



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109069513 B

(45) 授权公告日 2021.12.28

(21) 申请号 201780023517.4

(72) 发明人 郑求兴 金允骏 高恩京

(22) 申请日 2017.02.14

(74) 专利代理机构 北京青松知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11384

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109069513 A

代理人 郑青松

(43) 申请公布日 2018.12.21

(51) Int.CI.

A61K 31/52 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/517 (2006.01)

10-2016-0017187 2016.02.15 KR

A61K 9/16 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 9/20 (2006.01)

2018.10.12

A61K 9/48 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/KR2017/001575 2017.02.14

WO 2014/051359 A1, 2014.04.03

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 包宁疆

W02017/142283 K0 2017.08.24

(73) 专利权人 硕氏医科有限公司

权利要求书1页 说明书13页 附图4页

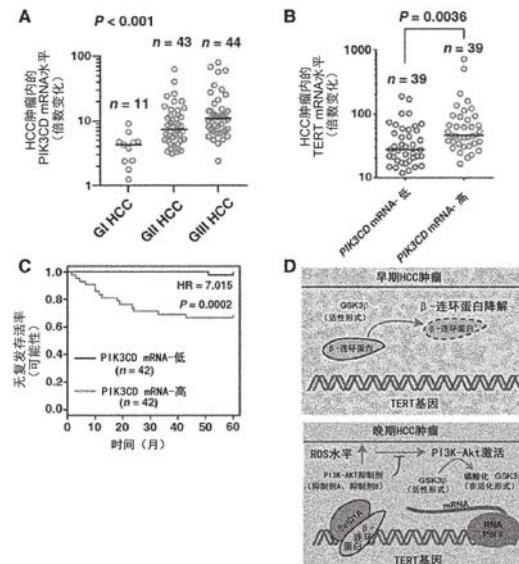
地址 韩国首尔

(54) 发明名称

用于治疗或预防肝癌的组合物

(57) 摘要

本申请涉及一种药物组合物，其包括用于预防和治疗肝癌的化合物5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4-3H)- 喹唑啉酮、和其药学上可接受的盐，且本申请的组合物抑制ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导，因此可以有利地用于治疗肝细胞癌，其中参与信号转导的蛋白质过表达，尤其是晚期肝细胞癌。



1.5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基] -4 (3H) -喹唑啉酮或其药学上可接受的盐在制备用于恶性肝细胞癌的预防或治疗的药物中的用途,其中,恶性肝细胞癌是具有增加的ROS水平和由增加的ROS水平而增加的PI3K同种型p110 δ 表达的肝细胞癌,其中,所述药物不包含其他抗癌药物。

2. 如权利要求1所述的用途,其中,根据Edmondson-Steiner分级系统作为肿瘤分化的组织学分级方法,晚期肝细胞癌是II级或更高级别的肝细胞癌。

3. 如权利要求1所述的用途,其中,肝细胞癌的治疗基于对ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导的抑制。

用于治疗或预防肝癌的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于肝癌的预防和治疗的组合物。

背景技术

[0002] 肝癌是全世界涉及癌症死亡的第二主要原因，并且肝细胞癌(HCC)占肝癌的85%到90%。肝细胞癌的几乎70%到80%在其发展到晚期后才被发现。目前，只有索拉非尼(Sorafenib)作为药物被批准作为针对晚期肝细胞癌的特异性治疗剂。

[0003] HCC的主要原因是肝硬化。由于肝硬化有很多原因如肝炎病毒(即,HBV或HCV)导致的肝炎、饮酒、或非酒精性脂肪肝，因此很难仅基于肝硬化的个人病史来制定治疗HCC患者的策略计划。

[0004] 已知包括Wnt-β-连环蛋白途径、p53-Rb途径、染色质重塑和磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)-AKT的多种途径与HCC的发病相关(El-Serag HB, Rudolph KL, “肝细胞癌:流行病学和分子致癌作用”(Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis),《消化内科》(Gastroenterology), 2007;132:2557-76; Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S等,“肝细胞癌的外显子组测序鉴定新的突变特征和潜在的治疗靶点”(Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets)《自然·遗传学》(Nat Genet.), 2015;47:505-11)。但是，尽管获得了这些研究的结果，但早期HCC到晚期HCC(即,GII HCC和GIII HCC)的进展的主要决定因素尚未确定。

[0005] 艾代拉利司(idelalisib)是一种PI3K抑制剂并且是美国FDA和欧洲药品管理局批准作为晚期复发性非霍奇金B-细胞淋巴瘤治疗剂的药品。在与p110δ的ATP-结合位点结合后，该抑制剂使PI3K-AKT信号转导途径失活。PI3K途径的激活由I类PI3K催化性同种型p110α、p110β、p110δ、和p110γ介导。p110δ主要在造血干细胞中表达，且PI3K-AKT信号转导基本上有助于免疫细胞增殖和相关细胞因子和趋化因子的刺激。因此，关于艾代拉利司，目前为止焦点是细胞存活，尤其是免疫细胞的死亡。

[0006] 韩国专利申请公开第10-2014-0022836号涉及用于血液恶性肿瘤的组合疗法，且公开了将艾代拉利司用于淋巴细胞白血病的治疗的用途。但是，对于艾代拉利司在肝癌，特别是晚期肝细胞癌中的作用一无所知，并且需要开发用于晚期肝细胞癌的治疗剂。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的目的在于提供一种用于抑制肝细胞癌增殖的药物组合物，其基于对于肝细胞癌细胞系中的端粒酶和TERT表达的抑制。

[0009] 解决技术问题所采用的技术方案

[0010] 根据本发明的一个方面，提供一种用于肝细胞癌的预防和治疗的药物组合物，其

包括5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H)-喹唑啉酮或其药学上可接受的盐。

[0011] 在本发明的一个实施方式中,肝细胞癌是其中ROS水平增加,从而PI3K同种型p110 δ 被过表达的肝细胞癌。

[0012] 在本发明的另一个实施方式中,肝细胞癌是晚期肝细胞癌,其可通过基于相关领域中已知的几个进展阶段对肝癌进行分类的方法来确定。尽管不限于此,晚期肝细胞癌是基于LCSGJ(日本肝癌研究组)的肝细胞癌TNM(肿瘤-淋巴结-转移)处于II期或更后期的肝细胞癌。或者,晚期肝细胞癌是基于作为用于肿瘤分化的组织学分级方法的Edmondson-Steiner分级系统为II级或更高级别的肝细胞癌。

[0013] 在另一个实施方式中,肝细胞癌可用本发明的药物组合物基于对ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导的抑制来进行治疗。

[0014] 根据本发明的另一方面,提供一种用于体内或体外抑制肝癌细胞或肝癌细胞系中PI3K同种型p110 δ 表达的试剂盒,其包含5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H)-喹唑啉酮或其药学上可接受的盐。

[0015] 在一个实施方式中,本发明的试剂盒有效的肝癌细胞具有高ROS水平。

[0016] 根据本发明的另一方面,提供一种用于体内或体外抑制肝癌细胞或肝癌细胞系中ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导的试剂盒,其包含5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H)-喹唑啉酮或其药学上可接受的盐。

[0017] 根据另一方面,本发明涉及用于抑制肝癌细胞中PI3K同种型p110 δ 的表达的方法,其包括用5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H)-喹唑啉酮或其盐处理肝癌细胞。

[0018] 根据另一方面,本发明提供用于抑制肝癌细胞中ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导途径的方法,其包括用5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H)-喹唑啉酮或其盐处理肝癌细胞。

[0019] 在一个实施方式中,肝癌细胞是具有增加的ROS水平的细胞,且它们包括肝癌细胞系和肝癌细胞或组织。

[0020] 根据另一方面,本发明提供一种用于肝细胞癌的治疗方法,包括向需要治疗肝细胞癌的对象给予药学上有效的量的化合物5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H)-喹唑啉酮或其药学上可接受的盐。

[0021] 在本发明的一个实施方式中,肝细胞癌是其中ROS水平增加,从而PI3K同种型p110 δ 被过表达的肝细胞癌。

[0022] 根据本发明的另一实施方式,肝细胞癌是晚期肝细胞癌,其可通过基于相关领域中已知的几个进展阶段对肝癌进行分类的方法来确定,并且尽管不限于此,晚期肝细胞癌是基于LCSGJ(日本肝癌研究组)的肝细胞癌TNM(肿瘤-淋巴结-转移)处于II期或更后期的肝细胞癌,或者,晚期肝细胞癌是基于作为用于肿瘤分化的组织学分级方法的Edmondson-Steiner分级系统为II级或更高级别的肝细胞癌。

