



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109069485 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780012955.0

(22)申请日 2017.02.23

(30)优先权数据

62/298,584 2016.02.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/019184 2017.02.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/147326 EN 2017.08.31

(71)申请人 纽约州立大学研究基金会

地址 美国纽约

(72)发明人 史黛西·W·布雷恩

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 刘明海 周瑞

(51)Int.Cl.

A61K 31/415(2006.01)

A61K 31/497(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/00(2006.01)

A61K 38/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书19页 附图11页

(54)发明名称

P27酪氨酸磷酸化作为CDK4活性的标志物及其使用方法

(57)摘要

公开了用于治疗恶性肿瘤的组合物和方法。具体地,本公开提供了治疗癌症的方法,其包括:评估包含来自受试者的癌细胞的生物样品中p27中的酪氨酸88(Y88)磷酸化(pY88)水平,以及与在对照组织中观察到的pY88磷酸化水平相比,将pY88磷酸化水平分级为0、1、2或3;其中,水平为0表示对细胞周期蛋白依赖性激酶4(cdk4)抑制没有可检测的敏感性;水平为1表示低或无可检测的敏感性;并且水平为2或3表示对cdk4抑制具有可检测的敏感性。还提供了用于实施所述方法的试剂盒。

1. 一种治疗受试者的癌症的方法,其包括:

a) 评估包含来自受试者的癌细胞的生物样品中p27中的pY88磷酸化水平,并与在对照组织中观察到的pY88磷酸化水平相比,将Y88磷酸化水平分级为0、1、2或3;

b) 将水平为0与cdk4抑制剂不敏感性相关联,并将水平为1、2或3与对cdk4抑制敏感相关联,以及

c) 向步骤b) 中鉴定的对cdk4抑制敏感的受试者施用治疗有效量的至少一种cdk4抑制剂,用于减轻癌症负担或症状。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Y88磷酸化水平为1,并且所述受试者对cdk4抑制剂疗法有响应。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Y88磷酸化水平为2,并且所述受试者对cdk4抑制剂疗法有响应。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Y88磷酸化水平为3,并且所述受试者对cdk4抑制剂疗法有响应。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌,脑癌,甲状腺癌,前列腺癌,结肠直肠癌,胰腺癌,宫颈癌,胃癌,子宫内膜癌,肝癌,膀胱癌,卵巢癌,睾丸癌,头癌,颈癌,皮肤癌,间皮衬里癌,白细胞的癌,食道癌,肌肉癌,结缔组织癌,肺癌,肾上腺癌,甲状腺癌,肾癌,骨癌和胃癌中的至少一种。

6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中所述受试者是人。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述cdk4抑制剂选自表2中列出的cdk4抑制剂。

9. 根据权利要求1所述的方法,其还包括施用cdk2抑制剂。

10. 根据权利要求1所述的方法,其还包括施用抗癌剂。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述cdk4抑制剂是Alt-Brk模拟物。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抑制剂是帕博西林。

13. 根据权利要求12的方法,其还包括施用Alt-Brk模拟物,所述Alt-Brk模拟物与所述帕博西林协同作用以杀死癌细胞。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述Alt-brk模拟物缺乏外显子2并且包含Brk的SH3结构域。

15. 用于评估癌症治疗中cdk4活性抑制功效的方法,包括:

比较用抗癌剂治疗之前和之后,包含来自所述受试者的癌细胞的生物样品中p27中的pY88磷酸化水平,其中所述抗癌剂包含一种或多种cdk抑制剂样品,以及

将水平分级为0或1、2或 ≥ 3 ,其中Y88磷酸化水平的降低与cdk4抑制的效力相关,并且癌细胞增殖的降低和Y88的增加与cdk4抑制剂疗法的效力降低或丧失相关。

16. 用于实施权利要求1所述的方法的试剂盒,其包含适用于测定p27中Y88和/或Y89的磷酸化水平的试剂,所述试剂包括对磷酸化和非磷酸化的Y88和/或Y89的检测免疫特异的抗体,所述抗体包含非天然存在的可检测标记,和/或任选地被固定在固体支持物上,所述试剂盒包含磷酸化和非磷酸化的Y88和/或Y89抗原。

P27酪氨酸磷酸化作为CDK4活性的标志物及其使用方法

[0001] 本申请要求2016年2月23日提交的美国临时申请62/298,584的优先权,其全部公开内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及癌症和癌症治疗和管理领域。更具体地,本发明提供了用于鉴定最可能受益于cdk4/cdk2调节的那些受试者的诊断方法和对于如此鉴定的受试者的治疗方法。

背景技术

[0003] 在整个说明书中引用了若干出版物和专利文献,以描述本发明所属领域的现有技术状态。这些引用中的每一个都通过引用并入本文,如同完整阐述一样。

[0004] 乳腺癌是美国女性癌症死亡的第二大原因,每年约有40,000人死亡。美国癌症协会估计今年将发生232,000例新发侵袭性乳腺癌病例和约60,000例原位导管癌。分子诊断学的进展表明乳腺癌不是一个单一的疾病实体;相反,它是具有广泛的瘤间和瘤内异质性的多样性疾病(即,具有不同遗传学、表观遗传学和/或表型特征的细胞亚克隆)。除了对化学治疗的响应之外,这种异质性在患者预后和对激素和靶向治疗的响应方面具有显著的临床和治疗后果。

[0005] 包括癌症病因学在内的分子基础知识的发展已经推动了个性化或“精准”医学领域,以识别特定的肿瘤特征,并通过开发针对这些实体的靶向疗法来利用这些特征。预测个体对特定治疗的响应的能力是现代精准医学的最终目标。由于对个体肿瘤特征的更详细的遗传和临床理解,目前在标准肿瘤治疗中使用了几种靶向癌症治疗。具有预测性临床和药理学相关性的分子生物标志物的治疗用途依赖于对这些生物标志物进行准确地检测和/或定量,以指导靶向疗法的安全和有效治疗。

[0006] 显然,迫切需要提供灵敏的诊断测定和设计用于靶向肿瘤中存在的特定类型的癌细胞的治疗方案。本发明的一个目的是提供这样的测定和治疗方案。

发明内容

[0007] 根据本发明,提供了一种治疗受试者的癌症的方法。示例性方法包括评估包含来自受试者的癌细胞的生物样品中p27中的pY88磷酸化水平,并与对照组织中观察到的pY88磷酸化水平相比,将pY88磷酸化水平分为0、1、2或3级,其中水平为0表示对cdk4抑制无可检测的敏感性,水平为1表示低或无可检测的敏感性,2或3表示对cdk4抑制有可检测的敏感性。

[0008] 然后用治疗有效量的至少一种cdk4抑制剂治疗被鉴定为具有对cdk4抑制敏感的肿瘤的受试者,以减轻癌症负担或症状。Cdk4抑制剂可以单独施用或与其他抗癌剂组合施用。根据本发明治疗的癌症包括但不限于乳腺癌,脑癌,甲状腺癌,前列腺癌,结肠直肠癌,胰腺癌,子宫颈癌,胃癌,子宫内膜癌,肝癌,膀胱癌,卵巢癌,睾丸癌,头癌,颈癌,皮肤癌,间皮衬里癌,白细胞的癌,食道癌,肌肉癌,结缔组织癌,肺癌,肾上腺癌,甲状腺癌,肾癌,骨癌

和胃癌。在优选的实施方案中,本发明的测试和治疗方法用于治疗乳腺癌。虽然本发明包括治疗多种哺乳动物,但优选地,哺乳动物是人。

[0009] 本文描述了可用于实践本发明的Cdk抑制剂,其包括表2中列出的cdk抑制剂。在某些实施方案中,cdk4抑制剂和cdk2抑制剂组合施用。该组合可以包含或不包含另外的抗癌剂。用于本发明的优选治疗剂包括p27模拟物或Alt-Brk模拟物。在特别优选的实施方案中,cdk4抑制剂是帕博西林(Palbociclib)。在另一个优选的实施方案中,还施用Alt-Brk模拟物,其与帕博西林协同作用以杀死癌细胞。

[0010] 本发明还提供了用于评估癌症治疗中cdk4活性抑制功效的方法,包括比较用抗癌剂治疗之前和之后,包含来自所述受试者的癌细胞的生物样品中p27中的pY88磷酸化水平,其中所述抗癌剂包含一种或多种cdk抑制剂样品,并将水平分为0、1、2或3级,其中Y88磷酸化水平的降低与cdk4抑制的功效相关,并且癌细胞增殖的降低和Y88磷酸化水平的增加与cdk4抑制剂治疗的功效降低或丧失相关。

[0011] 还提供了用于实施本文公开的方法的试剂盒。

附图说明

[0012] 图1A-1D:Brk在体外以高亲和力结合p27。(图1A)突出显示三个推定的SH3结构域募集位点(PxxP):K1(90-96)、K2(114-117)和K3(188-195)的脯氨酸束的p27序列(SEQ ID NO:1)。SFK SH3与p27(图1B)或p27的PxxP基序(图1C)相互作用的噬菌体ELISA分析。显示的数据是在标准化并减去与GST结合的背景后的三次独立实验的平均值±标准偏差。(图1C)将重组产生的GST-K1、GST-K2、GST-K3(分别为SEQ ID NO:2、3和4)或GST固定在96孔板中,并分析噬菌体与Brk-、Frk-、Yes或Abl-SH3结构域的结合。Brk的另一种剪接变体,Alt Brk,其缺乏外显子2的表达并编码较短的15kDa蛋白,如图1D所示。Brk(SEQ ID NO:5)和Src SH3(SEQ ID NO:6)结构域的3D结构的比对,衍生自PDB+jFATCAT刚性数据库。Brk SH3显示为橙色,Src SH3显示为蓝色。该Alt Brk与Brk共享N末端SH3结构域,并且具有独特的富含脯氨酸的羧基末端,但缺乏催化活性的SH1激酶结构域。

[0013] 图2。生产了过表达WT Brk或催化失活形式(KM)的MCF7细胞。当将p27从这些细胞中免疫沉淀时,用抗pY88、pY74或p27抗体进行免疫印迹分析,显示在过表达Brk的细胞中检测到pY88增加。当将cdk4从这些细胞中免疫沉淀,并用于使用重组RB的体外RB激酶测定时,从表达WT Brk的细胞中检测到cdk4激酶活性增加。表达WT Brk的细胞比空白对照(mock)表达细胞增殖更快。Brk增加,pY88增加,cdk4激酶活性增加且PD抗性增加。MCF7-Wt Brk表达细胞的IC₅₀值为约600nM PD。

[0014] 图3。显示出帕博西林敏感性的乳腺癌细胞组。以nM绘制IC₅₀值(来自Finn,R.S.等人,Breast Cancer Res,2009.11(5):p.R77)。

[0015] 图4A-4C。来自高响应者MCF7(图4A)、中度MDA MB 231(图4B)或无响应者HCC1954(图4C)的石蜡包埋的细胞块(cell block)材料,使用p27(褐色)和pY88(红色)抗体并显示低(图3A)、中(图3B)和高(图4C)pY88水平。

[0016] 图5A-5C。p27Y88作为cdk4生物标志物。(图5A)用DMSO处理不同步的MCF7、MDA MB231或HCC1954细胞或用400nM PD处理MCF7细胞。收获细胞并用10%福尔马林固定后制备细胞块。用p27(褐色)和pY88(粉红色)对载玻片染色,进行免疫组织化学。(图5B)来自正常

乳腺上皮或ER/PR+HER2-乳腺癌患者的针吸活组织检查用p27 (褐色) 和pY88 (粉红色) 抗体染色。患者按%pY88+细胞 (绿色、黄色、褐色) 以及染色是否为pY88强 (紫色、灰色、红色) 分类。由2位独立的病理学家匿情分析染色。(图5C) 显示了总结染色结果的表格。

[0017] 图6。将大学医院的ER/PR+、Her2-患者的乳房肿瘤切除术或乳房切除术中丢弃的材料在外植体培养基DMSO (绿色)、高非生理性帕博西林 (红色) 或生理浓度的帕博西林 (紫色) 中生长48小时。48小时后, 固定材料, 石蜡包埋并染色Ki67, Ki67是增殖的标志物。高浓度的药物 (紫色) 是内部对照, 可以抑制增殖。每个患者具有不同的固有增殖率, 如通过未处理样品 (DMSO) 中的不同的Ki67水平所测量的。测量到帕博西林响应, 在生理浓度的药物 (红色) 存在下Ki67减少。患者1和3响应。每个数据点是4个样品的平均值 (2个独立的外植体样品和2个独立的免疫组织化学染色)。每个样品由两位病理学家匿情读取。

具体实施方式

[0018] 细胞周期蛋白D-cdk4 (DK4) 提供了理想的治疗靶标, 因为它在大多数人类肿瘤中驱动癌症增殖, 包括ER/PR+、Her2-乳腺癌。细胞周期蛋白D和cdk4在多种肿瘤中过表达, 但它们的水平不是致癌活性的准确指标, 因为需要辅助因子, 例如p27Kip1, 将这种不稳定的二聚体组装成三元复合物。另外, p27的酪氨酸 (Y) 磷酸化 (pY88) 是激活cdk4所必需的, 充当ON/OFF“开关”。本发明鉴定了p27内的SH3募集结构域, 其调节pY88, 从而调节cdk4活性。使用SH3:PxxP相互作用筛选, Brk (乳腺肿瘤激酶) 被鉴定为高亲和力p27激酶。p27的进一步突变研究使本发明人能够鉴定允许体外和体内Y磷酸化所需的SH3募集结构域。调节乳腺癌细胞中的Brk可调节pY88并增加对cdk4抑制剂PD0332991 (帕博西林) 的抗性。包含其SH3结构域的Brk的可变剪接形式 (Alt Brk) 阻断了pY88, 并充当内源性cdk4抑制剂, 这鉴定出了p27内潜在的可靶向调节区。Brk在60%的乳腺癌中过表达, 表明这通过p27Y磷酸化而调节cdk4来促进细胞周期进程。p27被认为是一种肿瘤抑制因子, 但本文的数据强化了如下观点: 它也应该被认为是一种致癌基因, 负责细胞周期蛋白D-cdk4活性。p27的3¹⁰螺旋中Tyr-88/Tyr-89的磷酸化降低了其细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制活性。这种修饰不影响p27与细胞周期蛋白-CDK复合物的相互作用, 但确实干扰p27与CDK的催化裂隙中的氨基酸之间的范德华和氢键接触, 使p27的C-末端离开催化位点。细胞周期蛋白D-cdk4复合物通过p27保持在一起, 但p27Y磷酸化作为“开关”打开或关闭复合物以允许催化活性。因此, 有人提出该位点的磷酸化可以将肿瘤抑制性CDK抑制活性转变为致癌活性。

