



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106535940 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201580038192.8

(72)发明人 J·康纳

(22)申请日 2015.05.07

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

(30)优先权数据

1408297.8 2014.05.12 GB

代理人 崔佳佳 马莉华

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.12

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 35/763(2015.01)

A61K 35/765(2015.01)

A61K 35/761(2015.01)

A61K 35/768(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 31/55(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2015/051347 2015.05.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/173544 EN 2015.11.19

(83)生物保藏信息

ECACC V92012803 1992.01.28

(71)申请人 维塔生物制品有限公司

地址 英国格拉斯哥

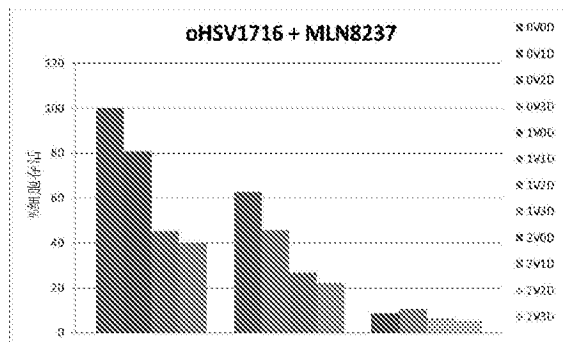
权利要求书1页 说明书25页 附图17页

(54)发明名称

用于癌症治疗的溶瘤病毒和极光激酶抑制剂

(57)摘要

公开了溶瘤病毒和极光激酶抑制剂在癌症治疗中的用途。



1. 一种用于治疗癌症的方法中的溶瘤病毒,其特征在于,所述方法包括:同时或按顺序施用溶瘤病毒和极光激酶抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的用于治疗癌症的方法中的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是溶瘤单纯疱疹病毒。

3. 根据权利要求2所述的用于治疗癌症的方法中的溶瘤病毒,其中在溶瘤单纯疱疹病毒的基因组中的ICP34.5基因的所有拷贝被修饰,使得ICP34.5基因不能表达功能ICP34.5基因产物。

4. 根据权利要求2或3所述的用于治疗癌症的方法中的溶瘤病毒,其中所述溶瘤单纯疱疹病毒是HSV-1株17的突变体。

5. 根据权利要求2或3所述的用于治疗癌症的方法中的溶瘤病毒,其中所述溶瘤单纯疱疹病毒是HSV1716。

6. 根据权利要求1所述的用于治疗癌症的方法中使用的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒选自下组的任一种:溶瘤呼肠孤病毒、溶瘤痘苗病毒、溶瘤腺病毒、溶瘤柯萨奇病毒、溶瘤新城疫病毒、溶瘤细小病毒、溶瘤痘病毒、溶瘤副粘病毒。

7. 一种溶瘤病毒在制备用于癌症治疗的方法的药物中的用途,其中所述治疗方法包括:施用极光激酶抑制剂至需要治疗的患者。

8. 根据权利要求7所述的溶瘤病毒的用途,其中所述溶瘤病毒是溶瘤单纯疱疹病毒。

9. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含溶瘤病毒和极光激酶抑制剂。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述溶瘤病毒是溶瘤单纯疱疹病毒。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中所述溶瘤单纯疱疹病毒是HSV-1株17的突变体。

12. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述溶瘤病毒是HSV1716。

13. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含预定量的溶瘤病毒和预定量的化疗剂,其中所述化疗剂是极光激酶抑制剂。

14. 一种产品,其特征在于,所述产品含有治疗有效量的:

(i) HSV1716,和

(ii) 极光激酶抑制剂,

它们用于在医学治疗的方法中同时或按顺序使用,优选癌症治疗。

用于癌症治疗的溶瘤病毒和极光激酶抑制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及溶瘤病毒和极光激酶抑制剂或组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂中一种或两种在癌症治疗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 溶瘤病毒治疗涉及使用裂解病毒 (lytic virus), 所述裂解病毒选择性感染并杀死癌细胞。一些溶瘤病毒是有希望的疗法, 因为它们对于癌症细胞中复制显示出优异的选择性, 并且它们在肿瘤内的自限性增殖导致更少的毒副作用。一些溶瘤病毒在临床已经大有前途 (贝尔, J., 溶瘤病毒: 地平线上的一个批准的商品? *Mol Ther.* 2010; 18 (2) : 233-234)。

[0004] 极光激酶是丝氨酸/苏氨酸激酶, 其功能是作为有丝分裂和细胞分裂中多方面的调节剂, 其中包括中心体、复制、有丝分裂纺锤体形成、染色体排列于主轴、有丝分裂关卡激活和胞质分裂。有三种相关的哺乳动物极光激酶, 被称为极光激酶-A、极光激酶-B和极光激酶-C。这些激酶在许多人类癌症中过度表达 (Carvajal 等人., 极光激酶: 癌症治疗的新靶点; *临床癌症研究* 2006; 12 (23) 2006年12月1日)。

[0005] 从中心体复制到有丝分裂退出, 极光激酶-A定位到中心体并在中心体复制和有丝分裂纺锤体形成中起主要作用。极光的失调已知是与肿瘤发生相关的。极光激酶-A位于染色体20q13.2, 这一区域通常在恶性肿瘤如黑素瘤和乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌、和胃癌中扩增。自从以下发现后, 对极光激酶的兴趣增强了: 用极光激酶-A转染啮齿动物Rat1和NIH3T3成纤维细胞系足以诱导培养基中集落形成和裸鼠体内肿瘤, 因此将极光激酶-A作为骨骼的致癌基因 (Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, 等人. 一种果蝇极光激酶类似物是致癌基因并在人结肠癌中扩增. *EMBO J* 1998; 17: 3052-65; Zhou H, Kuang J, Zhong L, 等人. 肿瘤扩增激酶STK15/BTAK诱导中心体扩增、非整倍性和转化; *自然遗传学* 1998; 20: 189-93)。人极光激酶A的氨基酸序列可以在Genbank中通过登录号NP_003591.2 (GI: 38327562) 找到。

[0006] 极光激酶A被广泛表达, 并通过调节从后S期至M期发生的细胞周期事件, 其中包括中心体成熟 (Berdnik D, Knoblich JA. 需要果蝇极光激酶-A在有丝分裂过程中用于中心体成熟和肌动蛋白依赖的不对称蛋白质的定位. *Curr Biol* 2002; 12: 640-7.), 进入有丝分裂阶段 (Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, 等人. 在人细胞中进行有丝分裂需要极光激酶-A和一个相互作用活化剂, LIM蛋白Ajuba; *细胞 (Cell)* 2003; 114: 585-98; Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, 等人. 在中心体上CDC25B通过极光激酶-A磷酸化有利于G2-M过渡. *细胞科学杂志 (J Cell Sci)* 2004; 117: 2523-31.), 中心体分离 (Marumoto T, Honda S, Hara T, 等人; 极光A激酶维持在HeLa细胞中早期和晚期有丝分裂活动的保真度; *生物化学杂志 (J Biol Chem)* 2003; 278: 51786-95.), 双极主轴组装 (Kufner TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA; 需要人TPX2将极光激酶-A激酶靶向纺锤体. *细胞生物学杂志 (J Cell Biol)* 2002; 158: 617-23; Eysers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. 一种活化蛋白激酶极光激酶-A的新机制. *当前生物学杂志 (Curr Biol)* 2003; 13: 691-7.), 染色体在中期板

排列 (Marumoto 等人. *supra*; Kunitoku N, Sasayama, Marumoto T, 等人; 着丝粒内部富集极光激酶-B和着丝粒功能需要在前期通过极光激酶-A对CENP-A进行磷酸化. *Dev Cell* 2003; 5:853-64.), 胞质分裂 (Marumoto 等人. 同上), 和有丝分裂退出。

[0007] 极光激酶-A在正常细胞生理学和肿瘤发生中的作用在以下文献中有进一步讨论: Marumoto T, Zhang D, Saya H. 极光激酶-A: 分裂极的监护人. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:42-50。

[0008] 极光激酶-A的过度表达是极光激酶-A诱导肿瘤发生的必要特征; 然而, 异常细胞定位和极光激酶-A表达的时机也有关联 (Carvajal 等人., 极光激酶: 癌症治疗新靶点. 临床癌症研究 (*Clin Cancer Res*) 2006; 12 (23) 2006年12月1日)。

[0009] 极光激酶-B是染色体乘客蛋白复合物的一个亚基, 其功能是确保准确的染色体分离和胞质分裂。极光激酶-B在有丝分裂过程中经历动态定位, 从前期到中期首先定位到着丝粒区域内, 然后从后期到胞质分裂定位到纺锤中央区和中间体。极光激酶-B位于染色体17p13.1, 这一区域通常不会在人类恶性肿瘤中扩增。在肿瘤中, 极光B尽管在基因水平缺乏扩增, 但是在mRNA和蛋白水平频繁增加, 例如在结肠直肠癌 (Tatsuka M, Katayama H, Ota T, 等人; 人类癌症细胞中极光和1p11样中间体相关蛋白有丝分裂激酶过度表达引起的多核性和增加的倍性. 癌症研究 (*Cancer Res*) 1998; 58:4811-6.)。在中国仓鼠胚胎细胞中极光激酶-B的外源过度表达, 导致随后的有丝分裂过程中染色体分离缺陷和体内侵袭性增加, 这表明极光激酶-B在肿瘤发生中的作用 (Ota T, Suto S, Katayama H, 等人. 归因于AIM-1/极光激酶-B过度表达的组蛋白H3有丝分裂磷酸化增加导致染色体数目的不稳定性. 癌症研究 (*Cancer Res*) 2002; 62:5168-77.)。

[0010] 人极光激酶B的氨基酸序列可以在Genbank中通过登录号NP_001243763.1 (GI: 378786658) 找到。

[0011] 没有极光激酶-B活性, 有丝分裂关卡被破坏, 导致非整倍体细胞数量增加, 遗传不稳定性, 和肿瘤发生 (Weaver BA, Cleveland DW. 解码有丝分裂、癌症和化疗之间的联系: 有丝分裂关卡、适应和细胞死亡. 癌症细胞学杂志 (*Cancer Cell*) 2005; 8:7-12)。

[0012] 极光激酶-C是一个染色体乘客蛋白, 它和极光激酶-B的共定位。极光激酶-C在睾丸中特异性地表达, 并且在精子发生和纤毛和鞭毛调节中起作用 (Carvajal 等人., 极光激酶: 癌症治疗新靶点. 临床癌症研究 (*Clin Cancer Res*) 2006; 12 (23) 2006年12月1日)。

[0013] 组蛋白脱乙酰酶 (HDACs) 调节参与癌症发生和发展两者的多种蛋白的表达和活性 (Glozak, MA和Seto, E25 (2007) . 组蛋白脱乙酰酶和癌症. 原癌基因 26:5420-5432)。多种HDAC抑制剂已被证明阻止癌细胞生长和/或诱导癌细胞凋亡 (Fouladi, M (2006) . 组蛋白脱乙酰酶抑制剂用于癌症治疗. *Cancer Invest* 24:521-527; Marks, P, Rifkind, RA, Richon, VM, Breslow, R, Miller, T和Kelly, WK (2001) ; 组蛋白脱乙酰酶和癌症: 成因和治疗. *Nat Rev Cancer* 1:194-202)。

[0014] 组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂是一组被充分表征的化合物。事实上, 例如HDAC抑制剂基地 (www.hdacis.com) 等设施, 提供了已知HDAC抑制剂的大量信息。多年来, HDAC抑制剂已被提出用于各种癌症的治疗 (Vigushin 等人., 抗癌药物 2002年1月; 13 (1) :1-13)。

[0015] 一些溶瘤病毒与一些HDAC抑制剂的相互作用以被一些研究小组研究 (Otsuki 等人, *Molecular Therapy* 16卷, 第9期, 1546-1555 2008年9月; MacTavish 等人., (2010) 组蛋

白去乙酰化酶抑制剂增强基于溶瘤病毒的溶瘤作用. PLoS ONE 5 (12); Ta-Chiang等人., Molecular Therapy第16卷,第6期,1041-1047,2008年7月;W02009/067808A1)。

发明内容

[0016] 本发明涉及溶瘤病毒治疗癌症的用途,其中患者接受溶瘤病毒和化疗剂作为治疗方案的一部分。所述化疗剂优选地为表观遗传剂(epigenetic agent)和更优选地为极光激酶抑制剂和/或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。

[0017] 所述溶瘤病毒和化疗剂作为患者治疗癌症方法的一部分给药。它们可以同时给药,例如作为组合/联合制剂或作为分开的制剂一前一后立即施用。或者,它们可以单独和按顺序给药,其中一种物质施用一段预定的时间间隔之后,施用另一种物质。

[0018] 本发明的一个方面,提供了一种溶瘤病毒在癌症治疗方法中的应用,所述方法包括同时或者按顺序施用溶瘤病毒和极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。

[0019] 本发明的另一方面,提供了一种所述溶瘤病毒在制备用于癌症的治疗方法的药物中的用途,其中所述治疗方法包括:施用极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂至需要治疗的患者。

[0020] 本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括:施用溶瘤病毒和极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂至需要治疗的患者,从而治疗癌症。

[0021] 本发明的另一方面,提供了一种溶瘤病毒在治疗癌症的方法中的用途,其中所述治疗方法包括:施用极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂至需要治疗的患者。

[0022] 本发明的另一方面,提供了极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂在癌症的治疗方法中的用途,其中所述治疗方法包括:施用溶瘤病毒至需要治疗的患者。

[0023] 本发明的另一方面,提供了一种溶瘤病毒在制备用于癌症的治疗方法的药物中的用途,其中所述治疗方法包括:施用极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂至需要治疗的患者。

[0024] 本发明的另一方面,提供了一种极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂在制备用于癌症的治疗方法的药物中的用途,其中所述治疗方法包括:施用溶瘤病毒至需要治疗的患者。

[0025] 本发明的又一方面,提供了一种药物组合物或药物,其包括溶瘤病毒和极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。

[0026] 在一些实施方式中,所述溶瘤病毒为溶瘤单纯疱疹病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤单纯疱疹病毒基因组中ICP34.5基因的所有拷贝都被修改以至于所述ICP34.5基因不能表达功能性ICP34.5基因产物。同样地,所述溶瘤单纯疱疹病毒可以是ICP34.5无效型突变病毒。

[0027] 在一些实施方式中,溶瘤单纯疱疹病毒的基因组中的ICP34.5的基因的一个或两个被修改,使得ICP34.5的基因不能表达功能性ICP34.5的基因产物。

[0028] 在一些实施方式中,所述溶瘤单纯疱疹病毒是HSV-1 17株的突变体。在优选的实施方式中,所述溶瘤单纯疱疹病毒是HSV1716 (ECACC保藏号V92012803)。在一些实施方式中,所述溶瘤单纯疱疹病毒是HSV-1 17株突变体1716的突变体。

[0029] 在一些实施方式中,所述溶瘤病毒选自:溶瘤呼肠孤病毒、溶瘤痘苗病毒、溶瘤腺病毒、溶瘤柯萨奇病毒、溶瘤新城疫病毒、溶瘤细小病毒、溶瘤痘病毒、溶瘤副粘病毒。

[0030] 在本发明的另一方面,提供了一试剂盒,所述试剂盒包含预定量的溶瘤病毒和预定义化疗剂,其中所述化疗剂是极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。所述试剂盒可以与说明书一起提供,所述说明书描述所述溶瘤病毒、极光激酶抑制剂和/或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂一起按顺序地或同时施用的以治疗癌症。

[0031] 本发明的另一方面,提供了一产品,所述产品包含治疗有效量:

[0032] (i) 溶瘤病毒,优选HSV1716;和

[0033] (ii) 极光激酶抑制剂或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,

[0034] 它们同时或按顺序用于医学治疗方法,优选地癌症的治疗。所述产品可以是药理学上接受的剂型和可以可任选地配制用于联合用药的组合制剂。

具体实施方式

[0035] 溶瘤病毒

[0036] 所述溶瘤病毒可以是任何溶瘤病毒。优选地是复制无能型病毒、至少是在靶向肿瘤细胞中的复制无能型病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒选自:溶瘤单纯疱疹病毒、溶瘤呼肠孤病毒、溶瘤痘苗病毒、溶瘤腺病毒、溶瘤新城疫病毒、溶瘤柯萨奇病毒、溶瘤麻疹病毒。溶瘤病毒是一种能裂解癌细胞(溶瘤)的病毒,优选以选择性方式溶瘤。那些选择性在分裂细胞而不在非分裂细胞中复制的病毒通常都是溶瘤细胞。溶瘤病毒在本领域公知,并且在“分子治疗”(Molecular Therapy)第18卷第2期,2010年2月第233-234页有综述。

[0037] 在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是溶瘤单纯疱疹病毒。所述单纯疱疹病毒(HSV)基因组包括两个共价连接的区段,称为长(L)和短(S)区段。每一区段包含一侧翼为一对反向末端重复序列的独特序列。所述长重复(RL或R_L)和所述短长重复(RS或R_S)是不同的。

[0038] 所述HSV(单纯疱疹病毒)ICP34.5(也称为 γ 34.5)基因,该基因已被广泛研究,在HSV-1株F和syn17+和在HSV-2株HG52中已被测序。ICP34.5基因的一个拷贝位于每个RL重复区。所述ICP34.5基因的一个或二个拷贝失活的突变体已知会缺乏神经毒力,即无毒力/非神经毒性(非神经毒性的定义为引入高滴度病毒(约 10^6 噬斑形成单位(pfu)的能力)至动物或患者而不会引起致死脑炎,使得在例如小鼠或人患者中的LD₅₀大约在 $\geq 10^6$ pfu),并且是溶瘤的。

[0039] 可以在本发明中使用的溶瘤HSV包括 γ 34.5(也称为ICP34.5)基因被修改(例如通过突变,其可以是缺失、插入、添加或取代),使得各自的基因是不能表达(例如编码)功能性ICP34.5蛋白。优选地,在根据本发明的HSV中, γ 34.5基因的2个拷贝被修改以至于修改后的HSV不能够表达(例如产生)功能性ICP34.5蛋白。

[0040] 在一些实施方式中,溶瘤单纯疱疹病毒可以是ICP34.5无效型突变,其中单纯疱疹病毒基因组(通常存在两个拷贝)上的ICP34.5基因的所有拷贝被破坏,以至于所述单纯疱疹病毒不能够产生功能性的ICP34.5基因产物。在其它实施方式中,所述单纯疱疹病毒可以缺乏至少一个可表达的ICP34.5基因。在一些实施方式中,所述单纯疱疹病毒可以只缺乏一个可表达的ICP34.5基因。在其它实施方式中,所述单纯疱疹病毒可以缺乏两个可表达的ICP34.5基因。在仍然其它实施方式中,所述单纯疱疹病毒上每个ICP34.5基因都不表达。缺

乏可表达ICP34.5基因意味着,例如,ICP34.5基因的表达不产生功能性ICP34.5基因产物。

[0041] 溶瘤单纯疱疹病毒可源自任何HSV,其中包括任何实验室株或临床分离(非实验室株)的HSV。在一些优选的实施方式中,所述HSV是HSV-1或HSV-2的突变体。可选地,所述HSV可以是HSV-1和HSV-2的型间重组株。所述突变体可以是实验室株HSV-1株17、HSV-1株F或HSV-2株HG52中的一种。所述突变体可以是非实验室株JS-1。优选地,所述突变体是HSV-1株17突变体。所述单纯疱疹病毒可以是HSV-1株17突变体1716、HSV-1株F突变体R3616、HSV-1株F突变体G207、HSV-1突变体NV1020,或进一步的突变体,其中所述HSV基因组包含额外的突变和/或一个或多个异源核苷酸序列。额外突变可以包括使功能失效的突变,该突变可影响到所述病毒的毒性或复制能力。例如,突变可以在任何一个或多个ICP6、ICP0、ICP4、ICP27上作出。优选地,在这些基因中的一个突变(任选地在该基因的2个拷贝上,如果合适的话),导致所述HSV表达成相应功能性多肽的无能(或能力降低)。以举例的方式,所述HSV基因组突变可以通过添加、缺失、插入或取代核苷酸来完成。

