(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113784718 A
(43)申请公布日 2021.12.10

(21)申请号 202080032255.X

(22)申请日 2020.04.16

(30)优先权数据
62/835,354 2019.04.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/028547 2020.04.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/214831 EN 2020.10.22

(71)申请人 得克萨斯大学体系董事会
地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 J·罗比丘 M·尼尔森
J·V·海马赫

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
代理人 王思琪 王建秀

(51)Int.Cl.
A61K 31/517(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
C07K 14/485(2006.01)
C07K 14/475(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

权利要求书4页 说明书28页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

对携带酪氨酸激酶抑制剂抗性EGFR突变的癌细胞具有抗肿瘤活性的化合物

(57)摘要

本公开提供了通过施用第二代喹唑啉胺衍生物类酪氨酸激酶抑制剂来治疗确定具有奥希替尼抗性EGFR突变的患者的癌症的方法。

CN 113784718 A

1.一种治疗受试者的癌症的方法,包括向所述受试者施用有效量的喹唑啉胺衍生物类酪氨酸激酶抑制剂(TKI),其中所述受试者已被确定具有一种或多种表皮生长因子受体(EGFR)TKI抗性突变。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述EGFR TKI抗性突变是获得性非典型EGFR突变。

3.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述喹唑啉胺衍生物类TKI是共价结合性喹唑啉胺TKI。

4.如权利要求3所述的方法,其中所述共价结合性喹唑啉胺TKI是阿法替尼、他索替尼-TKI、达克替尼、培利替尼或阿利替尼。

5.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述喹唑啉胺衍生物类TKI是非共价结合性喹唑啉胺TKI。

6.如权利要求5所述的方法,其中所述非共价结合性喹唑啉胺TKI是沙帕替尼、AZD3759、瓦利替尼、TAK-285或吉非替尼。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述喹唑啉胺衍生物类TKI被配制成片剂。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18、19、20或21处1-18个核苷酸的点突变、插入和/或缺失。

9.如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18的氨基酸688-728之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子18突变位于选自E709、L718、G719、S720和G724的一个或多个残基处。

11.如权利要求9或10所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子18突变包含E709A、L718Q、L718V、G719A、G719S、S720P和/或G724S。

12.如权利要求8-11中任一项所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子18突变包含E709A、E790K、L718Q、L718V、G719A、G719S、S720和/或G724S。

13.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子19的氨基酸729-761之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子19突变位于选自I744、L747、L747、A755、K757和/或D761的一个或多个残基处。

15.如权利要求13或14所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子19突变包含I744V、I744T L747S、L747FS、A755T、K757R和/或D761N。

16.如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子20的氨基酸763-823之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子20突变位于选自A763、S768、V769、H773、D770、V774、C775、S784、L792、G796、C797、S811和R776的一个或多个残基处。

18.如权利要求16或17所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子20突变包含D770insNPG、S784F、R776C、S768I、V774M、S768I、H773insAH、H773insNPH、V774A、V769L、V769M、S768dupSVD、A763insLQEA、L792H、G796D、S784F、C775Y和/或S811F。

19.如权利要求16-18中任一项所述的方法,其中所述一个或多个EGFR外显子20突变包

含D770insNPG、S784F、R776C、S768I、V774M、S768I、H773insAH、H773insNPH、V774A、V769L、V769M、S768dupSVD、A763insLQEA、L792H、G796D、G796S、S784F、C775Y和/或S811F。

20.如权利要求1-18中任一项所述的方法，其中所述一种或多种EGFRTKI抗性突变包含外显子21的氨基酸824-875之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。

21.如权利要求20所述的方法，其中所述一个或多个EGFR外显子21突变位于选自L833、V834、G836、V843、T854、L861、L861、L862、L844和L858的一个或多个残基处。

22.如权利要求20或21中任一项所述的方法，其中所述一个或多个EGFR外显子21突变可以包含L833F、V834L、L858R、L861Q、V843I、L861R、L862V、L844V、L861Q、G836S和/或T854I。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法，其中所述受试者已被确定具有2、3或4种EGFR TKI抗性突变。

24.如权利要求1-23中任一项所述的方法，其中先前已经向所述受试者施用了TKI。

25.如权利要求24所述的方法，其中所述受试者对先前施用的TKI耐药。

26.如权利要求24或25所述的方法，其中所述TKI是拉帕替尼、厄洛替尼、吉非替尼、诺司替尼、奥莫替尼、纳古替尼、奥希替尼、依鲁替尼或纳扎替尼。

27.如权利要求24-26中任一项所述的方法，其中所述TKI是吉非替尼、厄洛替尼或奥希替尼。

28.如权利要求24-27中任一项所述的方法，其中所述TKI是奥希替尼。

29.如权利要求1-28中任一项所述的方法，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变位于残基E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和/或L792处。

30.如权利要求1-29中任一项所述的方法，其中所述受试者已被确定在残基C797或T790处没有EGFR突变。

31.如权利要求1-30中任一项所述的方法，其中所述受试者被确定在残基T790处没有EGFR突变。

32.如权利要求1-29中任一项所述的方法，其中所述受试者具有T790突变。

33.如权利要求32所述的方法，其中所述受试者具有T790突变与至少一种另外的突变的组合。

34.如权利要求31所述的方法，其中所述受试者被确定在C797残基处具有突变。

35.如权利要求1-34中任一项所述的方法，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变选自由G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X组成的组，其中X是任何氨基酸。

36.如权利要求1-35中任一项所述的方法，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变选自由L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S组成的组。

37.如权利要求1-36中任一项所述的方法，其中通过分析来自患者的基因组样品来确定所述受试者具有EGFR TKI抗性突变。

38.如权利要求37所述的方法，其中所述基因组样品分离自唾液、血液、尿液、正常组织或肿瘤组织。

39.如权利要求1-38中任一项所述的方法，其中通过核酸测序或PCR分析确定EGFR TKI抗性突变的存在。

40.如权利要求1-39任一项所述的方法，其中口服施用喹唑啉胺衍生物类TKI。

41.如权利要求1-40中任一项所述的方法，其中每天施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI。

42.如权利要求41所述的方法，其中连续施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI。

43.如权利要求42所述的方法，其中以28天为周期施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI。

44.如权利要求1-43中任一项所述的方法，还包括施用另外的抗癌疗法。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述另外的抗癌疗法是化学疗法、放射疗法、基因疗法、手术、激素疗法、抗血管生成疗法或免疫疗法。

46.如权利要求44所述的方法，其中通过静脉内、皮下、骨内、口服、透皮、以缓释剂、以控释剂、以延迟释放剂、作为栓剂或舌下施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI和/或抗癌疗法。

47.如权利要求44所述的方法，其中施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI和/或抗癌疗法包括局部、区域性或全身施用。

48.如权利要求44所述的方法，其中两次或更多次施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI和/或抗癌疗法。

49.如权利要求1-48中任一项所述的方法，其中所述癌症为口腔癌、口咽癌、鼻咽癌、呼吸道癌、泌尿生殖癌、胃肠癌、中枢神经系统组织癌或外周神经系统组织癌、内分泌癌或神经内分泌癌或造血系统癌、胶质瘤、肉瘤、恶性上皮肿瘤、淋巴瘤、黑素瘤、纤维瘤、脑膜瘤、脑癌、口咽癌、鼻咽癌、肾癌、胆道癌、嗜铬细胞瘤、胰岛细胞癌、李法美尼肿瘤、甲状腺癌、甲状旁腺癌、垂体瘤、肾上腺肿瘤、骨肉瘤肿瘤、多发性神经内分泌肿瘤I型和II型、乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食道癌、气管癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。

50.如权利要求1-49中任一项所述的方法，其中所述癌症是非小细胞肺癌。

51.如权利要求1-50中任一项所述的方法，其中所述患者是人类。

52.一种用于已确定具有一种或多种EGFR TKI抗性突变的受试者的药物组合物，包含喹唑啉胺衍生物类TKI。

53.如权利要求52所述的组合物，其中所述组合物被进一步确定为口服组合物。

54.如权利要求52或53所述的组合物，其中所述组合物包含5-25mg的喹唑啉胺类衍生物类TKI。

55.如权利要求52-54中任一项所述的组合物，其中所述组合物被配制成片剂。

56.如权利要求52-55中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18、19、20或21处1-18个核苷酸的点突变、插入和/或缺失。

57.如权利要求52-56中任一项所述的组合物，其中所述受试者已被确定具有2、3或4种EGFR TKI抗性突变。

58.如权利要求52-57中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变位于残基E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和/或L792处。

59.如权利要求52-58中任一项所述的组合物，其中所述受试者已被确定在残基C797或T790处没有EGFR突变。

60.如权利要求52-59中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变选自由G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X组成的组，其中X是任何氨基酸。

61.如权利要求52-59中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种EGFR TKI抗性突变选自由L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S组成的组。

62.如权利要求52-61中任一项所述的组合物，其中所述受试者正在接受抗癌疗法的治疗。

63.一种预测患有癌症的受试者对单独的喹唑啉胺衍生物类TKI或喹唑啉胺衍生物类TKI与第二抗癌疗法的组合的反应的方法，包括检测从所述患者获得的基因组样品中的EGFR TKI抗性突变，其中如果所述样品对于所述EGFR TKI抗性突变的存在为阳性，则所述患者被预测为对单独的所述喹唑啉胺衍生物类TKI或所述喹唑啉胺衍生物类TKI与抗癌疗法的组合具有良好反应。

64.如权利要求63所述的方法，其中所述EGFR TKI抗性突变位于残基E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和/或L792处。

65.如权利要求63或64所述的方法，其中所述基因组样品分离自唾液、血液、尿液、正常组织或肿瘤组织。

66.如权利要求63-65中任一项所述的方法，其中通过核酸测序或PCR分析确定HER外显子21突变的存在。

67.如权利要求63-66中任一项所述的方法，其中所述EGFR TKI抗性突变选自由G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X组成的组，其中X是任何氨基酸。

68.如权利要求63-67中任一项所述的方法，其中所述EGFR TKI抗性突变选自由L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S组成的组。

69.如权利要求63-68中任一项所述的方法，其中对单独的所述喹唑啉胺衍生物类TKI或所述喹唑啉胺衍生物类TKI与抗癌疗法的组合的良好反应包括减小肿瘤大小或负荷、阻断肿瘤生长、减少肿瘤相关疼痛、减少癌症相关病理学、减少癌症相关症状、癌症无进展、增加无病间隔期、距进展的时间延长、诱导缓解、减少转移或增加患者存活。

70.如权利要求63-69中任一项所述的方法，还包括向被预测具有良好反应的所述患者施用单独的所述喹唑啉胺衍生物类TKI或所述喹唑啉胺衍生物类TKI与第二抗癌疗法的组合。

71.如权利要求63-70中任一项所述的方法，其中口服施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI。

72.如权利要求63-71中任一项所述的方法，其中以5-25mg的剂量施用所述喹唑啉胺衍生物类TKI。

73.如权利要求63-72中任一项所述的方法，其中所述喹唑啉胺衍生物类TKI被配制成片剂。

对携带酪氨酸激酶抑制剂抗性EGFR突变的癌细胞具有抗肿瘤活性的化合物

[0001] 本申请要求于2019年4月17日提交的美国临时专利申请第62/835,354号的权益，其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 1.领域

[0003] 本发明大体上涉及分子生物学和医学领域。具体而言，它涉及治疗具有酪氨酸激酶抑制剂抗性EGFR突变的患者的方法。

[0004] 2.相关技术的描述

[0005] 大约10％的非小细胞肺癌(NSCLC)具有表皮生长因子受体(EGFR)突变，导致对诸如吉非替尼、厄洛替尼(erlotinib)和奥希替尼(osimertinib)等酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的敏感性增加。最近，奥希替尼被批准用于EGFR突变NSCLC4的一线疗法，但原发抗性(de novo resistance)和获得性抗性仍然是许多患者的治疗障碍。一系列非典型和获得性EGFR突变可能潜在地导致奥希替尼抗性。研究已表明，这些非典型和获得性抗性突变改变了药物结合口袋的确认，导致药物与受体的结合亲和力改变，该口袋在奥希替尼的前面靠近溶剂。因此，对于治疗抗性EGFR突变癌症的新疗法的需求未得到满足。

[0006] 概述

[0007] 本公开的实施方案提供了用于治疗具有抗性EGFR突变的患者的癌症的方法和组合物。在第一个实施方案中，提供了治疗受试者的癌症的方法，包括向受试者施用有效量的喹唑啉胺衍生物类酪氨酸激酶抑制剂(TKI)，其中受试者已被确定具有一种或多种表皮生长因子受体(EGFR)TKI抗性突变。在在一些方面，患者是人类。

[0008] 在某些方面，喹唑啉胺衍生物类TKI是共价结合性喹唑啉胺TKI。在一些方面，共价结合性喹唑啉胺TKI是阿法替尼、他索替尼(tarloxotinib)-TKI、达克替尼、培利替尼或阿利替尼(allitinib)。在一些方面，喹唑啉胺衍生物类TKI是非共价结合性喹唑啉胺TKI。在一些方面，非共价结合性喹唑啉胺TKI是沙帕替尼(sapatinib)、AZD3759、瓦利替尼(Varlitinib)、TAK-285或吉非替尼。在某些方面，喹唑啉胺衍生物类TKI被配制成片剂。

[0009] 在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18、19、20或21处1-18个核苷酸的点突变、插入和/或缺失。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18的氨基酸688-728之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在具体方面，一个或多个EGFR外显子18突变位于选自E709、L718、G719、S720和G724的一个或多个残基处。在具体方面，一个或多个EGFR外显子18突变包含E709A、E790K、L718Q、L718V、G719A、G719S、S720P和/或G724S。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子19的氨基酸729-761之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在某些方面，一个或多个EGFR外显子19突变位于选自I744、L747、L747、A755、K757和/或D761的一个或多个残基处。在具体方面，一个或多个EGFR外显子19突变包含I744V、I744T、L747S、L747FS、A755T、K757R和/或D761N。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子20的氨基酸763-823之间

