



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106714795 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201680001302.8

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(22)申请日 2016.08.22

代理人 吴胜周

(30)优先权数据

62/209,197 2015.08.24 US

62/209,645 2015.08.25 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/385(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/047984 2016.08.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/035057 EN 2017.03.02

(71)申请人 卫理公会医院研究所

地址 美国德克萨斯

(72)发明人 赵宏 斯蒂芬·天赐·王

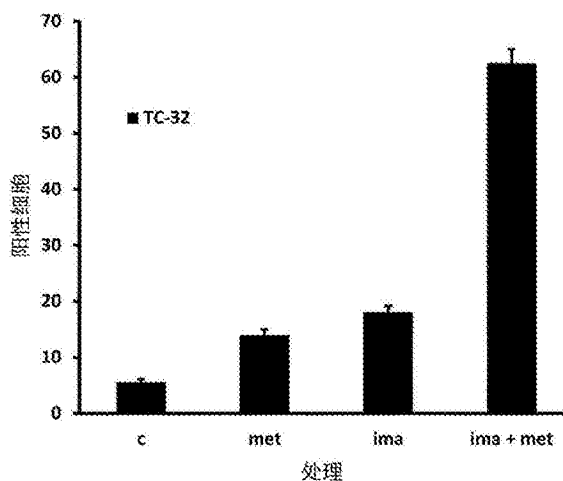
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗尤因家族肿瘤的组合物及方法

(57)摘要

一种用于治疗肉瘤的方法,其通过给药酪氨酸激酶抑制剂及双胍化合物进行。还描述了一种用于治疗尤因肉瘤(Ewing Sarcoma)家族肿瘤的方法,其通过下列进行:获得肿瘤样品;确定在所述样品中的ACTB、B2M、MLH1、PRKDC、XPC、APEX1、ERCC5、MMS19或RAD23的基因表达水平;及给药酪氨酸激酶抑制剂及双胍化合物。此外,本发明公开了一种用于治疗尤因家族肿瘤的药物组合物。所述组合物含有酪氨酸激酶抑制剂、双胍化合物及药用赋形剂。



1. 一种用于治疗肉瘤的方法,所述方法包括将有效量的第一酪氨酸激酶抑制剂及有效量的第一双胍化合物给药至具有肉瘤的对象。

2. 如权利要求1的方法,其中所述第一双胍化合物是甲福明。

3. 如权利要求1的方法,其中所述第一酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼、达沙替尼、尼罗替尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、奎扎替尼、喹诺兰尼或索拉非尼。

4. 如权利要求2的方法,其中所述第一酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼。

5. 如权利要求1的方法,还包括给药与所述第一酪氨酸激酶抑制剂不同的第二酪氨酸激酶抑制剂或与所述第一双胍化合物不同的第二双胍化合物。

6. 如权利要求1的方法,还包括给药选自下列各项所组成的组的化疗剂:环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶、多西他赛、紫杉醇、曲妥珠单抗、甲氨蝶呤、表柔比星、顺铂、卡铂、长春瑞滨、卡培他滨、吉西他滨、米托蒽醌、伊沙匹隆、艾瑞布林、拉帕替尼、卡莫司汀、氮芥、硫芥、四硝酸铂、长春碱、依托泊苷、喜树碱、拓扑异构酶抑制剂及其组合。

7. 如权利要求1的方法,其中所述癌是尤因肉瘤家族肿瘤。

8. 一种用于治疗尤因家族肿瘤的方法,所述方法包括:

从对象的尤因家族肿瘤获得组织样品;

确定当与选自ACTB、B2M、MLH1、PRKDC、XPC、APEX1、ERCC5、MMS19和RAD23A的基因的表达的预定水平相比,在所述样品中所述基因的表达的升高水平;以及

将有效量的第一酪氨酸激酶抑制剂及有效量的第一双胍化合物给药至所述对象。

9. 如权利要求8的方法,其中所述第一双胍化合物是甲福明。

10. 如权利要求8的方法,其中所述第一酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼、达沙替尼、尼罗替尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、奎扎替尼、喹诺兰尼或索拉非尼。

11. 如权利要求9的方法,其中所述第一酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼。

12. 如权利要求8的方法,还包括给药与所述第一酪氨酸激酶抑制剂不同的第二酪氨酸激酶抑制剂或与所述第一双胍化合物不同的第二双胍化合物。

13. 如权利要求8的方法,还包括给药选自下列各项所组成的组的化疗剂:环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶、多西他赛、紫杉醇、曲妥珠单抗、甲氨蝶呤、表柔比星、顺铂、卡铂、长春瑞滨、卡培他滨、吉西他滨、米托蒽醌、伊沙匹隆、艾瑞布林、拉帕替尼、卡莫司汀、氮芥、硫芥、四硝酸铂、长春碱、依托泊苷、喜树碱、拓扑异构酶抑制剂或其组合。

14. 如权利要求8的方法,其中所述确定步骤通过定量逆转录聚合酶链反应进行。

15. 一种用于治疗尤因家族肿瘤的药物组合物,其包含第一酪氨酸激酶抑制剂、第一双胍化合物及药用赋形剂。

16. 如权利要求15的药物组合物,其中所述第一双胍化合物是甲福明。

17. 如权利要求15的药物组合物,其中所述第一酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼、达沙替尼、尼罗替尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、奎扎替尼、喹诺兰尼或索拉非尼。

18. 如权利要求17的药物组合物,还包含与所述第一酪氨酸激酶抑制剂不同的第二酪氨酸激酶抑制剂或与所述第一双胍化合物不同的第二双胍化合物。

19. 如权利要求15的药物组合物,还包含脂质体、表面活性剂、囊泡、醇质体、传递体、磷脂、鞘磷囊体、纳米粒子、微粒子或其组合。

20. 如权利要求19的药物组合物,还包含免疫调节剂、神经活性剂、抗炎剂、抗脂血症

剂、激素、受体激动剂、受体拮抗剂、抗感染剂、蛋白质、肽、抗体、抗原结合片段、酶、RNA、DNA、siRNA、mRNA、核酶、激素、辅因子、类固醇、反义分子、抗高血压剂、化疗剂或其任何组合。

## 用于治疗尤因家族肿瘤的组合物及方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于2015年8月24日提出的美国临时专利申请号62/209,197,及于2015年8月25日提出的美国临时专利申请号62/209,645的权益。将它们二者的内容以其整体其通过引用结合于此。