[0042] 许多溶瘤单纯疱疹病毒在本领域中是公知的。例子包括HSV1716,R3616(例如参见Chou&Roizman,国家科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.) Vol.89,pp.3266-3270,1992年4月),G207(Toda等人,人类基因治疗9:2177-2185,1995年10月),NV1020(Geevarghese等人,人类基因治疗2010年9月;21(9):1119-28),RE6(Thompson等人,病毒学131,171-179(1983)),和Oncovex™(Simpson等人,癌症研究2006;66:(9)4835-4842 2006年5月1日;Liu等人,基因治疗(2003):10,292-303)。

[0043] 在一些优选的实施方式中,所述单纯疱疹病毒是HSV-1株17突变体1716(HSV1716)。HSV1716是一种溶瘤的非神经毒性的HSV,并且在以下文献中公开:EP0571410、WO 92/13943、Brown等人(Journal of General Virology(1994),75,2367-2377)和MacLean等人(Journal of General Virology(1991),72,631-639)的文献。HSV1716已于1992年2月28日按照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约(以下简称“布达佩斯条约”)的规定,保藏于欧洲动物细胞培养物保藏中心(ECACC),疫苗研究和生产实验室,公共健康实验室服务,波登当,索尔兹伯里,威尔特,SP40JG,英国,保藏号为V92012803。

[0044] 在一些实施方式中,所述单纯疱疹病毒是HSV-1株17突变体,其被修改以至于两个ICP34.5基因都不表达功能性基因产物,例如通过ICP34.5基因的突变(例如插入、缺失,添加,置换),但在其他方面类似或基本上类似野生型亲本病毒HSV-1株17+的基因组。换言之,所述病毒可以是HSV1716的突变体,具有基因组突变,从而使得HSV-1株17+的ICP34.5基因的两个拷贝都失活,但在其它方面不发生改变,即没有插入或删除/修改其它编码序列。

[0045] 其他类型的溶瘤病毒在本领域中也是已知的。它们包括溶瘤痘病毒(如正痘病毒)例如痘苗病毒JX-954和GLV-1h68(Park,BH等人.(2008)Lancet Onco19:533-542;Kelly等人.Human Gene Therapy 19:744-782(2008年8月);Wennier等人.分子医学专家回顾(Expert Rev Mol Med.)13e18 2011年12月5日),溶瘤呼肠孤病毒例如溶瘤呼肠孤病毒类型3迪林(Pandha,HS,等人.(2009)临床癌症研究(Clin Cancer Res)15:6158-6166;Vidal,L等人.(2008)临床癌症研究(Clin Cancer Res)14:7127-7137),溶瘤腺病毒例如Onyx-015(Cohen和Rudin.Curr Opin Investig Drugs 2001年12月;2(12):1770-5),溶瘤副粘病毒例如溶瘤麻疹病毒MV-Edm(Nakamura,T,等人.(2005)Nat Biotechnol 23:209-214;Wennier等人.分子医学专家回顾(Expert Rev Mol Med.)13e18 2011年12月5日),溶瘤柯

萨奇病毒例如A13,A15,A18,A21 (Au等人,病毒学杂志(Virology Journal) 2011,8:22),溶瘤新城疫病毒(Mansour等人,J Virol 2011,6月;85(12):6015-23),和溶瘤细小病毒如H-1PV和MVM(Wennier等人.分子医学专家回顾(Expert Rev Mol Med.) 13e18 2011年12月5日)。

[0046] 在一些实施方式中,本发明的溶瘤病毒的基因组可进一步被修改以编码至少一个拷贝的对病毒异源的多肽的(即通常在野生型病毒中未发现的)核酸,从而使得所述多肽可以由所述核酸表达。同样地,所述溶瘤病毒还可以是表达载体,从所述表达载体可表达出所述多肽。这些病毒的实例在WO2005/049846和WO2005/049845中描述。

[0047] 为了有效表达所述多肽,编码多肽的核酸优选为可操作地连接于能够实现编码所述多肽的核酸的转录调节序列,例如启动子。可操作地连接于核苷酸序列的调节序列(例如启动子),可位于邻近于该序列或接近,使得所述调节序列能够影响和/或控制表达所述核苷酸序列的产物。因此,所述核苷酸序列的编码产物是能由调节序列进行表达的。

[0048] 溶瘤病毒可以被配制为药物和临床使用的药物组合物,并且在这种制剂中可与药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂组合。所述组合物可被配制成用于局部、肠胃外、全身性的、腔内、静脉内、动脉内、肌内、鞘内、眼内、瘤内、皮下、口服或可以包括注射的经皮给药途径。合适的制剂可包含在无菌或等渗培养基中的病毒。药物和药物组合物可以被制剂成流体(包括凝胶)或固体(例如片剂)形式。流体制剂可以被配制成用于通过注射或通过导管给药,以输送至人或动物体的选定区域。

[0049] 给药优选为“治疗有效量”,该量是足以显示对个体的益处。实际给药量和速率和给药时程,将依赖于待治疗疾病的性质和严重程度。治疗处方,例如关于剂量决定等,属于全科医生和其它医生的职责范围,并且通常需要考虑被治疗的疾病、个体患者的状况、递送的部位、给药的方式和其它全科医生的已知的因素。其它上述提及的技术和方法可见Remington's Pharmaceutical Sciences(第20版,2000年,Lippincott,Williams&Wilkins出版)。

[0050] 靶向疗法可以用于递送所述溶瘤病毒至某些类型的细胞,例如通过使用靶向系统,如抗体或细胞特异性配体。由于多种原因,靶向可以是有利的;例如,如果病毒在高剂量下有不可接受的毒性,或者否则需要过高的剂量,或者否则它不能够进入靶细胞。

[0051] 能靶向细胞和组织中的HSV在文献PCT/GB2003/000603;WO 03/068809中有描述,这些文献通过引用全部并入。

[0052] 溶瘤病毒可单独地或与其它治疗联合施用,包括同时或按顺序所用,这取决于待治疗的病症。这样的其它治疗方法可以包括,提供给受试者的作为癌症治疗的标准疗法的化学疗法(包括使用化疗剂的全身治疗或者使用基于小分子或生物分子(例如抗体)类物质的治疗剂,所述治疗剂靶向肿瘤进展、维持或演进的关键途径)或放射疗法。

[0053] 化疗

[0054] 化疗是指使用药物治疗肿瘤。例如,所述药物可以是一种化学实体(化合物),例如小分子药物、蛋白质抑制剂(例如激酶抑制剂)、或生物制剂、例如抗体、抗体片段、核酸或肽适体、核酸(例如DNA、RNA)、肽、多肽、或蛋白质。所述药物可以被制成药物组合物或药物。所述制剂可包含一种或多种药物(例如,一种或多种活性物质)连同一种或多种药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0055] 治疗可以涉及不止一种药物的给药。药物可单独施用或与其它治疗联合施用,其中包括同时或按顺序施用,这取决于待治疗的病症。例如,化疗可以是一种共治疗,其中涉及两种药物/物质的施用,其中一种或多种用于治疗癌症。本发明中的溶瘤病毒和化疗可以同时、单独或顺序施用,这可以允许在需要治疗的肿瘤内同时存在2种物质(治疗剂),从而提供一种联合治疗效果,所述治疗效果可以是相加的或协同的。

[0056] 化疗可以通过一种或多种给药途径施用,例如给药肠胃外、动脉内注射或输注、静脉内注射或输注、腹腔内、肿瘤内或口服。给药优选为“治疗有效量”,这是指足以显示对个体的益处。实际给药量和速率和给药时程,将依赖于待治疗疾病的性质和严重程度。治疗处方,例如关于剂量决定等,属于全科医生和其它医生的职责范围,并且通常需要考虑被治疗的疾病、个体患者的状况、递送的部位、给药的方式和其它全科医生的已知的因素。其它上述提及的技术和方法可参见Remington's Pharmaceutical Sciences(第20版,2000年,Lippincott,Williams&Wilkins出版)。

[0057] 化疗可以根据治疗方案给药。所述治疗方案可以是预先确定的时间表、计划、方案或化疗给药的时间表,其可由医师或医生制定,并且可以是定制的以满足需要治疗的患者。

[0058] 治疗方案可指示一个或多个以下内容:施用于患者的化疗的类型;每种药物的剂量;给药之间的时间间隔;每次治疗的时长;任何治疗停止期的数量和性质,如果有等。对于共治疗,可以提供单一治疗方案,其指示各药物/物质如何被施用。

[0059] 极光激酶抑制剂

[0060] 极光激酶抑制剂是根据本发明可与溶瘤病毒一起使用以治疗癌症的化学治疗剂的实例。

[0061] 极光激酶抑制剂是能够抑制极光激酶,优选哺乳动物极光激酶,更优选人极光激酶活性的试剂。在一些优选的实施方式中,所述试剂能够抑制人的极光激酶A和/或B和/或C的活性。

[0062] 极光激酶抑制剂通常是化学实体,例如小分子药物、抗生素、或生物制剂、例如抗体、抗体片段、核酸或肽适体、核酸(例如DNA、RNA)、肽、多肽、或蛋白质。在正常细胞中,极光激酶-A受抑制会导致延迟(但不阻断)进入有丝分裂阶段(Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, 等人. 极光激酶-A和相互作用的激活剂, LIM蛋白Ajuba, 需要用于人细胞的有丝分裂的承诺. 细胞(Cell) 2003;114:585-98; Marumoto T, Honda S, Hara T, 等人. 极光激酶A维持在HeLa细胞中的早期和晚期的有丝分裂事件的保真度, 生物化学杂志(J Biol Chem) 2003; 278:51786-95.); 中心体分离缺陷导致单极有丝分裂纺锤体(Marumoto等人, 同上; Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. 极光突变防止中心体分离导致单极纺锤体的形成. 细胞. 1995;81:95-105.); 和胞质分裂的失败(Marumoto等人, 同上)。通过抑制极光激酶-A, 已经在三个人类胰腺癌细胞株(Panc-1, MIA PaCa-2, 和SU.86.86)中显示出令人鼓舞的抗肿瘤作用, 其中在细胞培养物中抑制生长并在小鼠异种移植中几乎全部去除了致瘤性(Hata T, Furukawa T, Sunamura M, 等人. 在人胰腺癌细胞株中靶向极光激酶A的RNA干扰抑制肿瘤的生长并增强紫杉烷化学敏感性. 癌症研究(Cancer Res) 2005;65:2899-905)。

[0063] 极光激酶B抑制会导致着丝点微管附着异常,不能实现染色体取向,和胞质分裂失败(Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, 等人; 极光B调节在细胞动力学过程中特定沟特异性波形蛋白磷酸化切割, 生物化学杂志(J Biol Chem) 2003;278:8526-30; Severson AF, Hamill

DR, Carter JC, Schumacher J, Bowerman B, 极光相关激酶AUR-2在细胞分裂中期招募ZEN-4/CeMKLP1至有丝分裂纺锤体并且是胞质分裂必需的, 当前生物学杂志 (Curr Biol) 2000年;10:1162-71)。有丝分裂检查点被破坏, 使得细胞可通过有丝分裂, 尽管微管-着丝点 (kinetochore) 附着不正确 (Hauf S, Cole RW, LaTerra S, 等人. 小分子橙皮素揭示极光B在校正微管的着丝点附着和维持纺锤体组装检验点中的作用, 细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 2003年;161:281-94; Kallio MJ, McClelland ML, Stukenberg PT, Gorbsky GJ. 抑制极光B-激酶阻止染色体分离, 覆盖纺锤体检查点, 并在有丝分裂扰乱微管动力学. 当前生物学杂志 (Curr Biol) 2002;12:900-5.)。尽管起始招募检查点蛋白例如BubR1和Mad2至着丝点在前期正常发生, 它们随后在缺乏极光激酶-B功能情况下在有丝分裂过程中发生离解。这种解离削弱了检查点, 允许细胞发生异常有丝分裂, 并从中期进展到后期。具有无胞质分裂的异常有丝分裂的反复循环导致大量多倍体, 并最终导致细胞凋亡 (Hauf等人, 同上; Ditchfield等人, 同上; Giet R, Glover DM. 果蝇极光B激酶是染色体凝缩期间的组蛋白H3磷酸化和凝缩募集以及在细胞分裂过程中组织中心主轴所必需的。细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 2001;152:669-82; Murata-Hori M, Wang YL. 极光B的激酶活性是有丝分裂期间着丝粒-微管 (kinetochore-microtubule) 相互作用所必需的, Curr Biol 2002;12:894-9, Kallio等人, 同上)。

[0064] 在肿瘤细胞中极光激酶-A或极光激酶-B活性的受抑制, 导致受损的染色体排列, 有丝分裂检查点的消除, 多倍体和随后的细胞死亡。这些体外效应在转化细胞中比在非转化或非分裂细胞中更显著 (Ditchfield等人, 同上)。因此, 靶向极光激酶 (Aurora) 可以实现癌症的体内选择性。

[0065] 可以使用本领域普通技术人员已知的常规程序, 测试极光激酶活性的抑制, 从而允许确认给定的试剂是否是极光激酶抑制剂。合适的方法包括使用体外激酶测定, 例如在 Harrington EA, Bebbington D, Moore J, 等人. “VX-680是Aurora激酶的有效和选择性小分子抑制剂, 抑制体内肿瘤生长”. Nat Med 2004;10:262-7中所述。或者, 可以选择设计用于筛选极光激酶抑制剂的市售试剂盒, 例如CycLex®极光激酶A测定/抑制剂筛选试剂盒 (MBL公司, CY-1165) 或CycLex®极光家族激酶测定/抑制剂筛选试剂盒 (MBL公司, CY-1174)。

[0066] 许多极光激酶抑制剂是已知的, 如下所述。

[0067] MLN8237

[0068] MLN8237 (9-氯-7-(2-氟-6-甲氧基苯基)-5H-嘧啶并[5,4-d][2]苯并氮杂卓-2-基)-氨基]-2-甲氧基苯甲酸) (千年制药 (Millenium Pharmaceuticals), 马萨诸塞州剑桥 (Cambridge, Massachusetts)) 是极光激酶A抑制剂。MLN8237是极光A激酶的口腹活性小分子抑制剂。它是选择性极光激酶A抑制剂, 其具有1nM的IC₅₀值, 在基于细胞的研究中对极光激酶A的选择性比极光激酶B高200倍 (Karthigeyan等人, 医药研究综述 (Medicinal Research Reviews), 第31卷, 第5期, 第757-793页, 2011年9月)。

[0069] MLN8237的结构如图1所示。

[0070] 橙皮素 (Hesperadin)

[0071] 橙皮素是抑制免疫沉淀的极光激酶-B的吡啶酮, 其抑制浓度50% (IC₅₀) 为250nmol/L (Carvajal等人, 极光激酶: 癌症治疗的新靶标 (Aurora Kinases: New Targets for Cancer Therapy.)。临床癌症研究 (Clin Cancer Res) 2006;12(23), 2006年12月1日)。

它诱导异常微管着丝点附着,显著增加同向连接 (syntelic attachments) 的形成 (Hauf S, Cole RW, LaTerra S, 等人. 小分子橙皮素揭示极关B在校正着丝点-微管附着和维持纺锤体组装检查点中的作用 (The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint). 细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 2003;161:281-94)。尽管未能实现适当的染色体双向定位,但处理的细胞逃避有丝分裂检查点并从中期进行到后期 (Hauf等人,同上;Harrington EA, Bebbington D, Moore J, 等人. VX-680是极光激酶的有效和选择性小分子抑制剂,抑制体内肿瘤生长 (VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo). Nat Med 2004;10:262-7)。这些细胞不能经受胞质分裂和四倍体结果。尽管增加了多倍体,但没有实现细胞活力的损失。

[0072] 橙皮素 (Hesperadin) 的结构如图1所示。

[0073] ZM447439

[0074] ZM447439是由阿斯利康公司 (AstraZeneca) 开发的喹唑啉衍生物,它是极光激酶的ATP竞争剂。体外测定显示对极光激酶-A和极光激酶-B的抑制,都具有 100nmol/L 的 IC_{50} (Carvajal等人,极光激酶:癌症治疗的新靶标 (Aurora Kinases: New Targets for Cancer Therapy). 临床癌症研究 (Clin Cancer Res) 2006;12 (23) 2006年12月1日)。

[0075] 与橙皮素 (Hesperadin) 一样, ZM447439诱导不正确的微管着丝点附着,染色体双向定位失败,有丝分裂检查点的消除,胞质分裂失败和四倍体的发展 (Hauf S, Cole RW, LaTerra S等人. 小分子橙皮素揭示极关B在校正着丝点-微管附着和维持纺锤体组装检查点中的作用 (The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint). 细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 2003;161:281-94; Harrington EA, Bebbington D, Moore J, 等人. VX-680是极光激酶的有效和选择性小分子抑制剂,抑制体内肿瘤生长 (VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo). Nat Med 2004;10:262-7)。处理的细胞在下一个细胞周期经历凋亡。暴露于ZM447439实现生长抑制和凋亡。尽管ZM447439在体外抑制极光激酶-A和极光激酶-B两者,但是在处理的细胞中观察到的表型表明对极光激酶-B的更大抑制。

[0076] ZM447439的结构如图1所示。

[0077] MK0457 (也称为VX-680)

[0078] MK0457抑制所有三种极光激酶。每个在基于细胞的测定中诱导相似的表型,其特征在于抑制组蛋白H3的Ser10的磷酸化,抑制胞质分裂和发展多倍体 (Hauf S, Cole RW, LaTerra S, 等人. 小分子橙皮素揭示极关B在校正着丝点-微管附着和维持纺锤体组装检查点中的作用 (The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint). 细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 2003;161:281-94; Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A等人. 通过将BubR1、Mad2和Cenp-E靶向到着丝点在(细胞分裂的)后期极光激酶B耦合染色体对准 (Aurora B couples chromosome alignment with anaphase

by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores). 细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 2003;161:267-80; Harrington EA, Bebbington D, Moore J, 等人. VX-680 是极光激酶的有效和选择性小分子抑制剂, 抑制体内肿瘤生长 (VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo). Nat Med 2004;10:262-7)。

[0079] MK0457 是靶向所有极光激酶共有的 ATP 结合位点的 4,6-二氨基嘧啶。它是所有三种极光激酶的有效抑制剂, 对于极光激酶-A, 极光激酶-B 和极光激酶-C 分别具有 0.6、18.0 和 4.6 nmol/L 的抑制常数 (K_i) (Harrington 等人, 同上)。

[0080] 用 MK0457 处理导致多倍体, 并另外抑制细胞培养物中几种肿瘤类型的生长, 诱导在白血病, 淋巴瘤和结肠直肠细胞系中最突出的凋亡。在白血病, 结肠癌和胰腺癌的啮齿动物异种移植模型中 MK0457 的研究也显示出令人印象深刻的抗肿瘤活性。

[0081] 用 MK0457 治疗人类急性骨髓性白血病 (HL60) 裸鼠异种移植与对照相比导致肿瘤体积减少 98% (Harrington 等人, 同上)。在人结肠癌 (HCT116) 裸鼠异种移植模型中, 用 MK0457 治疗导致所治疗的 7 只大鼠中的 4 只肿瘤消退。在所有治疗的异种移植中, 组蛋白 H3 的 Ser10 的磷酸化被抑制, 表明有效的极光激酶-B 抑制。

[0082] MK0457 的结构如图 1 所示。

[0083] MLN8054

[0084] MLN8054 是极光激酶的口小分子抑制剂, 对极光激酶-A 具有相对特异性 (极光激酶-A $IC_{50}=0.034 \mu\text{mol/L}$; 极光激酶-B $IC_{50}=5.7 \mu\text{mol/L}$; [Hoar HM, Wysong DR, Ecsedy JA. MLN8054 在培养的人肿瘤细胞中选择性抑制极光激酶 A 超过极光激酶 B (MLN8054 selectively inhibits Aurora A over Aurora B in cultured human tumor cells) [摘要 C40]. Proc AACR-NCIEORTC 国际会议: 分子靶标和癌症治疗 (Molecular Targets and Cancer Therapeutics) 2005.]。MLN8054 是选择性极光激酶-A 抑制剂。