[0019] 目前, 已经开发了几种cdk4抑制疗法 (cdk4i) 并且处于FDA批准的各个阶段。不幸的是, 不存在精确定对cdk4抑制疗法有响应的肿瘤和患者的生物标志物。如上所述, 需要在p27的残基Y88和/或Y89上进行酪氨酸磷酸化以将该三元复合物从被抑制的复合物转化为活性复合物。因此, 本文鉴定的pY相关的p27有利地用作cdk4活性的标志物。因此, 本发明包括组合物和方法, 所述组合物和方法使用pY作为人患者材料中的标志物, 以确定特定肿瘤是否具有本发明人已经鉴定为对用cdk4抑制剂治疗有响应的cdk4活性范围。我们开发了pY p27的磷酸特异性抗体, 并证明它识别石蜡包埋的归档人乳腺癌材料 (ER/PR+/Her2-) 中的pY。和100%外显率 (penetrance) 一致, 抗体不会对从人乳房缩小手术获得的良性组织进行染色。所分析的ER/PR+/Her-2乳腺癌样品中的大约75%为pY染色阳性 (47%高染色, 25%中度染色)。

[0020] 本发明的诊断测试和治疗方法使临床医生能够更准确地鉴定将受益于cdk抑制剂疗法的那些患者。然后用cdk4抑制剂疗法,单独或与其他化学治疗剂或抗增殖剂组合,来治疗被鉴定为cdk4活性水平适合疗法的患者。

[0021] 值得注意的是,pY还可以用作替代标志物,来评估这些患者中抗癌治疗的功效。例如,如果cdk4i疗法有效并且细胞周期蛋白D-cd4活性关闭,则pY不会被磷酸化。如果cdk4i疗法不再有效,从而恢复了细胞周期蛋白D-cdk4活性,则pY将再次出现。

[0022] I. 定义

[0023] 化合物或药物组合物的“治疗有效量”是指足以调节动物,尤其是人的肿瘤生长或转移的量,包括但不限于减少肿瘤生长或大小,或预防动物中肿瘤生长的形成,该动物在施用前没有任何肿瘤形成,即预防性施用。

[0024] “药学上可接受的”表示由联邦或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出用于动物,更具体地用于人的药物。

[0025] “载体”是指,例如,与本发明的活性剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂、辅助剂或媒介物。此类药物载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油,动物油,植物油或合成来源的那些,例如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等。优选使用水或盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液作为载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物载体描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。

[0026] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性。如本文所用,该术语是指包含重链的至少互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3以及轻链的至少CDR1、CDR2和CDR3的分子,其中所述分子能够结合抗原。术语抗体包括但不限于能够结合抗原的片段,例如Fv,单链Fv(scFv),Fab,Fab',和(Fab')₂。术语抗体还包括但不限于嵌合抗体,人源化抗体,人抗体和各种物种的抗体,如小鼠、食蟹猴等。

[0027] 术语“重链”是指包含至少重链可变区的多肽,有或没有前导序列。在一些实施方案中,重链包含至少一部分重链恒定区。术语“全长重链”是指包含重链可变区和重链恒定区的多肽,具有或不具有前导序列。

[0028] 术语“重链可变区”是指包含重链的重链互补决定区(CDR)1、框架区(FR)2、CDR2、FR3和CDR3的区域。在一些实施方案中,重链可变区还包含FR1的至少一部分和/或FR4的至少一部分。在一些实施方案中,重链CDR1对应于Kabat残基31至35;重链CDR2对应于Kabat残基50至65;重链CDR3对应于Kabat残基95至102。参见,例如Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(1987和1991,NIH,Bethesda,Md.)。

[0029] 术语“轻链”是指包含至少轻链可变区的多肽,有或没有前导序列。在一些实施方案中,轻链包含至少一部分轻链恒定区。术语“全长轻链”是指包含轻链可变区和轻链恒定区的多肽,具有或不具有前导序列。术语“轻链可变区”是指包含轻链CDR1、FR2、HVR2、FR3和HVR3的区域。在一些实施方案中,轻链可变区还包含FR1和/或FR4。在一些实施方案中,轻链CDR1对应于Kabat残基24至34;轻链CDR2对应于Kabat残基50至56;轻链CDR3对应于Kabat残基89至97。参见,例如Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(1987和1991,NIH,Bethesda,Md.)。

[0030] “嵌合抗体”是指这样的抗体:其重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,

而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同的来源或物种。在一些实施方案中,嵌合抗体是指这样的抗体:其包含来自第一物种(例如小鼠、大鼠、食蟹猴等)的至少一个可变区和来自第二物种(例如人、食蟹猴等)的至少一个恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体包含至少一个小鼠可变区和至少一个人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体包含至少一个食蟹猴可变区和至少一个人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体的所有可变区均来自第一物种,并且嵌合抗体的所有恒定区均来自第二物种。

[0031] “人源化抗体”是指这样的抗体:其中非人可变区的框架区中的至少一个氨基酸已被来自人可变区的相应氨基酸取代。在一些实施方案中,人源化抗体包含至少一个人恒定区或其片段。在一些实施方案中,人源化抗体是Fab, scFv, (Fab')₂等。

[0032] 如本文所用,“人抗体”是指人产生的抗体,包含人免疫球蛋白基因的非人动物产生的抗体,例如XenoMouse[®],以及使用体外方法(例如噬菌体展示,其中抗体库基于人免疫球蛋白序列)选择的抗体。

[0033] 本说明书中的“抗癌剂”是指对癌细胞具有细胞毒性或抗增殖作用的化学物质。

[0034] 本说明书中的“化学疗法”是通过将抗癌剂施用到活体中来治疗活体中的恶性肿瘤的疗法。

[0035] 用于乳腺癌的化学疗法包括例如CMF疗法(通过施用3种药剂的组合物,这3种药剂是环磷酰胺、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶),使用基于紫杉烷的抗癌剂如多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)等进行的疗法,CE疗法(通过施用2种药剂的组合物(即环磷酰胺和表阿霉素)的疗法),AC疗法(通过施用2种药剂(即多柔比星和环磷酰胺)的疗法),CAF疗法(通过施用3种药剂的组合物(即氟尿嘧啶、多柔比星和环磷酰胺)的疗法),FEC疗法(通过施用3种药剂的组合物(即氟尿嘧啶、表阿霉素和环磷酰胺)的疗法),通过施用2种药剂的组合物(即曲妥珠单抗和紫杉醇)的疗法,以及使用卡培他滨的疗法。其他治疗方式包括单独使用赫赛汀以及赫赛汀与其他抗癌剂组合使用。值得注意的是,cdk4抑制疗法也可用于使某些乳腺癌患者处于有利状态。对cdk4定向化学疗法的敏感性可以通过比较治疗前患者中pY88磷酸化的水平来确定,因为Y88可作为响应性的预测因子。

[0036] “siRNA”是指参与RNA干扰过程的分子,通过提供与靶基因序列具有同源性的干扰RNA(siRNA)来进行序列特异性转录后基因沉默或基因敲除。小干扰RNA(siRNA)可以在体外合成或通过核糖核酸酶III从较长的dsRNA切割产生,并且是序列特异性mRNA降解的介导者。优选地,本发明的siRNA是使用适当保护的核糖核苷亚磷酰胺和常规DNA/RNA合成仪而化学合成的。siRNA可以合成为两个独立的互补RNA分子,或者合成为具有两个互补区域的单个RNA分子。合成RNA分子或合成试剂的商业供应商包括Applied Biosystems(福斯特市, CA, USA), Proligo(汉堡市, 德国), Dharmacon Research(拉法叶市(Lafayette), 科罗拉多州, USA), Pierce Chemical(Perbio Science的一部分, 罗克福德, 伊利诺伊州, USA), Glen Research(斯特林(Sterling), 维吉尼亚州, USA), ChemGenes(阿什兰, 马萨诸塞州, USA)和Cruachem(格拉斯哥, UK)。用于抑制p27mRNA的特异性siRNA构建体的长度可以为15-35个核苷酸,更通常为约21个核苷酸。

[0037] 如本文所用,“p27的模拟物”可以指具有与p27内cdk4调节结构域相同的功能/结构-活性的肽变体、其片段、有机化合物或小分子。Alt-Brk是Brk的可变转录本,其编码134个氨基酸的蛋白质,其与全长Brk共享包含SH3结构域的前77个氨基酸残基。本文还提供了

BRK-alt (或其SH3结构域) 的模拟物。当“模拟物”是肽变体时,其氨基酸序列的长度通常类似于含有K1的肽 (p27中的SH3结合肽) 或Alt-Brk中含有SH3的肽的长度。或者,这种“模拟物”可以是具有较短氨基酸序列长度的肽变体。

[0038] 合适的模拟物或类似物可以通过本领域公知的建模技术产生。这包括“模拟物”的设计,其涉及功能性相互作用的研究,和化合物的设计,化合物所含官能团的排列方式能够使这些相互作用再现。

[0039] 术语“载体”涉及单链或双链环状核酸分子,其可以被感染、转染或转化到细胞中并独立地或在宿主细胞基因组内复制。可以切割环状双链核酸分子,从而在用限制酶处理后线性化。各种载体、限制酶和限制酶靶向的核苷酸序列的知识对于本领域技术人员来说是容易获得的,并且包括任意复制子,例如质粒,粘粒,杆粒,噬菌体或病毒,它们可以连接另一个基因序列或元件 (DNA或RNA),以便引起所连接的序列或元件的复制。通过用限制酶切割载体并将两个片段连接在一起,可以将本发明的核酸分子插入载体中。

[0040] 本领域技术人员可利用许多技术促进表达构建体转化、转染或转导到原核或真核生物中。术语“转化”、“转染”和“转导”是指将核酸和/或表达构建体插入细胞或宿主生物体中的方法。这些方法涉及多种技术,例如用高浓度的盐、电场或去污剂处理细胞,使宿主细胞外膜或细胞壁可渗透目标核酸分子,显微注射,肽栓系 (peptide-tethering), PEG-融合等。

[0041] 本文所用的术语“寡核苷酸 (oligonucleotide或oligo)”是指通常长度为8至35个核苷酸的DNA的短序列或DNA衍生物、引物或探针。寡核苷酸可以通过克隆或扩增合成得到。寡核苷酸被定义为由两个或更多个核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸组成的核酸分子,优选多于三个。寡核苷酸的确切大小将取决于各种因素以及寡核苷酸的特定应用和用途。当包含通常不是这些分子的一部分的另外的化学部分时,术语“衍生物”旨在包括任意上述变体。这些化学部分可具有不同的目的,包括改善溶解性、吸收、生物半衰期,降低毒性和消除或减少不希望的副作用。

[0042] “同时 (concurrently)”是指 (1) 在时间上同时,或 (2) 在共同治疗方案的过程中的不同时间。

[0043] “相继 (sequentially)”是指施用本方法中使用的一种活性剂后,施用另一种活性剂。在施用一种活性剂后,可以在第一种活性剂之后基本上立即施用下一种活性剂,或者可以在第一种活性剂之后的有效时间段后施用下一种活性剂;有效时间段是实现得益于第一活性剂的施用的最大益处所用的时间量。

[0044] 术语“受试者”是指哺乳动物受试者,包括但不限于人类,狗,牲畜,马,猫,兔,等等。优选地,受试者是人类受试者。

[0045] “cdk4抑制剂”或“cdki”是破坏或干扰cdk4激酶活性的剂 (例如,核酸、蛋白质/肽、小分子)。此类抑制剂包括但不限于表2中列出的剂,帕博西林,abemaciclib和ribociclib。同样参见美国专利8,566,072和6,962,792。

[0046] II. 用于治疗癌症的疗法

[0047] 本发明还提供了药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的至少一种药剂,其中所述至少一种药剂是干扰p27Kip1和Brk之间相互作用并抑制使p27“开启”的磷酸化事件的化合物。用于本发明的优选的剂包括小分子,cdk4抑制剂,如表2中列出的那些,基于图1

中提供的序列的模拟物,和siRNA。这种药物组合物可以以治疗有效量向需要癌症治疗的患者施用。

[0048] 本发明的模拟物/siRNA/抑制剂可用于治疗恶性疾病的各种治疗方案中。可使用本方案治疗的癌症包括但不限于:乳腺癌,脑癌,甲状腺癌,前列腺癌,结肠直肠癌,胰腺癌,子宫颈癌,胃癌,子宫内膜癌,肝癌,膀胱癌,卵巢癌,睾丸癌,头癌,颈癌,皮肤癌(包括黑色素瘤和基底癌),间皮衬里癌,白细胞的癌(包括淋巴瘤和白血病)食道癌,肌肉癌,结缔组织癌,肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞癌),肾上腺癌,甲状腺癌,肾癌,或骨癌;胶质母细胞瘤,间皮瘤,肾细胞癌,胃癌,肉瘤,绒毛膜癌,皮肤基底细胞癌,和睾丸精原细胞瘤。