的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在某些方面，一个或多个EGFR外显子20突变位于选自A763、S768、V769、H773、D770、V774、C775、S784、L792、G796、C797、S811和R776的一个或多个残基处。在一些方面，一个个或多个EGFR外显子20突变包含D770insNPG、S784F、R776C、S768I、V774M、S768I、H773insAH、H773insNPH、V774A、V769L、V769M、S768dupSVD、A763insLQEA、L792H、G796D、G796S、S784F、C775Y和/或S811F。在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子21的氨基酸824-875之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在具体方面，一个或多个EGFR外显子21突变位于选自L833、V834、G836、V843、T854、L861、L861、L862、L844和L858的一个或多个残基处。在一些方面，一个或多个EGFR外显子21突变可以包含L833F、V834L、L858R、L861Q、V843I、L861R、L862V、L844V、L861Q、G836S和/或T854I。在一些方面，受试者已被确定具有2、3或4种EGFR TKI抗性突变。在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变位于残基E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和/或L792处。在一些方面，受试者已被确定在残基C797或T790处没有EGFR突变。在具体方面，受试者被确定在残基T790处没有EGFR突变。在其他方面，受试者被确定具有单独的T790突变或T790突变与另一突变的组合。在某些方面，受试者被确定在C797残基处具有突变。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变选自G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X，其中X是任何氨基酸。在具体方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变选自L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S。

[0010] 在一些方面，先前已经向受试者施用了TKI。在某些方面，受试者对先前施用的TKI具有抗性。在一些方面，TKI是拉帕替尼、阿法替尼、达克替尼、奥希替尼、依鲁替尼、纳扎替尼(nazatinib)、奥莫替尼、诺司替尼(rociletinib)、纳古替尼(naquotinib)或来那替尼。在具体方面，TKI是奥希替尼、依鲁替尼、纳扎替尼、奥莫替尼、诺司替尼或纳古替尼。在具体方面，TKI是奥希替尼。

[0011] 在某些方面，通过分析来自患者的基因组样品确定受试者具有EGFR TKI抗性突变。在一些方面，基因组样品分离自唾液、血液、尿液、正常组织或肿瘤组织。在某些方面，通过核酸测序或PCR分析确定EGFR TKI抗性突变的存在。

[0012] 在一些方面，口服施用喹唑啉胺衍生物类TKI。在某些方面，每天施用喹唑啉胺衍生物类TKI。在具体方面，连续施用喹唑啉胺衍生物类TKI。在一些方面，以28天为周期施用喹唑啉胺衍生物类TKI。

[0013] 在另外的方面，该方法还包括施用另外的抗癌疗法。在一些方面，另外的抗癌疗法是化学疗法、放射疗法、基因疗法、手术、激素疗法、抗血管生成疗法或免疫疗法。在具体方面，通过静脉内、皮下、骨内、口服、透皮、以缓释剂、以控释剂、以延迟释放剂、作为栓剂或舌下施用波齐替尼(poziotinib)和/或抗癌疗法。在一些方面，施用波齐替尼和/或抗癌疗法包括局部(local)、区域性(regional)或全身施用。在具体方面，两次或更多次施用波齐替尼和/或抗癌疗法。

[0014] 在一些方面，癌症是口腔癌、口咽癌、鼻咽癌、呼吸道癌、泌尿生殖癌、胃肠癌、中枢或外周神经系统组织癌、内分泌或神经内分泌癌或造血系统癌、胶质瘤、肉瘤、恶性上皮肿瘤(carcinoma)、淋巴瘤、黑素瘤、纤维瘤、脑膜瘤、脑癌、口咽癌、鼻咽癌、肾癌、胆道癌、嗜铬细胞瘤、胰岛细胞癌、李法美尼肿瘤、甲状腺癌、甲状旁腺癌、垂体肿瘤、肾上腺肿瘤、骨肉瘤肿瘤、多发性神经内分泌肿瘤I型和II型、乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食道癌、气管癌、

肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。在具体方面，癌症是非小细胞肺癌。

[0015] 本文还提供了用于已确定具有一种或多种EGFR TKI抗性突变的受试者的包含喹唑啉胺衍生物类TKI的药物组合物。在一些方面，组合物被进一步确定为口服组合物。在某些方面，组合物包含5-25mg喹唑啉胺衍生物类TKI。在一些方面，组合物被配制成片剂。在一些方面，受试者正在接受抗癌疗法的治疗。

[0016] 在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18、19、20或21处1-18个核苷酸的点突变、插入和/或缺失。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变突变包含外显子18的氨基酸688-728之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在具体方面，一个或多个EGFR外显子18突变位于选自E709、L718、G719、S720和G724的一个或多个残基处。在具体方面，一个或多个EGFR外显子18突变包含E709A、L718Q、L718V、G719A、G719S、S720P和/或G724S。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子19的氨基酸729-761之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在某些方面，一个或多个EGFR外显子19突变位于选自I744、L747、L747、A755、K757和/或D761的一个或多个残基处。在具体方面，一个或多个EGFR外显子19突变包含I744V、I744T、L747S、L747FS、A755T、K757R和/或D761N。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子20的氨基酸763-823之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在某些方面，一个或多个EGFR外显子20突变位于选自A763、S768、V769、H773、D770、V774、C775、S784、L792、G796、C797、S811和R776的一个或多个残基处。在一些方面，一个个或多个EGFR外显子20突变包含D770insNPG、S784F、R776C、S768I、V774M、S768I、H773insAH、H773insNPH、V774A、V769L、V769M、S768dupSVD、A763insLQEA、L792H、G796D、S784F、C775Y和/或S811F。在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子21的氨基酸824-875之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在具体方面，一个或多个EGFR外显子21突变位于选自L833、V834、G836、V843、T854、L861、L861、L862、L844和L858的一个或多个残基处。在一些方面，一个或多个EGFR外显子21突变可以包含L833F、V834L、L858R、L861Q、V843I、L861R、L862V、L844V、L861Q、G836S和/或T854I。在一些方面，受试者已被确定具有2、3或4种EGFR TKI抗性突变。在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变位于残基E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和/或L792处。在一些方面，受试者已被确定在残基C797或T790处没有EGFR突变。在具体方面，受试者被确定在残基T790处没有EGFR突变。在其他方面，受试者被确定具有单独的T790突变或T790突变与另一突变的组合。在某些方面，受试者被确定在C797残基处具有突变。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变选自G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X，其中X是任何氨基酸。在具体方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变选自L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S。

[0017] 另一个实施方案提供了预测患有癌症的受试者对单独或与第二抗癌疗法组合的喹唑啉胺衍生物类TKI的反应的方法，包括检测从所述患者获得的基因组样品中的EGFR TKI抗性突变，其中如果样品对于EGFR TKI抗性突变的存在为阳性，则患者被预测为对单独或与抗癌疗法组合的喹唑啉胺衍生物类TKI有良好反应。在一些方面，基因组样品分离自唾液、血液、尿液、正常组织或肿瘤组织。在某些方面，通过核酸测序或PCR分析确定HER外显子21突变的存在。

[0018] 在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18、19、20或21处1-18个核苷酸的点突变、插入和/或缺失。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子18的氨基酸688-728之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在具体方面，一个或多个EGFR外显子18突变位于选自E709、L718、G719、S720和G724的一个或多个残基处。在具体方面，一个或多个EGFR外显子18突变包含E709A、L718Q、L718V、G719A、G719S、S720P和/或G724S。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子19的氨基酸729-761之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在某些方面，一个或多个EGFR外显子19突变位于选自I744、L747、L747、A755、K757和/或D761的一个或多个残基处。在具体方面，一个或多个EGFR外显子19突变包含I744V、I744T、L747S、L747FS、A755T、K757R和/或D761N。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子20的氨基酸763-823之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在某些方面，一个或多个EGFR外显子20突变位于选自A763、S768、V769、H773、D770、V774、C775、S784、L792、G796、C797、S811和R776的一个或多个残基处。在一些方面，一个或多个EGFR外显子20突变包含D770insNPG、S784F、R776C、S768I、V774M、S768I、H773insAH、H773insNPH、V774A、V769L、V769M、S768dupSVD、A763insLQEA、L792H、G796D、S784F、C775Y和/或S811F。在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变包含外显子21的氨基酸824-875之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。在具体方面，一个或多个EGFR外显子21突变位于选自L833、V834、G836、V843、T854、L861、L861、L862、L844和L858的一个或多个残基处。在一些方面，一个或多个EGFR外显子21突变可以包含L833F、V834L、L858R、L861Q、V843I、L861R、L862V、L844V、L861Q、G836S和/或T854I。在一些方面，受试者已被确定具有2、3或4种EGFR TKI抗性突变。在某些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变位于残基E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和/或L792处。在一些方面，受试者已被确定在残基C797或T790处没有EGFR突变。在具体方面，受试者被确定在残基T790处没有EGFR突变。在其他方面，受试者被确定为具有单独的T790突变或T790突变与另一突变的组合。在某些方面，受试者被确定在C797残基处具有突变。在一些方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变选自G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X，其中X是任何氨基酸。在具体方面，一种或多种EGFR TKI抗性突变选自L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S。

[0019] 另一个实施方案提供对单独或与抗癌疗法组合的喹唑啉胺衍生物类TKI的有利反应，包括减小肿瘤大小或负荷、阻断肿瘤生长、减少肿瘤相关疼痛、减少癌症相关病理学、减少癌症相关症状、癌症无进展、增加无病间隔期、距进展的时间延长、诱导缓解、减少转移或增加患者存活。

[0020] 在另外的方面，所述方法还包括向被预测具有良好反应的所述患者施用单独或与第二抗癌疗法组合的喹唑啉胺衍生物类TKI。在一些方面，口服施用喹唑啉胺衍生物类TKI。在某些方面，以5-25mg的剂量施用喹唑啉胺衍生物类TKI。在一些方面，喹唑啉胺衍生物类TKI被配制成片剂。

[0021] 根据以下详细描述，本发明的其他目的、特征和优点会变得明显。然而，应当理解，该详细描述和具体实施例虽然表明了本发明的优选实施方案，但仅以示例的方式给出，因为根据该详细描述，在本发明的精神和范围内的多种变化和修改对于本领域技术人员而言会变得显而易见。

[0022] 附图简要说明

[0023] 下列附图构成本说明书的一部分，并被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一幅或多幅并结合本文提供的对具体实施方案的详细描述，可以更好地理解本发明。

[0024] 图1A-1D：在体外非典型EGFR突变中，第二代喹唑啉基TKI比诸如奥希替尼等第三代TKI更有效且更具选择性。(图1A)用所示抑制剂处理表达跨越外显子18-21的一级(primary)非典型突变的Ba/F3细胞72小时的Log IC_{50}值的热图。突变从最大抗性到最敏感从上到下排序，且药物从最低IC_{50}值到最高IC_{50}值从左到右排序。(图1B)表达跨越外显子18-21的一级非典型突变的Ba/F3细胞的IC_{50}值除以用所示抑制剂处理表达WT EGFR(+10ng/ml EGF)的Ba/F3细胞72小时的IC_{50}值的比值的热图。突变顺序与分图A保持相同，但药物从最大选择性到最小选择性从左到右重新排序。(图1C)表达非典型突变的Ba/F3细胞的IC_{50}值的平均值±SEM的条形图，按药物类别分开。N＝40个细胞系，且符号代表每个细胞系。通过ANOVA确定统计学显著性。(图1D)表达非典型突变的Ba/F3细胞的突变体/WT EGFR比值的平均值±SEM的条形图，按药物类别分开。N＝40个细胞系，符号代表每个细胞系。通过ANOVA确定统计显著性。

[0025] 图2A-2D：P环外显子18突变在体内导致对奥希替尼的原发性抗性，但不会导致对其他EGFR TKI的抗性。(图2A)携带EGFR外显子18P-环突变(G719A)的NSCLC的PDX模型用所示抑制剂处理28天的肿瘤生长曲线。(图(图2B)在用所示抑制剂处理后28天实验结束时G719A肿瘤体积百分比变化的平均值±SEM的条形图。符号代表个体小鼠。通过ANOVA和Tukey检验确定显著差异以进行多重比较。(图2C)具有非P环外显子18EGFR突变(E709K L858R)的NSCLC PDX模型用所示抑制剂处理28天的肿瘤生长曲线。(图2D)在用所示抑制剂处理后28天实验结束时E709K/L858R肿瘤体积百分比变化的平均值±SEM的条形图。符号代表个体小鼠。通过ANOVA和Tukey检验确定显著差异以进行多重比较。

[0026] 图3A-3D：获得性非典型突变驱动对奥希替尼的抗性，但对喹唑啉TKI敏感，并且对同时发生的突变的药物敏感性/抗性可能由一级突变驱动。(图3A)用所示抑制剂处理表达跨越外显子18-21的获得性非典型突变的Ba/F3细胞72小时的Log IC_{50}值的热图。突变从最大抗性到最敏感从上到下排序，且药物从最低IC_{50}值到最高IC_{50}值从左到右排序。(图3B)表达跨越外显子18-21的获得性非典型突变的Ba/F3细胞的IC_{50}值除以用所示抑制剂处理表达WT EGFR(+10ng/ml EGF)的Ba/F3细胞72小时的IC_{50}值的比值的热图。突变顺序与分图A保持相同，药物从最大选择性到最小选择性从左到右重新排序。(图3C-D)具有一级突变Ex19del(图3C)和L858R(图3D)和没有一级突变时，不同药物类别的突变体/WT比值的条形图。对于单独的一级突变(空心条)，符号代表各个药物的突变体/WT平均比值，而对于一级突变+非典型突变(实心条)，符号代表所示药物类别中所有药物对每个突变的突变体/WT平均比值。由于样品大小不对称，使用非参数学生t检验确定了统计学差异。

[0027] 图4A-4D：不论是一级突变(primary muation)还是三级突变(tertiary mutation)，T790M突变驱动对第一代和第二代药物的抗性，但独特的第三代TKI和药物重新目的化可以克服三级T790M阳性抗性。(图4A)表达与T790M突变同时发生的EGFR突变并用所示典型EGFR抑制剂处理72小时的Ba/F3细胞的Log IC_{50}值的热图。突变从最大抗性到最敏感从上到下排序，且药物从最低IC_{50}值到最高IC_{50}值从左到右排序。(图4B)表达与T790M突变

同时发生的EGFR突变的Ba/F3细胞的IC_{50}值除以用所示典型EGFR抑制剂处理表达WT EGFR(+10ng/ml EGF)的Ba/F3细胞72小时的IC_{50}值的比值的热图。突变的顺序与分图A保持相同,但对于典型EGFR抑制剂,药物从最大选择性到最小选择性从左到右重新排序。(图4C)表达与T790M突变同时发生的EGFR突变并用所示再利用抑制剂处理72小时的Ba/F3细胞的Log IC_{50}值的热图。突变顺序与分图A保持相同,且药物从最低IC_{50}值到最高IC_{50}值从左到右排列。(图4D)表达与T790M突变共同发生的EGFR突变的Ba/F3细细胞的IC_{50}值除以用所示再利用抑制剂处理表达WTEGFR(+10ng/ml EGF)的Ba/F3细胞72小时的IC_{50}值的比值的热图。突变顺序与分图A保持相同,但药物按最大选择性到最小选择性从左到右重新排序。

