



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101001623 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 17

(21) 申请号 200580027168. 0

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 06. 10

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

173174/2004 2004. 06. 10 JP

David A. Wink et al.. Nitric oxide and some nitric oxide donor compounds enhance the cytotoxicity of cisplatin. Biology and Chemistry 1. 1997, 1(1), 88-94.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 02. 09

审查员 严华

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2005/011078 2005. 06. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02005/120493 EN 2005. 12. 22

(73) 专利权人 日本化药株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 安田浩康 山谷睦雄 中山胜敏

佐佐木英忠

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(51) Int. Cl.

A61K 31/34(2006. 01)

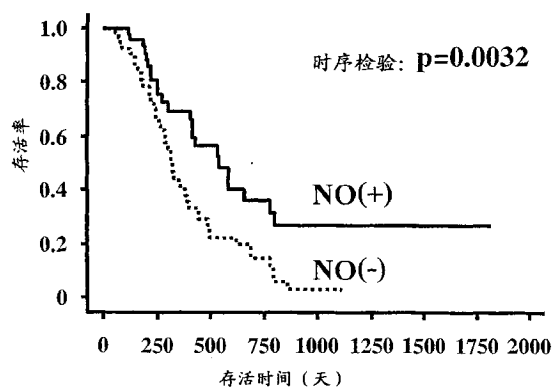
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 3 页

(54) 发明名称

抗癌效果增强剂

(57) 摘要

本发明提供了一种用于增强抗癌药物效果的增强剂,以获得对于癌症杰出的治疗效果。本发明所述的因而是一种解决方法的抗癌药物效果增强剂的特征在于其中的有效成分为一氧化氮。根据本发明,能够对非小细胞肺癌产生极好的治疗效果,非小细胞肺癌目前仍然没有对进展性癌建立有效的治疗方法,其不可进行手术并且是最难应用化学治疗的癌症之一。



1. 一氧化氮供体用于生产增强抗癌药物作用的增强剂的用途,其中用于治疗癌症是结肠癌,其中所述一氧化氮供体是硝酸甘油,并且其中所述抗癌药物是顺铂。

抗癌效果增强剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能够增强抗癌药物效果的增强剂,其可取得极好的治疗癌症效果。

背景技术

[0002] 众所周知,多年来对于抗癌药物已进行了深入研究和发展,现在有多种抗癌药物已被用于化学治疗各种类型的癌症,并因此取得了治疗效果。然而,我们也知道没有一种抗癌药物能够作用于所有类型的癌症,抗癌药物对于癌症的治疗效果具有局限性。

[0003] 抗癌药物对于癌症治疗效果局限性的原因之一在于,实体瘤内的低氧环境抑制了药物的治疗作用。例如,非专利文献 1(Matthews NE, Adams MA, Maxwell LR, Gofton TE, Graham CH. Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. J. Natl. Cancer Inst., 2001 ;93 :1879-1885) 披露了,在实验中,某些种类的癌细胞系实际上正是运用了低氧环境促进癌细胞对于抗癌药物的抵抗。在这篇文献中清楚地表明,当抗癌药物与癌细胞系的培养基混合时,即使癌细胞直接暴露于抗癌药物中,与处于含氧量正常的情况相比,处于含氧量低环境中的癌细胞的存活率仍然是前者的两倍或更多。该文献还明确了低含氧量环境抑制了一氧化氮 (NO) 的内源性产生,由此其增强癌细胞对于抗癌药物的抵抗力,并且使用的外源性 NO 供体能够改善因低氧环境所造成的对于抗癌药物的抵抗。除此之外,非专利文献 2(Jordan BF, Misson PD, Demeure R, Baudelet C, Beghein N, Gallez B. Changes In tumor oxygenation/perfusion induced by the NO donor, Isosorbide dinitrate, In comparison with carbogen; monitoring by EPR and MRI. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2000 ;48 :565-570) 建议了作为 NO 供体的硝酸异山梨酯能够增加血流,进而改善肿瘤内的氧分压。在非专利文献 3(Liang BC. Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines. J. Neurooncol., 1996 ;29 :149-155) 中,表明当神经胶质瘤细胞系处于低氧环境中时,它能够抵抗抗癌药物。非专利文献 4(Sanna K, Rofstad EK. Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines in vitro. Int. J. Cancer, 1994 ;58 :258-262) 披露了当人黑色素瘤细胞系处于低氧环境中时,其能够抵抗抗癌药物。因此,根据这些报道,即使抗癌药物大量地分布于癌细胞中,除非肿瘤组织中的低氧环境有所加强,否则癌细胞并不会加速死亡。非专利文献 1 和非专利文献 2 提示 NO 供体能够有效地改善实体肿瘤中的低氧环境。

[0004] 然而,上述任何报道都没有证明 NO 在人类临床医学中确实能够增强抗癌药物对于癌症的治疗效果。况且,还有很多报道认为 NO 能够增加肿瘤的尺寸并加速其进程。例如,非专利文献 5(Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis in head and neck cancer. J. Natl. Cancer Inst., 1998 ;90 :587-596) 研究了在参与人头颈癌的组织制备物中的 NO 生成的 NO 合酶 (NOS),研究表明在伴有向淋巴结转移的晚期癌症中表现出很高的 NOS 量,并且向淋巴结转移是阳性的部位,淋巴结中的

