

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102458443 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

- (21) 申请号 201080031866. 9 A61K 38/20 (2006. 01)
- (22) 申请日 2010. 05. 13 A61P 1/00 (2006. 01)
- (30) 优先权数据 A61P 37/08 (2006. 01)
61/177, 724 2009. 05. 13 US A61P 37/00 (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日
2012. 01. 13
- (86) PCT申请的申请数据
PCT/US2010/034816 2010. 05. 13
- (87) PCT申请的公布数据
W02010/132725 EN 2010. 11. 18
- (71) 申请人 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校
地址 美国北卡罗来纳
- (72) 发明人 N·E·沙普尔斯 P·J·罗伯茨
K·K·王 Y·刘 S·约翰逊
- (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 王磊
- (51) Int. Cl.
A61K 38/18 (2006. 01)
A61K 38/17 (2006. 01)

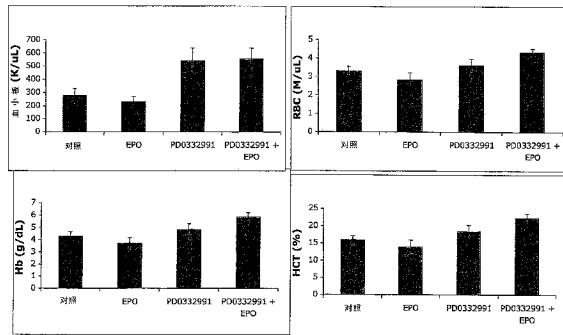
权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 24 页

(54) 发明名称

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂及使用方法

(57) 摘要

本发明公开的主题涉及保护健康细胞免受归因于DNA损伤剂的损伤的方法和组合物。具体地,本发明公开的主题涉及向已暴露于或有风险暴露于DNA损伤的个体给予的选择性细胞周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂的保护作用。



1. 一种增加毒性降低剂在需要治疗的个体中的效力的方法,所述方法包括:
提供个体,所述个体已暴露于、正暴露于或有风险暴露于 DNA 损伤剂或事件;
向所述个体给予毒性降低剂;以及
向所述个体给予药学有效量的选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述毒性降低剂为化疗毒性降低剂。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述毒性降低剂为辐射毒性降低剂。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述毒性降低剂包括一种或多种选自以下组中的物质:生长因子、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、聚乙二醇化 G-CSF、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、血小板生成素、红细胞生成素、聚乙二醇化红细胞生成素、白介素(IL)-12、青灰因子、角质形成细胞生长因子或者上述物质的衍生物。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物在所述个体内的一种或多种细胞中诱导药理性静止。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述一种或多种细胞各自选自血液细胞、血液干细胞和血液前体细胞。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之前、在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件的同时、或者在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后约 24 至约 48 小时之间向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。
9. 一种在需要治疗的个体的非血液细胞或组织暴露于 DNA 损伤剂或事件之前或之后缓解所述细胞或组织中的 DNA 损伤的方法,所述方法包括向所述个体给予药学有效量的选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述非血液细胞或组织包括来自以下组成的组中的一种的细胞或组织:肾、肠、心脏、肝、脑、甲状腺、皮肤、肠粘膜、听觉系统、肺、膀胱、卵巢、子宫、睾丸、肾上腺、胆囊、胰、胰岛、胃、血管、骨及它们的组合。
11. 一种减少或抑制需要治疗的个体中的记忆 T 细胞增殖的方法,所述方法包括向所述个体给予药学有效量的对所述个体选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述个体患有或有风险发展自身免疫病或变应性疾病。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述自身免疫病或变应性疾病选自系统性红斑性狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、自身免疫性关节炎、硬皮病、溶血性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性粒性白细胞减少、I 型糖尿病、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、银屑病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、风湿性多肌痛、葡萄膜炎、免疫性肺炎、自身免疫性肝炎、免疫性肾炎、免疫性肾小球肾炎、多发性硬化、自身免疫性神经病、白癜风、盘状狼疮、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性脉管炎、皮炎、外在和内在反应性呼吸道疾病(哮喘)、重症肌

无力、自身免疫性卵巢衰竭、恶性贫血、艾迪生病、自身免疫性甲状旁腺功能减退以及不适当的细胞免疫应答的其他综合征。

14. 一种减少或抑制需要治疗的个体中的 B 细胞祖细胞增殖的方法,所述方法包括向所述个体给予药理学有效量的对所述个体选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述个体患有或有风险发展自身免疫病或变应性疾病。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述自身免疫病或变应性疾病选自系统性红斑性狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎 (RA)、硬皮病、溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、获得性血友病、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、肺出血肾炎综合征、冷和温凝集素病、冷球蛋白血症以及不适当的抗体生成的综合征。

17. 一种缓解需要治疗的个体的自身免疫病或变应性疾病的方法,所述方法包括向所述个体给予药理学有效量的选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物,其中所述化合物减少或抑制记忆 T 细胞增殖、B 细胞祖细胞增殖、或者记忆 T 细胞增殖与 B 细胞祖细胞增殖。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述自身免疫病或变应性疾病选自系统性红斑性狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎 (RA)、自身免疫性关节炎、硬皮病、溶血性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性粒性白细胞减少、I 型糖尿病、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、银屑病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、风湿性多肌痛、葡萄膜炎、免疫性肺炎、自身免疫性肝炎、免疫性肾炎、免疫性肾小球肾炎、多发性硬化、自身免疫性神经病、白癜风、盘状狼疮、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性脉管炎、皮炎、外在和内在反应性呼吸道疾病 (哮喘)、重症肌无力、自身免疫性卵巢衰竭、恶性贫血、艾迪生病、自身免疫性甲状旁腺功能减退、不适当的细胞免疫应答的其他综合征、肺出血肾炎综合征、冷和温凝集素病、冷球蛋白血症以及不适当的抗体生成的综合征。

19. 一种治疗需要治疗的个体的癌症的方法,其中所述癌症的特征是升高的细胞周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2) 活性水平或者是降低的视网膜母细胞瘤抑癌蛋白或视网膜母细胞瘤家族成员蛋白的表达,所述方法包括向所述个体给予药理学有效量的选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物在癌细胞中不诱导药理性静止。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物提高癌细胞对 DNA 损伤剂的敏感性。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述敏感性的提高增加癌细胞死亡。

23. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述升高的 CDK2 活性水平与 MYC 原癌基因扩增或过量表达有关。

24. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述升高的 CDK2 活性水平与细胞周期蛋白 E1、细胞周期蛋白 E2 或细胞周期蛋白 A 的过量表达有关。

25. 如权利要求 19 所述的方法,其中给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物

缓解与暴露于 DNA 损伤剂或事件相关的血液毒性。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之前、在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件的同时、或者在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

27. 如权利要求 25 所述的方法,其中在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后约 24 至约 48 小时之间向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

28. 一种缓解个体中的化疗诱导或放疗诱导的血液起源或非血液起源的继发性恶性肿瘤的方法,所述方法包括向所述个体给予药理有效量的选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6) 的化合物。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其中在所述个体接受化疗或基于辐射的疗法以治疗原发性恶性肿瘤之前或期间向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本发明公开的主题基于 2009 年 5 月 13 日提交的美国临时申请序列号 61/177,724 并要求其权益；其公开整体援引加入本文。