[0028] 示例性实施方案的描述

[0029] 本研究鉴定出遍布各种恶性肿瘤(例如NSCLC)的奥希替尼抗性EGFR突变。系统地评估了抗性突变对TKI的药物敏感性。发现抗性EGFR突变对第二代喹唑啉胺衍生物类TKI敏感。

[0030] 因此,本公开的某些实施方案提供了用于治疗具有奥希替尼抗性EGFR突变的癌症患者的方法。特别是,本发明的方法包括向经鉴定具有一种或多种奥希替尼抗性EGFR突变例如外显子18、19、20或21突变,诸如获得性非典型突变和/或典型突变的患者施用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI。第二代喹唑啉胺衍生物类TKI的尺寸和柔性(flexibility)克服了空间位阻,从而在低纳摩尔级浓度下抑制EGFR突变体。因此,第二代喹唑啉胺衍生物类TKI是可用于靶向奥希替尼抗性EGFR突变的有效EGFR抑制剂。

[0031] I.定义

[0032] 如本文在说明书中所用,“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”可表示一个/一种或多个/一种。如本文在权利要求中所用,当与词“包含/包括(comprising)”联用时,词“一个/一种(a)”“或“一个/一种(an)”可表示一个/一种或多个/多种。

[0033] 权利要求中使用术语“或”来意指“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,但是本公开支持仅指替代方案和“和/或”的定义。如本文所用,“另一个/另一种(another)”可以意指至少第二个/第二种或更多个/更多种。

[0034] 就指定组分而言,本文所用“基本上不含”在本文中用于意指,这些指定组分无一被有意地配制到组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。由组合物的任何不想要的污染导致的指定组分的总量通常低于组合物的1%,更优选低于0.1%,并且仍然更优选低于0.01%。最优选的是这样的组合物,其中用标准分析方法检测不到可测量量的指定组分。

[0035] 术语“主要(essentially)”应当理解为,方法或组合物仅包括指定步骤或材料,以及实质上不影响这些方法和组合物的基本特征和新特征的那些材料或步骤。

[0036] 术语“基本上不含(substantially free of)”用于表示98%的所列组分和少于2%的组合物或颗粒实质上不含的组分。

[0037] 本文所用术语“基本上”或“大约(approximately)”可用于修饰任何定量比较、值、测量或其他表示方式,其可被允许变化而不导致与其相关的基本功能发生变化。

[0038] 术语“约(about)”通常是指,在使用测量所述值的标准分析技术确定的所述值的标准偏差内。该术语也可以以所述值的±5%来使用。

[0039] “治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括(1)抑制正在经历或表现出疾病病理学或症状学的受试者或患者的该疾病(例如,阻止病理学和/或症状学的进一步发展),

(2)改善在正在经历或表现出疾病病理学或症状学的受试者或患者的该疾病(例如,逆转病理学和/或症状学),和/或(3)在正在经历或表现出疾病病理学或症状学的受试者或患者中实现该疾病的任何可测量的减轻。例如,治疗可包括施用有效量的第二代喹唑啉胺衍生物类TKI。

[0040] "预防性治疗"包括:(1)降低或减轻可能处于疾病的风险和/或倾向于患疾病但尚未经历或表现出该疾病的任何或所有病理学或症状学的受试者或患者发展疾病的风险,(2)减缓可能处于疾病的风险和/或倾向于患疾病但尚未经历或表现出该疾病的任何或所有病理学或症状学的受试者或者患者的疾病病理学或者症状学的发作。

[0041] 本文所用术语"患者"或"受试者"是指活的哺乳动物生物体,例如人类、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其转基因物种。在某些实施方案中,患者或受试者是灵长类动物。人类患者的非限制性实例是成人、青少年、婴儿和胎儿。

[0042] 在说明书和/或权利要求中使用的术语"有效"是指足以实现期望的、预期的或想要的结果。"有效量"、"治疗有效量"或"药学有效量"当在用化合物治疗患者或受试者的上下文中使用时是指,当该化合物施用于受试者或患者以治疗或预防疾病时,该化合物的足以实现该疾病的这种治疗或预防的量。

[0043] 本文所用术语"IC_{50}"是指为获得最大反应的抑制剂量的50%。这种定量测量表明需要多少具体药物或其他物质(抑制剂)才能将给定的生物、生化或化学过程(或过程的组分,即酶、细胞、细胞受体或微生物)抑制一半。

[0044] "抗癌"剂能够对受试者的癌细胞/肿瘤产生不利影响,例如,通过促进癌细胞杀伤,诱导癌细胞凋亡,降低癌细胞的生长速率,降低转移的发生率或数量,减小肿瘤大小,抑制肿瘤生长,减少肿瘤或癌细胞的血液供应,促进针对癌细胞或肿瘤的免疫反应,阻止或抑制癌症的进展,或增加患有癌症的受试者的寿命。

[0045] 术语"插入"或"插入突变"是指将一个或多个核苷酸碱基对添加到DNA序列中。

[0046] "杂交(hybridize)"或"杂交(hybridization)"是指核酸之间的结合。杂交条件可根据要结合的核酸的序列同源性而变化。因此,如果主题核酸之间的序列同源性高,则使用严格条件。如果序列同源性低,则使用温和的条件。当杂交条件严格时,杂交特异性增加,且这种杂交特异性的增加导致非特异性杂交产物的产量降低。然而,在温和的杂交条件下,杂交特异性降低,且这种杂交特异性的降低导致非特异性杂交产物的产量增加。

[0047] "探针(probe)"或"探针(probes)"是指长度为至少八(8)个核苷酸并且由于探针中至少一条序列与靶区域中序列的互补性而与靶序列形成杂交体结构的多核苷酸。多核苷酸可包括DNA和/或RNA。在某些实施方案中,探针被可检测地标记。探针的大小可以有很大差异。通常,探针的长度为例如至少8-15个核苷酸。其他探针的长度为例如至少20、30或40个核苷酸。还有一些探针稍微更长一些,例如长度为至少50、60、70、80或90个核苷酸。探针也可以具有落入前述范围内的任何具体长度。优选地,探针不含有与用于在聚合酶链式反应期间引发靶序列的序列互补的序列。

[0048] "寡核苷酸"或"多核苷酸"是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的单链或双链聚合物,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。

[0049] "修饰的核糖核苷酸"或脱氧核糖核苷酸是指,可用于代替核酸中天然存在的碱基的分子,包括但不限于修饰的嘌呤和嘧啶,稀有碱基,可转换(convertible)核苷,嘌呤和嘧

啶的结构类似物,标记的、衍生的和修饰的核苷和核苷酸,共轭核苷和核苷酸,序列修饰物,末端修饰物,间隔子修饰物,以及具有主链修饰的核苷酸,所述主链修饰包括但不限于核糖修饰的核苷酸、氨基磷酸酯(phosphoramidate)、硫代磷酸酯、亚磷酰胺(phosphonamidite)、甲基膦酸酯、甲基亚磷酰胺(methyl phosphoramidite)、甲基亚膦酰胺(methyl phosphonamidite)、5'-β-氰乙基亚磷酰胺(5'-β-cyanoethyl phosphoramidite)、亚甲基膦酸酯、二硫代磷酸酯、肽核酸、非手性和中性核苷酸间键(internucleotidic linkage)。

[0050] "变体"是指分别相对于野生型或受试者群体中最普遍的形式,因一个或多个核苷酸或氨基酸的交换、缺失或插入而不同的多核苷酸或多肽。交换、缺失或插入的核苷酸或氨基酸的数量可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多,例如25、30、35、40、45或50个。

[0051] "引物"或"引物序列"是指与靶核酸序列(例如,要扩增的DNA模板)杂交以引发核酸合成反应的寡核苷酸。引物可以是DNA寡核苷酸、RNA寡核苷酸或嵌合序列。引物可以含有天然、合成或修饰的核苷酸。引物长度的上限和下限都是凭经验确定的。引物长度的下限是在核酸扩增反应条件下与靶核酸杂交后形成稳定双链体所需的最小长度。在这种杂交条件下,非常短的引物(长度通常少于3-4个核苷酸)不会与靶核酸形成热力学稳定的双链体。上限通常由在靶核酸中预定核酸序列以外的区域中形成双链体的可能性来确定。通常,合适的引物长度在约10至约40个核苷酸长的范围内。在某些实施方案中,例如,引物的长度可以为10-40、15-30或10-20个核苷酸长。当置于适当条件下时,引物能够在多核苷酸序列上作为合成起始点。

[0052] "检测(detect)"、"可检测的(detectable)"及其语法等效物是指确定靶核酸序列的存在和/或数量和/或身份的方式。在一些实施方案中,检测发生在扩增靶核酸序列时。在其他实施方案中,靶核酸的测序可以表征为"检测"该靶核酸。连接于探针的标记可以包括可通过例如化学或物理方式检测的本领域已知的多种不同标记中的任一种。可以连接于探针的标记可以包括例如荧光材料和发光材料。

[0053] "扩增(amplifying)"、"扩增(amplification)"及其语法等同体是指以依赖模板的方式复制靶核酸序列的至少一部分的任何方法,包括但不限于,用于以线性或指数方式扩增核酸序列的大量技术。用于进行扩增步骤的示例性手段包括,连接酶链式反应(LCR)、连接酶检测反应(LDR)、连接后Q-复制酶扩增、PCR、引物延伸、链置换扩增(SDA)、超支化(hyperbranched)链置换扩增、多重置换扩增(MDA)、核酸链基扩增(NASBA)、两步多重扩增(two-step multiplexed amplification)、滚环扩增(RCA)、重组酶-聚合酶扩增(RPA)(TwistDx,Cambridg,UK)和自持序列复制(3SR),包括其多重化形式或组合,例如但不限于OLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、PCR/LCR(也称为组合链式反应-CCR)等。此类技术的描述尤其可见于Sambrook et al.Molecular Cloning,3rd Edition(分子克隆,第三版)。

[0054] 本文通常使用的"药学上可接受的"是指,在合理医学判断范围内、适合用于与人类和动物的组织、器官和/或体液接触,但没有过度毒性、刺激、过敏反应或与合理的益处/风险比相称的其他问题或并发症的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0055] "药学上可接受的盐"是指,如上所定义的药学上可接受的并且具有所需的药理学

活性的本发明化合物的盐。此类盐的非限制性实例包括与无机酸或与有机酸形成的酸加成盐，无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸；有机酸例如1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、2-萘磺酸、3-苯基丙酸、4,4'-亚甲基双(3-羟基-2-烯-1-羧酸)、4-甲基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸、乙酸、脂肪族一元和二元羧酸、脂肪族硫酸、芳香族硫酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环戊烷丙酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡糖酸、谷氨酸、乙醇酸、庚酸、己酸、羟萘甲酸、乳酸、十二烷基硫酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘康酸、邻-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、草酸、对氯苯磺酸、苯基取代的链烷酸、丙酸、对甲苯磺酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、四丁基乙酸和三甲基乙酸。药学上可接受的盐还包括，当存在的酸性质子能够与无机碱或有机碱反应时可以形成的碱加成盐。可接受的无机碱包括氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、氢氧化铝和氢氧化钙。可接受的有机碱的非限制性实例包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇和N-甲基葡糖胺。应当认识到，构成本发明任何盐的一部分的具体阴离子或阳离子不是关键的，只要盐作为一个整体是药理学上可接受的即可。药学上可接受的盐的其他实例及其制备和使用方法提供于Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,and Use(药用盐手册:性质和使用)(P.H.Stahl& C.G.Wermuth eds.,Verlag Helvetica Chimica Acta,2002)。

[0056] II.抗性EGFR突变

[0057] 本公开的某些实施方案涉及确定受试者是否具有一种或多种奥希替尼抗性EGFR突变，例如外显子18、19、20或21突变。受试者可以具有2、3、4或更多个EGFR外显子20突变。一个或多个EGFR突变可以位于选自E709、L718、G719、G724、C797、V843、T854、L861和L792的一个或多个残基处。一个或多个EGFR突变可以是G719X、E709X、G724S、L718X、L861Q、T8541、V8431、C797S和/或L792X，其中X是任何氨基酸。突变检测方法是本领域已知的，包括PCR分析和核酸测序以及FISH和CGH。在具体方面，通过DNA测序，例如从肿瘤DNA或来自血浆的循环游离DNA检测EGFR突变。

[0058] EGFR外显子18突变可包含外显子18的氨基酸688-728之间的一个或多多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸，所述缺失为氨基酸框内缺失。一个或多个EGFR外显子18突变可以位于选自E709、L718、G719、S720和G724的一个或多个残基处。一个或多个EGFR外显子18突变可以包含E709A、L718Q、L718V、G719A、G719S、S720P和G724S。

[0059] EGFR外显子19突变可以在外显子19的氨基酸729-761之间的一个或多个点突变、插入和/或的缺失3-18个核苷酸，所述缺失为氨基酸框内缺失。一个或多个EGFR外显子19突变可以位于选自I744、L747、L747、A755、K757和/或D761的一个或多个残基处。一个或多个EGFR外显子19突变可以包含I744V、I744T L747S、L747FS、A755T、K757R和/或D761N。

[0060] EGFR外显子20突变可包含氨基酸763-823之间的一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。一个或多个EGFR外显子20突变可以位于选自G724、A763、S768、V769、H773、V774、C775、S784、G796、C797、S811和R776的一个或多个残基处。一个或多个EGFR外显子20突变可以包含S784F、R776C、S768I、V774M、S768I、H773insAH、V774A、V769M、S768dupSVD、A763insLQEA、G796D、S784F、C775Y和/或S811F。

[0061] EGFR外显子21突变可包含外显子21的氨基酸824-875之间、其间的氨基酸框内缺失之间包含一个或多个点突变、插入和/或缺失3-18个核苷酸。一个或多个EGFR外显子19突变可以位于选自S784、G796、C797、S811、L833、G836、V843、T854、L861、L861、L862、L844和

L858的一个或多个残基处。一个或多个EGFR外显子21突变可以包含L858R、L833F、L861Q、V843I、L861R、L862V、L844V、L861Q、G836S和/或T854I。

