

發明專利說明書

※申請案號：094101363

※IPC 分類：

一、發明名稱：

治療癌症之醫藥組成物
Cancer Therapy

二、中文發明摘要：

本發明是關於一種調節細胞循環以及利用一種過氧化體增殖劑活化受體 γ 興奮劑與一種甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑，或是一種甲羥戊酸拮抗劑來治療癌症之醫藥組成物。

三、英文發明摘要：

This invention relates to a method of regulating the cell cycle and treating cancer with a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist and a mevalonate pathway inhibitor or a mevalonate antagonist.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 該篇專利申請優先權為美國臨時申請案60/537, 235, 2004年1月16日，該項發明內容已整合於習知技術中。

【先前技術】

[0002] 施德丁類(statin)藥物常用來控制高膽固醇血症，用以阻斷甲羥戊酸合成膽固醇的途徑。我們已知此生物合成路徑在細胞增殖及轉化過程中扮演著重要的調節角色。最近的研究報告中指出施德丁類藥物無論是體外或體內實驗皆可抑制腫瘤細胞的成長(如：Wong W W, et al., *Leukemia*, 2002, 16: 508-19)，然而，在這些研究報告中顯示其大體上並無顯著成效。

[0003] 曲格列酮(troglitazone)，一種二氫噻唑二酮類型(thiazolidinedione type)的過氧化體增殖劑活化受體 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ)興奮劑，是一種用來治療第二型糖尿病的藥物。自從發現PPAR γ 興奮劑可對來自於人類癌症的細胞株產生抑制作用後，曲格列酮在研究中已被視為是一種具潛在性的抗癌藥物，然而，在多種的癌症臨床試驗中其治療成效並不佳(如：Kulke MH, et al., *cancer J.*, 2002, 8: 395-9; Burstein HJ, et al., *Breast cancer Res. Treat.*, 2003, 79: 391-7)。

【發明內容】

[0004] 本發明是建立在一個意外的發現上，這發現是關於一種PPAR γ 興奮劑與一種甲羥戊酸生物合成路徑之抑制劑或是一種甲羥戊酸拮抗劑共同進行投藥時，對於調控數個控制細胞循環的蛋白質具有協同效應。特別的，這兩種活化試劑可有效降低週期素依賴性激酶(cyclin dependent kinase-2, CDK-2)及週期素A(cyclin A)的量，提高細胞週期抑制蛋白p27^{kip1}(一種腫瘤抑制劑)的量，並可減少視網膜母細胞瘤(retinoblastoma, Rb)蛋白質磷酸化作用，此外，另一個驚奇的發現是此二種活化試劑對於某一些腫瘤細胞具有協同抑制作用。

- [0005] 因此，本發明一觀點為透過一種甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑及一種PPAR γ 興奮劑，或是利用一種甲羥戊酸拮抗劑及一種PPAR γ 興奮劑透過與細胞的聯繫來對細胞循環(cell cycle)進行負調控。此種甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑可以為一種3-羥基-3-甲基戊二酸單醯輔酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)還原抑制劑，例如施德丁類化合物(如：洛伐他汀(lovastatin)或辛伐他汀(simvastatin))。此類PPAR γ 興奮劑可為曲格列酮(troglitazone)或匹格列酮(piglitazone)，而甲羥戊酸拮抗劑可為洛伐他汀或辛伐他汀。
- [0006] 本發明另一個觀點為一種治療癌症(如：神經膠質瘤，血管瘤，胰臟癌，前列腺癌，子宮頸癌或肺癌)之醫藥組成物。該醫藥組成物包含提供受試者其所需有效量之PPAR γ 興奮劑及甲羥戊酸生物合成路徑之抑制劑或甲羥戊酸拮抗劑。
- [0007] 上述所提及之醫藥組成物亦包含提供受試者治療所需有效量之抗癌藥物。
- [0008] 關於本發明進一步的觀點為提高化學療法所使用之抗癌藥物的有效性。此醫藥組成物包含提供受試者所需有效量之化學治療抗癌藥物，及有效量之PPAR γ 興奮劑。該醫藥組成物亦包含提供受試者一有效量之甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑或甲羥戊酸拮抗劑。
- [0009] 同樣的，本發明領域中為包含一種甲羥戊酸生物合成路徑之抑制劑或一種甲羥戊酸拮抗劑，一種PPAR γ 興奮劑及藥學上可被接受的載體之醫藥組成物，及該醫藥組成物用於製造治療癌症的藥劑之用途，該醫藥組成物也進一步包含一種抗癌藥物。
- [0010] 本發明之其他特色、目的及優點將顯見於以下的說明與專利範圍。