[0085] 用低浓度的 MLN8054 (0.25-2 $\mu\text{mol/L}$) 处理培养的人肿瘤细胞导致与极光激酶-A 抑制一致的异常有丝分裂纺锤体形成。在较高浓度 (4 $\mu\text{mol/L}$) 的处理导致组蛋白 H3 的 Ser10 的磷酸化丧失, 与极光激酶-B 抑制一致。使用各种口服给药方案在 HCT116 人结肠癌, PC4 前列腺癌和 Calu-6 人肺癌异种移植模型中显示生长抑制 (Huck J, Zhang M, Burenkova O, Connolly K, Manfredi M, Meetze K. 临床前抗肿瘤活性与 MLN8054, 小分子极光 A 激酶抑制剂 (Preclinical antitumor activity with MLN8054, a small molecule Aurora A kinase inhibitor) [摘要 4698], Proc Am Assoc Cancer Res 2006;47:1104)。

[0086] 化合物 677

[0087] 化合物 677 是由阿斯利康公司开发的选择性极光激酶-B 抑制剂。它在临床前研究中显示出有效的单一药物抗癌活性 (Nair JS, Tse A, Keen N, Schwartz GK. 一种作为单一药剂或与化疗联合使用具有强效抗癌活性的新型极光 B 激酶抑制剂 (A novel aurora B kinase inhibitor with potent anticancer activity either as a single agent or in combination with chemotherapy), [摘要 9568]. Proc Am Soc Clin Oncol. 2004;23:848)。

[0088] AZD1152

[0089] AZD1152 是由阿斯利康公司开发的选择性极光激酶-B 抑制剂。它是一种高度可溶

的乙酰苯胺取代的吡唑氨基喹啉酮前药,其在人血浆中完全裂解,产生活性药物物质 AZD1152羟基-QPA。AZD1152羟基-QPA抑制极光激酶-A,极光激酶B-着丝粒内蛋白(INCENP)和极光激酶C-着丝粒内蛋白,各自的抑制系数为6873.7和17.0nmol/L,表明对极光激酶-B的选择性超过极光激酶-A100倍(Carvajal等人.,极光激酶:癌症治疗的新靶标(Aurora Kinases:New Targets for Cancer Therapy).临床癌症研究(Clin Cancer Res)2006;12(23)2006年12月1日)。

[0090] 细胞系研究显示在组蛋白H3的Ser10上的磷酸化的抑制和通过异常有丝分裂的具有正常动力学的进展,导致多倍体和细胞死亡。AZD1152的异种移植研究显示减少组蛋白H3的Ser10上的磷酸化,增加多倍体并在携带各种人类肿瘤,包括结肠直肠癌(SW620,HCT16和Colo205)和肺癌(A549和Calu-6)的无胸腺裸鼠中增强细胞凋亡(Wilkinson RW,Odedra R,Heaton SP等人。AZD1152,高效的极光激酶抑制剂,对极光激酶B具有选择性,在人肿瘤异种移植模型中诱导药效学效应和显著的生长抑制(AZD1152,highly potent Aurora kinase inhibitor,with selectivity for Aurora kinase B,induces pharmacodynamics effects and significant growth inhibition in human tumor xenograft models)[摘要B214].Proc AACR-NCI-EORTC国际会议:分子靶标和癌症治疗(Molecular Targets and Cancer Therapeutics)2005(183))。

[0091] 其它极光激酶抑制剂包括:PHA-680632((内尔维亚诺医学科学Nerviano Medical Sciences);Soncini C,Carpinelli P,Gianellini L等人。PHA-680632,一种具有有效抗肿瘤活性的新型极光激酶抑制剂(PHA-680632,a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity)。临床癌症研究(Clin Cancer Res)2006;12:4080-9),PHA-739358(内尔维亚诺医学科学),R763(Rigel;McLaughlin等人,肿瘤研究与临床肿瘤学杂志(J Cancer Research Clin Oncol).2010年1月;136(1):99-113),SNS-34(Sunesis;Arbitrario等人,癌症化疗和药理学(Cancer Chemother Pharmacol).2010年3月;65(4):707-17.Epub 2009年8月1日.),NCED#17(NCE开发有限公司(Discovery Ltd)),AT9283(Astex治疗(Therapeutics);Dawson等人,英国血液学杂志(Br J Haematol).2010年7月;150(1):46-57.Epub 2010年5月7日.),MP-235(蒙田制药(Montigen Pharmaceuticals)),MP-529(蒙田制药),MLN8054(千年;(Karthigeyan等人,医药研究综述(Medicinal Research Reviews)31卷,第5期,第757-793页,2011年9月),PHA-739358(Karthigeyan等人,医药研究综述(Medicinal Research Reviews)31卷,第5期,第757-793页,2011年9月),以及图1中所示的那些,以及描述于W02007/113005和W02007/115805中的那些,包括W02007/113005中描述的化合物VII和W02007/115805中描述(并示于图1)的化合物IV,VII,VIII和IX。

[0092] 组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂

[0093] 根据本发明,组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂是可以与溶瘤病毒一起使用以治疗癌症的化疗剂的实例。

[0094] HDAC抑制剂是抑制组蛋白脱乙酰酶的酶活性的化合物。HDAC抑制剂通常是化学实体,例如,小分子药物、抗生素或生物制剂,例如,抗体、抗体片段、核酸或肽配体、核酸(例如DNA、RNA)、肽、多肽或蛋白质。

[0095] HDAC抑制剂能够在体外,以及在荷瘤动物模型中体内诱导癌细胞的生长停滞,分

化和/或细胞凋亡。作为抗肿瘤剂几种类型的HDAC抑制剂正在进行临床试验。

[0096] 可以使用本领域普通技术人员已知的常规方法测试HDAC抑制剂活性,从而允许确认给定药剂是否是HDAC抑制剂。合适的方法包括使用体外测定,例如Hoffman等人(核酸研究(Nucleic Acids Research),999,27卷,No.9,2057-2058)中所述的那些。或者,几种设计用于筛选HDAC抑制剂的市售试剂盒是可用的,例如由艾跃生物公司(Active Motif)(卡尔斯巴德Carlsbad,加利福尼亚州CA,美国USA)提供的HDAC测定试剂盒(cat no.s 56200和56210)。

[0097] 许多HDAC抑制剂是已知的,如下所述。

[0098] 罗米地辛

[0099] 罗米地辛(商品名Istodax®(塞尔基因Celgene);代号为FK228和FR901228)被批准用于皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)的治疗,并且正在进行用于治疗非霍奇金淋巴瘤(NHL)的2期临床试验。

[0100] 罗米地辛的结构示于图2中。

[0101] 伏立诺他(Vorinostat)

[0102] 伏立诺他(或辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA))以名称Zolinza®销售用于治疗皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)。伏立诺他正在进行用于治疗间皮瘤的3期临床试验和用于治疗MDS、NHL、脑癌和NSCLC的2期试验。伏立诺他与硼替佐米(Velcade®)组合进行多发性骨髓瘤的2期和3期临床试验。

[0103] 伏立诺他的结构示于图2中。

[0104] 帕比司他(Panobinostat)

[0105] 帕比司他(LBH589;诺华Novartis)是正在进行用于治疗霍奇金淋巴瘤,慢性骨髓性白血病(CML),急性骨髓性白血病(AML)和骨髓增生异常综合征(MDS)的3期临床试验的非选择性HDAC抑制剂。

[0106] 帕比司他(Panobinostat)与硼替佐米和地塞米松结合正在进行用于治疗多发性骨髓瘤的2/3期临床试验。

[0107] 帕比司他的结构示于图2中。

[0108] 贝利司他(Belinostat)

[0109] 贝利司他(PXD101;频谱制药(Spectrum Pharmaceuticals),TopoTarget;Curagen)正在进行用于治疗AML、CTCL、MDS、NHL和卵巢癌的2期临床试验。

[0110] 贝利司他的结构示于图2中。

[0111] 莫西司他(Mocetinostat)

[0112] 莫西司他(MGCD0103;莫西司他二氢溴酸盐)是正在进行用于治疗AML、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、霍奇金淋巴瘤、NHL、胰腺癌和胸腺瘤的临床试验的苯甲酰胺组蛋白脱乙酰酶抑制剂。

[0113] 莫西司他的结构示于图2中。

[0114] 恩替诺特(Entinostat)

[0115] 恩替诺特(SNDX-275;Syndax制药)是正在进行用于治疗乳腺癌、霍奇金淋巴瘤和NSCLC的临床试验的苯甲酰胺组蛋白脱乙酰酶抑制剂。

[0116] 恩替诺特的结构示于图2中。

[0117] PCI-24781

[0118] PCI-24781 (CRA-02478;Pharmacoclics公司) 正在进行用于治疗血液癌症和肉瘤的临床试验。

[0119] 其它HDAC的实例包括丙戊酸、曲古抑菌素A、制蚜菌素 (Apicidin)、LBH-589、CS-00028 (微芯生物科技公司Chipscreen Biosciences)、CHR-2504 (色度治疗公司Chroma Therapeutics)、FR-135313 (格洛斯特制药Gloucester Pharmaceuticals)、JNJ-16241199 (强生公司)、MGCD0103 (甲基基因公司Methylgene)、LAQ-824 (诺华)、LBH-589 (诺华)、CC1994 (辉瑞Pfizer)、MS 275 (先灵药业Schering) 和新戊酰氧基甲基丁酸酯 (泰坦制药Titan Pharmaceuticals)。

[0120] 许多HDAC抑制剂也描述于AU 2001/18768 B2、AU 2002/327627 B2、US 6897220、US 0039850、US 6541661、US 7288567、US 7253204、AU 2001/283925 B2、US 7282608、US 7250514、US 7169801、US 7154002、US 6495719、US 7057057、US 7214831、US 7191305、US 7126001、US 7205304、EP 12068086 B1、US 6511990、US 7244751、AU 2002/246053 B2、AU 25 2000/68416 B2、US 7091229、US 6638530、EP 1501508 B1、EP 1656348 B1、EP 1358168 B1、US 7067551、AU 2001/282129 B2、US 6552065、US 683384、EP 1301184 B1、EP 1318980 B1、US 6960685、US 6888027、EP 1335898 B1、US 7183298、US 7135493、US 6825317和US 6656905中。

[0121] 化疗剂的形式

[0122] 给定化学治疗剂的活性化合物可以以相应的盐,溶剂化物或前药的形式提供。在本说明书中,提及化学治疗剂包括提及这些形式。

[0123] 盐

[0124] 制备,纯化和/或处理活性化合物的相应盐例如药学上可接受的盐可以是方便或需要的。药学上可接受的盐的实例描述于Berge等人,1977,“药学上可接受的盐”J.Pharm.Sci.第66卷,第1-19页。

[0125] 例如,如果化合物是阴离子的,或具有可以是阴离子的官能团(例如,-COOH可以是-COO⁻),则可以与合适的阳离子形成盐。合适的无机阳离子的实例包括但不限于:碱金属离子例如Na⁺和K⁺,碱土金属阳离子例如Ca²⁺和Mg²⁺,以及其它阳离子例如Al³⁺。合适的有机阳离子的实例包括但不限于:铵离子(即NH₄⁺)和取代的铵离子(例如NH₃R⁺,NH₂R₂⁺,NH₃R₃⁺,NR₄⁺)。一些合适的取代铵离子的实例是衍生自乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨基丁三醇,以及氨基酸例如赖氨酸和精氨酸的那些。常见的季铵离子的实例是N(CH₃)₄⁺。

[0126] 如果化合物是阳离子的或具有可以是阳离子的官能团(例如,-NH₂可以是-NH₃⁺),则可以与合适的阴离子形成盐。合适的无机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下无机酸的那些:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸和磷。

[0127] 合适的有机阴离子的实例包括但不限于衍生自下列有机酸的那些:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、依地(edetic)酸、乙二磺酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖(gluccheptonic)酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基乙酸、羟基马来酸、羟基萘羧酸、羟乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘酸、油酸、草酸、棕榈酸、扑酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、对氨基苯磺

酸、酒石酸、甲苯磺酸和戊酸。合适的聚合有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下聚合酸的那些：鞣酸，羧甲基纤维素。

[0128] 除非另有说明，对特定化合物的提及还包括其盐形式。

[0129] 溶剂化物

[0130] 制备，纯化和/或处理活性化合物的相应溶剂化物可以是方便或需要的。术语“溶剂化物”在本文中以常规意义使用，是指溶质（例如活性化合物，活性化合物的盐）和溶剂的复合物。如果溶剂是水，则溶剂化物可以方便地称为水合物，例如一水合物、二水合物、三水合物等。

[0131] 除非另有说明，对特定化合物的提及还包括其溶剂合物形式。

[0132] 前药

[0133] 制备，纯化和/或处理前药形式的活性化合物可以是方便或需要的。本文所用的术语“前药”涉及当代谢（例如，在体内）时产生所需活性化合物的化合物。通常，前药是无活性的，或比活性化合物活性低，但可提供有利的处理，施用或代谢性质。

[0134] 除非另有说明，对特定化合物的提及还包括其前药。

[0135] 例如，一些前药是活性化合物的酯（例如，生理上可接受的代谢不稳定酯）。在代谢期间，酯基（ $-C(=O)OR$ ）被切割以产生活性药物。这样的酯可以通过例如母体化合物中的任何羧酸基团（ $-C(=O)OH$ ）酯化形成，在适当情况下，如果需要，预先保护母体化合物中存在的任何其它反应性基团，然后脱保护。

[0136] 这种代谢不稳定酯的实例包括式 $-C(=O)OR$ 的那些，其中R是： C_{1-7} 烷基（例如 $-Me$ ， $-Et$ ， $-nPr$ ， $-iPr$ ， $-nBu$ ， $-sBu$ ， $-tBu$ ）； C_{1-7} 氨基烷基（例如，氨基乙基；2-(N,N-二乙基氨基)乙基；2-(4-吗啉代)乙基）；和酰氧基 $-C_{1-7}$ 烷基（例如，酰氧基甲基；酰氧基乙基；新戊酰氧基甲基；乙酰氧基甲基；1-乙酰氧基乙基；1-(1-甲氧基-1-甲基)乙基羧氧基乙基；1-(苯甲酰氧基)乙基；异丙氧基羧氧基甲基；1-异丙氧基羧氧基乙基；环己基羧氧基甲基；1-环己基羧氧基乙基；环己氧基羧氧基甲基；1-环己氧基羧氧基乙基；(4-四氢吡喃氧基)羧氧基甲基；1-(4-四氢吡喃氧基)羧氧基乙基；(4-四氢吡喃基)羧氧基甲基；和1-(4-四氢吡喃基)羧氧基乙基)。

[0137] 此外，一些前药被酶促活化以产生活性化合物，或是在进一步化学反应后产生活性化合物（例如，如在ADEPT、GDEPT、LIDEPT等中）的化合物。例如，前药可以是糖衍生物或其他糖苷偶联物，或可以是氨基酸酯衍生物。

[0138] 同时或顺序施用

[0139] 组合物可以单独施用或与其它治疗剂组合施用，根据待治疗的病症同时或顺序施用。

[0140] 在本说明书中，溶瘤病毒和化疗剂可以同时或顺序施用。

[0141] 同时施用（给药）是指将溶瘤病毒和化疗剂一起施用，例如作为含有两种药剂的药物组合物，或彼此紧接着，并且任选地通过相同的施用途径，例如施用到相同的动脉，静脉或其他血管。

[0142] 顺序施用（给药）是指施用溶瘤病毒或化疗剂之一，在给定的时间间隔之后，通过单独施用另一种试剂。两种药剂不需要通过相同的途径施用，尽管在一些实施方案中是这种情况。时间间隔可以是任何时间间隔。

[0143] 虽然同时或顺序给药意在使溶瘤病毒和化疗剂两者递送至相同的肿瘤组织以实现治疗,但是两种药剂同时以活性形式存在于肿瘤组织中不是必要的。

[0144] 然而,在顺序给药的一些实施方案中,选择时间间隔,使得溶瘤性单纯疱疹病毒和化疗剂预期同时以活性形式存在于肿瘤组织中,从而允许两种药物治疗肿瘤的组合的、加和的或协同效应。在这样的实施方案中,所选择的时间间隔选自下组任一:5分钟或更短、10分钟或更短、15分钟或更短、20分钟或更短、25分钟或更短、30分钟或更短、45分钟或更短、60分钟或更短、90分钟或更短、120分钟或更短、180分钟或更短、240分钟或更短、300分钟或更短、360分钟或更短、或720分钟或更短、或1天或更短、或2天或更短。

[0145] 癌症

[0146] 癌症可以是任何不需要的细胞增殖(或通过不需要的细胞增殖表现出来的任何疾病)、赘生物或肿瘤,或增加的所述不需要的细胞增殖、赘生物或肿瘤的风险或倾向。癌症可以是良性或恶性的,并且可以是原发性或继发性(转移性)。赘生物或肿瘤可以是细胞的任何异常生长或增殖,并且可位于任何组织中。组织的实例包括肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳房、盲肠、中枢神经系统(包括或排除脑)、小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮)、胆囊、食管、胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结、淋巴母细胞、上颌骨、纵隔、肠系膜、子宫肌层、鼻咽、网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统、腹膜、胸膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞。

[0147] 待治疗的肿瘤可以是神经或非神经系统肿瘤。神经系统肿瘤可以起源于中枢或外周神经系统,例如,神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、纤维神经瘤、室管膜瘤、神经鞘瘤、神经纤维肉瘤、星形细胞瘤和少突神经胶质瘤。非神经系统癌症/肿瘤可以起源于任何其它非神经组织、例子包括黑素瘤、间皮瘤、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、慢性骨髓性白血病(CML)、急性骨髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、肝癌、表皮样癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、胸腺癌、NSCLC、血液癌和肉瘤。

[0148] 肿瘤可以是恶性外周神经鞘瘤(MPNST)、肉瘤、实体瘤、骨肉瘤或神经母细胞瘤。

[0149] 肿瘤可在儿童期出现,例如在年龄在18、16、14、12或10岁之一的受试者中。这样的肿瘤在本文中被描述为“小儿肿瘤”。

[0150] 受试者

[0151] 待治疗的受试者可以是任何动物或人。受试者优先是哺乳动物,更优选人。受试者可以是非人哺乳动物,但更优选是人。受试者可以是男性或女性。受试者可以是患者。受试者可能已被诊断患有癌症,或被怀疑患有癌症。

[0152] 受试者可以是儿童,例如,年龄在18岁、16岁、14岁、12岁或10岁之一。受试者可以是在儿童时发展其癌症的成人。

[0153] 其他化疗剂

[0154] 除了通过使用具有极光激酶抑制剂或组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂的溶瘤病毒治疗癌症之外,被治疗的受试者还可以接受用其他化疗剂的治疗。例如,其它化疗剂可以选自:

[0155] (i) 烷化剂,例如顺铂、卡铂、氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥(瘤可宁)、异环磷酰胺;

[0156] (ii) 嘌呤或嘧啶抗代谢物,例如咪唑硫嘌呤或巯基嘌呤;

[0157] (iii) 生物碱和萜类化合物,例如长春花生物碱(例如长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、长春地辛)、鬼臼毒素、依托泊苷、替尼泊苷、紫杉烷类如紫杉醇(Taxol™)、多西紫杉醇;

[0158] (iv) 拓扑异构酶抑制剂,例如I型拓扑异构酶抑制剂喜树碱、伊立替康和拓扑替康,或II型拓扑异构酶抑制剂安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷;

[0159] (v) 抗肿瘤抗生素(例如蒽环类抗生素),例如更生霉素、阿霉素(Adriamycin™)、表阿霉素、博来霉素、雷帕霉素;

[0160] (vi) 基于抗体的药剂,例如抗VEGF、抗-TNF α 、抗-IL-2、抗-Gp11b/IIIa、抗-CD-52、抗-CD20、抗-RSV、抗HER2/neu(erbB2)、抗-TNF受体、抗-EGFR抗体、单克隆抗体或抗体片段,实例包括:西妥昔单抗、帕尼单抗、英夫利昔单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗(Avastin®)、阿昔单抗、达利珠单抗、吉妥珠单抗、阿仑单抗、利妥昔单抗(Mabthera®)、帕利珠单抗、曲妥珠单抗、依那西普、阿达木单抗、尼妥珠单抗;