[0062] 在一些方面，受试者可能在EGFR残基C797处具有或发展突变，该突变可以导致对TKI，例如第二代喹唑啉胺衍生物类TKI的抗性。因此，在某些方面，确定受试者在EGFR C797和/或T790处没有突变，例如C797S和/或T790M。在一些方面，可以向具有T790突变例如T790M的受试者施用奥希替尼，并且可以向具有C797突变例如C797S的受试者施用化学疗法和/或放射疗法。例如，如果C797S是在典型EGFR突变(例如，L858R或外显子19缺失)的背景下获得的，而T790M不存在，则这些突变可能对喹唑啉胺TKI敏感。然而，如果C797S突变是与T790M突变或外显子20插入突变一起获得的，则这些突变可能对喹唑啉胺TKI具有抗性。此外，如果T790M突变是与典型突变(例如L858R或外显子19缺失)一起获得的，则这些突变可能对喹唑啉胺TKI具有抗性，但对奥希替尼无抗性。此外，在体外，当T790M突变是与外显子18点突变(G719X/T790M)一起获得的时，这些突变似乎对喹唑啉胺TKI敏感。在一些方面，L858R/C797S、Ex19del/C797S或G719X/T790M突变体对喹唑啉胺TKI敏感。然而，在某些方面，L858R/T790M/C797S、外显子19缺失/T790M/C797s和外显子20插入+C797S或T790M突变体对EGFR TKI具有抗性。

[0063] 患者样品可以是任何包括来自受试者肺癌的核酸的身体组织或流体。在某些实施方案中，样品是包含循环肿瘤细胞或无细胞DNA的血液样品。在其他实施方案中，样品可以是组织，例如肺组织。肺组织可以来自肿瘤组织，并且可以是新鲜冷冻的或福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)。在某些实施方案中，获得肺肿瘤FFPE样品。

[0064] 适用于本文所述方法的样品含有遗传材料，例如基因组DNA(gDNA)。基因组DNA通常从生物样品中提取，例如血液或口腔内壁的黏膜刮屑(scraping)，但也可以从其他生物样品中提取，包括尿液、肿瘤或咳吐物(expectorant)。样品本身通常包括有核细胞(例如血液细胞或口腔细胞)或从受试者取出的组织，包括正常组织或肿瘤组织。用于获得、处理和分析样品的方法和试剂是本领域已知的。在一些实施方案中，在例如抽血的医疗保健提供者的帮助下获得样品。在一些实施方案中，在没有医疗保健提供者的帮助下获得样品，例如，在非侵入性获得样品的情况下，例如使用口腔拭子或刷子获得的、包含口腔细胞的样品，或漱口水样品。

[0065] 在某些情况下，可以处理生物样品以进行DNA分离。例如，可以将细胞样品或组织样品中的DNA与样品的其他组分分离。可以使用本领域已知的标准技术从生物样品中收获细胞。例如，可以通过离心细胞样品并重悬浮沉淀的细胞来收获细胞。可以将细胞重悬浮于缓冲溶液，例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。在离心细胞悬浮液以获得细胞团块后，可以裂解细胞以提取DNA，例如gDNA。参见，例如Ausubel et al.(2003)。可以浓缩和/或纯化样品以分离DNA。从受试者获得的所有样品，包括那些经过任何类型的进一步处理的样品，都视为是从受试者获得的。可使用常规方法从生物样品中提取基因组DNA，包括例如苯酚提取。或者可以使用诸如QIAamp®组织试剂盒(Qiagen,Chatsworth,Calif.)和Wizard®基因组DNA纯化试剂盒(Promega)等试剂盒提取基因组DNA。样品来源的非限制性例子包括尿液、血液和组织。

[0066] 可以使用本领域已知的方法确定本文所述抗性EGFR突变是否存在。例如，凝胶电泳、毛细管电泳、尺寸排阻层析、测序和/或阵列可用于检测插入突变的存在或不存在。在需

要时，可以使用本领域已知的方法，例如PCR，来完成核酸的扩增。在一个实例中，从受试者获得样品(例如，包含基因组DNA的样品)。然后检查样品中的DNA，以确定本文所述插入突变的身份。可以通过本文所述的任何方法，例如通过测序，或通过将基因组DNA、RNA或cDNA中的基因与核酸探针例如DNA探针(其包括cDNA和寡核苷酸探针)或RNA探针杂交，检测插入突变。可以将核酸探针设计为与具体变体特异性杂交或优先杂交。

[0067] 一组探针通常是指一组用于检测本公开的可操作治疗建议中使用的靶遗传变异(例如，EGFR突变)的引物，通常是引物对，和/或可检测地标记的探针。在扩增反应中使用引物对来界定跨越每个上述基因的靶遗传变异的扩增子。由一组匹配的探针检测该组扩增子。在示例性实施方案中，本发明的方法可以使用用于检测一组靶遗传变异诸如EGFR突变的TaqManTM(Roche Molecular Systems,Pleasanton,Calif.)测定。在一个实施方案中，该组探针是用于生成扩增子的一组引物，该扩增子通过诸如下一代测序反应等核酸测序反应检测。在这些实施方案中，例如，可以采用AmpliSEQTM(Life Technologies/Ion Torrent,Carlsbad,Calif.)或TruSEQTM(Illumina,San Diego,Calif.)技术。

[0068] 对核酸标志物的分析可以使用本领域已知的技术来进行，包括但不限于序列分析和电泳分析。序列分析的非限制性实例包括Maxam-Gilbert测序、Sanger测序、毛细管阵列DNA测序、热循环测序(Sears et al.,1992)、固相测序(Zimmerman et al.,1992)、质谱测序例如基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS;Fu et al.,1998)和杂交测序(Chee et al.,1996;Drmanac et al.,1993;Drmanac et al.,1998)。电泳分析的非限制性实例包括平板凝胶电泳，例如琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管电泳和变性梯度凝胶电泳。此外，可以使用来自公司例如Life Technologies/Ion Torrent PGM或Proton、Illumina HiSEQ或MiSEQ以及Roche/454下一代测序系统的市售试剂盒和仪器进行下一代测序方法。

[0069] 其他核酸分析方法可以包括直接手动测序(Church and Gilbert,1988;Sanger et al.,1977;美国专利第5,288,644号)；自动荧光测序；单链构象多态性分析(SSCP)(Schafer et al.,1995)；钳夹变性凝胶电泳(CDGE)；二维凝胶电泳(2DGE或TDGE)；构象敏感凝胶电泳(CSGE)；变性梯度凝胶电泳(DGGE)(Sheffield et al.,1989)；变性高效液相色谱(DHPLC,Underhill et al.,1997)；红外基质辅助激光解吸/电离(IR-MALDI)质谱(WO 99/57318)；迁移率变化分析(Orita et al.,1989)；限制酶分析(Flavell et al.,1978;Geever et al.,1981)；实时定量PCR(Raca et al.,2004)；异源双链分析；化学错配切割(CMC)(Cotton et al.,1985)；RNA酶保护测定(Myers et al.,1985)；使用识别核苷酸错配的多肽，例如大肠杆菌(E.coli)的mutS蛋白；等位基因特异性PCR，以及这些方法的组合。参见，例如，美国专利公开第2004/0014095号，其全部内容通过引用并入本文。

[0070] 在一个实例中，鉴定样品中EGFR突变的方法包括，使来自所述样品的核酸与能够与编码突变EGFR蛋白或其包含突变的片段的核酸特异性杂交的核酸探针接触，和检测所述杂交。在具体实施方案中，所述探针用例如放射性同位素(^{3}H、^{32}P或^{33}P)、荧光剂(若丹明或荧光素)或显色剂可检测地标记。在具体实施方案中，探针是反义寡聚体，例如PNA、吗啉代-氨基磷酸酯、LNA或2'-烷氧基烷氧基。探针可以为约8个核苷酸至约100个核苷酸，或约约10至约75个、或约15至约50个、或约20至约30个核苷酸。在另一方面，将本公开的所述探针提供在试剂盒中，用于鉴定样品中的EGFR突变，所述试剂盒包括与EGFR基因中的突变位点特异

性杂交或邻近该位点杂交的寡核苷酸。该试剂盒还可以包括基于使用该试剂盒的杂交测试结果，使用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI治疗患有含有EGFR突变的肿瘤的患者的说明书。

[0071] 另一方面，检测样品中EGFR突变的方法包括，从所述样品扩增对应于所述EGFR基因或其疑似含有突变的片段的核酸，并将扩增的核酸的电泳迁移率与相应野生型EGFR基因或其片段的电泳迁移率进行比较。迁移率的差异指示扩增的核酸序列中存在突变。可以在聚丙烯酰胺凝胶上测定电泳迁移率。

[0072] 或者，可以使用酶促突变检测(EMD)(Del Tito et al.,1998)分析核酸以检测突变。EMD使用噬菌体解离酶T_4内切核酸酶VII，该酶沿着双链DNA进行扫描，直到它检测并切割由点突变、插入和缺失导致的碱基对错配引起的结构扭曲。例如通过凝胶电泳检测通过解离酶切割形成的两个短片段，指示存在突变。EMD方法的优点是，使用单一方案来鉴别直接从PCR反应测定的点突变、缺失和插入，消除了对样品纯化的需要，从而缩短杂交时间并提高信噪比。可以分析含有高达20倍过量的正常DNA和尺寸高达4kb的片段的混合样品。然而，EMD扫描不能鉴定突变阳性样品中发生的具体碱基变化，如有必要，需要另外的测序程序来鉴定该突变。如美国专利第5,869,245号所证明的，可以使用类似于解离酶T_4内切核酸酶VII的CEL I酶。

[0073] III.治疗方法

[0074] 本文还提供了治疗或延迟个体癌症进展的方法，包括向确定具有抗性EGFR突变的受试者施用有效量的第二代喹唑啉胺衍生物类TKI或结构相似的抑制剂。受试者可以具有不止一种EGFR突变。

[0075] 预期待被治疗的癌症的实例包括肺癌、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠癌、淋巴瘤、肺癌前病变、结肠癌、黑色素瘤和膀胱癌。在具体方面，癌症是非小细胞肺癌。

[0076] 在一些实施方案中，受试者是哺乳动物，例如灵长类动物，优选高等灵长类动物，例如人类(例如，患本文所述病症或处于患本文所述病症的风险的患者)。在一个实施方案中，受试者需要增强免疫反应。在某些实施方案中，受试者是免疫功能受损的，或处于免疫功能受损的风险。例如，受试者正在接受或已经接受化疗治疗和/或放射疗法。或者，或组合地，受试者由于感染而导致免疫功能受损或处于免疫功能受损的风险。

[0077] 某些实施方案涉及向确定具有奥希替尼抗性EGFR突变的受试者施用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI。可以口服施用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI，例如以片剂形式。可以以4-25mg剂量，例如以5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24mg的剂量，施用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI。给药可以是每天、每隔一天、每3天或每周一次。给药可以连续进行，例如以28天为周期。

[0078] 奥希替尼、化学疗法和/或放射疗法可以单独施用或与第二代喹唑啉胺衍生物类TKI组合施用。可以以25-100mg的剂量，例如约40mg或80mg，施用奥希替尼。给药可以是每天、每隔一天、每2天、每3天或每周一次。可以口服施用奥希替尼，例如以片剂形式。

[0079] A.药物组合物

[0080] 本文还提供了用于确定具有抗性EGFR突变的受试者的药物组合物和制剂，其包含第二代喹唑啉胺衍生物类TKI和药学上可接受的载体。

[0081] 可以通过将具有所需纯度的活性成分(例如抗体或多肽)与一种或多种任选的药

学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition(雷明顿药物学,第22版),2012)混合来制备冻干制剂或水溶液形式的本文所述药物组合物和制剂。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,例如钠;金属配合物(例如锌-蛋白质配合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如可溶性人PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP(包括rHuPH20)和使用方法描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。一方面,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0082] B.联合疗法

[0083] 在某些实施方案中,本发明实施方案的组合物和方法涉及与至少一种另外的疗法组合的第二代喹唑啉胺衍生物类TKI。另外的疗法可以是放射疗法、手术(例如,乳房肿瘤切除术和乳房切除术)、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法或前述疗法的组合。另外的疗法可以为辅助疗法或新辅助疗法的形式。

[0084] 在一些实施方案中,另外的疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施方案中,另外的疗法是施用副作用限制剂(例如,旨在减少治疗副作用的发生和/或严重程度的药剂,例如止吐剂等)。在一些实施例中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,另外的疗法是手术。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法与手术的组合。在一些实施方案中,另外的疗法是γ辐射。在一些实施方案中,另外的疗法是靶向PBK/AKT/mTOR途径、HSP90抑制剂、微管蛋白抑制剂、凋亡抑制剂和/或化学预防剂的疗法。另外的疗法可以是本领域已知的一种或多种化学治疗剂。

[0085] 相对于另外的癌症疗法,例如免疫检查点疗法,可以在各种组合之前、期间、之后或以各种组合施用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI。施用间隔可以从同时到几分钟到几天到几周。在将第二代喹唑啉胺衍生物类TKI与另外的治疗剂分开提供给患者的实施方案中,通常会确保在每次递送之间没有很长的时间段,使得这两种化合物仍能够对患者产生有利的联合效果。在这种情况下,预期可以在彼此相隔约12-24或72小时内,更具体而言,彼此相隔约6-12小时内向患者提供抗体疗法和抗癌疗法。在一些情况下,如果各自施用之间间隔几天(2、3、4、5、6或7)到几周(1、2、3、4、5、6、7、或8),可能需要显著延长治疗时间。

[0086] 可以采用各种组合。对于下文的实例而言,第二代喹唑啉胺衍生物类TKI为"A",抗癌疗法为"B":

[0087] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A 。

[0088] 考虑到药剂的毒性(如果有的话),将本实施方案的任何化合物或疗法施用至患者应当遵循用于施用此类化合物的一般方案。因此,在一些实施方案中,存在监测可归因于联合疗法的毒性的步骤。

[0089] 1.化学疗法

[0090] 根据本发明的实施方案,可以使用各种各样的化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示在癌症治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物根据其在细胞内的活性模式来分类,例如,它们是否以及在哪个阶段影响细胞周期。或者,药剂可基于其直接交联DNA、嵌入DNA或通过影响核酸合成诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征。