[0003] 背景

[0004] 尤因家族肿瘤(Ewing family tumor)是一组癌症,其包括骨头的尤因肿瘤(Ewing tumor) (“尤因肉瘤”)、骨外尤因肿瘤、原发性神经外胚层肿瘤(PNET)及阿斯金肿瘤(Askin tumor)(胸壁的PNET)。这些肿瘤是侵袭性恶性肿瘤,其主要发生在幼年至青少年/青壮年数年。超过85%的尤因家族肿瘤情况产生自染色体易位,其将在染色体22上的EWS基因融合至在染色体11上的FLI1基因。在尤因家族肿瘤的发病机制中,该EWS/FLI融合蛋白质通过调节靶基因的表达起作用。

[0005] 在尤因家族肿瘤当中,尤因肉瘤是第二种最常见影响小孩及青壮年的原发性骨癌并且也是此年龄群最常见的软组织恶性肿瘤之一。

[0006] 虽然局部化尤因肉瘤治疗在进步,但几乎全部患者在诊断那时都具有无症状转移性疾病。转移性尤因肉瘤的长期存活率少于10%。

[0007] 阿霉素(多柔比星,doxorubicin)是现在用于这些肿瘤的标准全身性治疗。但是,仅有20%肉瘤对此药物反应。此外,阿霉素的临床使用受明显的副作用限制,特别是不可逆的心脏毒性。

[0008] 对有效治疗尤因家族肿瘤及缺乏不适宜的心脏细胞毒性的新型治疗药物存在明显未满足的医疗需求。

[0009] 概述

[0010] 为了满足上述提出的未满足的需求,本发明提供一种用于治疗肉瘤的方法。该方法通过将有效量的酪氨酸激酶抑制剂及有效量的双胍化合物给药(施用,administer)至具有肉瘤的对象(受试者,subject)而进行。

[0011] 本文中公开了一种用于治疗尤因家族肿瘤的方法。该方法包括(i)获得肿瘤样品;(ii)确定在该样品中的ACTB、B2M、MLH1、PRKDC、XPC、APEX1、ERCC5、MMS19或RAD23的基因表达的升高水平(与该基因的表达的预定水平相比);及(iii)将有效量的酪氨酸激酶抑制剂及有效量的双胍化合物给药至该对象。

[0012] 此外,本发明公开了一种用于治疗尤因家族肿瘤的药物组合物。该组合物包括酪氨酸激酶抑制剂、双胍化合物及药用赋形剂。

[0013] 在下列附图及描述二者中提出本发明的一个或多个实施方案的细节。将从该说明书及从权利要求书明了本发明的其它特征、目的及优点。

[0014] 重要的是,将本文中所引用的全部参考文献以其全文以引用方式并入本文。

[0015] 附图简述

[0016] 本发明以下描述参考所附附图,其中:

[0017] 图1A是直方图,其显示出在以媒介物(c)、10mM甲福明(metformin)(met)、5 $\mu$ M伊马

替尼(imatinib) (ima)、或二种药物一起(ima+met)处理的TC-32尤因肉瘤细胞中,通过免疫荧光染色定量出的 $\gamma$ 组织蛋白H2AX( $\gamma$ -H2AX)水平。该值是由 $\gamma$ -H2AX-阳性细胞数目/高倍视野(high power field)表示。误差棒代表标准偏差;

[0018] 图1B是直方图,其显示出在TC-71尤因肉瘤细胞中通过免疫荧光染色定量出的 $\gamma$ -H2AX水平。该处理及值是如在上述图1A的图例中所描述的。误差棒代表标准偏差;

[0019] 图2A是直方图,其显示出在未经处理(c)或经甲福明(met)、伊马替尼(ima)或二者(ima+met)处理达所指示出的时间的TC-32细胞中的 $\gamma$ -H2AX的相对表达。该值是通过蛋白质印迹(Western blot)确定的相对 $\gamma$ -H2AX表达。该药物处理是如在上述图1A的图例中所描述的。误差棒代表标准偏差;

[0020] 图2B是直方图,其显示出在以甲福明、伊马替尼或二者处理达所指示出的时间的TC-71细胞中的 $\gamma$ -H2AX的相对表达。该值及药物处理是如在上述图2A的图例中所描述的。误差棒代表标准偏差;

[0021] 图3A是带有TC-32细胞肿瘤的小鼠的生物发光对处理(治疗,treatment)天数的图示。这些小鼠如下处理:媒介物(vehicle)、150mg/kg甲福明(met)、50mg/kg伊马替尼(ima)及相同剂量的甲福明加伊马替尼(ima+met)。值为光子/秒/小鼠。误差棒代表标准偏差;

[0022] 图3B是带有TC-71细胞肿瘤的小鼠的生物发光对处理天数的图示。处理是如在上述图3A的图例中所描述的。误差棒代表标准偏差;

[0023] 图4A是显示出细胞凋亡水平的直方图,其是由在从带有TC-32细胞肿瘤的小鼠获得的肿瘤组织中的末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase) dUTP缺口末端标记(dUTP nick end labeling) (TUNEL)-阳性细胞的数目表示。该小鼠是如在上述图3A的图例中所描述那样处理。值是由TUNEL-阳性细胞数目/高倍视野表示。误差棒代表标准偏差;及

[0024] 图4B是直方图,其显示出在从带有TC-71细胞肿瘤的小鼠获得的肿瘤组织中的细胞凋亡水平。该小鼠是如在上述图3A的图例中所描述那样处理。值是由TUNEL-阳性细胞数目/高倍视野表示。误差棒代表标准偏差。

[0025] 详述

[0026] 如上述提及,本发明包括一种用于治疗癌的方法。该方法包括将有效量的酪氨酸激酶抑制剂及有效量的双胍化合物给药至具有肉瘤的对象。

[0027] 该酪氨酸激酶抑制剂可以是伊马替尼、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼(nilotinib)、舒尼替尼(sunitinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、奎扎替尼(quizartinib)、喹诺兰尼(crenolanib)或索拉非尼(sorafenib)。在特别的实施方案中,该酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼。

[0028] 该双胍化合物可以是但是不限于白乐君(proguanil)、氯丙胍(chlorproguanil)或甲福明。在特定方法中,该双胍化合物是甲福明。

[0029] 在特别的实施例中,前述描述的方法还包括给药二种不同的酪氨酸激酶抑制剂。该二种不同的酪氨酸激酶抑制剂可选自例如伊马替尼、达沙替尼、尼罗替尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、奎扎替尼、crenolanib及索拉非尼。

