石酸鹽、天門冬胺酸鹽、谷胺酸鹽、甲磺酸鹽、苯磺酸鹽、樟腦磺酸鹽等有機酸鹽。含鹼基鹽類可列舉：鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽、銨鹽等無機鹼機鹽；三乙基銨鹽、三乙醇銨鹽、吡啶噻鹽、二異丙基銨鹽等有機鹽。較佳之藥學上許可之鹽類，則可舉出鹽酸鹽等。

順鉑(cis-diamminedichloroplatinum)，可依據如 Ann., 51, 1(1845) 製造之。

氮柔比星或其藥學上許可之鹽類之最大耐受量：以鹽酸氮柔比星而言，鼠(mouse)為 25 mg/kg (75 mg/m<sup>2</sup>)、人類為 1日1次之單次投與 130 mg/m<sup>2</sup>、若為三日連續投與則單

## 五、發明說明(7)

日為  $50 \text{ mg/m}^2$ ；順鉑之最大耐受量，鼠(mouse)為  $10 \text{ mg/kg}$  ( $30 \text{ mg/m}^2$ )，人類為  $90 \text{ mg/m}^2$ 。

肺癌可列舉例如：小細胞肺癌，肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺大細胞癌、肺轉移、腺樣囊腫癌、黏表皮癌、惡性混合腫瘤等。其中，作為表示本發明肺癌治療劑之較佳效果之例，可舉小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺大細胞癌等，且可特別舉出以小細胞肺癌為佳。

經由實施例1使用鼠(mouse)之結果，發現以下之情形。

- (1) 鹽酸氟柔比星最大耐受量之0.5倍量( $12.5 \text{ mg/m}^2$ )與順鉑最大耐受量之0.5倍量( $5 \text{ mg/m}^2$ )併用時，與各單劑之最大耐受量投與群比較下，具有同樣程度之抗癌效果，另一方面順鉑之副作用則劇減。
- (2) 鹽酸氟柔比星最大耐受量之0.8倍量或1.0倍量(20或 $25 \text{ mg/m}^2$ )與順鉑最大耐受量之0.8倍量或1.0倍量(8或 $10 \text{ mg/m}^2$ )併用時，與各單劑之最大耐受量投與群比較下，具有強力之抗癌效果，另一方面順鉑之副作用未增加而保持同樣程度。

如此，將鹽酸氟柔比星或其藥學上許可之鹽類最大耐受量之約0.5~約1倍量，與順鉑最大耐受量之約0.5~約1倍量併用時，順鉑以及氟柔比星或其藥學上許可之鹽類之副作用並未增加，有時並可減低其副作用而得到安全且充分之抗癌效果。例如，順鉑或氟柔比星之副作用為問題點時，可於鹽酸氟柔比星或其藥學上許可之鹽類最大耐受量

## 五、發明說明( 8 )

之約0.5~約1倍量，與順鉑最大耐受量之約0.5~約1倍量範圍內，使用更低之投與量；另一方面，順鉑或氮柔比星之副作用非問題點時，於鹽酸氮柔比星或其藥學上許可之鹽類最大耐受量之約0.5~約1倍量，與順鉑最大耐受量之約0.5~約1倍量範圍內，使用更高之投與量，可安全地得到最大之抗癌效果。

氮柔比星或其藥學上許可之鹽類與順鉑之併用中，順鉑之投與量，雖可舉出為約0.5~約1倍量之範圍，具體上可舉出為最大耐受量之約0.5倍量、約0.8倍量、約1倍量等。例如，以順鉑最大耐受量之約0.5倍量投與時，氮柔比星或其藥學上許可之鹽類之投與量，可舉出為其最大耐受量之約0.5~約1倍量，而更佳之狀態則可舉出為約0.8倍量或1倍量。以順鉑最大耐受量之約0.8倍投與時，氮柔比星或其藥學上許可之鹽類之投與量為其最大耐受量之約0.5~約1倍量之範圍，以約0.8或約1倍量更佳。再者，亦可以順鉑最大耐受量之約1倍量投與。

人類之肺癌治療，可因患者之狀態、年齡、體重等作適當變更，例如可將氮柔比星或其藥學上許可之鹽類約60~約135 mg/m<sup>2</sup>與順鉑約35~約90 mg/m<sup>2</sup>併用。該氮柔比星或其藥學上許可之鹽類，可以例如約60~約135 mg/m<sup>2</sup>以單次或分為2~5次投與。氮柔比星或其藥學上許可之鹽類之較佳投與時間表，可舉出例如1日1次投與3日，特別以1日1次連續3日投與為佳。以單次投與時之投與量，可舉出例如約110~約130 mg/m<sup>2</sup>之範圍，以120 mg/m<sup>2</sup>等為佳。

## 五、發明說明( 9 )

3日連續投與時每日投與量，可舉出例如約25~約50 mg/m<sup>2</sup>之範圍，約35~約45 mg/m<sup>2</sup>之範圍較佳，其特別以約40 mg/m<sup>2</sup>~約45mg/m<sup>2</sup>為更佳。

併用之順鉑投與量，可舉出例如：單次投與約35~約90 mg/m<sup>2</sup>之範圍，以單次投與約50~約80 mg/m<sup>2</sup>之範圍較佳，具體上為約60 mg/m<sup>2</sup>及約80 mg/m<sup>2</sup>，其中，特別以60 mg/m<sup>2</sup>為更佳。此外，順鉑可分為數次，以1日或分成數日投與。

