



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101432005 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 19

(21) 申请号 200780014758. 9

(22) 申请日 2007. 04. 23

(30) 优先权数据

60/794, 089 2006. 04. 24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2007/000392 2007. 04. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02007/123468 EN 2007. 11. 01

(73) 专利权人 布鲁斯医学股份公司

地址 瑞典维肯

(72) 发明人 拉尔斯·布鲁斯 英格丽德·布鲁斯

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 章社杲 李丙林

(51) Int. Cl.

A61K 31/765 (2006. 01)

A61K 31/785 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 96/07420 A1, 1996. 03. 14, 说明书第 4 页
第 10-17 行, 说明书第 9 页第 20-24 行.

US 5047236 A, 1991. 09. 10, 第 2 栏第 3 - 6
行, 第 11 栏第 15 - 36 行.

审查员 康旭亮

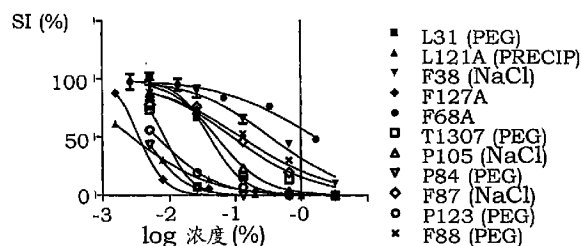
权利要求书2页 说明书21页 附图14页

(54) 发明名称

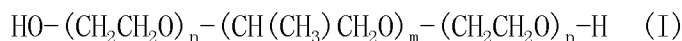
基于聚合物的抗癌剂

(57) 摘要

本发明涉及两性嵌段共聚物用于治疗 and 预防癌症的应用, 更具体的是通过降低癌细胞的增殖率来治疗和预防癌症的应用。优选的嵌段共聚物包含一个中心疏水链, 优选为聚环氧丙烷链, 至少两个亲水侧链, 优选为聚环氧乙烷链与中心疏水链连接。



1. 一种两性嵌段共聚物作为化学治疗剂在制备用于治疗或预防癌症的药物中的应用，条件是所述癌症不是结肠癌或直肠癌，所述两性嵌段共聚物由式 (I) 表示：

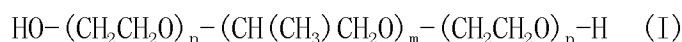


其中，m、n 和 p 均为整数，

其中，所述两性嵌段共聚物中的平均环氧乙烷含量为至少 40% w/w，但低于 80% w/w，

并且其中，所述药物包括所述两性嵌段共聚物或至少两种作为独立化学治疗剂的两性嵌段共聚物的混合物。

2. 一种两性嵌段共聚物在制备用于降低患有癌症的对象中的癌细胞生长率的药物中的应用，条件是所述癌症不是结肠癌或直肠癌，所述两性嵌段共聚物由式 (I) 表示：

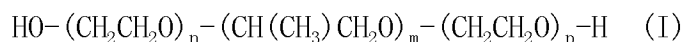


其中，m、n 和 p 均为整数，

其中，所述两性嵌段共聚物中的平均环氧乙烷含量为至少 40% w/w，但低于 80% w/w，

并且其中，所述药物包括所述两性嵌段共聚物或至少两种作为独立生长率降低剂的两性嵌段共聚物的混合物。

3. 一种两性嵌段共聚物在制备抗细胞增殖药物中的应用，条件是所述细胞不是结肠癌细胞或直肠癌细胞，所述两性嵌段共聚物由式 (I) 表示：



其中，m、n 和 p 均为整数，

其中，所述两性嵌段共聚物中的平均环氧乙烷含量为至少 40% w/w，但低于 80% w/w，

并且其中，所述药物包括所述两性嵌段共聚物或至少两种作为独立抗细胞增殖剂的两性嵌段共聚物的混合物。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中，对 m、n 和 p 进行选择，以使得

$$\frac{44 \times (n + p)}{44 \times (n + p) + 58 \times m} < 0.8。$$

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中 n 等于 p。

6. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中所述两性嵌段共聚物中的平均环氧丙烷含量为至少 2000g/mol。

7. 根据权利要求 6 所述的应用，其中所述平均环氧丙烷含量为至少 3000g/mol。

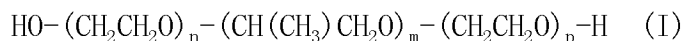
8. 根据权利要求 7 所述的应用，其中所述平均环氧丙烷含量在 3500g/mol 至 4500g/mol 的范围内。

9. 根据权利要求 8 所述的应用，其中所述平均环氧丙烷含量为 4000g/mol。

10. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中所述两性嵌段共聚物具有 12600g/mol 的平均分子量、平均环氧乙烷含量为 73.2±1.7% 且熔点为 56℃。

11. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中所述癌症选自肾癌、肺癌、骨髓瘤、淋巴瘤和前列腺癌组成的组。

12. 一种调节细胞增殖率的体外方法，条件是所述细胞不是结肠癌细胞或直肠癌细胞，所述方法包括将所述细胞与两性嵌段共聚物相接触，所述两性嵌段共聚物由式 (I) 表示：



其中，m、n 和 p 均为整数，

其中,所述两性嵌段共聚物中的平均环氧乙烷含量为至少 40% w/w,但低于 80% w/w。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述细胞是癌细胞但不是结肠癌细胞或直肠癌细胞。

基于聚合物的抗癌剂

技术领域

[0001] 本发明主要涉及癌症的治疗,特别涉及基于聚合物的抗癌剂在这样的癌症治疗中的应用。

背景技术

[0002] 癌症是一类疾病,其特征为细胞的不受控制的分裂,以及这些细胞通过侵入而直接生长至邻近组织中或者通过转移而植入体内的远距离部位中的扩散能力。

[0003] 现今,癌症是人死亡的主要原因,且受到疾病侵袭的个体的数目逐年增加。尽管最近几十年来不同的治疗癌症的方法(例如,化学疗法、内分泌疗法、放射疗法和手术法)已经得到极大的发展,但是它们在治疗不同的癌症类型的结果方面还是远远不够完善的。另外,一些已知的癌症治疗方法也由于高治疗成本、副作用和患者痛苦以及相对无效性(relative inefficiency)的缺点而受到损害(marred)。出于这些原因,进行了广泛的研究以找到癌症治疗方法的可替换形式或补充形式。

[0004] 文献[1]披露了非发酵型渗透性泻药(容积性泻药,osmotic laxative)作为活性剂在制备用于治疗结肠癌和/或直肠癌的药物产品中的应用。这种泻药的实例是可获自BASF公司的**PLURONIC**[®] F68。这些化合物具有促进排便和凝胶化特性。这些化合物由于其物理-化学特性而吸引并保留结肠内的水,并且能够在无纤维的条件下增加粪便排泄。人们相信,化合物的促进排便、非发酵性、渗透性(osmotic)和保水性能对于两种特定的癌症类型,结肠癌和直肠癌具有保护作用。

[0005] 文献[2]讨论了传播肿瘤细胞以发展为转移(转移灶)的能力,其中这种能力是基于对内皮固有的生理化学粘附(physiochemical adherence)以及微小凝块(microclot)的形成。其描述了干扰凝结过程的物质可以用于预防肿瘤的转移。建议的物质包括肝素(heparin)、华法林钠(sodium warfarin)和**PLURONIC**[®] F68。这些物质可连同手术用来预防继发于外科手术的肿瘤操作的转移。

发明内容

[0006] 本发明克服了现有技术方案(arrangement)中的这些和其他缺点。

[0007] 本发明的主要目的是提供能够用于癌症治疗或预防的基于聚合物的药物。

[0008] 本发明的另一个目的是提供降低癌细胞增殖率(proliferation rate)的基于聚合物的药物。

[0009] 如所附权利要求所限定的,通过本发明可实现这些及其他目的。

[0010] 简言之,本发明涉及两性嵌段共聚物的未预料到的抗癌作用的应用。这些共聚物是对抗各种不同癌症类型的有效的化学治疗剂,并且对癌细胞具有增殖率降低效应。

[0011] 本发明的两性嵌段共聚物优选包括一个疏水聚合物链,与至少两个亲水侧链连接。该疏水聚合物链优选为这样的中心链(central chain),其具有第一末端,与至少一个、优选一个或两个亲水侧链连接,并且具有第二末端,与至少一个、优选一个或两个亲水侧链

连接。

[0012] 优选的两性嵌段共聚物为具有结构 (I) 的那些共聚物：

[0013] $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{O})_m-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-\text{H}$ (I)

[0014] 因此, 优选具有环氧丙烷中心聚合物链且侧面为环氧乙烷侧链的共聚物。另外, n 优选等于 p 。这种共聚物可从 BASF 公司获得, 商标名称为 **PLURONIC[®]**。

[0015] 本发明的优选的这种 **PLURONIC[®]** 共聚物是具有至少 40% w/w 的平均环氧乙烷含量并且优选平均环氧乙烷含量低于 80% w/w 的那些共聚物。两性嵌段共聚物的平均环氧丙烷含量优选至少为 2000g/mol, 更优选至少为 3000g/mol, 例如约 $4000 \pm 500\text{g/mol}$ 。优选的共聚物的实例为 **PLURONIC[®] F127**, 其平均分子量为 12600g/mol, 平均环氧乙烷含量为 $73.2 \pm 1.7\%$ 以及熔点为 56°C 。

[0016] 发明人出乎意料地发现, 这些共聚物在降低或抑制癌细胞的细胞增殖或生长率方面以及在降低癌细胞的 DNA 合成方面具有抗癌作用。这种出乎意料的作用至少部分地是由共聚物结合至细胞膜并且阻碍不同生长因子与膜上它们各自的受体相结合的作用而引起的。

[0017] 本发明的药物组合物优选包括本发明的单独的两性嵌段共聚物或至少两种作为独立 (sole) 的化学治疗剂的这样的共聚物的混合物。

附图说明

[0018] 通过参考与附图联系在一起的以下说明可最好地理解本发明以及本发明的其他目的和优点, 其中：

[0019] 图 1 是说明 **PLURONIC[®] F127** 对人乳腺癌细胞系 MCF-7 的生长率的作用的图示；

[0020] 图 2 是说明 **PLURONIC[®] F127** 对人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 的生长率的作用的图示；

[0021] 图 3 是说明 **PLURONIC[®] F127** 对 FCS 刺激的人血管平滑肌细胞的生长率的作用的图示；

[0022] 图 4 是说明 **PLURONIC[®] F127** 对未刺激的或 FCS 刺激的大鼠主动脉平滑肌细胞的生长率的作用的图示；

[0023] 图 5 是说明 **PLURONIC[®] F127** 和 Triton X-100 的细胞介导的细胞毒性的比较的图示；

[0024] 图 6 是说明不同的两性嵌段共聚物对 FCS 刺激的人血管平滑肌细胞的相对细胞生长抑制作用的图示；

[0025] 图 7 是说明 **PLURONIC[®] F127** 对刺激的大鼠主动脉肌细胞的生长率抑制作用与 **PLURONIC[®] F127** 在阻碍成纤维细胞生长因子结合至平滑肌细胞上的受体中的作用之间的相关性的图示；

[0026] 图 8 是 **PLURONIC[®] F127** 在阻碍血小板衍生的生长因子结合至大鼠主动脉平滑肌细胞上的受体中的作用作用的图示；

[0027] 图 9 是说明植入小鼠中的具有 U937/gtb 癌细胞的中空纤维在经 **PLURONIC[®] P105** 处理 (treatment) 或未经 **PLURONIC[®] P105** 处理的情况下的细胞密度的图示；

[0028] 图 10 是说明植入小鼠中的具有 H69 癌细胞的中空纤维在经 PLURONIC® P105 处理或未经 PLURONIC® P105 处理的情况下的细胞密度的图示；

[0029] 图 11 是说明暴露于不同的两性嵌段共聚物的 U937/gtb 癌细胞的存活指数的图示；

[0030] 图 12A 至 12O 是说明暴露于不同的两性嵌段共聚物的 U937/gtb 癌细胞的存活指数的图示；以及

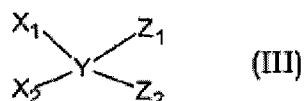
[0031] 图 13A 至 13C 是说明暴露于 PLURONIC® P84、F127 或 L121 的不同癌细胞系的存活指数的图示。

具体实施方式

[0032] 本发明主要涉及癌症治疗，特别是涉及用于抑制并降低癌细胞的生长和增殖率的两性嵌段共聚物的应用。

[0033] 本发明的活性抗癌化合物是疏水及亲水单体的两性嵌段共聚物。因此，该嵌段共聚物包括至少一个水溶性（亲水性）部分和至少一个水溶性较差或甚至为非水溶性（疏水性）部分。在目前优选的嵌段共聚物中，中心疏水链被至少两个亲水侧链包围。更优选地，中心疏水链具有第一链末端（chain end），其与至少一个，优选一个或两个亲水侧链连接，中心疏水链并且具有第二链末端，其与至少一个，优选一个或两个亲水侧链连接。以下的式 (II) 和 (III) 示意性地说明了这样的优选两性嵌段共聚物：

[0034]



[0035] 其中，X、X₁、X₂ 和 Z、Z₁、Z₂ 表示各个亲水侧链，且 Y 表示疏水中心链。在优选的实施方案中，X = Z，且 X₁ = X₂，Z₁ = Z₂，且更优选 X₁ = X₂ = Z₁ = Z₂。

[0036] 在优选的实施方式中，本发明的两性嵌段共聚物为环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物。现今可以从不同的生产商（manufacture）得到若干不同的这样的共聚物，包括来自 BASF 公司的聚合物 PLURONIC® 和 TETRONIC®。

[0037] 简言之，PLURONIC® 是环氧乙烷（EO）和环氧丙烷（PO）的共聚物，具有结构通式 (III)：



[0039] 或者更具体的结构 (I)：



[0041] 在优选的实施方式中，n = p。

[0042] 以下表 I 中列出了几种可获自 BASF 的 PLURONIC® 聚合物并且其可根据本发明进行使用。

[0043] 表 I-PLURONIC® 共聚物

[0044]

名称	平均分子量 (g/mol)	粘度 (cps)	25°C 下, 水中的溶 解度 (%)	熔点 (°C)
L31	1100	175*	>10	-
L35	1900	375*	>10	-
L43	1850	310*	>10	-
L44	2200	440*	>10	-
L61	2000	325*	不溶	-
L62	2500	450*	>10	-
L64	2900	850*	>10	-
L81	2750	475*	不溶	-
L92	3650	700*	>1	-
L101	3800	800*	不溶	-
L121	4400	1200*	不溶	-
P65	3400	180**	>10	-
P84	4200	280**	>10	-
P85	4600	310**	>10	-
P103	4950	285**	>10	-
P104	5900	390**	>10	-
P105	6500	750*	>10	-
P123	5750	350**	>10	-
F38	4700	260***	>10	48
F68	8400	1000***	>10	52
F77	6600	480***	>10	48
F87	7700	700***	>10	49
F88	11400	2300***	>10	54
F98	1300	2700***	>10	58
F108	14600	2800***	>10	57
F127	12600	3100***	>10	56

[0046] *25°C下的粘度 [布鲁克菲尔德 (Brookfield)]

[0047] **60°C下的粘度 [布鲁克菲尔德]

[0048] ***77°C下的粘度 [布鲁克菲尔德]