[0161] (vii) EGFR抑制剂,例如厄洛替尼、西妥昔单抗和吉非替尼;

[0162] (viii) 抗血管生成剂,例如贝伐单抗(Avastin®)。

[0163] 给药途径

[0164] 根据本发明方面的病毒,化疗剂,药物和药物组合物可以配制用于通过多种途径给药,包括但不限于:肠胃外、静脉内、动脉内、肌内、瘤内和口服。病毒、化疗剂、药物和组合物可以配制成流体或固体形式。流体制剂可以配制用于通过注射施用到人或动物体的选定区域。

[0165] 剂量方案

[0166] 可以提供多剂量的溶瘤病毒。一种或多种或每种剂量可以伴随同时或顺序施用化疗剂。

[0167] 多剂量可以以预定的时间间隔分开,其可以选择为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天,或1、2、3、4、5或6个月之一。

[0168] 作为实例,可以每7、14、21或28天(加或减3、2或1天)给予剂量。在每个给药点给予的溶瘤病毒的剂量可以相同,但这不是必需的。例如,在第一,第二和/或第三给药点给予更高的先导剂量可能是合适的。

[0169] 试剂盒

[0170] 在本发明的一些方面,提供了部件的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒可以具有至少一个具有预定量的溶瘤病毒的容器,例如,预定的病毒剂量或病毒颗粒的数/量/浓度。溶瘤病毒可以配制成以便适于注射或输注到肿瘤或血液。在一些实施方案中,试剂盒可以进一步包含具有预定量的化疗剂的至少一个容器。化疗剂也可以配制成以便适于注射或输注到肿瘤或血液,或者可以配制成用于口服给药。在一些实施方案中,提供了具有预定量的溶瘤病毒和预定量的化疗剂的混合物的容器,其可以任选地配制成以便适于注射或输注到肿瘤或血液。

[0171] 在一些实施方案中,试剂盒还可以包含适于施用一种或多种剂量的溶瘤病毒和/或化疗剂的装置。这样的装置可以包括一个或多个导管和/或针和/或注射器,这样的装置优选地以无菌形式提供。

[0172] 试剂盒可以进一步包括用于施用治疗有效剂量的溶瘤病毒和/或化疗剂的说明书。

[0173] 本发明包括所描述的方面和优选特征的组合,除非这样的组合是明显不允许或明确避免的。

[0174] 本文所用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0175] 现在将参考附图通过示例来说明本发明的方面和实施方式。其它方面和实施方式对于本领域技术人员将是显而易见的。本文中提及的所有文件通过引用并入本文。

附图说明

[0176] 现在将参考附图来讨论说明本发明的原理的实施例和实验,其中:

[0177] 图1显示了所选择的极光激酶抑制剂。

[0178] 图2显示了所选择的HDAC抑制剂。

[0179] 图3显示了在S462TY细胞中,HSV1716与MLN8237组合的MTS细胞存活的图表。0V=无病毒,0D=无药物,1V=moi 0.045,2V=moi 0.45,1D=30nM MLN8237,2D=50nM MLN8237,3D=70nM MLN8237 [右侧从上到下所示的组合对应于从左到右读取的图柱]。

[0180] 图4显示了HSV1716与MLN8237组合的图3数据的FaCI图。

[0181] 图5a和5b。(a)显示了单独的iTu HSV1716,单独的MLN8237 (Alisertib) 或其组合在S462TY侧翼异种移植物中的肿瘤生长抑制的图。治疗方案和剂量显示在在图的底部。(b)显示了单独的IV HSV1716,单独的MLN8237 (Alisertib) 或其组合在S462TY侧翼异种移植物中肿瘤生长抑制的图。治疗方案和剂量显示在图的底部。

[0182] 图6显示了MLN8237 (Alisertib) 在具有S462TY异种移植物的鼠中增强ITu HSV1716治疗。用MLN8237和oHSV (n=10) 处理携带S462TY异种移植肿瘤的小鼠。通过在42天的第0天口腔喂食和/或在第7天单次注射HSV1716 (1×10^7 pfu) 或PBS (组合的p值=0.0194, 如通过对数秩和 (Mantel-Cox) 检验确定的), 给动物每天2次 (每周5天) 施用MLN8237 (20mg/kg) 或载体 (vehicle)。

[0183] 图7显示了MLN8237 (Alisertib) 在具有S462TY异种移植物的鼠中增强IVHSV1716治疗。用MLN8237和oHSV (n=10) 处理携带S462TY异种移植肿瘤的小鼠。通过在42天的第0天口腔喂食和/或在第7天单次注射HSV1716 (9×10^7 pfu) 或PBS (组合的p值=0.0033, 如通过对数秩和 (Mantel-Cox) 检验确定的), 给动物每天2次 (每周5天) 施用MLN8237 (20mg/kg) 或载体 (vehicle)。

[0184] 图8显示了具有S462TY异种移植物的四组裸鼠中的每一组的治疗方案的示意图。

[0185] 图9显示了单独的HSV1716、单独的MLN8237或其组合在S462TY侧翼异种移植物中直至第28天的肿瘤生长抑制。根据图8中的循环模式用分别由方框或箭头所示的MLN8237和HSV1716施用/给药处理小鼠组。

[0186] 图10显示了单独的HSV1716、单独的MLN8237 (Alisertib) 或其组合在S462TY侧翼异种移植物中对个体小鼠的肿瘤生长抑制。根据图8中的循环模式用所示的MLN8237和HSV1716施用处理小鼠组。

[0187] 图11显示了在S462TY侧翼异种移植物中治疗的第28天,HSV1716和MLN8237的组合与单独的HSV1716相比,显著的肿瘤生长抑制。

[0188] 图12显示了MLN8237 (Alisertib) 在具有S462TY异种移植物的老鼠中增强ITu HSV1716治疗的图。对照老鼠或在S462TY侧翼异种移植物中用单独的HSV1716, 单独的MLN8237或其组合处理的老鼠的存活。根据通过对数秩和 (Mantel-Cox) 检验确定的p值说明的循环模式处理老鼠组。

[0189] 图13显示了具有SK-N-AS异种移植物的四组裸鼠的每一组的治疗方案的示意图。

[0190] 图14显示了单独的HSV1716、单独的MLN8237 (Alisertib) 或其组合在SK-N-AS侧翼异种移植物中的肿瘤生长抑制。根据图13中的方案用所示的MLN8237和HSV1716施用处理老鼠组。

[0191] 图15a至15d显示了在个体对照老鼠 (a), 或单独用HSV1716 (b), 单独用MLN8237 (Alisertib) (c), 或其组合 (d) 在SK-N-AS侧翼异种移植物中处理的老鼠中肿瘤生长图。

[0192] 图16显示了在SK-N-AS侧翼异种移植物中治疗的第21天, 单独HSV1716或MLN8237与对照老鼠, 以及HSV1716和MLN8237的组合与单独的HSV1716或MLN8237相比, 显著地肿瘤生长抑制。

[0193] 图17显示了MLN8237增强具有SK-N-AS异种移植物的老鼠中的ITu HSV1716治疗。对照老鼠、用单独的HSV1716, 单独的MLN8237或其组合在SK-N-AS侧翼异种移植物中处理的老鼠的存活率。根据图13中的模式、具有通过对数秩和 (Mantel-Cox) 检验确定的p值处理老鼠组。

[0194] 图18显示了对照和具有S462TY异种移植物的MLN8237-处理老鼠中ITu注射 1×10^7 pfu HSV1716之后2和48小时的HSV1716滴度。

[0195] 图19显示了在ITu注射 1×10^7 pfu HSV1716 3天以后, 从S462TY异种移植物提取的细胞的FACS分析的结果以鉴定CD45.2+和CD11b+白细胞、嗜中性粒细胞 (Neu)、天然杀伤细胞 (NK)、肿瘤相关的巨噬细胞 (TAM)、骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 和B细。用PBS, MLN8237 (MLN) 或单独的ITu HSV1716或HSV1716与MLN8237组合 (MLN+HSV 716) 处理老鼠。

[0196] 图20显示了在S462TY细胞感染后30分钟, MLN8237 (Alisertib) 显著增加细胞内HSV716基因组。

[0197] 发明详述

[0198] 本发明的一个或多个实施例的细节在下面伴随的描述中阐述, 包括发明人为了实现本发明而设想的最佳模式的具体细节, 作为示例。对本领域技术人员显而易见的是, 本发明可以在不限于这些具体细节的情况下实施。

[0199] 极光激酶抑制剂和HDAC抑制剂被报道可阻止肿瘤生长。我们认识到, 通过减弱肿瘤生长, 溶瘤病毒有更好的机会可裂解肿瘤细胞并成功地破坏肿瘤。

[0200] 实施例

[0201] 实施例1

[0202] 目的: 使用MTS细胞活力测定评价使用溶瘤性单纯疱疹病毒 (oHSV) 和化疗的新型组合疗法对人肿瘤细胞系的治疗效果。

[0203] 方法

[0204] 细胞系

[0205] 人肿瘤细胞系在完全培养基 (补充有10%胎牛血清 (FBS) 的杜尔伯科改良伊格尔培养基 - (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)) 中生长和培养, 并在37°C和5%CO₂

下孵育。

[0206] MTS细胞活力测定

[0207] 使用血细胞计数器对细胞计数,并以在50 μ L完全培养基中500个细胞/孔的浓度加入到的96孔板中。在24小时温育后,用单一试剂病毒、小分子信号转导抑制剂或其组合处理细胞。

[0208] 病毒研究

[0209] 在一定范围感染复数(MOI)(0.001、0.01、0.10、1.0)的细胞系中进行单试剂病毒MTS测定。用HSV1716感染细胞,并在感染后第0、1、2、4和6天读数。向每个孔中加入20 μ L的MTS染料,随后在加入25 μ L的十二烷基硫酸钠(SDS)之前温育4小时,从而完成病毒MTS测定。每个板通过96孔板分光光度计在490nm的波长下读数。

[0210] MTS组合研究

[0211] 在单个时间点(感染后第4天),使用HSV1716在肿瘤细胞系中进行病毒组合研究。化疗剂与病毒组合按在先前实验中作为单个试剂所确定的造成细胞存活力25%,50%和75%降低的抑制浓度(IC)加入。分析数据并通过Chou-Talalay分析确定协同效应。MTS测定和Chou-Talalay分析是本领域熟知的技术。

[0212] 结果

[0213] HSV1716作为单一疗法和与极光激酶抑制剂和/或HDAC抑制剂的组合降低了体外肿瘤细胞生长的存活。

[0214] 实施例2-在恶性外周神经鞘瘤(MPNST)和神经母细胞瘤细胞系中用HSV1716和极光激酶A抑制剂MLN8237进行的体外和体内组合研究。

[0215] MLN8237 (Alisertib)

[0216] MLN8237(武田/千禧制药-Takeda/Millennium)是第二代极光激酶A抑制剂。它在生物化学测定中抑制极光激酶A的IC₅₀为1nM,在细胞测定中对极光激酶A的选择性比极光激酶B高200倍。受体和离子通道的广泛筛选没有显示显著的交叉反应性。该化合物阻止多种肿瘤细胞系的生长,具有低至16nM的GI₅₀值。生长抑制与有丝分裂纺锤体异常、细胞在有丝分裂、多倍体和细胞凋亡中的积累相关。它可口服并且快速吸收。在有效剂量下,观察到组蛋白H3磷酸化的瞬时抑制(与极光激酶B抑制主导是一致的),随后是组蛋白H3磷酸化的显著升高(与极光激酶A抑制主导是一致的)。已经用20mg/kg的口服剂量每天两次给药连续21天在多种异种移植物中实现最大体内功效,虽然其它方案也是有效的(Dar等人,极光激酶抑制剂-癌症治疗中的新星?-Aurora Kinase Inhibitors-Rising Stars in Cancer Therapeutics?分子肿瘤治疗(Mol Cancer Ther.) (2010)9;268.)。

[0217] 恶性外周神经鞘瘤

[0218] 恶性外周神经鞘瘤(MPNST)是源自外周神经或来自细胞(例如与神经鞘相关的雪旺细胞、周围神经细胞或成纤维细胞)的肉瘤。诊断和分类可能很困难。一般来说,由周围神经或神经纤维瘤引起的肉瘤被认为是MPNST。术语MPNST替代了许多以前使用的名称,包括恶性神经鞘瘤、神经纤维肉瘤和神经源性肉瘤。MPNST占有软组织肉瘤的约5-10%,自发发生或与神经纤维瘤病-1(NF1)相关。

[0219] 对于MPNST的局部复发和远处转移,手术切除提供了最好的预后。放射治疗是大多数软组织肉瘤中局部疾病控制的一个组成部分。与广泛的手术切除一起,放射治疗提供局

部和总体生存率,类似于截肢术后的那些。用辅助放射疗法治疗软组织肉瘤已经引起局部疾病复发率的在统计学上的显著降低,但是没有明显降低远处转移率或总生存率(Vraa等人,(1998)软组织肉瘤预后因素:Aarhus经验。欧洲癌症杂志(Eur J Cancer),34((12)):1876-82,,Yang等人,(1998)辅助放射治疗在肢体软组织肉瘤治疗中的益处-随机前瞻性研究-Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity.J Clin Oncol,16((1)):197-203)。

[0220] MPNSTs的总生存率较差,用于软组织肉瘤的常规化疗没有改善结果(Pervaiz等人,(2008)对于局部可切除的软组织肉瘤辅助化疗的随机对照试验系统性荟萃分析-A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma.癌症(Cancer),113(3):573-581)。MPNST的稀少意味着缺乏关于化疗敏感性的一致数据;在MPNST中没有进行特别的II期或III期试验。

[0221] 儿童期软组织肉瘤

[0222] 软组织肉瘤是小于20岁儿童的常见实体瘤,次于脑肿瘤、淋巴瘤和癌(主要是甲状腺和黑素瘤)。如在成人患者中一样,儿科患者经历多种肉瘤。儿童中最常见的软组织肉瘤是横纹肌肉瘤。在过去几十年中,联合使用化疗、手术和照射的进展显著改善了局部软组织肉瘤患者的生存率,从<25%至近70% [Pappo等人.(1995).儿科横纹肌肉瘤的生物学和治疗-Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma.临床肿瘤学杂志(Journal of Clinical Oncology)13:2123-2139.]。然而,在治疗横纹肌肉瘤患者中仍然存在许多挑战。转移性疾病是不良预后的主要预测指标,并没有受到联合治疗的显著影响。

[0223] 骨肉瘤是青少年中第三个最常见的癌症,发生的频率仅低于淋巴瘤和脑肿瘤 [Ries等人.(1999).儿童和青少年的癌症发病率和生存率:美国SEER计划1975-1995-Cancer incidence and survival among children and adolescents:United States SEER Program 1975-1995,国家癌症研究所,SEER计划.NIH公开号.99-4649.贝塞斯达(Bethesda),马里兰州(MD).]。儿童和年轻成年人中最常见的两种类型是骨肉瘤和尤文肉瘤。两种类型的治疗的主要手段是手术,并且保肢操作通常可以用于保持功能。然而,这些操作在恢复和最终功能方面可能具有显著的发病率。还需要化疗来治疗微转移疾病,其存在着,但在大多数诊断患者中不可检测。放射治疗也用作尤文肉瘤的重要治疗。放射治疗对于骨肉瘤患者本质上不是一种选项,因为它们均耐辐射。对于两种肿瘤类型,用于局部疾病的联合治疗治愈率在60-70%的范围内 [Ries等人.(1999).儿童和青少年的癌症发病率和生存率:美国SEER计划1975-1995,国家癌症研究所,SEER计划.NIH公开号.99-4649.贝塞斯达(Bethesda),马里兰州(MD).]。然而,存在转移或多灶性疾病的患者具有非常差的预后,长期生存率<30%。

[0224] 神经母细胞瘤(Nb)是<10岁儿童中最常见的颅外实体瘤。诊断的中位年龄为17.3个月,其中40%的诊断患者为婴儿,90%的年龄小于5岁,97.8%到10岁 [Olshan,A.,和Bunin,G.(2000).神经母细胞瘤流行病学-Epidemiology of Neuroblastoma.在神经母细胞瘤Neuroblastoma(G.Brodeur,T.Sawada,Y.Tsuchida和P.Voute,Eds.),33-39页.爱思唯尔科技-Elsevier Science,阿姆斯特丹-Amsterdam,Brodeur,G.,和Maris,J.(2001).神经

母细胞瘤.在儿科肿瘤学的原则和实践-Principles and Practice of Pediatric Oncology (P.Pizzo和D.Poplack,Eds.),896-937页.Lippincott Williams&Wilkins,费城.].不幸的是,高危神经母细胞瘤患者的长期生存率非常差。表征不良预后的危险因素包括年龄超过一年、疾病的更高阶段、MYCN扩增和不利的组织学。令人鼓舞的是,通过使用高剂量化疗自体干细胞拯救和视黄酸,高危神经母细胞瘤的患者的生存得到改善 [Matthay等人.(1999).使用强化化疗、放射治疗、自体骨髓移植和13-顺-视黄酸治疗高危神经母细胞瘤-Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation and 13-cis-retinoic acid. 儿童癌症小组-Children's Cancer Group.新英格兰医学杂志-New England Journal of Medicine 341:1165-1173.]。然而,生存率保持<50%,特别是如果肿瘤具有MYCN扩增,其与早期进展相关 [Seeger等人(1985).N-myc癌基因的多拷贝与神经母细胞瘤快速进展的关联-Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas.新英格兰医学杂志-New England Journal of Medicine 313:1111-1116.]。

[0225] 使用以手术、化疗和放射的联合方法已导致上述所有肿瘤的患者生存率提高到不同程度。然而,这些方式的最大效益水平已基本实现。

[0226] A:HSV1716与极光激酶抑制剂MLN8237在恶性外周神经鞘瘤肿瘤细胞系S462TY和神经母细胞瘤细胞系SK-N-AS中的组合。

[0227] 体外组合-Chou/Talalay分析。

[0228] 在恶性外周神经鞘瘤 (MPNST) 细胞系S462TY中评估HSV1716与MLN8237的组合。使用MTS细胞存活分析,测定在0、30、50或70nM MLN8237与HSV1716组合在0、0.045或0.45感染复数 (moi) 下的毒性,并通过Chou/Talalay方法分析结果的协同相互作用。MTS细胞存活谱显示于图3中,并且从该数据的Chou/Talalay分析得到的FaCI图如图4所示。HSV1716与MLN8237组合协同地增强了细胞的杀伤作用,即5/6组合产生CI<1 (表2)。

[0229] 表2来自Chou/Talalay分析的HSV1716与MLN8237组合的Fa和CI值。

[0230]

MLN8237剂量 (nM)	HSV1716MOI	Fa	CI
30	0.045	0.544767	1.054598
50	0.045	0.734438	0.780505
70	0.045	0.779835	0.882132
30	0.45	0.895564	0.654121
50	0.45	0.934083	0.519477
70	0.45	0.945432	0.548158

[0231] HSV1716和MLN8237的体内组合

[0232] a) HSV1716和MLN8237在S462TY裸小鼠异种移植模型中

[0233] S462TY细胞系容易在裸鼠中形成侧部异种植物,并且进行6组别 (6-arm) 体内功效研究 (n=10/组),用于单次静脉内或肿瘤内注射HSV1716并联合MLN8237口服给药。取20mg/kg的MLN8237或其运载体通过口服管饲法每天两次施用,每周5天,从第0天开始至42天。在第7天实施单瘤 (ITu) 注射 1.0×10^7 pfu HSV1716或PBS或单次静脉内 (IV) 注射

9.0x10⁷pfu HSV1716或PBS,并监测肿瘤生长和生存(情况)。

[0234] 六组小鼠为:

[0235] • 对照(载体+ITu PBS)

[0236] • MLN8237 (+ITu PBS)