[0003] 政府权利

[0004] 本发明公开的主题利用由 National Institutes of Health 经 National Institute on Aging 拨款的 Grant No. 2R01AG024379-06 美国政府资助得以完成。因此,美国政府享有本发明公开的主题的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明公开的主题涉及保护健康细胞免受 DNA 损伤和增加诸如生长因子的毒性降低剂 (toxicity reducing agent) 的效力的方法和组合物。此外,本发明公开的主题涉及通过阻断某些免疫细胞的增殖来治疗自身免疫病的方法和组合物。特别地,本发明公开的主题涉及使用选择性细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6 (CDK4/6) 抑制剂在哺乳动物个体内的某些干细胞和祖细胞群体中诱导药理性静止,从而增强该个体的临床结果。

[0006] 缩写

[0007]

% = 百分比

μg = 微克

μL = 微升

μM = 微摩尔浓度

2BrIC = 2-溴-12,13-二氢-5H-吲哚并[2,3-a]吡咯并[3,4]-咪唑-5,6-二酮

BM = 骨髓

BM-MNC = 骨髓单核细胞

BrdU = 5-溴-2-脱氧尿苷

[0008]

BUN	=	血尿素氮(blood area nitrogen)
CAFC	=	鹅卵石区形成细胞
CBC	=	全血细胞计数
CDK	=	细胞周期蛋白依赖性激酶
CDK4/6	=	细胞周期蛋白依赖性激酶 4 和/或细胞周期蛋白依赖性激酶 6
CLP	=	淋巴共同祖细胞
CMP	=	髓共同祖细胞
CNS	=	中枢神经系统
DMEM	=	达尔伯克改良伊格尔培养基
DMSO	=	二甲基亚砷
DNA	=	脱氧核糖核酸
DOX	=	多柔比星
EPO	=	红细胞生成素
Etop	=	依托泊苷
FACS	=	荧光激活细胞分选术
FBS	=	胎牛血清
g	=	克
GC	=	生发中心
G-CSF	=	粒细胞集落刺激因子
GEMM	=	基因工程小鼠模型
GM-CSF	=	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
GMP	=	粒细胞-单核细胞祖细胞
Gy	=	戈瑞
h	=	小时
HPLC	=	高效液相层析
HSC	=	造血干细胞
HSPC	=	造血干细胞和造血祖细胞
IC ₅₀	=	50%抑制浓度
IHC	=	免疫组织化学
IL	=	白介素

[0009]

IP	=	腹膜内
IR	=	电离辐射
ITP	=	特发性血小板减少性紫癜
kg	=	千克
LT-HSC	=	长期造血干细胞
MEP	=	巨核细胞-红细胞类祖细胞
mg	=	毫克
MPP	=	多能祖细胞
nM	=	纳摩尔浓度
NP-CGG	=	硝基苯乙酰-鸡 γ 球蛋白
PD	=	6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮(也称为 PD 0332991)
RA	=	类风湿性关节炎
RB	=	视网膜母细胞瘤抑癌蛋白
RLU	=	相对光单位
SEM	=	平均标准误差
SLE	=	系统性红斑性狼疮
ST-HSC	=	短期造血干细胞
Sv	=	西弗特
tHDF	=	调聚的人二倍体成纤维细胞
TTP	=	血栓性血小板减少性紫癜

背景技术

[0010] 癌症的治疗常包括使用 DNA 损伤性药物和 / 或其他 DNA 损伤性物质, 如电离辐射。这些治疗对于正常的快速分裂细胞可以是非特异性和有毒的, 特别是在高剂量下。这常在接受癌症治疗的患者中引起各种副作用。

[0011] 例如, 骨髓抑制 (骨髓中血细胞生成严重降低) 是此类副作用之一。它的特征是骨髓抑制 (贫血、中性白细胞减少症、粒细胞缺乏症和血小板减少) 和淋巴细胞减少。中性白细胞减少症的特征是循环嗜中性粒细胞数的选择性降低和对细菌感染的易感性提高。在美国, 贫血 (红细胞或红血球数、血红蛋白量或红细胞压积 (通过测定血细胞比容表征) 降低) 影响约 67% 的接受化疗的癌症患者。参见 BioWorld Today, 第 4 页, 2002 年 7 月 23 日。血小板减少症是血小板数降低伴有出血易感性增高。淋巴细胞减少症是化疗的常见副作用, 其特征是循环淋巴细胞 (也称为 T- 细胞和 B- 细胞) 数量降低。淋巴细胞减少症患者

者易受到多种感染。

[0012] 因此,医生通常必须平衡化疗和放疗技术在破坏异常增殖细胞中的效力与相关的对正常细胞的细胞毒性效应。因此,化疗和放疗技术的治疗指数变窄,常导致不完全的肿瘤缩小、肿瘤复发、增加肿瘤负荷以及诱导抗化疗和 / 或抗辐射肿瘤。

[0013] 已设计了各种方法以努力减少正常组织损伤,同时仍递送有效治疗剂量的 DNA 损伤剂。关于 IR,这些技术包括近距离照射、分次和高分次剂量给药、复杂剂量调度和递送系统、以及用线性加速器的高压治疗。然而,这类技术仅试图取得辐射的治疗效果和期望的效果之间的平衡,而并未实现完全效力。

[0014] 小分子已用来减轻某些化疗化合物的一些副作用。例如,亚叶酸已用来缓解甲氨蝶呤 (methotrexate) 对骨髓细胞和对胃肠道粘膜细胞的效应。氨磷汀已用来减轻接受烷基化或含铂化疗剂的患者中性白细胞减少症相关的发热和粘膜炎的发病。此外,右雷佐生已用来提供对于蒽环类抗癌化合物的心脏保护。不幸的是,许多化疗保护剂例如右雷佐生和氨磷汀在相伴给药时存在可能降低化疗效力的问题。

[0015] 其他化疗保护治疗包括使用生长因子。造血生长因子可在市场上以重组蛋白的形式得到。这些蛋白包括粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 及它们用于治疗中性白细胞减少症的衍生物,以及红细胞生成素 (EPO) 及其用于治疗贫血的衍生物。然而,虽然生长因子可以加速一些血液细胞系的恢复,但是它们不治疗血小板、巨噬细胞、T- 细胞或 B- 细胞的抑制。