[0023] 发明效果

[0024] 通过抑制肝细胞癌(HCC)中被ROS激活的PI3K-AKT-TERT信号转导以降低TERT表达且减小端粒长度,本发明的药物组合物可抑制肿瘤增殖。尤其,该药物组合物可有利地用于

晚期肝癌或恶性肝癌的治疗,其中ROS水平增加从而增加PI3K同种型p110 δ 的表达。

[0025] 附图的简要说明

[0026] 图1根据本发明的一个实施方式显示HCC细胞的增殖、PI3K-AKT-TERT信号转导、和维持的端粒长度被艾代拉利司抑制。

[0027] 图1A到1C示出了艾代拉利司在具有激活的AKT(即,激活的PI3K/AKT信号转导)的两个HCC细胞系中和来自正常肝(即,非激活的PI3K/AKT信号转导)的非肝癌细胞系中的剂量依赖性抑制。用艾代拉利司在预定剂量范围内处理两个HCC细胞系的Huh7细胞(图1A)和Hep3B细胞(图1B)、和来自正常肝的非肝癌细胞系THLE-3细胞(图1C),并通过MTS测定分析细胞增殖。方框中显示的免疫染色图表明被艾代拉利司选择性靶向的p110 δ 表达在HCC细胞中高于THLE-3细胞。比例尺为10 μ m。图1D到1F示出了用艾代拉利司处理后,其中AKT被激活的HCC细胞系模型和来自正常肝的其中AKT非激活的非肝癌细胞系中的靶向抑制和下游信号转导。图1G到1I示出了在用艾代拉利司处理后,HCC细胞系中缩短的端粒。端粒长度用端粒Southern印迹(图1G)、免疫FISH(图1H、1J、和1L)、和定量PCR(图1I、1K、和1M)来定量。T/S比是指端粒重复拷贝数与单拷贝基因拷贝数之比。POC代表对照组的百分比。数据中描述的数字代表平均值±SEM(每组n=4);根据**t-检验,P<0.01。

[0028] 图2显示,在HCC细胞中,ROS加速端粒延长和PI3K-AKT-TERT信号转导的激活,而艾代拉利司抑制ROS介导的PI3K-AKT-TERT信号转导激活。图2A示出Huh7、Hep3B、和THLE-3细胞中p110同种型mRNA水平。图2B示出用过氧化氢(H₂O₂)处理后的Huh7、Hep3B、和THLE-3细胞中p110同种型mRNA水平。图2C到2E示出在H₂O₂和ROS清除剂NAC以各种浓度存在的情况下细胞活力(亮蓝)的百分比、端粒荧光(红)、TERT表达(黑),以及TERT蛋白质免疫试验的百分比。端粒的平均长度由流式FISH确定。Huh7细胞(图2C)、Hep3B细胞(图2D)、和THLE-3细胞(图2E)。POC代表对照组的百分比,且NAC代表N-乙酰半胱氨酸。图2F到2H示出用艾代拉利司处理后,用300 μ mol/L H₂O₂处理的HCC细胞系和用150 μ mol/L H₂O₂处理的THLE-3细胞中的靶向抑制和下游信号转导。用 β -肌动蛋白对TERT表达进行标准化。POC代表对照组的百分比。

[0029] 图2I到2K示出在存在或缺乏艾代拉利司处理的情况下,用300 μ mol/L H₂O₂-处理的HCC细胞系和用150 μ mol/L H₂O₂-处理的THLE-3细胞中的端粒活性。数据中描述的数字代表平均值±SEM(每组n=4)。基于示出的治疗组和对照组之间的比较的P值如下;根据t检验,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

[0030] 图3显示ROS-PI3K-AKT β -连环蛋白-TERT的激活被PI3K-AKT抑制剂所抑制。图3A到3C示出在存在或缺乏PI3K抑制剂艾代拉利司(图3A)、AKT抑制剂哌立福辛(perifosine)(图3B)、或GSK3 β 抑制剂XI(图3C)的情况下,在用300 μ mol/L H₂O₂-处理的或模拟处理的Huh7细胞中使用TERT启动子的 β -连环蛋白相互作用位点ChIP。数字代表平均值±SEM(每组n=4);根据t检验,**P<0.01和***P<0.001。图3D显示植入模拟处理的Huh7细胞、用300 μ mol/L H₂O₂-处理的Huh7细胞、和用300 μ mol/L H₂O₂和25 μ mol/L艾代拉利司处理的Huh7细胞后第六周的裸鼠的代表性的图像。圆圈区域示出了肿瘤。比例尺为10cm。图3E是示出每周确定的小鼠的平均肿瘤体积(mm^3)的图。与注射了相同数量的用H₂O₂和艾代拉利司处理的细胞的小鼠相比,P值通过使用单侧秩检验确定。小鼠的数量如下;4只用于模拟处理,5只用于H₂O₂处理,以及4只用于H₂O₂和艾代拉利司处理。

[0031] 图4显示HCC患者和HCC肿瘤组织中的TERT表达和低存活率与艾代拉利司特异性分

子p110 δ 的表达具有正相关。图4A示出GI、GII和GIII HCC肿瘤组织中的p110 δ 表达(n=98)。图4B示出HCC组织(n=98)中的平均TERT表达(水平线),其中p110 δ mRNA以高水平或低水平存在。图4C示出与p110 δ 的表达成比例的无复发存活率,其中n=84。基于平均p110 δ 表达将样品分成两组。通过使用Kaplan-Meier方法来测定存活率,并且通过使用对数秩检验来比较存活率。存活率图表显示了相应的风险比例(HR)。图4D示出了分子模型,其中显示了ROS和晚期HCC中PI3K和AKT抑制剂的潜在功能。即,显示出随着晚期HCC中AKT信号转导的激活导致的ROS水平增加,产生的TERT的上调。AKT激活抑制GSK3 β 活性,而GSK3 β 的失活导致细胞核中 β -连环蛋白的连续累积。当 β -连环蛋白与TERT启动子结合,TERT表达升高,从而产生端粒延长。RNAPol II代表RNA聚合酶II。

[0032] 实施方式说明

[0033] 本发明基于以下发现:在PIK3同种型中,尤其是p110 δ 型在肝细胞癌、尤其是晚期肝细胞癌中被ROS过表达,而通过实现对该过表达的抑制可有效治疗肝细胞癌、尤其是晚期肝细胞癌。

[0034] 因此,基于对肝细胞癌的发病机制的阐明,本发明涉及化合物5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H) -喹唑啉酮(艾代拉利司)用于肝细胞癌的治疗的新用途。

[0035] 根据一个实施方式,本发明提供一种用于肝细胞癌的预防和治疗的药物组合物,其包含5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H) -喹唑啉酮化合物。

[0036] 本发明的化合物“5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H) -喹唑啉酮”也称为艾代拉利司,并且该化合物和用于制造该化合物的方法在国际公开WO 2012/152210中被描述,其通过引用并入本文。

[0037] 根据本发明的一个实例,发现本发明的化合物是一种PI3K-Akt抑制剂,尤其是选择性p110 δ 激酶抑制剂,其不仅具有抑制HCC细胞系的HuH7细胞和Hep3b细胞(图1A和1B)的增殖的作用,而且具有通过抑制TERT(端粒酶逆转录酶)的表达而抑制端粒长度延长的抗端粒酶作用。

[0038] 本发明的组合物与p110 δ 的ATP-结合位点结合,从而使PI3K-AKT信号转导途径失活。通过激活下游激酶如AKT,PI3K在调节细胞生长、增殖和新陈代谢方面起到重要作用。PI3K途径的激活由I类PI3K催化性同种型p110 α 、p110 β 、p110 δ 、和p110 γ 介导,所述类的酶将磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2)磷酸化以产生磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(PIP3),其是第二种必需的信使物质。

[0039] 在本发明的另一实施方式中,证实了本发明的组合物抑制了由ROS(活性氧物质)激活的PI3K-AKT-TERT信号转导(图2)。在癌细胞中,PI3K-AKT信号转导途径被ROS过激活。但是,上述途径的激活可被本发明的组合物抑制。