[0237] • HSV1716 (ITu)+载体

[0238] • HSV1716 (IV)+载体

[0239] • HSV1716 (ITu)+MLN8237

[0240] • HSV1716 (IV)+MLN8237

[0241] 与对照处理的小鼠(载体+ITu PBS)相比,单一肿瘤内剂量的HSV1716(图5a)减少了裸鼠中S462TY异种移植物的生长,尽管单一IV剂量的HSV1716对肿瘤生长没有影响(图5b)。每天两次给予MLN8237最初有效地防止了异种移植物的生长,但是从第30天起观察到肿瘤的生长,并且当在第42天停止MLN8237处理时有所增加(图5aa和b)。单剂量HSV1716通过ITu(图5a)或IV(图5b)与每日两次剂量的MLN8237的组合在预防肿瘤生长直到第50天是高度有效的,其后有一些肿瘤生长的证据。对于可评估的小鼠,ITu HSV1716+MLN8237组合的“临床”结果是1例疾病进展,4例部分缓解和3例完全缓解(表3)。

[0242] 单剂量IV HSV1716与MLN8237的组合效果特别引人注目,因为单独的IVHSV1716未显示肿瘤生长抑制(图5b)。对于可评估的小鼠,IVHSV1716+MLN8237的组合的“临床”结果是2例疾病进展,2例疾病稳定和3例部分缓解(表3)。

[0243] 表3. 在S462TY侧部异种移植物中单独用ITu HSV1716、单独用IVHSV1716、单独用MLN8237或其组合治疗可评估小鼠的临床反应性。疾病进展(PD),疾病稳定(SD),部分缓解(PR)和完全缓解(CR)是在第53天(最后一次治疗后11天)观察到的反应。SD→PD和PR→PD包括了在42天治疗周期期间观察至少21天的最佳反应性以及在第53天观察到最后的反应性。

[0244]

	PD	SD→PD	SD	PR→PD	PR	CR
载体+ITu PBS	9	0	0	0	0	1
MLN8237+ITu PBS	4	6	0	0	0	0
载体+ITu HSV	2	3	0	2	1	1
载体+IV HSV	9	0	0	0	0	0
MLN8237+ITu HSV	0	1	0	0	4	3
MLN8237+IV HSV	0	2	2	0	3	0

[0245] 与载体/PBS处理的对照相比,HSV 1716的单次ITu注射或MLN8237的每日两次给药改善了存活(情况),但是该组合对存活(情况)具有显著且非常重要的改善(图6)。在第60天处死大多数对照或单一治疗的小鼠,此时大多数组合治疗的小鼠仍然存活并且此后持续(存活)。与对照处理的小鼠相比,HSV1716的单次IV给药没有改善存活(情况),但同样单次IV HSV1716与MLN8237的组合对存活具有显著且非常重要的改善(图7)。在第50天处死大多数接受IV HSV1716的小鼠,大多数接受每日两次剂量的MLN8237的那些小鼠在第60天被处死,此时大多数组合处理的小鼠仍然存活。因此,HSV1716与MLN8237的组合在裸鼠MPNST异种移植模型中是高度有效的,具有有效的肿瘤生长抑制和显著延长的存活(情况)。

[0246] B: 使用多个周期的较低剂量MLN8237加上HSV1716的S462TY裸小鼠异种移植模型

中的HSV1716和MLN8237。

[0247] 在裸鼠中形成S462TY异种移植物,并对口服给予MLN8237联合HSV1716瘤内注射进行4组别的体内功效研究($n=10$ /组)。按 $10\text{mg}/\text{kg}$,将MLN8237或其运载体通过口服管饲法在5个不同的时机施用5天,每天一次,之间伴随两天的非治疗间隔,其间施用 1×10^7 pfu HSV1716或PBS的单次瘤内(ITu)注射。用于4组中的每一组的方案如图8所示,并且在整个实验中监测肿瘤生长和存活情况。

[0248] 与对照处理的小鼠(载体+ITu PBS)相比,每周间隔的多次肿瘤内HSV1716的给药减少了裸鼠中S462TY异种移植物的生长(图9)。5天多次、其间具有2天非治疗间隔的 $10\text{mg}/\text{kg}$ MLN8237每日施用,也减少了S462TY异种移植物的生长,尽管从第12天开始,在仅MLN8237和HSV1716两组中观察到肿瘤生长(图9)。多次ITu给予HSV1716和每天单剂给予 $10\text{mg}/\text{kg}$ MLN8237(5天多次)的组合在预防肿瘤生长方面高度有效,如对于个体小鼠所示(图10),在第28天四组之间的比较表明组合治疗高度显著地减少了肿瘤生长(图11)。与载体/PBS处理的对照和仅用单一试剂处理的组相比,HSV1716与MLN8237的多剂量组合显著改善了存活(情况)(图12)。在第30天处死大多数对照或单一治疗小鼠,此时大多数组合治疗的小鼠仍然存活并且此后持续(存活)。因此,HSV1716与MLN8237的组合在裸鼠MPNST异种移植模型中是高度有效的,具有有效的肿瘤生长抑制和显著延长的存活(情况)。

[0249] b) SK-N-AS裸鼠异种移植模型中的HSV1716和MLN8237

[0250] SK-N-AS细胞衍生自位于儿童脑部的骨髓转移性低分化胚胎神经母细胞瘤,并且细胞系容易在裸鼠中形成侧部异种移植物。进行4组别体内功效研究($n=10$ /组),用于HSV1716的瘤内注射与口服给药的MLN8237的组合。将 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的MLN8237或其载体通过口服管饲法在5个不同的时机施用5天,每天一次,之间伴随两天的非治疗间隔,其间施用 1×10^7 pfu HSV1716或PBS的瘤内(ITu)注射。用于4组中的每一组的方案如图13所示,并且在整个实验中监测肿瘤生长和存活情况。

[0251] 与对照处理的小鼠(载体+ITu PBS)相比,每周间隔的5次肿瘤内HSV1716给药减少了裸鼠中SK-N-AS异种移植物的生长(图14)。在5个不同的时机(其间具有两天的非治疗间隔)施用5天、每天一次的 $10\text{mg}/\text{kg}$ MLN8237,也减少了SK-N-AS异种移植物的生长,尽管从第10天开始,在仅采用MLN8237和HSV1716的6两组中观察到了肿瘤生长(图14)。经ITu多剂给予HSV1716与每天单剂、给予5天的 $10\text{mg}/\text{kg}$ MLN8237的组合在预防肿瘤生长方面是高度有效的(图14),并且存在肿瘤消退的迹象。通过比较对照组(图15a)和用iTu HSV1716(图15b)、MLN8237(图15c)、或其组合(图15d)处理后的个体小鼠中对肿瘤生长的影响,清楚地观察到HSV1716与MLN8237组合的这种高效的肿瘤生长抑制。在第21天的四组之间的比较表明与单独的任一试剂相比,单独HSV1716和MLN8237二者和其组合治疗高度显著地减少了肿瘤的生长(图16)。

[0252] 与载体/PBS处理的对照和仅用单一试剂处理的组相比,HSV1716与MLN8237的组合显著改善了存活情况(图17)。大多数对照小鼠在第14天被处死,与组合处理的小鼠在36天100%(存活)的情况相比,在第25天,大约50%单独接受HSV1716或MLN8237的小鼠仍然存活,该实验仍在进行。对于治疗小鼠的当前“临床”评价是2例疾病进展,4例疾病稳定,2例部分缓解和2例完全缓解。因此,HSV1716与MLN8237的组合在裸鼠神经母细胞瘤SK-N-AS异种移植模型中是高度有效的,具有有效的肿瘤生长抑制和消退以及治愈。

[0253] c) 作用机制研究。

[0254] 在一系列实验中研究了MLN8237/HSV1716组合的有效增强功效的作用机制。如通过使用Ki67染色的免疫组织化学所示(数据未显示),与单独的任一试剂相比,所述组合诱导肿瘤细胞的大量坏死。

[0255] 设计了系列实验以明确两种试剂组合优异功效的潜在机制如下:

[0256] 1. MLN8237诱导的肿瘤停滞允许HSV1716更有效地繁殖,使得肿瘤不再比病毒扩散生长地更快

[0257] 2. MLN8237+HSV1716改变了细胞死亡的机制

[0258] 3. MLN8237导致衰老诱导的分泌表型,导致吞噬死亡细胞的巨噬细胞的募集增加

[0259] 4. MLN8237调节HSV1716诱导的先天性免疫细胞浸润

[0260] 5. MLN8237增加病毒易感性、允许性和/或持久性

[0261] 1) 初始实验表明MLN8237不增加HSV1716的复制。MLN8237处理或对照、未处理的S462TY异种移植小鼠接受了ITu HSV1716,并在病毒施用后2和48小时移除了肿瘤,并进行了滴度(测定)(图18)。在48小时时,与未处理的对照肿瘤相比,经MLN8237处理的病毒滴度没有明显增加。有趣的是,在经MLN8237处理的肿瘤中在2小时检测到较少的游离输入性病毒。

[0262] 2) 来自对照、未处理和经HSV1716、经MLN8237和经HSV1716/MLN8237处理小鼠的S462TY异种移植物中裂解的半胱天冬酶3的免疫组织化学表明,与单独的HSV1716或MLN8237处理相比,通过组合处理的没有细胞凋亡水平的明显变化。在HSV1716给药后24小时、72小时或1周制备切片。

[0263] 3) 已经显示MLN8237在黑素瘤中诱导NF- κ B介导的衰老相关分泌表型(Liu等人,2013,EMBO Mol Med 5:149),并且潜在地,与HSV1716组合,吞噬死亡和垂死细胞的浸润吞噬巨噬细胞数量增加。使用衰老相关的 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal或SABG)的底物X-gal检测衰老。然而,在用X-gal孵育后,在S462TY异种移植物中MLN8237诱导衰老的证据很少,仅有1/18切片染色(未示出),并且组合处理小鼠的异种移植物中,未显示出活化巨噬细胞(IBa1+)浸润的明显增加。

[0264] 4) 对从S462TY异种移植物提取的细胞进行FACS分析,以鉴定单用HSV1716、单用MLN8237或HSV1716和MLN8237的组合治疗后的固有免疫细胞浸润。在ITu注射 1×10^7 pfu HSV1716 3天以后提取细胞并进行FACS分析以鉴定CD45.2+和CD11b+白细胞、中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、髓源抑制性细胞(MDSC)和B细胞(图19)。单用HSV1716引起CD45.2+和CD11b+白细胞、中性粒细胞和MDSC的浸润增加,但是HSV1716与MLN8237的组合在这些或任何其它先天免疫细胞的募集中不引起任何显著变化。

[0265] 5) 用抗HSV抗血清的免疫组织化学表明MLN8237极大地增强了HSV1716的初始摄取/感染率。来自用HSV1716+载体或HSV1716+MLN8237处理小鼠的S462TY异种移植物切片表明在初始24小时时间点,病毒基因表达具有巨大差异。在仅用载体预处理的小鼠中ITu注射 1×10^7 pfu HSV1716后24小时仅有几个HSV1716蛋白生产的小灶,而在用MLN8237预处理小鼠时,至少50%的细胞在ITu注射后24小时表达病毒抗原。这在早期极大增强的感染摄取/速率导致在72小时时大大改善了扩散和增殖,导致肿瘤细胞死亡率高得多,并因此通过组合增强肿瘤生长控制。

[0266] 通过对病毒基因组的定量PCR评估,MLN8237在体外通过S462TY细胞改善了HSV1716的摄取。用HSV1716感染S462TY细胞,30分钟后用酸洗涤以除去没有侵入细胞内的残留游离病毒。使用GAPDH拷贝数对HSV基因组的Q-PCR进行标准化,并且表明在MLN8237存在下,摄取/感染率明显更高(图20)。

[0267] 有趣的是,这可以解释图18中呈现的结果,其显示在MLN8237处理的小鼠中ITu注射HSV1716后2小时检测到游离病毒明显更少。然而,在相同的实验中,可滴定的HSV1716的水平与+/-MLN8237相似,并且可能MLN8237促进了细胞-细胞扩散(未通过滴定检测)而不是裂解释放。

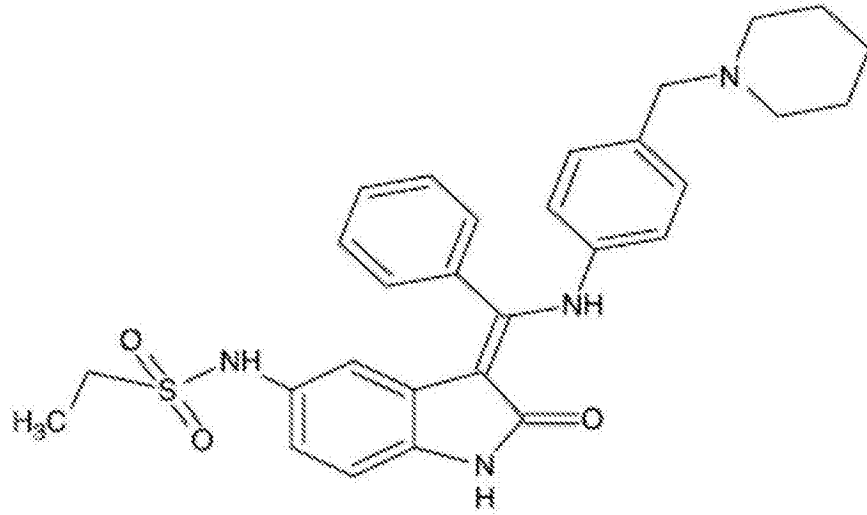
[0268] 结论

[0269] HSV1716和MLN8237在MPNST细胞系S462TY中协同组合

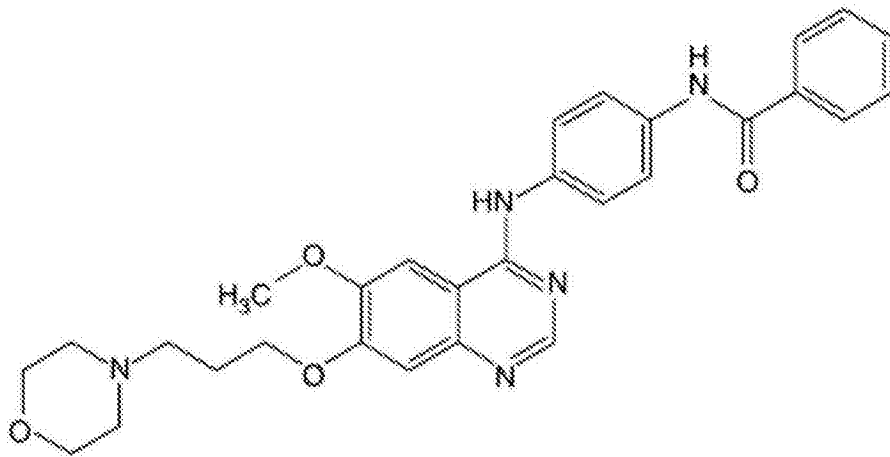
[0270] HSV1716与MLN8237的组合在裸鼠MPNST异种移植模型中是高度有效的,具有有效的肿瘤生长抑制和显著的存活延长。

[0271] 作用机制研究表明,MLN8237改善了HSV1716的初始摄取/感染率

[0272] HSV1716与MLN8237的组合在裸鼠神经母细胞瘤异种移植模型中是高度有效的,具有有效的肿瘤生长抑制、肿瘤消退和治愈作用。

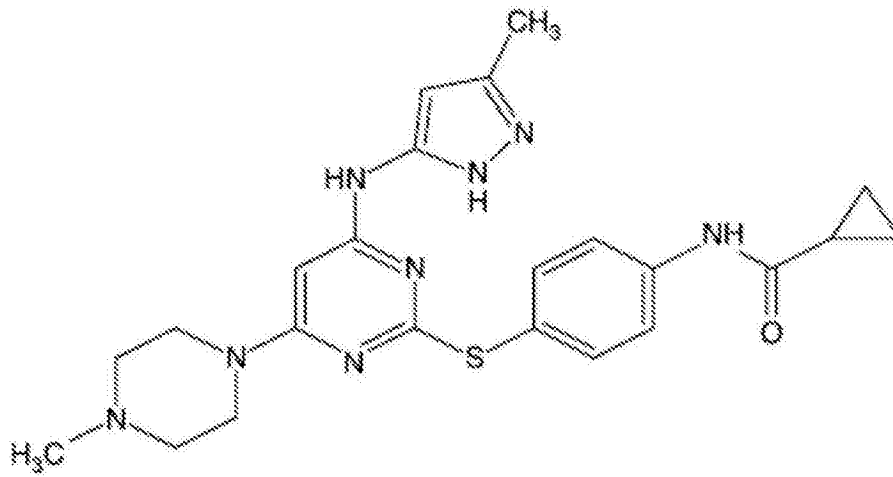


橙皮素(Hesperadin)

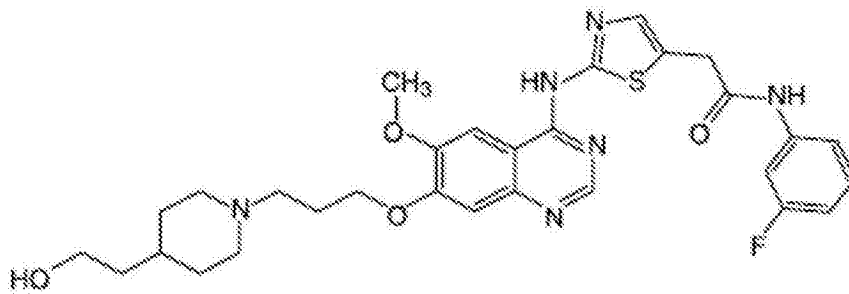


ZM447439

图1

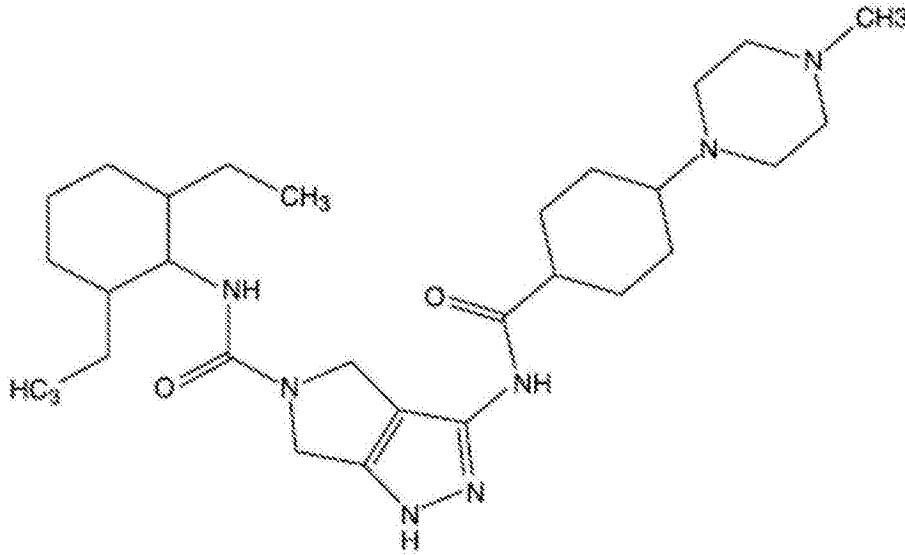


MK0457 (VX-690)

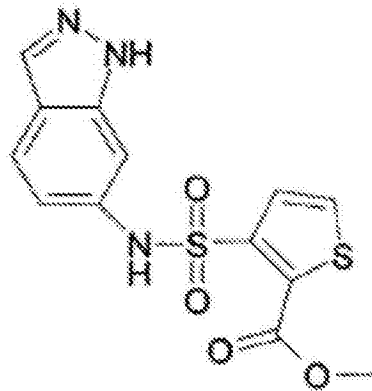


AZD1152

图1 (续)