[0030] 在不同实施例中,该方法包括给药二种不同的双胍化合物。示例性方法包括给药二种不同选自白乐君、氯丙胍及甲福明的双胍化合物。

[0031] 该方法可进一步包括给药与上述讨论的酪氨酸激酶抑制剂不同的化疗剂。可以与该酪氨酸激酶抑制剂及双胍化合物一起给药的示例性化疗剂有环磷酰胺(cyclophosphamide)、阿霉素(doxorubicin)、5-氟尿嘧啶、多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、甲氨蝶呤(methotrexate)、表柔比星(epirubicin)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、长春瑞滨(vinorelbine)、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊沙匹隆(isabepilone)、艾瑞布林(eribulin)、拉帕替尼(lapatinib)、卡莫司汀(carmustine)、氮芥(nitrogen mustard)、硫芥(sulfur mustard)、四硝酸铂(platin tetranitrate)、长春碱、依托泊苷(etoposide)、喜树碱及拓扑异构酶抑制剂。也可以给药这些化疗剂的组合。

[0032] 在所述方法的范围内还包括与给药该酪氨酸激酶抑制剂及双胍化合物一起,将该肿瘤组织暴露至电离辐射。

[0033] 所述方法对治疗尤因家族肿瘤特别有效。这样的肿瘤的实例有骨头的尤因肿瘤(Ewing tumor of bone)、骨外尤因肿瘤(extraosseous Ewing tumor)、原发性神经外胚层肿瘤(primitive neuroectodermal tumor)及阿斯金肿瘤(Askin tumor)。

[0034] 本发明公开了第二种有效治疗尤因家族肿瘤的方法。

[0035] 该方法包括从尤因家族肿瘤获得组织样品。可经由本领域已知的技术例如经由针刺活组织检查法(needle biopsy)获得组织样品。

[0036] 确定在样品中要升高的基因表达水平(当与基因表达的预定水平相比时)。不受理论限制,据信当在尤因家族肿瘤中的特定基因的表达升高时(与在具有好的临床结果的其它尤因家族肿瘤患者中的相同基因的表达水平比较),患者具有差的临床结果。参见以下的实施例6。差的临床结果为死亡、转移、3年复发及5年复发。

[0037] 确定以下中的一种或多种的升高的基因表达水平:β细胞骨架肌动蛋白(ACTB)、β-2-微球蛋白(B2M)、DNA错配修复蛋白质(MLH1)、DNA-依赖性蛋白质激酶催化亚单位(PRKDC)、着色性干皮病互补C组(XPC)、APEX核酸酶多功能DNA修复酶(APEX1)、DNA切除修复蛋白质ERCC-5(ERCC5)、核苷酸切除修复同系物MMS19(MMS19)及UV切除修复蛋白质RAD23同系物A(RAD23A)。

[0038] 在一个实施例中,通过测量mRNA水平,通过定量的聚合酶链反应确定基因表达的升高水平。在另一个实施例中,通过将mRNA杂交至基因表达微阵列确定基因表达水平。在另一个实施例中,通过免疫测定测量蛋白质水平来测量基因表达水平。

[0039] 所述方法包括给药酪氨酸激酶抑制剂及双胍化合物。上述描述了适当的酪氨酸激酶抑制剂及双胍化合物。在特别的方法中,该酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼(imitanib)及该双胍化合物是甲福明。

[0040] 此外,在此方法的范围内,给药二种不同的酪氨酸激酶抑制剂或二种不同的双胍化合物。

[0041] 所述方法还可包括给药一种或多种选自下列各项的化疗剂:环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶、多西他赛、紫杉醇、曲妥珠单抗、甲氨蝶呤、表柔比星、顺铂、卡铂、长春瑞滨、卡培他滨、吉西他滨、米托蒽醌、伊沙匹隆、艾瑞布林、拉帕替尼、卡莫司汀、氮芥、硫芥、四硝酸铂、长春碱、依托泊苷、喜树碱及拓扑异构酶抑制剂。

[0042] 本发明提供一种用于治疗尤因家族肿瘤的药物组合物。该组合物包括酪氨酸激酶

抑制剂、双胍化合物及药用赋形剂。

[0043] 示例性酪氨酸激酶抑制剂有伊马替尼、达沙替尼、尼罗替尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、奎扎替尼、crenolanib及索拉非尼。

[0044] 甲福明是一种可包含在该组合物中的双胍化合物。该双胍化合物也可能是白乐君或氯丙胍。

[0045] 在特别的实施方案中,该药物组合物包括二种不同的酪氨酸激酶抑制剂或二种不同的双胍化合物。

[0046] 为了使得药物递送容易,该药物组合物可进一步包括递送剂,诸如脂质体、表面活性剂、囊泡(niosome)、醇质体(ethosome)、传递体(transfersome)、磷脂、鞘磷囊体(sphingosome)、纳米粒子(nanoparticle)、微粒子(microparticle)或这些试剂的组合。

[0047] 在另一个实施例中,该药物组合物还包括下列的一种或多种:免疫调节剂、神经活性剂(neuroactive agent)、抗炎剂、抗脂血症剂(anti-lipidemic agent)、激素、受体激动剂、受体拮抗剂、抗感染剂、蛋白质、肽、抗体、抗原结合片段、酶、RNA、DNA、siRNA、mRNA、核糖核酸酶、激素、辅因子、类固醇、反义分子(antisense molecule)、抗高血压剂及与该酪氨酸激酶抑制剂不同的化疗剂。

[0048] 没有进一步详细阐述,据信本领域技术人员可将本公开使用至其最大水平。因此,下列具体实施例仅解释为描述性,并且无论如何不以任何方式限制本公开的剩余部分。

[0049] 实施例1:甲福明及伊马替尼在肿瘤细胞生存能力上的作用

[0050] 在两种尤因家族肿瘤细胞系,即TC-32及TC-71上检验甲福明与伊马替尼于肿瘤细胞生存能力上的组合作用。该TC-32细胞系是来自新近诊断出的17岁大的PNET患者并且该TC-71细胞系是来自22岁大的尤因肉瘤患者在化学疗法后复发的肿瘤。参见May等人的2013, PLoS One, 8 (12): e80060。两种细胞系携带上述提及的EWS/FLI基因融合。使用不具有EWS/FLI基因融合的乳房癌骨头转移细胞系MDA-MB231-Bo及NIH 3T3细胞作为对照。

[0051] 这些细胞是在37°C及5%CO<sub>2</sub>的增湿环境中,于DMEM培养基中培养,所述培养基补充有10%FBS、1%L-谷氨酸、1%丙酮酸钠、1%盘尼西林/链霉素及1%非必需氨基酸。在全部实验中,细胞对孔表面及培养基体积的比率都保持固定。

[0052] 从Sigma Aldrich购买甲福明盐酸盐及伊马替尼甲磺酸盐,并在使用前溶解于0.1%DMSO中。

[0053] 在96孔板中,以每孔 $1.5 \times 10^4$ 细胞的密度分别将TC-32、TC-71、MB231-Bo及NIH 3T3细胞铺板。这些细胞用甲福明、伊马替尼或0.1%DMSO处理24小时,接着加入CellTiter-Glo®荧光细胞生存能力检测试剂(Promega)。使用IVIS200系统(Xenogen Corporation, Alameda, CA)的生物荧光成像功能对经处理的细胞进行成像。在5分钟内获得的三个动力学生物发光采集的平均值。在孔上方自动汲取有兴趣的区域并用Living Image软件版本2.50.1定量。基于总发射光子通量减掉空白孔的背景光子通量来分析数据。进行三个单独的实验,每个数据点有六个复制孔。结果显示在下列表1中。