[0049] 应当理解,治疗可以在例如肿瘤切除之前或在肿瘤切除之后发生。

[0050] III. 用于治疗癌症的组合法

[0051] 根据本发明,还发现本文所述的药剂和小分子/模拟物/siRNA与某些已知的化学治疗有效药剂的组合协同作用以抑制肿瘤生长。因此,本发明提供了用于治疗患者癌症的药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的至少一种干扰特定酪氨酸(Y)磷酸化,从而将p27保持在“关闭”位置的剂,以及至少一种化学治疗剂。还提供了通过施用有效量的至少一种Y88磷酸化抑制剂来治疗患者的癌症的方法。这种药剂可以单独使用或与至少一种其他抗癌剂组合使用。合适的药剂包括但不限于帕博西林,abemaciclib,ribociclib,紫杉醇(Taxol®),顺铂,多西他赛,卡铂,长春新碱,长春碱,甲氨蝶呤,环磷酰胺,CPT11,5氟尿嘧啶(5-FU),吉西他滨,雌莫司汀,卡莫司汀,阿霉素(多柔比星),依托泊苷,三氧化二砷,伊立替康,和埃博霉素衍生物。这些药剂可以同时或相继施用。

[0052] IV. 药物组合物和化合物的施用

[0053] 本发明的药物组合物可以通过任意合适的途径施用,例如,通过注射、口服、肺部、鼻腔或其他施用方法。通常,本发明的药物组合物尤其包含药学上可接受的稀释剂,防腐剂,增溶剂,乳化剂,佐剂和/或载体。在某些情况下,载体是纳米颗粒。此类组合物还可包括各种缓冲剂含量(例如,Tris-HCl,乙酸盐,磷酸盐)、pH和离子强度的稀释剂;和添加剂,例如洗涤剂 and 增溶剂(例如,吐温80,聚山梨醇酯80),抗氧化剂(例如,抗坏血酸,焦亚硫酸钠),防腐剂(例如,硫柳汞(Thimersol),苄醇)和填充物质(bulking substance)(例如乳糖,甘露醇)。组合物可以掺入到聚合化合物如聚乳酸、聚乙醇酸等的颗粒制剂中,或掺入到脂质体中。此类组合物可影响本发明药物组合物的组分的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(1990,Mack Publishing Co.,Easton,PA 18042)第1435-1712页,其通过引用并入本文。本发明的药物组合物可以制备成例如液体形式,或者可以是干粉形式(例如,冻干的)。上文描述了施用药物组合物的具体方法。

[0054] 在另一个实施方案中,本发明的药物组合物可以在控释系统中递送,例如使用静脉内输注,可植入的渗透泵,透皮贴剂,脂质体,或其他施用方式。在一个具体实施方案中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng. (1987) 14:201;Buchwald等人,Surgery (1980) 88:507;Saudek等人,N.Engl.J.Med. (1989) 321:574)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer and Wise(eds.),CRC Press:Boca Raton,Florida(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen and Ball

(eds.), Wiley: New York (1984); Ranger 和 Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. (1983) 23:61; 还参见 Levy 等人, Science (1985) 228:190; During 等人, Ann. Neurol. (1989) 25:351; Howard 等人, J. Neurosurg. (1989) 71:105)。在另一个实施方案中,可以在动物的靶组织附近放置控释系统,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见,例如,Goodson,在 Medical Applications of Controlled Release 中,同上(1984)第2卷,第115页138)。特别地,可以在动物中不恰当的免疫激活或肿瘤部位附近引入控释装置。Langer (Science (1990) 249:1527-1533) 的综述中讨论了其他控释系统。

[0055] V. 试剂盒和制品

[0056] 可将上述产品中的任意一种掺入试剂盒中,所述试剂盒可包含一种或多种对磷酸化和非磷酸化形式的Y88和Y89免疫特异性的抗体,Y88和Y89抗原,所述抗体任选地用非天然存在的可检测标记物可检测地标记,或任选地附着并固定于固体支持物上,寡核苷酸(其适于扩增或与p27编码核酸特异性杂交),p27和Alt-brk的非天然存在的多肽模拟物,药学上可接受的载体,使用说明书,容器,施用器皿,测定底物,cdk抑制剂,抗癌剂,或其任何组合。

[0057] 提供以下材料和方法以促进本发明的实践。

[0058] 抗体。小鼠抗-p27 (Kip1), BD Biosciences 610242。Cdk4 (DCS-35), p27 (N-20), C-末端Brk (C-18), Brk (D-6), N-末端Brk (N-20), c-Src (SC-18), 细胞周期蛋白D1 (H 295), ARHGDI A (A-20), Santa Cruz Biotechnology。磷酸酪氨酸 (P-Tyr-100), Cell Signaling Technology。Cdk4 (C-term, 目录号 AP7520b), Abgent。GST (PRB-112C), Covance。Flag (F3165), 肌动蛋白 (A2066), Sigma Aldrich。磷酸Brk (Tyr342), EMD Millipore。通过用磷光 (phosphor) 特异性p27肽 (Invitrogen) 免疫兔子产生pY74、Y88和Y89磷酸特异性抗体。分别用非磷酸化和磷酸化肽进行阴性和阳性亲和层析,以纯化抗体。这些抗体仅分别对Y88、Y89、Y74磷酸化具有特异性。

[0059] 酶。根据制造商的说明书使用Gst-PTK6/Brk, GST-Src (SignalChem), His-Abl (New England Biolabs), His-PTK6/Brk, His-Src (Invitrogen)。酶具有大致相当的比活度 (specific activity)。

[0060] 噬菌体-ELISA。产生噬菌体上清液,并将SH3-噬菌体与重组产生的His-标记的p27或GST-PxxP-肽的结合如所述进行分析 (Asbach B. 等人, (2012) PLoS One 6:e38540)。

[0061] 突变体和肽的构建。将编码PxxP-肽K1、K2和K3的寡核苷酸退火并直接连接到pGEX-KG表达载体中以产生N-末端GST-标记的肽。描述了GST, GST-Brk SH3, GST-Brk SH2表达质粒 (Vasioukhin V. 等人; (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:14477-82)。用这些质粒转化的大肠杆菌BL21细胞在LB-氨苄青霉素中生长,直至OD达到0.6,并通过加入1mM IPTG诱导蛋白质产生。2小时后,通过离心收获细胞。根据GST-蛋白质纯化手册 (GE Healthcare) 进行细胞裂解和GST-琼脂糖上的蛋白质纯化。用过量的谷胱甘肽洗脱蛋白质,并针对PBS透析用于进一步使用。如前所述从大肠杆菌生产纯化的C-末端组氨酸标记的或N-末端Flag标记的p27's (James M.K. 等人. (2008) Mol. Cell. Biol. 1:498-510)。将人p27cDNA用作PCR诱变中的模板,PCR诱变中,寡核苷酸携带点突变:PPPP (SEQ ID NO:7) 91、92、94、95AAAA (SEQ ID NO:8) (Δ K1); PKKP (SEQ ID NO:9) 188、189、190、191AAAA (SEQ ID NO:8) (Δ K3); 或PPPP (SEQ ID NO:7) 91、92、94、95AAAA (SEQ ID NO:8) 和PKKP (SEQ ID NO:9) 188、189、190、

191AAAA (SEQ ID NO:8 (Δ K1/K3)。

[0062] 用于产生58-106的寡核苷酸为:

[0063] 正向引物5'-GGCCTCGAGCTAGCTCTCCTGCGCCG-3' (SEQ ID NO:10)

[0064] 反向引物5' GGGGTCTAGAGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCGCAAGTGGA ATTTGATTTTC-3' (SEQ ID NO:11)

[0065] 将PCR片段连接到T7pGEMEX人His-p27或T7pGEMEX人Flag-p27质粒用于在大肠杆菌中表达。先前描述了突变体Y74F、Y88F和Y88/89F (参见James等,同上)。根据制造商的方案,用Flag抗体 (M-2, Sigma F-18C9) 通过Flag免疫沉淀纯化Flag-标记的p27突变体,并用Flag肽 (Sigma F-4799) 洗脱。经由his-捕获亲和层析 (His-Trap HP, GE Healthcare 71-5247-01) 通过FPLC纯化His-标记的p27突变体。根据制造商的方案剥离亲和柱,然后用5倍柱体积的100mM CoCl₂洗涤。用由6M尿素,500mM NaCl,50mM Tris-HCl,pH7.5和20%甘油组成的上样缓冲液施加粗材料。用500mM NaCl,50mM Tris-HCl,pH 7.5和10%甘油洗涤该材料。用500mM咪唑,20mM Hepes pH 7.4和1M KCl洗脱纯化的材料。然后将蛋白质在25mM Hepes pH 7.7,150mM NaCl,5mM MgCl₂和0.05%NP40的溶液中透析过夜。通过考马斯和免疫印迹分析分析所有纯化的蛋白质。使用In Fusion Gene Cloning试剂盒 (Clontech) 将p27, Δ K1, Δ K3, Δ K1/K3,Y74F和Y88/89F盒克隆到pTRE3G四环素诱导型逆转录病毒表达构建体中。使用PCDNA3载体 (38) 中的人Alt-Brk作为模板,通过PCR产生Alt Brk,然后使用In-fusion克隆试剂盒克隆到T7pGEMEX人Flag-标记的质粒和pTRE3G中。Alt-Brk的氨基酸序列如下所示:

[0066]

MVSRDQAHLGPKYVGLWDFKSRTDEELSFRAGDVFHVARKEEQWWWATLLDEAGGAVAQGYVPHNYLAERETVESEP AGHAGCAALQDLAACRGPAAPERGGVLPQPARACELPQGPEPVPRPAAGRALPEARA (SEQ ID NO:12)。

[0067] 可通过截短3、5、10、15、20、25、50或更多个氨基酸来产生该序列的模拟物和突变体。也可以产生其中单个氨基酸可以被密切相关的其他氨基酸取代的变体。例如,单个氨基酸可以如下取代:任意疏水性脂族氨基酸可以用任意其它疏水性脂族氨基酸取代;任意疏水性芳香族氨基酸可以用任意其它疏水性芳香族氨基酸取代;任意具有极性侧链的中性氨基酸可以用任意具有极性侧链的其他中性氨基酸取代;酸性氨基酸可以用酸性氨基酸取代;并且碱性氨基酸可以用碱性氨基酸取代。具有优选性质和活性的变体和突变体也可以通过用不紧密相关的氨基酸取代某些氨基酸来产生,例如用中性氨基酸取代带电荷的氨基酸。也可以产生非连续氨基酸的融合蛋白。可以使用从先前解析的各种Src家族酪氨酸激酶的3D结构获得的信息进行特定改变。每种模拟物应有效干扰pY磷酸化。

[0068] 重组细胞周期蛋白D1-cdk4。从共感染的High5细胞中收获重组His-细胞周期蛋白D1-cdk4,并如前所述进行纯化 (James等,同上)。纯化重组GST-Rb (86Kd版本) 并用于体外激酶测定。

[0069] p27-细胞周期蛋白D1-Cdk4三元复合物的体外磷酸化。将重组His-p27和突变体在室温下与细胞周期蛋白D1-Cdk4在25mM Hepes,pH7.4中一起孵育1小时。用抗Cdk4抗体 (Santa Cruz, DCS 35) 和Protein G Dynabeads (Invitrogen,10004D) 免疫沉淀该三元复合物。然后将复合物进行SFK磷酸化和/或用于体外Rb激酶测定。

[0070] 细胞系。MCF10A,MCF7,MDA MB 231,MDA MB 468,T47D,PC3,Mv1Lu和HEK 293购自

ATCC并根据供应商的说明保持。将胰岛素水平调节至0(-),10(+)或50(+++) $\mu\text{g/ml}$,并使细胞生长2周,然后如所述进行测定。为了通过接触而停止,使细胞生长至汇合并保持6天,每隔一天补充培养基。如材料和方法部分中所述进行免疫沉淀、免疫荧光、PI染色。如所述进行FACS分析(Nguyen K.D.et al. (2010) J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.5,556-62)。使用自动细胞计数器(BioRad TC-20)计数细胞。通过台盼蓝染色测量活力并使用细胞计数器计数。

[0071] 免疫沉淀。用Triton裂解缓冲液(25mM HEPES pH 7.4,100mM NaCl,1mM EDTA,10%甘油,1%Triton X-100)或吐温裂解缓冲液(50mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,1mM EDTA,2.5mM EGTA,10%甘油,0.1%吐温-20)裂解细胞。裂解缓冲液补充有1mM PMSF,10mM DTT,1mM NaV,10ng/ml亮抑酶肽(Leupeptin)和1ng/ml抑肽酶(Aprotinin)。通过与Dynabeads A或G(Life Technologies)在4℃孵育1小时,将裂解物(1mg)预先澄清。免疫沉淀如所述进行(James等,同上)。

[0072] 免疫荧光。在第0天将细胞系分成亚汇合条件,并在第2天在微孔板中使用1X PBS,pH7.4中的4%多聚甲醛在室温下固定15分钟。用0.1%Triton X-100对其进行透化,并在室温下用5%BSA封闭1小时。将它们与PBS中的第一轮一抗在室温下孵育1小时。将细胞用PBS洗涤,并与在3%BSA/PBS中稀释的适当的二抗(1:500)在室温下一起孵育1小时。然后将它们用PBS洗涤,并在室温下与0.02%Triton X-100/3%BSA孵育30分钟以制备它们用于用抗体进行第二轮孵育。然后将细胞用PBS洗涤,并在室温下与Hoechst染色剂(1mg/ml)(1:5000于PBS中)孵育15分钟。将它们用水冲洗并用90%甘油封装在载玻片上。将样品在4℃孵育,然后通过共聚焦显微镜分析。

[0073] 抑制剂处理。将细胞一式两份接种在六孔板上,每孔 5.0×10^4 个细胞。接种后24小时,用胰蛋白酶处理每个平板的一个孔,并使用Biorad Automated细胞计数器计数。接种后48小时,用胰蛋白酶处理另一个孔并计数,并用50nM,100nM,200nM和400nM的帕博西林(SelleckChem)处理其余孔。DMSO用作阴性对照。处理后24和48小时再次计数细胞。对于处理后48小时的每种细胞系,通过将用不同浓度的帕博西林处理的活细胞的数量相对于用DMSO处理的活细胞的数量标准化,来确定 IC_{50} 值。用DMSO处理的活细胞的数量被认为是100%。获得活力值的对数,并将数据拟合至非线性回归曲线,使用Graphpad Prism软件用该非线性回归曲线生成 IC_{50} 值。