血管密度也很高。在该文献中还进行了一项研究,该研究利用兔角膜研究 NO 对于癌症组织的肿瘤血管源性作用,所述癌症组织由人的头和颈癌症制备。根据这篇文献的结论,与对照组相比,使用 L-NAME 的组中肿瘤血管的产生显著降低并且癌症的发展受到抑制,其中所述的 L-NAME 是 NOS 抑制剂;并且该文献还表明 NO 对于通过产生肿瘤血管而增加和促进癌组织具有促进作用。非专利文献 6(Edwards P,Cendab JC,Topping DB,Moldawer LL,Mackay S,Copeland EM,Lind DS.Tumor cell nitricoxide inhibits cell growth in vitro,but stimulate tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo.J.Surg.Res.,1996 ;63 :49-52) 表明当使用下述培养细胞进行试验时,肿瘤细胞的生长会受到抑制,其中所述培养细胞中的 NO 产生由于使用 EMT-6 细胞(小鼠的乳腺癌细胞系)所导致的 LPS/IFN- γ 的兴奋而有所增加;当相同的细胞被移植到 BALB/c 鼠并且被 LPS/IFN- γ 刺激时,肿瘤组织和肺转移增加至对照组的两倍。另外,使用培养细胞(体外实验)和动物实验(体内实验)的试验结果是完全相反的。在非专利文献 7(Amb S,Merriam WG,Ogunfusika MO,Bennett WP,Ishibe N,et al.p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumorgrowth of NOS2-expressing human carcinoma cells.Nature Med.,1998 ;4 :1371-1376) 中,研究了在动物实验中 NO 对于血管发生和癌症发展的影响,其中在人类癌细胞系中引入 NOS 基因以达到引导 NO 以恒定方式合成的目的,将上述人类癌细胞系移植到没有胸腺的裸小鼠内。此处,研究了癌症抑制基因 p53 的活性是存在还是不存在,研究表明如果肿瘤组织中被转移到裸小鼠内的癌细胞系具有 p53 活性(野生型 p53),则内源性 NO 能够抑制肿瘤细胞的生长;如果肿瘤组织中被转移到裸小鼠内的癌细胞系只有很弱的 p53 活性(突变型 p53),那么内源性 NO 会促进 VEGF 表达和血管发生,促进肿瘤细胞的生长。非专利文献 8(DC Jenkins, IG Charles, LL Thomsen, DW Moss, LSHolmes, SA Baylis, P Rhodes, K Westmore, PC Emson, S Moncada.Roles of Nitric Oxide in Tumor Growth.Proc.Natl.Acad. Sci. USA,1995 ;92 :4392-4396) 表明在人类乳腺癌和妇科领域的癌症中,NO 产生和癌生长具有正性相关性。非专利文献 9(Lala PK,Chakraborty C.Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumourprogression.Lancet Oncol.,2001 ;2 :149-156) 表明衍生型的 NOS 参于结肠、肺和咽喉肿瘤的 p53 突变,NO 通过环氧化酶 -2(COX-2) 的活化刺激肿瘤的生长。因此,根据上述报道,强烈地表明在人类临床医学通过抗癌药物进行癌症治疗中,应用 NO 对于病人可能会产生不良作用,例如增大或促进癌症。

[0005] 如上文所述,现在有大量的报道涉及 NO 对于癌症的活性,一些报道认为 NO 能够抑制癌症,而另一些报道认为 NO 会恶化癌症,两方面的报道数量都很多,并且提供了科学证据和科学评价对所述观点进行支持,因此目前有关 NO 对于癌症活性的研究还处于很混乱的状态。此外,如非专利文献 6 所述,使用培养细胞的试验和动物实验的试验结果完全相反的事实是永远不会停止的。考虑到上述状况,以非专利文献 1 为例,其披露了在使用培养细胞的实验中,由于低含氧环境所造成的癌细胞系对于抗癌药物的抗性在 NO 供体的作用下有所改善,虽然这一发现对于进一步研究很有价值,但不可能根据这一发现推断 NO 供体具有缩小癌组织或者增强抗癌药物活性的作用。因此更加说明了,在人类临床医学中还没有能力作出 NO 供体会增强抗癌药物活性的结论,而且也不应当作出这样的结论。

[0006] 在专利文献 1(JP 2004-508279A) 中,提出了一种使用 NO 供体作为钾通道激活剂的方法,并将该方法作为将抗癌药物选择性转移到癌组织的方法,其中将抗癌药物由血液

送至癌细胞的血管渗透压有所增强。然而,提出的有关结论在目前的状况下根本不足以令人信服,所述结论是 NO 供体只有在由于血管渗透压升高引起抗癌药物向肿瘤组织的转移增多的情况下才会增强抗癌药物的活性,而不需要实际证明 NO 供体即使在动物实验中也能够增强抗癌药物对于癌组织的活性,这一结论不能令人信服是因为如上文所述对于 NO 对癌症活性的科学评价是很混乱的。专利文献 1 没有得出在实际人类临床医学中 NO 供体能够引起抗癌药物活性增强的结论。事实上,通过上述方法能够得到可以表明对于癌症的治疗作用有所改善的数据,但是专利文献 1 甚至没有得到任何动物试验的数据。

[0007] 因此,本发明的目的在于提供一种抗癌药物的活性增强剂,其能够得到极好的癌症治疗效果。

[0008] 发明公开

[0009] 即使是动物实验,现有技术也没有任何结论表明 NO 供体对于癌组织具有活性。现在,本发明发现 NO 供体能够显著地改善抗癌药物对于非小细胞肺癌的治疗效果,所述非小细胞肺癌被认为是进行化疗最困难的癌症之一。背景技术之一是对于心绞痛或老年心肌梗塞患者的临床研究回顾,所述患者均应用 NO 供体进行治疗。这是因为有分析数据显示患有晚期非小细胞肺癌并接受化疗 (MVP 治疗) (该组同时使用了 NO ;年龄 : 67 ± 8 ;男性比例 :80%) 的组对于化疗治疗的应答率非常显著地高于没有使用 NO 供体并接受相同 MVP 治疗 (对照组,年龄 : 65 ± 9 ;男性比例 :76%) 的组,其中优势比 = 30.6,95% CI 3.5-270.4, $p < 0.0001$,卡方检验。同时使用 NO 的组应答率为 90% (CR :20%,2/10 ;PR :70%,7/10 ;NC :10%,1/10 ;PD :0%,0/10),对照组的应答率为 23% (CR :0%,0/44 ;PR :23%,10/44 ;NC :50%,22/44 ;PD :27%,12/44) (判断方法参照下文所述的实施例)。