以順鉑進行治療之肺癌患者，因其副作用等原因而判斷為無法繼續治療時，以減輕該副作用之投與量進行投與，並加以投與氮柔比星或其藥學上許可之鹽類，可減輕順鉑之副作用以繼續治療。減輕該副作用之順鉑量，可舉出例如：約35~約70 mg/m<sup>2</sup>之範圍，並可舉出較佳為約35~約60 mg/m<sup>2</sup>之範圍。

氮柔比星或其藥學上許可之鹽類，與順鉑之投與量組合，可舉出下述之例。

| 氮柔比星或其藥學上許可之鹽類                  | 順鉑                         |
|---------------------------------|----------------------------|
| 約60 mg/m <sup>2</sup> (單次)      | 約35 mg/m <sup>2</sup> (單次) |
| 約120 mg/m <sup>2</sup> (單次)     | 約80 mg/m <sup>2</sup> (單次) |
| 約25 mg/m <sup>2</sup> (1日1次)×3日 | 約35 mg/m <sup>2</sup> (單次) |
| 約40 mg/m <sup>2</sup> (1日1次)×3日 | 約60 mg/m <sup>2</sup> (單次) |
| 約40 mg/m <sup>2</sup> (1日1次)×3日 | 約80 mg/m <sup>2</sup> (單次) |
| 約45 mg/m <sup>2</sup> (1日1次)×3日 | 約60 mg/m <sup>2</sup> (單次) |
| 約45 mg/m <sup>2</sup> (1日1次)×3日 | 約80 mg/m <sup>2</sup> (單次) |

## 五、發明說明( 10 )

本發明之肺癌治療劑中，氮柔比星或其藥學上許可之鹽類，可與於順鉑之同時，分離，或持續投與。分離或持續投與時，氮柔比星或其藥學上許可之鹽類於順鉑之前或之後投與皆可。此時兩投與之間隔，可適宜地決定，例如可為1~數小時、十~數十小時、1~數日、1週等。例如，氮柔比星或其藥學上許可之鹽類與順鉑雖於同一日投與，以考量患者至醫院之通勤時間為佳。

本發明之肺癌治療劑，雖依患者之症狀、年齡、體重、投與狀態、併用之順鉑投與量、投與次數等作適當變化，上述氮柔比星或其藥學上許可之鹽類與順鉑各投與後，再以約7日至約60日之間隔重複同樣之各投與。特別是較佳為約每2週~約每4週，尤以約每3週之重複更佳。

氮柔比星或其藥學上許可之鹽類，通常可以非口服性(例如：靜脈內、動脈內、皮下、肌肉內注射、膀胱內、腹腔內、胸腔內、局部性、經直腸方式、經皮方式、經鼻方式等)投與。較佳形式可舉出靜脈內投與。此外，亦可使用口服投與，而口服投與之形式，可舉出例如：錠劑、膠囊、藥丸、顆粒劑、散劑、口服液、糖漿或懸浮劑等。

順鉑則通常可以非口服性(例如：靜脈內、動脈內、皮下、肌肉內注射、膀胱內、腹腔內、胸腔內、局部性、經直腸方式、經皮方式、經鼻方式等)投與。較佳形式可舉出靜脈內投與。此外，亦可使用口服投與，而為作為口服投與之形式，可舉出例如：錠劑、膠囊、藥丸、顆粒劑、散劑、口服液、糖漿或懸浮劑等。

## 五、發明說明 ( 11 )

本發明之肺癌治療劑中，可更進一步與其他抗癌劑、放射線療法、外科手法等組合。此外，亦可由(a)包含作為其有效成分之氮柔比星或其藥學上許可之鹽類之第1組成物，以及(b)包含順鉑作為其有效成分之第2組成物，構成用於肺癌併用治療之套組。

實施例

以下舉出實施例以更詳細說明本發明，而本發明並不限於此內。

## 實施例1

併用氮柔比星或其藥學上許可之鹽類所產生之抗腫瘤效果

將人類小細胞肺癌 LX-1 細胞株進行皮下移植於出生後 5 週之裸鼠 (80 隻)。腫瘤移植 15 日後，將腫瘤面積為約  $200\sim 500\text{ mm}^3$  之 36 隻以 1 群 6 隻分成 6 群。於當日，分別以生理食鹽水投與「對照群」；以鹽酸氮柔比星最大耐受量 (25 mg/kg) 投與「鹽酸氮柔比星單獨投與群」；「順鉑單獨投與群」投與順鉑最大耐受量 (10 mg/kg)；「併用群 (0.5 x MTD)」投與鹽酸氮柔比星最大耐受量之 0.5 倍量與順鉑最大耐受量之 0.5 倍量；「併用群 (0.8 x MTD)」投與鹽酸氮柔比星最大耐受量之 0.8 倍量與順鉑最大耐受量之 0.8 倍量；「併用群 (1 x MTD)」則投與鹽酸氮柔比星最大耐受量與順鉑最大耐受量。其後 23 日，測定鼠之腫瘤面積及體重。

將鹽酸氮柔比星溶解於半胱胺酸 (Cysteine) 緩衝液 (0.4 mg/mL 之 L-半胱胺酸鹽酸鹽 1 水合物，含 6.25 mg/mL 之乳

## 五、發明說明 ( 12 )

糖)使成為2.5 mg/mL，並將此以生理食鹽水稀釋以調整為2.0以及1.25 mg/mL之溶液，並分別投與10 mL/kg之液量，以作為鹽酸氮柔比星最大耐受量、其0.8倍量、以及其0.5倍量之投與。

順鉑為由日本化藥股份公司購入之λ注(含有0.5 mg/mL)，以20、16、及10 mL/kg之液量投與，以作為順鉑之最大耐受量、其0.8倍量、及其0.5倍量之投與。