[0091] 化学治疗剂的实例包括烷化剂,例如噻替哌和环磷酰胺;烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌、美托替哌(meturedopa)和瑞多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺(trietylenephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(尤其是布拉他辛和布拉他辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利司他丁(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(cryptophycin)(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素(dolastatin);倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);五加素(eleutherobin);水鬼蕉碱;肉球菌素(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥类,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺和乌拉莫司汀;亚硝基脲类,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷尼司汀(ranimnustine);抗生素类,例如烯二炔抗生素类(例如,卡奇霉素(calicheamicin),尤其是卡奇霉素γlI和卡奇霉素ωI1);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双膦酸盐,例如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌素生色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(包括吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、2-吡咯并-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链霉黑素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁和佐柔比星;抗代谢物,例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、蝶罗呤和三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨和氟尿苷;雄激素,

例如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷和睾内酯;抗肾上腺素,例如米托坦和曲洛司坦;叶酸补充剂,例如弗林酸(frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶、阿莫斯汀(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;亚丝醌;艾氟米辛(elformithine);依利醋铵;埃博霉素;乙环氧啶;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登素类,例如美登木素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫达醇(mopidanmol);二胺硝呢(nitraerine);喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;甲基苄肼;PSK多糖复合物;雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯毒素(尤其是T-2毒素、犹孢菌素A(verracurin A)、漆斑菌素A和蛇形菌素(anguidine));氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;伽胞嘧啶;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;紫杉烷类,例如紫杉醇和多西他赛、吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;铂配位化合物,例如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺凡特龙(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇类,例如视黄酸;卡培他滨;卡铂、甲基苄肼、普卡霉素、吉西他滨、诺维苯(navelbine)、法呢基-蛋白转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)和任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0092] 2.放射疗法

[0093] 导致DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括通常已知的γ射线、X射射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。还考虑了其他形式的DNA损伤因素,例如微波、质子束照射(美国专利第5,760,395号和第4,870,287号)和紫外线照射。很可能所有这些因素都会对DNA、对DNA前体、对DNA复制和修复以及对染色体的组装和维持产生广泛的损伤。X射线的剂量范围从每天50-200伦琴的长时间(3-4周)剂量到2000-6000伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大,并取决于同位素的半衰期、发射辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的吸收。

[0094] 3.免疫疗法

[0095] 本领域技术人员应当理解,另外的免疫疗法可以与实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的背景下,免疫疗法通常依赖于免疫效应细胞以及靶向和破坏癌细胞的分子的使用。利妥昔单抗(RITUXAN®)就是这样实例。免疫效应物可以是,例如,对肿瘤细胞表面上的一些标志物具有特异性的抗体。单独的抗体可以作为治疗的效应物,或者它可以招募其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并用作靶向剂。或者,效应物可以是携带直接或间接与肿瘤细胞靶标相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0096] 抗体-药物缀合物已成为开发癌症治疗剂的突破性方法。癌症是世界上导致死亡的主要原因之一。抗体药物缀合物(ADC)包含与细胞杀伤药物共价连接的单克隆抗体(MAb)。这种方法将MAb对其抗原靶标的高特异性与高效细胞毒性药物相结合,从而产生将有效载荷(药物)递送至具有富集水平的抗原的肿瘤细胞的"武装的"MAb。药物的靶向递送

也最大限度地减少了其在正常组织中的暴露,从而降低了毒性并提高了治疗指数。FDA批准的两种ADC药物,即2011年批准的ADCETRIS®(维布妥昔单抗(brentuximab vedotin))和2013年批准的KADCYLA®(曲妥珠单抗美坦新偶联物(trastuzumab emtansine)或T-DM1)验证了该方法。目前有30多种ADC候选药物处于癌症治疗临床试验的各个阶段(Leal et al.,2014)。随着抗体工程和接头-有效载荷(linker-payload)优化越来越成熟,新ADC的发现和开发越来越依依赖于适合这种方法的新靶标的鉴定和验证以及靶向MAb的生成。ADC靶标的两个标准是在肿瘤细胞中的表达上调/高水平和稳健的内化。

[0097] 在免疫疗法的一个方面,肿瘤细胞必须携带适合靶向,即不存在于大多数其他细胞上的某标志物。存在许多肿瘤标志物,并且在本实施方案的背景中,这些标志物中的任何一种都可能适合被靶向。常见的肿瘤标志物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、层黏连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的另一方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,例如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、γ-IFN、趋化因子,例如MIP-1、MCP-1、IL-8,以及生长因子,例如FLT3配体。

[0098] 免疫疗法的实例包括免疫佐剂,例如牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、二硝基氯苯和芳香族化合物(美国专利第5,801,005号和第5,739,169号;Hui and Hashimoto,1998;Christodoulides et al.,1998)、细胞因子疗法,例如干扰素α、β和γ,IL-1、GM-CSF和TNF(Bukowski et al.,1998;Davidson et al.,1998;Hellstrand et al.,1998);基因疗法,例如TNF、IL-1、IL-2和p53(Qin et al.,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利第5,830,880号和第5,846,945号);以及单克隆抗体,例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2和抗p185(Hollander,2012;Hanibuchi et al.,1998;美国专利第5,824,311号)。预期一种或多种抗癌疗法可与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0099] 在一些实施方案中,免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点要么调高信号(例如,共刺激分子)要么降低信号。免疫检查点阻断可以靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体(A2AR)、B7-H3(也称为CD276)、B和T淋巴细胞衰减子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,也称为CD152)、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白(KIR)、淋巴细胞活化基因3(LAG3)、程序性死亡因子1(PD-1)、T细胞免疫球蛋白结构域和黏蛋白结构域3(TIM-3)和T细胞激活抑制物Ig V结构域(VISTA)。特别地,免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0100] 免疫检查点抑制剂可以是药物例如小分子、配体或受体的重组形式,或者特别地是抗体,例如人抗体(例如,国际专利公开WO2015016718;Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012;两者均通过引用并入本文)。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂,特别是可以使用嵌合、人源化或人源形式的抗体。如技术人员应当知道的,本公开中提及的某些抗体可使用替代名称和/或等效名称。在本发明的上下文中,这类替代和/或等效名称是可互换的。例如,众所周知,帕博利珠单抗(lambrolizumab)也以替代和等效名称MK-3475和派姆单抗(pembrolizumab)为人所知。

[0101] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PDL1结合配偶体是PD-1和/或

B7-1。在另一个实施方案中，PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在具体方面，PDL2结合配偶体是PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利号8,735,553、8,354,509和8,008,449中，上述专利均通过引用并入本文。用于本文提供的方法中的其他PD-1轴拮抗剂是本领域已知的，例如美国专利公开号US20140294898、US2014022021和US20110008369中描述的，上述专利公开均通过引用并入本文。

[0102] 在一些实施方案中，PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如，人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中，抗PD-1抗体选自纳武单抗、派姆单抗和CT-011。在一些实施方案中，PD-1结合拮抗剂是免疫黏附素(例如，包含PDL1或PDL2的融合到恒定区(例如，免疫球蛋白序列的Fc区)的细胞外部分或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些实施方案中，PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗，也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和OPDIVO®，是描述于WO2006/121168中的抗PD-1抗体。派姆单抗，也称为MK-3475、Merck 3475、帕博利珠单抗、KEYTRUDA®和SCH-900475，是描述于WO2009/114335中的抗PD-1抗体。CT-011，也称为hBAT或hBAT-1，是描述于WO2009/101611中的抗PD-1抗体。AMP-224，也称为B7-DCIg，是描述于WO2010/027827和WO2011/066342中的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0103] 可以在本文提供的方法中靶向的另一免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)，也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4存在于T细胞表面，且当与抗原呈递细胞表面的CD80或CD86结合时充当“关闭”开关。CTLA4是在辅助性T细胞表面表达并向T细胞传递抑制信号的免疫球蛋白超家族成员。CTLA4类似于T细胞共刺激蛋白CD28，且这两种分子都与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(也分别称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4向T细胞传递抑制信号，而CD28则传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中，且可能对其功能很重要。通过T细胞受体和CD28激活T细胞会导致CTLA-4即B7分子的抑制性受体的表达增加。

[0104] 在一些实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如，人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。

[0105] 可以使用本领域公知的方法生成适用于本发明方法的抗人CTLA-4抗体(或从其衍生的VH和/或VL结构域)。或者，可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如，本文公开的方法可以使用以下公开的抗CTLA-4抗体：美国专利第8,119,129号；国际专利公开号WO 01/14424、WO 98/42752和WO 00/37504(CP675,206，也称为曲美木单抗(tremelimumab)；以前称为替西木单抗(ticilimumab))；美国专利第6,207,156号；Hurwitz et al.,1998；Camacho et al.,2004；以及Mokyr et al.,1998。每一前述出版物的教导均在此通过引用并入。也可以使用与任何这些本领域公认的抗体竞争结合CTLA-4的抗体。例如，人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请号WO2001014424和WO2000037504以及美国专利第8,017,114号中；其全部通过引用并入本文。

[0106] 示例性抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或其抗原结合片段和变体(参见，例如，WO 01/14424)。在其他实施方案中，该抗体包含伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此，在一个实施方案中，该抗体包含伊匹单抗VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域以及伊匹单抗VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中，该抗体

与上述抗体竞争结合CTLA-4上的相同表位。在另一个实施方案中，该抗体与上述抗体具有至少约90％的可变区氨基酸序列同一性(例如，与伊匹单抗具有至少约90％、95％或99％的可变区同一性)。

[0107] 用于调节CTLA-4的其他分子包括：CTLA-4配体和受体(例如美国专利号5,844,905、5,885,796和国际专利申请号WO1995001994和WO1998042752中描述的，其全部通过引用并入本文)和免疫黏附素(例如美国专利号8,329,867中描述的，其通过引用并入本文)。

[0108] 4.手术

[0109] 大约60％的癌症患者会接受某些类型的手术，这包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括切除术，其中全部或部分癌性组织被物理去除、切除和/或破坏并且可以与其他疗法结合使用，例如本发明实施方式的疗法、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除是指物理切除至少一部分肿瘤。除肿瘤切除术外，手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科和通过显微镜控制的手术(莫氏手术(Mohs’surgery))。

[0110] 在切除部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤后，可在体内形成空腔。治疗可以通过灌注、直接注射或其他抗癌疗法的局部区域应用来完成。此类治疗可重复，例如每1、2、3、4、5、6或7天，或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。这些治疗也可以具有不同的剂量。

[0111] 5.其他剂

[0112] 预期其他剂可与本发明实施方案的某些方面组合使用，以提高治疗的疗效。这些另外的剂包括影响细胞表面受体和细胞间隙连接(GAP junction)的上调的剂、细胞生长抑制剂和分化剂、细胞黏附抑制剂、增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的剂或其他生物剂。通过提高细胞间隙连接的数量来增加细胞间信号传导会增加对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中，细胞生长抑制剂或分化剂可与本发明实施方案的某些方面组合使用，以提高治疗的抗过度增殖功效。考虑了细胞黏附抑制剂来提高本发明实施方案的功效。细胞黏附抑制剂的实例是黏着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。还预期，增加过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他剂，例如抗体c225，可以与本发明实施方案的某些方面组合使用，以提高治疗功效。

[0113] IV.试剂盒

[0114] 用于检测奥希替尼抗性EGFR突变(例如本文公开的那些突变)的试剂盒也在本公开的范围内。这种试剂盒的实例可以包括一组奥希替尼抗性EGFR突变特异性引物。该试剂盒还可以包括使用引物检测本文所述具体奥希替尼抗性EGFR突变的存在或不存在的说明书。该试剂盒还可以包括用于诊断目的的说明书，其指出在来自癌症患者的样品中对本文所述奥希替尼抗性EGFR突变的阳性鉴定表明对第二代喹唑啉胺衍生物类TKI或结构相似的抑制剂的敏感性。该试剂盒还可以包括这样的说明书，该说明书指出在来自癌症患者的样品中对本文所述奥希替尼抗性EGFR突变的阳性鉴定表明患者应该用第二代喹唑啉胺衍生物类TKI或结构相似的抑制剂治疗。

V.实施例

[0115] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解，以下

实施例中公开的技术遵循发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以视为构成其实施的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对公开的具体实施方案进行许多改变,且这些改变仍然获得类似或相似的结果。

[0116] 实施例1-鉴定用于具有奥希替尼抗性EGFR突变的癌细胞的药物

[0117] 生成一组表达奥希替尼或厄洛替尼抗性突变的Ba/F3细胞系,这些突变包括跨越外显子18-21的非典型EGFR突变和典型EGFR突变。然后通过剥夺IL-3后的持续细胞活力评估突变的转化能力。然后筛选激活的EGFR突变Ba/F3细胞对抗EGFR TKI的能力。通过Cell Titer Glo测定确定细胞活力。

[0118] 第二代喹唑啉胺衍生物类TKI抑制表达诸如L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S等非典型突变的Ba/F3细胞系的增殖,IC_{50}值<3nM。

[0119] 在另一项研究中,用所示抑制剂将携带EGFR外显子18P-环突变(G719A)的NSCLC的PDX模型处理28天。进一步发现,P-环外显子18突变导致体内对奥希替尼的原发性抗性,但不会导致对其他EGFR TKI的原发性抗性(图2)。

[0120] 用抑制剂将表达跨越外显子18-21的获得性非典型突变的Ba/F3细胞处理72小时。观察到,获得性非典型突变驱动对奥希替尼的抗性,但对喹唑啉TKI敏感,并且共同发生的突变的药物敏感性/抗性可能由一级突变驱动(图3)。还表明,不论一级突变还是三级突变,T790M突变驱动对第一代和第二代药物的抗性,但独特的第三代TKI和药物重新目的化可以克服三级T790M阳性药物抗性。

[0121]