[0049] 如本领域中已知的, **PLURONIC**[®] 产品名的字母标记代表在 25°C 下产品的物理形态 (physical form), 其中, “L” 表示液体, “P” 表示糊状物 (paste) 而 “F” 表示固体形式。三位数字产品名中的首位数字或两个首位数字乘以 300, 示出了疏水中心聚环氧丙烷链的近似分子量。末位数字, 乘以 10, 示出了聚合物的环氧乙烷的近似含量 (以 % 计)。环氧乙烷含量可由公式 (1) 计算:

$$EO = \frac{44(n+p)}{44(n+p)+58m} \quad (1)$$

[0051] 其中, m、n 和 p 如结构 (I) 中所定义的。

[0052] 如果疏水或液体可溶部分 (P0) 减少的过多, 即, m 是较小的整数, 则生长抑制作用会显著降低。结果, 本发明优选的 **PLURONIC**[®] 共聚物因此是具有至少约 2000g/mol 的疏水部分的那些 **PLURONIC**[®] 聚合物, 即, 表 I 中具有三位数字产品名或者其中产品名中的首位数字大于 6 的那些 **PLURONIC**[®] 聚合物。

[0053] 另外,已表明具有较大的亲水含量(即,环氧乙烷的近似含量为约80%或更多)的**PLURONIC**[®]共聚物,在测试共聚物中具有最低效的抗癌作用。在表 I 中这些共聚物的产品名具有末尾数字 8。

[0054] 如果嵌段共聚物的环氧乙烷的含量相对于环氧丙烷的含量过低,则共聚物水溶性较差或者甚至是非水溶性的。这样的嵌段共聚物由于必须使用基于非水的溶剂,所以可能在临床上的有用性较差。

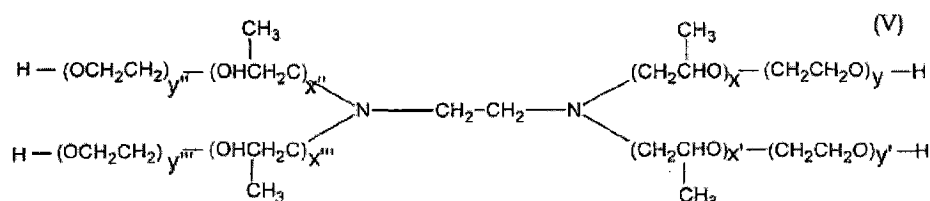
[0055] 此外,如果结构(I)中的 m、n 和 p 都过低,例如 L31、L42、L43、L44、L61、L62 和 L63,即,较短的相关疏水嵌段共聚物,该共聚物对于癌性细胞及非癌性细胞均是有毒的。因而,对于这样的共聚物,必须使用较低的药物浓度。

[0056] 目前优选的**PLURONIC**[®]共聚物的实例包括 F127、P84、P105、P123、F87 和 L121 并且特别是 F127。

[0057] 已经进行了多个实验,其中去除**PLURONIC**[®]共聚物中的一个亲水侧链。在这种情况下,抑制作用明显降低或甚至丧失。因此,本发明的优选的两性共聚物包括至少两个连接至疏水(聚环氧丙烷)链的亲水(聚环氧乙烷)链。

[0058] 根据本发明可使用的其他相关的共聚物为**TETRONIC**[®]聚合物,也可获自 BASF 公司。这些共聚物可由以下结构(V)表示:

[0059]



[0060] 下表 II 中列出了可获得的**TETRONIC**[®]聚合物的一些性能。

[0061] 表II-**TETRONIC**[®]共聚物

[0062]

名称	平均分子量 (g/mol)	粘度 (cps)	25°C 下, H ₂ O 中 的溶解度 (%)	熔 点 (°C)
304	1650	450*	>10	-
701	3600	600*	不溶	-
901	4700	700*	不溶	-
904	6700	320**	>10	-
908	25000	325***	>10	58
1107	15000	1100***	>10	51
1301	6800	1000*	不溶	-
1307	18000	2700***	>10	54

[0063] *25°C下的粘度 [布鲁克费尔德]

[0064] **60°C下的粘度 [布鲁克费尔德]

[0065] ***77°C下的粘度 [布鲁克费尔德]

[0066] 在这些**TETRONIC**[®]共聚物中,**TETRONIC**[®]1307是目前根据本发明的优选的两性共聚物。1307共聚物具有高效的抗癌作用,同时是水溶性的,并且对于非增殖细胞是相对无毒的。

[0067] 根据本发明还可使用其他的亲水疏水两重性(两性)嵌段共聚物。例如,具有与各个聚环氧乙烷侧链连接的中心聚苯乙烯链的共聚物具有生长抑制作用。因此,除了包括一个聚环氧乙烷链和多个聚环氧乙烷侧链的那些之外,本发明还包括其他的两性嵌段共聚物。

[0068] BASF 公司还具有其他相关的两性嵌段共聚物,其与 **PLURONIC[®]** 和 **TETRONIC[®]** 共聚物相关。**PLURONIC[®]R** 是一种这样的共聚物,其中与 **PLURONIC[®]** 相比,环氧乙烷和环氧丙烷的位置已被改变。换言之,聚合物具有以下结构通式:



[0070] 表 III 列出了可获得的这样的共聚物。

[0071] 表 III-**PLURONIC[®]R** 共聚物

[0072]

名称	平均分子量 (g/mol)	粘度 (cps)	25°C 下, H ₂ O 中 的溶解度 (%)	熔点 (°C)
10R5	1950	440*	>10	-
17R2	2150	450*	>10	-
17R6	2650	600*	>10	-
25R4	3600	1100*	>10	-
31R1	3250	660*	>1	-

[0073] *25°C 下的粘度 [布鲁克费尔德]

[0074] 相应地,将 **TETRONIC[®]** 中的环氧乙烷和环氧丙烷已改变位置的共聚物表示为 **TETRONIC[®]R** 聚合物。表 IV 列出了可获自 BASF 公司的这样的聚合物。

[0075] 表 IV-**TETRONIC[®]R** 共聚物

[0076]

名称	平均分子量 (g/mol)	粘度 (cps)	25°C 下, H ₂ O 中 的溶解度 (%)	熔点 (°C)
150R1	8000	1840*	不溶	-
90R4	6900	3870*	>10	-

[0077] *25°C 下的粘度 [布鲁克费尔德]

[0078] 应注意的是,当在本文件中提到共聚物的分子量时,指的是平均理论分子量 (average theoretical molecular weight)。如本领域中的技术人员所熟知的,在给定的—批特定共聚物中,并不是所有的聚合物分子都具有完全相同的聚合物长度和分子量。因此,给出的分子量是平均值,并且在该平均值附近具有一个分布范围 (distribution)。平均值附近的分布范围的相同讨论适用于共聚物的亲水性,例如,通过聚合物的平均环氧乙烷含量表示的。

[0079] 本发明的共聚物是体外癌生长的有效抑制剂,即使以非常低的剂量。此外,与缓慢生长的癌细胞相比,在快速生长的癌细胞中生长抑制作用更加显著。另外,本发明的至少一些两性嵌段聚合物对非癌性细胞不具有任何细胞增殖影响功能,除非由于添加不同的生长因子而使得非癌性细胞受到刺激。

[0080] 该共聚物可用来降低不同类型的癌细胞系的生长率,并使其正常化。此外,该共聚

物似乎可将高增殖降低至正常的生长率,但不再进一步降低。因此,非癌性细胞由于其已经以低的正常生长率增殖,因而不会受到影响。

[0081] 一旦癌细胞的生长率已经被减少,则(人)患者的免疫系统能够更加有效地控制和对抗癌细胞从而消除癌症。

[0082] 本发明的共聚物在预防癌细胞中的突变的发生或至少降低癌细胞中的突变发生率上也具有影响。这项发现非常重要,因为其减少了由于突变而形成更倾向于避开或对抗对象的固有癌症防御机制的癌细胞的危险。

[0083] 根据本发明,可使用本领域普通技术人员已知的制剂方法(formulation method),将两性嵌段共聚物制成药物可接受的制剂(formulation)。这些制剂可通过标准途径给药。通常,共聚物可以药物可接受的剂型以包括活性成分的药物制品的形式,进行静脉内、腹膜内、皮下、含服、直肠、皮肤、鼻、口服、气管、支气管、局部给药,通过任何其他的非肠道途径或通过吸入进行给药。

[0084] 目前优选的给药途径是静脉内给药,其中药用的医药组合物包括在所选溶剂的溶液中的本发明的两性共聚物。

[0085] 在特定的给药实施方案中,将含共聚物的溶液一次性或优选即刻(instant)多次地注射至需要癌症治疗的个体中。还可以采用来自例如医用泵或其他给药装置的连续的或半连续的药物供应。通过所谓的缓释给药也是可能的,并且在本发明的范围之内。

[0086] 在另一种特定的实施方案中,肿瘤内的局部给药或与肿瘤相关的局部给药,可以用来使得活性成分的局部浓度相对较高。这种局部给药可以伴随着一种或多种系统给药(全身给药,systemic administration)。

[0087] 通常,通过使活性成分优选地与液体载体、或有时与细微分割的固体载体、或与其二者进行均匀且密切的结合来制备该制剂,然后,如果需要,使产品成形。

[0088] 适合于非肠道给药的制剂包括含水的或非水无菌注射溶液(其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和致使该制剂与目标接受者的血液等渗(isotonic)的溶质)、以及含水的或非水无菌悬浮液(其可包含悬浮剂及增稠剂)。该制剂可提供在单位剂量或多剂量的容器中,如密封的安瓿和小瓶中,并且可储藏于冷冻-干燥(冻干)的条件下,只需在使用前立即添加无菌的液体载体(例如用于注射的水)。

[0089] 特别地,对于本发明的非水溶性的共聚物,当注射药物时,除水介质之外,还可使用其他介质。这种介质的实例是聚乙二醇(PEG)。其他实例包括水包油或油包水乳液。可使用矿物油或其他的油质物,例如 Drakeol 6VR 或 Drakeol 5 (Penreco, 巴特勒(Butler), 国宾夕法尼亚(PA))作为乳液的油相。水相可以是磷酸盐缓冲生理盐水或其他生理盐水溶液。油与水的比例优选在大约 80:20 与 1:100 之间。

[0090] 适用于口服给药的制剂可作为胶囊、扁胶囊(cachet)或药片(各自包含预定量的作为粉末或微粒(granule)的活性成分)而存在;作为含水液体或非水液体中的溶液或悬浮液或乳液存在。适用于对皮肤局部给药的制剂可作为包括在药物可接受载体中给药的成分的软膏、乳剂(cream)、凝胶以及糊剂(paste)存在。用于直肠给药的制剂可作为栓剂存在,其具有合适的基本组分(base),包括例如可可油或水杨酸盐。适用于阴道给药的制剂可作为阴道栓剂、填塞剂(tampons)、乳剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂存在,除活性成分之外其还包含本领域已知的合适的载体。

[0091] 单位剂量制剂的实例是包含每日剂量或单位的、每日亚剂量的 (daily sub-dose) (如本文中以上所述)、或它们的适当比例的给药成分的那些。

[0092] 根据本发明可使用的最大允许剂量,除其他因素之外 (among others),取决于特定的两性嵌段共聚物的毒性、其抗癌作用 (即生长率抑制作用)、以及给药途径。可根据本文文件的实施例部分中所描述的毒性研究,评估两性共聚物的最大允许浓度。然后,使用本领域中已知的技术,从小鼠或一些动物中的这种毒性研究获得的结果与所估计的其他动物 (包括人) 的最大允许浓度相关联。例如可使用 Freireich 等 [17] 的剂量转换因子表。根据该转换因子表,建议从小鼠至人的转换因子为约 1/12,意味着如果小鼠中允许的最大聚合物浓度为 X%,那么人相应的估计的最大浓度为约 X/12%。

[0093] 例如,小鼠中的毒性研究已表明,可将约 30% w/w 的最大聚合物浓度安全地注射进小鼠中,而不产生任何副作用。那么对于人给药而言,这将对应于约 2.5% w/w 的浓度极限。上述列出的本发明的两性共聚物的一些 (包括 PLURONIC[®]) 进行了临床分期研究 (clinical phase studies) 和广泛的毒性试验。

[0094] 用于聚合物给药的浓度,可由本领域中的技术人员基于上述方法,非创造性地确定。期望聚合物的浓度达到 30% w/w,例如达 25、20、15 或 10% w/w,或达到 7.5% w/w,优选 0.001 至 5% w/w,更优选至少 0.01% w/w,例如至少 0.1% w/w 是适合的浓度。

[0095] 合适的浓度可以是得到低于 5% w/w,优选小于 2.5% w/w 并且尤其是小于 1% w/w 的平均血液浓度的那些浓度。优选的浓度范围为 0.0001% w/w 和 1% w/w 聚合物之间,例如大于 0.01% w/w,或大于 0.1% w/w。

[0096] 本发明还可用于动物对象,优选哺乳动物对象并且更优选人对象。

[0097] 本发明的活性共聚物可用来降低不同癌系和类型的肿瘤的生长率。本发明可应用于若干不同类型的癌症,包括,但不限于,人体肉瘤和肿瘤,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤 (Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管肺癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、魏尔姆瘤 (肾母细胞瘤, Wilm's tumor)、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞癌、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、血管母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、以及视网膜母细胞瘤、白血病,例如急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、和急性髓细胞性白血病 (成髓细胞性、前髓细胞性 (早幼粒细胞性)、粒单核细胞性、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病 (慢性髓细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤 (何杰金氏病 (Hodgkin's disease) 和非何杰金氏病 (non-Hodgkin's disease))、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症 (Waldenström's macroglobulinemia) 和重链病。

[0098] 本发明的药物组合物可包括本发明的两性嵌段共聚物中的一种。在可替换的实施方式中,该组合物包括至少两种本发明的两性嵌段共聚物的混合物。

[0099] 此外,本发明可用作其他的传统癌症治疗技术,例如放射治疗、化学疗法、激素治疗 (hormone treatment) 等的补充治疗,以对抗患者的癌症。

[0100] 本发明的聚合物可有利地连同其他的化学治疗药物来使用。在这种情况下,至少

一种这样的化学治疗药物可与至少一种本发明的两性共聚物同时给药或相继给药。

[0101] 可与本发明的共聚物一起使用的合适的化学治疗剂的实例包括：

[0102] 烷化剂，例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥（瘤可宁，chlorambucil）；

[0103] 抗代谢类药物，例如甲氨喋呤、咪唑硫嘌呤、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、氟达拉滨、喷司他丁、克拉屈滨、5- 氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷；

[0104] 蒽环类药物，例如柔红霉素（道诺霉素，daunorubicin）、阿霉素、表阿霉素（去甲氧柔红霉素，idarubicin）、米托蒽醌；

[0105] 长春碱类药物，例如长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、长春地辛；

[0106] 鬼臼毒素，例如依托泊苷、替尼泊苷；

[0107] 紫杉烷类，例如红豆杉醇、多西紫杉醇；以及

[0108] 拓扑异构酶抑制剂，例如伊立替康、拓扑替康、安吖啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷。

[0109] 关于本发明的两性共聚物的生长抑制作用的可能的理论遵循于本文。然而，本发明绝不局限于该理论。共聚物优选为水溶性的，以便使其可通过给药或在体外到达癌细胞，并与其相互作用。然后，共聚物的疏水部分可渗透到细胞膜中，并结合到其中。亲水部分避免了共聚物完全进入膜中。这意味着共聚物通常锚定在细胞表面上。一旦固定在膜中，共聚物则以不同的方式发挥其细胞生长抑制作用。

[0110] 两性共聚物可与生长因子结合，从而使其失活，或至少防止它们结合并活化癌细胞膜中的生长受体。在关于本发明的一种两性嵌段共聚物的试验中已经发现了这一点，该共聚物能够阻碍成纤维细胞生长因子 2 (FGF2, 也表示为碱性 FGF) 和血小板源生长因子 (PDGF) 与细胞膜上各自的受体相结合。