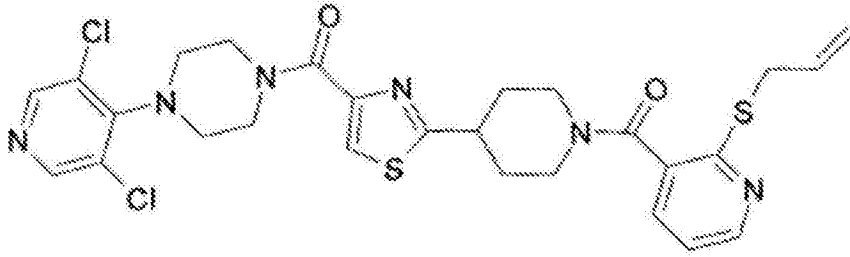


PHA-680632

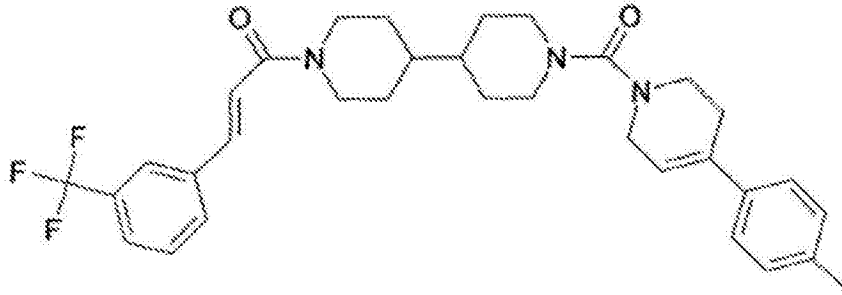


化合物 VII, 描述于 W02007/113005

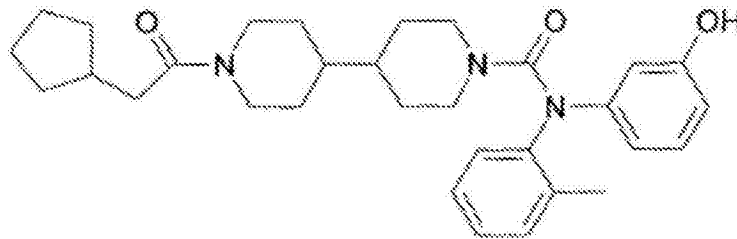
图1(续)



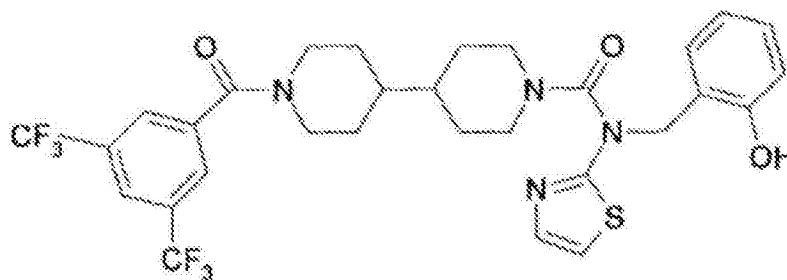
化合物 IV, 描述于 W02007/115805



化合物 VII, 描述于 W02007/115805

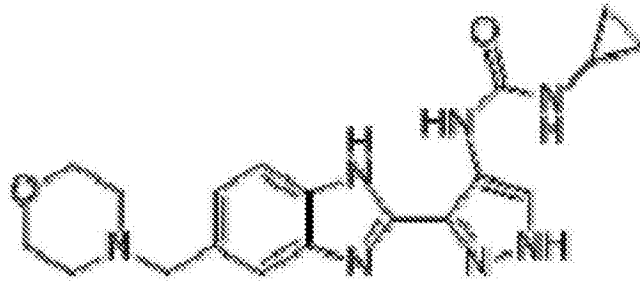


化合物 VIII, 描述于 W02007/115805

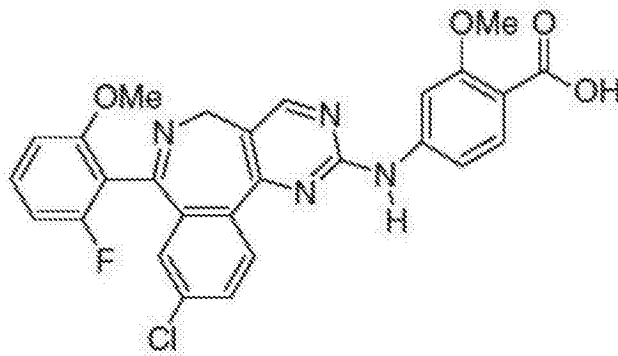


化合物 IX, 描述于 W02007/115805

图1(续)

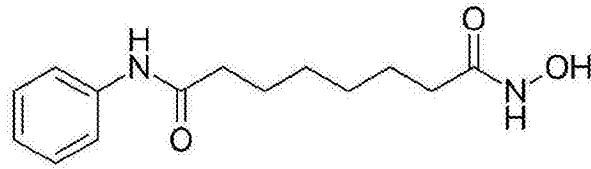


AT9283

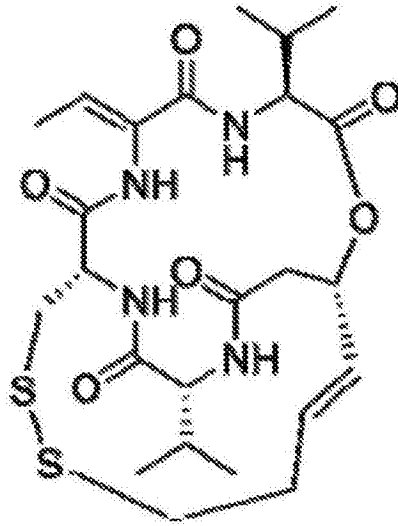


MLN8327

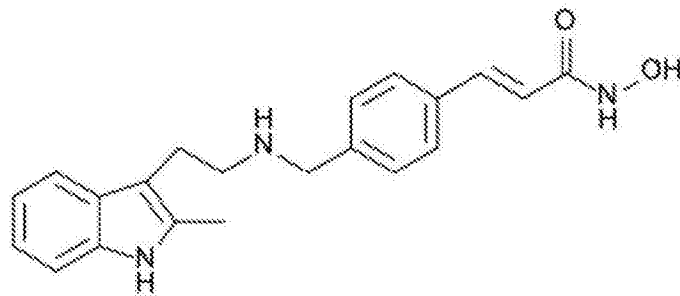
图1 (续)



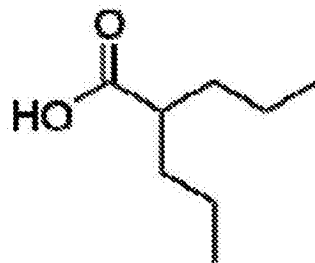
伏立诺他(Vorinostat)



罗米地辛(Romidepsin)

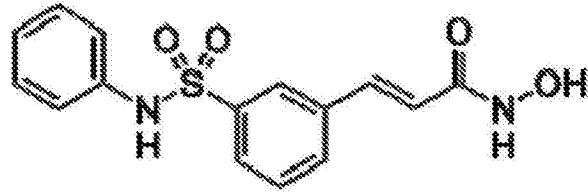


帕比司他(Panobinostat)

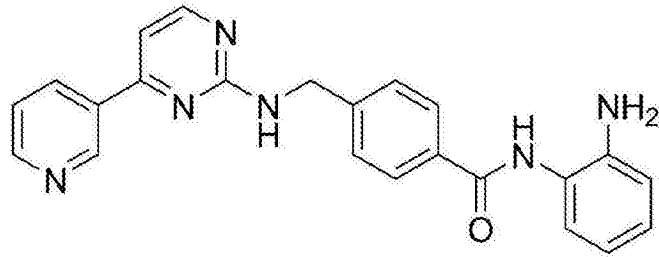


丙戊酸(Valproic acid)

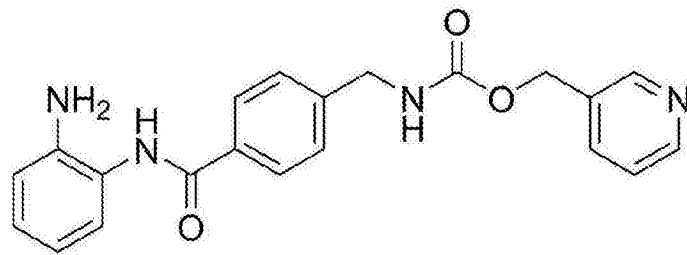
图2



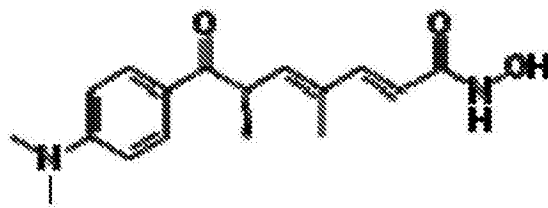
贝利司他(Belinostat)



莫西司他(Mocetinostat)



恩替诺特(Entinostat)



曲古菌素 A(Trichostatin A)

图2(续)