[0016] 已证明非选择性激酶抑制剂星形孢菌素在一些培养的细胞类型中防止 DNA 损伤剂。参见 Chen et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 1999-2008 (2000); 和 Ojeda et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 663-667 (1992)。星形孢菌素是天然产物,并且是高亲和性地结合大多数哺乳动物激酶的非选择性激酶抑制剂。参见 Karaman et al., *Nat. Biotechnol.*, 26, 127-132 (2008)。取决于细胞类型、药物浓度和暴露时间长度,星形孢菌素治疗可以引发一系列细胞反应,包括细胞凋亡、细胞周期停滞和细胞周期关卡破坏 (compromise)。例如,已证明星形孢菌素通过几种报道的机制 (包括消除 G2 关卡反应) 使细胞对 DNA 损伤剂例如电离辐射和化疗敏感 (参见 Bernhard et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 69, 575-584 (1996); Teyssier et al., *Bull. Cancer*, 86, 345-357 (1999); Hallahan et al., *Radiat. Res.*, 129, 345-350 (1992); Zhang et al., *J. Neurooncol.*, 15, 1-7 (1993); Guo et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 82, 97-109 (2006); Bucher and Britten, *Br. J. Cancer*, 98, 523-528 (2008); Laredo et al., *Blood*, 84, 229-237 (1994); Luo et al., *Neoplasia*, 3, 411-419 (2001); Wang et al., *Yao Xue Xue Bao*, 31, 411-415 (1996); Chen et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 1999-2008 (2000); 和 Hirose et al., *Cancer Res.*, 61, 5843-5849 (2001))。尚不清楚星形孢菌素治疗在一些培养的细胞类型中防止 DNA 损伤剂的机制,所提出的几种可能的机制包括抑制蛋白激酶 C 或降低 CDK4 蛋白水平。参见 Chen et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 1999-2008 (2000); 和 Ojeda et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 663-667 (1992)。已证明星形孢菌素对造血祖细胞无效应,已证明恰在暴露于 DNA 损伤剂之后使用星形孢菌素不能提供保护。此外,在向哺乳动物体内给药后,星形孢菌素的非选择性激酶抑制产生与其对细胞周期的效应无关的显著毒性 (例如高血糖),并且这些毒性已阻止其临床使用。

[0017] 因此,仍然需要实用的方法以保护预定接受、有风险接受或已经接受 DNA 损伤剂和 / 或事件暴露的个体,以及增加毒性降低剂的效力的方法。此外,仍然需要通过阻断免疫细胞的增殖来治疗自身免疫病的方法和组合物。

[0018] 发明概述

[0019] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种增加毒性降低剂在需要治疗的个体中的效力的方法,所述方法包括:提供个体,所述个体已暴露于、正暴露于或有风险暴露于 DNA 损伤剂或事件;向所述个体给予毒性降低剂;以及向所述个体给予药学有效量的选择性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) 的化合物。

[0020] 在一些实施方案中,所述毒性降低剂为化疗毒性降低剂。在一些实施方案中,所述毒性降低剂为辐射毒性降低剂。

[0021] 在一些实施方案中,所述毒性降低剂包括一种或多种选自包括但不限于以下物质的组的物质:生长因子、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、聚乙二醇化 G-CSF、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、血小板生成素、红细胞生成素、聚乙二醇化红细胞生成素、白介素(IL)-12、青灰因子(steel factor)、角质形成细胞生长因子或者上述物质的衍生物。

[0022] 在一些实施方案中,所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物在所述个体内的一种或多种细胞中诱导药理性静止(pharmacologic quiescence)。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞各自选自包括以下细胞的组:血液细胞、血液干细胞和血液前体细胞。

[0023] 在一些实施方案中,在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之前、在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件的同时、或者在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。在一些实施方案中,在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后约 24 至约 48 小时之间向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0024] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种在需要治疗的个体的非血液细胞或组织暴露于 DNA 损伤剂或事件之前或之后缓解所述细胞或组织中的 DNA 损伤的方法,所述方法包括向所述个体给予药学有效量的选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。在一些实施方案中,所述非血液细胞或组织包括来自包括以下的组中的一种的细胞或组织:肾、肠、心脏、肝、脑、甲状腺、皮肤、肠粘膜、听觉系统、肺、膀胱、卵巢、子宫、睾丸、肾上腺、胆囊、胰、胰岛、胃、血管、骨及它们的组合。

[0025] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种减少或抑制需要治疗的个体中的记忆 T 细胞增殖的方法,所述方法包括向所述个体给予药学有效量的对所述个体选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0026] 在一些实施方案中,所述个体患有或有风险发展自身免疫病或变应性疾病。在一些实施方案中,所述自身免疫病或变应性疾病选自包括以下疾病的组:系统性红斑性狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、自身免疫性关节炎、硬皮病、溶血性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性粒性白细胞减少、I 型糖尿病、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、银屑病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、风湿性多肌痛、葡萄膜炎、免疫性肺炎、自身免疫性肝炎、免疫性肾炎、免疫性肾小球肾炎、多发性硬化、自身免疫性神经病、白癜风、盘状狼疮、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免

疫性心肌炎、自身免疫性脉管炎、皮炎、外在和内在反应性呼吸道疾病（哮喘）、重症肌无力、自身免疫性卵巢衰竭、恶性贫血、艾迪生病、自身免疫性甲状旁腺功能减退以及不适当的细胞免疫应答的其他综合征。

[0027] 在一些实施方案中，本发明公开的主题提供一种减少或抑制需要治疗的个体中的 B 细胞祖细胞增殖的方法，所述方法包括向所述个体给予药学有效量的对所述个体选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0028] 在一些实施方案中，所述个体患有或有风险发展自身免疫病或变应性疾病。在一些实施方案中，所述自身免疫病或变应性疾病选自系统性红斑性狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎 (RA)、硬皮病、溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、获得性血友病 (acquired inhibitors in hemophilia)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、肺出血肾炎综合征、冷和温凝集素病 (cold and warm agglutin disease)、冷球蛋白血症以及不适当的抗体生成的综合征。

[0029] 在一些实施方案中，本发明公开的主题提供一种缓解需要治疗的个体的自身免疫病或变应性疾病的方法，所述方法包括向所述个体给予药学有效量的选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物，其中所述化合物减少或抑制记忆 T 细胞增殖、B 细胞祖细胞增殖、或者记忆 T 细胞增殖与 B 细胞祖细胞增殖。

[0030] 在一些实施方案中，所述自身免疫病或变应性疾病选自包括以下疾病的组：系统性红斑性狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎 (RA)、自身免疫性关节炎、硬皮病、溶血性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性粒性白细胞减少、I 型糖尿病、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、银屑病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、风湿性多肌痛、葡萄膜炎、免疫性肺炎、自身免疫性肝炎、免疫性肾炎、免疫性肾小球肾炎、多发性硬化、自身免疫性神经病、白癜风、盘状狼疮、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性脉管炎、皮炎、外在和内在反应性呼吸道疾病（哮喘）、重症肌无力、自身免疫性卵巢衰竭、恶性贫血、艾迪生病、自身免疫性甲状旁腺功能减退、不适当的细胞免疫应答的其他综合征、肺出血肾炎综合征、冷和温凝集素病、冷球蛋白血症以及不适当的抗体生成的综合征。

[0031] 在一些实施方案中，本发明公开的主题提供一种治疗需要治疗的个体的癌症的方法，其中所述癌症的特征是升高的细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2) 活性水平或者是降低的视网膜母细胞瘤抑癌蛋白或视网膜母细胞瘤家族成员蛋白的表达，所述方法包括向所述个体给予药学有效量的选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0032] 在一些实施方案中，所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物在癌细胞中不诱导药理性静止。在一些实施方案中，所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物提高癌细胞对 DNA 损伤剂的敏感性。在一些实施方案中，所述敏感性的提高增加癌细胞死亡。