[0111] 另外，两性共聚物可阻断膜中的生长受体，并防止这些受体配对在一起，这对于向细胞提供信号 (forwarding a signal) 常常是必须的。

[0112] 另外，或可替换地，两性共聚物可结合生长受体，从而使其失活，或至少部分地阻碍它们从而防止生长因子结合并活化受体。

[0113] 以前，本发明中的某些两性嵌段共聚物已经连同抗肿瘤剂而被使用了。例如，已知 [18] 可使用所选的 **PLURONIC**[®] 聚合物和聚环氧乙烷的组合来降低抗肿瘤剂的毒性，并通过 i) 提高血流中药剂的稳定性、ii) 使药剂更加可溶或者 iii) 促进药剂穿过细胞膜的输送，来提高抗癌活性。并且已知 [19] **PLURONIC**[®] 嵌段共聚物影响着若干不同的耐药机制，包括抑制药物外排转运体 (drug efflux transporter)、消除酸性囊泡 (acidic vesicle) 中的药物隔离 (drug sequestration) 以及抑制古拉定 (glutathione)/ 谷胱甘肽 S- 转移酶解毒体系。所有这些耐药机制都依赖于能量，因此，在耐多种药物的癌细胞中由 **PLURONIC**[®] 嵌段共聚物引起的 ATP 损耗，被认为是通过蒽环类抗生素和 **PLURONIC**[®] 共聚物的组合给药能够实现化疗增敏作用的原因。

[0114] 然而，至今并未认识到，诸如 **PLURONIC**[®] 共聚物的两性嵌段共聚物本身以抑制癌细胞增殖和生长率的形式而具有抗癌作用。因此，还未能认识到：有效的抗癌药剂可包括本发明的两性嵌段共聚物，而不包括任何现有技术的化疗剂，并且在预防或治疗癌症中仍然是有效的。

[0115] 本发明的第一个方面涉及一种药物组合物,其包括本发明的两性嵌段共聚物,作为抗细胞增殖或抗细胞生长剂。这个方面还涉及本发明的两性嵌段共聚物在制备抗细胞增殖或抗细胞生长药剂中的应用。本发明还包括体外调节(即降低或甚至抑制)细胞(优选癌细胞)的增殖率或生长率的方法。该方法包括用两性嵌段共聚物与细胞(优选癌细胞)接触。该两性嵌段共聚物优选被添加在用于细胞的培养基中。另外的实施方式涉及体内调节(即降低)细胞(优选癌细胞)的增殖率或细胞生长率的方法。该方法包括将根据本发明的第一个方面的药物组合物给予对象,其中该对象为动物对象,优选哺乳动物对象且更优选人对象。

[0116] 本发明的第二个方面涉及一种药物组合物,其包括根据本发明的两性嵌段共聚物,作为用于治疗或预防癌症的化疗剂,条件是两性嵌段共聚物不是PLURONIC® F68(平均分子量为8400g/mol,平均环氧乙烷含量为 $81.8 \pm 1.9\%$,熔点为 52°C 并且 77°C 下的平均布鲁克菲尔德粘度(Brookfield viscosity)为1000cps且平均化学结构(average chemical structure)为 $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{80}-(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_{27}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{80}-\text{H}$)。另一种实施方式涉及作为化疗剂(活性抗癌剂)的两性嵌段共聚物在制备用于治疗或预防癌症的药剂中的应用,条件是嵌段共聚物不是PLURONIC® F68。这个方面还涉及治疗或预防对象,优选哺乳动物对象,更优选人对象中的癌症的方法。该方法包括将根据本发明的第二个方面的药物组合物给予对象。

[0117] 本发明的第三个方面涉及一种药物组合物,其包括根据本发明的两性嵌段共聚物,用于降低或抑制患有癌症的对象,优选哺乳动物对象且更优选人对象中的癌细胞的生长率。这个方面的实施方式涉及本发明的两性嵌段共聚物在制备用于抑制或降低患有癌症的对象中的癌细胞生长率的药物中的应用。该方面还涉及降低患有癌症的对象中的癌细胞生长率的方法,其中该方法包括将第三方面的药物组合物给予对象。

[0118] 本发明的第四个方面涉及一种药物组合物,其包括由式(IV)表示的两性嵌段共聚物:



[0120] 其中,m、n和p均为整数,优选为多个整数(multiple integers numbers),用于治疗或预防对象、优选哺乳动物对象且更优选人对象中的癌症,条件是癌症不是结肠癌或直肠癌。实施方案教导了由式(IV)表示的两性嵌段共聚物作为化疗剂在制备用于治疗或预防对象中癌症的药物中的应用,条件是所述癌症不是结肠癌或直肠癌。该方面还涉及通过将第四个方面的药物组合物给予对象来治疗或预防对象中不同于结肠癌及直肠癌的癌症的方法。

[0121] 本发明的第五个方面涉及一种阻碍生长因子与细胞的细胞膜上的生长因子受体相结合的方法,包括体外方法。该方法包括用根据本发明的两性嵌段共聚物与细胞相接触。

[0122] 实施例

[0123] 在实施方案中,使用了不同的两性嵌段共聚物。PLURONIC®和TETRONIC®聚合物从BASF公司获得。标记为DORVAL1的两性嵌段共聚物是PLURONIC®聚合物的变体,只是将中心环氧丙烷链换成相应的聚苯乙烯链。该嵌段共聚物从加拿大的PolymerSource公司订购。聚合物具有以下的示意性结构(schematic structure): $(\text{EO})_x-(\text{St})_y-(\text{EO})_x$,其中 $x \approx 70$,且 $y \approx 27$, M_n :

PEO(3100)-PSt(2800)-PEO(3100) 且 $M_w/M_n = 1.11$ 。

[0124] 乳腺癌细胞的生长率抑制作用

[0125] 检测了 **PLURONIC®F127** 对于体外培养的人乳腺癌细胞系的细胞生长的作用。通过掺入 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷来测定生长率。检验迅速生长的乳腺癌细胞系 MCF-7、以及较缓慢生长的乳腺癌细胞系 SK-BR-3。

[0126] 简言之,在补充有 10% FCS(胎牛血清)、胰岛素 (1mg/100ml) 和 1% 抗生素的 1.0ml 的 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 培养基中,将约 3×10^4 个细胞接种在 24-孔微量滴定板上,并过夜培养(潮湿空气, 5% CO_2 , 37°C)。在过夜培养之后,使用灭菌的巴斯德移液管通过真空吸引去除培养基,并且每孔用含 0.1% FCS 的 1.0ml RPMI 替换。在过夜培养之后,将补充有不同浓度(按重量计 0.01%、0.1%、0.3%、1% 和 2%) 的生长率调节性 **PLURONIC®F127** 和 / 或 10% 的 FCS 的 RPMI 添加至细胞 ($n = 3$) 中。在除了对照孔以及具有 1% 的 F127 的孔之外的所有孔中,还将添加 FCS。对孔培养约 15 小时。

[0127] 将 $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷 (Amersham-PharmaciaBiotech) 添加至每个孔中,并培养 4 小时。在标记期的末期,去除培养基,并将细胞用 PBS 漂洗两次,用冷冻 (4°C) 的 10% TCA(三氯乙酸) 固定 10 分钟。然后,去除 TCA,用 95% 乙醇清洗单细胞层,并在室温下风干 20 分钟。

[0128] 此后,将 1.0ml 的 0.2M NaOH 添加至每个孔中,为了溶解细胞至少在室温下培养 1 小时。在 5ml 闪烁管中,将 1.0ml 的各个孔内容物 (well-content) 稀释到 4ml 的高安全 II 级 (Higshafe II) 闪烁液中。在 β 计数器上测量放射性强度。

[0129] 如在图 1 和 2 中所看到的, **PLURONIC®F127** 明显降低了两种乳腺癌细胞系的生长。在迅速生长的癌症 (MCF-7) 中作用是最显著的,即 1% 的 **PLURONIC®F127**,使细胞增殖降低了大约 80%。在 SK-BR-3 中的作用同样很显著,使生长降低了大约 60%。

[0130] 添加生长刺激物 (growth stimulus) FCS 提高了 SK-BR-3 中的增殖却没有提高 MCF-7 中的增殖,可能是由于 MCF-7 本身已以最大速率进行增殖。在 SK-BR-3 中,相比于未刺激的细胞,在 FCS 刺激的细中 **PLURONIC®F127** 的作用得到了提高。

[0131] **PLURONIC®F127** 即使在最低的测试浓度 (0.01% w/w) 下,其作为增殖的抑制剂也是有效的。

[0132] 对刺激的平滑肌细胞的 DNA 合成抑制作用

[0133] 同样地,在来自人、大鼠和兔的血管平滑肌细胞中,体外进行了上述生长率实验。该实验证实,正如掺入胸腺嘧啶脱氧核苷而测量到的, **PLURONIC®F127** 以剂量依赖性方式抑制了来自人、大鼠和兔的生长-刺激的(存在 10% 的 FCS) 血管平滑肌细胞中的 DNA 合成。然而, **PLURONIC®F127** 不影响未刺激的肌细胞的生长率。

[0134] 简言之,对于较大的血管,将解剖的血管切开,用解剖刀将内皮刮掉。翻转血管,并进一步剥去外膜。对于较小的血管,通过用 0.1% 的 Triton X-100 冲洗血管内腔 10 秒而去除内皮,随后,使用 DMEM 培养基(达尔伯克改良伊格尔培养基, dulbecco' s ModifiedEagle' s Medium) 进行冲洗。

[0135] 将血管切割为较小的片,约 $1 \times 1\text{mm}$ 。将血管片转移至具有补充有 10% FCS 和 1% 抗生素的 DMEM 的细胞培养瓶中,培养 10 天。对于人细胞, DMEM 培养基还补充有 10% 的人血清 (NHS)。

[0136] 在细胞传代中,将余下的培养基用移液管移除,并丢弃。通过向瓶中添加 PBS(10ml/75cm² 瓶)漂洗细胞两次,同时注意不要破坏单细胞层。通过轻微地前后摇摆瓶,漂洗单细胞层。将 PBS 移除并丢弃。向瓶中添加胰蛋白酶 (3.5ml/75cm² 瓶),并轻微摇摆瓶以确保整个单细胞层由胰蛋白酶溶液所覆盖。

[0137] 瓶子被培养 3-5 分钟,直至细胞开始脱离 (detach)。每瓶中添加 3.5ml 10% 的 FCS,以“中和”胰蛋白酶,对溶液进行上下吸打 (pipette up and down),直至细胞分散至整个细胞悬浮液中。

[0138] 溶液以 300g 离心 5 分钟,将上清液移除并丢弃。将细胞团 (cell pellet) 溶解在 DMEM 中并转移至两个新的培养烧瓶中。

[0139] 然后,如对于上述两种乳腺癌细胞系一样,以相同的方式进行细胞生长率 (DNA 合成) 试验。

[0140] 图 3 说明了关于 PLURONIC[®] F127 对人血管平滑肌细胞的生长率调节作用的结果。可以看出,PLURONIC[®] F127 对于 FCS 刺激的肌细胞具有计量依赖性的增殖率抑制作用。从大鼠和兔血管平滑肌细胞中也获得了相当的结果。

[0141] 在比较性研究中,研究了 F127 以及其他 PLURONIC[®] 聚合物对于 FCS 刺激 (10%) 的平滑肌细胞的 DNA 合成抑制作用。结果在以下表 V 中列出,结果标准化为在补充有 10% FCS 的培养基中生长的对照细胞的 DNA 合成 (如使用上述基于胸腺嘧啶脱氧核苷的方法所测定的)。测试的细胞在补充有 10% FCS 和浓度为 10mg/ml、1mg/ml 或 0.1mg/ml 的共聚物的培养基中生长。在这些测试中,将对照细胞的 DNA 合成设定为 100%,将测试的物质表示为对照细胞的 DNA 合成的百分比。

[0142] 表 V-DNA 合成的抑制作用

[0143]

PLURONIC [®] 聚合物	相对于 10% FCS 细胞的标准化的 DNA 合成 (%)		
	10 mg/ml	1mg/ml	0.1mg/ml
L31	-39.0±6.8	3.4±6.8	91.5±4.1
F38	102.7±11.6	68.5±4.1	83.6±8.9
F68	131.8±6.8	93.2±6.8	97.7±5.7
F98	49.3±6.9	61.6±1.4	52.1±8.2
L121	47.7±2.3	95.5±0.9	127.3±11.4
P123	-9.6±1.6	68.0±8.0	108.8±5.6
F127	1.4±3.4	30.1±4.1	56.2±7.5

[0144] 这些试验证实了,PLURONIC[®] 聚合物可用于抑制 DNA 合成。试验还表明,PLURONIC[®] F68 似乎并不具有任何的这种抑制作用。在最高的测试浓度 (10mg/ml) 下,L31 具有杀死细胞的趋势。

[0145] 对刺激的平滑肌细胞的细胞生长抑制作用

[0146] 为了证实 DNA 合成的抑制是由于减少的细胞数目,即,增殖率的抑制,因此在 PLURONIC[®] F127 处理后使用比色法来测量细胞的数目。

[0147] 使用上述过程获得了来自大鼠主动脉的血管平滑肌细胞。将 200 μ l 补充有 10%

FCS 的 DMEM 中的 5000 个大鼠主动脉细胞接种在 CellTiter96™Aqueous 板 (Promega) 的每个孔中。对细胞培养约 1 天。培养基用移液管移除并丢弃,并且每孔用具有 0.1% FCS 的 200 μ l DMEM 进行替换。

[0148] 2 天后,将细胞 DMEM 培养基(阴性对照)、具有 10% FCS 的 DMEM 培养基(阳性对照)、具有 1%或 5%**PLURONIC**® F127 的 DMEM 培养基或具有 10% FCS 和 1%或 5% **PLURONIC**® F127 的 DMEM 培养基添加至不同的孔 ($n = 3$) 中,并根据 CellTiter96™ 非放射性细胞增殖 (Non-Radioactive Cell Proliferation)/细胞毒性检测 (Cytotoxicity Assay) 制造商的实验方案进行培育。

[0149] 然后,根据制造商的实验方案使用 PBS 将孔清洗三次,然后每个孔添加 20 μ l MTS 溶液。将板培育 1-4 小时,在 490nm 下测量吸收值。

[0150] 结果在图 4 中进行了说明。在图中可看出,比色法证实了使用上述 DNA 合成方法观察到的**PLURONIC**® F127 的细胞增殖率的抑制作用。**PLURONIC**® F127 抑制了 FCS 的生长刺激作用,但对于未刺激的细胞不具有任何作用。

[0151] 细胞介导的细胞毒性

[0152] 为了确定**PLURONIC**® F127 的细胞增殖抑制作用是否是由于共聚物对细胞的任何毒性作用,实施了细胞介导的细胞毒性测试,其中使**PLURONIC**® F127 的细胞毒性与 1%的 Triton X-100、PEG1000 以及另一种**PLURONIC**®聚合物 P123 进行比较。

[0153] 使用不同浓度的**PLURONIC**® F127、1% Triton X-100、1% PEG1000 和 1% **PLURONIC**® P123,使用来自 Promega 的 CellTiter96™ 非辐射细胞增殖/细胞毒性检测来进行上述过程。图 5 说明了不同浓度的**PLURONIC**® F127 的细胞毒性,其表示为 Triton X-100 的细胞毒性的百分比。**PLURONIC**® F127 即使在 5%的最高测试浓度下也未表现出细胞毒性。然而,另外测试的**PLURONIC**®聚合物 P123 表现出相比之下显著较高的细胞毒性。