[0040] 在本发明的另一实施方式还证实,本发明的组合物可以抑制ROS-PI3K-AKT- β 连环蛋白-TERT的激活(图3)。本发明中证实,由于PI3K-Akt信号转导被ROS过激活,细胞核中的 β -连环蛋白表达增加,从而产生增加的TERT表达和端粒的延长(图3C和4)。当作为负责端粒延伸的酶的端粒酶被抑制时,每次细胞分裂时端粒变短,并且最终导致细胞的生长停止、衰老并死亡。端粒变短还可由氧化应激导致,且它是由体内活性氧物质(ROS)的细胞内增加介导的。但是,在从早期HCC进展到晚期HCC的过程中,随着ROS水平的增加,端粒被延长而不是

缩短。在各种人类肿瘤的进展过程中,TERT(端粒酶逆转录酶)介导的活性通过增加端粒长度来允许肿瘤细胞的无限增殖,并且这种现象在HCC肿瘤中得以保留。在本发明的一个实施方式中,发现基于对PI3K-AKT信号转导的抑制,端粒酶表达被抑制,从而端粒延长被抑制。这样,本发明提供一种用于肝细胞癌的预防和治疗的药物组合物,其包含作为抗端粒酶的5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮。

[0041] 如本文所用,术语“肝细胞癌”表示最初发生在肝组织中的原发性恶性肿瘤,其在具有如酒精滥用、病毒性肝炎和代偿性肝病等风险因素的患者中被发现。肝细胞癌占全部肝癌的90%或更多。40%到80%的患者存在复发,多发于肝脏。但是,其也可发生于肺,淋巴结,围绕腹腔、纵隔的内壁,且在这些区域中发生的癌症也包括在本发明中。

[0042] 在本发明的一个实施方式中,用途尤其用于晚期肝癌或恶性肝癌的治疗。本发明的基于肝癌的进展阶段的分类在相关领域中是公知的,并且可以参考例如Edmondson-Steiner分级系统(Pirisi M等,《病理学和实验室医学档案》(Arch Pathol Lab Med.) 2010十二月;134(12):1818-22),其是用于肿瘤分化的组织学分级的方法。根据该系统,显示本发明组合物有效的肝细胞癌是分级为1至4级的肝细胞癌中II级或更高级别的肝细胞癌。也可以参考美国癌症联合委员会(AJCC) TNM肝肿瘤分级(2010年第7版)或日本肝癌研究组(LCSGJ)-T的最近版本的HCC TNM(肿瘤淋巴结转移)分级。

[0043] 根据以上,显示本发明组合物有效的肝细胞癌是根据其进展阶段分为1至4期的肝细胞癌中II期或更晚期的肝细胞癌。

[0044] 本文所用的术语“治疗”、“缓和”和“改善”是指通过给予本发明的组合物在积极的意义上改善或改变代谢疾病症状的所有活动。根据韩国医学科学院建议的数据,任何具有本发明领域的技术常识的人都会知道本发明的组合物有效的疾病的准确标准,并且可以确定改善/增强和治疗的水平。

[0045] 用于本发明的药学上可接受的加成盐包括药学上可接受的酸加成盐。表述“药学上可接受的盐”是指基础化合物的任何有机或无机加成盐,其中在对患者表现出相对无毒且无害的有效活性的浓度下,由盐引起的副作用不会妨碍基础化合物的有益效果。酸的实例包括卤酸如盐酸或氢溴酸;无机酸,如硫酸、硝酸或磷酸;以及有机酸,如乙酸、三氟乙酸、丙酸、羟基乙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸(即丁二酸)、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环己烷氨基磺酸、水杨酸、对氨基水杨酸或扑酸。碱盐形式的实例包括铵盐,碱金属盐和碱土金属盐如锂盐、钠盐、钾盐、镁盐或钙盐;以及与有机碱形成的盐如苄星盐、N-甲基-D-葡萄糖胺盐,或氢化胺盐,含有精氨酸和赖氨酸等氨基酸的盐。

[0046] 根据本发明的治疗剂或药物组合物可以与通常使用的药学上可接受的运载体一起配制成合适的形式。表述“药学上可接受”是指生理上允许的组合物,并且当施用于人时通常不引起过敏反应如胃部问题或恶心,或类似的反应。药学上可接受的运载体的实例包括水、合适的油、生理盐水、和用于肠胃外给药的运载体如葡萄糖和乙二醇,且可另外包括稳定剂和防腐剂。合适的稳定剂的实例包括抗氧化剂如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠和抗坏血酸。合适的防腐剂的实例包括苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯和氯丁醇。此外,根据给药方法或制剂,本发明的组合物可适当地含有悬浮剂、增溶助剂、稳定剂、等渗剂、防腐剂、抗吸附剂、表面活性剂、稀释剂、赋形剂、pH调节剂、镇痛剂、缓冲剂、抗氧化剂

等。除了上面例举的那些之外,适用于本发明的药学上可接受的运载体和制剂在文献[《雷明登药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),最新版]中有详细描述。

[0047] 根据本发明所涉及的技术领域中具有公知常识的人可以容易地实施的方法,本发明的组合物可以通过使用药学上可接受的运载体和/或赋形剂来制备制剂、以单位剂量产生,或者可以被引入多剂量容器来产生。在这种情况下,制剂可以是油或溶液形式,处于水性介质、悬浮液或乳液,或粉末、颗粒、片剂或胶囊中。

[0048] 给予本发明的药物组合物的方法可以根据制剂容易地选择,并且可以通过各种途径给予包括家畜和人的哺乳动物。例如,可配制成粉末、片剂、丸剂、颗粒剂、糖衣丸、硬或软胶囊、液体、乳液、悬浮液、糖浆、酏剂、外用制剂、栓剂、注射用灭菌溶液等,且全身或局部给药,也可口服或肠胃外给药。肠胃外给药可能是特别优选的。

[0049] 用于肠胃外给药的制剂的实例包括灭菌水溶液、非水制剂、悬浮液、乳液、冷冻干燥制剂和栓剂。对于非水溶剂和悬浮溶剂,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,可注射酯如油酸乙酯等。对于栓剂基质,可以使用合成脂肪酸酯(witepsol)、聚乙二醇(macrogol)、吐温61、可可脂、月桂脂、甘油、明胶等。

[0050] 本发明的药物组合物以药学上有效的量给予。药学上有效的量使得能够获得期望的作用,即治疗或改善肝细胞癌的作用,这是由于以预定剂量给予本发明化合物预定的一段时间。剂量可以在宽范围内变化,这取决于患者的体重、年龄、性别或健康状况,饮食、给药期、给药方法、排泄率、疾病严重程度等。但是,对于成人(60kg),组合物的有效剂量通常为1至500mg,并且优选为30至300mg,并且可每天给予一次或几次。至于剂量,可参考现有药物的剂量。但是,由于剂量可以根据各种条件而变化,因此对于相关领域的技术人员显而易见的是,可以对上述剂量进行改变。因此,本发明的范围不受任何意义上的剂量的限制。对于给予次数,给予可以在所需范围内每天进行一次或分开进行几次,并且给予期也没有特别限制。

[0051] 根据本发明的另一方面,提供一种用于体内或体外抑制肝癌细胞或肝癌细胞系(特别是具有过表达的ROS的肝癌细胞(细胞系))中PI3K同种型p110 δ 的表达或ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导的方法和试剂盒,其通过使用5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H) -喹唑啉酮或其药学上可接受的盐。对于用于方法和试剂盒的化合物和与上述生物现象的抑制有关的化合物,可以参考上面给出的说明。

[0052] 如上文详细描述的,本发明的化合物或包含该化合物的组合物可有效地用于肝细胞癌的治疗。

[0053] 根据另一方面,本发明涉及一种用于肝细胞癌的治疗方法,包括向需要治疗肝细胞癌的对象给予药学上有效的量的化合物5-氟-3-苯基-2-[(1S) -1- (7H-嘌呤-6-基氨基) 丙基]-4 (3H) -喹唑啉酮或其药学上可接受的盐。