[0033] 在一些实施方案中，所述升高的 CDK2 活性水平与 MYC 原癌基因扩增或过量表达有关。在一些实施方案中，所述升高的 CDK2 活性水平与细胞周期蛋白 E1、细胞周期蛋白 E2 或细胞周期蛋白 A 的过量表达有关。

[0034] 在一些实施方案中，给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物缓解与暴露于 DNA 损伤剂或事件相关的血液毒性。在一些实施方案中，给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物缓解与暴露于 DNA 损伤剂或事件相关的长期毒性，如继发性恶性肿瘤和

脊髓发育不良。

[0035] 在一些实施方案中,在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之前、在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件的同时、或者在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。在一些实施方案中,在所述个体暴露于所述 DNA 损伤剂或事件之后约 24 至约 48 小时之间向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0036] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种缓解个体中的化疗诱导或放疗诱导的血液起源或非血液起源的继发性恶性肿瘤的方法,所述方法包括向所述个体给予药理有效量的选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。在一些实施方案中,在所述个体接受化疗或基于辐射的疗法以治疗原发性恶性肿瘤之前或期间向所述个体给予所述选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0037] 本发明公开的主题的目的是提供通过向个体给予有效量的选择性 CDK4/6 抑制剂化合物来保护所述个体中的健康细胞免受 DNA 损伤剂的影响和治疗某些疾病状况的方法。

[0038] 结合下文充分描述的附图,随着进一步描述,上文已述并通过本发明公开的主题全部或部分地实现的本发明公开的主题的目的,以及其他目的会变得显而易见。

附图说明

[0039] 图 1 :CDK4/6 抑制增强红细胞生成素介导的 DNA 损伤之后类红细胞谱系的恢复的效力。向辐照 (6.5Gy) 的野生型小鼠 (FVB/n) 群组 (8 只小鼠每群组) 给予安慰剂、红细胞生成素 (EPO)、CDK4/6 抑制剂 (PD0332991) 或者 CDK4/6 抑制剂与 EPO 的组合 (PD0332991+EPO)。在治疗之后的第 17 天进行连续取血,并且进行全血细胞计数以测定红细胞、各种白细胞亚群和血小板的数量。处理对血小板的影响如左上角的图所示,红细胞 (RBC) 在右上角的图中,血红蛋白 (Hb) 在左下角的图中,而血细胞比容 (HCT) 在右下角的图中。误差棒代表 \pm SEM。

[0040] 图 2A :CDK4/6 抑制在原代人肾近端小管上皮细胞中诱导 G₁ 停滞。用不同浓度的 PD0332991 处理 16 小时的原代人肾近端小管上皮细胞的细胞周期分析的代表性直方图。将细胞收获、固定、染色并通过流式细胞术分析。利用来自 Verity (Verity Software House, Topsham, Maine, United States of America) 的 Mod-Fit™ 软件拟合数据。增加 CDK4/6 抑制剂的浓度产生“完全 (clean)”G₁ 停滞,没有细胞毒性的证据。

[0041] 图 2B :CDK4/6 抑制在原代人肾近端小管上皮细胞中诱导 G₁ 停滞。用不同浓度的 PD0332991 处理 16 小时的原代人肾近端小管上皮细胞的细胞周期分析。将细胞收获、固定、染色并通过流式细胞术分析。利用来自 Verity (Verity Software House, Topsham, Maine, United States of America) 的 Mod-Fit™ 软件拟合数据。G₁ (菱形)、G₂/M (方形) 和 S (三角形) 中的细胞的相应%如图上所示。

[0042] 图 3 :CDK4/6 抑制阻断原代人肾近端小管上皮细胞的增殖。将细胞用不同浓度的 PD0332991 处理 72 小时。培养之后,利用 CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, United States of America) 定量细胞增殖。数据代表 4 个重复的平均值 (相对光单位, RLU) \pm 标准差。

[0043] 图 4 :CDK4/6 抑制在原代人肾近端小管上皮细胞中抑制依托泊苷诱导的 DNA 损

伤。将细胞用 PD0332991 预处理 16 小时,然后用依托泊苷 (Etop) 预处理 8 小时。将细胞收集、固定、用抗 γ H2AX FITC 染色并通过流式细胞术分析。利用 FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, Oregon, United States of America) 分析数据。 γ H2AX 阳性细胞的%如附图所示。

[0044] 图 5 :CDK4/6 抑制保护原代人肾近端小管上皮细胞免受依托泊苷诱导的细胞死亡。PD0332991 以 cdk4/6 依赖性方式抑制化疗诱导的细胞毒性。将原代人肾近端小管上皮细胞与 30nM 或 100nM PD0332991 培养 16 小时。加入依托泊苷 (Etop, 2.5 μ M), 保持 8 小时。培养之后,用新鲜培养基替换该培养基,并且将所述细胞培养额外的 7 天。在第 7 天,利用 CellTiter-Glo $\text{\textcircled{R}}$ (Promega, Madison, Wisconsin, United States of America) 评价细胞增殖。误差棒示出 \pm 标准差。

[0045] 图 6 :CDK4/6 抑制在用顺铂处理的小鼠中阻断 EdU 掺入全肾。在腹膜内 (IP) 注射顺铂 (10mg/kg) 之前 1 小时将小鼠通过口腔管饲用 PD0332991 (150mg/kg) 处理。处死之前每 24 小时 IP 给予 EdU (100 μ g/ 小鼠)。采集肾,制备单细胞分离物并染色 EdU 掺入。通过流式细胞术评价增殖。数据代表未处理、顺铂处理和顺铂 /PD0332991 处理的细胞中 EdU 染色的%。

[0046] 图 7 :CDK4/6 抑制在用顺铂处理的小鼠中保护肾功能。单独用顺铂 (10mg/kg IP) 处理 (方形)、单独用 PD0332991 (150mg/kg PO) 处理 (菱形) 或者在顺铂 (10mg/kg) 之前立即用 PD0332991 (150mg/kg PO) (三角形) 处理小鼠群组。在第 7 天通过 mg/dL 的血尿素氮 (BUN) 和 mg/dL 的血清肌酸酐 (血清 Cr) 的定量来测量肾功能。数据代表 6 只动物每群组的平均值 \pm 平均标准误差。

[0047] 图 8 :CDK4/6 抑制增强 Rb 缺陷细胞的增殖。将 RB 缺失 (H69, H82, H209, H345) 或具有完整 RB (H417) 的小细胞肺癌细胞系与 PD0332991 培养 24 小时。培养之后,替换培养基,并且使该细胞生长 7 天。利用 WST-1 试剂评价细胞增殖。每个数据点代表 4 个重复的平均值 \pm SEM。CDK4/6 抑制提高 RB 缺陷细胞系的细胞增殖。

[0048] 图 9 :CDK4/6 抑制在 RB 缺陷乳腺癌的小鼠模型中增强化疗的效力。在 3 周中每 7 天用单独的 PD0332991 (150mg/kg PO)、单独的卡铂 (90mg/kg IP) 或卡铂联合 PD0332991 (卡铂 +PD0332991) 处理小鼠。数据为肿瘤体积的%变化,并且代表至少 15 只动物每群组的平均值 \pm SEM。