[0154] 两性嵌段共聚物的比较研究

[0155] 除**PLURONIC**® F127 之外,还对其它的两性嵌段共聚物,包括来自 BASF 公司的 **PLURONIC**® F38、F68、F87、F98、P105、F108、和**TETRONIC**® T908、T1307,以及来自 Polymer Source Inc. 的 DORVAL1 对刺激的 (10% FCS) 人血管平滑肌细胞的生长率的抑制作用进行了测试。

[0156] 如同以上描述的以及在图 3 中说明的基于胸腺嘧啶脱氧核苷的 DNA 合成实验,以相同的方式进行实验,不同的是每种嵌段共聚物测试三个浓度 1%、0.1%和 0.01% w/w。

[0157] 图 6 中示出了生长率抑制的结果,其中,将生长率相对于测定的最高细胞生长率 (T908 且为 0.01% w/w) 而被标准化。

[0158] 从图中可看出,具有最高的亲水性含量(约 80%)的共聚物,即, F38、F68、F108 以及 T908,对于 FCS 刺激的平滑肌细胞表现出最小的细胞生长抑制作用。共聚物 F87 与 F127 具有相似的作用,而在目前的试验设置下, P105 获得了最大的抑制作用。

[0159] 结合试验

[0160] 进行测试试验,以确定**PLURONIC**® F127 的生长率抑制作用是否是通过阻碍不同的生长因子与大鼠主动脉平滑肌细胞上各自的受体结合而介导的。

[0161] 如前所述制备的大鼠主动脉细胞添加到培养基 (+10% FCS) 中, 以每孔约 5000 个细胞的浓度置于 24 孔微量滴定板的孔中。对板进行过夜培养, 以使得细胞形成一层孔底物。然后, 用补充有 0.1% FCS 的培养基取代培养基, 并培养 2 天。

[0162] 然后, 去除培养基, 用 PBS 清洗孔两次。然后添加具有不同浓度的 **PLURONIC**[®] F127 (2、1、0.1、0.01、0.001 和 0.0001 % w/w) 的 150 μ l NaCl 溶液, 以及稀释在缓冲溶液 (0.237M NaCl、0.0054MKCl、0.00044M KH_2PO_4 、0.00126M CaCl_2 、0.00018M MgSO_4 、0.020M HEPES 和 0.3% BSA) 中的 1 μ l ^{125}I -FGF2 (放射性标记的成纤维细胞生长因子 2) 或 1 μ l ^{125}I -PDGF (血小板源生长因子), 在 37°C 下培养 30 分钟。然后使用 PBS (磷酸盐缓冲液; 每 1000ml 蒸馏水中含有 0.2g KCl、0.2g KH_2PO_4 、1.35g Na_2HPO_4 和 8.0g NaCl) 清洗孔 5 次。然后, 每孔中添加 1ml 0.2M 的 NaOH, 并将板置于冰箱中过夜。然后, 通过传统的 γ 测量来测定放射性标记的生长因子的结合量。

[0163] 可得出结论, **PLURONIC**[®] 以一种剂量依赖性的方式阻碍这两种生长因子与细胞上它们各自的受体相结合。另外, 如图 7 中所说明的, 用于生长抑制作用所需的 F127 的浓度与用于 FGF2 结合的抑制所需的 F127 的浓度之间具有非常高的相关性。图 8 说明了 F127 聚合物对于放射性标记的 PGGF 的相应的结合的阻碍作用。因此, 对该生长因子与细胞膜中受体的结合的阻碍, 可能是本发明的两性嵌段共聚物的生长率抑制机制中的至少一种机制。

[0164] 小鼠中的毒性研究

[0165] 进行实验以研究在小鼠中静脉给药之后, **PLURONIC**[®] P105 是否产生毒性反应。

[0166] 将 10 只 NMRI 白化病小鼠 (达到重约 25g 时) 用于该实验。该动物从 Scanbur BK 获得, 并在研究开始前一周使其状态良好。无限制地向动物提供食物和水。

[0167] 将活性物质 **PLURONIC**[®] P105 分别以共聚物重量计为 10% 和 50% 的的两种本体溶液提供, 10% 的溶液是在 NaCl (9mg/l) 中而 50% 的溶液是在 NaCl (9mg/l) 和 PEG 中。

[0168] 将动物分成五组, 并在尾部静脉进行静脉注射处理, 每天一次, 进行 5 天。所有组的注射体积为 150 μ l。该注射在 10 秒内进行。

[0169] 组 1 : 50% **PLURONIC**[®] P105 (n = 2)

[0170] 组 2 : 40% **PLURONIC**[®] P105 (n = 2)

[0171] 组 3 : 30% **PLURONIC**[®] P105 (n = 2)

[0172] 组 4 : 20% **PLURONIC**[®] P105 (n = 2)

[0173] 组 5 : 10% **PLURONIC**[®] P105 (n = 2)

[0174] 在第一次给药之前以及在第 6 天时, 记录体重。在给予测试物质之后的 0-30 分钟内, 以及在第 1、2、3、4、8、24、48 和 72 小时观察动物的毒性临床体征 (毛皮质量、流涎、流泪、腹泻、呼吸、运动障碍、情感淡漠、震颤、惊厥和昏迷)。

[0175] 对用 10% **PLURONIC**[®] P105 处理的两只小鼠和用 50% **PLURONIC**[®] P105 处理的两只小鼠进行探索性研究。发现用最低 P105 浓度处理的动物对于重复处理具有良好的耐受性, 但用 50% P105 处理的那些小鼠则在第二次注射时就表现出水肿和溶血的尾部。另外, 这两个动物表现为减少的运动行为, 并随后在处理开始后的第三天施以安乐死。在这一点上, 决定用生理盐水将 50% 的制剂稀释至 40%、30% 和 20% 来处理 6 只小鼠。

[0176] 用 40% P105 处理的动物在第 2 天表现出尾部的轻微溶血变色,这在治疗期间持续存在。观察到一定的浮肿。这些动物还表现出体重增加的下降,见表 VI。

[0177] 发现注射有 20%和 30%稀释物的动物对于处理具有良好的耐受性。

[0178] 表 VI- 小鼠的体重增加

[0179]

PLURONIC® P105 浓度	第 6 天的平均体重增加 (g)
40%	0.1
30%	7.2
20%	14.9
10%	6.1

[0180] 中空纤维植入测试

[0181] 进行测试,以研究 PLURONIC® P105 是否抑制小鼠中的中空纤维模型中的肿瘤细胞的生长。

[0182] 将 18 只 NMRI 白化病雄性小鼠 (达到重约 25g 时) 用于该实验。该动物从 Scanbur BK 获得,并在研究开始前一周使其状态良好。无限制地向动物提供食物和水。

[0183] 在乌普萨拉大学医院 (Uppsala University Hospital), 临床药理研究室 (Department of Clinical Pharmacology) 进行纤维的填充。纤维负载以下肿瘤细胞:黄色纤维负载 U936/gtb 而蓝色纤维负载 H69。

[0184] 在剃毛和消毒后,在异氟醚麻醉 (isofluran anesthesia) 下,在动物的背部上形成小的皮肤切口。将三种纤维,两个黄色一个蓝色,以随机的方式进行皮下植入并使用皮钉 (staple) 将皮肤切口闭合。

[0185] 将动物分成三组,在植入后立即开始在尾部静脉进行如下的静脉内处理,每天一次,进行 5 天:

[0186] 组 1:稀释在 NaCl 中的 10% PLURONIC® P105 (n = 6)

[0187] 组 2:稀释在 PEG 和 NaCl 中的 25% PLURONIC® P105 (n = 6)

[0188] 组 3:赋形剂 (n = 6)

[0189] 在第一次给药之前和安乐死之前记录体重。每天检查动物的食物摄取、活动等改变的迹象,作为一般健康状况改变的迹象。在纤维植入后的第 6 天,用异氟醚将动物麻痹,从眼眶静脉丛 (orbitalplexus) 采集大约 250 μ l 血,用于血液学研究分析。此后,通过颈椎骨折脱位术对动物施以安乐死,并在评估细胞密度和生命力 (viability) 之前将纤维取出且置于细胞培养基中 (37°C)。

[0190] 在惠普 Compac dx2000 计算机上,在 Windows XP 系统下,使用 Graph Pad Prism version4 (Graph Pad 软件公司,圣地亚哥,美国) 来进行统计学评估。通过使用借助于 Tukey 氏多重比较检验的单因素方差分析 (One-way ANOVA),在统计学上检验处理组之间的血液学参数的差异。使用配对 t- 检验,在统计学上检测处理前后的重量差异。

[0191] 任何动物中,均不存在健康状况变化的明显迹象。在处理前后,关于重量,组内不存在统计学上的显著差异。

[0192] 在血液学参数 RBs (p = 0.0127, 组 1 对组 3 以及组 2 对组 3)、HGB (p = 0.021, 组

1 对组 3 以及组 2 对组 3) 和 PLT ($p = 0.0006$, 组 1 对组 3 以及组 2 对组 3) 中, 发现各组之间存在统计学上的显著差异, 见表 VII。

[0193] 表 VII- 血液学参数

[0194]

组	WBC($10^9/l$)	RBC($10^{12}/l$)	HGB(g/l)	HCT (l/l)	PLT($10^9/l$)
1	9.6±1.1	7.87±0.56	132.8±8.9	0.460±0.144	1014.0±103.5
2	7.6±1.6	7.94±0.47	134.7±6.1	0.403±0.021	947.0±61.6
3	8.9±1.6	8.65±0.15	148.2±3.8	0.439±0.015	744.7±107.0

[0195] 与对照相比, 在用高剂量的 PLURONIC® P105 处理的含 U937/gtb 的纤维中, 纤维中细胞密度明显降低 ($p < 0.05$)。对于植入到用低剂量 P105 处理的动物中的细胞, 也观察到相似的趋势, 见图 9。对于用共聚物处理的动物中的 H69 细胞系, 也观察到倾向于较低的平均细胞密度值的趋势, 见图 10。

[0196] 共聚物的细胞毒活性的体外评价

[0197] 当前的研究目的是研究不同的 PLURONIC® 和 TERTRONIC® 共聚物的细胞毒活性。作为模型系统, 使用明确限定的具有 10 个选定的人肿瘤细胞系的组以及另外一种前列腺癌细胞系的一组研究对象。在所有细胞系中对在敏感性淋巴瘤细胞系 U937/gtb 中筛选出来的三种化合物进行研究。

[0198] 在本研究中使用的模型系统是具有 10 个人肿瘤细胞系的细胞系研究组 (cell line panel) [3]。这个概念起源于美国的国家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI), 其中通常使用具有大约 60 个不同细胞系 (代表大多数的人癌症形式) 的细胞系研究组, 以限定一种新的化合物的活性分布 (activity profile) [4]。通过使用相关分析, 细胞系研究组能够成功地对药剂进行分类, 如关于特定的机理分组 (例如抗代谢物、烷化剂 (alkylators)、拓扑异构酶 II 抑制剂) [5]。早先已经表明, 较为有限数目 (10) 的代表限定种类的抗细胞毒药物的人肿瘤细胞系可成功地用于抗癌剂的初始评估和初步的机理分类 [6]。

[0199] 肿瘤细胞可获得对细胞毒药物的耐药性, 且已知的耐药性机理的实例为 P- 糖蛋白 (Pgp) 和多药耐药性相关的蛋白 (MRP)、提高了的细胞解毒系统的活性、核靶标酶 (nuclear target enzymes) 如拓扑异构酶 II (topoII) 的功能改变, 以及改变的微管蛋白结合 / 功能和药物的亚细胞再分配。所用的细胞系研究组包括表达这些表现型中的一些的细胞系 [3]。

[0200] 药物外排泵, 例如 Pgp 和 MRP, 对底物表现出较低的特异性, 因此导致对各种药物 (例如, 长春花生物碱、蒽环类、紫杉烷类、表鬼臼毒素 (epipodophyllotoxine) 和其他药物) 的敏感性降低 [7]。

[0201] 人肿瘤细胞的原代培养物 (primary culture) 是一种可替换的模型系统, 在新药物筛选和开发的情况下, 其受到相对较少的关注。然而, 已经表明, 对来自不同肿瘤的原代培养物进行的体外分析与临床肿瘤类型的比活性 (specific activity) 具有良好的相关性 [8]。

[0202] 组合不同的细胞毒药物并制造出包括可提高药物吸收或药物作用 (药物效应,

drug effect) 的药物制品,是癌症化学疗法中正在发展的领域。已经提出了多种实施和解释关于药物相互作用的临床前研究的方法。当在固定浓度下,能够获得来自单剂 (single agent) 和它们组合的数据时,通常使用“乘法概念”(加成性模型 (additive model))。这里,将加成性相互作用定义为两种药物的组合,其导致存活分数 (surviving fraction) 等于单剂存活分数的乘积,其示出了药物的独立作用 [9]。如果组合的作用超过加成性效应 (additive effect),则相互作用是协同的。

[0203] 为了评估药物的作用模式 (activity pattern),使用了具有 4 个敏感性亲代细胞系、代表不同耐药机理的 5 个耐药性亚系、以及 1 个具有原 (药) 耐药性的细胞系的人细胞系研究组。包括的细胞系为骨髓瘤细胞系 RPMI 8226/S 及其亚系 8226/Dox40 和 8226/LR-5 (由亚利桑那 (AZ) 图森 (Tucson) 亚利桑那大学 (University of Arizona) 亚利桑那癌症中心 (Arizona Cancer Center) 医学部 (Dept of Medicine) 的 W. S. Dalton 馈赠)、淋巴瘤细胞系 U-937/gtb 和 U-937-Vcr (由瑞典乌普萨拉大学 (University of Uppsala) 病理学系 (Dept of Pathology), 的 K. Nilsson 馈赠)、SCLC 细胞系 NCI-H69 及其亚系 H69AR (美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Center) ; ATCC, 罗克维尔 (Rockville), 马里兰州 (MD))、肾腺癌细胞系 ACHN (ATCC) 和白血病细胞株 CCRF-CEM 及其亚系 CEM/VM-1 (由田纳西州 (TN) 孟菲斯 (Memphis) 田纳西州大学 (College of Medicine) 医学院 (College of Medicine) 药理学系 (Dept of Pharmacology) 的 W. T. Beck 馈赠)。

[0204] 选择 8226/Dox40 用于阿霉素耐药,并且表现出具有过量表达的 P-糖蛋白 170 (Pgp) 的典型 MDR 表型 [10]。选择 8226/LR-5 用于苯丙酸氮芥耐药,并提出其与 GSH 的水平提高相关 [11]。选择 U-937-Vcr 用于长春新碱耐药,并提出其与微管蛋白相关 [12]。选择 H69AR 用于阿霉素耐药,表达 MDR 表型,并提出其由 MRP 所介导 [13]。选择 CEM/VM-1 用于替尼泊苷耐药,表现出非典型的 MDR,提出其与拓扑异构酶 II (topoII) 相关 [14]。对于原 (药) 耐药性 ACHN 细胞系的准确的耐药机理还是未知的并且可能是多因素的 [15]。

[0205] 细胞系生长在完全的培养基 (以下描述为在 37°C 下,在含有 5% 的 CO₂ 的潮湿气氛中)。每月用 0.24 μg/ml 的阿霉素处理一次 8226/Dox40,并且每次更换培养基时用 1.53 μg/ml 的苯丙酸氮芥处理 8226/LR-5。在 10ng/ml 长春新碱的存在下连续培养 U-937-Vcr,用不含药物的培养基和含有 0.46 μg/ml 阿霉素的培养基交替性地供给 H69AR。CEM/VM-1 细胞系在不含药物的培养基中培养,在 6-8 个月一段时期内没有任何耐药性的损失。在对照实验中,常规性地证实细胞系的耐药模式。