[0010] 本发明是在上文所述发现的基础上完成的。根据本发明的第一个方面和特征,提供了一种抗癌药物的活性增强剂,其特征在于其中的有效成分是 NO 供体。

[0011] 除了第一个特征,根据本发明的第二个方面和特征,用于治疗癌症是实体瘤。

[0012] 除了第二个特征,根据本发明的第三个方面和特征,所述实体瘤是非小细胞肺癌。

[0013] 除了第一个特征,根据本发明的第四个方面和特征,NO 供体是有机硝酸盐化合物。

[0014] 本发明可能提供了一种抗癌药物活性增强剂,用于获得一种极好的癌症治疗效果。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 显示了晚期非小细胞肺癌患者在化学治疗期间使用 NO 供体治疗 {NO(+)} (实线) 和不使用 NO 供体治疗 {NO(-)} (虚线) 的存活率曲线。通过时序检验 (log-rank) 计算 P 值。

[0017] 图 2 显示了 C57BL6 鼠 (对照组, $n = 6$;C, NO 供体组, $n = 6$;N, 化疗组, $n = 6$;CTX, NO+ 化疗组, $n = 6$;N+CTX) 肺癌模型 (鼠路易斯肺癌 ;LLC 细胞) 的肿瘤体积生长曲线。通过 $0.5 \times \{\text{肿瘤长度 (mm)}\} \times \{\text{肿瘤宽度 (mm)}\}^2$ 的方式计算肿瘤体积。根据 student t- 检验方法计算 P 值。

[0018] 图 3 显示了 BALB/c 鼠 (对照组, $n = 6$;C, NO 供体组, $n = 6$;N, 化疗组, $n = 6$;CTX, NO+ 化疗组, $n = 6$;N+CTX) 结肠癌模型 (鼠结肠癌细胞系 ;结肠 26 细胞) 的肿瘤体积生长曲线。通过 $0.5 \times \{\text{肿瘤长度 (mm)}\} \times \{\text{肿瘤宽度 (mm)}\}^2$ 的方式计算肿瘤体积。根据 student t- 检验方法计算 P 值。

[0019] 实施本发明的最佳方式

[0020] 在本发明中,一氧化氮(NO)供体指的是在生理学条件下能够释放出NO的一种试剂。例如有机硝酸酯化合物,其是一元或多元醇的硝酸酯。该类化合物相应的例子是硝酸甘油(NTG)、硝酸戊四醇酯(PETN),硝酸异山梨酯(ISDN)和单硝酸异山梨酯(ISMN)。

[0021] 对于和NO供体同时使用而在化疗中效果有所增强的抗癌药物并无特别限制,抗癌药物的例子是抗代谢物如5-氟尿嘧啶、氮甲喋呤、去氧氟尿苷、替加氟、阿糖胞苷和吉西他滨;烷化剂例如环磷酰胺、异环磷酰胺、硫替派、卡波醌和盐酸尼莫司丁;抗癌性抗生素例如丝裂霉素、盐酸阿霉素、amurubicin hydrochloride、盐酸吡柔比星、盐酸表柔比星、盐酸阿柔比星、盐酸米托蒽醌、盐酸博来霉素和硫酸培来霉素;微管作用剂例如多西紫杉醇、紫杉醇、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨;金属铂药物例如顺铂、卡铂和奈达铂;拓扑异构酶抑制剂例如依立替康和nogitecan hydrochloride;以及生物碱抗癌药物例如依托泊苷。

[0022] 关于NO供体,一个例子是对采用标准化疗的患者进行化疗前5-2天开始使用NO供体(优选,3天前),NO供体在整个化疗期间内一直使用,直到化疗结束后才停止NO供体的使用。虽然对于NO供体的剂型没有特别的限制,但优选口服制剂或者皮下制剂,这样当考虑到发生抵抗性危险时比较容易控制血药浓度。NO供体的剂量可根据心绞痛治疗中的剂量确定,其中心绞痛是NO供体内在固有的应用。更特别的,当使用硝酸甘油时,如果是片剂或类似剂型进行口服给药则剂量为1-50mg/天(一天内分成两次给药),如果是膏剂或类似剂型进行皮下给药则剂量为1-50mg/天(每天使用一次)。当使用硝酸异山梨酯时,如果口服给药则剂量为10-100mg/天(一天内分成两次给药),如果皮下给药则剂量为10-100mg/天(每天使用一次)。另外,上述描述未否认NO供体和抗癌药物以组合制剂形式给药。

[0023] 对于本发明治疗目的的癌症没有特别限制,只要是能够进行化学治疗的任何癌症都可以应用。具体的例子是固态瘤例如头和颈癌症、胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胆囊和胆管癌症、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌和子宫颈癌,血癌例如恶性淋巴瘤和白血病。

[0024] 实施例

[0025] 本发明如下文所述。根据下述文献,将不存在任何对于解释的限制。

[0026] 实施例1:一项关于联合应用NO供体和抗癌药物对于患者化疗响应效果的研究,所述患者是前瞻性随机对照试验中的晚期非小细胞肺癌患者。

[0027] 患者特征

[0028] 在此研究中采用的是65名不能做手术的晚期非小细胞肺癌(NSCLC)患者,这些患者符合下述5项标准:(a) IIIB期或IV期;(b) 以前没有接受过化学治疗或放射治疗;(c) 良好的体力状态:根据东半球肿瘤协作组织(ECOG)的标准应达到0-2级体力状态;(d) 无脑部转移;(e) 肾功能、肝功能、血液功能和心脏功能适当。