表1. 原发非典型EGFR突变的IC_{50}值

IC_{50}值, nM	厄洛替尼	沙帕替尼	AZD3759	CUDC-101	阿法替尼	达克替尼	来那替尼	依鲁替尼	奥希替尼	诺司替尼	纳扎替尼	奥莫替尼	纳古替尼
E709K	327.03	22.19	325.10	306.03	1.48	16.82	19.65	30.99	255.17	1403.00	388.40	655.97	358.63
E709_T710delinsD	561.63	ND	ND	ND	5.71	4.16	150.53	ND	171.41	ND	ND	271.60	ND
E709A	262.60	2.79	109.75	443.27	0.60	4.84	11.56	32.83	56.22	1157.25	174.61	372.45	254.60
E709A G719S	99.57	4.07	221.40	252.47	0.09	0.10	0.58	2.02	69.01	207.53	119.77	144.47	48.13
E709K L858R	103.94	3.80	22.88	612.50	0.15	0.50	2.54	21.11	7.83	61.66	25.83	16.12	11.02
E709K G719S	55.90	2.01	77.78	239.23	0.11	0.08	3.24	0.33	54.22	94.44	43.97	57.34	15.23
L718Q	1700.67	370.60	1762.33	765.90	12.08	23.76	96.23	521.63	1532.00	1142.00	1614.00	3982.67	733.60
L718V	656.05	230.77	716.75	229.80	4.89	6.85	117.20	168.35	171.70	1367.90	1021.55	139.17	78.41
G719S	63.55	36.47	52.44	146.70	0.70	0.14	0.83	17.09	130.21	150.32	105.87	214.26	36.72
G719A	146.62	2.31	104.07	300.88	0.77	0.12	0.14	10.76	105.12	145.47	87.85	141.19	18.11
G719A/R776C	143.40	8.93	208.47	192.53	0.15	0.16	0.10	4.42	63.41	230.40	56.55	180.73	39.03
G719A L861Q	153.81	8.42	77.49	57.65	1.30	0.14	0.34	27.10	31.01	36.07	68.93	73.98	4.22
S720P	5.57	0.79	0.75	ND	0.07	0.49	0.58	ND	24.87	160.10	22.63	87.50	52.95
G724S	641.84	25.73	85.98	201.80	5.32	14.76	41.78	19.16	67.28	306.63	126.76	82.95	58.07
T725M	101.83	1.22	110.02	250.67	0.18	1.90	5.73	5.23	47.20	365.47	58.88	280.02	77.58
I740dupIPVAK	94.44	1.52	93.35	237.17	1.23	0.85	6.11	10.68	28.10	433.23	75.36	138.36	67.67
L747P	472.10	5.61	305.20	553.90	4.90	18.44	248.30	424.40	93.79	630.23	287.97	392.93	472.23
L747_K754delinsATSPE	5015.67	1456.33	8117.00	140.25	37.56	339.13	399.17	1741.00	0.40	0.92	1.55	0.14	0.58
L747S	114.16	0.95	84.39	202.93	0.41	0.40	277.67	34.59	25.91	247.70	81.72	62.99	120.00
K754E	110.23	0.56	48.33	206.33	0.23	2.01	4.43	2.62	12.67	217.87	61.57	88.50	66.00
K757R	260.47	59.11	381.85	200.00	20.00	50.15	23.64	82.34	120.00	709.45	623.85	144.07	122.38
A767insASV	16773.67	407.57	4316.00	505.70	128.91	189.67	236.60	513.40	342.67	2479.67	827.50	680.17	216.87
S768dupSVD	3162.00	486.67	3194.67	305.87	24.82	54.73	62.57	11865.67	143.53	1152.40	519.73	554.07	152.83
S768I	396.10	5.72	358.47	888.20	1.86	3.50	63.23	159.30	210.47	1738.00	513.60	837.40	503.03
S768I/V769L	907.03	47.38	734.77	203.60	4.38	12.94	13.14	68.70	90.94	570.73	292.17	358.70	233.57
S768I V774M	267.60	48.33	265.50	200.00	4.95	8.73	81.97	71.19	3.26	160.43	124.00	111.10	66.22
V769L	1293.00	36.36	1014.53	792.37	6.01	8.70	10.13	5.70	165.27	1040.60	253.80	312.57	218.70
D770insNPG	4646.33	916.67	3985.00	924.87	198.20	335.37	1873.47	983.27	191.60	914.83	685.97	310.47	174.57

[0122]

N771dupN G724S	1701.67	134.64	1307.07	509.00	42.36	196.18	129.15	123.80	170.34	1143.00	438.73	417.07	374.50
H773insNPH	1545.00	230.83	1622.33	352.10	64.88	102.08	518.90	955.10	133.83	1165.33	550.10	428.00	145.05
V774M	324.33	10.18	326.17	286.23	1.09	2.80	127.09	0.53	4.28	109.43	152.93	69.97	38.54
R776C	367.87	3.67	158.11	446.03	1.20	7.54	16.88	74.87	235.13	1860.00	369.03	513.77	575.00
R776H	50.67	0.35	22.70	110.09	0.10	0.08	1.08	1.13	17.82	248.30	46.69	114.73	68.62
S784F	136.83	15.53	72.93	245.43	1.76	4.83	35.63	21.35	101.99	690.27	402.90	140.17	70.19
S811F	332.30	23.09	145.00	ND	7.43	67.09	90.98	ND	96.17	845.50	742.80	760.60	173.10
L833F	171.72	1.21	129.74	331.80	1.06	11.56	21.86	27.84	101.38	806.83	252.89	329.03	411.27
L833V	240.85	2.30	138.70	214.35	0.28	3.91	21.23	28.10	63.44	803.30	246.20	394.40	402.00
L861Q	173.63	2.31	92.72	177.50	0.97	0.13	1.16	29.63	27.27	201.00	83.40	83.66	77.43
L861R	95.91	0.51	38.49	71.36	0.13	0.10	0.42	1.41	6.55	42.80	14.53	29.41	12.19

表2. 获得性奥希替尼抗性突变(T790M阴性)

IC_{50}值, nM	厄洛替尼	阿法替尼	达克替尼	来那替尼	奥希替尼	纳扎替尼	奥莫替尼	诺司替尼	纳古替尼	沙帕替尼	AZD3759	CUDC-101	依普替尼
L858R S784F	10000.00	56.49	226.27	298.87	580.67	427.93	437.33	1083.87	353.73	10000.00	10000.00	452.23	232.90
Ex19del G724S	3134.50	3.16	14.53	30.97	316.33	3021.33	331.37	5805.50	697.45	3850.00	17022.00	974.05	1865.00
Ex19del/L792H	9745.67	62.74	51.78	453.53	87.00	56.70	19.26	504.17	3.94	9760.33	10000.00	719.80	745.63
Ex19del/C797S	2.09	0.90	1.09	1052.93	1442.27	3977.00	2143.00	1448.67	1541.33	0.11	0.14	9.19	11008.00
Ex19del T854I	17937.50	5.69	44.74	27.58	24.12	138.07	95.02	149.85	112.39	46.51	1675.50	108.10	66.18
L858R/C797S	7.93	4.74	2.82	156.10	2369.00	4487.00	2245.00	1166.80	709.13	0.20	1.97	34.40	6882.00
L858R G796S	3742.00	22.27	22.67	430.43	296.77	856.33	957.90	1704.67	423.03	624.90	4243.33	451.53	535.53
L858R L718Q	400.90	2.60	3.17	42.74	1811.60	808.40	2327.33	3961.03	747.00	35.80	391.23	698.43	649.50
Ex19del G796S	3962.00	34.88	44.72	49.64	70.34	210.18	254.27	453.25	53.17	120.05	1249.24	419.40	169.60
L858R/L792H	39.97	0.53	0.18	3.11	59.12	74.41	140.69	1263.37	34.33	2.26	32.47	1030.93	ND
L858R/L718V	219.67	0.09	0.09	1.50	168.69	335.07	864.03	274.20	18.83	10.18	250.20	134.73	71.73
L858R G724S	4.95	4.09	32.28	116.40	19.12	248.20	164.80	177.00	108.40	0.04	0.28	ND	ND
Ex19del L718Q	50.24	0.69	4.13	499.00	22.63	72.01	52.75	23.19	2.64	9.97	21.60	ND	ND
Ex19del L718V	64.96	0.05	0.38	87.17	13.92	86.60	87.68	131.70	13.94	1.12	42.88	300.85	67.60
L858R/V834L	7.74	0.35	0.58	2.66	1.02	14.56	6.73	33.59	7.19	0.34	2.33	37.90	64.39

[0123]

表 3. 获得性抗性突变(T790M阳性)——传统EGFR TKI

IC_{50}值, nM	纳古替尼	奥莫替尼	奥希替尼	诺司替尼	纳扎替尼	阿法替尼	CUDC-101	达克替尼	来那替尼	依鲁替尼	沙帕替尼	AZD3759	厄洛替尼
L858R T790M L792H	624.07	2220.67	2503.00	1005.87	5565.67	1411.50	342.70	3010.00	1635.37	2654.33	82444.98	>10000	>10000
L858R/T790M/C797S	4349.00	4116.33	2931.00	1421.67	3434.67	1937.33	274.08	2587.00	2815.67	>10000	>10000	>10000	>10000
Ex19del T790M C797S	1971.67	1928.26	2328.68	1106.66	7205.56	2504.81	58.96	2360.05	1782.95	9293.04	3126.67	>10000	>10000
L858R/T790M/L718Q	91.78	620.43	332.70	1112.20	1000.20	1344.33	217.67	2840.67	1069.67	3676.33	5000.00	>5000	>5000
L718Q T790M	212.30	358.37	829.13	1029.30	411.00	69.50	275.57	296.87	3560.00	217.40	>10000	>10000	>10000
L858R T790M L718V	4.03	21.68	189.70	70.13	336.33	218.10	467.25	5561.00	2714.67	>5000	>5000	>5000	3490.85
Ex19del T790M L718V	7.72	189.57	53.09	108.52	211.37	458.73	393.90	1281.67	591.33	2023.00	7572.33	>10000	74558.35
Ex19del/T790M/L792H	4.75	4.76	38.57	497.10	37.40	669.27	173.33	514.50	1338.13	2972.33	>10000	>10000	7093.00
G724S T790M	18.78	19.88	37.06	120.32	242.11	112.63	413.53	747.83	217.83	406.20	8874.67	8000.67	8427.33
T790M	54.37	46.17	34.88	103.19	151.23	85.06	77.97	376.09	121.51	148.42	12869.00	>10000	>10000
Ex19del/T790M/G724S	3.84	5.08	21.04	39.66	79.32	32.94	245.83	243.65	354.45	501.40	4773.67	4826.00	5294.00
L858R T790M V843I	2.05	0.77	6.08	4.74	32.39	331.67	273.43	1244.67	4677.66	780.20	8943.67	>10000	>10000
L858R/T790M	1.88	0.79	1.84	4.21	25.38	335.27	240.43	620.77	831.13	163.90	7093.33	>10000	>10000
S768I/T790M	19.20	21.53	3.11	25.89	25.55	23.87	814.70	79.55	47.17	109.04	>10000	7500.00	4943.34
G719A T790M	11.72	11.41	49.78	13.01	34.40	41.61	136.47	57.06	65.10	118.70	>10000	>10000	8879.51
Ex19del T790M	1.41	0.41	2.80	4.77	16.40	127.51	151.52	302.23	2295.38	251.10	1959.00	13176.66	4973.66

表4. 获得性抗性突变(T790M阳性)——非传统/重新目的化的 EGFR TKI

IC_{50} 值, nM	来他替尼 (Lestaurtinib)	米哚妥林	布加替尼	AZD3463	鲁伯斯塔 (Ruboxistaurin)	索曲妥林 (Sotrastaurin)
L858R T790M L792H	116.60	270.67	659.93	1546.00	331.70	10728.00
L858R/T790M/C797S	102.13	251.00	290.83	1271.87	364.48	9867.33
Ex19del T790M C797S	0.53	880.53	1019.57	1444.00	486.70	1041.00
L858R/T790M/L718Q	78.22	2976.00	1073.27	1120.67	3868.33	6936.33
L718Q T790M	115.87	1568.00	1489.00	1141.00	4360.00	9785.33
L858R T790M L718V	83.95	1378.60	772.50	662.27	2045.00	4240.50
Ex19del T790M L718V	287.03	3545.33	1095.67	1342.33	2289.00	3333.67
Ex19del/T790M/L792H	97.10	119.43	979.03	1094.00	2520.33	5809.00

[0124]

G724S T790M	12.80	143.67	454.13	695.00	546.93	2887.67
T790M	93.78	2945.67	858.93	1269.00	3911.67	5790.00
Ex19del/T790M/G724S	364.25	3607.67	1537.00	1611.33	6571.00	20067.00
L858R T790M V843I	15.43	1328.30	350.83	768.27	1002.47	1424.47
WT EGFR	416.90	755.33	684.23	1632.33	4879.00	13959.33
L858R/T790M	216.70	2861.33	2613.00	2404.33	3842.67	19878.33
S768I/T790M	297.05	194.73	770.47	1732.67	5923.33	14076.33
G719A T790M	141.20	213.80	336.37	1340.70	2487.67	10471.01
Ex19del T790M	3.71	526.30	140.60	255.10	633.10	863.07

[0125] 表5.EGFR突变载体

[0126]

EGFR 突变	起始载体	基因组改变	制造商
A767insASV	N/A	N/A	Addgene #32066
D770insNPG	N/A	N/A	Addgene #11016
Ex19del (746_A750del)	N/A	N/A	Addgene # 32062
Ex19del/T790M	N/A	N/A	Addgene #32072
G719S	N/A	N/A	Addgene #11013
L858R	N/A	N/A	Addgene #11012
L858R/T790M	N/A	N/A	Addgene #32073
L861Q	N/A	N/A	Addgene #32068
T790M	N/A	N/A	Addgene #32070
WT	N/A	N/A	Addgene #11011
D761N	EGFR WT	c.2281G>A	GeneScript
E709_T710del insD	EGFR WT	c.2127_2129del	GeneScript
E709A	EGFR WT	c.2126A>C	GeneScript
E709A G719S	EGFR G719S	c.2126A>C	GeneScript
E709K	EGFR WT	c.2125G>A	GeneScript
E709K G719S	EGFR G719S	c.2125G>A	GeneScript
E709K L858R	EGFR L858R	c.2125G>A	GeneScript
Ex19del G724S	EGFR Ex19del	c.2313_2314insAAC	GeneScript
Ex19del G796S	EGFR Ex19del	c.2386G>A	GeneScript
Ex19del L718Q	EGFR Ex19del	c.2153T>A	Bioinnovatise
Ex19del L718V	EGFR Ex19del	c.2152C>G	Bioinnovatise
Ex19del T854I	EGFR Ex19del	c.2561C>T	GeneScript
Ex19del/C797S	EGFR Ex19del	c.2386, T>A	Bioinnovatise
Ex19del/L792H	EGFR Ex19del	c.2375T>A	Bioinnovatise
G719A	EGFR WT	c.2156G>C	Bioinnovatise
G719A L861Q	EGFR G719A	c.2582T>A	Bioinnovatise
G719A/R776C	EGFR G719A	c.2326C>T	GeneScript
G724S	EGFR WT	c.2170G>A	GeneScript
H773insNPH	EGFR WT	c.2319_2320insAACCCCCAC	Bioinnovatise
I740dupIPVAK	EGFR WT	c.2214_2231dup	Bioinnovatise
K754E	EGFR WT	c.2260A>G	GeneScript
K757R	EGFR WT	c.2270A>G	GeneScript
L718Q	EGFR WT	c.2153T>A	GeneScript
L718V	EGFR WT	c.2152C>G	GeneScript
L747_K754del insATSPE	EGFR WT	c.2239_2260delinsGCAACATCTCCGG (SEQ ID NO: 1)	GeneScript
L747P	EGFR WT	c.2239_2240TT>CC	GeneScript
L747S	EGFR WT	c.2240T>C	GeneScript
L833F	EGFR WT	c.2499G>T	GeneScript
L833V	EGFR WT	c.2497T>G	GeneScript
L858R G724S	EGFR L858R	c.2313_2314insAAC	GeneScript
L858R G796S	EGFR L858R	c.2386G>A	GeneScript
L858R L718Q	EGFR L858R	c.2153T>A	GeneScript
L858R S784F	EGFR L858R	c.2351C>T	GeneScript
L858R/C797S	EGFR L858R	c.2386, T>A	Bioinnovatise
L858R/L718V	EGFR L858R	c.2152C>G	GeneScript
L858R/L792H	EGFR L858R	c.2375T>A	Bioinnovatise