【實施方式】

- [0011] 本發明特色包含給與受試者所需有效量之PPAR γ 興奮劑及甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑或是甲羥戊酸拮抗劑，來治療癌症或是對細胞循環的負調節。專有名詞"甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑"意指一種可以抑制甲羥戊酸生物合成路徑中的任何酵素(如：HMG-CoA還原酶)，進而阻斷其合成路徑之化合物。該化合物會經由與酵素結合而抑制該酵素之活性，或是在甲羥戊酸生物合成路徑中以間接方式來抑制酵素活性。舉例來說，這種抑制劑可為施德丁類化合物，例如：洛伐他汀或辛伐他汀。甲羥戊酸生物合成路徑在此領域是眾所皆知的，如：*Biochemical pathways: An atlas of biochemistry and molecular biology*; Ed. Gerhard Michal, Wiley-Spektrum, 1998. 甲羥戊酸拮抗劑為一種可阻抗正常量或較低量之甲羥戊酸的化合物。PPAR γ 興奮劑為一種模擬PPAR γ 活性的物質，舉例來說，合適之PPAR γ 興奮劑包含，但不侷限於曲格列酮或匹格列酮。
- [0012] 專有名詞"治療"在此意指運用或給與一種含有活化劑的合成藥物給已罹患癌症或是有癌症徵狀或是有罹癌傾向之受試者，以提供其適當的治療、治癒、減輕、緩和、醫治、改善、改進或是影響疾病。專有名詞"有效量"在此意指關於提供給受試者一種或多種所需的活化劑之量，此量於受試者身上賦予明顯之療效。有效量的變異，依照熟習該項技術者之認定，與給藥路徑、賦形劑的使用，及其他同時使用之活化劑有關。
- [0013] 專有名詞"癌症"意指具有自發性成長能力的細胞，即細胞快速且大量增生的異常狀態或情況。此意謂包含了所有類型細胞之不當增生或致癌因子的形成過程，轉移的組織或是惡性轉移的細胞、組織或器官，但不考慮組織病理學上的類型或侵入階段。
- [0014] 舉例來說，癌症如下所列但不僅限於這幾類，包含癌、肉瘤及血液科惡性疾病像是白血病、肉瘤、胃癌、淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、皮膚癌、睪丸癌、胃癌、胰臟癌、乳癌、膀胱結腸直腸癌、頭頸部癌、腦癌、食道癌、膀胱癌、腎上腺皮質癌、肺癌、支氣管癌、子宮內膜癌、鼻咽癌、子宮頸癌或肝臟癌，或是原發部位不明之癌症。此外，癌症為一種抗藥性表現型，其中腫瘤細胞表現P-醣蛋白、多重抗藥性關聯蛋白、肺部抗性關聯蛋白、乳癌抗性關聯蛋白或是其他與抗癌藥物相抵抗之關聯蛋白。
- [0015] 為了實行上述的步驟，活化劑可以同時或非同時作用，他們可以口服、注射、經由吸入噴霧，或是藉由植入一個貯存器的方式來給與。專有名詞"非經腸道"在此意指包含皮下、皮內、靜脈、肌肉內、關節內、動脈、關節液內、胸骨內、脊髓內、疾病部位內及顱內的注射或是其他之注射技術。
- [0016] 該醫藥組成物包含兩種活化劑及一種可被應用於上述方法中之藥物可接受載體。專有名詞"藥物可接受載體"意指一種可以與每個活化劑相容(更好的是，具有穩定活化劑的能力)的載體，並且不會有害於接受治療的受試者。舉例來說，可溶性試劑，例如環狀糊精(cyclodextrin)，可被用來做為運送活化劑的藥物賦形劑。其它載體的例子包含膠狀的二氧化矽(silicon dioxide)、硬脂酸鎂(magnesium stearate)、纖維素、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)及適用於藥物及化妝品之十號黃色素(D&C Yellow#10)。