圖1及圖2中，分別將併用群(0.5xMTD)之腫瘤體積及體重變化，與鹽酸氮柔比星單獨投與群及順鉑單獨投與群之資料一同列出。

圖3及圖4中，分別將併用群(0.8xMTD)之腫瘤體積及體重變化，與鹽酸氮柔比星單獨投與群及順鉑單獨投與群之資料一同列出。

圖5及圖6中，分別將併用群(1xMTD)之腫瘤體積及體重變化，與鹽酸氮柔比星單獨投與群及順鉑單獨投與群之資料一同列出。

表1中，表示各群腫瘤增殖率之最小T/C %值。最小T/C %值以如下方式計算。

最小T/C %值：各投與群腫瘤增殖率\*)對於對照投與群之腫瘤增殖率\*)之比率(%)於測定期間之最小值。

\*)腫瘤增殖率：各測定時間點1群6隻之腫瘤體積之平均值，相對於藥劑投與時間點之1群6隻腫瘤體積平均值之比率。

## 五、發明說明 ( 13 )

表 1

| 投與群                               | 最小<br>T/C %值 |
|-----------------------------------|--------------|
| 鹽酸氮柔比星最大耐受量投與群                    | 55           |
| 順鉑最大耐受量投與群                        | 68           |
| 鹽酸氮柔比星最大耐受量與順鉑最大耐受量之併用投與群         | 30           |
| 鹽酸氮柔比星最大耐受量0.8倍與順鉑最大耐受量0.8倍之併用投與群 | 40           |
| 鹽酸氮柔比星最大耐受量0.5倍與順鉑最大耐受量0.5倍之併用投與群 | 54           |

## 1. 併用群(0.5 x MTD)之結果

如圖 1 所示，併用投與之抗腫瘤效果，與各單劑之最大耐受量投與群比較，具有同程度之效果。亦即，最小 T/C % 值於鹽酸氮柔比星單獨投與群為 55%，於順鉑單獨投與群為 68%，而於併用群(0.5 x MTD)時則為 54%。

若以動物之體重降低評價其副作用，如圖 2 所示，與各單劑之最大耐受量投與群比較，得到可視為因順鉑投與量減半，而明顯減輕副作用之效果。

## 2. 併用群(0.8 x MTD)之結果

如圖 3 所示，可見到腫瘤之消退，併用投與之抗腫瘤效果，與各單劑之最大耐受量投與群比較，顯示強力抗腫瘤效果。亦即，最小 T/C % 值於鹽酸氮柔比星單獨投與群為 55%，於順鉑單獨投與群為 68%，而於併用群(0.8 x MTD)時則為 40%。

## 五、發明說明 ( 14 )

若以動物之體重降低評價其副作用，如圖4所示，與順鉑單獨投與群同樣程度。

### 3. 併用群(1xMTD)之結果

如圖5所示，與0.8倍量時同樣可見到腫瘤之消退，併用投與之抗腫瘤效果，與各單劑之最大耐受量投與群比較，顯示顯著之抗腫瘤效果。亦即，最小T/C %值於鹽酸氮柔比星單獨投與群為55%，於順鉑單獨投與群為68%，而於併用群(1xMTD)時則為30%。

若以動物之體重降低評價其副作用，如圖6所示，雖暫時呈現約3g之體重減少，而產生回復後，與順鉑單獨投與群為同樣程度之副作用。

如上述，鹽酸氮柔比星與順鉑併用時其副作用減低，並確認其顯著之治療效果。此外，由圖1~6可知，併用之效果為投與時間起算2週之間表現特別顯著，並於3週後效果幾乎消失。因此，約2週至約4週後重複其再次投與為佳，特別是可視為約3週後之再投與，且其後亦繼續者為佳。

### 實施例2

#### 正常與腫瘤組織中羰基還原酶(Carbonyl Reductase)基因表現之變動分析

使用由人類肺正常組織69樣本與人類肺腺癌組織44樣本、肺扁平上皮組織32樣本、肺大細胞癌組織5樣本及白血病細胞18樣本分別調製之全RNA，以生物晶片(DNA chip)進行分析。生物晶片分析以Affymetrix公司之Gene

## 五、發明說明 ( 15 )

Chip Human Genome U95A、B、C、D、E進行。具體而言，分析以(1)由全RNA調製cDNA、(2)由該cDNA調製標記化cRNA、(3)標記化cRNA之片段化、(4)片段化cRNA與探針微陣列(probe array)之雜交、(5)探針微陣列之染色、(6)探針微陣列之掃描以及(7)基因表現分析等步驟進行。

## (1) 由全RNA調製cDNA

將由人類肺正常組織69樣本與人類肺腺癌組織44樣本、肺扁平上皮組織32樣本、肺大細胞癌組織5樣本及白血病細胞18樣本調製之全RNA 10  $\mu\text{g}$ 以及含有T7-(dT)24引子(Amersham公司製) 100 pmol之11  $\mu\text{L}$ 混合液以70 $^{\circ}\text{C}$ 加熱10分鐘後，於冰上冷卻。冷卻後，將含於cDNA合成用SuperScript Choice系統(SuperScript Choice System for cDNA Synthesis, Gibco-BRL公司製)中之5倍濃縮第一股cDNA緩衝液(5x First Strand cDNA Buffer) 4  $\mu\text{L}$ ，添加含於該套組之0.1M DTT(二硫蘇糖醇, dithiothreitol) 2  $\mu\text{L}$ 及含於該套組之10 mM dNTP混合物(Mix) 1  $\mu\text{L}$ ，以42 $^{\circ}\text{C}$ 加熱2分鐘。此外，再添加含於該套組之Super Script II RT 2  $\mu\text{L}$  (400U)，以42 $^{\circ}\text{C}$ 加熱1小時後，於冰上冷卻。冷卻後，添加DEPC處理水(Nacalaitesk公司製) 91  $\mu\text{L}$ 、含於該套組中之5倍濃縮第二股反應緩衝液(5x Second Strand Reaction Buffer) 30  $\mu\text{L}$ 、10 mM dNTP混合物3  $\mu\text{L}$ 、含於該套組之E. coli DNA連接酶Ligase 1  $\mu\text{L}$  (10U)、含於該套組之E. coli DNA聚合酶I (Polymerase I) 4  $\mu\text{L}$  (40U)及含於該套組之E.