[0029] 在65名晚期NSCLC患者中,31名患者患有鳞状细胞癌(19名IIIB期患者,12名IV期患者),29名患者患有腺癌(9名IIIB期患者,20名IV期患者),5名患者患有大细胞癌(4名IIIB期患者,1名IV期患者),在前瞻性群组研究中所有的患者于化疗期间随机地接受伴有或没有NO供体的抗癌药物。

[0030] 65名晚期NSCLC患者中,32名患者在进行化疗时使用NO供体(在开始每一次化学治疗前3天和使用抗癌药物结束之间,经皮使用硝酸甘油,尼采贴TTS®, 25mg/人/天;

或者口服使用硝酸异山梨酯, **NitrolR®**, 40mg/人, 每天分两次使用)。使用 NO 供体治疗的组中, 32 名患者的 21 位使用 MVP, 顺铂 (CDDP) + 长春瑞滨 (VNR) + 丝裂霉素 (每 21 天中, 第 1 天 CDDP 80mg/m², 第 1 和 8 天 VNR 25mg/m², 第 1 天丝裂霉素 8mg/m²) 治疗, 6 名患者使用 CDDP + 多西紫杉醇 (DOC) (每 21 天中, 第 1 天 CDDP 80mg/m², 第 1 天 DOC 75mg/m²) 治疗, 5 名患者使用 CDDP + VNR (每 21 天中, 第 1 天 CDDP 80mg/m², 第 1 和 8 天 VNR 25mg/m²) 治疗。65 名晚期 NSCLC 患者中的另外 33 名患者在进行化疗时不使用 NO 供体。在不使用 NO 供体的组中, 33 名患者中的 18 名使用 MVP, CDDP + VNR + 丝裂霉素 (每 21 天中, 第 1 天 CDDP 80mg/m², 第 1 和 8 天 VNR 25mg/m², 第 1 天丝裂霉素 8mg/m²) 治疗, 8 名患者使用 CDDP + DOC (每 21 天中, 第 1 天 CDDP 80mg/m², 第 1 天 DOC 75mg/m²) 治疗, 7 名患者使用 CDDP + VNR (每 21 天中, 第 1 天 CDDP 80mg/m², 第 1 和 8 天 VNR 25mg/m²) 治疗。A 和 B 组中患者的特征如表 1 所示:

[0031] 表 1. 晚期非小细胞肺癌患者的特征

[0032]

特征	NO 模拟状态 (A 组, n=32)	无 NO 模拟状态 (B 组, n=33)	P 值
年龄 (岁)			
平均值	68	67	0.2615*
范围	41 - 83	48 - 84	
性别			
(患者人数)			
男性	29	24	0.063
女性	3	9	
体力状态			
(患者人数)			
0	23	23	0.8469
1	6	6	0.9529
2	3	4	0.721
布林克曼指数			
(包-年 (pack-year))			
平均值	49	47	0.6334*
范围	0 - 120	0 - 125	
细胞类型			
(患者人数)			
鳞状上皮细胞	18	13	0.1737

[0033]

腺癌	10	19	0.0328
大细胞	4	1	0.1520
期			
(患者人数)			
IIIB	17	15	0.5363
IV	15	18	
化学治疗			
(患者人数)			
MVP	21	18	0.362
CDDP+DOC	6	8	0.5902
CDDP+VNR	5	7	0.5616

[0034] MVP = 丝裂霉素 C + 长春瑞滨 + 顺铂, CDDP = 顺铂, DOC = 多西紫杉醇,

[0035] VNR = 长春瑞滨.

[0036] 两处使用 * 标记的是 Mann-Whitney U 检验的统计数据。

[0037] 其他数据是根据卡方检验得到的。

[0038] 方法

[0039] 在开始每一次化学治疗前 3 天和使用抗癌药物结束之间使用 NO 供体。为了评价 NO 供体对于化学敏感性的作用,在使用抗癌药物治疗之前和之后,我们采用胸部计算机断层成像技术 (CT) 比较肿瘤的大小。采用 CT 扫描和胸部放射性铈 -67 柠檬酸盐闪烁扫描图来判定肺癌的结节肿瘤分类。采用脑部和腹部的 CT 扫描以及骨骼锝 99m 闪烁扫描图判定脑部、腹部和骨骼中是否有肿瘤转移。完全反应 (CR) 被认定为所有已知疾病都已消失,疾病的消失是通过分别至少两周的两项观察加以确定的。部分反应 (PR) 被认定为那些疾病的总肿瘤尺寸有 50% 或更多的减少,这是由分别至少 4 周的两项观察进行确定的。无变化 (NC) 被认为是总肿瘤尺寸连 50% 的减少都没有,并且一种或更多测定的疾病的尺寸也没有增加 25% 或更多。进行性疾病 (PD) 被认定是一种或多种被测量的病灶尺寸增加了 25% 或更多,或者产生了新的病灶。当患者为 PR 或 CR 时,他们被归类为应答者。如果患者是 NC 或 PD,他们被归类为非应答者。根据应答者占应答者和非应答者之和的比例计算化学治疗的应答率。根据第一个化学治疗循环第一天的日期和患者在数据采集期间的死亡日期或截断日期来计算存活率。

[0040] 和化学治疗应答有关的因素通过单变量分析 (卡方检验) 和多变量分析 (对数回归分析) 进行评价。采用 Cox 回归分析评价变量的预后有效性。我们采用 Kaplan-Meire 方法分析存活率,采用时序检验分析两种患者之间存活曲线的 p 值,所述两种患者其中一种使用抗癌药物和 NO 供体进行治疗,另外一种仅使用抗癌药物进行治疗。p < 0.05,证明具有显著性差异。

[0041] 术语解释 (第 1 组)

[0042] ECOG 体力状态 (PS):

[0043]

等级	ECOG
0	完全有效,能够无限制地从事任何病前工作。
1	受限于重体力作业,但是能够走动并且可以从事较轻的或者坐着的工作例如轻家务劳动、办公室工作。
2	能走动并且能够自理,但不能进行任何工作劳动。大约超过 50%醒着的时间是可以站起来的。
3	仅能够进行有限的自理,超过 50%醒着的时间被限制在床上或椅子上。
4	完全地残疾。不能进行任何自理,所有时间都在床上或椅子上。
5	死亡

[0044] *Am J Clin Oncol 5:649-655,1982.