[0206] 从美国典型培养物保藏中心 (罗克维尔 (Rockville), 马里兰州 (MD)) 获得人前列腺癌 PC-3 细胞。其在补充有 10% 胎牛血清、青霉素 G 和链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基 (dulbecco' s Modified Eagle' s Medium) 中进行培养。

[0207] 表 VIII- 人肿瘤细胞系

[0208]

细胞系	来源	选择剂 (selecting agent)	相关抗性
CCRF-CEM	白血病		
CEM/VM-1	白血病	替尼泊苷	拓扑异构酶 II
ACHN	肾癌		原发抗性
NCI-H69	小细胞肺癌		
H69AR	小细胞肺癌	阿霉素	MRP
RPMI 8226/S	骨髓瘤		
8226/dox40	骨髓瘤	阿霉素	Pgp
8226/LR5	骨髓瘤	苯丙氨酸氮芥	谷胱甘肽
U-937 GTP	淋巴瘤		
U-937-vcv	淋巴瘤	长春新碱	微管蛋白
PC-3	前列腺癌		

[0209] 对细胞系始终使用完全培养基,其由补充有 10 % 失活的 FCS、2mM 谷氨酰胺、50 μ g/ml 链霉素和 60 μ g/ml 青霉素的碳酸盐缓冲培养基 RPMI-1640 (HyClone, Cramlington, UK) 构成。将 FDA (Sigma, St Louis, MO) 溶解在 DMSO 中,并且作为储存溶液避光冷藏 (-20°C)。

[0210] 根据以下的表 IX 是溶解的测试化合物。

[0211] 表 IX- 测试物质

[0212]

共聚物	剂量 (g)	PEG (g)	NaCl (9mg/l) (g)	95%EtOH (g)
L31	0.6	1.0		0.2
L121	0.6	1.0		0.2
F38	0.6		1.0	0.2
F127	5		4	1
F68	5		4	1
T1307	0.6	1.0		0.2
P105	0.6		1.2	
P84	0.6	1.0		0.2
F87	0.6		1.0	0.2
P123	0.6	1.0		0.2
F88	0.6	1.0		0.2

[0213] 初步筛选 (primary screening) 的主要部分是关于仅溶解在氯化钠和乙醇中的第一批物质 (F127 和 F68) 而进行的。在一些实验中,比较溶解在 NaCl 和乙醇中的共聚物和溶解在 PEG 和乙醇中的共聚物之间的活性,在效力上不存在显著差异。为了简化,假定所有标准药剂瓶中的测试物质的浓度为 50 % w/w。使用磷酸盐缓冲液 (PBS; Sigma Aldrich) 对其进行进一步的稀释,使溶液澄清。

[0214] 以约 20000 细胞 / 孔的细胞密度,将肿瘤细胞接种在准备有药物的 96- 孔板中。

[0215] 如前面详细描述 [16],使用微培养细胞毒荧光分析 (FMCA),其基于对具有完整胞质膜的细胞通过将 FDA 水解为荧光素而产生的荧光的测量。该板在 37℃ 下,在含有 5% 的 CO₂ 的潮湿气氛中培养 72 小时。在培养阶段的末期,对板进行离心 (1000rpm, 5 分钟),并通过抽吸将培养基移除。用 PBS 清洗一次后,溶解在生理缓冲液 (10 μg/ml) 中的 FDA 以 100 μg/ 孔添加。将板培养 45 分钟,在 96- 孔扫描荧光计 scanning fluorometer (Fluoroscan II, Labsystem Oy, 赫尔辛基 (Helsinki), 芬兰) 测量每个孔中产生的荧光。该荧光与孔中完整细胞的数目是成比例的。

[0216] 用于成功分析的质量标准 (quality criteria) 包括,对照孔中的荧光信号大于平均空白值的 5 倍,对照孔中的平均变异系数 (CV) 小于 30%,并且在培养前细胞制备物中的肿瘤细胞大于 70%。实验进行两次,整个过程中使用平均值。

[0217] 细胞存活表示为存活指数 (SI),定义为实验孔中的荧光占对照孔中的荧光的百分比,其中扣除空白孔中的值。所有的细胞系实验均进行两次,且所有的数据均包含在该分析中。

[0218] 将来自细胞系研究组实验的数据与包含来自多于 150 种不同化合物 (包括最常用的细胞毒素剂) 的数据的数据库进行比较。处于此目的,针对每一种药物和细胞系,使用简单的对数线性回归来计算 IC₅₀,其定义为导致 50% 存活指数的药物浓度。使用皮尔逊 (Pearson's) 相关系数,将对于每一种药物的 10 个 IC₅₀ 值的集合与来自数据库中的所有其他药物的相应数据集进行关联。使用 Delta,通过这些 IC₅₀ 来显示出作用模式,其定义为一个细胞系的 logIC₅₀ 与细胞系研究组中的平均 logIC₅₀ 的偏离。根据 Dhar 等 [3] 来进行这些计算,并由国家癌症研究所 (www. dtp. nci. nih. gov) 使用的方法进行修改。

[0219] 使用 GraphPad Prism 软件 (加利福尼亚,圣地亚哥,GraphPadSoftware 公司) 中的非线性回归,将来自两个细胞系研究组的浓度 - 效应数据拟和成 (fit to) 具有可变斜率的 S 曲线计量反应方程 (sigmoidal dose-response equation)。分别将 0% 和 100% 的细胞存活设定为最大效应 (maximum effect) 和基线 (baseline),通过曲线拟合,预测 EC₅₀ (表现出 50% 效应的浓度)。计算细胞系对 (cell linepairs) 中的耐药细胞系和亲代细胞系的 EC₅₀ 之间的比值作为耐药因子 [3]。

[0220] 在 -70℃ 下,化合物在微量滴定板中存储 4 周后仍保持其细胞毒活性。使用已经存储 4 周的板和使用新准备的板 (未示出),浓度效应曲线是相似的。

[0221] 图 11 示出了 U937/gtb 中所有测试化合物的浓度 - 效应曲线。在图 12A 至 12O 中分别描述了各个测试化合物。在以下表 X 中示出了 IC₅₀ 值。当比较溶解在 NaCl/EtOH 中和 PEG/NaCl/EtOH 中的样品时,获得了相似的结果 (未示出)。

[0222] 表 X- 共聚物的 IC₅₀ 值

[0223]

共聚物	IC ₅₀ (%w/w)
L31	0.042
T1307	0.0085
F38	0.35
P84	0.045
P105	0.053
L121*	0.0029
F68	1.7
F127	0.0037
F87	0.094
P123	0.0067
F88	0.13

[0224] 通过在 PBS 中稀释来沉淀 *L121, 以产生乳状悬浮液, 认为其对于测试是足够均质的。

[0225] 结果再一次证实, 具有约 80% 的平均亲水含量的 **PLURONIC®** 共聚物目前具有最低的抗癌作用。针对从表 XI 中选择的三种最有效的共聚物, 将所有细胞系的 EC₅₀ 列在表 XI 中。图 13A 至 13C 是这些结果的图示。

[0226] 表 XI- 细胞系研究组中的 EC₅₀ 活性

[0227]

细胞系	F127 (%w/w)	P84 (%w/w)	L121 (%w/w)
CCRF-CEM	>1	0.022	0.0018
CEM/VM-1	>1	0.0020	0.0020
ACHN	0.0095	0.00091*	0.0019
NCI-H69	>1	0.0018	0.00061*
H69AR	0.0028	0.00003*	<<0.0016*
RPMI 8226/S	0.017	0.00075*	<<0.0016*
8226/dox40	0.078	0.0014	<<0.0016*
8226/LR5	0.024	0.0015	0.00012*
U-937 GTP	0.0011	0.0012	0.00012*
U-937-vcv	0.0032	0.0011	0.00012*
PC-3	0.027	0.00076*	<<0.0016*

[0228] 近似值, 不能曲线拟合。

[0229] 降至 0.0016% w/w 的最小浓度对物质进行测试。低于此的 EC₅₀ 值是来自允许曲线外推的线性回归分析的估测。当曲线拟合不充分, 且大多数细胞在最低浓度下死亡时, 则使用 EC₅₀<<0.0016。

[0230] 本领域的技术人员应理解, 在不背离由所附权利要求限定的本发明范围的情况

下,可以对本发明进行各种修改和变化。

[0231] 参考文献

[0232] US 2001/0051659 A1

[0233] Silk et al., Cancer 1972, 29, 171-172

[0234] Dhar et al., Br J Cancer 1996, 74, 888-896

[0235] Alley et al., Cancer Res 1988, 48, 589-601

[0236] Paull et al., J Natl Cancer Inst 1989, 81, 1088-1092

[0237] Dhar et al., Eur J Pharmacol 1998, 346, 315-322

[0238] Fisher et al., Eur J Cancer 1996, 32A, 1082-1088

[0239] Fridborg et al., Eur J Cancer 1999, 35, 424-432

[0240] Valeriote et al., Cancer Chemother Rep 1975, 59, 895-900

[0241] Dalton et al., Cancer Res 1986, 46, 5125-5130

[0242] Bellamy et al., Cancer Res 1991, 51, 995-1002

[0243] Botling et al., Int J Cancer 1994, 58, 269-274

[0244] Cole et al., Science 1992, 258, 1650-1654

[0245] Danks et al., Biochemistry 1988, 27, 8861-8869

[0246] Nygren et al., Biosci Rep 1990, 10, 231-237

[0247] Larsson et al., Int J Cancer 1992, 50, 177-185

[0248] Freireich et al., Cancer Chemother Rep 1966, 50, 219-244

[0249] W098/07434

[0250] Kabanov et al., Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54, 759-779