[0074] Brk敲除。慢病毒siRNA颗粒购自Sigma Aldrich:NM_005975.2-1064sc1和NM_004383.x-2117sc1。在第0天接种MCF7细胞,在第1天,吸出培养基并用siRNA慢病毒颗粒感染细胞。根据制造商的说明使用溴化己二甲铵以提高感染效率。将细胞孵育过夜,在第2天补充培养基,将细胞孵育72小时,用4%多聚甲醛固定,并如所述进行免疫荧光。

[0075] 体内表达。已经描述了WT-Brk,KM-Brk和YF-Brk的产生(Palka-Hamblin H.L.et al., (2010) J.Cell Sc.123:236-45)。通过使用Lipofectamine 2000(Life Technologies 11668-019)转染具有pAmpho包膜和pBabe或pTRE3G四环素诱导型构建体的HEK 293细胞,产生双嗜性逆转录病毒。病毒感染MCF7细胞后,通过嘌呤霉素选择分离稳定的整合子。合并菌落以产生稳定的嘌呤霉素抗性克隆。通过免疫印迹和免疫荧光分析证实稳定表达。通过在培养基中加入TetExpress(Clontech)实现四环素诱导型表达。

[0076] 定量RT-PCR。使用TRIzol试剂(Life Technologies)按照制造商的说明书进行RNA

提取。使用Verso cDNA试剂盒(Thermo Scientific)对500µg的RNA进行逆转录。将250ng RNA与cDNA引物和ABsolute Blue qPCR SYBR Green(Thermo Scientific)混合以进行qPCR。

[0077] 使用以下引物进行q-PCR:

[0078]

基因	正向引物	反向引物
----	------	------

肌动蛋白	5'-AAAATCTGGCACCACACCTTCTAC-3' (13)	5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAACG-3' (14)
------	-------------------------------------	-----------------------------------

Brk	5'-CCAAGTATGTGGGCCTCTGG-3' (15)	5'-AAAGAACCACGGTTCGACT-3' (16)
-----	---------------------------------	--------------------------------

Alt Brk	5'-GACGGTGGAGTCGGAACCTG-3' (17)	5'-TAGTTCACAAGCTCGGGCAG-3' (18)
---------	---------------------------------	---------------------------------

[0079] (括号中的数字是SEQ ID NO号)。

[0080] 人类患者材料的分析。将从ER/PR+、Her2-患者的乳房肿瘤切除术或乳房切除术中丢弃的材料(得到了布鲁克林大学医院的患者的知情同意)在外植体培养基DMSO、高非生理性帕博西林或生理浓度的帕博西林(紫色)中生长48小时。将患者材料的6个1mm³切片置于6孔培养皿的孔中的,在温的完全DMEM培养基+FBS中饱和的牙科海绵上。使样品在孵育器中恢复48小时。48小时后,加入DMSO、100nM帕博西林或500nM帕博西林另外48小时。用镊子取出外植体样品,将材料在10%福尔马林中固定,石蜡包埋并用IHC染色Ki67,Ki67为增殖标志物。通过在100nM帕博西林的存在下Ki67的减少来衡量Palnociolib响应。每个数据点是4个样品的平均值(2个独立的外植体样品,每个外植体的2个独立的免疫组织化学染色(记为A和B)。每个样品由两位病理学家匿情读取。

[0081] 在乳房肿瘤切除术或乳房切除术时从相同患者取出活检或切除材料,送至DMC病理科进行10%福尔马林固定和石蜡包埋。然后如所述在双重pY/p27 IHC测定中对材料进行染色。

[0082] 评分:

[0083] 0=无pY染色

[0084] 1=1-29%pY+细胞,0%强染色

[0085] 2=1-29%pY+细胞,仅5-20%强染色

[0086] 3=30-100%pY+细胞,>20%强染色

[0087] 细胞块制备。使1×10¹²个细胞在组织培养基中生长,旋转沉淀并固定于10%福尔马林中,包埋在石蜡中,然后按照所述的双重pY/p27 IHC测定进行分析。在细胞块制备前,用400nM帕博西林处理MCF7细胞48小时。5个独立实验由两位病理学家匿情读取。

[0088] 评分:

[0089] 0=无pY染色

[0090] 1=弱pY染色

[0091] 2=中度pY染色

[0092] 3=强pY染色

[0093] 用p27/pY88抗体进行双重免疫组织化学测定。

[0094] 试剂:

[0095] 染色试剂盒:Enzo Lifesciences (ADI-950-100-0001);抗原修复溶液:Dako (S1699);PAP笔:Fisher Scientific (XT001-PP);蛋白质块:Dako (X0909);抗体稀释液:Dako (S3022);P27抗体:BD Biosciences (610242);封装溶液:Fisher Scientific (SP15-100)

[0096] 染色方案

[0097] 在第1天,用铅笔标记载玻片,在65℃的烘箱中烘烤30分钟,立即从烘箱转移到含有二甲苯的科普林氏(coplin)罐中。将载玻片在室温下在二甲苯中漂洗4次,每次3分钟,然后在室温下在100%-95%-75%乙醇中进行分级醇洗涤3次,每次3分钟。然后通过H₂O中孵育3分钟使载玻片水合。干燥后,使用PAP笔在组织周围形成疏水屏障。通过将载玻片与过氧化物块在室温下孵育30分钟来阻断内源性过氧化物。将载玻片用TBS-0.1%吐温20洗涤3次,每次3分钟,然后在1X PBS中孵育3分钟。在室温下与蛋白质块孵育1小时后,向载玻片中加入在DAKO抗体稀释剂中1:200稀释的P27pY88抗体,在4℃孵育过夜。

[0098] 在第2天,由10X储液制备1X抗原修复溶液,并将其在100℃水浴中平衡。在抗原修复溶液的温度达到100℃后,将载玻片在室温下用TBS-0.1%吐温20洗涤3次,每次3分钟。在100℃下进行抗原修复30分钟。30分钟后,将科普林氏罐在室温下冷却另外20分钟。然后将载玻片在1X PBS中孵育3分钟。在DAKO抗体稀释剂中制备P27kip1抗体(1:1000)稀释液。将载玻片与p27kip1抗体在4℃孵育过夜。

[0099] 在第3天,将载玻片在TBS-0.1%吐温20中孵育3次,每次3分钟。将Polyview IHC小鼠HRP和Polyview IHC兔AP在Eppendorf中以等体积混合,并将混合物加入载玻片中并在室温下孵育20分钟。然后将载玻片在TBS-0.1%吐温20中孵育3次,每次3分钟。在该孵育期间,将1ml小鼠HRP色原缓冲液与20ul(或一滴)DAB色原混合。它们通过倒置混合并避光。将载玻片与活化的DAB底物在室温下孵育5分钟。将它们在TBS-0.1%吐温20中洗涤3次,每次3分钟。通过倒置试管并避光,将1ml兔AP色原缓冲液与20ul(或一滴)AP色原混合。然后将载玻片与活化的AP底物在室温下孵育15分钟,并在TBS-0.1%吐温20中洗涤3次,每次3分钟,然后在室温下用自来水洗涤5分钟。载玻片然后在室温下用75%-95%-100%乙醇冲洗3次,每次3分钟,并使用Permout溶液进行封装。

[0100] 统计。使用Student's t检验,Welch's t检验,2尾3型检验进行统计分析,因为样本量不等,方差不等。

[0101] 提供以下实施例以说明本发明的某些实施方案。它们不旨在以任何方式限制本发明。

[0102] 实施例I

[0103] PY作为确定癌细胞对CDK4抑制剂的敏感性的标记物

[0104] 在本实施例中,pY用作人患者材料中的标记物,以确定特定肿瘤是否具有适合被cdk4抑制剂抑制的适当范围的cdk4活性。我们开发了pY p27的磷酸特异性抗体,并证明它识别福尔马林固定的、石蜡包埋的归档人乳腺癌材料(ER/PR+/Her2-)中的pY。和100%外显率一致,抗体不会对从人乳房缩小手术获得的良性组织进行染色。虽然具有不同的强度,但

所分析的ER/PR+/Her-2乳腺癌样品中的75%呈pY染色阳性。

[0105] p27含有三个推定的SH3募集序列,它们含有共同的PxxP核心基序,命名为K1、K2和K3(图1A)。K1在PxxP后含有碱性残基,因此其是规范型2K SH3靶位点(Cesareni G.et al., (2002) FEBS Lett. 513:38-44)。K2仅存在于p27的人直系同源物中,因此不太可能介导细胞周期调控中的保守功能。K3位于p27的C-末端,在已显示对cdk相互作用不是必要的区域中。基于报道的p27与非受体结合的酪氨酸激酶(SFK)(如Src、Yes和Lyn)的相互作用,我们提出以下问题:该家族的其他成员是否也可能与p27相互作用,以及使用了哪些募集序列(K1、K2和/或K3)。我们使用噬菌体-ELISA程序(Asbach B.et al. (2012) PLoS One 6:e38540.)检测了SFK家族的11名成员以及Ab1(据报道Ab1在体外和体内磷酸化p27)与全长p27或GST-标记的K1、K2或K3肽的结合(图1B、1C)。

[0106] 虽然大多数SFK的SH3结构域可以与全长p27相互作用,但我们发现Brk的SH3结构域与全长p27强烈地相互作用($K_d=250\text{nM}$),并且比Src或Ab1更好地结合,Src和Ab1是已知与p27相互作用的两个SFK(图1B)。该 K_d 值反映了p27与噬菌体之间的相互作用,噬菌体含有许多相同的重复的SH3结构域,这将使结合增强。我们将p27内的各个SH3募集位点(K1、K2和K3)表达为GST-融合肽,并针对SH3结构域文库对其进行测试(图1C)。在不存在任何p27序列的情况下表达的GST结构域用作阴性结合对照(GST)。大多数SFKSH3结构域不能与各个的含有PxxP的肽显著相互作用(数据未显示)。在该测定中,Brk与K3区域强烈地相互作用,并且与K1区域弱相互作用(图1C)。相关激酶Frk是全长p27的第二个最佳结合物(图1B),但是当针对各个PxxP结构域进行测试时,检测到与GST阴性对照的显著结合(图1C),因此我们无法推断是否Frk的SH3结构域与PxxP结构域肽结合。Ab1和Yes的SH3结构域与p27的K3结构域相互作用,尽管与Brk相比,这种相互作用降低(图1C)。没有SH3结构域与K2位点相互作用(图1C)。突出显示SH3结构域的Brk序列在图1D中提供。我们使用来自X射线晶体学研究以及来自PDB+ jFATCAT刚性数据库的3D结构,对Brk和Src SH3结构域进行了计算机模拟分析。我们确定连接 β 折叠的环中的差异存在于结合p27的Brk SH3结构域和不结合p27的Src SH3结构域之间。当我们将Src SH3环转换为Brk Sh3结构时,我们创建了一个不与p27结合的变体,证明至少部分地,某些特异性来自于所述环。我们鉴定了Brk SH3结构域环中介导这种结合的残基,并将他们用残基取代,以增加Brk SH3变体和p27K1结构域之间的亲和力。当用改变的K1或K3位点产生p27的变体时,结果显示体外和体内pY88磷酸化都需要K1位点。虽然K3位点可以更好地结合Brk SH3结构域作为单体肽,但在全长p27的情况下,结合和磷酸化通过K1位点介导。

[0107] 细胞周期蛋白D-cdk4(DK4)一直是备受追捧的治疗靶点,因为它在大多数人类肿瘤中(包括ER/PR+、Her2-乳腺癌)驱动癌症增殖。我们已经探索了最近发现的p27Kip1及其激活剂——乳腺肿瘤相关激酶(Brk)对DK4进行细胞周期调控的机制的临床效用,用于预测对治疗的响应性和作为治疗的新靶标。虽然被称为DK4组装因子和cdk2抑制剂,但p27也可作为DK4开启/关闭的“开关”。Brk对p27的酪氨酸(Y)磷酸化(pY)控制cdk4的T环的ATP结合和CAK磷酸化,这对DK4激活至关重要。该功能仅限于cdk4:p27与cdk2的结合,无论是否是Y磷酸化的,似乎都是抑制性的。然而,体内Y磷酸化的p27是cdk2依赖性泛素介导的降解的靶标,减少了p27与cdk2的结合,间接激活了该复合物。这导致以下模型:阻断p27 pY将直接灭活cdk4并且间接灭活cdk2,因此代表一种阻断癌细胞增殖的新方法。pY还可作为cdk4抑制

剂活性、肿瘤对治疗的响应和化学治疗抗性的预测性生物标志物。

[0108] 为了阻断乳腺癌细胞系中的pY,我们使用了一种小肽ALT,其含有Brk的SH3结构域的一部分。ALT与p27结合,阻断Brk的关联以及磷酸化p27的能力,抑制cdk4并增加p27抑制cdk2的能力。我们生成了表达ALT的四环素诱导型细胞系和/或工程化了基于脂质的纳米颗粒递送载体(NP-ALT),允许我们测试作为第一代治疗剂的ALT。ALT还与帕博西林一起用于确定组合疗法是否降低了耐药性。pY抑制具有内置的、用于效力以及响应细胞系和/或未来患者的鉴定的生物标志物。我们开发了用于p27和pY的双重IHC测定,我们用它分析了先前分级为帕博西林敏感性的乳腺癌细胞系小组以及石蜡包埋的归档人类肿瘤样本。