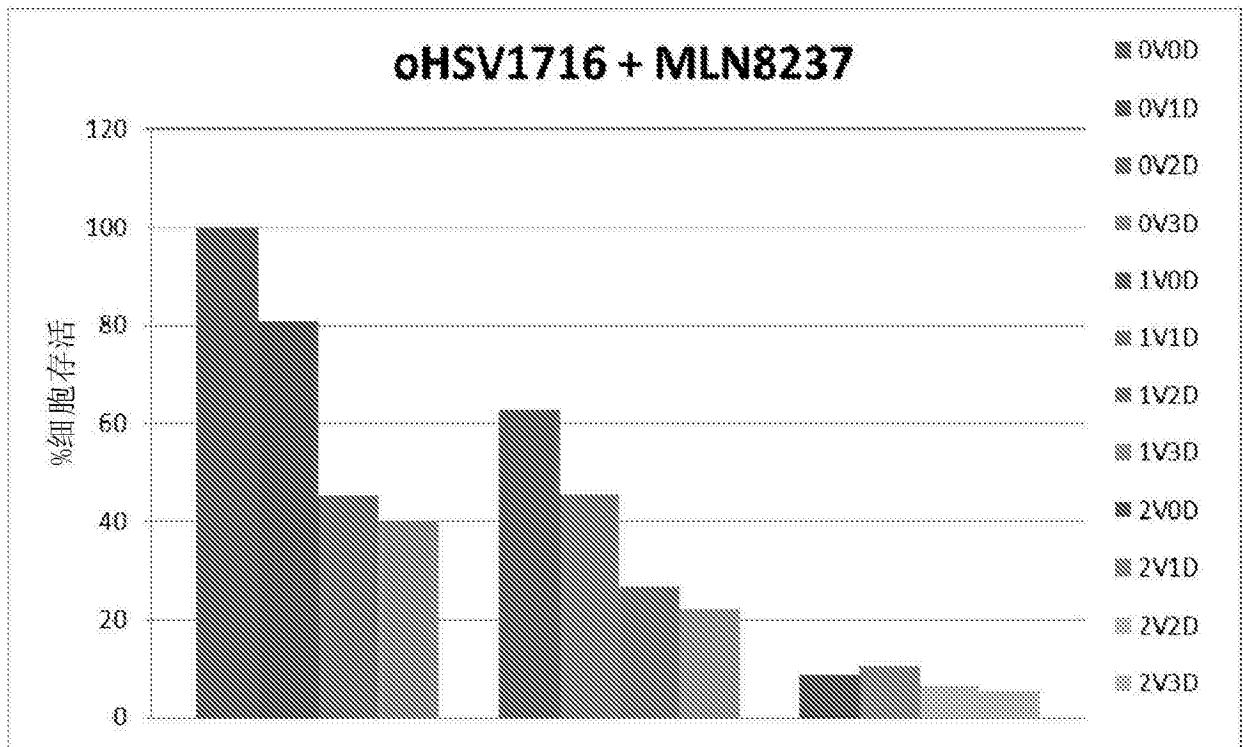


图3

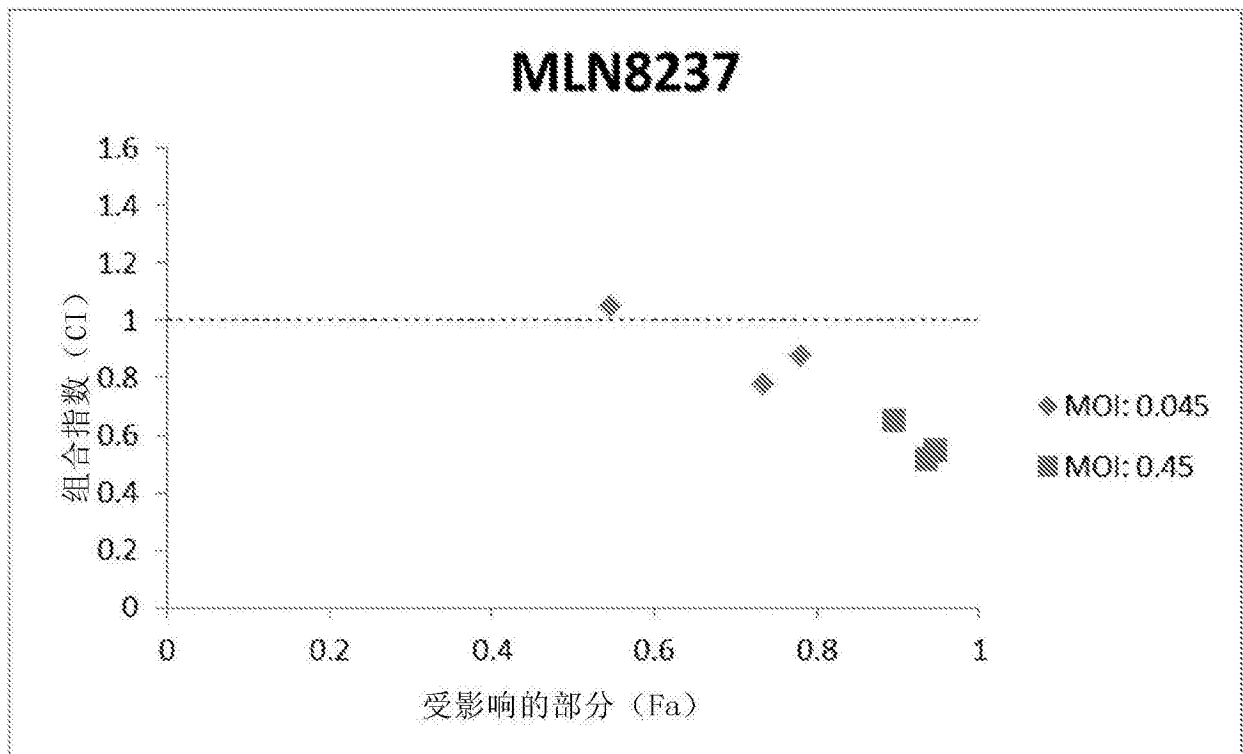


图4

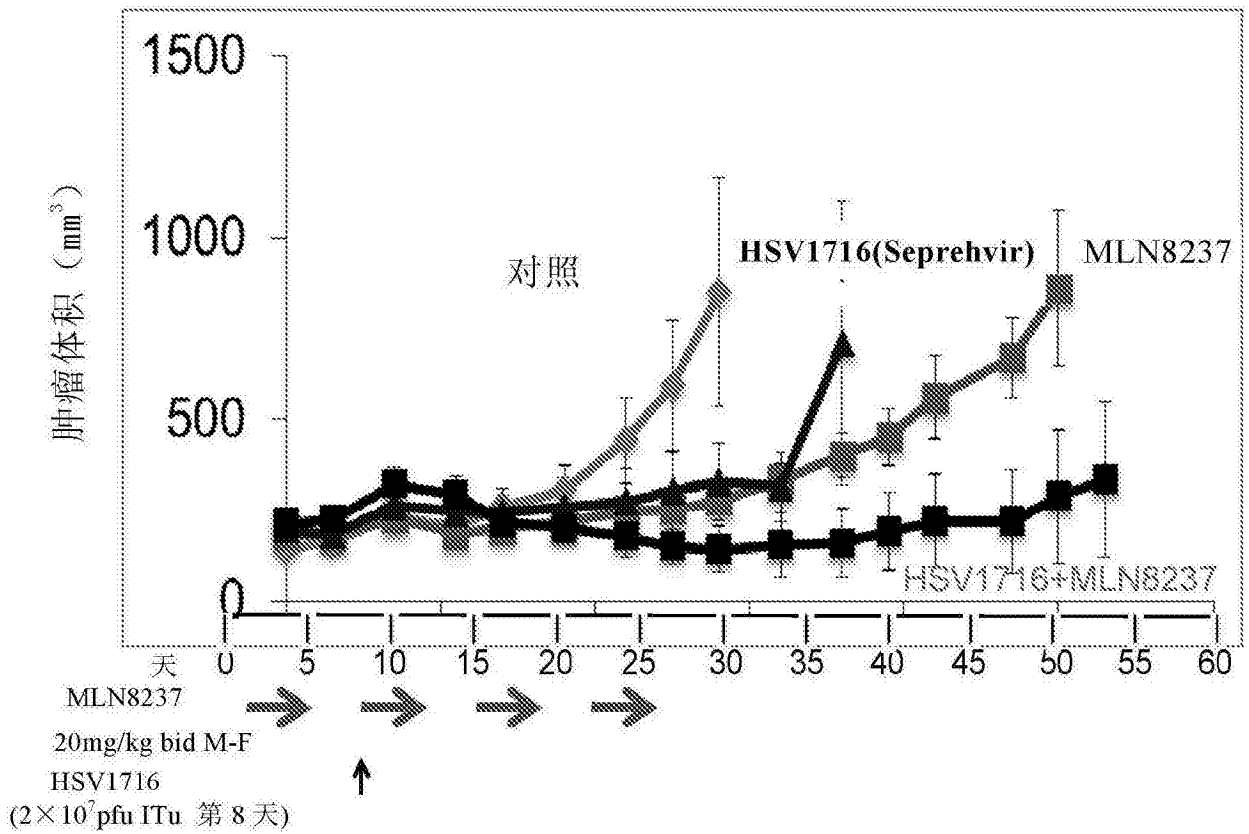


图5a

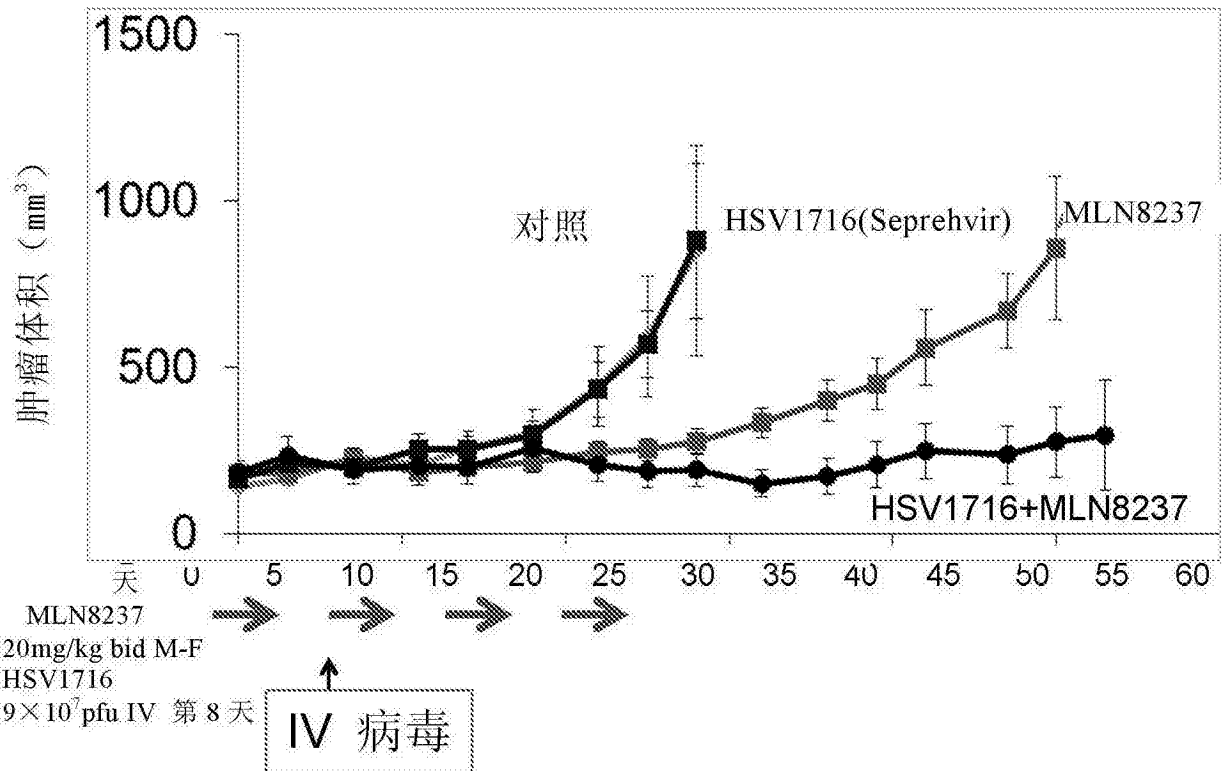


图5b

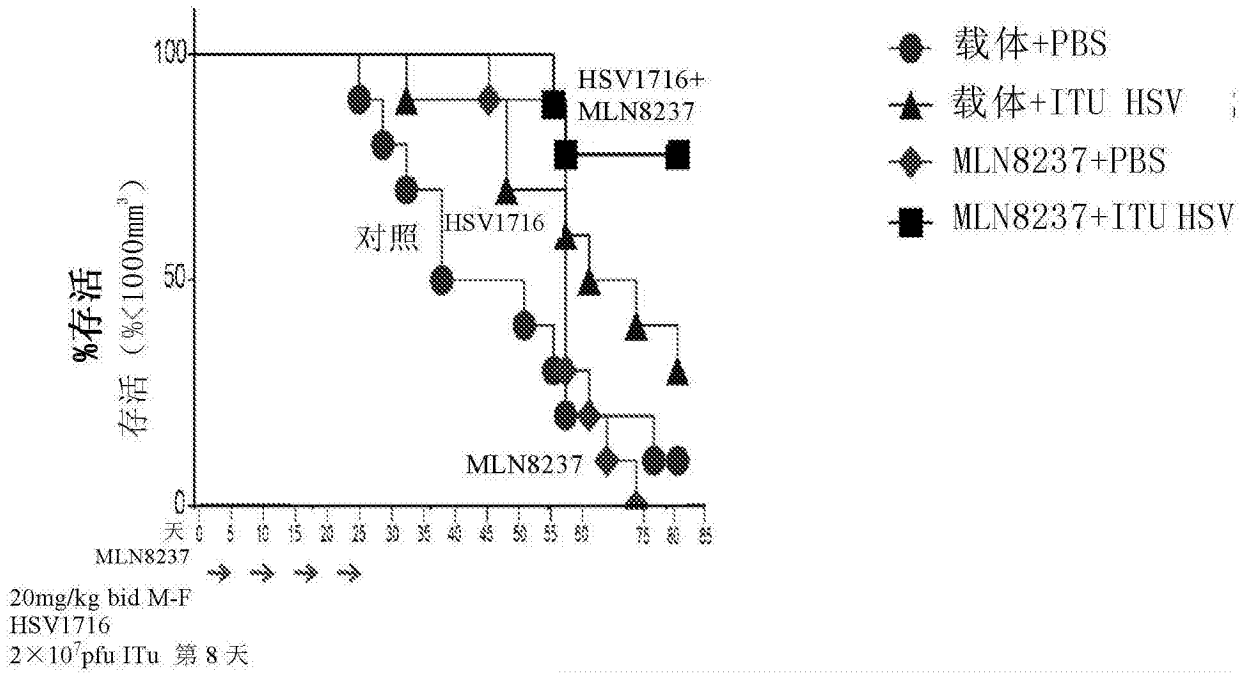


图6

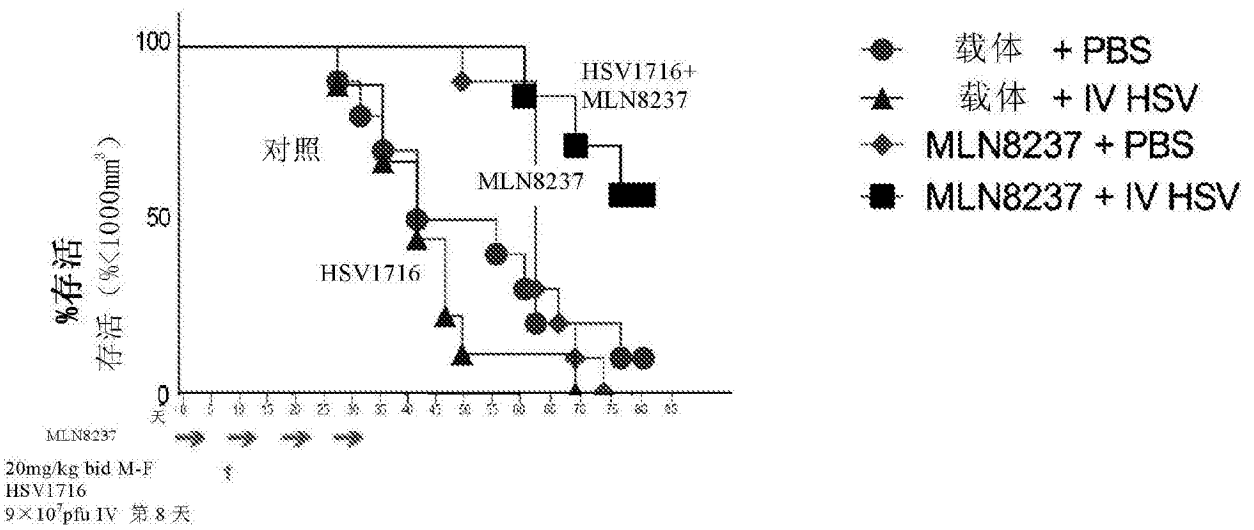


图7

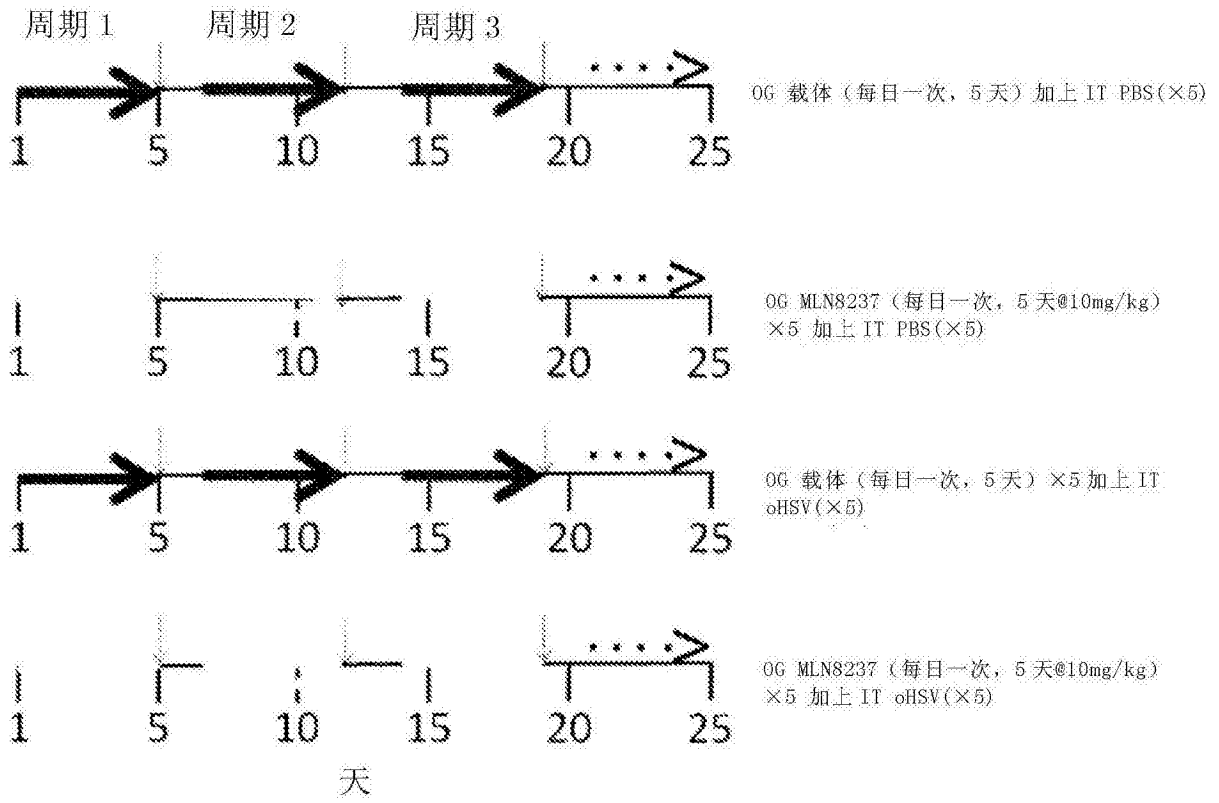


图8

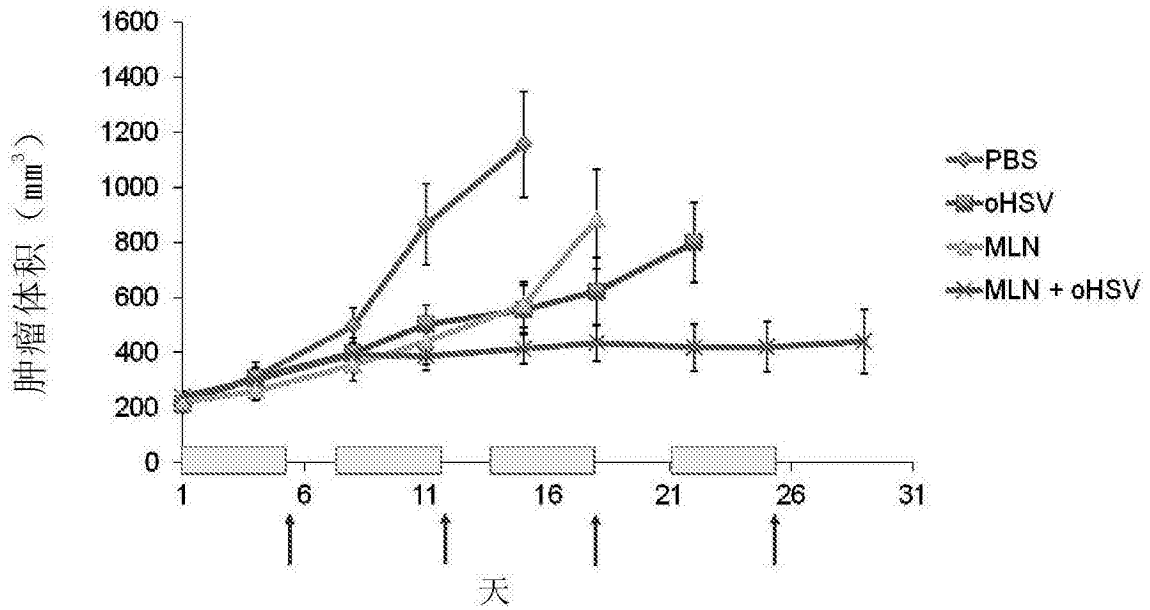


图9

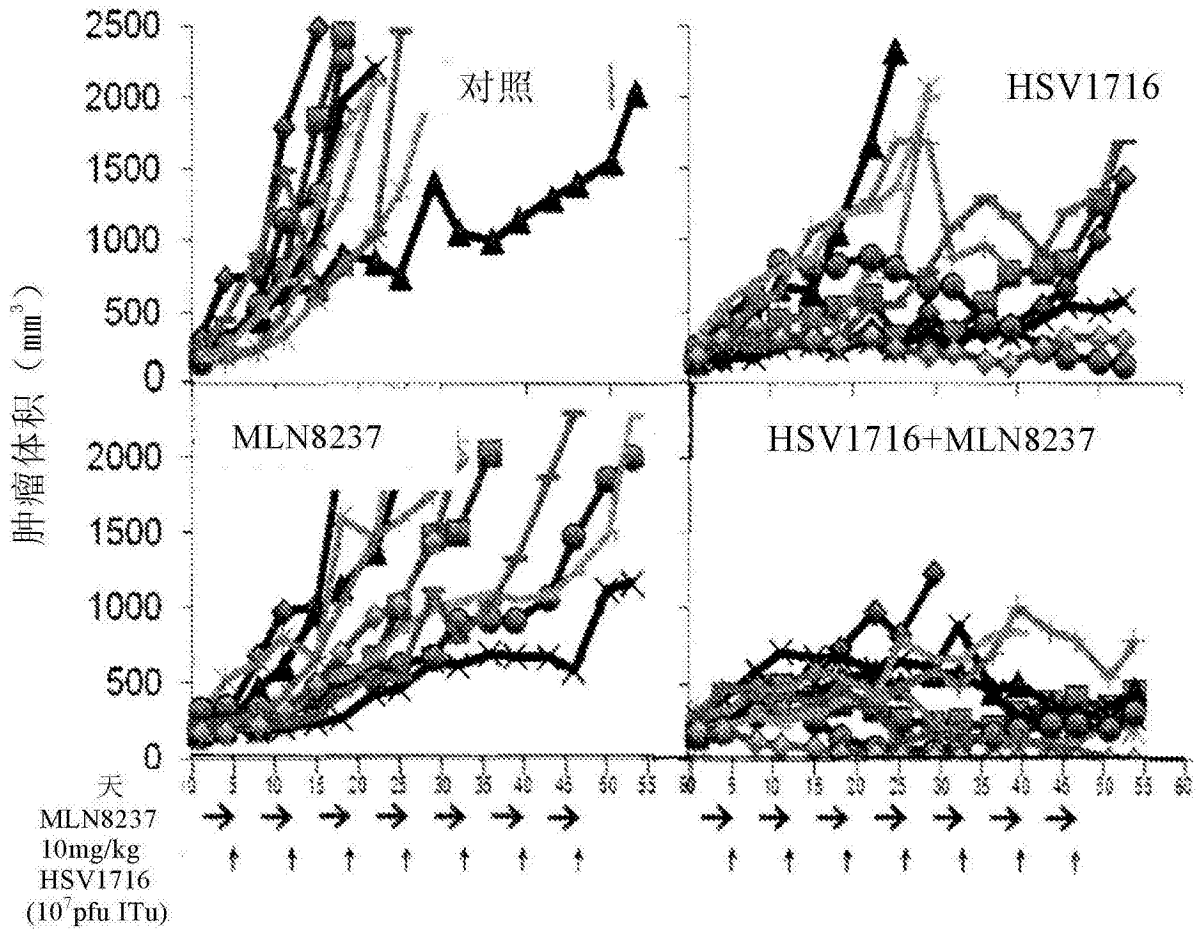


图10

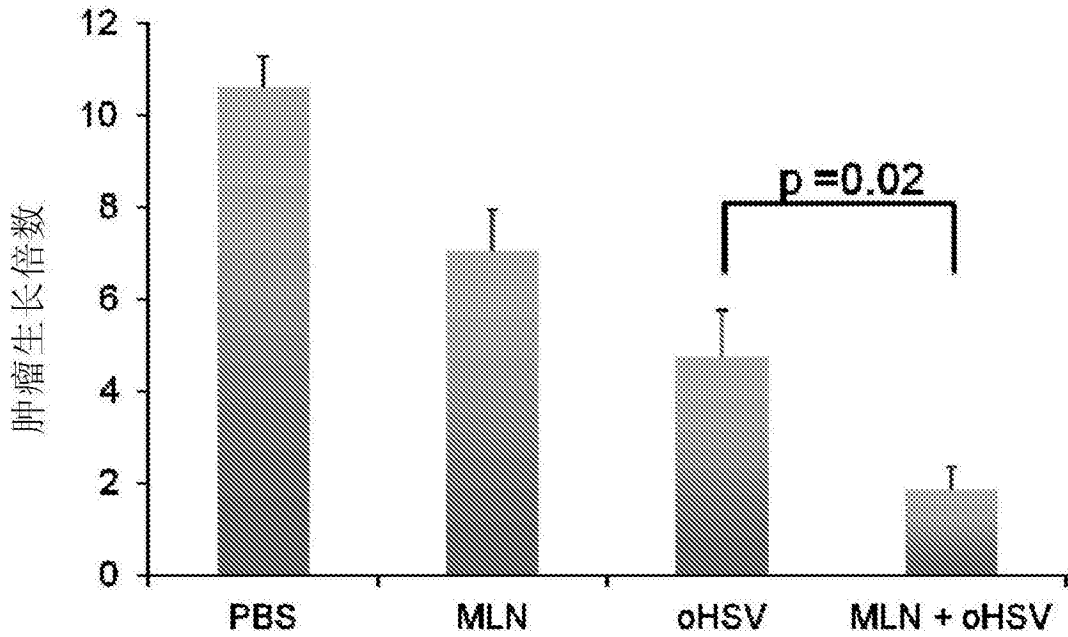