[0045] 术语解释(第2组)

[0046] 布林克曼指数:吸烟期间(年)内,通过每天抽烟数量(香烟的包数)的累加所计算出的抽烟史。

[0047] 结果

[0048] 表2和表3所示的是应答者和非应答者中患者的特征。根据Kaplan-Meier检验计算出的使用NO供体治疗组和不使用NO供体治疗组的存活率曲线如图1所示。

[0049] 表2. 采用多变量分析对于化学敏感性危险因素的分析

特征	PR+CR (应答者) (n=39)		NC+PD (非应答者) (n=26)		多变量分析 P 值
年龄(岁)					
≥55	30	(67 %)	15	(33 %)	0.792
<55	9	(45 %)	11	(55 %)	
性别(病人数)					
男	35	(66 %)	18	(34 %)	0.438
女	4	(33 %)	8	(67 %)	
体力状态 (病人数)					
0	28	(61 %)	18	(39 %)	0.927
1	6	(50 %)	6	(50 %)	
2	5	(71 %)	2	(29 %)	
布林肯曼指数 (包-年)					
≥50	20	(74 %)	7	(26 %)	0.399
<50	19	(50 %)	19	(50 %)	
细胞类型 (病人数)					
鳞状细胞	26	(84 %)	5	(16 %)	0.011
腺癌	10	(34 %)	19	(66 %)	
大细胞	3	(60 %)	2	(40 %)	0.948
[0050]					
期 (病人数)					
III	24	(75 %)	8	(25 %)	0.098
IV	15	(45 %)	18	(55 %)	
化疗 (病人数)					
MVP	26	(67 %)	13	(33 %)	0.199
CDDP+DOC	7	(50 %)	7	(50 %)	
CDDP+VNR	6	(50 %)	6	(50 %)	
肺活量 (%可预见)					
<80 %	7	(78 %)	2	(22 %)	0.724
≥80 %	32	(57 %)	24	(43 %)	
1 秒钟加压 呼气量 (%可预见)					
<70 %	18	(72 %)	7	(28 %)	0.299
≥70 %	21	(53 %)	19	(47 %)	
使用 NO 模拟 (病人数)					
是	26	(31 %)	6	(19 %)	0.007
否	13	(39 %)	20	(61 %)	
使用除了 NO 模拟 的血管舒张药 (病人数)					
是	13	(69 %)	8	(31 %)	0.246
否	21	(54 %)	18	(46 %)	

[0051] CR = 完全反应, PR = 部分反应, NC = 无变化, PD = 进行性疾病, NO = 一氧化氮, MVP = 丝裂霉素 C + 长春瑞滨 + 顺铂, CDDP = 顺铂, DOC = 多西紫杉醇, VNR = 长春瑞滨。同

时使用多变量分析和对数回归分析。

[0052] 表 3. 临床研究中使用 NO 供体及抗癌药物和化学敏感性之间的关系

[0053]

	抗癌药物	应答者; CR+PR (人数)		非应答者; NC+PD (人数)	
使用 NO 供 体 (+)	MVP	17	26	4	6
	CDDP+DOC	5		1	
	CDDP+VNR	4		1	
使用 NO 供 体 (-)	MVP	9	13	9	20
	CDDP+DOC	2		6	
	CDDP+VNR	2		5	

[0054] CR = 完全反应, PR = 部分反应, NC = 无变化, PD = 进行性疾病, NO = 一氧化氮, MVP = 丝裂霉素 C+ 长春瑞滨 + 顺铂, CDDP = 顺铂, DOC = 多西紫杉醇, VNR = 长春瑞滨。

[0055] 使用抗癌药物和 NO 供体治疗的晚期 NSCLC 患者和仅使用抗癌药物治疗的患者之间在年龄、性别、体力状态、抽烟史、肺癌阶段以及化疗诊断记录方面 (表 1) 没有统计学意义。如图 2 和图 3 所示, NO 供体和抗癌药物联合应用对于晚期 NSCLC 患者的化疗治疗应答率有显著的强大作用力。在化疗期间使用 NO 供体的患者 (81%, 32 名患者中有 26 名) 的应答率显著地高于不使用 NO 供体的患者 (39%, 33 名患者中有 13 名), (优势比 = 6.7, 95% CI 2.2-20.7, $p = 0.0006$, 卡方检验) (表 2)。NO 供体的应用 ($p < 0.01$) 显著地伴随着晚期 NSCLC 患者对于抗癌药物的阳性应答 (对数回归分析) (表 2)。Kaplan-Meier 分析表明使用抗癌药物和 NO 供体治疗的患者的生命显著地长于仅用抗癌药物治疗的患者 ($p < 0.05$) (Log-rank 检验)。结果 (表 2 和表 3) 显示使用 NO 供体例如硝酸甘油和硝酸异山梨酯可以改善 IIIB 期和 IV 期晚期 NSCLC 患者对于化学治疗的应答。

[0056] 结论

[0057] 与仅使用抗癌药物不使用 NO 供体治疗的患者相比, 联合使用 NO 供体和抗癌药物在改善晚期 NSCLC 患者的化疗应答率和总存活数方面具有很大的附加效应。