## 五、發明說明 ( 16 )

coli核糖核酸水解酶H (RNase H) 1  $\mu$ L (2U)，使其於16 $^{\circ}$ C反應2小時。其次，加入含於該套組之T4 DNA聚合酶2  $\mu$ L (10U)，使其於16 $^{\circ}$ C反應5分鐘後，添加0.5M之EDTA 10  $\mu$ L。其次，添加苯酚/氯仿/異戊醇(phenol/chloroform/isoamyl alcohol)溶液(Nippon Gene公司製) 162  $\mu$ L並混合之。將該混合液移至事先以室溫、14,000 rpm離心分離30秒之Phase Lock Gel Light (Eppendorf公司製)，並以室溫、14,000 rpm離心分離2分鐘後，將145  $\mu$ L之水層移至離心管中。於所得溶液中加入7.5M醋酸銨溶液72.5  $\mu$ L及乙醇362.5  $\mu$ L並混合後，以4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm、離心分離20分鐘。離心分離後，捨去上清液，得到含有所製cDNA之DNA丸粒(pellet)。之後，添加80%之乙醇0.5 mL於該丸粒，以4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm、離心分離5分鐘後，捨去上清液。再度進行同樣操作後，使該丸粒乾燥，溶解於12  $\mu$ L之DEPC處理水。

依以上操作，由源自人類肺正常組織69樣本與人類肺腺癌組織44樣本、肺扁平上皮組織32樣本、肺大細胞癌組織5樣本及白血病細胞18樣本之全RNA取得cDNA。

## (2) 由cDNA調製標記化cRNA

於上述(1)所調製之各cDNA溶液5  $\mu$ L中，加入DEPC處理水17  $\mu$ L、包含於生物微陣高產率RNA轉錄物標記套組(BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit, ENZO公司製)中之10倍濃縮HY反應緩衝液4  $\mu$ L、含於該套組之10倍濃縮以生物素標記之核糖核苷酸(10x Biotin Labeled

## 五、發明說明 ( 17 )

Ribonucleotides) 4  $\mu$ L、含於該套組之10倍濃縮DTT 4  $\mu$ L、含於該套組之10倍濃縮核糖核酸水解酶抑制劑混合物(10x RNase Inhibitor Mix) 4  $\mu$ L及含於該套組之20倍濃縮T7 RNA聚合酶2  $\mu$ L混合之，使其於37°C反應5小時。反應後，於該反應液中加入DEPC處理水60  $\mu$ L，利用RNeasy迷你套組(Mini Kit)並依照其所附之步驟，純化所調製之標記化cDNA。

## (3) 標記化cRNA之片段化

於含有上述(2)所純化之各標記化cRNA 20 $\mu$ g溶液中，加入5倍濃縮片段化緩衝液(Fragmentation Buffer) ((200 mM Tris-Acetate, pH 8.1 (Sigma公司製)、500 mM醋酸鉀(Sigma公司製)及150 mM醋酸鎂(Sigma公司製)) 8  $\mu$ L，並將所得反應液40  $\mu$ L於94°C加熱35分鐘後，放置於冰中。依此方式將標記化cRNA片段化。

## (4) 片段化cRNA與探針微陣列(probe array)之雜交

於上述(3)所得各片段化cRNA 40  $\mu$ L中，加入5 nM對照組寡核苷酸B2 (Control Oligo B2, Amersham公司製) 4  $\mu$ L、100倍濃縮對照組cRNA混合液(100x Control cRNA Cocktail) 4  $\mu$ L、鮭魚精子DNA (Promega公司製) 40  $\mu$ g、乙醯化之BSA (Gibco-BRL公司製) 200  $\mu$ g、2倍濃縮MES雜交緩衝液[200 mM MES、2M[Na<sup>+</sup>]]、40 mM EDTA、0.02% Tween 20 (Pierce公司製)、pH 6.5-6.7] 200  $\mu$ L及DEPC處理水144  $\mu$ L混合，得到400  $\mu$ L之雜交混合物。將所得各雜交混合物於99°C加熱5分鐘後，再以45°C加熱5

## 五、發明說明 ( 18 )

分鐘。加熱後，於室溫以 14,000 rpm 離心分離 5 分鐘，得到雜交混合物之上清液。

另一方面，將充滿於單倍 MES 雜交緩衝液 (1x MES hybridization buffer) 中之人類基因組 U95 探針微陣列 (Affymetrix 公司製)，於雜交裝置內以 45°C、60 rpm 旋轉 10 分鐘後，除去單倍 MES 雜交緩衝液，並調製探針微陣列。將上述所得雜交混合物之上清液 200  $\mu$ L 分別加入該探針微陣列中，於雜交裝置內以 45°C、60 rpm 旋轉 16 小時，得到與片段化 cRNA 雜交後之探針微陣列。