[0049] 图 10 :CDK4/6 抑制在 RB 缺陷乳腺癌的小鼠模型中增强化疗的效力。在 3 周中每 7 天用单独的卡铂 (90mg/kg IP) (深色阴影方形) 或联合 PD0332991 (150mg/kg PO; 浅色阴影方形) 处理小鼠。数据为肿瘤体积的%变化,并且代表至少 15 只动物每群组的平均值 \pm SEM。

[0050] 图 11A :CDK4/6 的急性抑制在小鼠中选择性阻抑记忆 T 细胞稳态增殖。用 PD0332991 (150mg/kg 通过口腔管饲) 处理小鼠。利用 BrdU 和流式细胞术评价 T- 细胞的增殖。

[0051] 图 11B :示出图 11A 所示的 T- 细胞增殖数据所示的数据的图。

[0052] 图 11C :CDK4/6 的急性抑制在小鼠中选择性阻抑生发中心形成。用 PD0332991 (150mg/kg 通过口腔管饲) 处理小鼠。通过 Ki67 免疫组织化学评价生发中心形成。

[0053] 图 12 :作为人免疫抑制剂的 CDK4/6 抑制剂。测试 CDK4/6 抑制剂作为人免疫抑制剂的实验设计。

[0054] 图 13 :当通过 TCR 途径刺激时 CDK4/6 抑制剂阻抑记忆和幼稚(**naïve**)区室的 T 细胞增殖。利用 Automacs 通过 CD3 阳性选择纯化人外周血 T 细胞,然后用 CDK4/6 抑制剂处理并用 PMA 和肌霉素刺激 48hr。通过 BrdU+ 或 Ki-67+ 细胞的 FACS 染色测量 PMA 和肌霉素刺激之后记忆 (CD45RA+) 或幼稚 T 细胞的增殖。示出抑制的百分比,其显示记忆区室的抑制多于幼稚区室。

[0055] 图 14 :当通过 TCR 途径刺激时 CDK4/6 抑制剂阻抑 T 细胞增殖。当通过 TCR 途径刺激时 T 细胞具有更活跃的增殖,这被 CDK4/6 抑制所阻止。在 CD8+ 区室中也观察到相似抑制。通过 BrdU 或 Ki67 掺入测定增殖。L4D = 2BrIC, 误差棒示出 +/-SEM。

[0056] 图 15 :CDK4/6 抑制之后 CD4T 细胞组成的变化。当通过 TCR 途径刺激时 CDK4/6 抑制剂阻抑 T 细胞增殖。示出中枢记忆 (CCR7-CD45RA-)、效应记忆 (CCR7+CD45RA+)、幼稚 (CCR7+CD45RA+) 和终末分化 T 细胞 (CCR7-CD45RA+)。如通过 BrdU 掺入所评价的, CDK4/6 抑制之后记忆和终末分化 T 细胞分数减少。L4D = 2BrIC。CD8+ 区室中的相似结果。

[0057] 图 16 :CDK4/6 抑制之后 CD4T 细胞组成的变化。当通过 TCR 途径刺激时 CDK4/6 抑制剂阻抑 T 细胞增殖。示出中枢记忆 (CCR7-CD45RA-)、效应记忆 (CCR7+CD45RA+)、幼稚 (CCR7+CD45RA+) 和终末分化 T 细胞 (CCR7-CD45RA+)。如通过 Ki67 染色所评价的, CDK4/6 抑制之后记忆和终末分化 T 细胞分数减少。L4D = 2BrIC。

[0058] 图 17A :CD4+T 细胞中记忆 T 细胞和 TD 细胞增殖的优先抑制。示出中枢记忆 (CCR7-CD45RA-)、效应记忆 (CCR7+CD45RA+)、幼稚 (CCR7+CD45RA+) 和终末分化 T 细胞 (CCR7-CD45RA+)。所示处理的代表性流式点图:媒介物 (DMSO)、PD0332991 或 2BrIC。

[0059] 图 17B :CD4+T 细胞中记忆 T 细胞和 TD 细胞增殖的优先抑制。示出图 17A 所示数据的记忆 T 细胞 / 幼稚 T 细胞的比例的图。CDK4/6 抑制之后记忆和终末分化 T 细胞分数减少。L4D = 2BrIC。误差棒示出 +/-SEM。

[0060] 图 17C :CD4+T 细胞中记忆 T 细胞和 TD 细胞增殖的优先抑制。图量化图 17A 所示数据的 T 细胞的%。CDK4/6 抑制之后记忆和终末分化 T 细胞分数减少。误差棒示出 +/-SEM。

[0061] 图 18 :CD8+T 细胞中记忆 T 细胞和 TD 细胞增殖的优先抑制。示出中枢记忆 (CCR7-CD45RA-)、效应记忆 (CCR7+CD45RA+)、幼稚 (CCR7+CD45RA+) 和终末分化 T 细胞 (CCR7-CD45RA+)。CDK4/6 抑制之后记忆和终末分化 T 细胞分数减少。L4D = 2BrIC。

[0062] 图 19 :记忆 T 细胞和 TD 细胞增殖的优先抑制。CDK4/6 抑制剂抑制通过 PMA 和离子霉素的 T 细胞活化。用 PMA 和离子霉素刺激纯化的人外周 T 细胞,有或无 CDK4/6 抑制剂处理。通过 FACS 测量刺激时活化的 T 细胞 (CD25+) 分数。发现 CDK4/6 抑制剂处理之后 T 细胞活化减少。L4D = 2BrIC。

[0063] 图 20 :通过 BCR 刺激之后 CDK4/6 抑制剂阻抑 B 细胞增殖。通过 CD19+ 细胞的 Automacs 选择来纯化 B 细胞。在有或无 CDK4/6 抑制剂处理的抗 IgM 刺激之后测定纯化的人外周 B 细胞的 BrdU 掺入。L4D 抑制之后增殖 B 细胞的分数减少~ 10 倍。L4D = 2BrIC。

[0064] 图 21 :CDK4/6 抑制阻断 T 和 B 细胞增殖。将动物用 CDK4/6 抑制剂 (PD0332991, 空心棒) 或媒介物 (实心棒) 处理 24 小时并安乐死。分离脾细胞并染色 B 和 T 细胞标志。达到适当的群体之后,进行 Ki67 染色作为增殖和 S 期的指示物。误差棒示出 +/-SEM。

[0065] 图 22 :CDK4/6 抑制剂阻断 B- 细胞增殖。将动物用 CDK4/6 抑制剂 (150mg/kg 通过每天口腔管饲) 或媒介物处理 4 天, 并且用饮用水中的 BrdU 处理 3 天。BrdU 处理之后, 使动物安乐死。分离脾细胞并染色 B 细胞标志。达到适当的群体之后, 进行 BrdU 染色作为增殖的指示物。

[0066] 图 23 :CDK4/6 抑制剂阻断胸腺作用 (Thymopoiesis)。将动物用 CDK4/6 抑制剂 (150mg/kg 通过每天口腔管饲) 或媒介物处理 4 天, 然后通过双阴性 (DN :CD4-CD8-)、双阳性 (DP :CD4+CD8+) 或者 CD4 或 CD8 单阳性细胞的流式细胞术评价胸腺细胞数目。CDK4/6 抑制导致新 DP 细胞生成的显著减少, 对 DN 和 SP 分数有适度影响。