[0054] 表1甲福明及伊马替尼的EC<sub>50</sub><sup>a</sup>

药物	TC-32	TC-71
甲福明	11.76 mM (p < 0.0001)	11.59 mM (p < 0.0001)
伊马替尼	44.40 μM (p < 0.0002)	23.69 μM (p < 0.0001)

[0056] <sup>a</sup>EC<sub>50</sub>是抑制肿瘤细胞生长50%的药物浓度(当与经媒介物处理的对照比较时)。

[0057] 实施例2:甲福明与伊马替尼在肿瘤细胞生存能力上的组合作用

[0058] 使用在实施例1中所描述的细胞生存能力检测来测试不同比率的甲福明与伊马替尼混合物的作用。

[0059] 组合指数(CI)说明确定该组合作用的单一药物的剂量反应。参见Chou及Talalay的1984, Adv. Enzyme Regul. 22:27-55。用于计算CI的方程式如下:

$$[0060] \quad CI = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}}$$

[0061] 在此方程式中, D<sub>1</sub>及D<sub>2</sub>表示化合物1及化合物2单独具有x%作用所需要的剂量, 同时D<sub>x1</sub>及D<sub>x2</sub>是以组合具有x%效应时每种化合物各自所需要的剂量。

[0062] 该CI从在上述提出的细胞生存能力检测中, 通过甲福明与伊马替尼于不同浓度比率下的测试组合所获得的数据来计算。这二种药物的相互作用表征为:拮抗的, 定义为CI > 1.1; 加合的, 定义为0.9 < CI < 1.1; 协同的, 定义为CI < 0.9; 及强协同的, 定义为CI < 0.3。

[0063] 结果显示在下列表2中。

[0064] 表2甲福明/伊马替尼抑制肿瘤细胞生长的组合指数值。

伊马替尼/甲福明浓度比率	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup>		ED <sub>75</sub> <sup>a</sup>		ED <sub>90</sub> <sup>a</sup>	
	TC-32	TC-71	TC-32	TC-71	TC-32	TC-71
1:3000	N.D. <sup>b</sup>	1.10 x 10 <sup>-4c</sup>	N.D.	2.90x10 <sup>-14</sup>	N.D.	3.10x10 <sup>-23</sup>
1:2000	1.10x10 <sup>-1</sup>	5.66x10 <sup>-7</sup>	6.37x10 <sup>-5</sup>	9.33x10 <sup>-21</sup>	3.65x10 <sup>-8</sup>	7.69x10 <sup>-34</sup>
1:1500	N.D.	1.60x10 <sup>-3</sup>	N.D.	2.97x10 <sup>-11</sup>	N.D.	3.28x10 <sup>-18</sup>
1:1000	1.22x10 <sup>4</sup>	1.00x10 <sup>-3</sup>	1.24x10 <sup>4</sup>	6.17x10 <sup>-13</sup>	1.23x10 <sup>4</sup>	2.74x10 <sup>-21</sup>
1:750	1.09x10 <sup>5</sup>	1.20x10 <sup>-4</sup>	4.78x10 <sup>5</sup>	2.27x10 <sup>-15</sup>	2.11x10 <sup>6</sup>	3.77x10 <sup>-25</sup>
1:500	9.48x10 <sup>4</sup>	1.40x10 <sup>-4</sup>	5.74x10 <sup>5</sup>	1.44x10 <sup>-15</sup>	3.50x10 <sup>6</sup>	1.49x10 <sup>-25</sup>
1:400	1.36x10 <sup>3</sup>	4.28x10 <sup>-5</sup>	1.73x10 <sup>3</sup>	1.54x10 <sup>-15</sup>	2.22x10 <sup>3</sup>	5.73x10 <sup>-25</sup>
1:333	1.26x10 <sup>5</sup>	2.30x10 <sup>-4</sup>	1.17x10 <sup>6</sup>	2.47x10 <sup>-15</sup>	1.10x10 <sup>7</sup>	2.82x10 <sup>-25</sup>
1:250	1.34x10 <sup>-2</sup>	1.88x10 <sup>2</sup>	2.60x10 <sup>-4</sup>	1.49	5.19x10 <sup>-6</sup>	1.26x10 <sup>-1</sup>
1:200	1.03x10 <sup>4</sup>	8.23x10 <sup>-5</sup>	4.68x10 <sup>4</sup>	2.71x10 <sup>-15</sup>	2.17x10 <sup>5</sup>	9.33x10 <sup>-25</sup>
1:100	7.00x10 <sup>6</sup>	1.20x10 <sup>-4</sup>	5.41x10 <sup>8</sup>	9.72x10 <sup>-15</sup>	4.32x10 <sup>10</sup>	5.81x10 <sup>-26</sup>

[0066] <sup>a</sup>ED<sub>50</sub> = 减低细胞生存能力50%的有效剂量, ED<sub>75</sub> = 减低细胞生存能力为细胞生存能力的75%的有效剂量, ED<sub>90</sub> = 减低细胞生存能力90%的有效剂量。

[0067] <sup>b</sup>N.D. = 未确定的。

[0068] <sup>c</sup>该值是使用上述提出的公式, 使用伊马替尼与甲福明的相应ED<sub>(50, 75, 90)</sub>值所计算的组合指数。

[0069] 浓度比率为1:2000 (5μM:10mM) 的伊马替尼及甲福明在杀死TC-32细胞上具有强协同作用 (CI < 0.3)。浓度5μM及10mM分别与当在TC-32细胞上使用单一药剂时, 伊马替尼的ED<sub>50</sub> (44.40μM) 的11%, 及甲福明的ED<sub>50</sub> (11.76mM) 的85%相应。

[0070] 在TC-71细胞上测试的全部浓度比率几乎都观察到伊马替尼与甲福明的协同作用。在伊马替尼:甲福明浓度比率为1:2000 (5μM:10mM) 及1:3000 (5μM:15mM) 下看到最强的协同作用。浓度5μM的伊马替尼是当该单一药剂使用在TC-71细胞上时, 此药物的ED<sub>50</sub> (23.69 μM) 的22%。对甲福明来说, 10mM是甲福明如为单一药剂在TC-71细胞上时的ED<sub>50</sub> (11.59mM) 的85%及15mM是125%。