[0109] 我们的结果显示,ALT阻断了ER/PR+、Her2-乳腺癌细胞系中的pY、cdk4和cdk2活性以及增殖。几个细胞系中帕博西林介导的停滞不是很持久,细胞很快就会对治疗产生抗性,我们证明这是由于cdk2补偿cdk4活性丧失的能力。由于ALT使cdk4和cdk2均失活,因此ALT介导的停滞更具抗药性(停滞>10天)。作为双重治疗,ALT治疗与帕博西林协同作用以使细胞停滞>30天,并且增加衰老,防止药物去除后的恢复。pY水平与cdk4活性相关:增加或减少Brk表达分别增加或减少pY和cdk4活性,这与帕博西林敏感性的增加或减少相关。我们发现对帕博西林响应良好的MCF7细胞($IC_{50}=200\text{nM}$)具有较低的pY(较少的cdk4活性需要较少的药物),而Rb+细胞,如治疗窗口内施用的帕博西林响应不佳的HCC1954,具有很高的pY,表明较高的cdk4活性需要升高的药物浓度($IC_{50}=1000\text{nM}$)。参见图5。细胞如具有中等水平pY的MDA MB231对帕博西林具有中等要求($IC_{50}=400\text{nM}$)。从档案来源获得的人类癌症的分析表明,在静止的良性乳腺组织中从未检测到pY,但是在所分析的大约一半的晚期ER/PR+/Her2-肿瘤中检测到pY,尽管具有不同的染色强度。

[0110] 我们得出结论,阻断p27 pY提供了一种抑制cdk4抑制剂敏感性和癌细胞增殖的强有力的方法,因为它抑制cdk2和cdk4,诱导衰老并防止耐药性。我们的数据表明,虽然通过pY测量的cdk4活性水平将决定初始响应性,以抑制药物抗性,但也应抑制cdk2活性。从上面可以清楚地看出,pY88水平可用于预测cdk4抑制剂的敏感性,其中水平为0表示对cdk4抑制无可检测的敏感性,水平为1表示低或无可检测的敏感性,2或3表示对cdk4抑制有可检测的敏感性。

[0111] Brk-p27-DK4轴是cdk4和cdk2活性、肿瘤响应和抗性的预测性生物标志物。

[0112] 迫切需要鉴定对帕博西林和其他cdk4选择性抑制剂有响应的患者。虽然患者接受帕博西林和来曲唑(Letrozole)治疗后PFS显著改善,但总生存期(OS)无统计学差异。在本研究中,没有从OS数据中去除完全无响应者。我们假设如果可以鉴定无响应者并将其从试验中去除,那么临床结果可能会更好。由于帕博西林每年的成本>10万美元,因此潜在响应患者的鉴定是一个理想的目标。

[0113] 分子特征性乳腺癌细胞系的体外大组分析提供了对哪些亚组更有可能从cdk4阻断治疗中获益的见解。乳腺癌细胞系已经针对帕博西林敏感性进行了分级(图3)。示出了响应的 IC_{50} 值,并且细胞系可以细分为高、中或无响应。在该研究中,鉴定了几种不含RB的抗性系,因此抑制cdk4没有效果。然而,还有几种Rb+抗性系,如HCC1186、HCC1954和Ca151。在这些细胞系中,帕博西林不抑制cdk4依赖性RB磷酸化,这表明CDK4以预防帕博西林结合的方式突变,或cdk4活性水平过高(≥ 3)以至于不能被治疗窗口内的药物抑制,或一些其他激酶如cdk2补偿cdk4损失,允许Rb磷酸化。值得注意的是,尽管细胞系可用于预测抗癌剂的效

力,但细胞系中获得的数据可显著不同于原位肿瘤或离体肿瘤中观察到的数据。

[0114] 我们假设pY水平可能用帕博西林敏感性分级。我们通过双重IHC测试了无响应者(HCC1954)、中度(MDA MB 231)和高响应者(MCF7)细胞系中的每一种的p27(褐色)和pY88(粉红色)表达(将DAB检测系统与APAAP组合)(图4)。虽然我们在所有三个细胞系中检测到了pY88,但我们发现高响应者(MCF7, $IC_{50}=200nm$)具有较低的pY染色(具有+1染色强度),而中度响应者(MDA MB 231, $IC_{50}=400nm$)具有中等水平的pY(具有+1-2染色强度),无响应者(HCC1954, $IC_{50}=1000nm$)具有非常高水平的pY88(具有+2-3染色强度)。我们可能期望在非响应者细胞系中看到pY88完全缺失,表明没有任何作为药物靶标存在的cdk4。然而,我们在该细胞系中检测到了最强的pY88染色。这些数据表明cdk4的水平可能决定停滞,“速度限制”型模型可能解释这些结果:没有pY染色(0级)表示cdk4太少,表明完全无响应者,但cdk4过多(水平 ≥ 3),如非常高的pY染色所示,也可以鉴定无响应者,因为在体内显示响应并抑制该量的cdk4所需的帕博西林浓度是有毒的($>1000nm$)。在这种情况下,不同的cdk4抑制剂(下文描述)可以比帕博西林更好地起作用以抑制癌细胞增殖。值得注意的是,当用400nM帕博西林处理MCF7细胞时,pY染色减少(0%的细胞染色)并导致0强度。

[0115] 乳腺癌细胞对帕博西林治疗具有不同的动力学抗性,我们的数据表明长期帕博西林响应vs抗药性可能是由于cdk2激活所致。帕博西林可能能够最初并瞬时抑制cdk4(细胞周期停滞),但随着时间的推移,cdk2能够弥补这种损失并克服细胞静止(抗性)。增加或减少pY将向上或向下“拨动(toggle)”帕博西林敏感性。正如我们在MCF7细胞中所显示的,抑制Brk会降低p27 pY并降低cdk4活性。相反,增加Brk表达会增加p27 pY并增加cdk4活性。

[0116] 我们筛选了15例通过穿刺活检获得的福尔马林固定、石蜡包埋的乳腺肿瘤(图5)。这些肿瘤为II级和III级,ER/PR+、Her2-,预后不良的亚组。该亚组约占乳腺癌患者的40%,并且它们不是Her2靶向疗法的候选者。该亚组目前是帕博西林Paloma试验的焦点。所有样品均为2-3级,Ki67+范围为10-50%。通过病理学在样本集中没有检测到其他差异。然而,通过p27/pY88测定中的染色,我们能够基于它们的pY状态进一步对这些难以区分的ER/PR+、Her2-样品进行分级。我们还筛选了5个良性乳腺活检组织。我们用p27(褐色)和pY88(粉红色)抗体进行双重IHC分析,结果由两位独立的病理学家匿名分析(图5B、C)。对载玻片染色阳性的细胞百分比和pY88染色的强度进行评分(0、1、2、3)。我们发现100%的非肿瘤性正常样本为p27阳性且pY88阴性,与静息组织具有失活的cdk4的模型一致(图5B、5C,crème框)。这些样品为Ki67-(静息)并且缺乏pY染色的,表明cdk4是无活性的并且细胞不处于周期中。这也证实了pY88抗体对Y磷酸化具有特异性,并且不识别非磷酸化的p27。如表1所示,所分析的ER/PR+、Her2-肿瘤的100%对p27染色呈阳性。在该肿瘤亚组中检测到了pY88的三个分级:47%具有高pY88染色,25.5%具有低和局部pY88染色,25.5%无pY88染色。

[0117] 表1, Her2-患者

[0118] pY亚组

[0119] 无 25.5%

[0120] 中度 25.5%

[0121] 高 47%

[0122] 无:0%的细胞+pY

[0123] 中度:1-29%的细胞+pY

[0124] 高:30-100%的细胞+pY

[0125] 虽然我们没有这些患者的相应的帕博西林敏感性数据,但结果表明该亚组可以根据pY水平进一步划分,这将转化为表示对帕博西林的不同敏感性的cdk4活性水平。这里细胞系和数据之间检测到的巨大差异是25.5%的患者没有pY88染色(0级)。这并不意外,因为细胞系是增殖和转化的。我们的数据表明0pY88染色组将不会对帕博西林有响应。

[0126] 第二个差异是虽然细胞系是克隆的并且每个细胞以相同的方式染色,但由于同一肿瘤中固有的肿瘤异质性,在肿瘤块中,一些细胞染色而一些细胞没有染色。我们计算了染色+(上图)的细胞百分比,但我们也以0-3的等级确定了pY88强度(图5A),其中0表示Y88阴性,并且更类似于细胞块中使用的评分。26.7%的样品对于pY染色呈阴性(图5B,绿色,0)并且类似于正常材料(*crème*)。这表明该组没有活性cdk4,并且不会响应于PD治疗。其余样品确实具有用pY染色的细胞:26.7%的样品具有1-29%的pY染色细胞(图5B,黄色,1-2级),46.6%具有30-100%染色(图5B,褐色,3级)。在组3中,其中>30%的细胞对pY染色,~50%的染色细胞对pY强染色(%pY88强,红色)。然而,一名患者(D26)有许多细胞是Y88+,但只有7.5%是Y88强。在组1中(图5B,黄色),其中较少的细胞是阳性的,大多数没有对pY88强染色(图5B,紫色),但是两名患者(D18和D26)具有少的<10%的强染色细胞(图5B,灰色)。落入0和3组的样品容易区分:组0没有Y88染色且没有强Y88染色,而组3有>30%的细胞有Y88染色并且这些细胞的>50%强染色。1-2组混合较多,可分为2组:<10%细胞染色呈弱阳性(无强Y88染色)的那些,和20-50%阳性染色并具有<20%强染色的那些。数据表明0组不会对PD治疗产生响应,因为这些样品缺乏pY,因此缺乏cdk4活性。组3应该会对PD做出响应,因为存在“可药物(druggable)”靶标并指示cdk4活性。组3中的pY水平可与可能需要更高浓度的帕博西林的cdk4活性水平相关。落入组1-2的样品将需要较低的帕博西林浓度。

[0127] 图7示出了从ER/PR+、Her2-患者的乳房肿瘤切除术或乳房切除术中丢弃的材料的外植体培养物的结果,该材料用无(DMSO;绿色)、高非生理性帕博西林(500nM,红色)或生理浓度的帕博西林(100nM,紫色)处理。固定的、石蜡包埋的块针对Ki67进行染色,Ki67作为增殖的标志物。高浓度的药物(紫色)是内部对照,可以抑制增殖。每个患者具有不同的固有增殖率,如通过未处理样品(绿色)中不同的Ki67水平所测量的。通过在生理浓度的药物(红色)的存在下Ki67的减少,来衡量帕博西林响应。患者1和3响应。每个数据点是4个样品的平均值(2个独立的外植体样品和2个独立的免疫组织化学染色)。每个样品由两位病理学家匿情读取。

[0128] 在另外的实验中,在乳房肿瘤切除术或乳房切除术时从相同患者取出的材料被送至DMC病理科进行固定和石蜡包埋。然后在双重pY/p27 IHC测定中对材料进行染色。样品评分如图6。

[0129] 0=无pY染色

[0130] 1=1-29%pY+细胞,0%强染色

[0131] 2=1-29%pY+细胞,仅5-20%强染色

[0132] 3=30-100%pY+细胞,>20%强染色

[0133] 从该实验(n=4名患者),pY状态为3=响应,而pY状态为0或1=无响应。在强度为1的样品染色中,肿瘤块可能缺乏足够数量的携带cdk4靶标的细胞或者肿瘤对cdk4活性的依赖性较小。

[0134] 我们开发了一种非常方便的、可重复的测定和分析,可以快速应用于这些其他乳腺癌亚组和其他癌症类型。我们的测定可以应用于切除材料,其通常具有如由结构表征所定义的恶性和良性区域。我们将确定乳腺癌患者来源的良性区域(特别是在切除的边缘)是否与从非乳腺癌患者获得的材料一样“良性”。由于pY88明显不存在于良性组织中,因此在乳腺癌患者来源的良性区域中检测到pY88将证明边缘不像结构表征所表示的那样“干净”。

[0135] pY还可以用作生物标志物,以预测在IRB批准下从活组织检查和肿瘤切除术程序中获得的患者材料中的响应。使用具有三种帕博西林浓度的剂量响应曲线来确定IC₅₀值。IC₅₀<200nM将被定义为高响应。IC₅₀在201nM-500nM之间为中等,IC₅₀大于500nM为无响应性。

[0136] 实施例II

[0137] 用于改善与癌症,特别是乳腺癌相关的扩散和症状的测试和治疗方法

[0138] 在本发明的另一方面,公开了一种测试和治疗方法。首先,从肿瘤中取样并评估Y88磷酸化水平以确定cdk4活性水平。如前面实施例中详细描述,相对于在正常组织中观察到的水平,Y88磷酸化水平不可检测的患者不太可能受益于cdk4抑制剂治疗,而相对于在正常组织中观察到的水平,pY88磷酸化水平为1、2或3的患者应该受益于不同浓度的cdk4抑制剂治疗。为了治疗患有癌症的个体以减轻疾病的体征或症状,在表2中公开以及在上述实施例中描述的靶向cdk2和cdk4的合适药剂,可以在最有可能受益的患者中,单独或组合施用以减轻患者的肿瘤负担。这些药剂应以有效剂量施用。一个或多个总治疗剂量(当要调节两个或更多个靶标时)可以作为单剂量向受试者施用,或者可以使用分次治疗方案施用,其中多个/单独剂量在更长时间段内施用,例如,在一天的时间段内,以允许施用每日剂量,或在更长的时间段内以在所需时间段内施用剂量。

[0139] 本领域技术人员将知道在受试者中获得有效剂量所需的cdk抑制剂的量取决于许多因素,包括受试者的年龄、体重和一般健康状况,以及施用途径和待施用的治疗的数量。鉴于这些因素,技术人员将调整具体剂量以获得用于治疗患有癌症,特别是乳腺癌的个体的有效剂量。

[0140] cdk抑制剂的有效剂量将取决于施用方式和所治疗个体的体重。在患有癌症,特别是更严重形式的疾病的个体中,当组合施用,例如与用于治疗这种疾病的常规药剂一起施用时,cdk抑制剂的施用可能特别有用。技术人员将单独或组合施用治疗剂,并且将使用常规方法例如放射学、免疫学测定或,如果指出,组织病理学方法监测这种治疗的有效性。在优选的实施方案中,Y88磷酸化水平可用于监测治疗随时间的有效性。