[0054] 对于肝细胞癌的药学上有效的量、给予方法、类型和治疗机制等,可以参考上面给出的说明。

[0055] 在下文中,给出了一些实施例以帮助理解本发明。但是,显而易见的是,提供以下实施例仅为了更好地理解本发明,并且本发明不限于此。

实施例

[0056] 方法和材料

[0057] 肿瘤样本

[0058] 对于使用人体组织的所有实验,获得首尔国立大学机构审查委员会的批准(SNUIRB第E1308/001-035)。为了进行基因表达分析,分析了84个手术切除的HCC肿瘤组织和非肿瘤肝组织样品的冷冻样品。从2005年到2009年(133个石蜡包埋样本)和2011年至2013年(28个冷冻组织样本),以及2010年至2013年(56个冷冻组织样本),每个病例分别在韩国天主教大学圣玛丽医院和韩国九老医院(KU Guro Gene Bank 2013-020)进行预期和持续性鉴定。本发明中使用的几乎所有组织样品也已用于本发明人的先前研究中。使用来自圣玛丽医院的133个石蜡包埋样本中的93个样本、和28个冷冻组织样本中的19个样本、以及来自九老医院的56个冷冻组织样本中的53个样本(Ko E等,Seo HW,JungES,Kim BH,Jung G.“TERT启动子SNP rs2853669降低E2F1转录因子结合并增加肝癌的死亡率和复发风险”(The TERT promoter SNP rs2853669decreasesE2F1transcription factor binding and increases mortality and recurrence risks in liver cancer)《肿瘤靶标》(Oncotarget) 2015;Ko E等,“端粒酶逆转录酶启动子甲基化与肝细胞癌复发风险有关”(Telomerase reverse transcriptase promoter methylation is related to a risk of recurrence in hepatocellular carcinoma)《肝病》(Hepatology) 2015)。在用于HCC GI、GII和GIII各自的p110δmRNA水平定量的98个样品中,14个冷冻组织也用于本发明的发明人的另一项研究(Lim SO等,《肝病》(Hepatology) 2011;53:1352-62)。根据Edmondson-Steiner分级系统定义了肿瘤分化的组织学分级,该分级系统基于显示最高级别的肿瘤区域。

[0059] 细胞培养

[0060] HCC细胞系(Huh7和Hep3B)获自韩国细胞系库(KCLB,首尔,韩国)。从ATCC(美国典型培养物保藏中心)获得THLE-3细胞系(通过SV40大T抗原感染产生的永生化人肝内皮细胞系)。通过使用DNA指纹作为短串联重复分析,进行KCLB和ATCC的细胞系鉴定。测试所有细胞系的支原体污染。将HCC细胞在补充有10%胎牛血清(GenDepot公司,美国得克萨斯巴克)的DMEM(Welgene公司,韩国庆山市)培养基中,在潮湿的5%CO₂培养箱中在37℃下培养。

[0061] 正如ATCC手册所推荐的那样,THLE-3细胞在BEGM(龙泽公司(Lonza))培养基中培养,培养基中加入10%胎牛血清,在湿润的5%CO₂培养箱中在37℃下培养。

[0062] ROS诱导剂用于PI3K、AKT和GSK3β,ROS清除剂和抑制剂处理

[0063] 每天更换培养基,并将上述细胞在300μmol/L过氧化氢(H₂O₂) (西格马奥德里奇公司(Sigma Aldrich);H1009)中培养4天。在几个实验中,在加入H₂O₂之前,用5mmol/L N-乙酰半胱氨酸(NAC) (西格马奥德里奇公司;A7250)、25μmol/L艾代拉利司(LC实验室(LC Laboratoties),美国马萨诸塞州沃本;I-7447)、25μmol/L哌立福辛(LC实验室,美国马萨诸塞州沃本;P-6522)或30μmol/L GSK3β抑制剂(GSK3β抑制剂XI)(圣克鲁兹公司(SantaCruz);sc-204770)(31)处理细胞1小时。此外,使用灭菌蒸馏水(pH7.0)作为阴性对照(即模拟处理)。

[0064] 流式FISH

[0065] 流式FISH如前所述进行(Rufer N等,《自然·生物技术》(Nat Biotechnol) 1998;

16:743-7),几乎没有改变。用含有0.1%w/v牛血清白蛋白(BSA)的冷PBS(磷酸盐缓冲盐水)溶液洗涤细胞两次。随后,将细胞重悬于杂交缓冲液(70%去离子甲酰胺(安氏公司(Amresco),美国俄亥俄州梭伦)、20mmol/L TrisHCl[pH 6.8],1%BSA和1nmol/L FAM标记的端粒PNA(端粒肽核酸)探针(Te1GFAM:TTAGGGTTAGGGTTAGGG)(Panagene公司,韩国大田)或1nmol/L FAM标记的着丝粒PNA探针(CentFAM:AAACTAGACAGAACATT)(Panagene公司))中。将杂交缓冲液的体积调节至每10⁵个细胞100μl。接下来,将各样品在85℃的水浴中培养10分钟。在室温下避光与端粒探针杂交3小时,用各洗涤液(洗涤溶液I:70%去离子甲酰胺,10mM TrisHCl[pH6.8],0.1%BSA和0.1%吐温20;洗涤溶液II:0.1%BSA和0.1%吐温20的PBS溶液)洗涤各样品,然后在37℃下在溶液(0.1%BSA,10μg/mL RNA酶A和0.06μg/mL 7-AAD的PBS溶液)中培养1小时。通过使用其中使用CELLQUEST软件的BD FACS Calibur流式细胞仪(BD公司(BectonDickinson),美国新泽西州富兰克林湖)测量细胞周期的G1G0期的所有细胞核的端粒荧光强度。

[0066] 免疫FISH

[0067] 使用已建立的免疫FISH方案(Plentz RR等,《肝病》(Hepatology) 2007;45:968-76)并稍作修改。使用二甲苯对石蜡包埋的切片进行去石蜡化,然后使用乙醇梯度进行再水合。通过在100mmol/L柠檬酸钠(pH6.0)中在微波中煮沸10分钟来进行抗原修复。在37℃下蛋白酶K(PBS中的浓度为15μg/mL [pH7.4])渗透20分钟后,将8-氧化-dG-特异性抗体(1:100,阿柏堪穆公司(Abcam),美国马萨诸塞州坎布里奇;ab62623)在PBS 0.1%曲通X-100中进行1%BSA稀释,并在室温下培养过夜。洗涤后,用Alexa 647二抗处理载玻片1小时。然后通过使用4%甲醛固定样品并空气干燥。在90℃下变性6分钟后,将样品在暗处杂交2小时。在杂交溶液中,含有2×SSC的70%甲醛、5%MgCl₂、0.25%封闭试剂(罗氏公司(Roche),瑞士巴塞尔)、15.4nmol/L Cy3标记的端粒PNA探针(Te1CCy3:CCCTAACCTAACCTAA)(Panagene公司,韩国大田)和18.4nmol/L FAM标记的着丝粒PNA探针(CentFAM:AAACTAGACAGAACATT)(Panagene公司)。洗涤后,用含有DAPI的PBS冲洗载玻片,然后用DAPI密封剂(封固剂)(载体实验室公司(VectorLaboratories),美国加利福尼亚州伯林盖姆)密封。同时,本发明的发明人进行着丝粒染色,作为端粒染色和8-氧化-dG染色的内参。据报道,在包括HCC在内的各种肿瘤类型中显示出作为分子ROS标记物的氧化性DNA加合物8-氧化-2'-脱氧鸟苷(8-氧化-dG)的水平增加。端粒荧光水平和8-氧化-dG水平分别表示端粒荧光强度与着丝粒荧光强度之比、以及8-氧化-dG荧光强度与着丝粒荧光强度之比。为了定量端粒荧光强度、着丝粒荧光强度和8-氧化-dG荧光强度,采用相同的暴光时间。通过划分对应于5个随机视野的非肿瘤组织中的荧光水平来计算肿瘤组织的端粒荧光水平和8-氧化-dG荧光水平。通过使用Image-Pro plus 6.0软件(Media Cybernetics公司,美国马里兰州罗克维尔)进行图像分析。

[0068] 端粒Southern印迹

[0069] 根据手册,通过使用非放射性化学荧光TelotAGGG端粒长度测定法(罗氏公司;目录号12 209 136 001)测定端粒长度。使用GeneJET基因组DNA纯化试剂盒(赛默飞世尔科技;#K0721)从HCC细胞中分离基因组DNA,然后在37℃下用20单位的Hinf 1(Enzyomics公司(Enzyomics))和Rsa 1(Enzyomics公司)消化4μg基因组DNA 16小时。将消化后的DNA进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,然后使用毛细管转移将其转移到带正电荷的尼龙膜上。使印迹后

的DNA在42°C下与端粒重复特异性的洋地黄毒昔(DIG)标记探针杂交16小时。之后,在室温下用与碱性磷酸酶偶联的DIG特异性抗体培养30分钟。

[0070] 基于定量实时PCR的相对端粒长度的测量

[0071] 基于使用从细胞提取的基因组DNA的定量PCR分析,确定相对端粒重复拷贝数(T)和单拷贝数(S),并且像先前的方法一样进行计算,其中T/S比被连续修改(Cawthon RM,“通过新型单色多重定量PCR方法测量端粒长度”(Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitativePCR method)《核酸研究》(Nucleic Acids Res)2009;37:e21)。