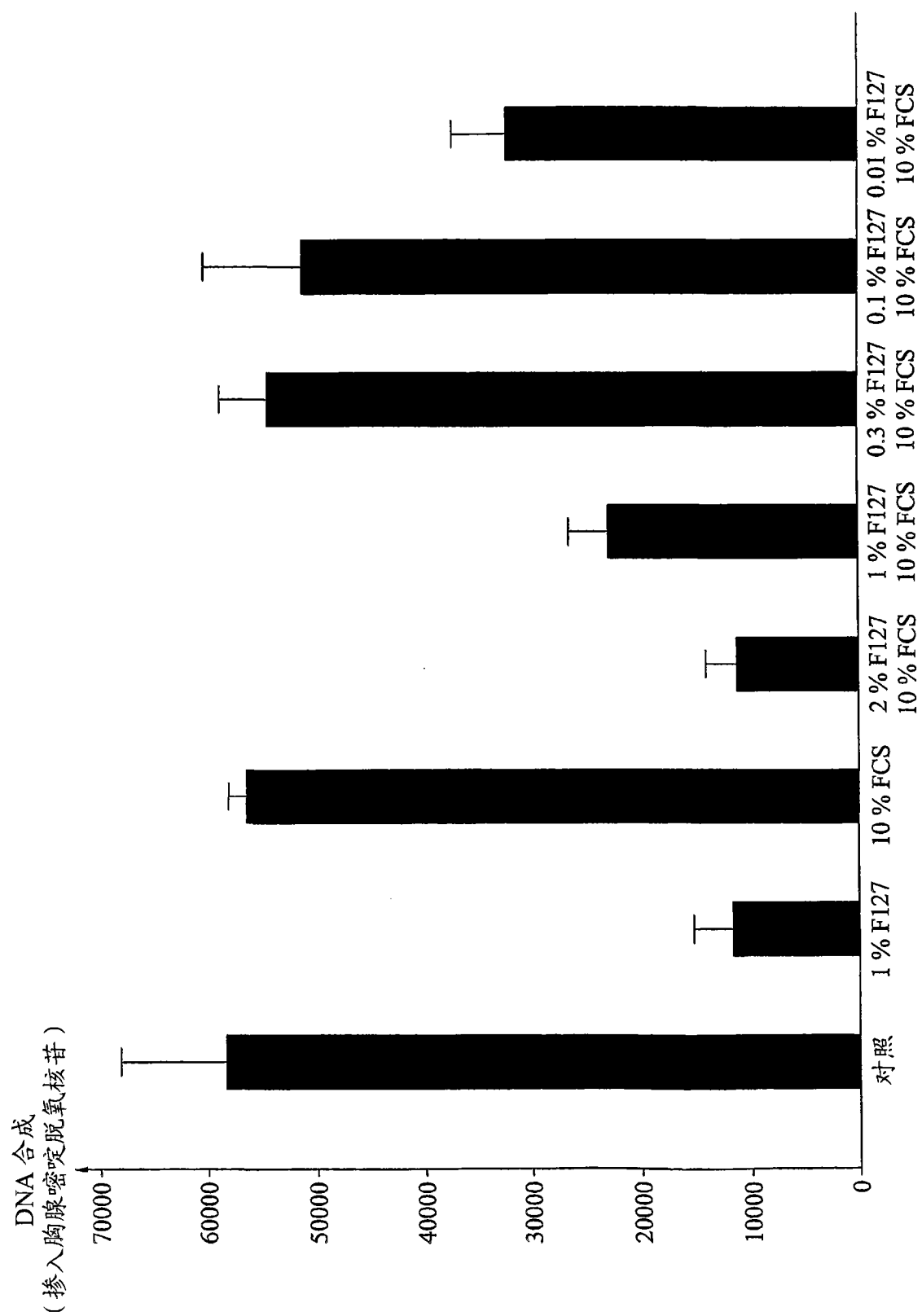


图 1

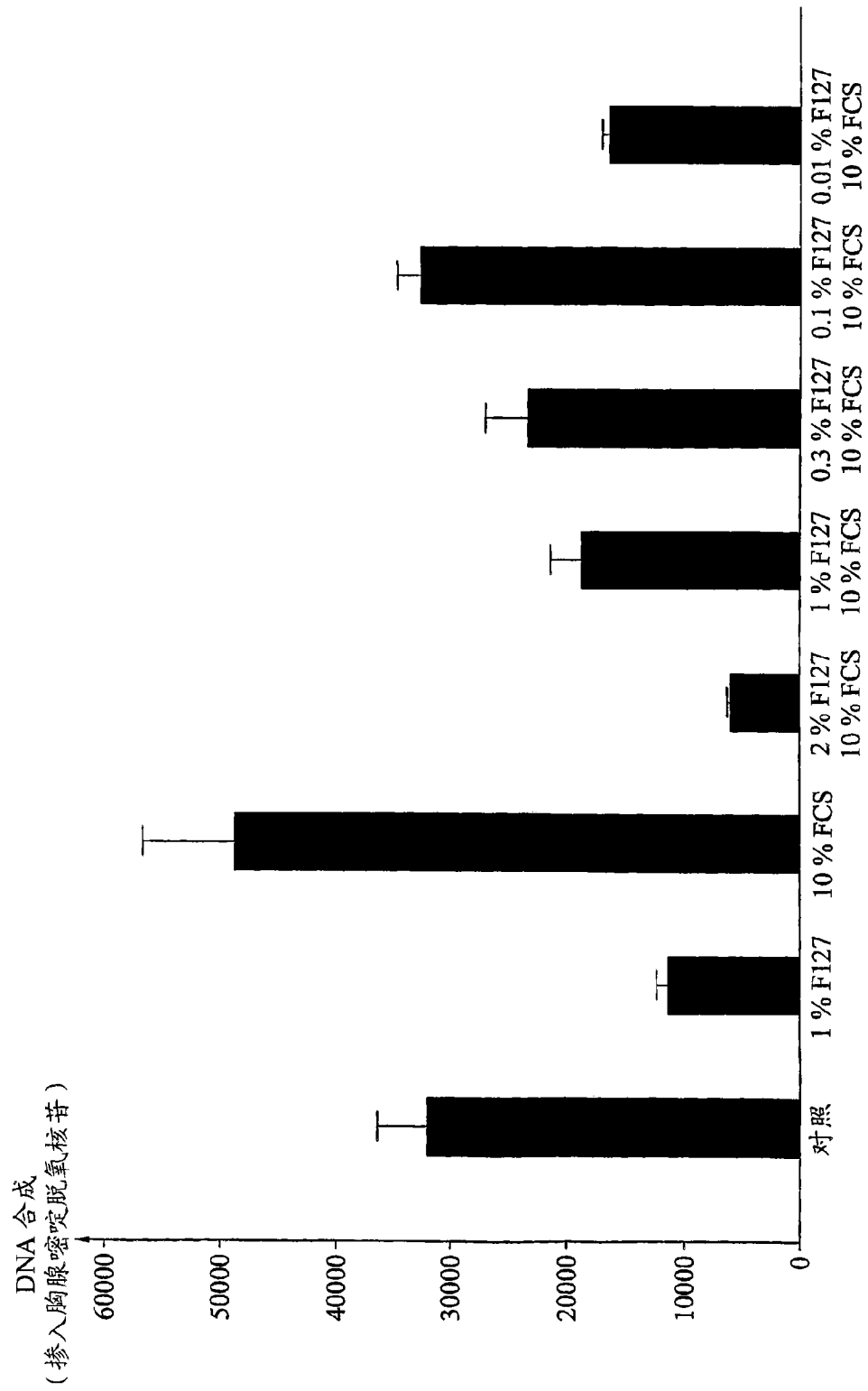


图 2

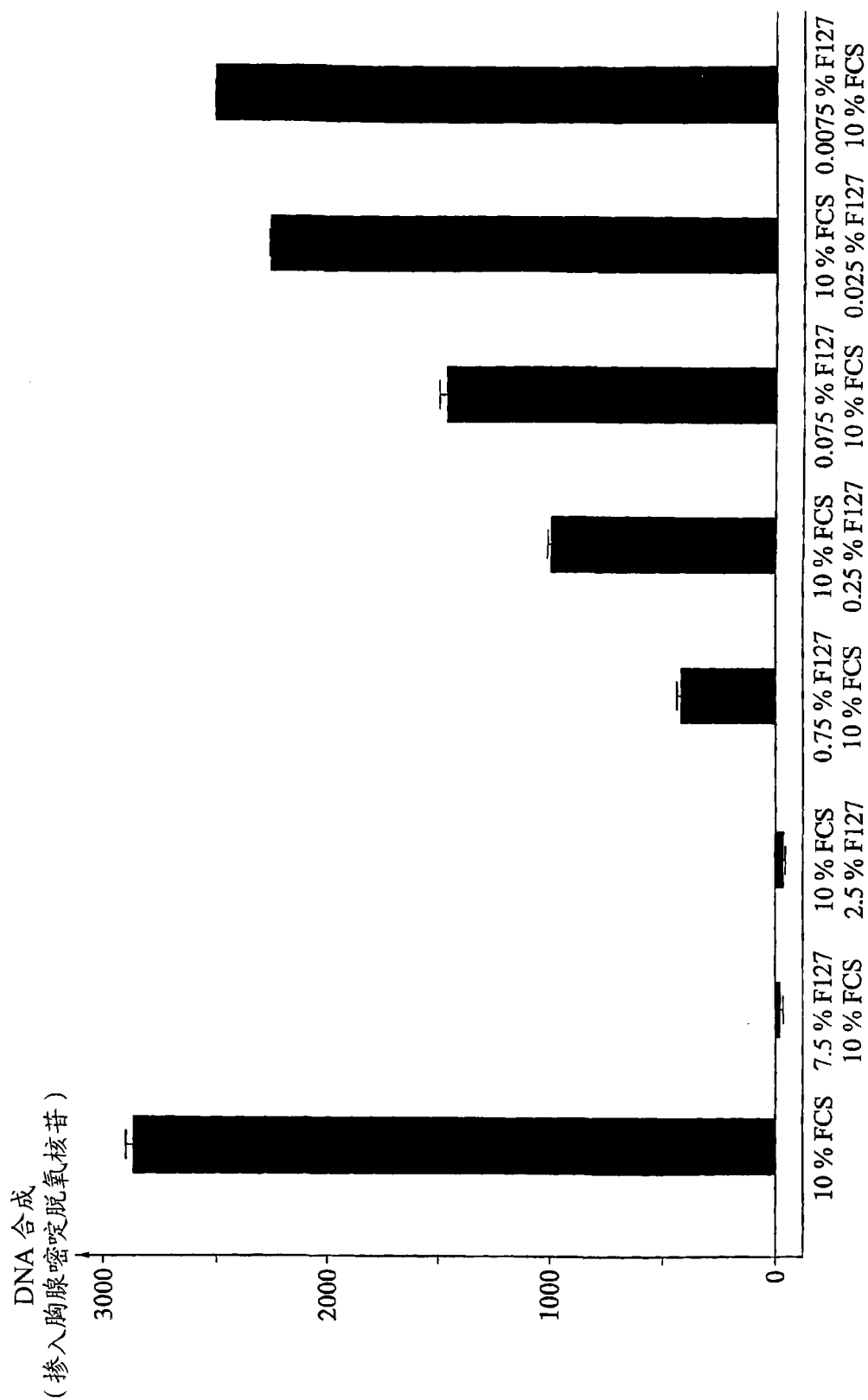


图 3

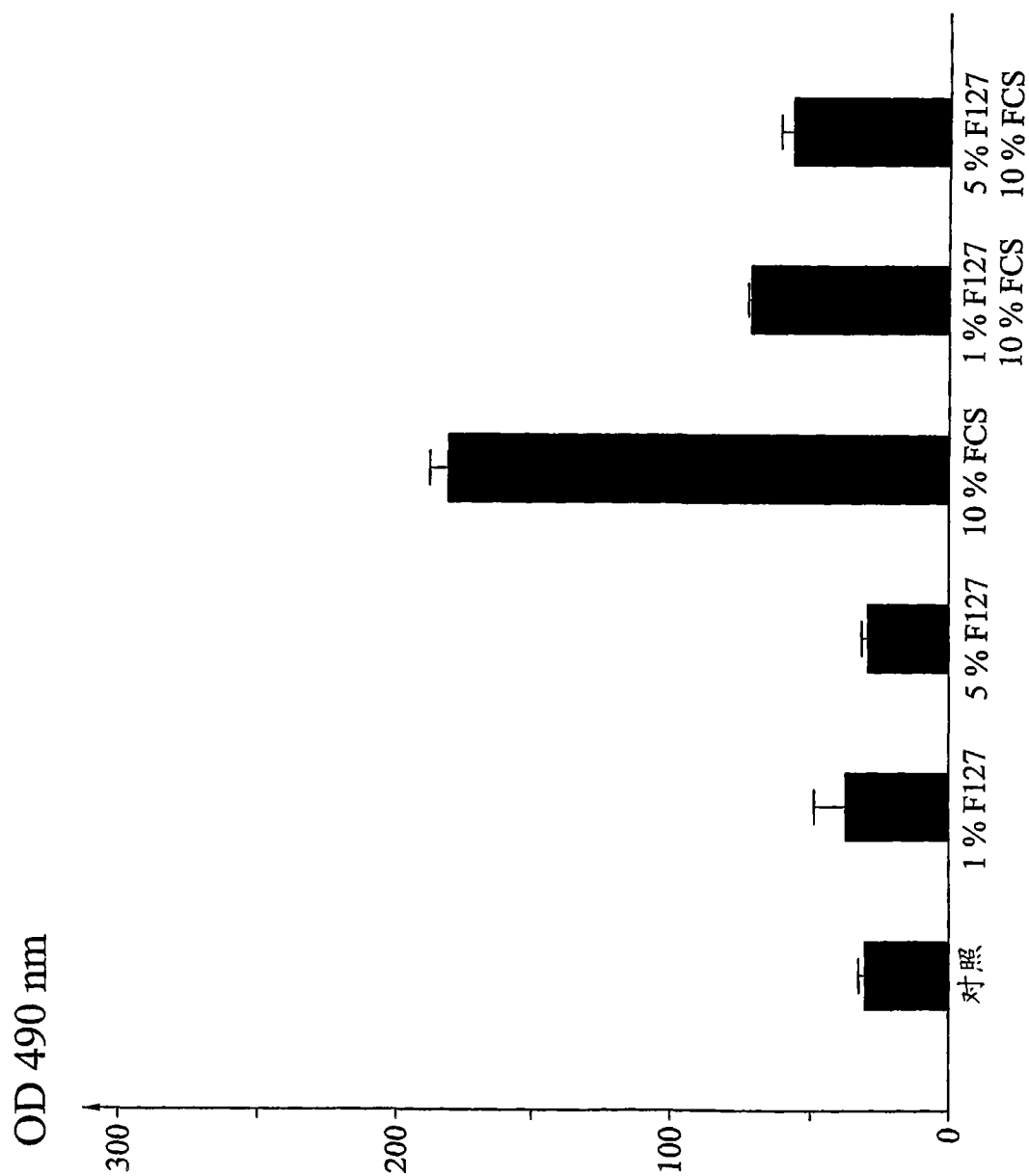


图 4

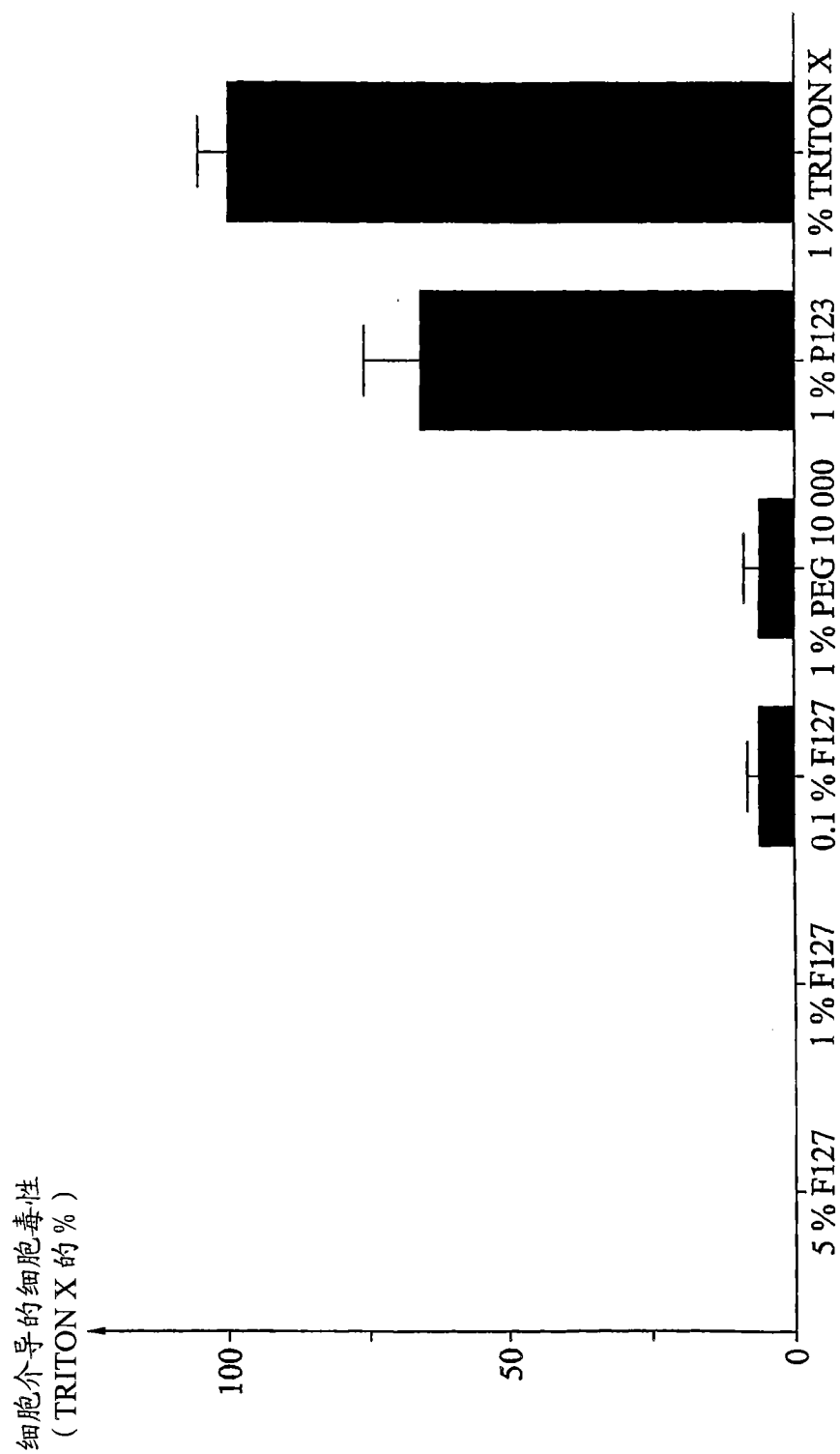


图 5

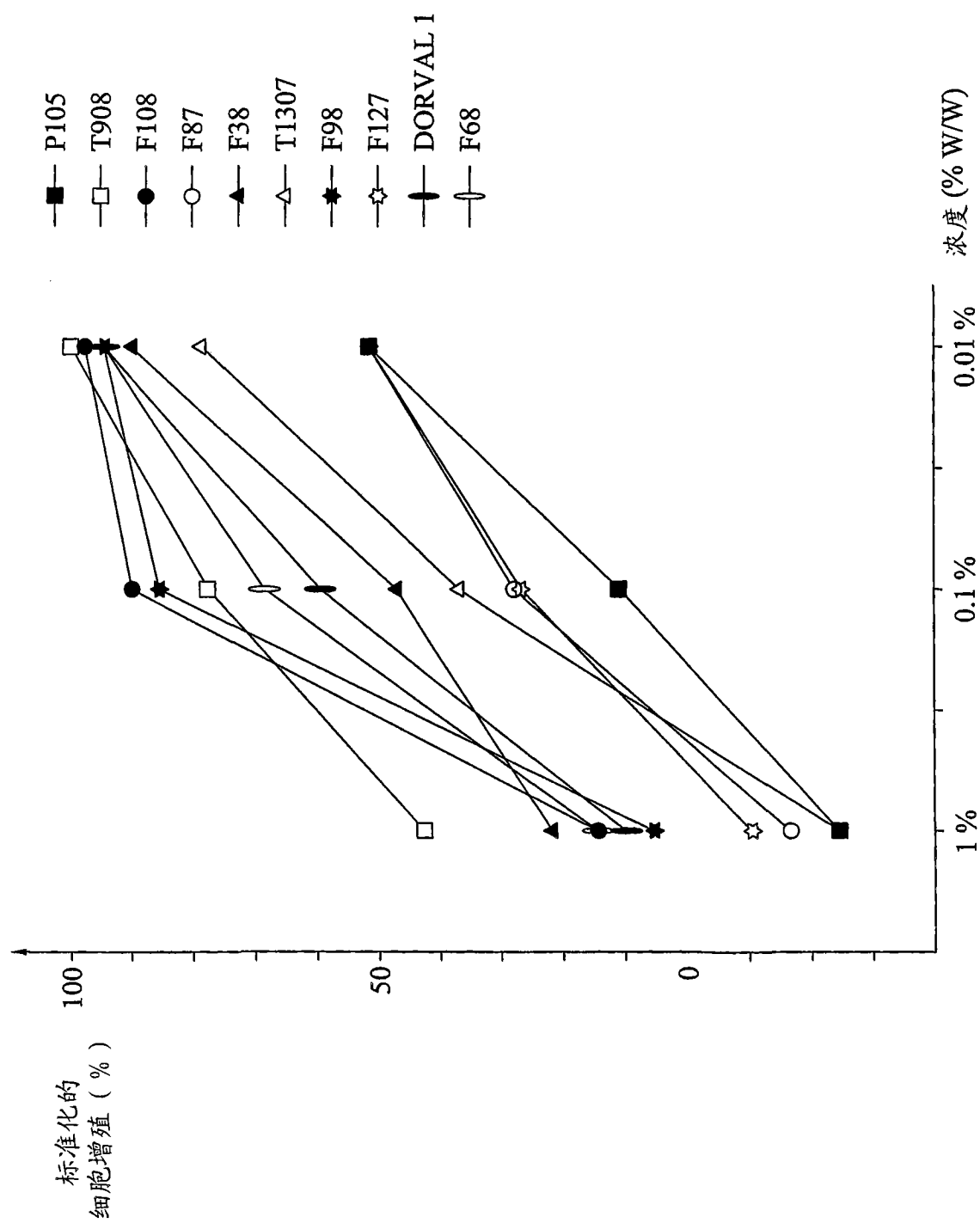


图 6

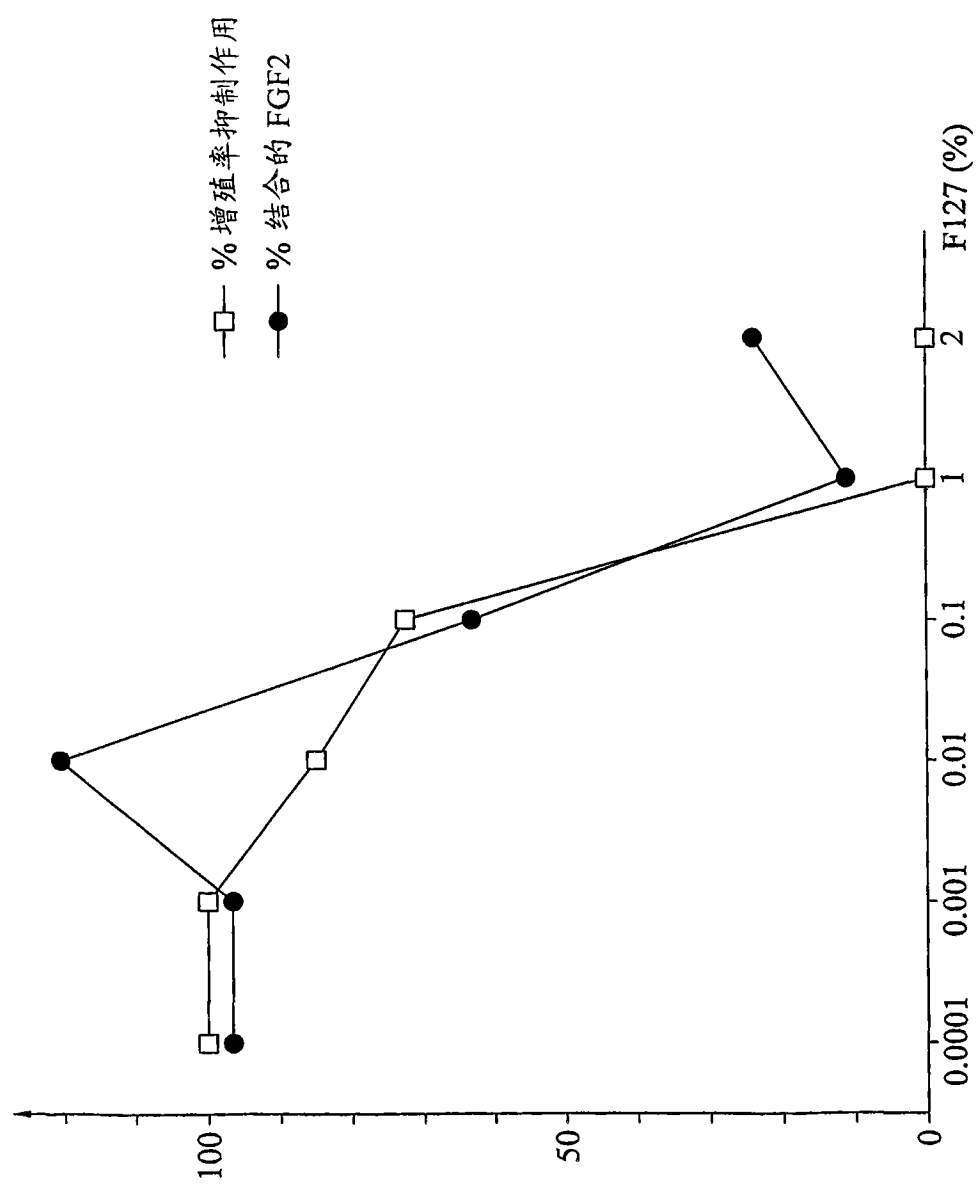


图 7

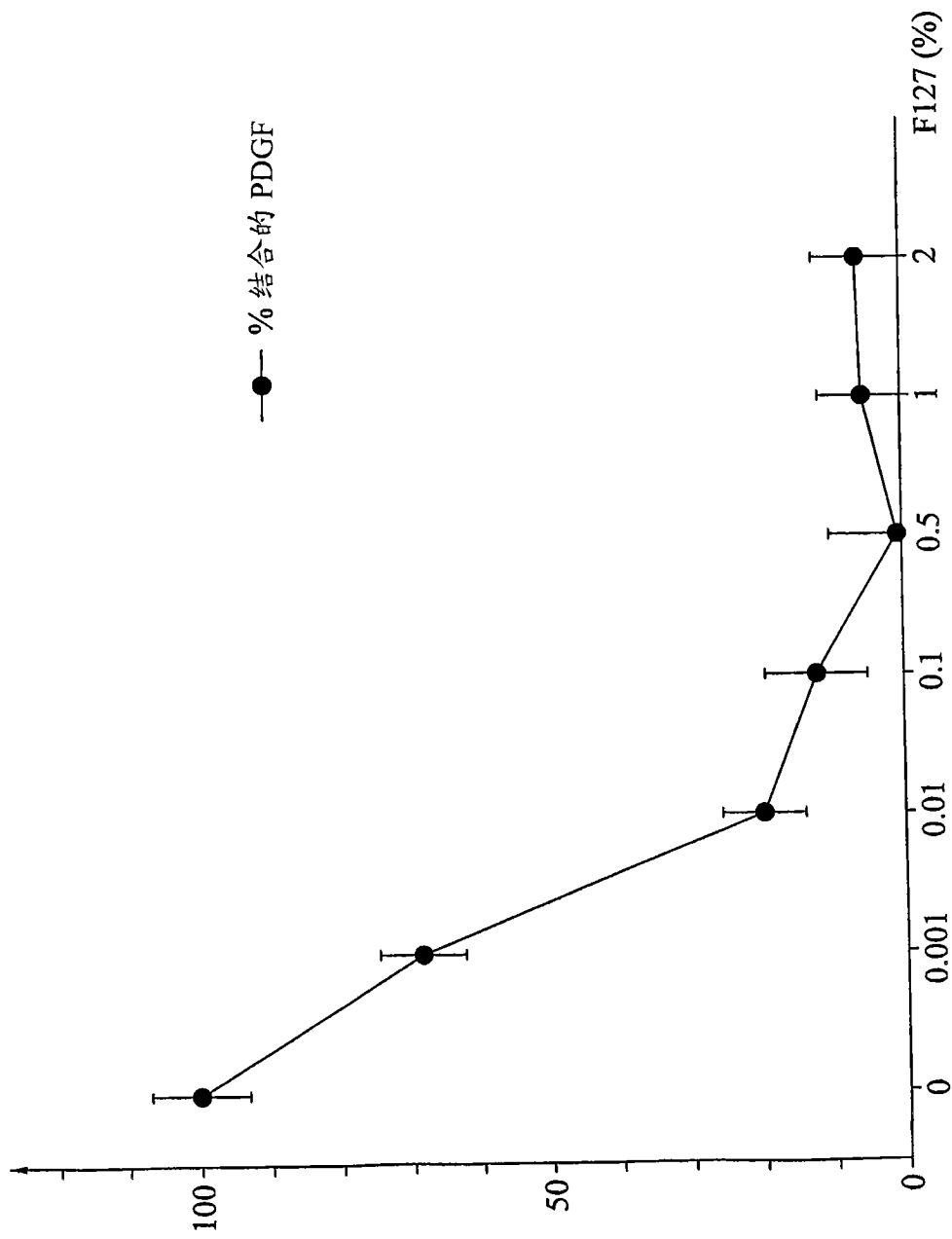


图 8

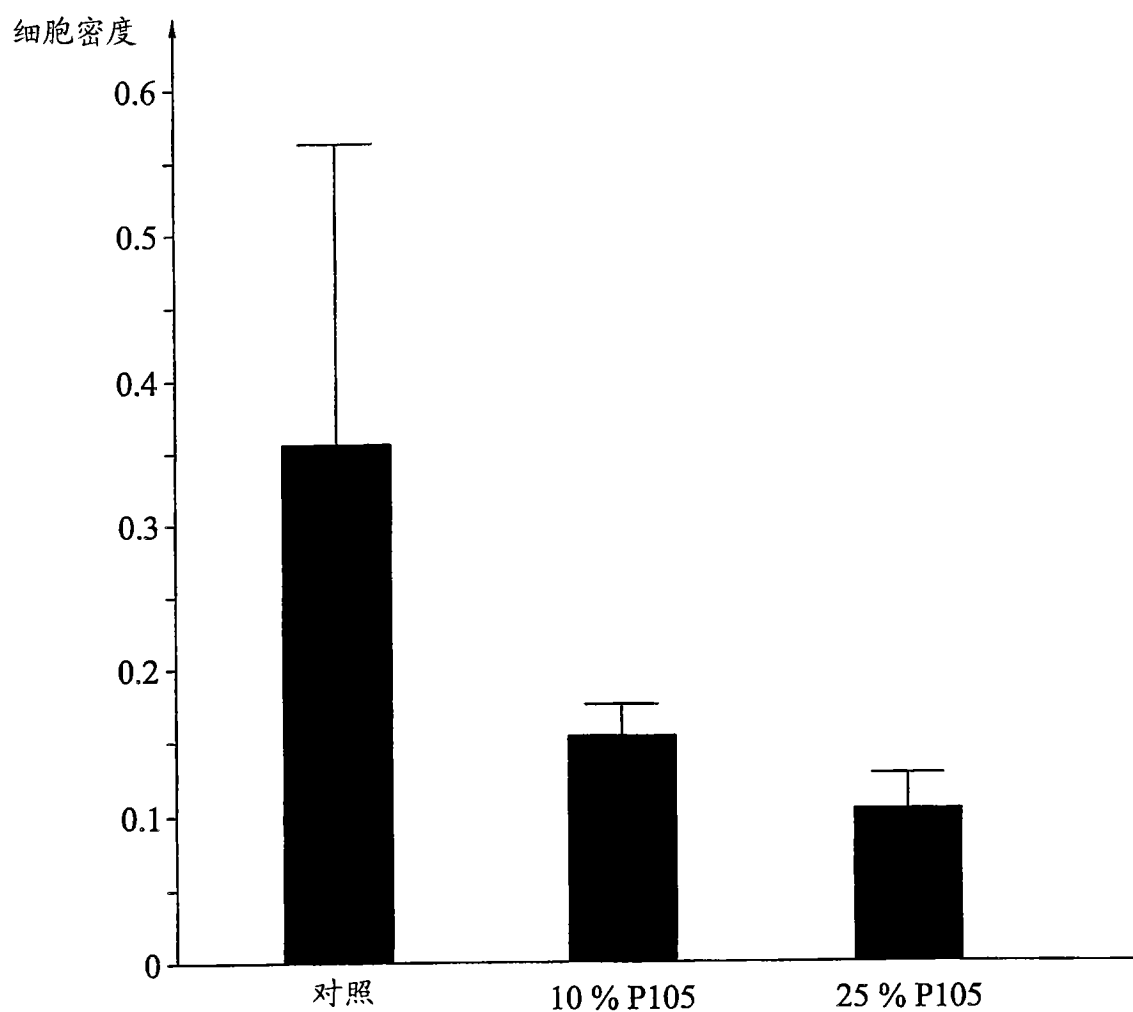


图 9

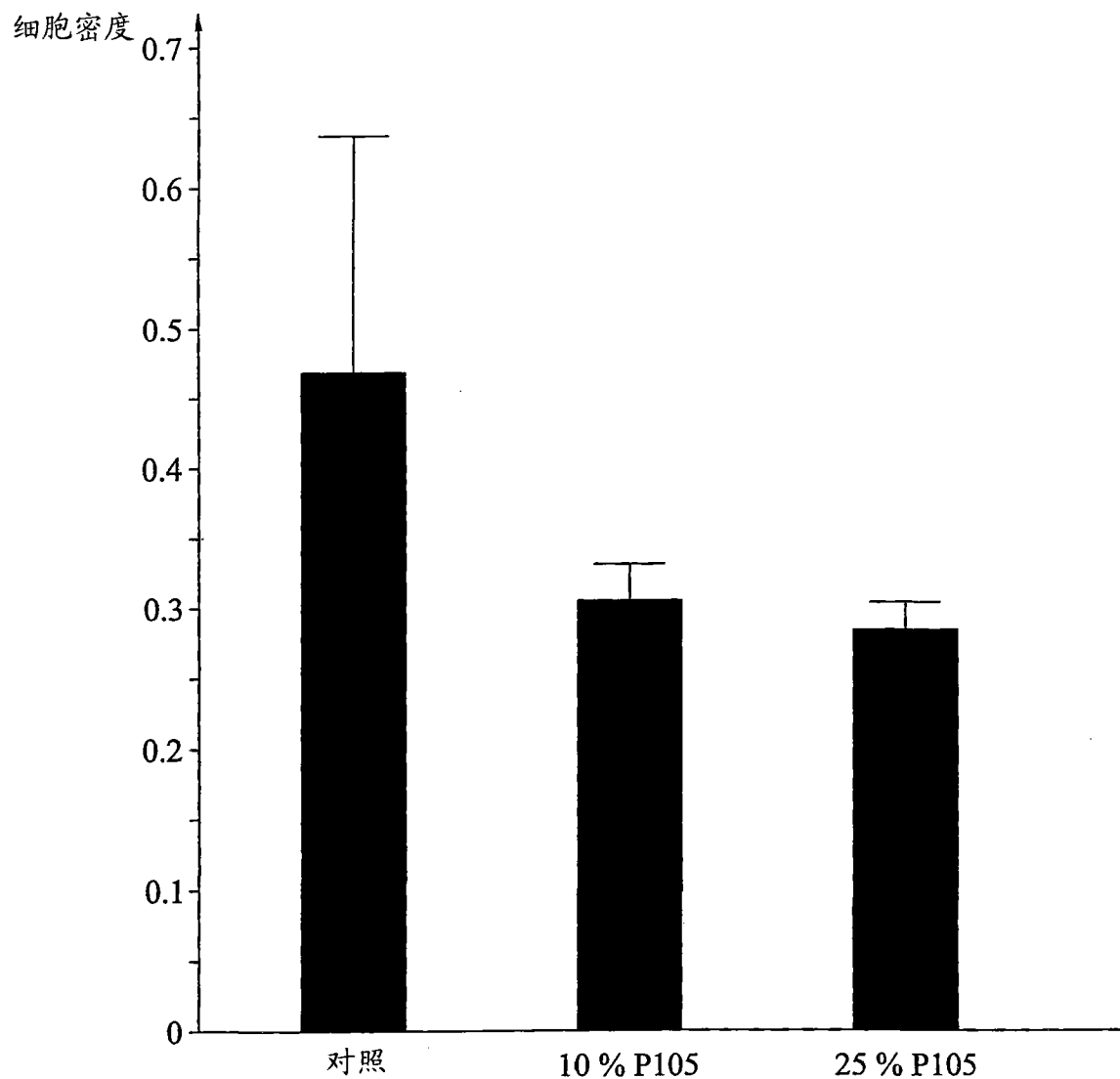