[0058] 对于晚期 NSCLC、鳞状上皮细胞癌、腺癌和大细胞癌的治疗目前仍然非常困难, 这是因为晚期 NSCLC 不能进行手术, 其对于抗癌药物即使是最新的第三代抗药物的应答率都非常低。相反, 小细胞肺癌对于化学治疗的应答率为约 70-80%, 显著地高于 NSCLC。与胃癌患者的人数相反, 全世界大多数国家的肺癌患者人数均为逐年上升。另外, 很大比例的肺癌由 NSCLC 组成。因此, 目前需要一种比现有方法更有效地治疗晚期 NSCLC 的新方法。基于这个观点, 本发明不仅在改善 NSCLC 应答率, 而且对于改善其他种类晚期实体瘤的应答率都具有重要意义。

[0059] 实施例 2: 同时使用 NO 供体硝酸甘油, 能够改善鼠肺癌模型的化学敏感性。

[0060] 方法

[0061] 从 Tohoku 大学细胞资源中心获得鼠路易士肺癌 (LLC) 细胞、肺腺癌细胞用于生物医学研究, 使用 DMEM 加 10% 胎牛血清孵育细胞, 直到细胞进行了充分的增殖以进行该

试验。使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 调节 LLC 细胞浓度为 2×10^5 细胞 / $100 \mu\text{l}$, 接种至 6 周龄的雄性 C57BL6 鼠内, 右季肋部皮下给予 (2×10^5 细胞 / $100 \mu\text{l}$ / 鼠), 该鼠购买自 Charles River Japan, Inc. (Tokyo, Japan) 和 Clea Japan, Inc. (Tokyo, Japan)。鼠生活在无特异病原体条件下, 给予无菌食物和水。当移植的肿瘤生长到肿瘤体积约 100mm^3 时, 将实验动物均分为 4 组 (对照组, $n = 6$; C, NO 供体组, $n = 6$; N, 化疗组, $n = 6$; CTX, 和 NO+ 化疗组, $n = 6$; N+CTX)。根据 $0.5 \times \{\text{肿瘤长度 (mm)}\} \times \{\text{肿瘤宽度 (mm)}\}^2$ 公式计算肿瘤体积。在对照组中, 每周对 C57BL6 鼠腹腔内注射 (i. p.) 四次 (周日、周一、周三和周四各一次), 每次 $100 \mu\text{l}$ PBS, 另外, 每周两次 (周一、周四各一次) 在 i. p. 30 分钟后静脉注射 (i. v.) $100 \mu\text{l}$ PBS。该试验进行两周。在 NO 供体组中, 每周四次 (周日、周一、周三和周四各一次) 对鼠进行 i. p. 给药, 每次为用 PBS 稀释的 $100 \mu\text{l}$ 的 0.02mg/kg 硝酸甘油, 另外每周两次 (周一、周四各一次) 在 i. p. 硝酸甘油溶液 30 分钟后 i. v. $100\mu\text{l}$ PBS。该试验进行两周。在化学治疗组中, 每周对鼠 i. p. 四次 (周日、周一、周三和周四各一次), 每次 $100 \mu\text{l}$ PBS, 另外, 每周两次 (周一、周四各一次) 在 i. p. PBS 30 分钟后 i. v. $100 \mu\text{l}$ 的 3.5mg/kg 顺铂的 PBS 溶液。该试验进行两周。在 NO+ 化疗组中, 每周四次 (周日、周一、周三和周四各一次) 对鼠进行 i. p. 给药, 每次为用 PBS 稀释的 $100 \mu\text{l}$ 的 0.02mg/kg 硝酸甘油, 另外每周两次 (周一、周四各一次) 在 i. p. 硝酸甘油溶液 30 分钟后 i. v. $100 \mu\text{l}$ 的 3.5mg/kg 顺铂的 PBS 溶液。该试验进行两周。顺铂和硝酸甘油从 Nippon Kayaku Co., Ltd (Tokyo, Japan) 购得。在开始对鼠给药后, 每两天测量一次鼠的肿瘤体积和鼠体重。

[0062] 结果

[0063] 肿瘤体积生长曲线如图 2 所示。与化学治疗组相比较, NO+ 化疗组中第 9 天后的鼠肿瘤体积有明显减小。另一方面, 与化疗组以及 NO+ 化疗组相比, NO 供体组和对照组均显示出快速的肿瘤生长。

[0064] 这些数据表明, 由于 NO 供体在改善化学敏感性特别是难以使用化疗进行治疗的实体肿瘤方面具有极好的作用, NO 供体作为抗癌药物作用增强剂的新的商业用途可以得到扩展。

[0065] 实施例 3 : 同时使用 NO 供体, 硝酸甘油, 能够改善鼠结肠癌模型的化学敏感性。

[0066] 方法

[0067] 从 Tohoku 大学细胞资源中心获得结肠 26 细胞、鼠结肠癌细胞用于生物医学研究, 使用 RPMI 1640 加 10% 胎牛血清孵化细胞直到细胞增殖足以进行该试验。使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 调节结肠 26 细胞浓度为 2×10^5 细胞 / $100 \mu\text{l}$, 接种至 6 周龄的雌性 BALB/c 鼠内, 右季肋部皮下给予 (2×10^5 细胞 / $100 \mu\text{l}$ / 鼠), 该鼠购买自 Charles River Japan, Inc. (Tokyo, Japan) 和 Clea Japan, Inc. (Tokyo, Japan)。鼠生活在无特异病原体条件下, 给予无菌食物和水。当移植的肿瘤生长到肿瘤体积约 100mm^3 时, 将实验动物均分为 4 组 (对照组, $n = 6$; C, NO 供体组, $n = 6$; N, 化疗组, $n = 6$; CTX, 和 NO+ 化疗组, $n = 6$; N+CTX)。根据 $0.5 \times \{\text{肿瘤长度 (mm)}\} \times \{\text{肿瘤宽度 (mm)}\}^2$ 公式计算肿瘤体积。在对照组中, 每周对 BALB/c 鼠腹腔内注射 (i. p.) 四次 (周日、周一、周三和周四各一次), 每次 $100\mu\text{l}$ PBS, 另外, 每周两次 (周一、周四各一次) 在 i. p. 30 分钟后静脉注射 (i. v.) $100 \mu\text{l}$ PBS。该试验进行两周。在 NO 供体组中, 每周四次 (周日、周一、周三和周四各一次) 对鼠进行 i. p. 给药, 每次为用 PBS 稀释的 $100 \mu\text{l}$ 的 0.02mg/kg 硝酸甘油, 另外每周两次 (周一、周四各一次) 在