[0072] 免疫荧光试验

[0073] 为了显示p1108表达水平,使用p1108特异性(1:500,阿柏堪穆公司;ab32401)抗体。洗涤后,使用含有DAPI的培养基密封载玻片(载体实验室公司)。通过使用共聚焦显微镜(LSM 700;卡尔蔡司公司(Carl Zeiss),德国上科亨)获得图像。使用Image-Pro plus 6.0软件(Media Cybernetics公司)进行图像分析。

[0074] TRAP(端粒酶重复扩增方案)试验

[0075] 为了定量测定端粒酶活性,使用TRAPEZE®RT端粒酶检测试剂盒(密理博公司(Millipore),德国达姆施塔特)进行TRAP检测根据手册,每个反应使用全蛋白质提取物(100ng)。

[0076] 使用定量实时PCR确定基因表达水平

[0077] 使用NucleoSpin®TriPrep试剂盒(Macherey-Nagel公司(Macherey-Nagel),德国迪伦;740966.250)分离总RNA,然后通过使用TOPscript™ RT Drymix(dT18)(Enzynomics公司,韩国大田;RT200),从经过模拟处理或指定试剂处理的细胞的总RNA合成cDNA。通过使用TOPreal™qPCR 2×PreMIX(具有高ROX的SYBR Green)(Enzynomics公司,韩国大田;RT501M)和ABI Prism 7300热循环仪(应用生物系统公司(AppliedBiosystems),美国加利福尼亚州福斯特城)进行PCR。用β-肌动蛋白将基因表达进行标准化:TERT(正向引物:GCCTTCAAGAGGCCACGTC;反向引物:CCACGAACGTGTCGCATGT)(26)和β-肌动蛋白(正向引物:GCAAAGACCTGTACGCCAAC;反向引物:TGCATCCTGTCGGCAATG)。为了检查引物特异性,额外包括解离步骤。

[0078] 免疫印迹试验

[0079] 将总 2×10^5 个细胞在2×SDS样品缓冲液中煮沸5分钟(100mmol/L TrisHCl[pH6.8],4% SDS,0.2% 溴酚蓝,20% 甘油和200mmol/Lβ-巯基乙醇),然后进行SDS-PAGE和Western印迹。为了检测TERT,将细胞在2×SDS样品缓冲液中在55°C下培养15分钟。用TBS-吐温20将TERT特异性(1:300,罗克兰免疫化学品公司(Rockland Immunochemicals),美国宾夕法尼亚州吉尔伯茨维尔;600-401-252)、AKT特异性(1:1000,细胞信号转导技术公司(Cell SignalingTechnology);#9272)、磷酸化AKT特异性(1:2000,细胞信号转导技术公司;#4060)、GAPDH特异性(1:2000,圣克鲁兹生物技术公司(Santa CruzBiotechnology);sc-47724)或β-肌动蛋白特异性(1:2000,西格玛-奥德里奇公司,美国密苏里州圣路易斯;A5441)抗体稀释于5%脱脂乳或牛血清白蛋白中,在4°C下培养过夜,洗涤,与HRP偶联的二抗(1:1000,阿柏堪穆公司;ab131368,或ab131366)一起培养。通过使用FUSION-SOLO成像仪(VilberLourmat公司(Vilber Lourmat),法国马恩拉瓦莱),获得化学荧光图像。

[0080] 细胞活力的测定

[0081] 如前所述(10),通过使用Cell Titer 96MTS(普罗麦格公司(Promega))测定细胞活力。将细胞以每孔500至1000个细胞的量接种,然后以每个图中所述的药物浓度处理96小时。每次分析至少重复3次。在绘制数据后,通过使用GraphPad软件获得IC₅₀值。通过使用Flexstation 3多模板读数器(分子设备公司(Molecular Devices)),在490nm处测量指示甲酇产量的光密度。

[0082] 染色质免疫沉淀

[0083] 如前所述(Lim SO等,《消化内科》(Gastroenterology) 2008;135:2128-40,40e1-8.;Hoffmeyer K等《科学》(Science),2012;336:1549-54),进行了几种改良的ChIP(染色质免疫沉淀)试验。在存在或不存在PI3K抑制剂、AKT抑制剂或GSK3β抑制剂的情况下,在采用或不采用300μmol/L H₂O₂处理的情况下培养Huh7细胞4天。在室温下温和摇动20分钟,用1%多聚甲醛固定细胞。之后,用冰冷的PBS冲洗细胞两次;用400μL微球菌核酸酶缓冲液(50mmol/LTrisHCl[pH 8.0]、5mmol/L CaCl₂、100μg/mL BSA、10mmol/L KC1、和蛋白酶抑制剂混合物[罗氏公司,瑞士巴塞尔;4693159001])重悬;用2mm直径的锆珠(沃森公司(Watson))破碎;微球菌核酸酶消化(新英格兰生物实验室(NewEngland Biolabs),美国马萨诸塞州伊普斯维奇;M0247S)。收集染色质(150μg)并在稀释缓冲液(0.1%NP-40,2mmol/L EDTA,150mmol/L NaCl,20mmol/LTrisHCl[pH 8.0],蛋白酶抑制剂混合物[Roche])和磷酸酶抑制剂混合物[卡巴开公司(Calbiochem)])中稀释,然后在4℃下用2μg消化的鲑鱼精DNA、10μL预免疫血清(圣克鲁兹生物技术公司;sc-2027)、和Dynabeads珠蛋白G(生命技术公司(Life Technologies))预清除2小时。免疫沉淀后,向其中加入20μL Dynabeads珠蛋白G,继续培养2小时。用TSE 1(0.1%SDS、1%曲通X-100、2mmol/L EDTA、20mmol/L TrisHCl和150mmol/L NaCl)、TSE II(0.1%SDS、1%曲通X-100、2mmol/L EDTA、20mmol/L TrisHCl和500mmol/L NaCl)和缓冲液III(0.25mol/L LiCl、1%NP-40、1%脱氧胆酸盐、1mmol/L EDTA和10mmol/LTrisHCl)连续洗涤Dynabeads珠10分钟。之后,用TE缓冲液洗涤珠3次,并使用1%SDS和0.1mol/L NaHCO₃进行提取。为了进行反向甲醛交联,将洗脱溶液在65℃下加热过夜。通过使用NucleoSpin DNA清理试剂盒,纯化DNA碎片。通过使用TERT启动子区域特异性引物,用qPCR(ABI 7300;应用生物系统公司,美国加利福尼亚州福斯特城)定量PCR扩增产物。将PCR扩增针对TERT内含子标准化。引物序列如下:用于ChIP的β-连环蛋白相互作用位点(正向引物:TCCCGGTTCCCCGGCCA;反向引物:CCTCGCGTAGTGGCTGCGC)和用于ChIP的TERT内含子(正向引物: TGAGGGCTGAGAAGGAGTGT; 反向引物: CACGATAGACGACGACCTCA)。对于之前记录的每个β-连环蛋白相互作用位点,加入20-22bp。使用的抗体如下:兔多克隆抗β-连环蛋白(1:200,阿柏堪穆公司,美国马萨诸塞州坎布里奇;ab6302)、小鼠单克隆抗RNA聚合酶II(1:50,科文斯公司(Covance),美国新泽西州普林斯顿;MMS-126R)和兔多克隆抗SETD1A(1:100,诺复斯生物制品公司(Novus Biologicals),美国科罗拉多州利特尔顿;NBP1-81513)。

[0084] 体内致肿瘤性分析

[0085] 动物试验按照首尔国立大学机构动物护理和使用委员会(批准号:SNU-130225-6)批准的方案进行。将小鼠保持在常规条件下(即,半特异性无病原体状态),并允许其自由获取食物和水。对于所有异种移植研究,使用5周龄的KSN/S1c裸鼠。测试使用体重为18g至20g

的小鼠。对于异种移植分析,对模拟处理的 1×10^5 Huh7、仅用 $300\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理的 1×10^5 Huh7、用 $25\mu\text{mol/L}$ 艾代拉利司和 $300\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理的 1×10^5 Huh7进行洗涤,在不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的PBS中收获,随后以 0.2mL 的量注射到皮下组织中。根据卡尺测量的肿瘤的两个垂直直径(即,D1作为最大直径,D2作为最小直径),每周监测肿瘤产物。肿瘤体积计算为 $\pi \times D1 \times D2^2 / 6$ 。