图 10

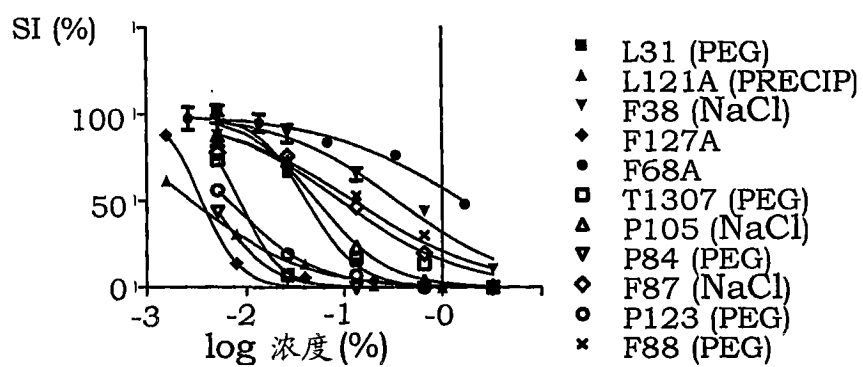


图 11

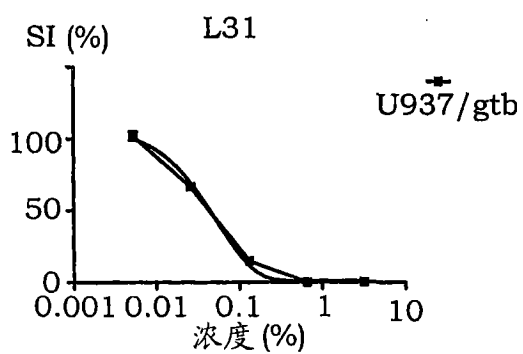


图 12A

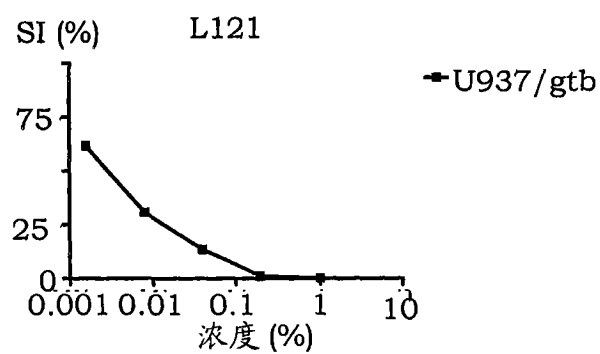


图 12B

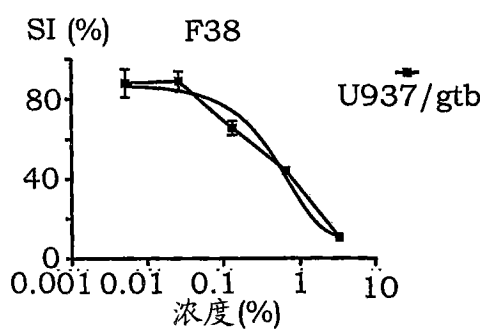


图 12C

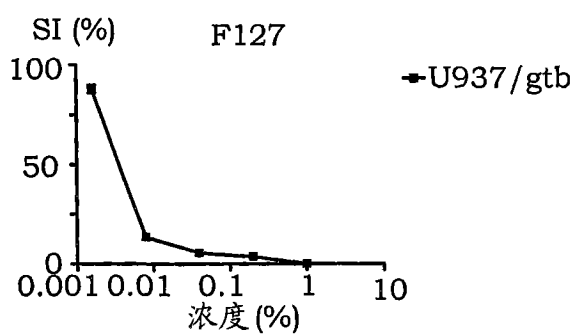


图 12D

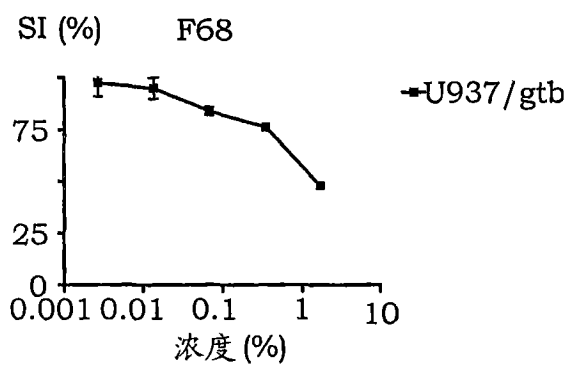


图 12E

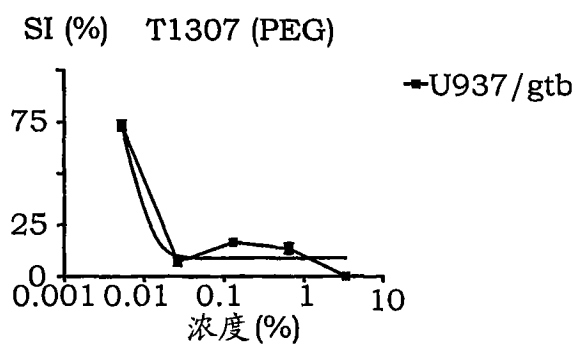


图 12F

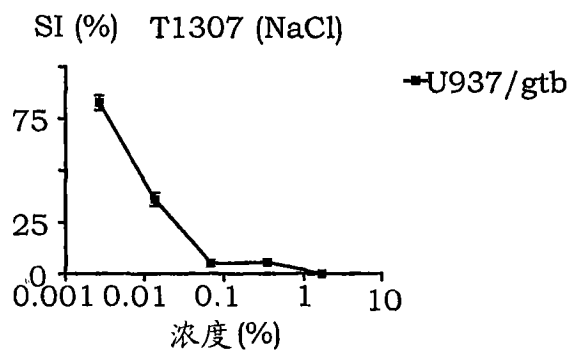


图 12G

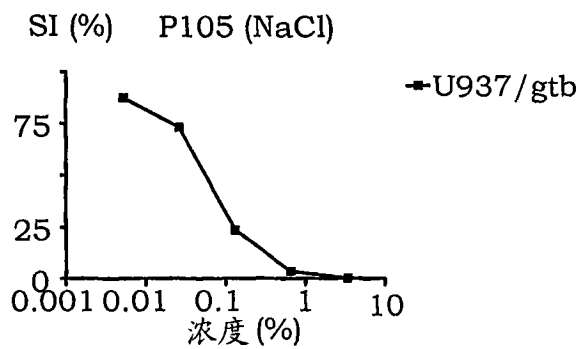


图 12H

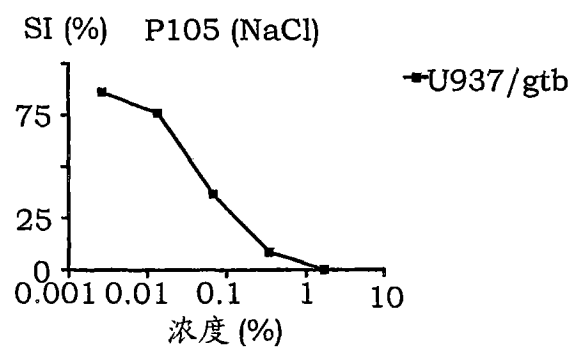