[0071] 在与于TC-32及TC-71细胞上测试相同的剂量下, 伊马替尼及甲福明如为单一药剂或以组合时都对MB231-Bo癌细胞及3T3纤维母细胞未显示出任何细胞毒害性。

[0072] 实施例3: 伊马替尼及甲福明在肿瘤细胞中的DNA损伤上的体内作用

[0073] γ组织蛋白H2AX (γ-H2AX) 是DNA双链断裂存在的标志, 通过免疫荧光染色及通过蛋白质印迹分析, 使用抗-γ-H2AX抗体来定量其在经培养的TC-32细胞及TC-71细胞中的水平。这些细胞是如于上述实施例1中所描述的处理1、6及12小时 (用于蛋白质印迹分析) 或24

小时(用于免疫荧光研究)。

[0074] 结果显示在图1A、1B、2A及2B中,其表明伊马替尼与甲福明组合明显诱发更多DNA损伤(如与单独任一种药物比较)。

[0075] 例如,在用伊马替尼与甲福明二者处理细胞后,于TC-32细胞中的 $\gamma$ -H2AX表达水平如通过免疫荧光染色测量是两倍高(如与用伊马替尼或甲福明处理比较)。参见图1A。类似地,在用伊马替尼与甲福明二者处理细胞后,于TC-71细胞中的 $\gamma$ -H2AX表达也升高(如与用伊马替尼或甲福明处理比较)。参见图1B。

[0076] 在另一个实施例中,在用伊马替尼加甲福明处理TC-32细胞12小时后,通过蛋白质印迹分析测量的 $\gamma$ -H2AX水平是4倍高(如与分别用任一种药物处理细胞比较)。参见图2A。同样,在TC-71细胞的药物处理后获得类似结果。参见图2B。

[0077] 实施例4:伊马替尼及甲福明在肿瘤生长上的体内作用

[0078] 使用TC-32及TC-71异种移植小鼠模型来评估伊马替尼与甲福明组合的抗肿瘤作用。将在10微升磷酸盐缓冲液中的 $2 \times 10^6$ 个TC-32或TC-71细胞接种进小鼠的腓肠肌中。在药物治疗前,允许所产生的肿瘤到达最小直径0.5cm。

[0079] 最常使用的甲福明剂量是500-1000mg/天,其产生血浆水平约1.1mg/升,相当于0.007mM。伊马替尼通常以在成年患者中400-600mg/天的剂量给药,此产生血液浓度约1000ng/mL,相当于1.7 $\mu$ M。如在Reagan-Shaw等人的2008,FASEB J., 22(3):659-661中所描述的计算在小鼠中的等效剂量。在小鼠中,甲福明的等效剂量是210-420mg/kg及伊马替尼的等效剂量是167-250mg/kg。在此研究中,基于在前述实施例2中所提出的体外结果,以组合每种药物的较低剂量可导致肿瘤细胞生长的协同抑制,对此初始动物研究来说,选择剂量300mg/kg/天的甲福明及50mg/kg/天的伊马替尼。

[0080] 对药物治疗来说,将小鼠划分成四组,每组15只动物,且如下治疗:(i)媒介物;(ii)单独甲福明,150mg/kg,每日两次通过口服灌食;(iii)单独伊马替尼,50mg/kg,每日一次通过腹膜内注射;及(iv)伊马替尼与甲福明组合。在给药前,将甲福明与伊马替尼二者溶解在无菌生理食盐水中。药物治疗连续二周。在开始治疗后,每五天进行非侵入性生物荧光成像以监视肿瘤生长,直到第21天。

[0081] 结果表明,在TC-32及TC-71异种移植小鼠模型二者中,甲福明与伊马替尼组合在二周治疗期间几乎完全抑制肿瘤生长。参见图3A及3B。此外,在这些动物中的肿瘤持续生长,其明显比在单一药物组或媒介物组的小鼠中的肿瘤慢。参见Id。该药物组合并无观察到急性或慢性毒性。

[0082] 在第21天时,让小鼠安乐死及解剖肿瘤以进行病理学检验。染色肿瘤组织,使用末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记(TUNEL)检测凋亡细胞的存在。使用ImageExpress自动显微镜,在10x物镜下获得肿瘤切片瘤段蒙太奇图像。以单盲方式手动计数具有TUNEL-阳性染色的细胞数目。

[0083] 结果显示出在TC-32及TC-71异种移植小鼠模型二者中,给药伊马替尼与甲福明组合导致3-5倍高的凋亡细胞数目(如与任一种药物单独在肿瘤组织中比较)。分别参见图4A及4B。对TC-32细胞来说,在用伊马替尼+甲福明治疗后所看见的TUNEL-阳性细胞数目明显高于对照,单独甲福明及单独伊马替尼(分别为 $p=0.002$ 、 $p=0.031$ 及 $p=0.025$ )。在TC-71细胞中,在用伊马替尼+甲福明治疗后所看见的TUNEL-阳性细胞数目也明显高于对照,单独

甲福明及单独伊马替尼(分别为 $p=0.002$ 、 $p=0.006$ 及 $p=0.043$ )。

[0084] 实施例5:经药物治疗的肿瘤细胞的基因表达分布图

[0085] 使用来自SuperArray Bioscience Corporation(Frederick,MD USA)的人类DNA损伤信号传导途径RT<sup>2</sup>-PCR阵列检验在经伊马替尼及伊马替尼/甲福明治疗的TC-32及TC-71细胞中的基因表达。该阵列检测与DNA损伤及DNA修复途径相关的一组84个基因的表达。在该阵列上包括管家基因(housekeeping genes)以标准化RNA量。如先前描述的分析所产生的数据。参见Rodriguez等人的2010,Breast Cancer Res.Treat.,123(1):189-196。

[0086] 检验在用伊马替尼或用伊马替尼加甲福明治疗12小时的TC-32细胞及TC-71细胞中的基因表达。

[0087] 在TC-32细胞中,9个基因的表达因伊马替尼治疗而明显地向上调节,同时由伊马替尼与甲福明的组合抑制。该9个基因是DNA-依赖性蛋白质激酶催化亚单位(PRKDC)、DNA连接酶4(LIG4)、N-甲基嘌呤-DNA糖苷酶(MPG)、 $\beta$ 细胞骨架肌动蛋白(ACTB)、DNA糖苷酶/AP裂解酶Nei12(NEIL2)、DNA错配修复蛋白质(MLH1)、复制蛋白A3(RPA3)、阿塔辛(Ataxin)3(ATXN3)、DNA切除修复蛋白质ERCC-5(ERCC5)。这些基因充当DNA修复基因并参与二种正规修复途径,即,通过非同源性末端接合(NHEJ)的DNA双链修复及通过同源重组(HR)的DNA双链修复。