[0086] 统计学分析

[0087] 通过Fisher精确检验和对数秩检验分别评估端粒长度测定和存活率的统计学显著性。通过使用双侧检验,计算用于比较模拟和ROS或PI3K-AKT抑制剂治疗之间的端粒活性和信使RNA表达水平的P值。通过使用Shapiro-Wilk检验来测试频率分布的正常性。使用R软件(www.r-project.org)或Prism GraphPad软件4.0版进行统计分析(格拉夫派得软件公司(GraphPad Software Inc),美国加利福尼亚州圣迭戈)。所有测试均独立进行至少三次。显著性值设定如下: $*P<0.05$, $**P<0.01$,和 $***P<0.001$ 。

[0088] 实施例1.作为PI3K-Akt抑制剂的艾代拉利司对HCC细胞增殖、TERT表达、和端粒长度维持的抑制的确定

[0089] 由于阻断PI3K-AKT信号转导的活性,艾代拉利司作为选择性p110 δ 激酶抑制剂已被用于治疗患有慢性淋巴细胞白血病的患者(Yang Q等,《临床癌症研究》(Clin.Cancer Res)2015;21:1537-42;Fruman DA等,《自然评论·药物发现》(Nat Rev Drug Discov)2014;13:140-56)。为了测量其中p110 δ 以不同水平潜伏存在的肝细胞中艾代拉利司的活性,本发明的发明人通过使用三种肝细胞系进行增殖试验。这些肝细胞系包括Huh7细胞和Hep3B细胞,它们来自患有早期HCC的患者并显示高水平p110 δ (图1A和B),还包括THLE-3细胞系,它是永生化的人肝上皮细胞系,源自正常成体肝内皮细胞中显示的正常原代细胞,并且显示低水平p110 δ (图1C)。

[0090] 确定艾代拉利司是否以浓度依赖性方式抑制两种HCC细胞系的细胞增殖。结果显示,上述细胞系的细胞增殖受到抑制(图1A和1B)。Huh7和Hep3B的 IC_{50} 低于 $30\mu\text{mol/L}$ (图1A和B),THLE-3细胞的 IC_{50} 高于 $200\mu\text{mol/L}$ (图1C)。除抑制细胞增殖外,本发明的发明人还检测了对于两种HCC细胞系中AKT磷酸化的抑制(图1D和E)。THLE-3中基础水平的AKT磷酸化低,并且在没有被 $25\mu\text{mol/L}$ 的浓度下的艾代拉利司降低(图1F),表明AKT信号转导在那些细胞中失活。

[0091] 还确定了艾代拉利司是否可以降低HCC细胞中的TERT表达和端粒长度。显示艾代拉利司(图1D和E)使两种HCC细胞系中TERT表达降低,但在THLE-3细胞中无此情况(图1F)。与显示降低的TERT表达的结果相同,HCC细胞的端粒长度被艾代拉利司减小(图1G至1K)。THLE-3细胞中TERT表达的基础水平低,且艾代拉利司没有使THLE-3细胞中TERT表达和端粒长度减小(图1F、1L和1M)。这些结果表明,在PI3K-AKT信号转导激活后,TERT表达受到调节,并且其在HCC细胞中被艾代拉利司抑制,但在THLE-3细胞中无此情况。即,这意味着在PI3K抑制剂的存在下,具有活化的PI3K-AKT信号转导的细胞成为使TERT表达减少和使端粒长度减小的合适靶标。

[0092] 实施例2.HCC细胞中艾代拉利司对ROS诱导的TERT上调和端粒延长的抑制的确定

[0093] 之前已经证实ROS可以过度激活癌细胞中的PI3K-AKT信号转导途径(Brazil DP等.《细胞》(Cell),2002;111:293-303;Li VS等.《细胞》(Cell)2012;149:1245-56)。然而,

尚不清楚PI3K同种型是否被ROS增加以诱导PI3K-AKT活化。因为HCC细胞中PI3K同种型p110 δ 的表达高于THLE-3细胞(图1和图2A),并且作为p110 δ 选择性抑制剂的艾代拉利司可以仅抑制HCC细胞中的pAKT和TERT表达和端粒维持,因此本发明的发明人进行了实验,以观察在HCC细胞中p110 δ 表达是否被ROS增加。在I类PI3K同种型(p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ)中,在用过氧化氢(H₂O₂)作为ROS诱导剂处理后,在HCC细胞中仅p110 δ 具有增加的表达(图2B)。该结果表明,通过上调p110 δ 表达,ROS尤其过激活PI3K-AKT信号转导。

[0094] 接下来,为了检查ROS是否可以基于AKT激活来增加TERT表达和端粒长度,本发明的发明人比较了TERT信使RNA(mRNA)和蛋白质水平、以及在用各种浓度(0-300 μ mol/L)的H₂O₂处理后显示ROS水平增加的细胞中的端粒长度。与没有暴露于H₂O₂的对照HCC细胞相比,经过300 μ mol/L处理的HCC细胞中TERT表达和端粒长度增加(端粒长度增加了25%-30%,TERT表达增加了40%-45%;图2C和2D)。当用作为ROS清除剂的N-乙酰半胱氨酸(NAC)和H₂O₂同时处理细胞时,显示HCC细胞中TERT表达增加和端粒长度增加的H₂O₂诱导现象消失(图2C和2D)。关于THLE-3细胞,当暴露于150 μ mol/L H₂O₂时,大多数细胞(85%)不能存活,并且显示在该浓度下端粒长度减少(图2E)。然而,TERT表达水平没有变化,显示出与H₂O₂处理后AKT磷酸化水平相比没有变化的相同结果(图2E)。这些结果表明,基于AKT磷酸化和TERT表达的上调,ROS可以在HCC细胞中产生更长的端粒。

[0095] 为了研究艾代拉利司对ROS诱导的PI3K-AKT信号转导的过激活的作用,本发明的发明人测定了暴露于艾代拉利司的用H₂O₂处理的HCC细胞中的TERT表达、端粒长度和端粒酶活性。与仅用H₂O₂处理的HCC细胞相比,用艾代拉利司处理后的用H₂O₂处理的HCC细胞中TERT表达水平和端粒长度显著减少(端粒长度减少40-45%,TERT表达减少65%-70%;图2F和2G)。这些结果表明艾代拉利司抑制ROS诱导的PI3K-AKT信号转导的过激活。与TERT表达和端粒长度的结果类似(图2F至2H),艾代拉利司使两个HCC细胞系中的端粒酶活性降低(图2I和2J),但在THLE-3细胞中无此情况(图2K)。本发明的发明人发现,ROS介导的TERT表达、端粒酶活性和端粒长度的增加几乎被艾代拉利司完全抑制(图2F至2K)。

[0096] 实施例3.作为PI3K抑制剂的艾代拉利司对与HCC肿瘤生长促进有关的ROS活性的体内抑制的确定

[0097] 本发明的发明人进行了研究,以观察TERT转录期间TERT启动子中染色质可及性的增加是否与 β -连环蛋白有关。为此,通过使用内源性 β -连环蛋白和针对组蛋白甲基转移酶SetD1A的抗体(其已被报道基于染色质重塑促进TERT转录),进行染色质免疫沉淀。当PI3K或AKT抑制剂一起处理用于染色质免疫沉淀时,即使在存在H₂O₂的情况下, β -连环蛋白和SetD1A(其与HCC细胞中的TERT启动子结合)也被减少(图3A和3B)。然而,当还用GSK3 β 抑制剂进行治疗时,无论用H₂O₂处理与否,都显示出 β -连环蛋白和SetD1A的结合增加(图3C)。这些结果表明,由于ROS通过PI3K-Akt信号转导级联的过激活而增加 β -连环蛋白的核表达,因此ROS促进了SetD1A与TERT启动子的结合。

[0098] 接下来,进行检查以确定艾代拉利司是否可具有体内抑制肿瘤生长的作用。首先,在用H₂O₂处理后,测定已注射具有过激活的PI3K-AKT信号转导的HCC细胞的裸鼠中肿瘤出现的潜伏时间。在注射了用H₂O₂处理的1×10⁵个HCC细胞的裸鼠中,直至肿瘤发展的潜伏时间为28天(图3D和3E)。在注射了没有用H₂O₂处理的1×10⁵个HCC细胞的裸鼠中,肿瘤发生的平均时间为70天(图3E)。另一方面,当注射用H₂O₂和艾代拉利司处理的HCC细胞时,即使在70天