## (5) 探針微陣列之染色

自上述 (4) 所得各雜交完成之探針微陣列，回收去除雜交混合物後，以非嚴格洗滌緩衝液 (Non-Stringent Wash Buffer) { 6x SSPE [ 以 20x SSPE (Nacalaitesk 公司製) 稀釋 ]、0.01% Tween 20 及 0.005% Antifoam 0-30 (Sigma 公司製) } 注滿。其次，於安置有非嚴格洗滌緩衝液及嚴格洗滌緩衝液 (100 mM MES、0.1M 氯化鈉及 0.01% Tween 20) 之 GeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix 公司製) 既定位置，裝置片段化 cRNA 及雜交後之探針微陣列。之後，依照染色步驟 EuKGE-WS2，以一次染色液 [ 10  $\mu$ g/mL 鏈黴抗生素蛋白藻紅素 (Streptavidin Phycoerythrin, SAPE) (MolecuLar Probe 公司製)、2 mg/mL 乙醯化 BSA、100 mM MES、1 M 氯化鈉 (Ambion 公司製)、0.05% Tween 20 及 0.005% Antifoam 0-30 ]、以及二次染色液 [ 100  $\mu$ g/mL 山羊 IgG (Sigma 公司製)、3  $\mu$ g/mL 生物素化抗-抗鏈黴抗生素抗

## 五、發明說明 ( 19 )

體、(Vector Laboratories公司製)、2 mg/mL 乙醯化BSA、100 mM MES、1M 氯化鈉、0.05% Tween 20 及 0.005% Antifoam 0-30] 分別染色。

### (6) 探針微陣列之掃描以及(7)基因表現分析

將上述(5)染色後之各探針微陣列置入 HP GeneArray Scanner (Affymetrix公司製)，讀取其染色圖案。

以染色圖案作為基礎，利用 GeneChip Workstation System (Affymetrix公司製)分析探針微陣列上羧基還原酶 1 (Carbonyl Reductase 1)之表現。其次，依照分析步驟進行標準化(Normalization)及基因表現之比較分析。

結果，人類白血病細胞中羧基還原酶 1 之表現頻率為 11% (18 例中 2 例)，表現量中央值為 39，發現其幾乎未表現之現象。另一方面，人類肺組織之羧基還原酶 1 表現頻率於腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌及正常組織中，分別為 55% (44 例中 24 例)、63% (32 例中 20 例)、40% (5 例中 2 例) 及 32% (69 例中 22 例)，此外，表現量分別為 51、96、34 及 22，發現與肺正常組織比較下，肺癌組織中羧基還原酶 1 之表現亢進，特別是肺腺癌與扁平上皮癌之表現量為肺正常組織表現量之 2 倍及 4 倍。

### 產業上利用之可能性

藉由本發明，提供一種可用於治療肺癌患者有用之鹽酸氮柔比星及順鉑併用治療劑。經由與順鉑之併用，可提升鹽酸氮柔比星之抗腫瘤治療效果，並使降低順鉑副作用之癌治療成為可能。