[0067] 发明详述

[0068] 参考所附的实施例 (其中给出代表性的实施方案), 在下文中更充分地描述本发明公开的主题。但是, 本发明公开的主题可以以不同的形式体现, 而不应解释为受限于本文列举的实施方案。更确切地, 提供这些实施方案以使本公开充分且完整, 并且这些实施方案会向本领域技术人员充分传达本发明的实施方案的范围。

[0069] 除非另外限定, 本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所述主题所属领域的技术人员的通常理解相同的含义。本文提及的所有出版物、专利申请、专利及其他文献整体援引加入本文。

[0070] 在整个说明书和权利要求中, 特定的化学式或化学名应包括所有活性的旋光异构体和立体异构体, 以及外消旋混合物 (若存在此类异构体和混合物)。

[0071] I. 定义

[0072] 虽然我们认为本领域技术人员完全理解以下术语, 但是为了便于说明本发明公开的主题解释以下定义。

[0073] 遵循长期的专利法常规, 术语“一个 (a)”、“一个 (an)”和“这个 (the)”在本申请包括权利要求中使用是指“一个 (种) 或多个 (种)”。因此, 例如, 提及“化合物”或“细胞”包括多个这样的化合物或细胞等。

[0074] 与“包括”“含有”或“特征是”同义的术语“包含”是包容性或开放性的, 并且不排除额外的未列举的元素或方法步骤。“包含”是用于权利要求语言的专门术语, 其表示所列举的元素是必不可少的, 但是可以加入其他元素, 并且仍然形成权利要求的范围内的构成。

[0075] 在本文中使用时, 短语“由... 组成”排除权利要求中未指明的任何元素、步骤或成分。当短语“由... 组成”出现在权利要求的主体的条款中而不是紧接在序言之后时, 其仅限制该条款所列出的元素; 其他元素并未从整个权利要求排除。

[0076] 在本文中使用时, 短语“基本上由... 组成”将权利要求的范围限制在指定的物质或步骤, 加上不会实质上影响所要求保护的主题的基本和新特征的物质或步骤。

[0077] 关于术语“包含”、“由... 组成”和“基本上由... 组成”, 当本文中使用时这三个术语中的一个时, 本发明公开和要求保护的主体可以包括另外两个术语的使用。

[0078] 术语“和 / 或”, 当用于描述两种项目或情况, 例如 CDK4 和 / 或 CDK6 时, 是指两种项目或情况均存在或均适用的情况, 以及仅所述项目或情况之一存在或适用的情况。因此, CDK4 和 / 或 CDK6 抑制剂可以是抑制 CDK4 和 CDK6 的化合物、仅抑制 CDK4 的化合物或者仅抑制 CDK6 的化合物。

[0079] “健康细胞”或“正常细胞”是指个体中的不表现出疾病 (例如但不限于癌症或其

他增殖性疾病)的特征、症状和/或标志的任何细胞。在一些实施方案中,所述健康细胞是干细胞。在一些实施方案中,所述健康细胞是造血干细胞或造血祖细胞(HSPC)。祖细胞包括但不限于长期造血干细胞(LT-HSC)、短期造血干细胞(ST-HSC)、多能祖细胞(MPP)、髓共同祖细胞(CMP)、淋巴共同祖细胞(CLP)、粒细胞-单核细胞祖细胞(GMP)以及巨核细胞-红细胞类祖细胞(MEP)。祖细胞还可以包括来源于造血干细胞的成熟效应细胞,包括但不限于红细胞、血小板、粒细胞、巨噬细胞、T-细胞以及B-细胞。

[0080] 在一些实施方案中,所述健康细胞是非造血组织中的细胞,例如但不限于肝、肾、胰、脑、肺、肾上腺、小肠、肠、胃、皮肤、听觉系统、骨、膀胱、卵巢、子宫、睾丸、胆囊、甲状腺、心脏、胰岛、血管等。

[0081] 本文中“DNA损伤剂或事件”是指DNA损伤性化合物以及DNA损伤的其他效应物(例如,电离辐射)。因此,DNA损伤剂或事件可以包括为了特定目的,例如但不限于医学目的(例如,治疗癌症或与细胞的过度增殖相关的其他疾病)所提供的化疗和辐射治疗。DNA损伤剂和事件还可以涉及偶然暴露于DNA损伤性化合物和/或其他物质,例如其可以由于意外的环境暴露而发生(例如,在工作场所或另一环境中由于例如化学物质溢出、化学或放射性废物的不适当的处理或其他不适当的操作、使用DNA损伤性化学物质或辐射期间安全措施和/或个人防护装备故障、恐怖袭击、战争、或者工业和/或核电厂事故)。

[0082] 在本文中使用时,术语“电离辐射”是指当被细胞和组织吸收时典型地诱导反应性氧物质(species)形成和DNA损伤的具有足够能量的辐射。电离辐射可以包括X-射线、 γ 射线和粒子轰击(例如,中子束、电子束、质子、介子等),其应用的目的包括但不限于医学试验和治疗、科学用途、工业试验、生产和灭菌,以及武器和武器开发。辐射通常以吸收剂量单位例如拉德或戈瑞(Gy),或者以剂量当量的单位例如雷姆或西弗特(Sv)进行量度。

[0083] “有风险暴露于DNA损伤剂或事件”是指预定(例如预定的放疗或化疗疗程)在将来暴露于DNA损伤剂或事件的个体,或者有机会在将来无意地暴露于DNA损伤剂或事件的个体。无意的暴露包括意外的或无计划的环境或职业暴露(例如,放射性或化学武器恐怖袭击、化学物质溢出或辐射泄露或者在战场上暴露于放射性或化学武器)。

[0084] 在本文中使用时,术语“癌症”是指由不受控制的细胞分裂和细胞转移或者在其他部位形成新生物(new growth)的能力导致的疾病。术语“恶性肿瘤”、“瘤”、“肿瘤”及其变体是指癌细胞或癌细胞组。

[0085] 癌症的具体类型包括但不限于皮肤癌、结缔组织癌、脂肪癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、肛殖癌(anogenital cancer)、肾癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、头颈癌、脑癌、中枢神经系统(CNS)癌、视网膜癌、血癌和淋巴瘤。

[0086] 在一些实施方案中,术语癌症是指特征是(例如,具有细胞,其表现出)升高的CDK2活性水平或者降低的视网膜母细胞瘤抑癌蛋白或视网膜母细胞瘤家族成员蛋白(例如但不限于p107和p130)表达的癌症。升高的CDK2活性水平或者降低的视网膜母细胞瘤抑癌蛋白或视网膜母细胞瘤家族成员蛋白表达可以是例如与正常细胞相比升高或降低。在一些实施方案中,升高的CDK2活性水平可以与MYC原癌基因扩增或过量表达有关(例如,可以由MYC原癌基因扩增或过量表达所导致或伴随着MYC原癌基因扩增或过量表达观察到)。在一些实施方案中,升高的CDK2活性水平可以与细胞周期蛋白E1、细胞周期蛋白E2或细胞周期蛋白A的过量表达有关。