后也未形成肿瘤(图3D)。这些结果表明ROS促进肿瘤生长，并且艾代拉利司作为PI3K抑制剂可以在体内抑制这种促进肿瘤生长的ROS活性。

[0099] 实施例4.根据HCC组织中p110 δ 表达水平的增加引起更高TERT表达的现象和肝癌患者的关系的确定

[0100] 根据本发明，已经发现p110 δ 的mRNA水平在从早期HCC组织到晚期HCC组织(2期或更晚期)有所增加(图4A)，并且它与TERT mRNA的表达正相关(图4B)。该结果表明相同的主信号是p110 δ 和TERT表达增加的原因。p110 δ 的高mRNA水平与低无复发存活率相关(图4C)，并且表明p110 δ 的高mRNA水平表达可以作为HCC的预后标志物，如高水平TERT mRNA、高水平ROS和长端粒长度。这意味着，基于对p110 δ 激酶的抑制以阻断高水平p110 δ mRNA的表达，本发明的药物组合物可以抑制HCC肿瘤生长，并且它可以特别有效地用于治疗晚期肝细胞癌。还认识到，基于ROS-PI3K-AKT-TERT信号转导的过激活的特异性阻断，该药物组合物可用于治疗肝癌(图4D)。

[0101] 以上详细说明了本发明的示例性实例。但是，本发明所保护的范围不限于此，本领域技术人员使用以下权利要求所限定的本发明的基本概念所做出的各种修改和改进也在本发明的范围内。

[0102] 除非另外特别定义，否则本文使用的所有技术术语以与本领域技术人员通常理解的含义相同的含义使用。在本说明书中描述为参考文献的每个文档的内容通过引用整体并入本文。