[0088] 转至TC-71细胞,在这些细胞中鉴别出11个基因,其由伊马替尼明显地向上调节并且由伊马替尼与甲福明的组合抑制。该11个基因是核苷酸切除修复同系物MMS19(MMS19)、LIG4、 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M)、复制因子C激活剂1(RFC1)、聚ADP-核糖聚合酶2(PARP2);乳房癌2,早期发作(BRCA2);三个启动修复核酸外切酶(prime repair exonuclease)1(TREX1)、着色性干皮病互补C组(XPC)、UV切除修复蛋白质RAD23同系物A(RAD23A)、A/G特异腺嘌呤DNA糖苷酶(MUTYH)、及APEX核酸酶多功能DNA修复酶(APEX1)。这些基因也富含于上述提及的相同二种正规途径,即,由NHEJ及HRDNA双链修复中。

[0089] 值得注意的是,LIG4是一种经由NHEJ的DNA双链断裂修复必需的基因,其是在TC-32细胞及TC-71细胞二者中鉴别出由伊马替尼向上调节并且由伊马替尼加甲福明抑制的唯一基因。

[0090] 不受理论限制,这些结果表明,将甲福明加入至细胞将抑制DNA内源性修复途径,其中该途径将响应于伊马替尼引发的DNA损伤而升高。此两种药物在引发DNA损伤及抑制DNA修复上的结合作用可解释伊马替尼与甲福明的协同作用。

[0091] 实施例6:升高的基因表达与临床结果的相关性

[0092] 使用Ohal1肉瘤数据集(Ohal1等人,2004,Oncogene,23(55):8997-9006)探索在上述实施例5的RT<sup>2</sup>-PCR阵列研究中所鉴别出的19个高度表达的基因的临床关联性。该数据集包括来自20个尤因肉瘤样品(14个原发位置肿瘤及6个转移性样品)的基因表达信息、和与临床结果有关的相应信息。临床结果包括死亡、转移及复发。结果显示在下列表3中。

[0093] 表3基因表达水平与临床结果的相关性

[0094]

基因	倍数差异 <sup>a</sup>	相关的临床结果
ACTB	3.881	死亡
B2M	4.347	5年复发

MLH1	1.139	转移
PRKDC	3.576	5年复发
XPC	1.675	5年复发
APEX1	2.396	5年复发
ERCC5	1.561	3年复发
MMS19	1.398	5年复发
RAD23A	1.570	3年复发

[0095] <sup>a</sup>在差的结果样品对好的结果样品中的基因表达的倍数差异。

[0096] 结果表明,在来自具有差的预后的患者的样品中,所检验的19个基因的9个明显向上调节(如与来自具有好的预后的患者的样品比较)。

[0097] 其它实施方案

[0098] 在此专利说明书中所公开了的全部特征可以任何组合进行组合。在此专利说明书中所公开的每个特征可由提供相同、同等或类似目的的可替代的特征替代。因此,除非其它方面有明确地描述,否则所公开的每个特征仅是同等或类似特征的一般系列的实例。

[0099] 本领域技术人员可从上述说明容易地查明本发明的基本特征,并且可以在不背离其精神及范围的情况下对本发明形成多种改变及更改以使其适应多种用途及条件。因此,其它实施方案也在所附权利要求书的范围内。