[0127]

L858R/V834L	EGFR L858R	c.2500G>T	Bioinnovatise
L861R	EGFR WT	c.2582T>G	GeneScript
N771dupN G724S	EGFR G724S	c.2313_2314insAAC	GeneScript
R776C	EGFR WT	c.2326C>T	GeneScript
R776H	EGFR WT	c.2327G>A	GeneScript
S720P	EGFR WT	c.2158T>C	GeneScript
S768dupSVD	EGFR WT	c.2303_2304dupAGCGTGGAC	Bioinnovatise
S768I	EGFR WT	c.2303G>T	Bioinnovatise
S768I V774M	EGFR S768I	c.2320G>A	GeneScript
S768I/T790M	EGFR S768I	c.2369C>T	Bioinnovatise
S768I/V769L	EGFR S768I	c.2305G>T	GeneScript
S784F	EGFR WT	c.2351C>T	GeneScript
S811F	EGFR WT	c.2432C>T	GeneScript
T725M	EGFR WT	c.2174C>T	GeneScript
V769L	EGFR WT	c.2305G>T	Bioinnovatise
V774M	EGFR WT	c.2320G>A	GeneScript

[0128] 因此,第二代喹唑啉胺衍生物类TKI是原发和获得性非典型奥希替尼抗性EGFR突变性NSCLC的有效抑制剂,所述突变包括L861Q、G719S、L858R/L792H、L858R/C797S和Ex19del/C797S。目前的研究表明,第二代TKI克服了非典型EGFR突变性NSCLC的奥希替尼抗性。

[0129] 实施例2-材料和方法

[0130] Ba/F3细胞系生成和IL-3剥夺:Ba/F3细胞系的建立如前所述(Robichaux et al.,2018)。简而言之,通过逆转录病毒转导Ba/F3细胞系12小时生成稳定的Ba/F3细胞系。通过使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)将表1总结的pBabe-Puro基载体(Addgene和Bioinnovatise)转染到Phoenix 293T-ampho细胞(Orbigen)中,生成逆转录病毒。转导三天后,将2μg/ml嘌呤霉素(Invitrogen)添加到RPMI培养基中。然后细胞系在不存在IL-3的情况下生长两周,每三天使用Cell Titer Glo测定(Progema)评估细胞活力。将得到的稳定细胞系维持在含有10%FBS但不含IL-3的RPMI-1640培养基中。

[0131] 细胞活力测定和IC_{50}评估:如前所述(Robichaux et al.,2018),使用Cell Titer Glo测定(Promega)确定细胞活力。简而言之,将每孔2000-3000个细胞一式三份接种在384孔板(Greiner Bio-One)中。用七种不同浓度的酪氨酸激酶抑制剂或单独的媒介物处理细胞,最终体积为每孔40μL。3天后,将11μL Cell Titer Glo添加到每个孔中。将板摇动15分钟,并使用FLUOstar OPTIMA多模式酶标仪(BMG LABTECH)测定生物发光。将生物发光值针对DMSO处理的细胞归一化,并在GraphPad Prism中对归一化的值作图,使用用非线性回归拟合具有可变斜率的归一化数据。通过GraphPad Prism计算50%抑制的IC_{50}值。

[0132] 根据本公开,本文公开和要求保护的所有方法可以在没有过度实验的情况下进行和执行。虽然已经根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但对本领域技术人员来说明显的是,可以在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,对本文所述方法和所述方法的步骤或步骤顺序进行改变。更具体地,显然,某些化学和生理学相关的剂可以替代本文所述的剂,同时会获得相同或相似的结果。所有这些对本领域技术人员明显的类似替代和修改都视为落入所附权利要求书所定义的本发明的精神、范围和概念内。

[0133] 参考文献

[0134] 以下参考文献在其提供了示例性程序或补充本文所述内容的其他细节的程度上被通过引用专门并入本文。

[0135] Arcila et al.,Clin Cancer Res 18:4910-8,2012.

[0136] Arcila et al,Mol Cancer Ther 12(2):220-229,2013.

[0137] Austin-Ward and Villaseca,Revista Medica de Chile,126(7):838-845,1998.

[0138] Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,NY,2003.

[0139] Bukowski et al.,Clinical Cancer Res.,4(10):2337-2347,1998.

[0140] Camacho et al.J Clin Oncology 22(145):Abstract No.2505(antibody CP-675206),2004.

[0141] Cha et al.Int J Cancer 130:2445-54,2012.

[0142] Chee et al.,Science,274:610-614,1996.

[0143] Cho et al.,Cancer Res73:6770-9,2013.
[0144] Christodoulides et al.,Microbiology,144(Pt 11):3027-3037,1998.
[0145] Church and Gilbert,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:1991-1995(1988).
[0146] Cotton et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:4397-4401(1985).
[0147] Davidson et al.,J.Immunother.,21(5):389-398,1998.
[0148] Davies et al.,Plos One8,2013.
[0149] Del Tito et al.,Clinical Chemistry 44:731-739,1998.
[0150] Drmanac et al.,Nat.Biotechnol.,16:54-58,1998.
[0151] Drmanac e tal.,Science,260:1649-1652,1993.
[0152] Ettinger et al,.J Natl Compr Canc Netw 16:807-21,2018.
[0153] Flavell et al.,Cell 15:25(1978).
[0154] Fu et al.,Nat.BiotecHnol.,16:381-384,1998/
[0155] Geever et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:5081(1981).
[0156] Hanibuchi et al.,Int.J.Cancer,78(4):480-485,1998.
[0157] Hellstrand et al.,Acta Oncologica,37(4):347-353,1998.
[0158] Hollander,Front.Immun.,3:3,2012.
[0159] Hong et al.,J Biol Chem 282:19781-7,2007.
[0160] Hui and Hashimoto,Infection lmmun.,66(11):5329-5336,1998.
[0161] Hurwitz et al.Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071,1998.
[0162] Hyman et al.,Nature 554:189-94,2018.
[0163] 国际专利公开号WO 99/57318
[0164] 国际专利公开号WO1995001994
[0165] 国际专利公开号WO1998042752
[0166] 国际专利公开号WO2000037504
[0167] 国际专利公开号WO2001014424
[0168] 国际专利公开号WO2009/101611
[0169] 国际专利公开号WO2009/114335
[0170] 国际专利公开号WO2010/027827
[0171] 国际专利公开号WO2011/066342
[0172] 国际专利公开号WO2015016718
[0173] 国际专利公开号WO 00/37504
[0174] 国际专利公开号WO01/14424
[0175] 国际专利公开号WO98/42752
[0176] Kosaka et al.,Cancer Res 2017.
[0177] Kris et al.,Ann Oncol 26:1421-7,2015.
[0178] Kris et al.,Ann Oncol 26:1421-7,2015.
[0179] Leal,M,Ann N Y Acad Sci 1321,41-54,2014.
[0180] Lynch et al.,N Engl J Med.350(21):2129-2139,2004.
[0181] Ma et al.,J Clin Oncol33,2015.

[0182] Maemondo et al.,N Engl J Med 362:2380-8,2010.
[0183] Meric-Bernstam et al.,Clin Cancer Res.2018.
[0184] Mitsudomi and Yatabe,Cancer Sci.98(12):1817-1824,2007.
[0185] Mokyr et al.Cancer Res58:5301-5304,1998.
[0186] Oxnard et al.,J Thorac Oncol.8(2):179-184,2013.
[0187] Paez et al.,Science 304(5676):1497-1500,2004.
[0188] Pao et al.,Proc Natl Acad Sci USA 101(36):13306-13311,2004.
[0189] Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012.
[0190] Perera et al.,Proc Natl Acad Sci USA 106:474-9,2009.
[0191] Qin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95(24):14411-14416,1998.
[0192] Raca et al.,Genet Test8(4):387-94(2004).
[0193] Robichaux et al,Nat Med 24:638-46,2018.
[0194] Sanger et al.,Proc.Natl.Acas.Sci.USA 74:5463-5467(1977).
[0195] Sears et al.,BioteChniques,13:626-633,1992.
[0196] Sheffield et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:232-236(1989).
[0197] Shen et al.,J Recept Signal Transduct Res 36:89-97,2016.
[0198] Thress et al..Nat Med 21:560-2,2015.
[0199] 美国专利号4,870,287
[0200] 美国专利号5,288,644
[0201] 美国专利号5,739,169
[0202] 美国专利号5,760,395
[0203] 美国专利号5,801,005
[0204] 美国专利号5,824,311
[0205] 美国专利号5,830,880
[0206] 美国专利号5,844,905
[0207] 美国专利号5,846,945
[0208] 美国专利号5,869,245
[0209] 美国专利号5,885,796
[0210] 美国专利号6,207,156
[0211] 美国专利号8,008,449
[0212] 美国专利号8,017,114
[0213] 美国专利号8,119,129
[0214] 美国专利号8,188,102
[0215] 美国专利号8,329,867
[0216] 美国专利号8,354,509
[0217] 美国专利号8,735,553
[0218] 美国专利公开号2004/0014095
[0219] 美国专利公开号2005/0260186
[0220] 美国专利公开号2006/0104968

[0221] 美国专利公开号20110008369

[0222] 美国专利公开号20130071452

[0223] 美国专利公开号2014022021

[0224] 美国专利公开号20140294898

[0225] Underhill et al.,Genome Res.7:996-1005(1997).

[0226] Vogel et al.,J Clin Oncol 20:719-26,2002.

[0227] Yang et al,Int J Cancer 2016.

[0228] Yasuda et al.,Sci Transl Med 5(216):216ra177,2013.

[0229] Zimmerman et al.,Methods Mol Cell.Biol.:3:39-42,1992.

序列表

<110> 得克萨斯大学体系董事会

<120> 对携带酪氨酸激酶抑制剂抗性EGFR突变的癌细胞具有抗肿瘤活性的化合物

<130> UTFC.P1457WO

<140> 未知

<141> 2020-04-16

<150> 62/835,354

<151> 2019-04-17

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

gcaacatctc cgg 13

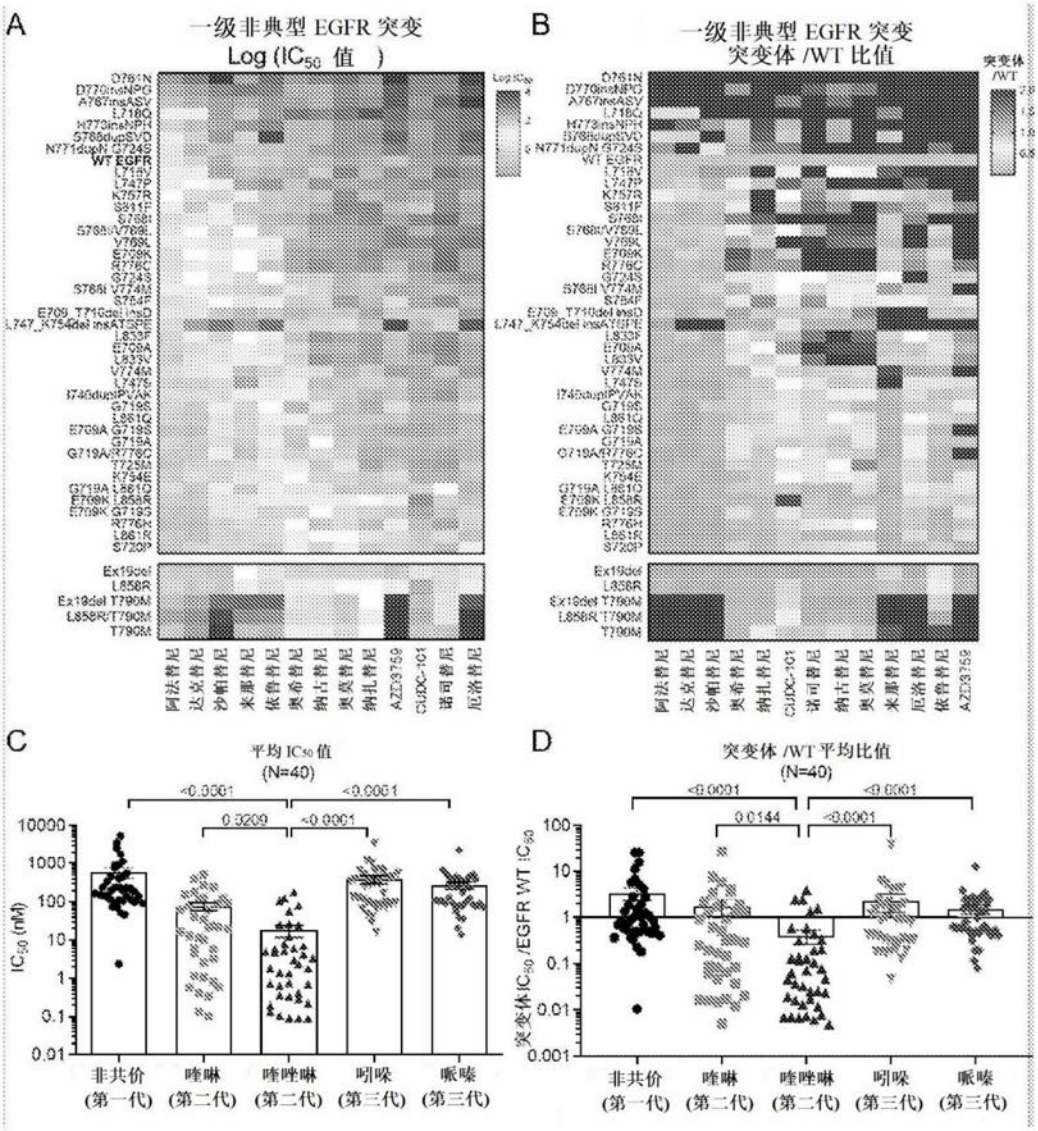

A
一级非典型 EGFR 突变
Log (IC_{50} 值)
B
一级非典型 EGFR 突变
突变体 /WT 比值
阿法替尼
达克替尼
沙帕替尼
来那替尼
依鲁替尼
奥希替尼
纳古替尼
奥莫替尼
纳扎替尼
AZD3759
CUDC-101
诺司替尼
厄洛替尼
C
平均 IC_{50} 值
(N=40)
<0.0001
<0.0001
0.0209
<0.0001
IC_{50} (nM)
非共价 (第一代)
喹啉 (第二代)
喹唑啉 (第二代)
吲哚 (第三代)
哌嗪 (第三代)
D
突变体 /WT 平均比值
(N=40)
<0.0001
<0.0001
0.0144
<0.0001
突变体/EGFR WT IC_{50}
非共价 (第一代)
喹啉 (第二代)
喹唑啉 (第二代)
吲哚 (第三代)
哌嗪 (第三代)