图11

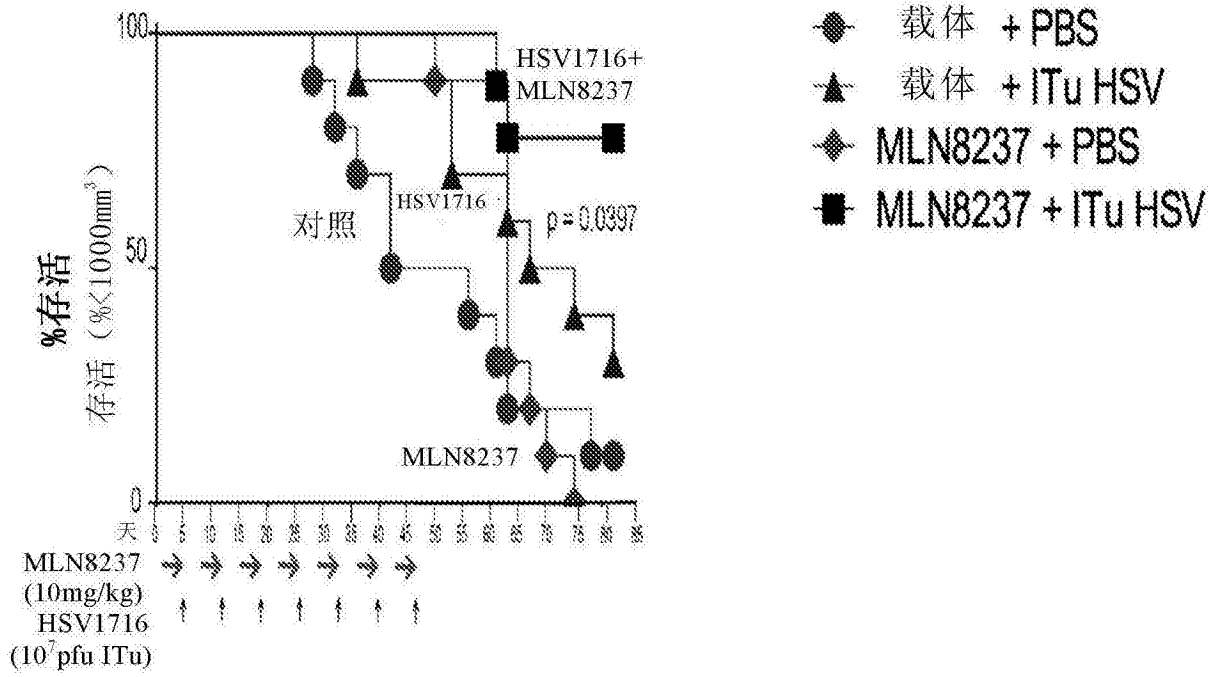


图12

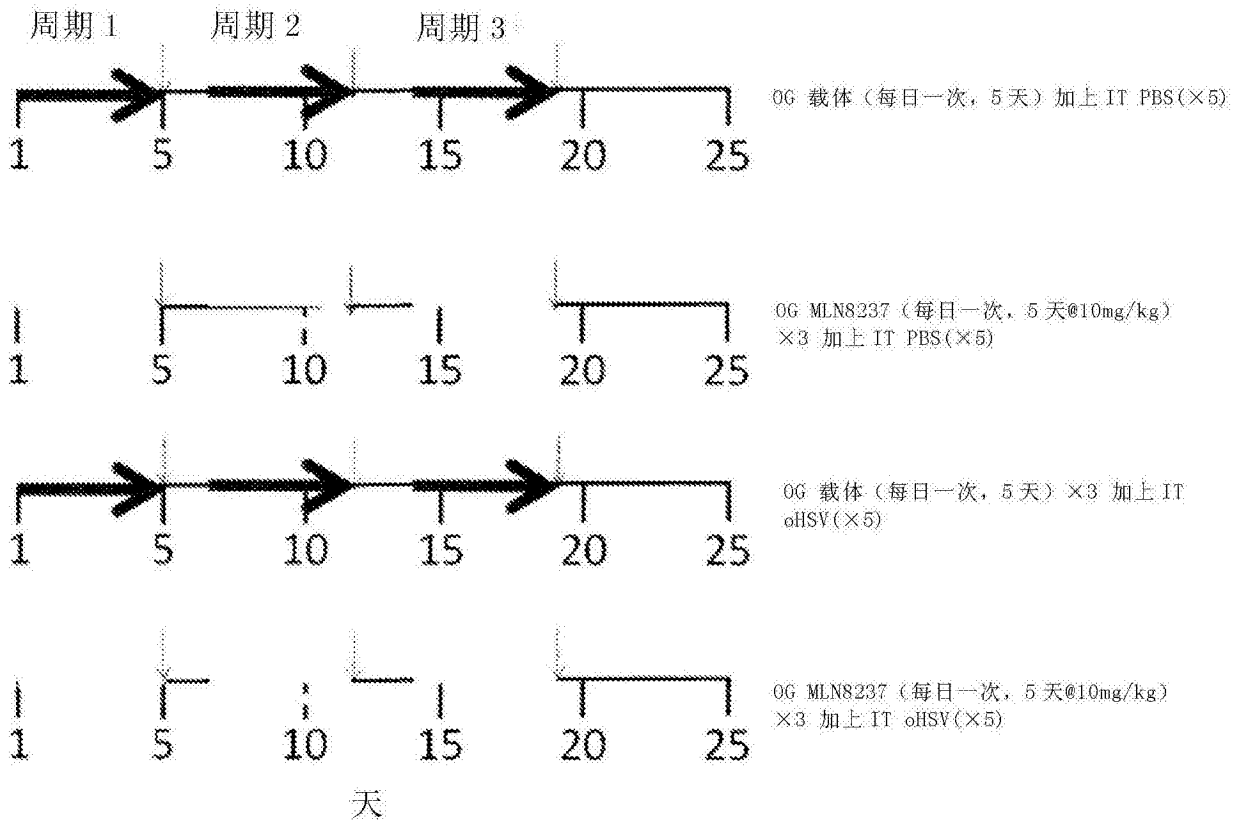


图13

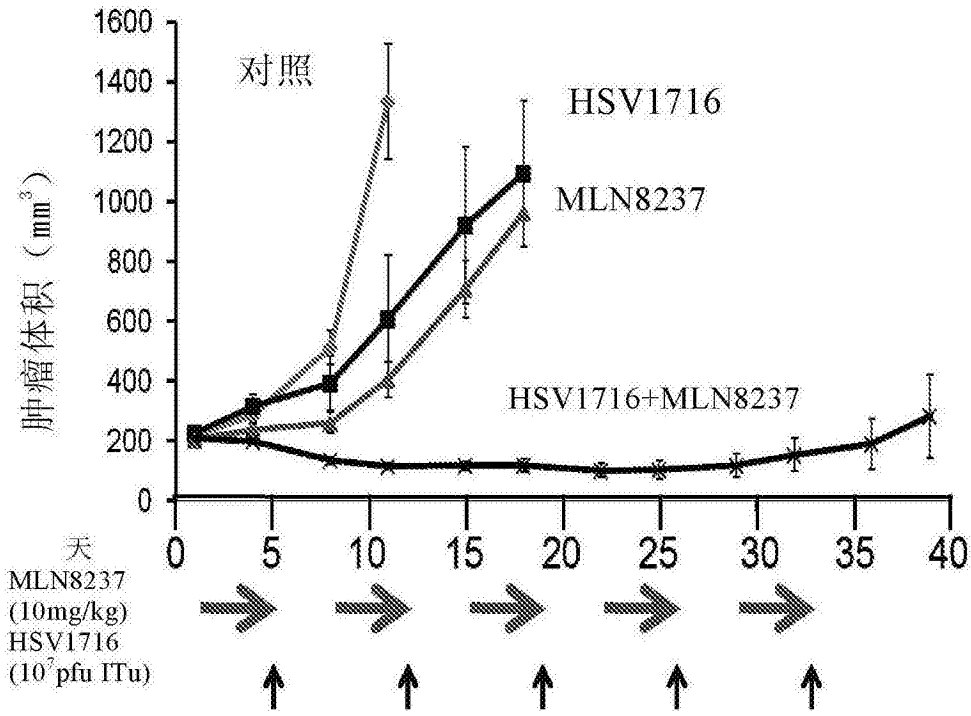


图14

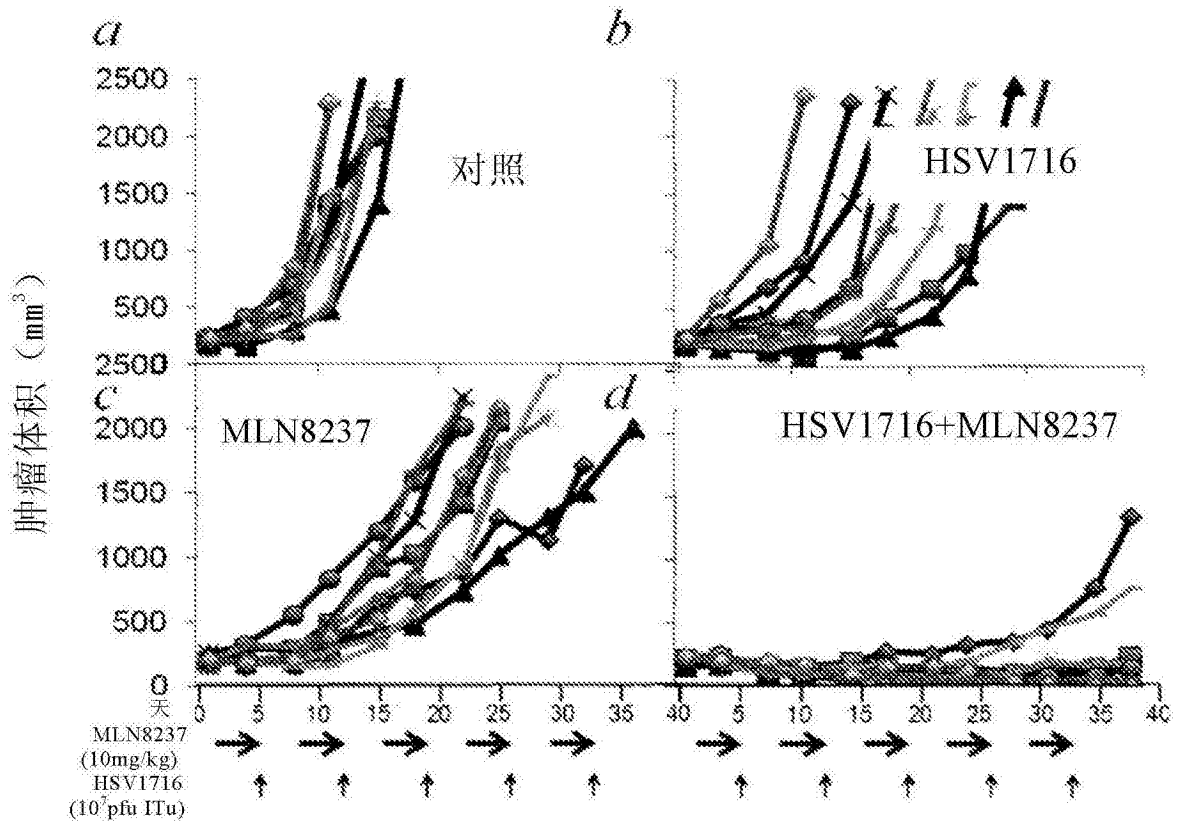


图15

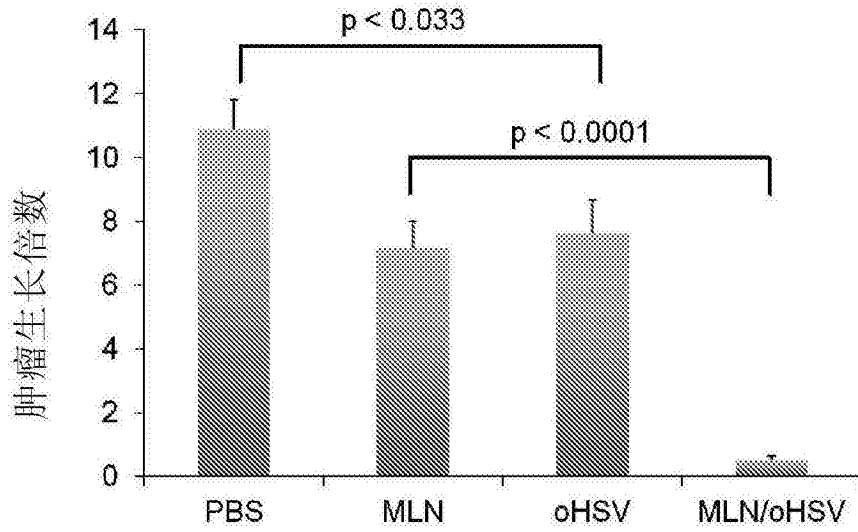


图16

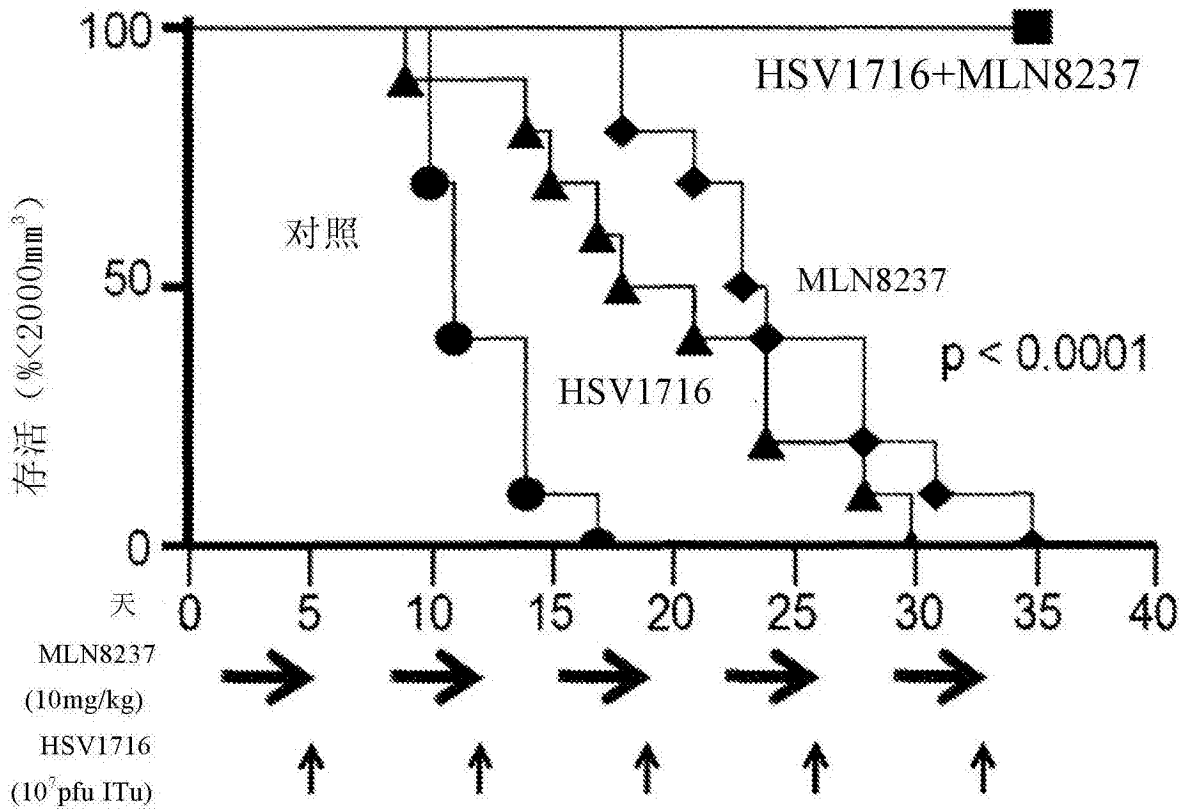


图17

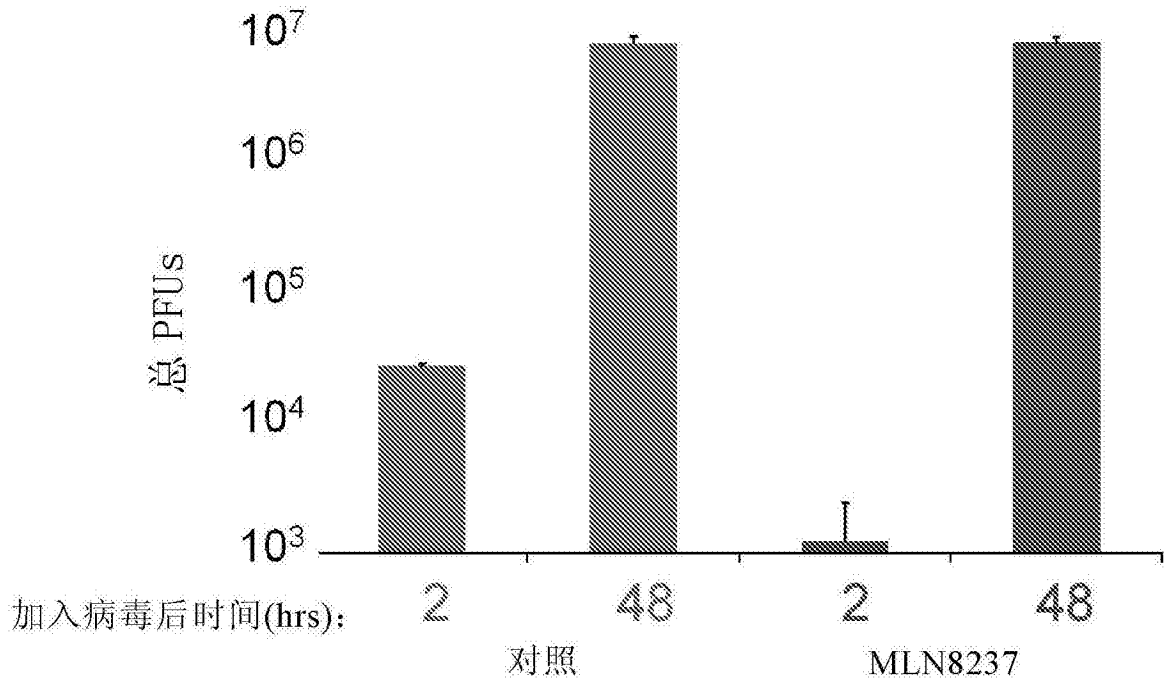


图18

肿瘤中细胞浸润 (%)

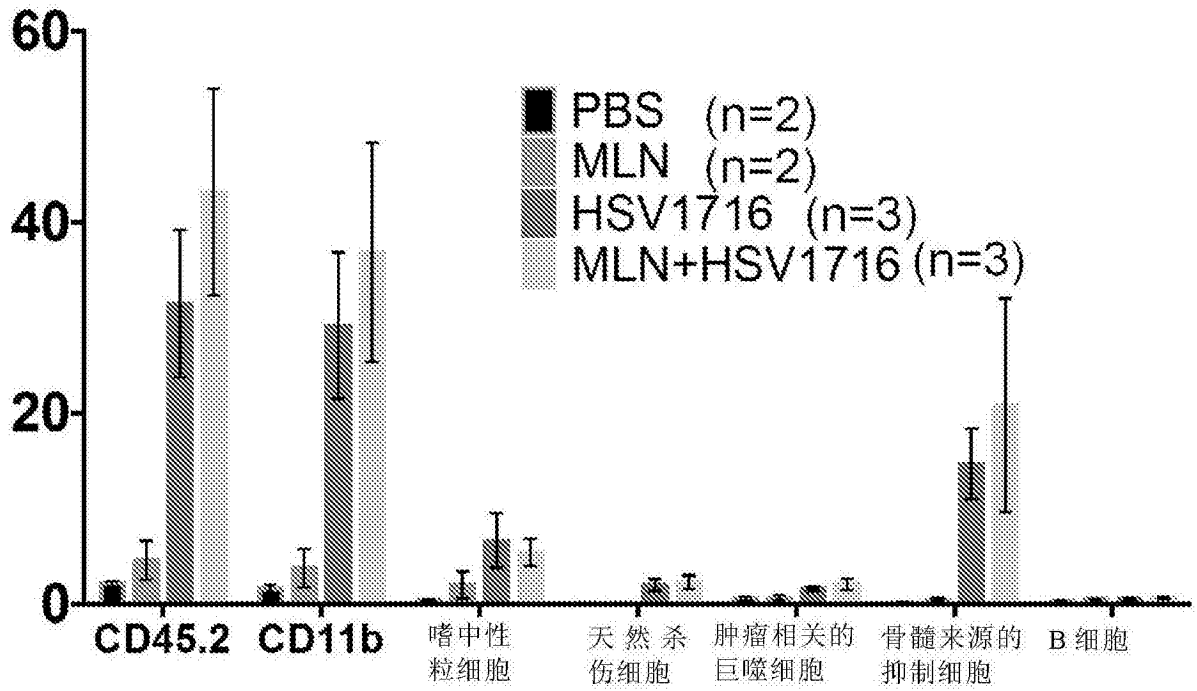


图19

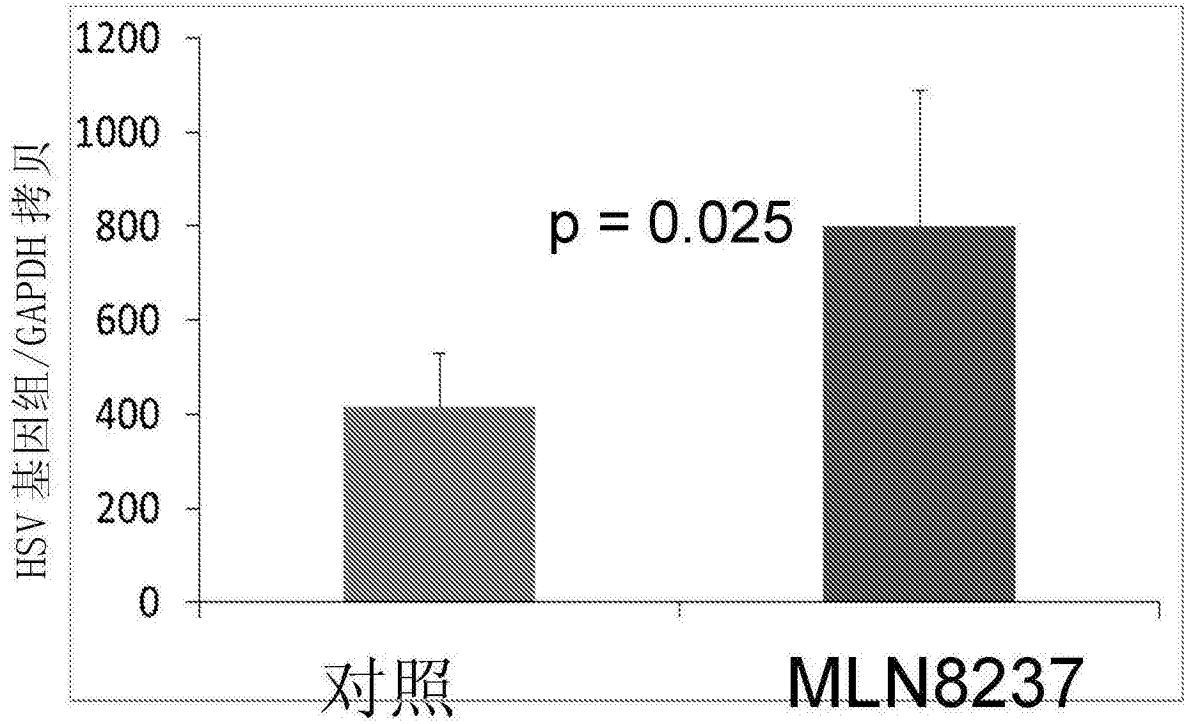


图20