i. p. 硝酸甘油溶液 30 分钟后 i. v. 100 μ lPBS。该试验进行两周。在化学治疗组中,每周对鼠 i. p. 四次(周日、周一、周三和周四各一次),每次 100 μ lPBS,另外,每周两次(周一、周四各一次)在 i. p. PBS 30 分钟后 i. v. 100 μ l 的 3.5mg/kg 顺铂的 PBS 溶液。该试验进行两周。在 NO+ 化疗组中,每周四次(周日、周一、周三和周四各一次)对鼠进行 i. p. 给药,每次为用 PBS 稀释的 100 μ l 的 0.02mg/kg 硝酸甘油,另外每周两次(周一、周四各一次)在 i. p. 硝酸甘油溶液 30 分钟后 i. v. 100 μ l 的 3.5mg/kg 顺铂的 PBS 溶液。该试验进行两周。顺铂和硝酸甘油从 Nippon Kayaku Co., Ltd(Tokyo, Japan) 购得。在开始对鼠给药后,每两天测量一次鼠的肿瘤体积和鼠体重。

[0068] 结果

[0069] 肿瘤体积生长曲线如图 3 所示。与化学治疗组相比较,NO+ 化疗组中第 6 天后的鼠肿瘤体积有明显减小。另一方面,与化疗组以及 NO+ 化疗组相比,NO 供体组和对照组均显示出快速的肿瘤生长。

[0070] 这些数据表明,由于 NO 供体和抗癌药物联合应用不仅在改善肺癌而且在改善结肠癌的化学敏感性方面具有极好的作用,NO 供体和抗癌药物的联合应用能够扩大 NO 供体新的商业应用的机会。