图1A-1D

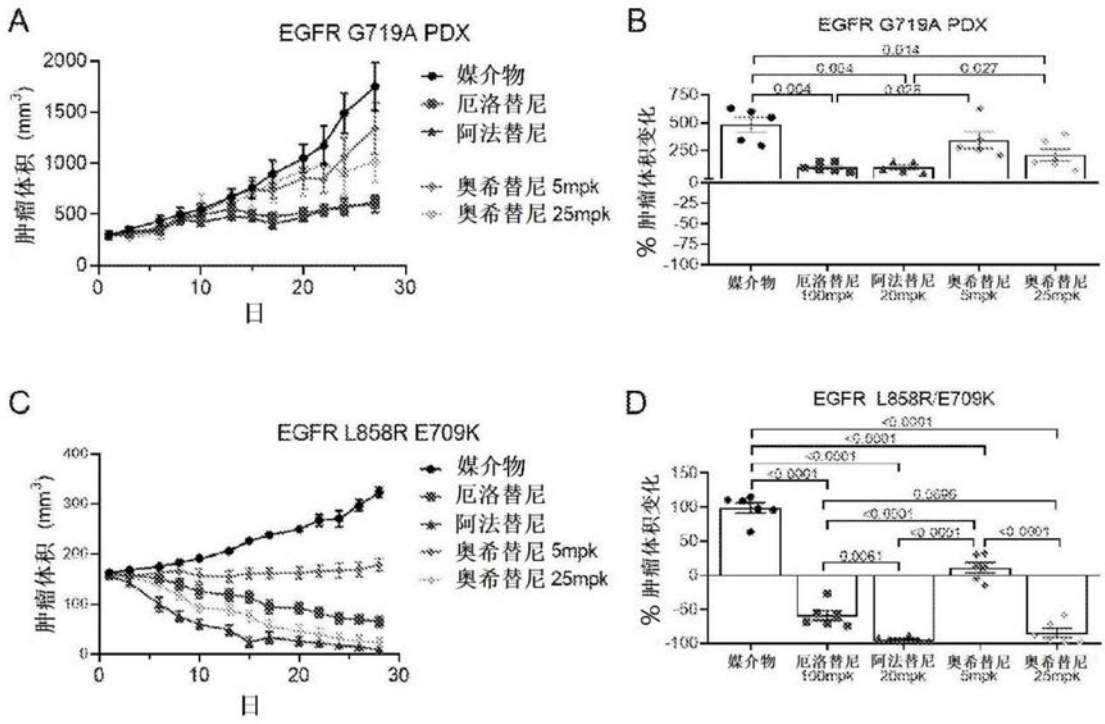

A
EGFR G719A PDX
肿瘤体积 (mm³)
日
媒介物
厄洛替尼
阿法替尼
奥希替尼 5mpk
奥希替尼 25mpk
B
EGFR G719A PDX
% 肿瘤体积变化
媒介物
厄洛替尼 100mpk
阿法替尼 20mpk
奥希替尼 5mpk
奥希替尼 25mpk
C
EGFR L858R E709K
肿瘤体积 (mm³)
日
媒介物
厄洛替尼
阿法替尼
奥希替尼 5mpk
奥希替尼 25mpk
D
EGFR L858R/E709K
% 肿瘤体积变化
媒介物
厄洛替尼 100mpk
阿法替尼 20mpk
奥希替尼 5mpk
奥希替尼 25mpk

图2A-2D

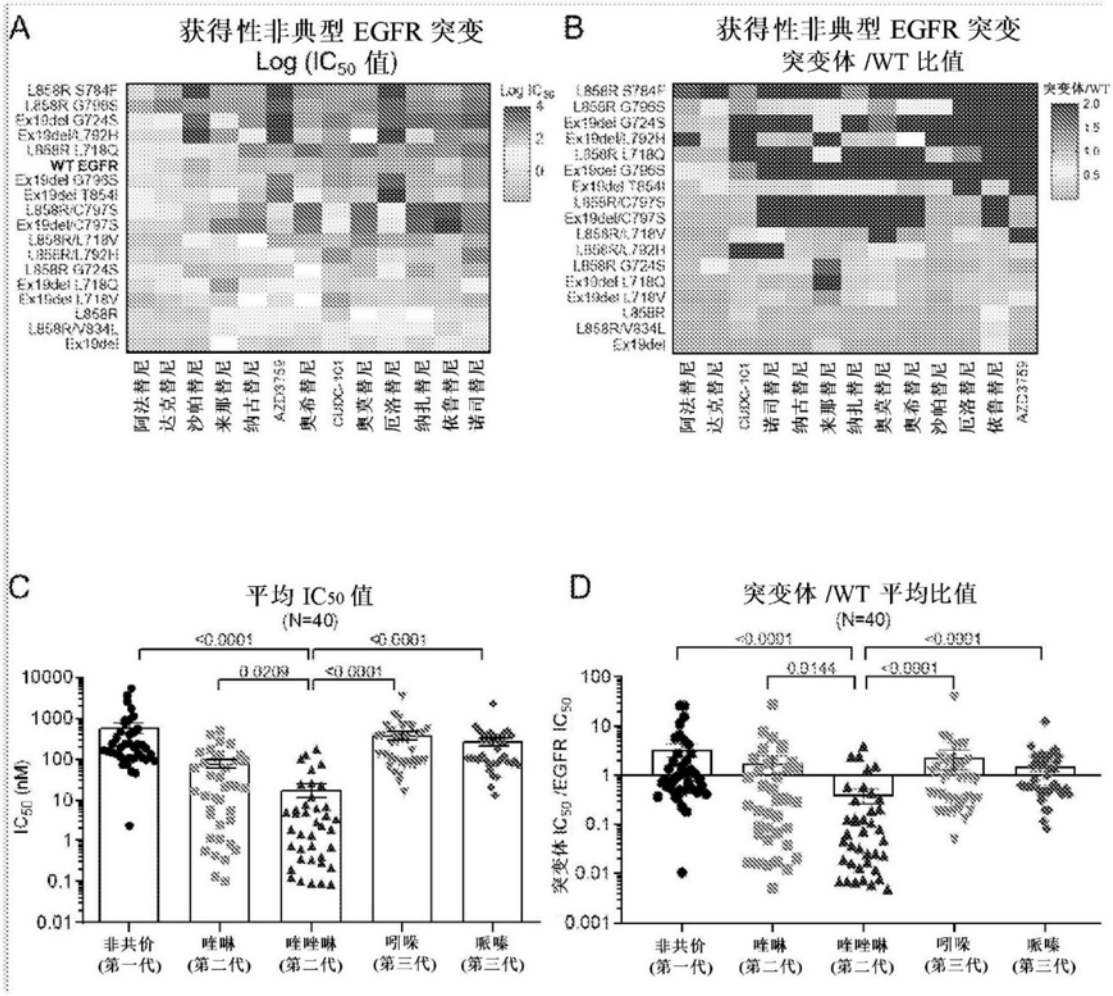

A
获得性非典型 EGFR 突变
Log (IC50 值)
L858R S784F
L858R G796S
Ex19del G724S
Ex19delA792H
L858R L718Q
WT EGFR
Ex19del G796S
Ex19del T854I
L858R/C797S
Ex19delC797S
L858R/L718V
L858R/L792H
L858R G724S
Ex19del L718Q
Ex19del L718V
L858R
L858R/V834L
Ex19del
阿法替尼
达克替尼
沙帕替尼
来那替尼
纳古替尼
AZD3759
奥希替尼
CUDC-101
奥莫替尼
厄洛替尼
纳扎替尼
依鲁替尼
诺司替尼
B
获得性非典型 EGFR 突变
突变体 /WT 比值
突变体/WT
C
平均 IC50 值
(N=40)
<0.0001
<0.0001
0.0209
<0.0001
IC50 (nM)
非共价
(第一代)
吡啉
(第二代)
喹唑啉
(第二代)
吲哚
(第三代)
哌嗪
(第三代)
D
突变体 /WT 平均比值
(N=40)
<0.0001
<0.0001
0.0144
<0.0001
突变体 IC50 /EGFR IC50

图3A-3D

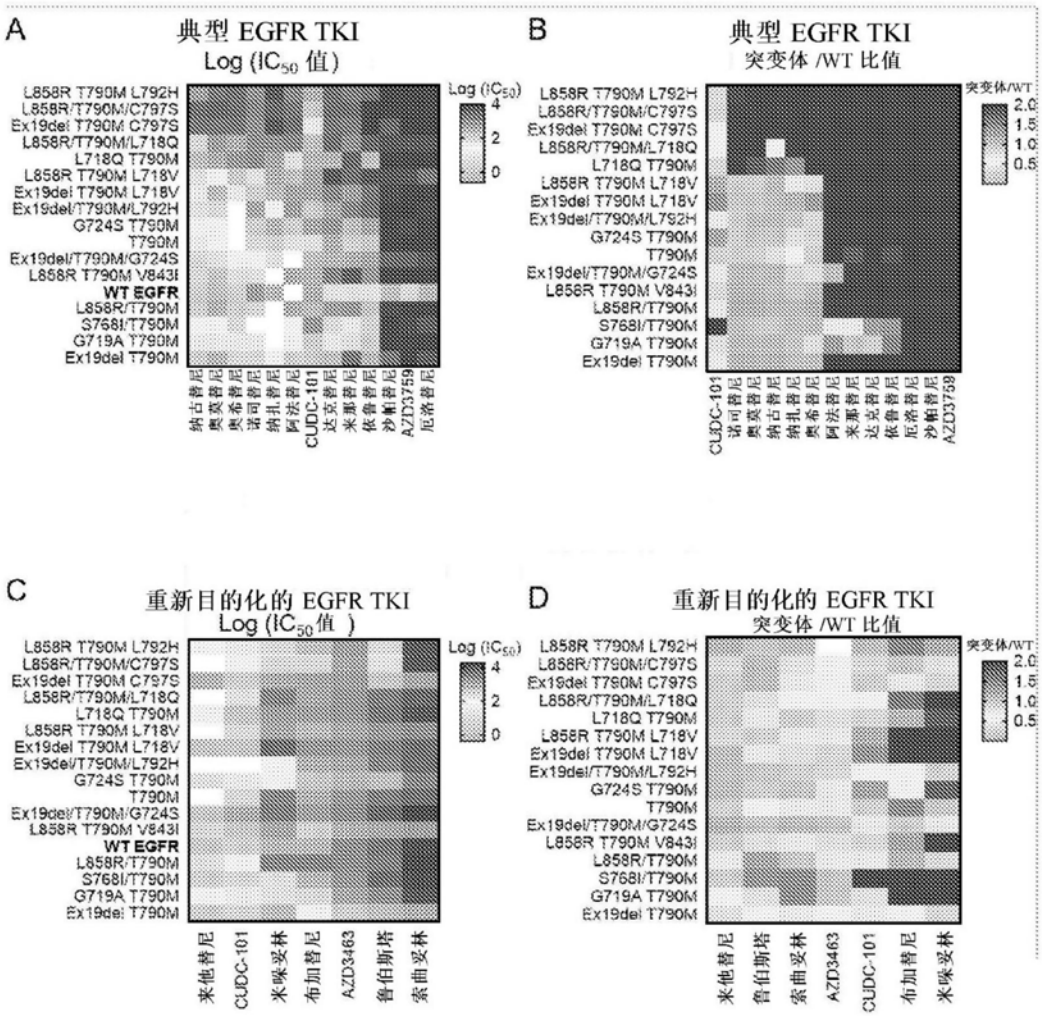

A
典型 EGFR TKI
Log (IC50 值)
L858R T790M L792H
L858R/T790M/C797S
Ex19del T790M C797S
L858R/T790M/L718Q
L718Q T790M
L858R T790M L718V
Ex19del T790M L718V
Ex19del/T790M/L792H
G724S T790M
T790M
Ex19del/T790M/G724S
L858R T790M V843I
WT EGFR
L858R/T790M
S768I/T790M
G719A T790M
Ex19del T790M
Log (IC50)
4
2
0
纳古替尼
奥莫替尼
奥希替尼
诺司替尼
纳扎替尼
阿法替尼
CUDC-101
达克替尼
米那替尼
依鲁替尼
沙帕替尼
AZD3759
厄洛替尼
B
典型 EGFR TKI
突变体 /WT 比值
突变体/WT
2.0
1.5
1.0
0.5
CUDC-101
诺司替尼
奥莫替尼
纳古替尼
纳扎替尼
奥希替尼
阿法替尼
米那替尼
达克替尼
依鲁替尼
厄洛替尼
沙帕替尼
AZD3759
C
重新目的化的 EGFR TKI
Log (IC50值)
来他替尼
CUDC-101
米哚妥林
布加替尼
AZD3463
鲁伯斯塔
索曲妥林
D
重新目的化的 EGFR TKI
突变体 /WT 比值
来他替尼
鲁伯斯塔
索曲妥林
AZD3463
CUDC-101
布加替尼
米哚妥林

图4A-4D