[0141] 在本发明的一个优选实施方案中,提供了一种在组合方法中使用本实施例公开的药剂协同治疗癌症的方法。如上所述,Alt-Brk(或干扰Y88磷酸化的另一种剂)与帕博西林组合有效地协同使乳腺癌细胞增殖停滞。有利地,本发明的协同方法减少癌症的进展,或减少哺乳动物宿主中与癌症相关的症状。本文提供的信息在用于管理乳腺癌的新治疗方式中指导临床医生。

[0142] 用于安全有效地施用大多数这些药剂的方法是本领域技术人员已知的。另外,它们的施用描述于标准文献中。例如,许多抗癌剂的施用描述于“Physicians' Desk Reference”(PDR)中,例如1996年版(Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645-1742, USA);其公开内容通过引用并入本文。

[0143] 本发明还包括可用于治疗癌症的药物组合物,其包括施用治疗有效量的本发明的

组合,有或没有药学上可接受的载体或稀释剂。本发明的协同药物组合物包含两种或更多种前述实施例中描述的和/或下表中列出的药剂,和药学上可接受的载体。本发明的组合物还可包含一种或多种药学上可接受的其他成分,例如明矾,稳定剂,抗微生物剂,缓冲剂,着色剂,调味剂,佐剂等。本发明的抗癌组合物可以口服或胃肠外施用,包括静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下、直肠和局部施用途径。

[0144] 某些癌症可以用上面列出的多种化合物有效地治疗。这种三重和四重组合可以提供更大的效力。当以这种三重和四重组合使用时,可以根据已知方案确定剂量。

[0145] 本发明的组合还可以与众所周知的其他治疗剂共同施用,其他治疗剂根据其针对正在治疗的病况的特定有效性而选择。当多组合制剂不合适时,本发明的组合可以选择性地与已知的药学上可接受的剂相继使用。

[0146] 而且,通常,本文所述的化合物不必在相同的药物组合物中施用,并且由于不同的物理和化学特性,可能必须通过不同的途径施用。例如,第一种化合物可以口服施用以产生良好的血液水平并维持,而第二种化合物可以静脉内施用。在可能的情况下,在相同的药物组合物中施用方式和施用可行性的确定完全在熟练临床医生的知识范围内。可以根据本领域已知的已建立的方案进行初始施用,然后,基于观察到的效果,可以由熟练的临床医生修改剂量、施用方式和施用时间。

[0147] 如前所述,本发明人已经鉴定了用于预测乳腺癌患者的长期存活和对癌症疗法的响应的新的标志物。CDK靶标与合用的已知药物如表2所示。这些药物可以结合起来协同治疗癌症或同时减少癌症特别是乳腺癌的症状或进展。

[0148] 表2

抑制剂 (公司)	主要靶标 (其他靶标)
AG-024322 (Pfizer) ‡	CDK1、CDK2 和 CDK4 (其他 CDK)
AT7519 (Astex) ‡	CDK2、CDK4、CDK5 和 CDK9 (CDK1、CDK4、CDK6 和 GSK3β)
AZD5438 (AstraZeneca) *	NA
Flavopiridol, 也称为 alvocidib (Sanofi-Aventis) ‡	CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、CDK7 和 CDK9 (GSK3β)
Indisulam, 也称为 E7070 (Eisai) ‡§	NA
P1446A-05 (Nicholas Piramal) *	CDK4 (NA)
P276-00 (Nicholas Piramal) ‡	CDK1、CDK4 和 CDK9 (CDK2、CDK6 和 CDK7)
PD-0332991 帕博西林 (Pfizer) *	CDK4 和 CDK6 (NA)
R-roscovitine, 也称为 CYC202 和 seliciclib (Cyclacel) *	CDK1、CDK2、CDK5、CDK7 和 CDK9 (CK1、GSK3α-β、DYRK1A、ERK1、ERK2 和 PDXK)

抑制剂 (公司)	主要靶标 (其他靶标)
R547, 也称为 Ro-4584820 (Hoffmann-La Roche) ‡	CDK1、CDK2、CDK4 和 CDK7 (NA)
SCH 727965 (Schering-Plough) ‡	CDK1、CDK2、CDK5 和 CDK9 (NA)
SNS-032, 也称为 BMS-387032 (Suncsis) ‡	CDK2、CDK7 和 CDK9 (CDK1 和 CDK4)
Terameprocic, 也称为 EM-1421 (Erimos) ‡	CDK1、存活素 (survivin) 和 VEGFR (NA)
ZK 304709, 也称为 MTGI 和 ZK-CDK (Schering AG) *	CDK1、CDK2、CDK4、CDK7 和 CDK9 (VEGFR1 VEGFR2、VEGFR3 和 PDGFRβ)
Abeciclib (Eli Lilly)	CDK4、CDK6
Ribociclib (Chemietek)	CDK4、CDK6

[0151] 数据摘自<http://www.clinicaltrials.gov>。‡静脉内。*口服。§Indisulam不是直接的CDK抑制剂:它会导致细胞周期蛋白E水平降低,这会降低CDK2活性,并导致细胞周期蛋白H水平降低,这会降低CDK7活性。CDK,细胞周期蛋白依赖性激酶;CLL,慢性淋巴细胞白血病;CYC,细胞周期蛋白;DYRK1A,双特异性酪氨酸磷酸化调节的激酶1A;ERK,细胞外信号调节的激酶;G1,第一间隙;G2,第二间隙;GSK3β,糖原合成酶激酶3β;IC50,引起激酶活性(体外激酶测定)或细胞增殖(细胞增殖测定)50%抑制的化合物浓度;Ki,抑制常数;M,有丝分裂;NA,不可获得;NHL,非霍奇金淋巴瘤;NSCLC,非小细胞肺癌;PDGFRβ,血小板衍生生长因子受体-β;PDXK,吡哆醛激酶;RB1,视网膜母细胞瘤蛋白;S,合成;VEGFR,血管内皮生长因子受体。

[0152] 虽然上面已经描述并具体例示了本发明的某些优选实施方案,但并不意味着本发明限于这些实施方案。在不脱离如所附权利要求中阐述的本发明的范围和精神的情况下,可以对其进行各种修改。

10 20 30 40 50 60
 MSNVRVSNQS PSLEPMDARQ AEHPKPSACR NLFGPVDHEE LTRDLEKHCR DMEEASQPKW
 70 80 90 K1 100 110 K2 120
 NFDFQNHKPL ECKYEWQEV E KGSLEFYYP PPRPPK SACK VFAQESQDVS GSNPAAPLIG
 130 140 150 160 170 180
 APANSEDTHL VDFKTDPSDS QTGLAEQCAG IERKRPATDDS STQNHKPAHRT EENVSDGSPN
 K3
 190
 AGSVEQTPNK PGLRRQT