[0071] 工业实用性

[0072] 本发明提供了一种能够增强抗癌药物效果的增强剂,并取得了极好的癌症治疗效果,因此,其具有工业实用性。

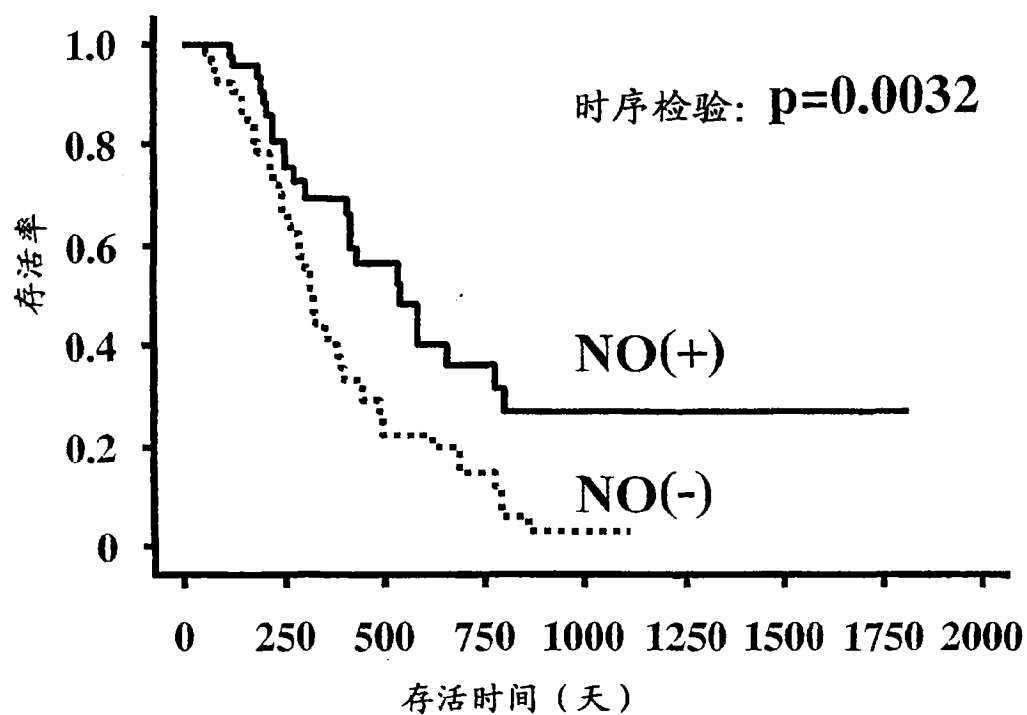


图 1

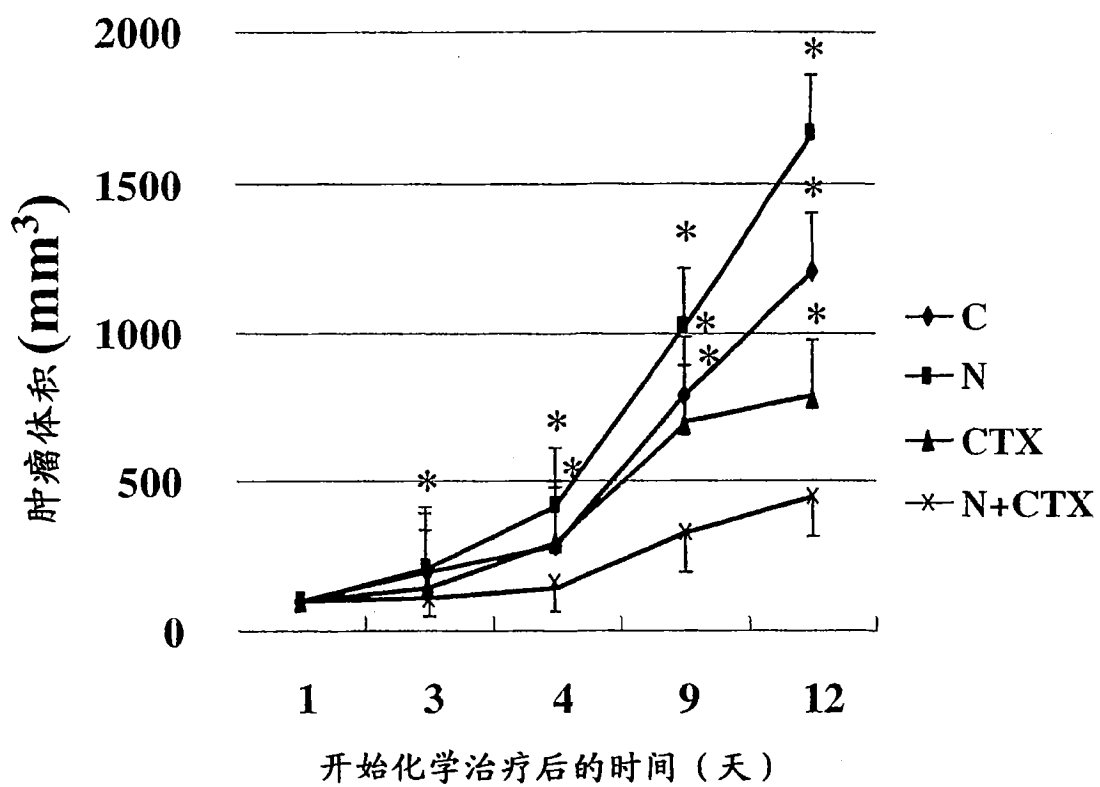


图 2

* $p < 0.05$ vs N+CTX

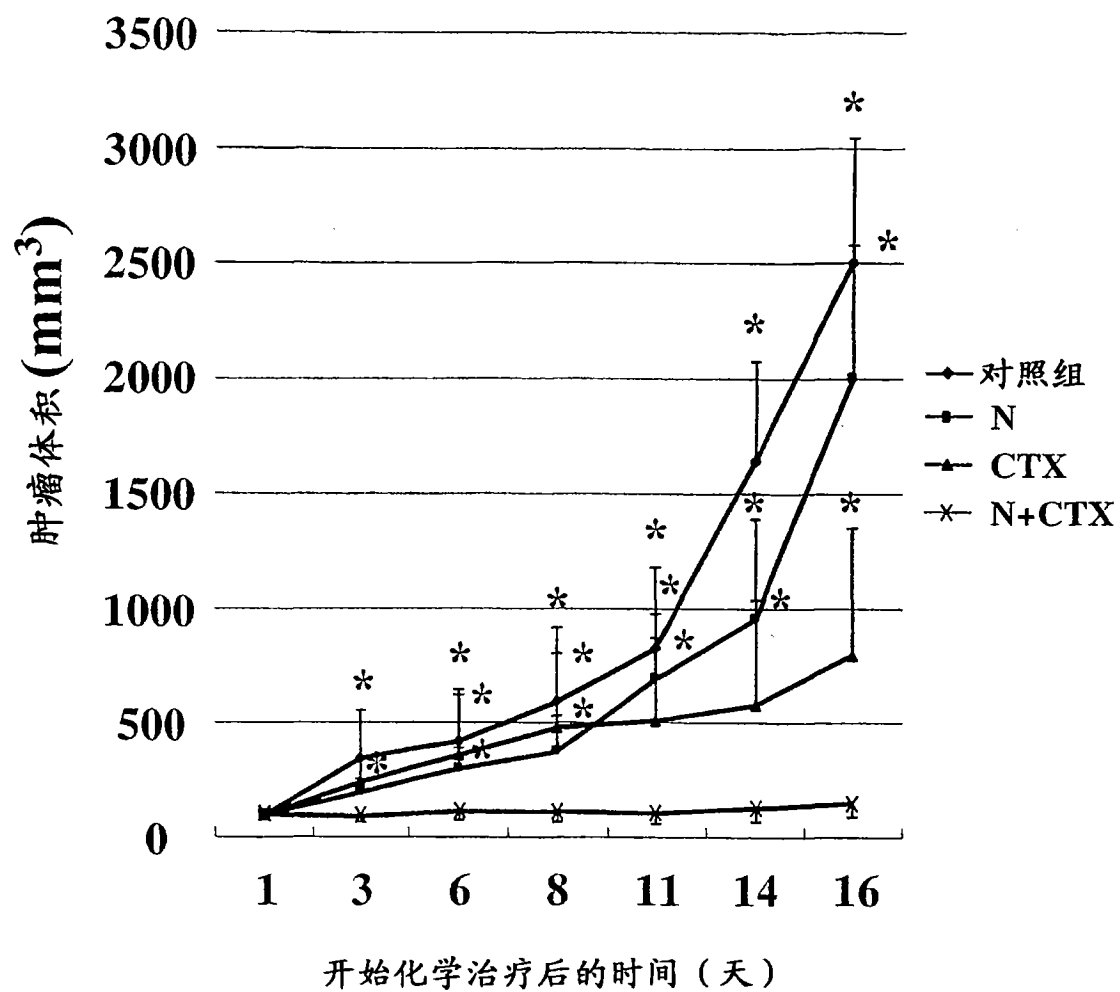


图 3

*p < 0.05vs N+CTX