图 12I

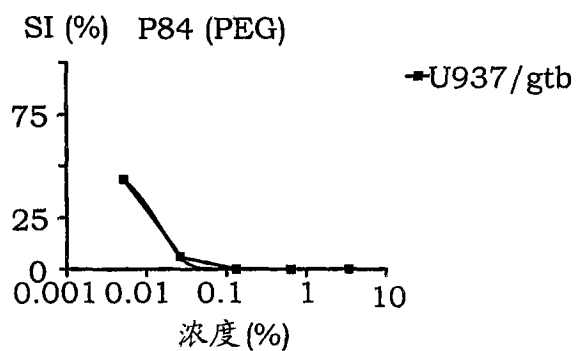


图 12J

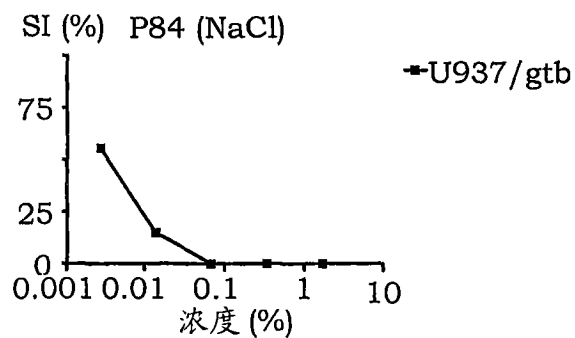


图 12K

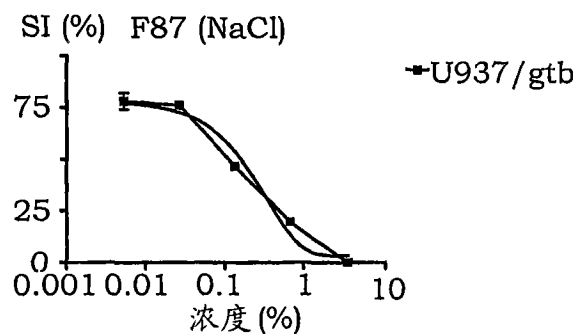


图 12L

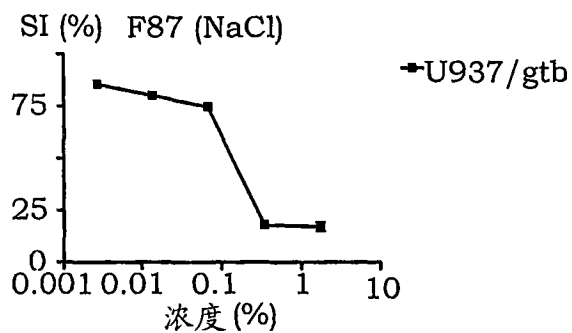


图 12M

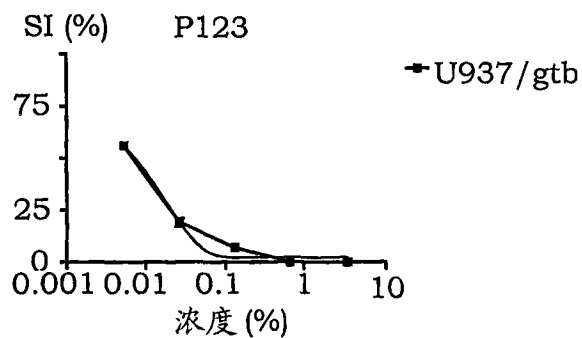


图 12N

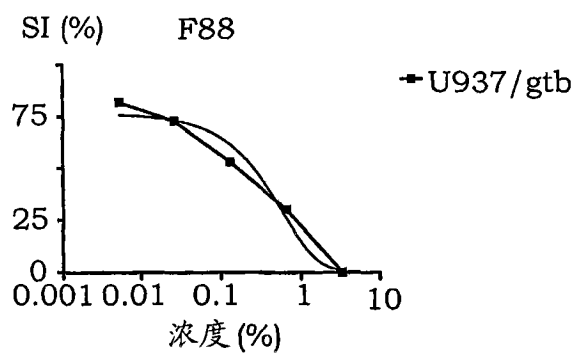


图 12O

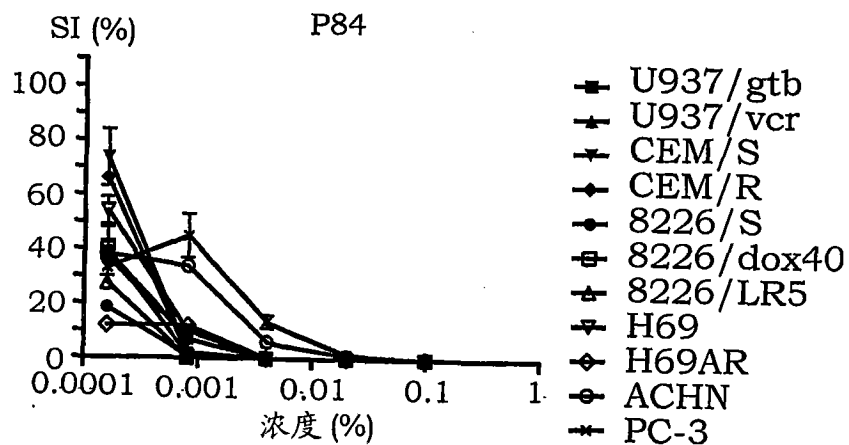


图 13A

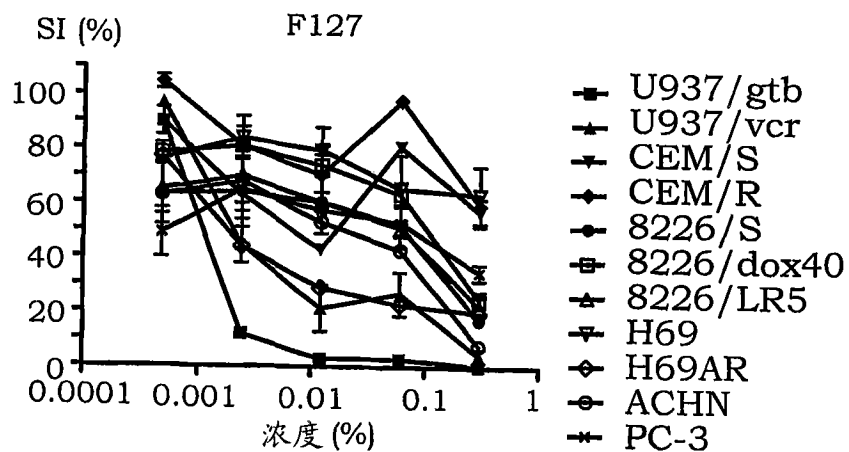


图 13B

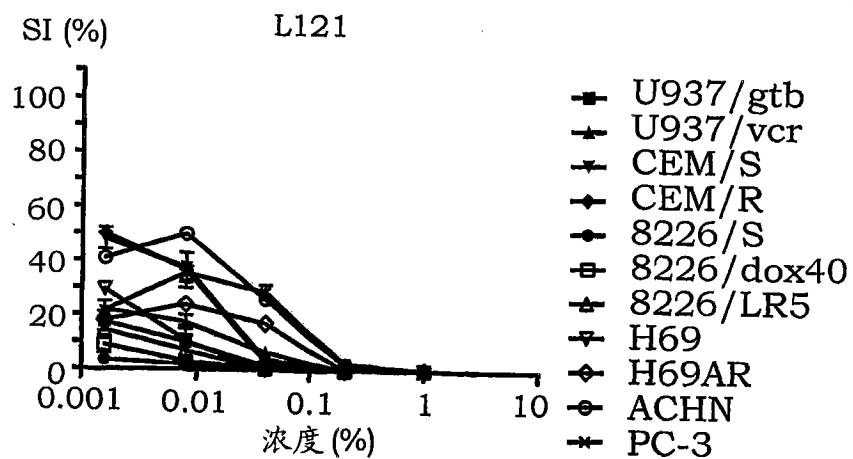


图 13C