图1A

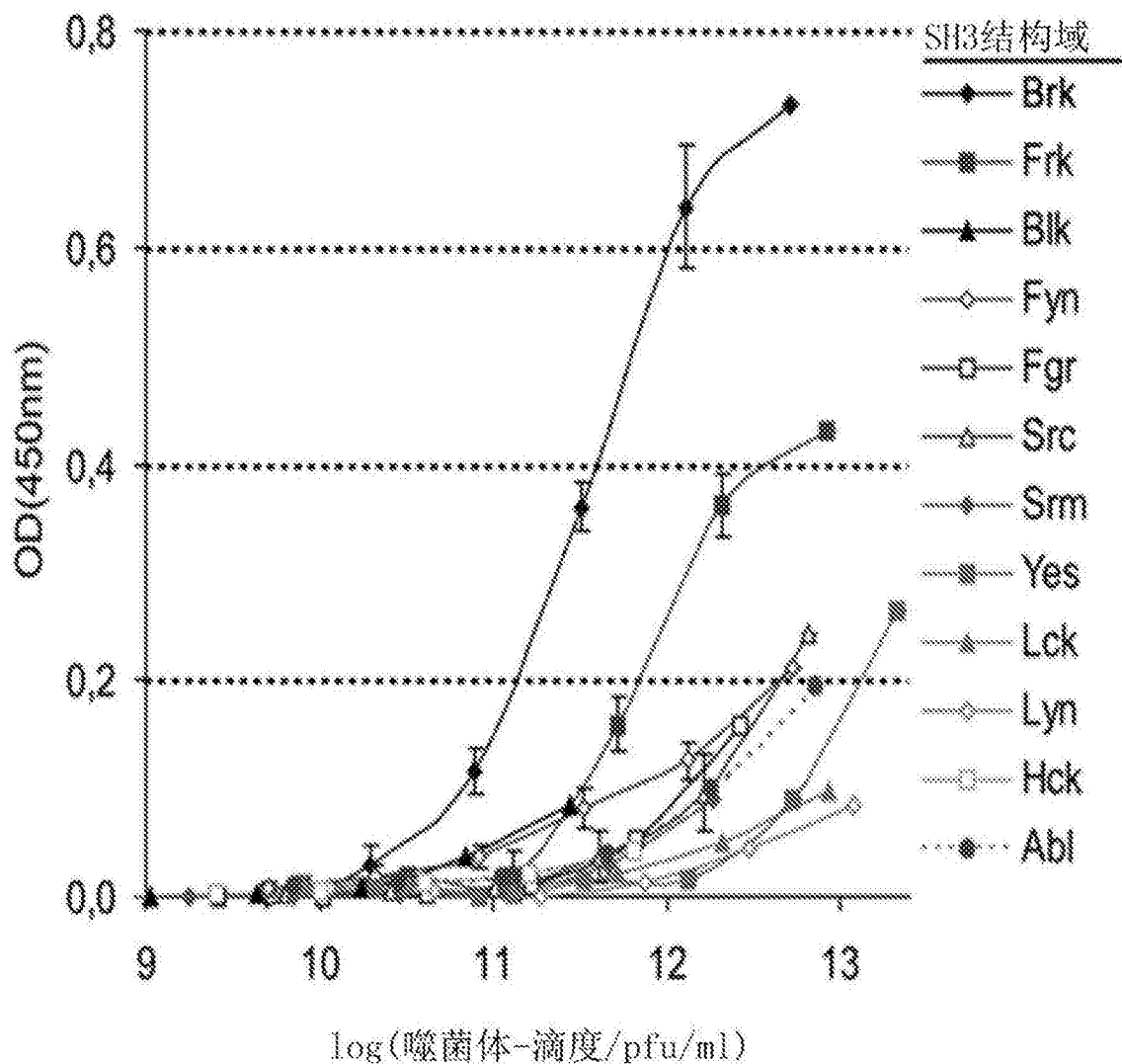


图1B

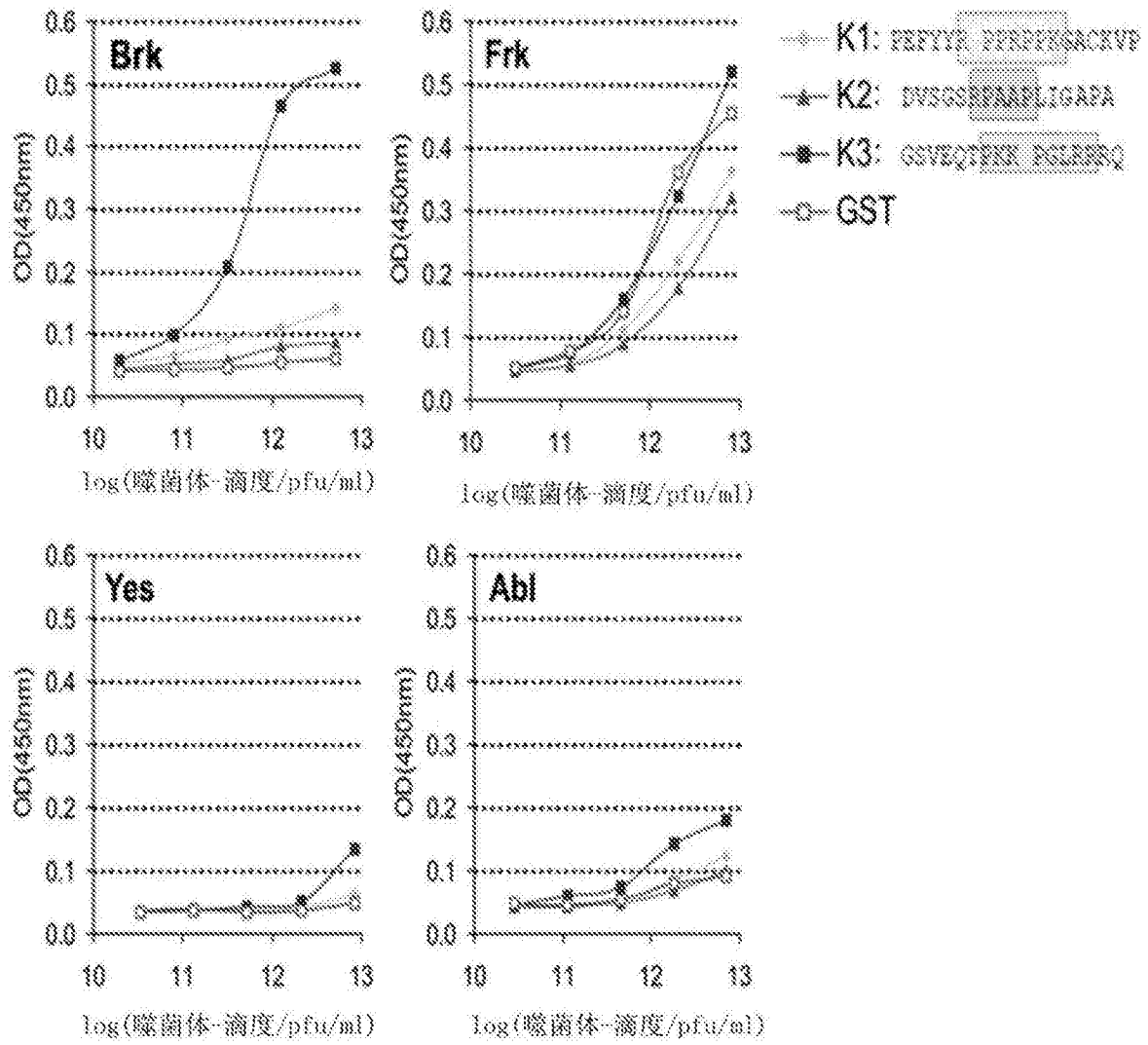


图1C

Brk SH3 vs. Src SH3

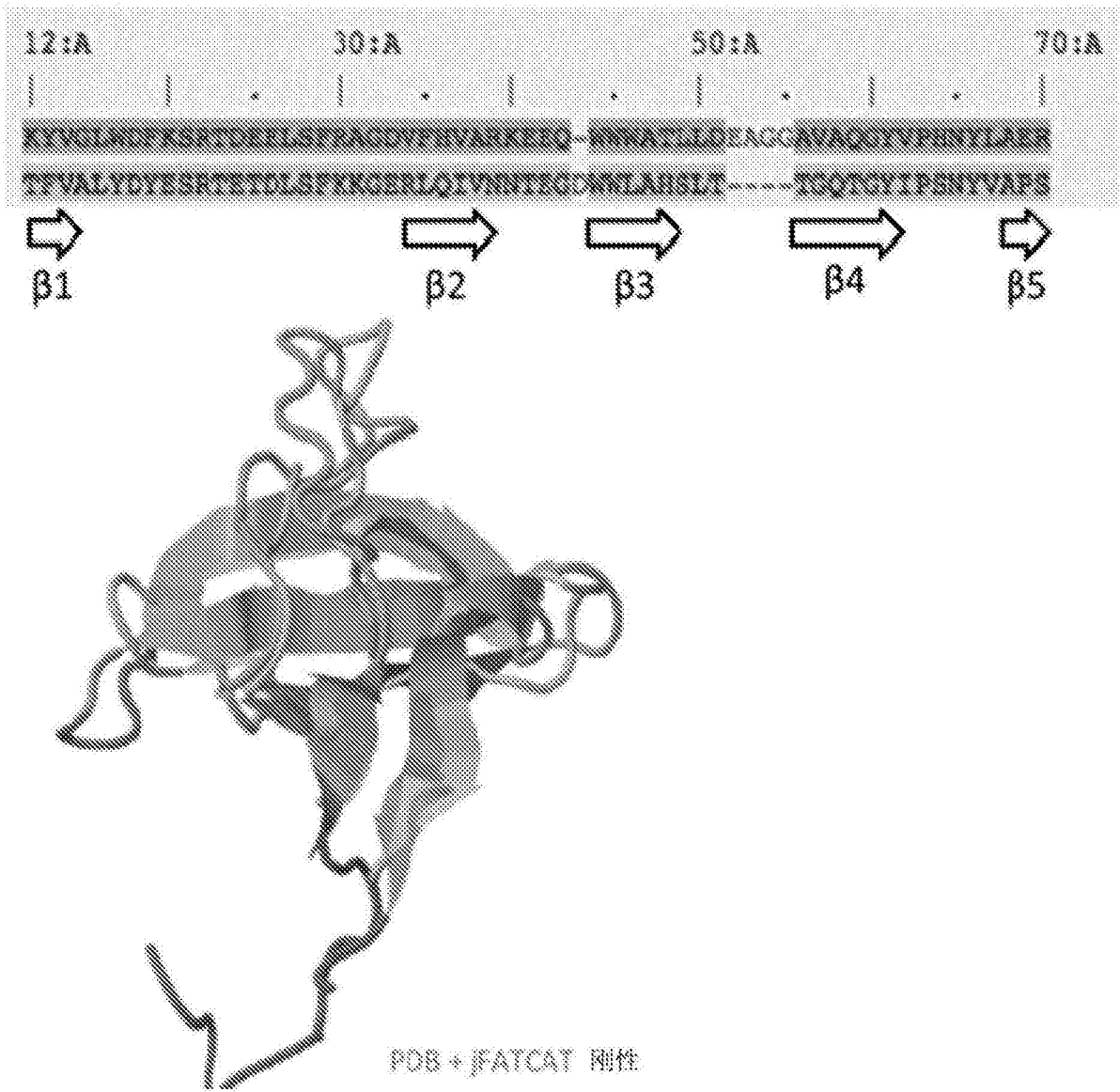


图1D

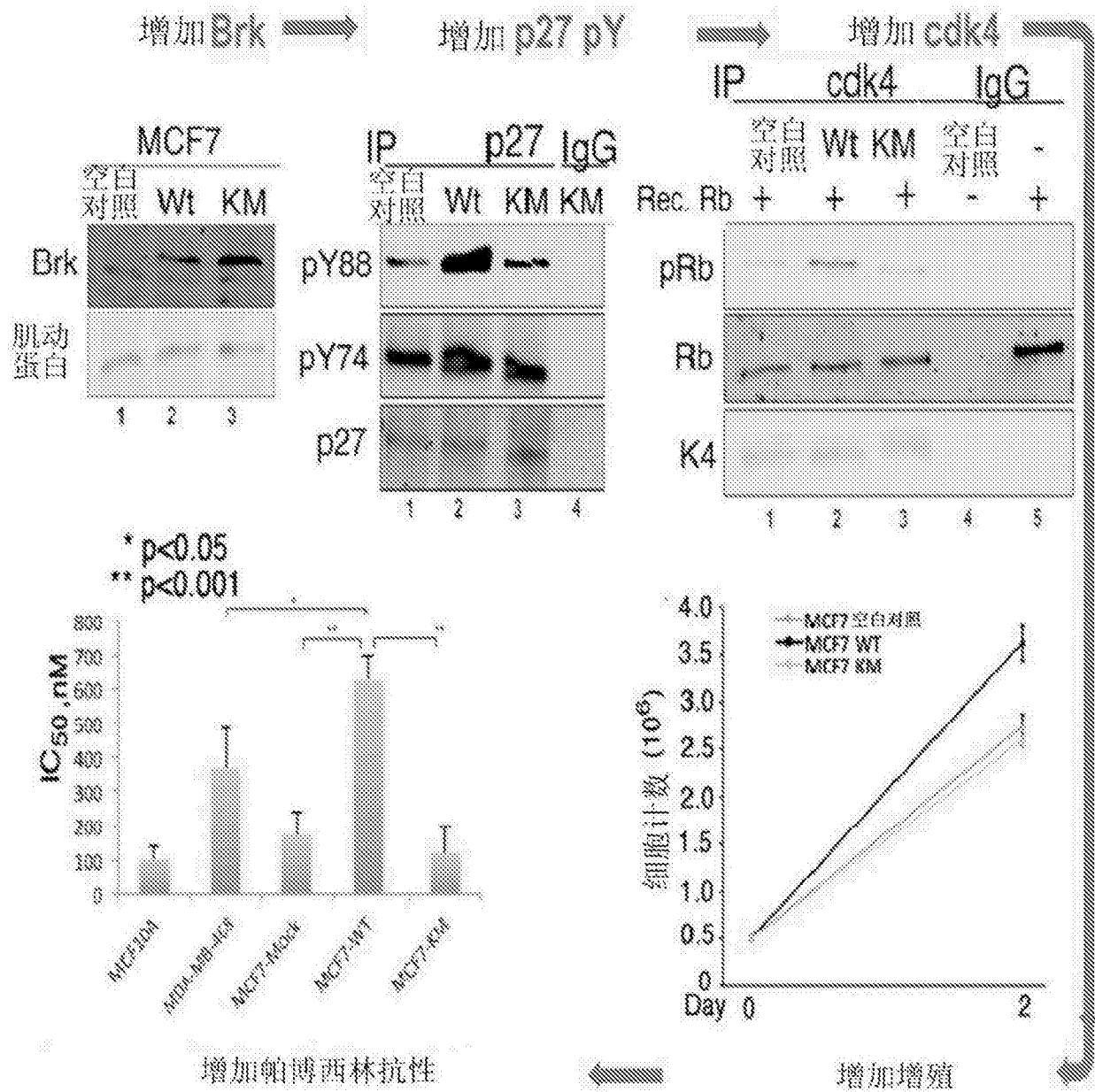


图2

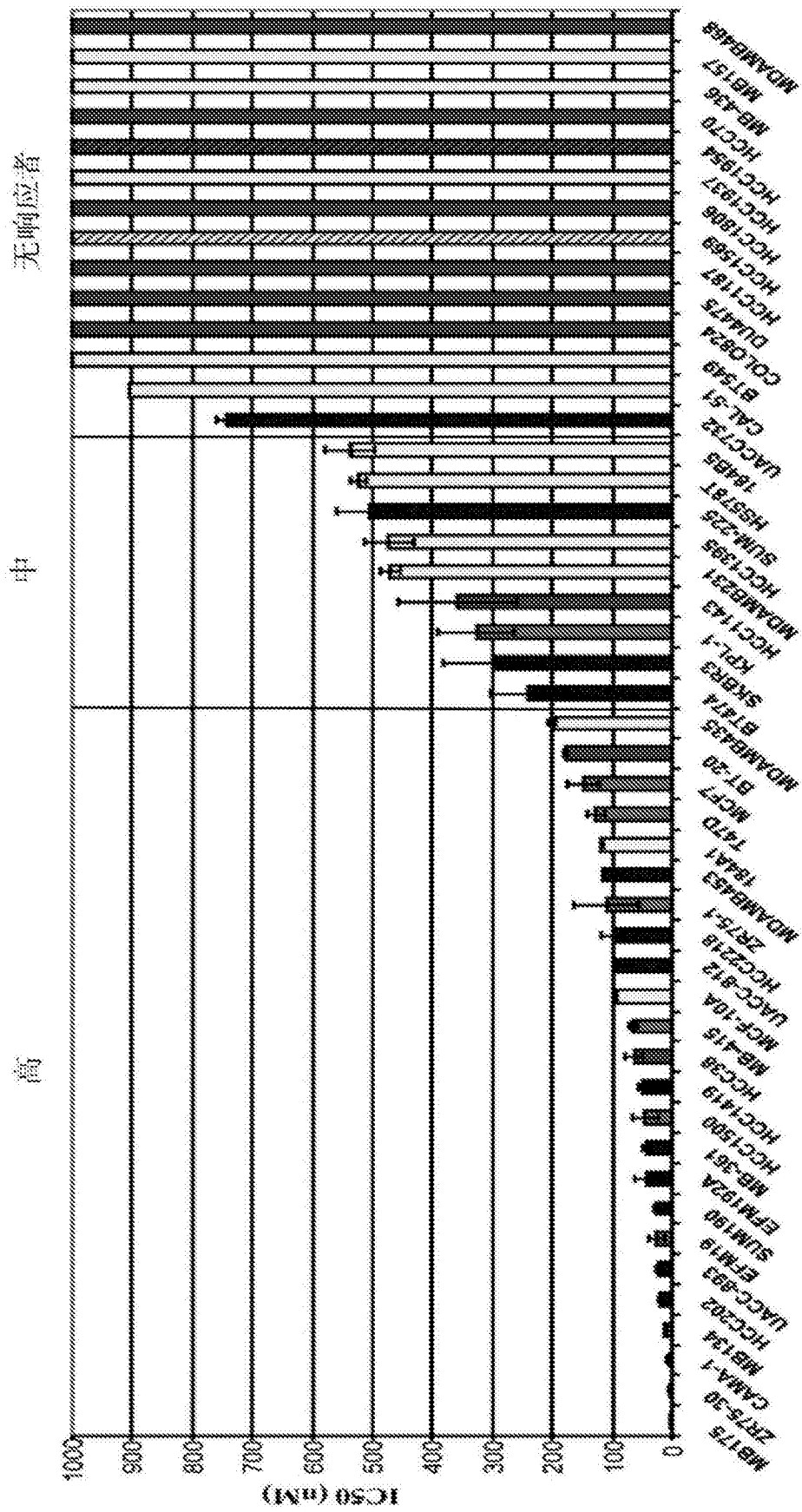


图3

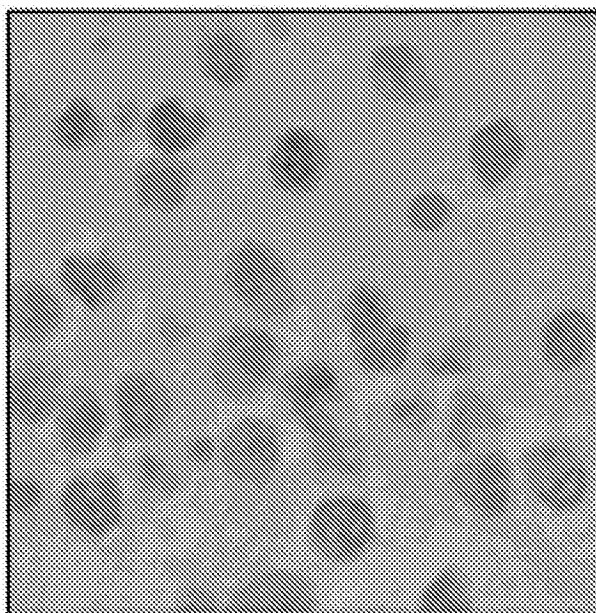
MCF7