[0087] 在本文中使用时,术语“化疗”是指用细胞毒性化合物(例如但不限于 DNA 损伤性化合物)来减低或消除不期望的细胞(例如但不限于癌细胞)的生长或增殖的治疗。因此,在本文中使用时,“化疗化合物”是指用于治疗癌症的细胞毒性化合物。所述化合物的细胞毒性效应可以但不必须是以下的一种或多种效应的结果:核酸嵌入或结合、DNA 或 RNA 烷基化、抑制 RNA 或 DNA 合成、抑制另一种核酸相关的活性(例如,蛋白合成)或任何其他细胞毒性效应。

[0088] 因此,“细胞毒性化合物”可以是也称为“抗肿瘤”剂或“化疗剂”的化合物中的一种或任何组合。此类化合物包括但不限于 DNA 损伤性化合物和可以杀死细胞的其他化学物质。“DNA 损伤性化合物”包括但不限于烷化剂、DNA 嵌入剂、蛋白合成抑制剂、DNA 或 RNA 合成抑制剂、DNA 碱基类似物、拓扑异构酶抑制剂和端粒酶抑制剂或结合端粒 DNA 的化合物。例如,烷化剂包括烷基磺酸酯,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如 benzodizopa、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替派;乙烯亚胺和甲基蜜胺类,例如六甲蜜胺、三亚乙基密胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲噻胺;氮芥类,例如苯丁酸氮芥、荼氮芥、环磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、胆固醇苯乙酸氮芥、泼尼莫司汀、曲磷胺和乌拉莫司汀;以及亚硝基脲类,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀。

[0089] 用于治疗癌症的抗生素包括:放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、硫酸博来霉素、丝裂霉素、普卡霉素和链佐星。化疗抗代谢药包括:巯嘌呤、硫鸟嘌呤、克拉屈滨、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷、阿糖胞苷、喷司他丁、甲氨蝶呤和硫唑嘌呤、阿昔洛韦、腺嘌呤 β -1-D-阿拉伯糖苷、甲氨蝶呤(amethopterin)、氨蝶呤、2-氨基嘌呤、阿非科林、8-氮鸟嘌呤、偶氮丝氨酸、6-氮尿嘧啶、2'-叠氮-2'-脱氧核苷、5-溴脱氧胞苷、胞嘧啶 β -1-D-阿拉伯糖苷、重氮氧正亮氨酸(diazooxynorleucine)、双脱氧核苷类、5-氟脱氧胞苷、5-氟脱氧尿苷和羟基脲。

[0090] 化疗蛋白合成抑制剂包括:相思豆毒蛋白、金精三羧酸、氯霉素、大肠杆菌素 E3、环己酰亚胺、白喉毒素、伊短菌素 A、依米丁、红霉素、乙硫氨酸、氟化物、5-氟色氨酸、夫西地酸、鸟苷酰亚甲基二磷酸(guanylyl methylene diphosphonate)和鸟苷酰亚胺二磷酸(guanylyl imidodiphosphate)、卡那霉素、春雷霉素、黄色霉素和 O-甲基苏氨酸。其他蛋白合成抑制剂包括:蒴莲根毒蛋白、新霉素、正缬氨酸、密旋霉素、巴龙霉素、嘌呤霉素、蓖麻毒蛋白、志贺毒素、焦土霉素、司帕霉素、大观霉素、链霉素、四环素、硫链丝菌肽和甲氧苄啶。DNA 合成抑制剂包括:烷化剂,例如硫酸二甲酯、丝裂霉素 C、氮芥和硫芥;嵌入剂,例如吖啶染料、放线菌素类、阿霉素、葱类、苯并芘、溴乙啶、二碘化丙啶-缠绕剂(propidium diiodide-intertwining);及其他物质,例如偏端霉素和纺锤菌素。拓扑异构酶抑制剂(例如香豆霉素、荼啶酸、新生霉素和奥索利酸);细胞分裂抑制剂(包括秋水仙酰胺、秋水仙碱、长春碱和长春新碱);以及 RNA 合成抑制剂(包括放线菌素 D、 α -鹅膏蕈碱及其他真菌鹅膏蕈毒素、蛹虫草菌素(3'-脱氧腺苷)、二氯呋喃核糖基苯并咪唑、利福平、曲张链菌素和利迪链菌素)也可以用作 DNA 损伤性化合物。

[0091] 因此,其毒性效应可被本发明公开的选择性 CDK4/6 抑制剂缓解的现有化疗化合物包括但不限于:阿霉素、5-氟尿嘧啶(5FU)、依托泊苷、喜树碱、放线菌素-D、丝裂霉素、顺铂、过氧化氢、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、

亚硝基脲、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素、他莫昔芬、紫杉醇、反铂、长春碱和甲氨蝶呤等。

[0092] “毒性降低剂”是指用于降低物质或事件（例如但不限于 DNA 损伤剂或事件）的细胞毒性效应的化合物或其他物质。在一些实施方案中，毒性降低剂是除了选择性抑制一种或多种细胞周期蛋白依赖性激酶的化合物之外的化合物。毒性降低剂是在用 DNA 损伤剂或事件处理或以其他方式暴露于 DNA 损伤剂或事件的细胞、组织或个体中防止或减少 DNA 损伤的物质。毒性降低剂所引起的 DNA 损伤的防止或减少可以影响个体中的某些细胞（例如，某些健康的），但是在个体中的其他细胞（例如，疾病和 / 或肿瘤细胞）中不提供任何效应。因此，使用毒性降低剂可以保护个体中的某些细胞以便在疾病治疗方案中允许更频繁或更高剂量使用 DNA 损伤剂。在一些实施方案中，毒性降低剂降低归因于使用化疗剂的不期望的细胞毒性。在一些实施方案中，毒性降低剂可以降低辐射所导致的不期望的细胞毒性。

[0093] 在一些实施方案中，毒性降低剂为生长因子或其他天然存在的化合物，或者它们的衍生物。在一些实施方案中，毒性降低剂选自包括但不限于以下物质的组：生长因子、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、聚乙二醇化 G-CSF、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、血小板生成素、红细胞生成素、聚乙二醇化红细胞生成素、白介素 (IL)-12、青灰因子、角质形成细胞生长因子或者上述物质的衍生物（例如，具有基于上述毒性降低剂之一的结构的化学修饰的化合物，例如烷基化或酯化衍生物）。

[0094] “增加毒性降低剂的效力”是指选择性 CDK4 和 / 或 CDK6 抑制剂增加毒性降低剂的效力的能力。因此，该术语可以指毒性降低剂和选择性 CDK4 和 / 或 CDK6 抑制剂的组合的有益用途。例如，使用该组合可以导致与单独给予毒性降低剂（或选择性 CDK4 和 / 或 CDK6 抑制剂）时个体会具有的耐受性相比，个体对给定剂量或给定频率给予 DNA 损伤剂或事件的更高的耐受性。使用该组合可以提供更高水平的保护免受 DNA 损伤性事件所引起的副作用（例如但不限于骨髓抑制的更大降低或发生继发性恶性肿瘤的更低概率）。使用该组合还可以提供保护免受归因于暴露于 DNA 损伤剂或事件的更大范围的副作用，和 / 或保护个体中更多类型的细胞和 / 或组织。例如，在一些实施方案中，选择性 CDK4 和 / 或 CDK6 抑制剂在与生长因子联用时可以提供协同效应以从 DNA 损伤剂或事件拯救和支持各种造血群体。