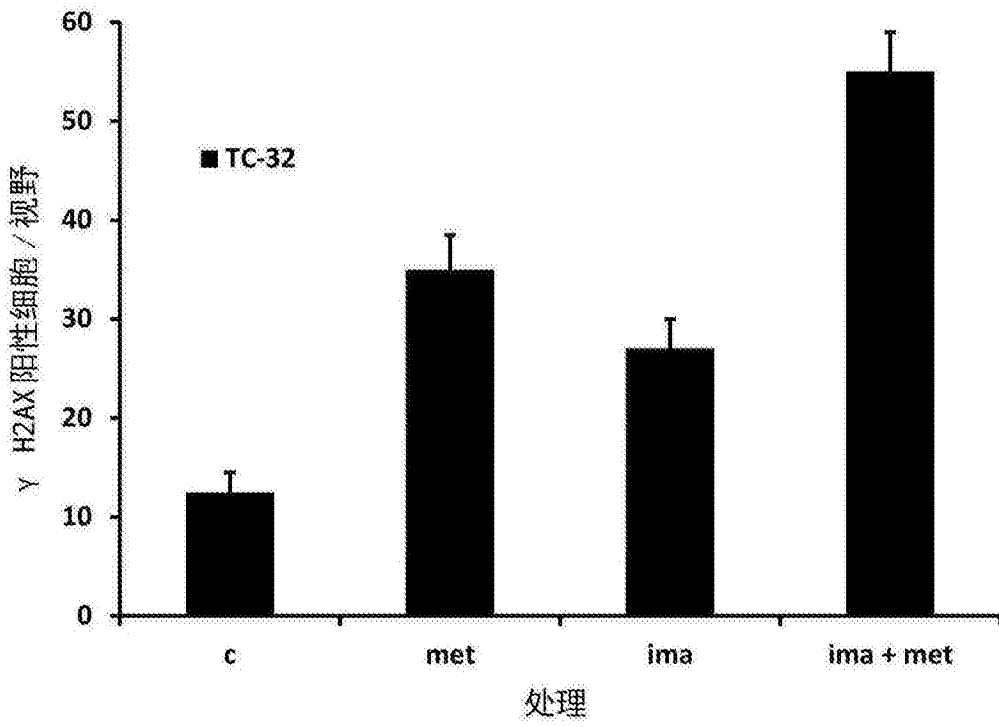


图1A

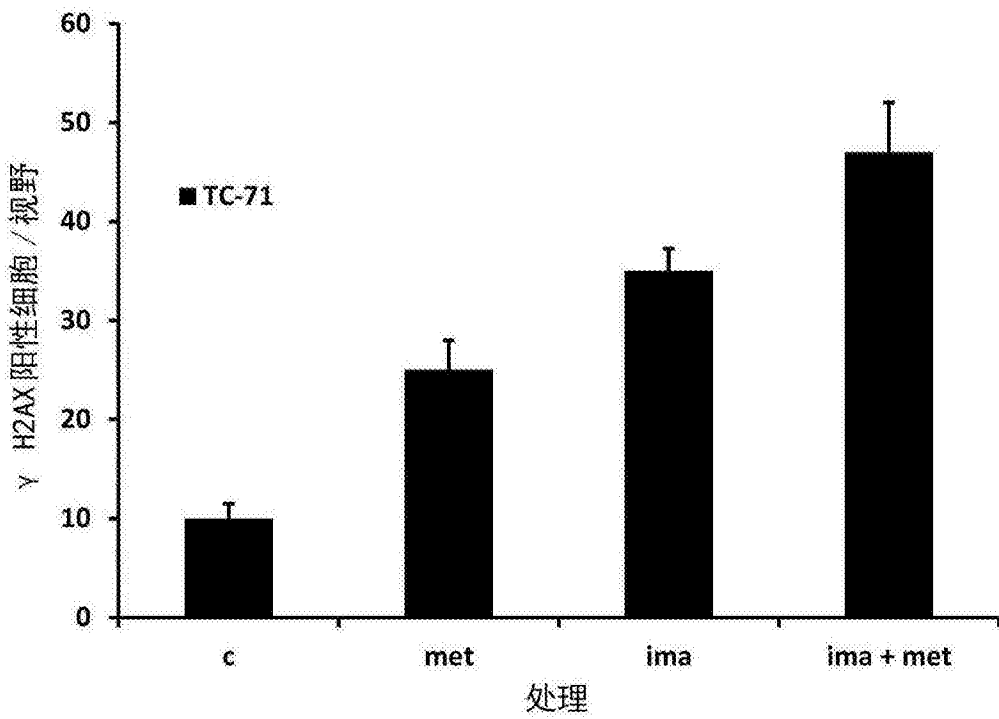


图1B

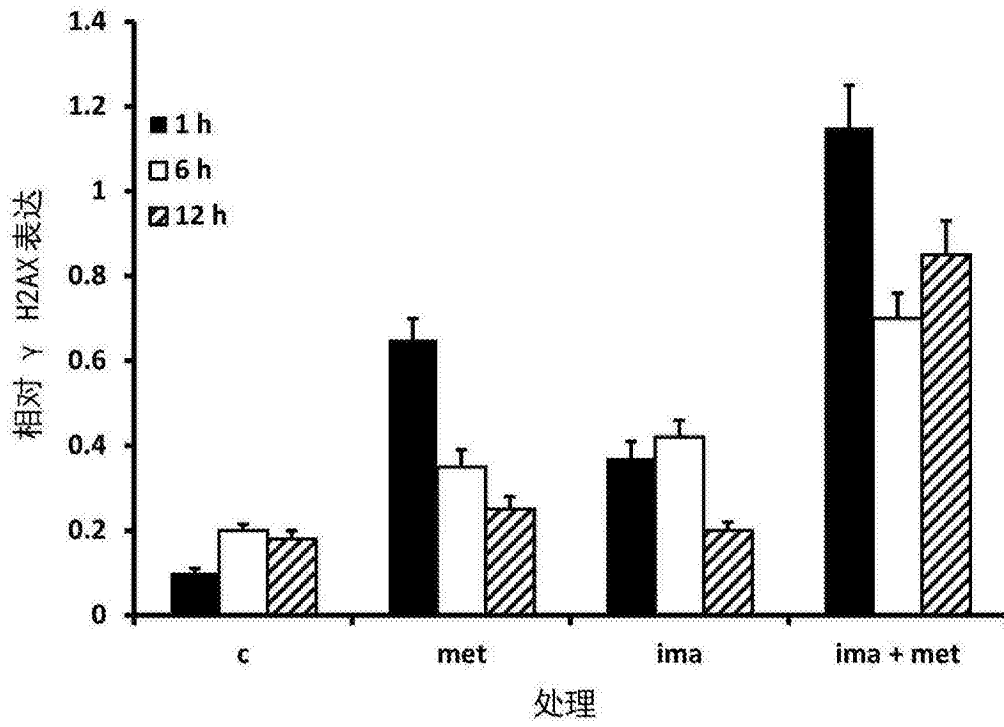


图2A

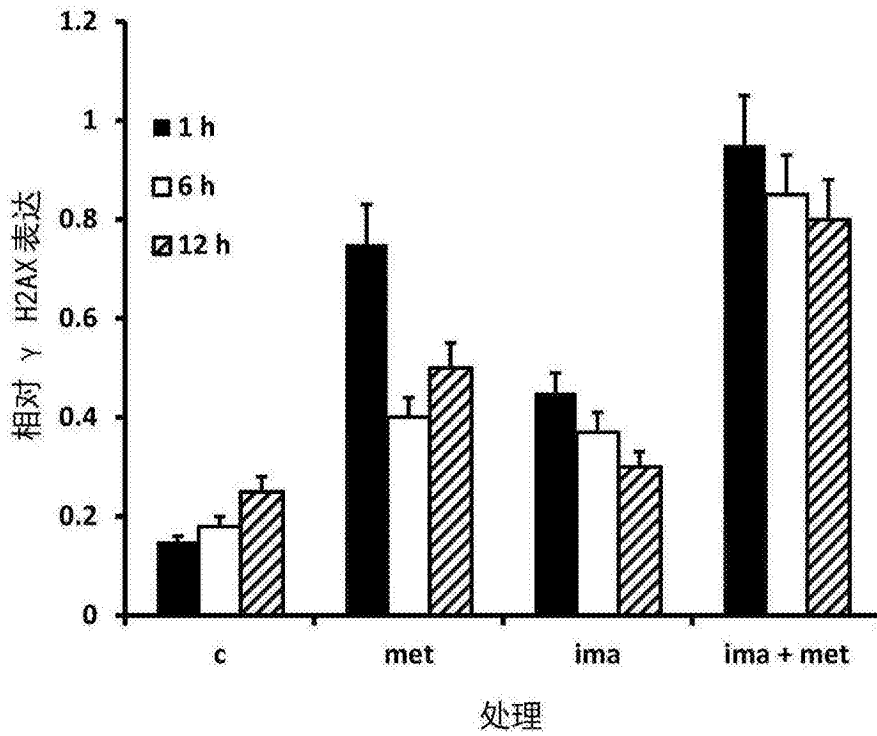


图2B