图4A

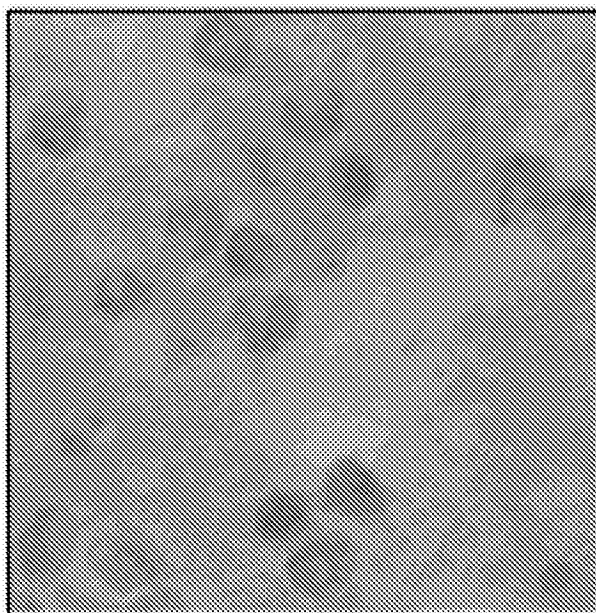
MDA MB 231

图4B

HCC 1954

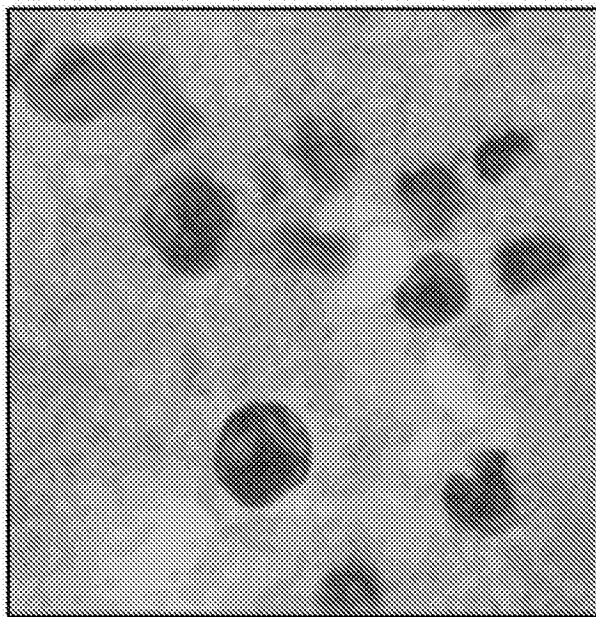


图4C

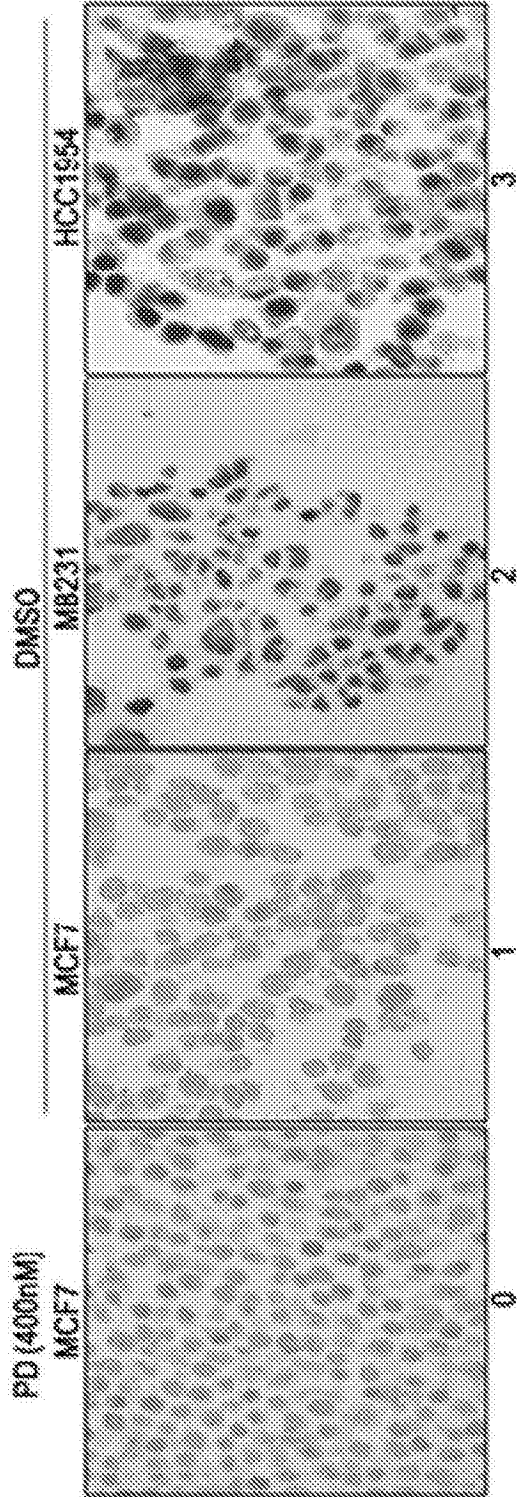


图5A

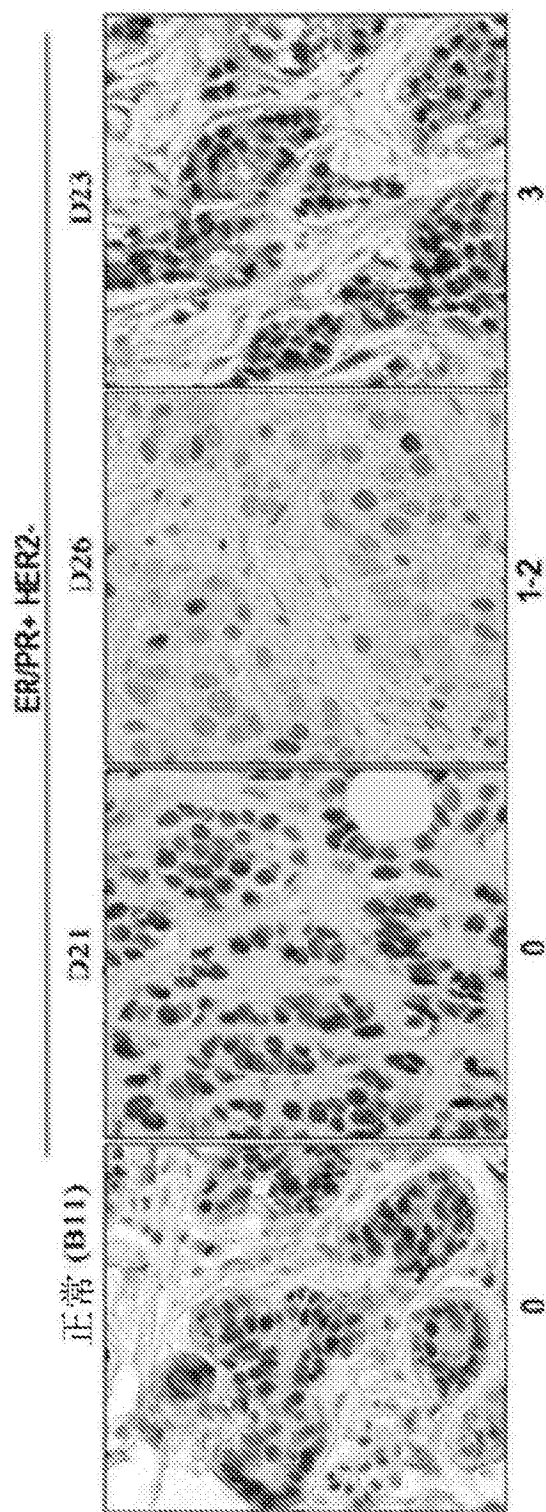


图5B

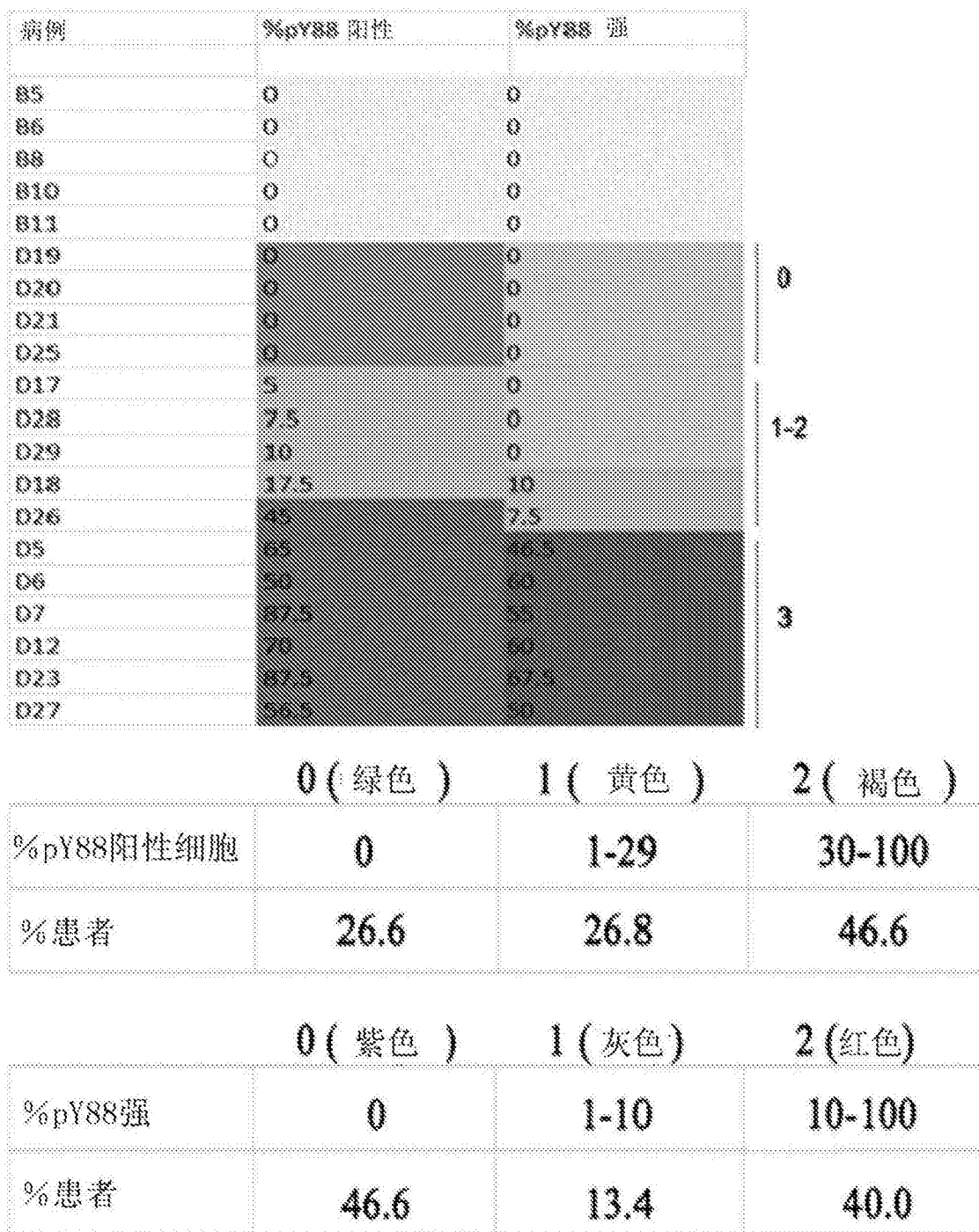


图5C

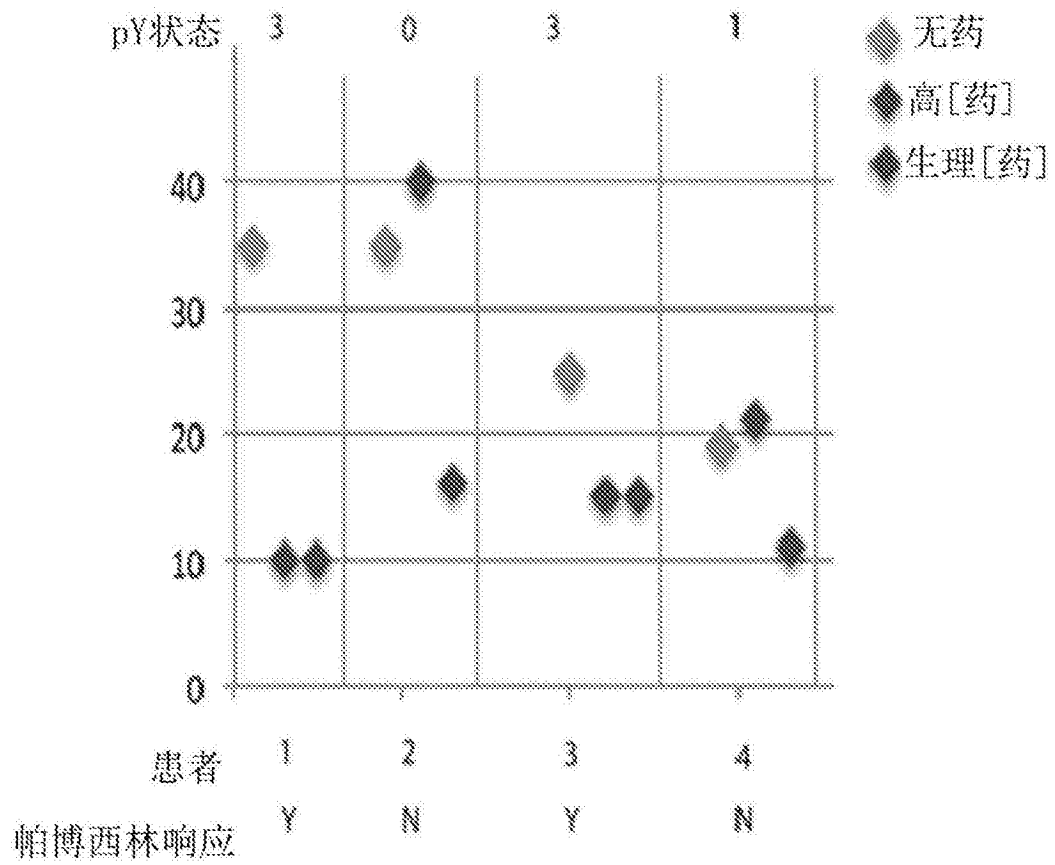


图6