- [0017] 口服給藥的組成物可為下列任何可以接受的口服方式，但不侷限於這幾類，包含錠劑、膠囊、乳狀液、水溶液懸浮物、散劑與溶液。一般做為錠劑的載體包含乳糖及玉米粉，而潤滑劑如硬脂酸鎂亦是典型的錠劑添加物。在膠囊型的口服給藥方式中，有用的稀釋劑包含乳糖及乾燥的玉米粉。當以水溶液懸浮物或乳狀物為口服給藥方式時，其活性組成部分可為懸浮或溶解於一種結合乳狀或懸浮狀藥劑之油相中。如果需要的話，可加入某些甜味、香味或顏色劑。
- [0018] 無菌的血管注射劑組成物（如：水溶液或油性懸浮液）可以根據該領域中已知之技術按照配方使用合適的分散劑或濕著劑（舉例來說，如乳化劑Tween 80）及懸浮劑。無菌血管注射劑配製亦可為一種無菌血管注射劑溶液，或是溶於一種無毒性且腸胃外可接受的稀釋劑或溶劑之懸浮液中，如1,3-丁二醇。在可接受的賦形劑及溶劑中，可被利用的有甘露醇(mannitol)、林格爾氏溶液(Ringer's solution)及生理食鹽水(isotonic sodium chloride solution)，此外，無菌的固定油是常用來做為溶劑或懸浮介質（如：合成的單或二丙三醇）。脂肪酸，如油酸或是其甘油酯衍生物，如同是藥學上可接受的天然油，如橄欖油或蓖麻油，尤其是他們的聚乙醇氧化物變體(polyoxyethylated version)有助於血管注射劑的配製。這些油性溶液或懸浮液可同時含有一長鏈狀之乙醇稀釋劑或分散劑，或是羧甲基纖維素(carboxymethyl cellulose)或類似的分散劑。
- [0019] 吸入劑之組成物係根據該領域中已知之藥物處方技術來製備，而且可以製備成鹽水溶液，該溶液使用苯甲醇或是其他合適的防腐劑、增加生物可利用性的吸收促進劑、氟碳化物，以及（或）其他在該領域中已知的可溶性或分散性試劑。
- [0020] 上述提到治療癌症的醫藥組成物，同時包含了提供一有效量抗癌藥物給罹患癌症之受試者。專有名詞"抗癌藥物"意指一種用來治療癌症的藥物，並不包含甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑及PPAR γ 興奮劑該類尚未被准許於癌症治療上的藥物。舉例來說，抗癌藥物包含（但不僅限於）下列幾種：維生素A酸(retinoids)、非類固醇消腫止痛藥(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAIDs)、順式鉑化物(cisplatin)、太平洋紫杉醇(taxol)、阿黴素(doxorubicin, 俗稱小紅梅)及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)。這些抗癌藥物可以在給與PPAR γ 興奮劑及甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑（或是甲羥戊酸拮抗劑）之前或是之後給藥。
- [0021] 本發明亦是一種以提高化學治療抗癌藥物之療效為特色的醫藥組成物。該組成物包含給與受試者其所需之有效量的化學治療抗癌藥物及一有效量的PPAR γ 興奮劑。專有名詞"化學治療抗癌藥"意指一種利用選擇性殺死癌症細胞來治療癌症的化合物，但並非指以誘導癌症細胞變異來治療癌症之化合物（如：維生素A酸及非類固醇消腫止痛藥）。舉例來說，化學治療抗癌藥包含順式鉑化物、太平洋紫杉醇、阿黴素及5-氟尿嘧啶。該方法亦包含給與受試者一有效量之甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑（一種甲羥戊酸拮抗劑）。為了實踐該方法，可以同時或是不同時間使用活化劑，而此類試劑可以經由口服、注射、利用吸入噴霧或是藉由植入貯存器的方式給藥。
- [0022] 一項合適的活體外試驗可以用來初步估算結合活化劑於調節某些細胞循環調節蛋白（如：CDK-2, cyclin A, Rb, E2F1及p27^{kip1}）量及抑制癌症細胞上之成效。此結合指數(combinations index, CI)是根據Chou, T. C. et al. *Adv. Enzyme Regul.*, 1984, 22: 27-55該篇論文中提及之中位數有效方程式(median effect equation)所計算出的。上述之結合指數相當於結合效應，像是二種或多種藥物間之協同作用、拮抗作用或加成作用。當結合指數小於1時，此結合效應為協同作用；當結合指數等於1時，此結合效應為加成作用；當結合指數大於1時，此結合效應為拮抗作用。
- [0023] 結合活化劑可依照於活體外試驗中治療癌症之成果再做進一步的篩選，舉例來說，可將一種結合活性劑注入動物體內（如：老鼠樣本），然後評估該藥物之治療成效，並可以根據該結果決定適當之投藥劑量及給藥途徑。
- [0024] 在本發明中所使用之甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑、甲羥戊酸拮抗劑、PPAR γ 興奮劑、抗癌藥物及化學治療抗癌藥物為一般可由市面上獲得或是可從該領域中已知的方法合成。
- [0025] 在沒有更進一步的詳細闡述下，相信由以上之敘述足以呈現此發明。因此，接下來實施例是純粹被分析做為解說性之實例，無論如何不受限於其餘以任何形式公開的事情。在此文中被引用之所有刊物及美國臨時申請案60/537, 235皆已全部整合於參考文獻中。在沒有更進一步的詳細闡述下，相信由以上之敘述足以呈現此發明。因此，接下來實施例是純粹被分析做為解說性之實例，無論如何不受限於其餘以任何形式公開的事情。在此文中被引用之所有刊物及美國臨時申請案60/537, 235皆已全部整合於參考文獻中。