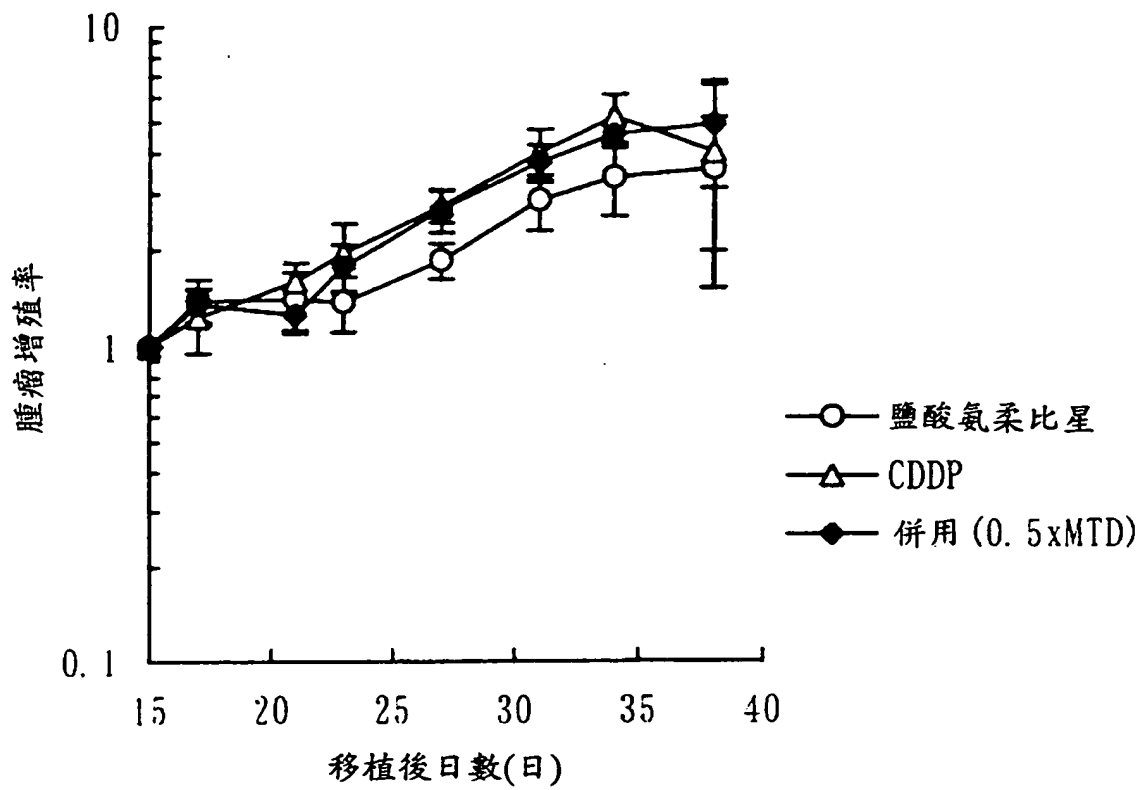


圖 1

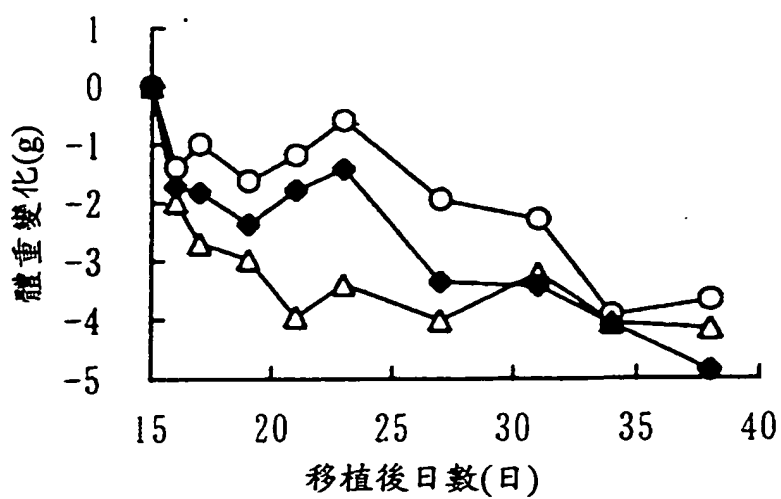


圖 2

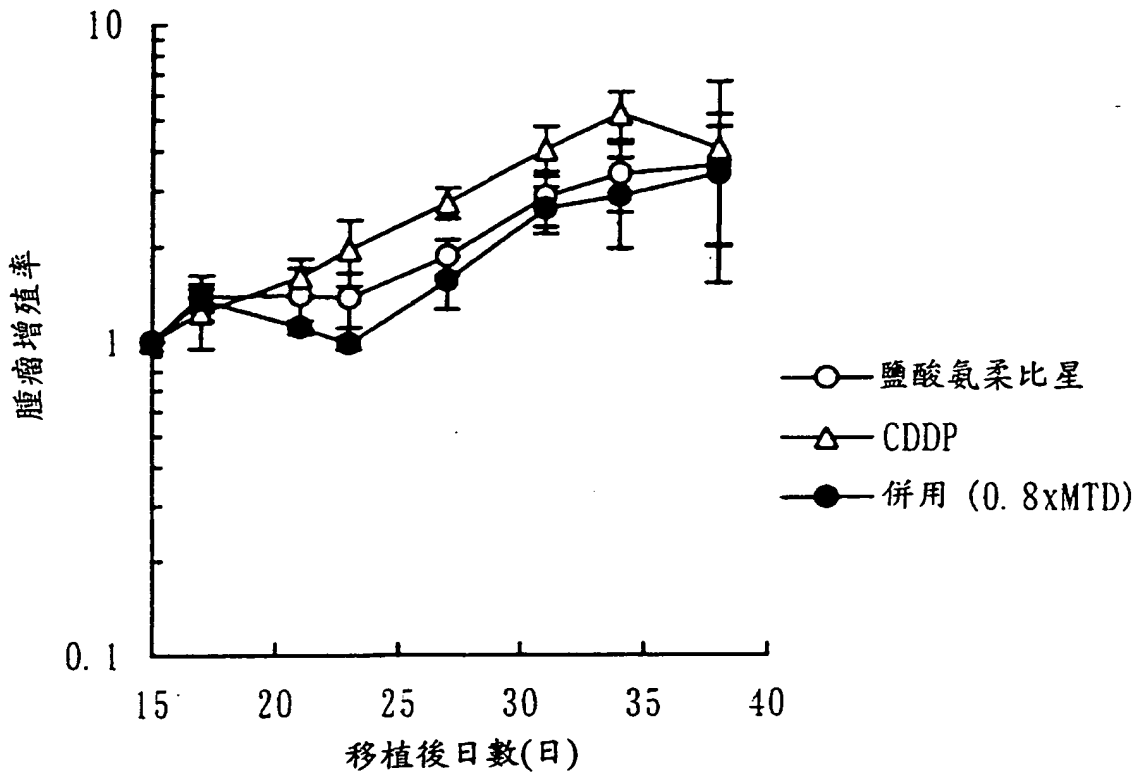


圖 3

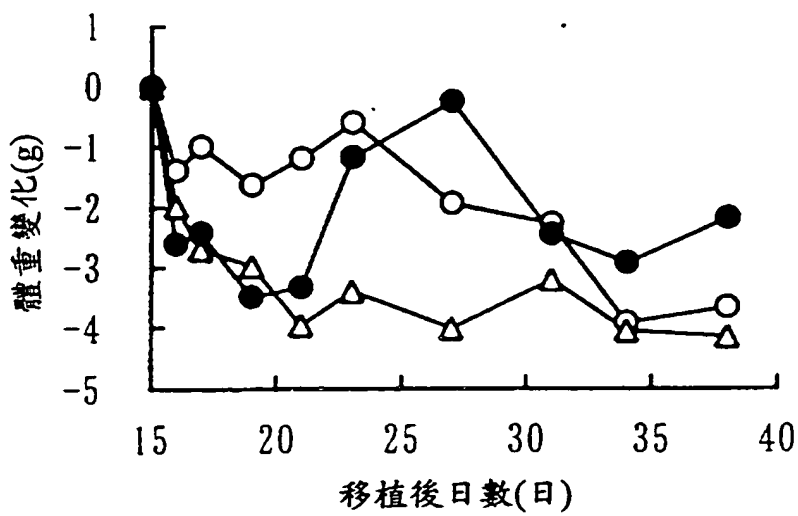


圖 4

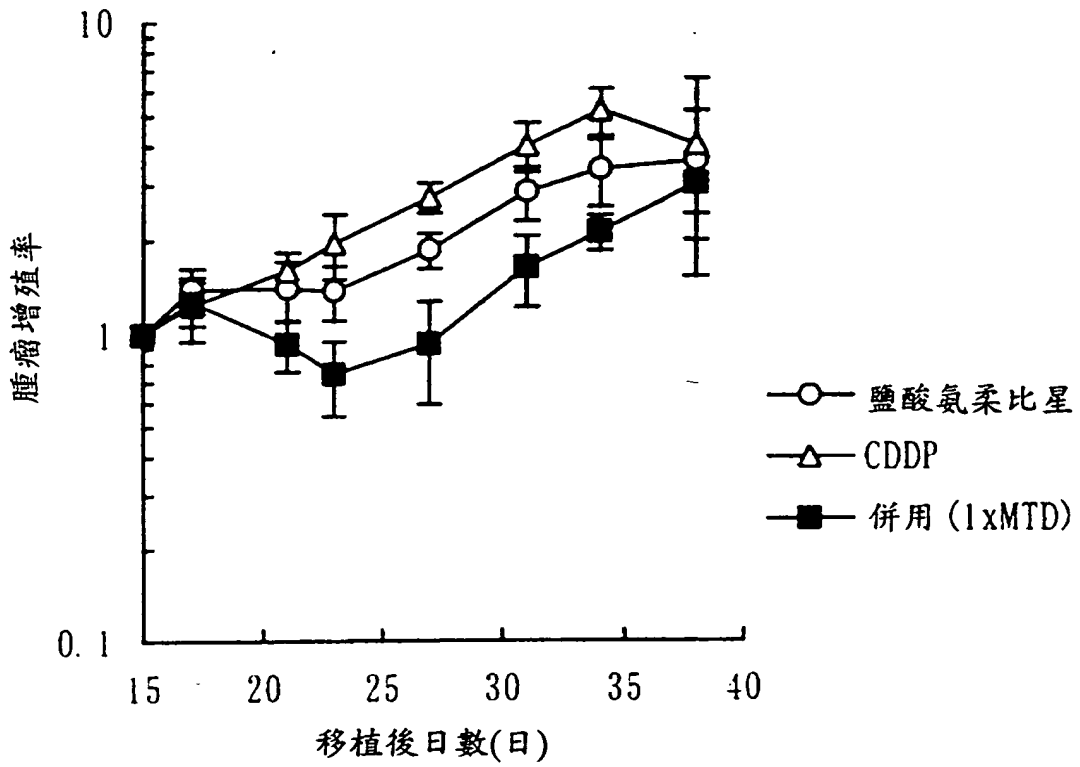


圖 5

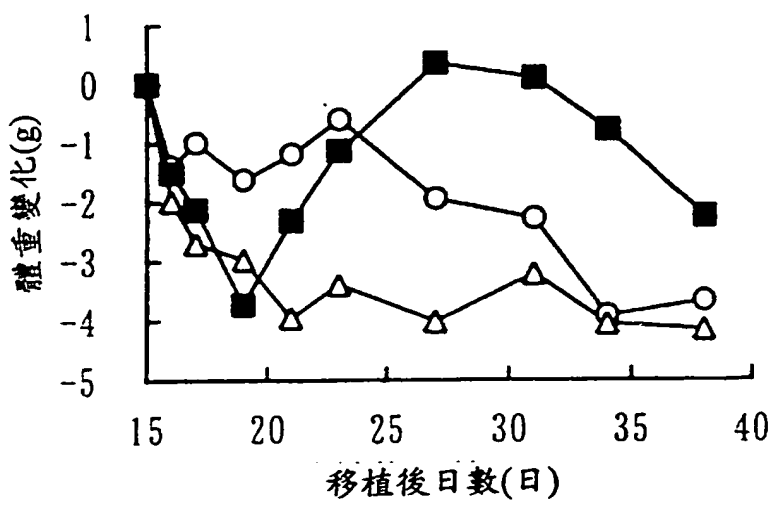


圖 6

# 公告本

98年12月4日

補充

|      |  |
|------|--|
| 申請日期 | 91.01.30.  |
| 案 號  | 091101579  |
| 類 別  | Ab1K $3\frac{1}{100}$ , $33\frac{3}{4}$ ; Ab1P $35\frac{5}{100}$ , $1\frac{1}{100}$ ; CO7H $15\frac{5}{100}$ |

A4

C4

中文說明書替換頁(98年12月)