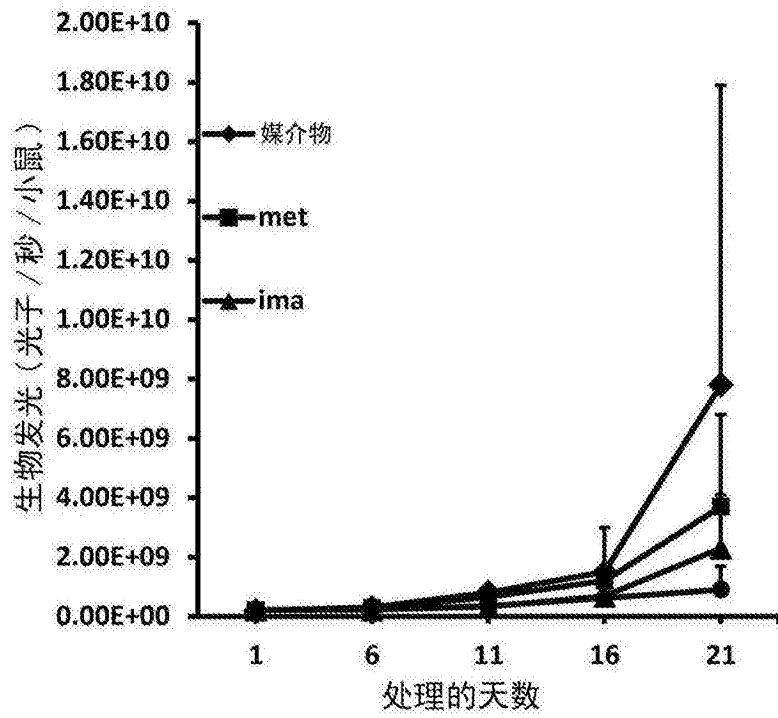


图3A

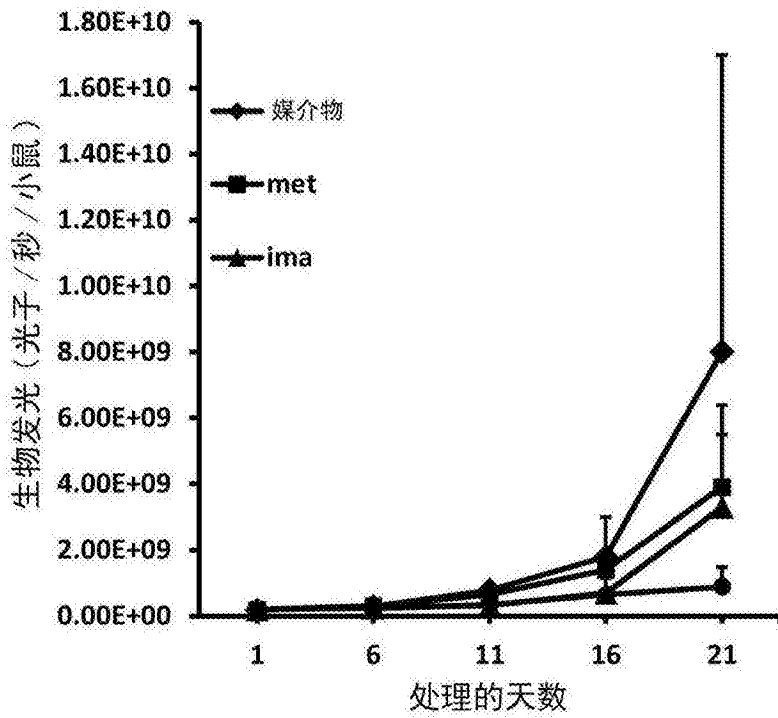


图3B

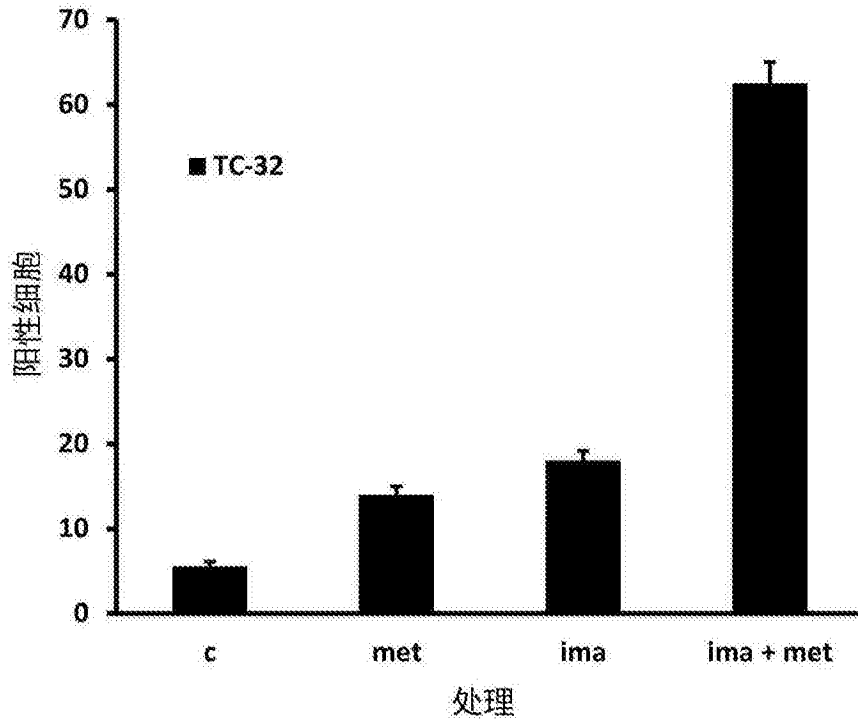


图4A

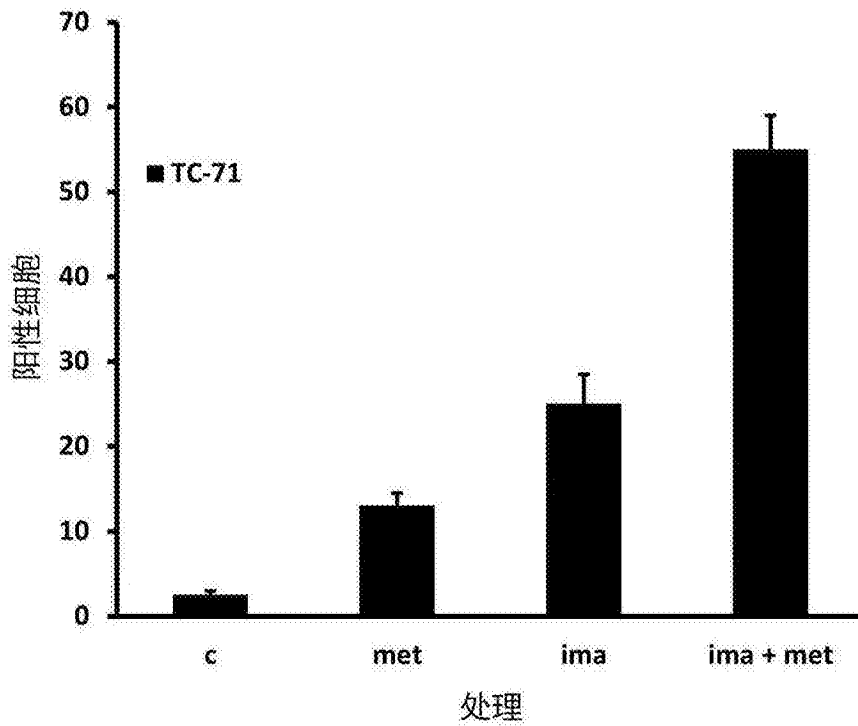


图4B