- [0026] 單獨使用0.5 μ M的洛伐他丁(購自Calbiochem公司)以及單獨使用10 μ M曲格列酮(購自Calbiochem公司)處理DBTRG 05MG細胞(人類神經膠母細胞瘤細胞)六天,接著以硫羅丹明分析法(sulforhodamine assay)來計算細胞數(如:Rubinstein, L. V. et al., *J. Natl. Cancer Institute*, 1990, 82: 113),結果顯示,腫瘤細胞數分別減少9.7%及11%。於對照組中,當同時使用洛伐他丁(0.5 μ M)及曲格列酮(10 μ M)處理DBTRG 05MG細胞六天,則腫瘤細胞數減少82%。
- [0027] 同種的細胞亦使用不同比例之洛伐他丁及曲格列酮結合物來進行處理,計算其結合指數值發現,所有的值皆小於1,顯示彼等之結合效應為協同效應。
- [0028] 此外,顯微鏡觀察亦證實了洛伐他丁及曲格列酮在抑制人類神經膠母細胞瘤細胞上具有協同效應。
- [0029] 同樣的,單獨使用洛伐他丁、單獨使用曲格列酮以及使用洛伐他丁及曲格列酮的組合物對許多他種細胞株,即C6(鼠神經膠質瘤細胞株)、CL1-0、CL1-5及CL1-5F4(人類肺癌細胞株)、MIA-PaCa2(人類胰臟癌細胞株)、Hela(人類子宮頸癌細胞株)、Hep G2(人類肝原細胞癌細胞株)、PC3(人類前列腺癌細胞株)、SVR(老鼠內皮細胞株),及MS1(老鼠內皮細胞株)進行測試,結果顯示,組合物係以協同效應的方式抑制著受測細胞株。
- [0030] 針對細胞循環調節蛋白、週期素依賴性激酶(CDK-2)、週期素A、視網膜母細胞瘤蛋白及細胞週期抑制蛋白進行測試,以決定洛伐他丁及曲格列酮在調節細胞循環上之成效。值得注意的是,細胞週期抑制蛋白為一種眾所皆知的CDK抑制劑,且可以調節癌症細胞之抗藥性(Lloyd, R. V., *Am. J. Pathol.* 1999, 154: 313-323)。視網膜母細胞瘤蛋白可與許多蛋白質鍵結,包含數種重要的基因調節蛋白,其鍵結能力與本身之磷酸化狀態有關,當視網膜母細胞瘤蛋白質(Retinoblastoma protein)被去磷酸化時,會鍵結至一組促進細胞的增殖調節蛋白(如:E2F-1);而當視網膜母細胞瘤蛋白質為磷酸化狀態時,則會釋放這些蛋白質,從而允許他們自由行動。
- [0031] DBTRG 05MG細胞以洛伐他丁(1 μ M)單獨使用,曲格列酮(10 μ M)單獨使用以及使用洛伐他丁(1 μ M)及曲格列酮(10 μ M)之組合物處理3天後,利用西方墨點法(Western blotting)分析週期素依賴性激酶(CDK-2)、週期素A、細胞週期抑制蛋白、視網膜母細胞瘤蛋白質及E2F-1的濃度。簡單地說,以一種補充蛋白酶抑制劑(Sigma)之放射性免疫分析法緩衝溶液來調製全細胞溶解物(cell lysate),將此細胞溶解物先進行十二基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳術(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis),然後再以電泳轉漬法(electroblotting)轉印至聚氟化亞乙烯薄膜(polyvinylidene difluoride membranes, Bio-Rad)。在室溫下經過1小時的阻斷後,於4°C的環境下以一級抗體感作一夜,接著再以辣根過氧化物酵素軛合物(horseradish peroxidase conjugate)二級抗體感作1小時,接著根據製造商所提供的方法將免疫複合體以光敏靈試劑(luminol agent, Santa Cruz)顯像。用以檢驗週期素依賴性激酶(sc-163)、週期素A(sc-239)、E2F-1(sc-239)及視網膜母細胞瘤蛋白質(sc-102)之一級抗體是購自聖塔古滋生技中心(Santa Cruz Biotechnology);用以檢驗細胞週期抑制蛋白(#610241)之一級抗體是購自必帝基因轉殖研究室(BD transduction laboratory);而用以檢驗磷酸化之視網膜母細胞瘤蛋白質(Sef807/811)則是購自細胞訊息傳遞技術中心(Cell Signaling Technology)。
- [0032] 結果顯示,無論單獨使用洛伐他丁或單獨使用曲格列酮,對於誘導週期素依賴性激酶、週期素A、視網膜母細胞瘤蛋白質及E2F-1的量幾乎沒有變化;對照下,使用洛伐他丁及曲格列酮之組合物明顯降低週期素依賴性激酶、週期素A、視網膜母細胞瘤蛋白質及E2F-1的量,而且幾乎使視網膜母細胞瘤蛋白質(Sef807/811)去磷酸化。
- [0033] 將DBTRG 05MG細胞以洛伐他丁(0.5 μ M),曲格列酮(10 μ M)及甲羥戊醯丙酮(100 μ M),HMG-CoA還原酶的下游產物處理6天,接著以硫羅丹明分析(sulforhodamine assay)來計算細胞數(如:Rubinstein, L. V. et al., *J. Natl. Cancer Institute*, 1990, 82: 113),結果顯示,甲羥戊醯丙酮的增加明顯降低洛伐他丁與曲格列酮間之協同效應。
- [0034] 所有於該說明書中被公開之特性也許以任何組合形式結合。在該說明書中每一個被公開之特性也許以一提供相同、相等或相似效果的替代特性來取代,因此,除非特地以其他方法說明,否則每一個公開之特性僅是一般一連串相同或相似特性的例子。
- [0035] 由以上的敘述可知,熟習該項技術者可以很容易地確定本發明之必要特性,而且沒有背離其本意及領域,可以引起專利不同之變化及修改使其適用於不同的用途與情況,因此,其他之實施例亦同時包含於下列的專利範圍內。