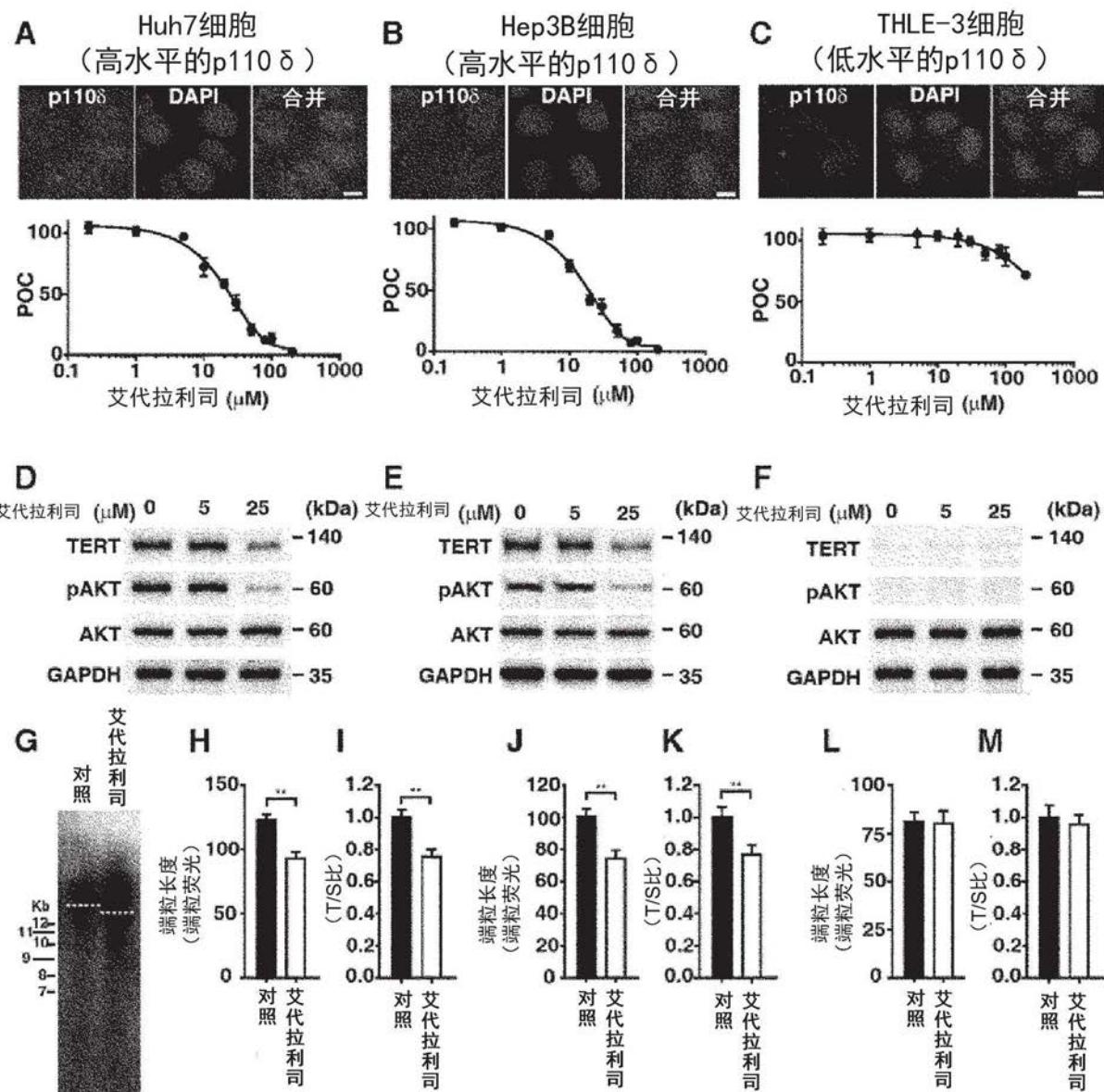


图1

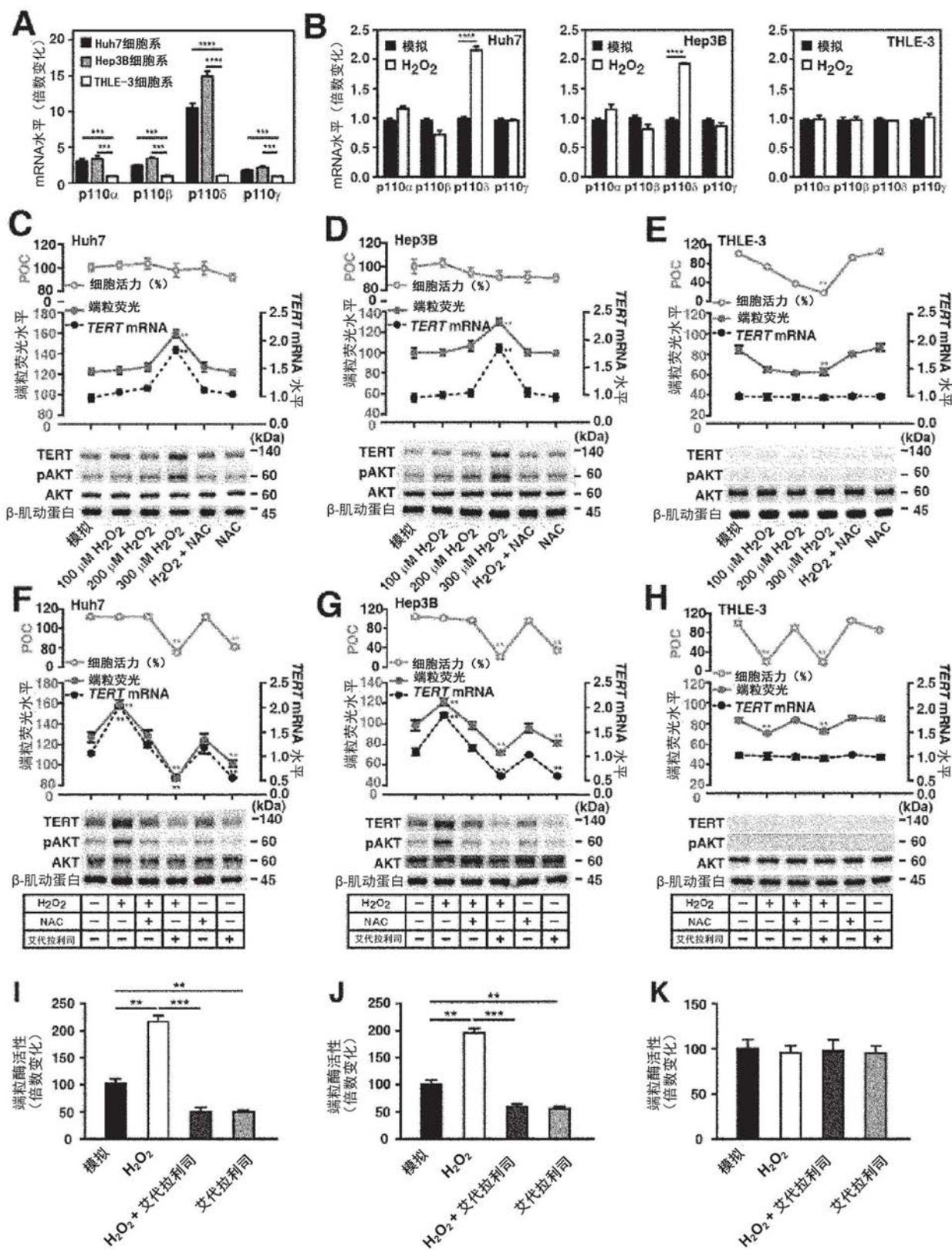


图2

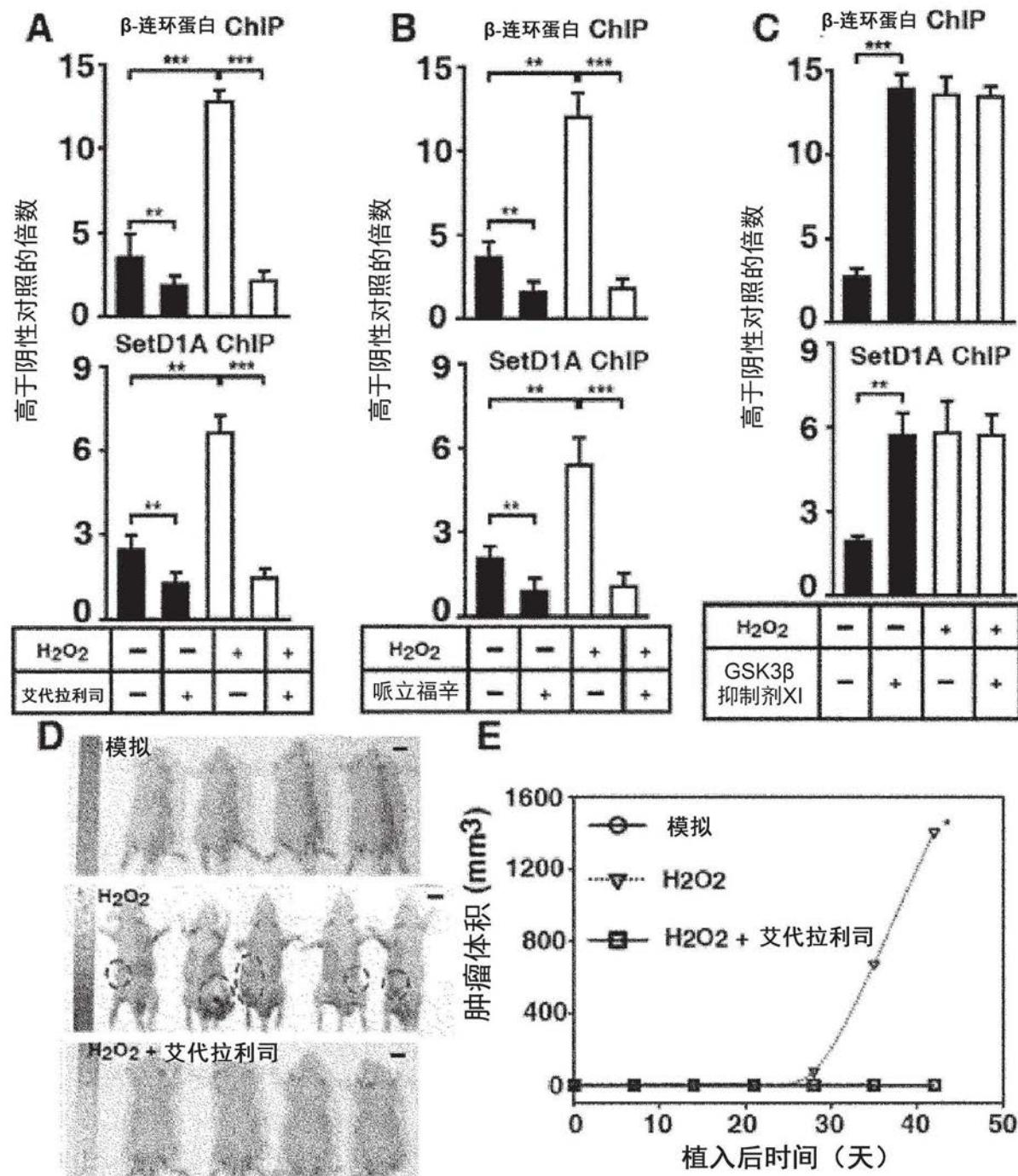


图3

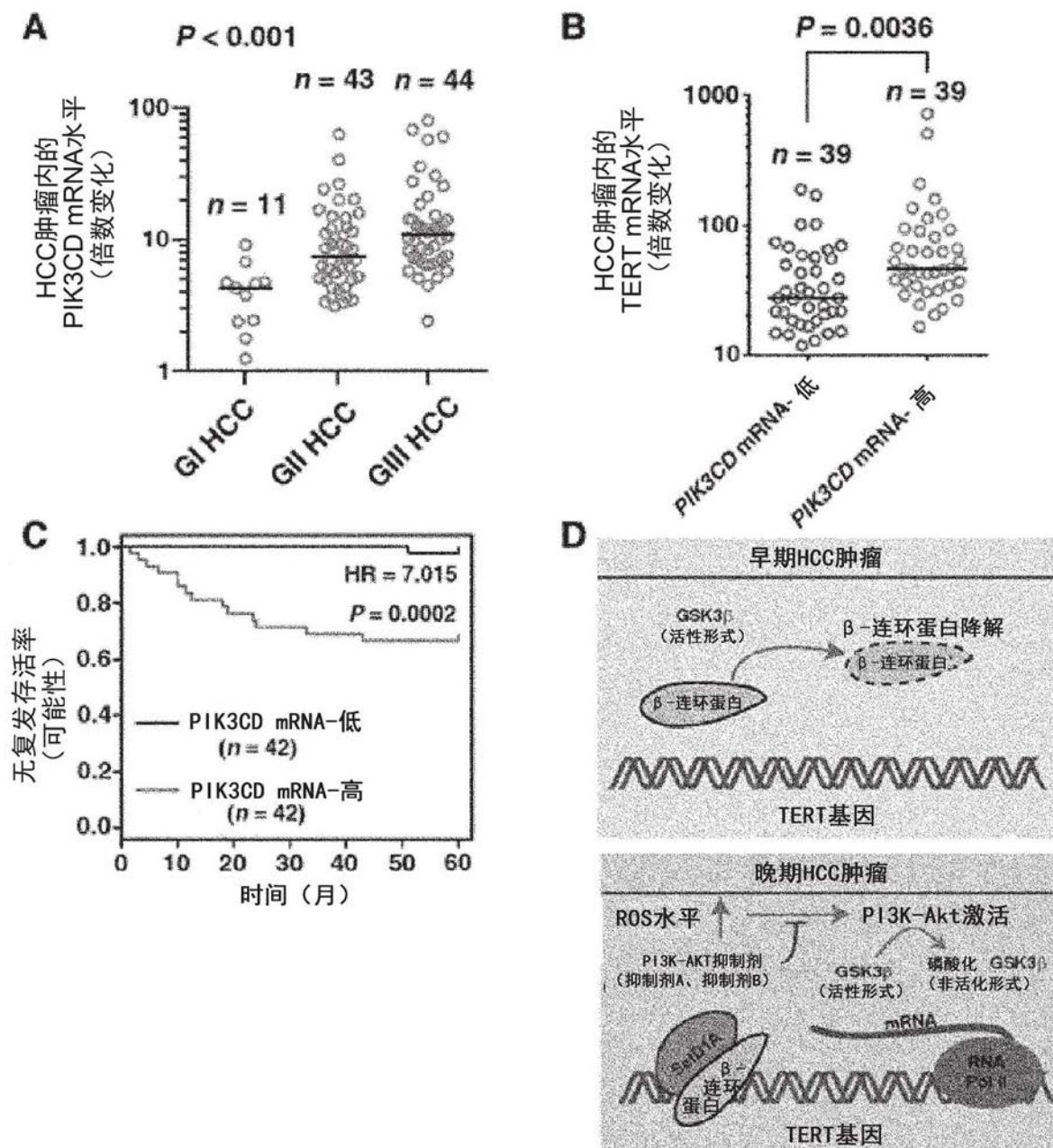


图4