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

|             |                |  |
|-------------|----------------|--|
| 一、發明<br>名稱  | 中 文            | 肺癌治療用醫藥組合物及醫藥組合  |
|             | 英 文            | PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND COMBINATION FOR LUNG CANCER                                   |
| 二、發明<br>創作人 | 姓 名            | 1.野口 俊弘 TOSHIHIRO NOGUCHI<br>2.馬場 朱美 AKEMI BABA  |
|             | 國 籍            | 均日本 JAPAN  |
| 三、申請人       | 住、居所           | 1.日本國大阪府茨木市學園町5-4-608<br>2.日本國大阪府豐中市曾根東町2丁目10-3-351  |
|             | 姓 名<br>(名稱)    | 日商大日本住友製藥股份有限公司<br>DAINIPPON SUMITOMO PHARMA CO., LTD.                                       |
|             | 國 籍            | 日本 JAPAN   |
|             | 住、居所<br>(事務所)  | 日本國大阪府中央區道修町2丁目6番8號<br>6-8, DOSHO-MACHI 2-CHOME, CHUO-KU, OSAKA-SHI,<br>OSAKA 541-8524 JAPAN |
|             | 代 表 人 名<br>姓 名 | 宮武 健次郎<br>MIYATAKE, KENJIRO  |

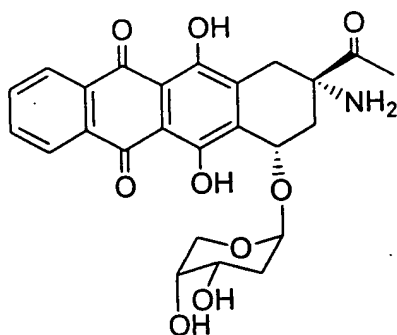
## 五、發明說明 ( 1 )

### 發明技術範圍

本發明係有關一種以氨柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分之肺癌治療劑，其係用於與順鉑之併用。

### 技術背景

氨柔比星((+)-(7S,9S)-9-乙酰基-9-胺基-7-[(2-去氧-β-D-赤-吡喃戊糖基)氧基]-7,8,9,10-四氫基-6,11-二羥基-5,12-萘并萘二酮，即(+)-(7S,9S)-9-Acetyl-9-amino-7-[(2-deoxin-β-D-erythro-pentopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naphthacener dione)為如下述化學構造式所示蒽環類抗生素(Anthracyclin)化合物(特公平3-5397號)。



氨柔比星於生物體內容易被還原，並生成第13位氮氧化物之代謝體(氨柔比星醇，Amrubicinol)，然而此氨柔比星醇比氨柔比星對於腫瘤細胞之增殖更具相當強烈之抑制作用。其他蒽環類抗生素(Anthracyclin)化合物之阿黴素(doxorubicin)及柔紅黴素(daunomycin)雖亦生成還原代謝物，但相反地其活性相對減少。(Cancer Chemother. Pharmacol., 30, 51-57(1992))。氨柔比星在於心毒性方面亦

四、中文發明摘要(發明之名稱： 肺癌治療用醫藥組合物及醫藥組合 )

利用氨柔比星(amrubicin)或其藥學上許可之鹽類與順鉑(Cisplatin)併用後，可有效地治療肺癌。

英文發明摘要(發明之名稱： PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND COMBINATION FOR LUNG CANCER )

Lung cancer can be efficaciously treated by the combined use of amrubicin or its pharmaceutically acceptable salt with cisplatin.

## 六、申請專利範圍

1. 一種肺癌治療用醫藥組合物，其係以氨柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分，並與順鉑併用。
2. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中肺癌為小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌以及肺大細胞癌。
3. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中肺癌為小細胞肺癌。
4. 如申請專利範圍第1~3項中任一項之醫藥組合物，其有效成分為鹽酸氨柔比星。
5. 一種肺癌治療用醫藥組合，其係以氨柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分，並與順鉑併用者，其中該醫藥組合係與順鉑投與之同時投與、分離投與，或持續投與。
6. 如申請專利範圍第5項之醫藥組合，其中肺癌為小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌以及肺大細胞癌。
7. 如申請專利範圍第5項之醫藥組合，其中肺癌為小細胞肺癌。
8. 如申請專利範圍第5~7項中任一項之醫藥組合，其有效成分為鹽酸氨柔比星。
9. 如申請專利範圍第5項之醫藥組合，其以氨柔比星或其藥學上許可之鹽類作為有效成分，用於順鉑投與後，或預定投與之患者。
10. 一種醫藥組合，其係用於與順鉑之併用之申請專利範圍第5項之醫藥組合者，其中將氨柔比星或其藥學上許可之鹽類以單次 $60\sim 135\text{ mg/m}^2$ 或分為2~5次投與之方式包

## 六、申請專利範圍

裝。

11. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以單次 $110\sim 130\text{ mg/m}^2$ 投與之方式包裝。
12. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以一日一次 $25\sim 50\text{ mg/m}^2$ 投與三日之方式包裝。
13. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類以一日一次 $35\sim 45\text{ mg/m}^2$ 投與三日之方式包裝。
14. 如申請專利範圍第12或13項之醫藥組合，其中氮柔比星或其藥學上許可之鹽類係連續投與三日。
15. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合，其中併用之順鉑以單次 $35\sim 90\text{ mg/m}^2$ 投與。
16. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合，其中併用之順鉑以單次 $50\sim 70\text{ mg/m}^2$ 投與。
17. 如申請專利範圍第5項之醫藥組合，其中作為其有效成分之氮柔比星或其藥學上許可之鹽類係用於：因副作用而無法持續順鉑治療，且接受投與使副作用減輕之順鉑量之肺癌患者。
18. 一種氮柔比星或其藥學上許可之鹽類、與順鉑併用之用途，其係用於製造肺癌治療用醫藥組合物。
19. 如申請專利範圍第18項之用途，其中肺癌為小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌以及肺大細胞癌。

## 六、申請專利範圍

20. 如申請專利範圍第18項之用途，其中肺癌為小細胞肺癌。
21. 如申請專利範圍第18~20項中任一項之用途，其中有效成分為鹽酸氨柔比星。