【圖式簡單說明】

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種用於治療癌症的醫藥組成物，其包含一種甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑或一種甲羥戊酸拮抗劑，曲格列酮與一種藥學上可被其接受之載體。
2. 如申請專利範圍第1項所述之用於治療癌症的醫藥組成物，其更包含一種抗癌藥物。
3. 如申請專利範圍第1項所述之用於治療癌症的醫藥組成物，其包含一種甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑，曲格列酮與一種藥學上可被其接受之載體。
4. 如申請專利範圍第1項所述之用於治療癌症的醫藥組成物，其中該甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑係一種3-羥基-3-甲基戊二酸單醯輔酶A還原抑制劑。
5. 如申請專利範圍第4項所述之用於治療癌症的醫藥組成物，其中該3-羥基-3-甲基戊二酸單醯輔酶A還原抑制劑係一種施德丁類化合物。
6. 如申請專利範圍第5項所述之用於治療癌症的醫藥組成物，其中施德丁類化合物係洛伐他丁或辛伐他丁。
7. 一種用於抑制癌細胞生長與癌細胞週期的醫藥組成物，其包含一種甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑與曲格列酮，或是包含一種甲羥戊酸拮抗劑及曲格列酮。
8. 如申請專利範圍第7項所述之用於細胞循環負調節的醫藥組成物，其中該甲羥戊酸生物合成路徑抑制劑係一種施德丁類化合物。
9. 如申請專利範圍第8項所述之用於細胞循環負調節的醫藥組成物，其中該施德丁類化合物係洛伐他丁或辛伐他丁。

八、圖式：