[0095] “化合物的药学有效量”是指在个体中有效提供有益结果的量。例如，其可以是有效降低或消除与 DNA 损伤剂或事件（例如，化疗或个体中的健康 HSPC 的其他暴露于细胞毒性化合物、或者 IR）相关的毒性的量。在一些实施方案中，有效量是暂时（例如，几小时或几天）抑制个体中的造血干细胞的增殖（即，在造血干细胞中诱导静止状态）所需的量。

[0096] 在一些实施方案中，选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物没有脱靶 (off-target) 效应。“没有”可以指选择性 CDK4/6 抑制剂化合物不具有不期望的或脱靶效应，特别是当其在体内使用或者通过基于细胞的测定进行评价时。因此，“没有”可以指选择性 CDK4/6 抑制剂不具有脱靶效应，例如但不限于长期毒性、抗氧化效应、雌激素效应、酪氨酸激酶抑制效应、对除 CDK4/6 之外的 CDK 的抑制效应；和 / 或非 CDK4/6 依赖性细胞中的细胞周期停滞。

[0097] “基本上没有”脱靶效应的选择性 CDK4/6 抑制剂是这样的 CDK4/6 抑制剂，其可以具有一些较小 (minor) 的脱靶效应，所述脱靶效应不干扰所述抑制剂提供对抗 CDK4/6 依赖

性细胞中的细胞毒性化合物的保护作用的能力。例如，“基本上没有”脱靶效应的 CDK4/6 抑制剂可以对其他 CDK 具有一些较小的抑制效应（例如，对 CDK1 或 CDK2 的 $IC_{50} > 0.5 \mu M$ ； $> 1.0 \mu M$ 或者 $> 5.0 \mu M$ ），只要所述抑制剂提供 CDK4/6 依赖性细胞中的选择性 G1 停滞。

[0098] “减轻”或“预防”或其语法变体分别是指，减少效应或者防止效应完全发生。“缓解”可以指减轻和 / 或预防。

[0099] “药理性静止”是指细胞周期的暂时停滞。

[0100] “有风险发展自身免疫病”是指因为以下原因疑似具有发展自身免疫病的可能性的个体，所述原因包括但不限于，例如，由于具有与自身免疫病相关的一种或多种遗传标记、具有自身免疫病的家族病史和 / 或已暴露于疑似触发自身免疫病的发生的环境物质。该术语还可以应用于先前已诊断患有自身免疫病但是在缓解期和 / 或目前无症状的个体。

[0101] 在一些实施方案中，本发明公开的主题中所治疗的个体期望是人个体，但是应当理解本文所述的方法对所有脊椎动物物种（例如，哺乳动物、鸟类等）有效，术语“个体”旨在包括所有脊椎动物物种。

[0102] 更具体地，本文提供哺乳动物的治疗，例如，人，以及由于濒危而具有重要性的那些哺乳动物（例如西伯利亚虎）、对人类具有经济重要性（为了供人食用而在农场饲养的动物）和 / 或社会重要性（作为宠物饲养或在动物园中饲养的动物）的那些哺乳动物，例如，除了人之外的食肉动物（例如猫和狗）、猪类（猪、肉猪和野猪）、反刍动物（例如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼）和马。因此，本文所述的方法的实施方案包括家畜的治疗，包括但不限于家养猪（猪和肉猪）、反刍动物、马等。

[0103] 在本文中使用时，术语“烷基”是指 C_{1-20} （含端值）、线性的（即，“直链的”）、支链的、或环状的、饱和的、或者至少部分不饱和的以及在一些情况中完全不饱和的（即，烯基和炔基）烃链，包括例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、辛基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、辛烯基、丁二烯基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基和丙二烯基基团。“支链的”是指其中低级烷基基团例如甲基、乙基或丙基与直链烷基链相连的烷基基团。“低级烷基”是指含有 1- 约 8 个碳原子，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的烷基基团（即 C_{1-8} 烷基）。“高级烷基”是指含有约 10- 约 20 个碳原子，例如 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子的烷基基团。在某些实施方案中，“烷基”特指 C_{1-8} 直链烷基。在其他实施方案中，“烷基”特指 C_{1-8} 支链烷基。

[0104] 烷基基团可以任选地由一个或多个烷基基团的取代基取代（“取代的烷基”），所述取代基可以相同或不同。术语“烷基基团的取代基”包括但不限于烷基、取代的烷基、卤代、芳基氨基、酰基、羟基、芳氧基、烷氧基、烷硫基、芳硫基、芳烷基氧基、芳烷基硫基、羧基、烷氧基羰基、氧代和环烷基。可以沿着烷基链任选地插入一个或多个氧原子、硫原子或者取代或未取代的氮原子，其中氮的取代基是氢、低级烷基（本文也称为“烷基氨基烷基”）或芳基。

[0105] 因此，在本文中使用时，术语“取代的烷基”包括本文定义的烷基基团，其中所述烷基基团的一个或多个原子或官能团被另外的原子或官能团（包括例如烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸酯和巯基）替代。

[0106] 本文使用的术语“芳基”是指芳香族部分，其可以是单个芳香环，或者稠合的、共价

连接的或连接至共有基团（例如但不限于亚甲基或亚乙基部分）的多个芳香环。所述共有的连接基团还可以是羰基（如在二苯甲酮中）、氧（如在二苯醚中）或氮（如在二苯胺中）。术语“芳基”具体地包括杂环芳香化合物。芳香环可以包括苯基、萘基、联苯基、二苯醚、二苯胺和二苯甲酮等。在特定的实施方案中，术语“芳基”是指含有约 5- 约 10 个碳原子（例如 5、6、7、8、9 或 10 个碳原子）并且包含 5 元- 和 6- 元烃和杂环芳香环的环状芳香基团。

[0107] 芳基基团可以任选地由一个或多个芳基基团的取代基取代（“取代的芳基”），所述取代基可以相同或不同，其中“芳基基团的取代基”包括烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳烷基氧基、羧基、羰基、酰基、卤代、硝基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、芳烷基氧基羰基、酰氧基、酰基氨基、芳酰基氨基、氨基甲酰基、烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳硫基、烷硫基、亚烷基和 $-NR' R''$ （其中 R' 和 R'' 可以各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和芳烷基）。

[0108] 因此，在本文中使用时，术语“取代的芳基”包括本文定义的芳基基团，其中所述芳基基团的一个或多个原子或官能团被另外的原子或官能团（包括例如烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸酯和巯基）替代。

[0109] 芳基基团的具体实例包括但不限于环戊二烯基、苯基、呋喃、噻吩、吡咯、吡喃、吡啶、咪唑、苯并咪唑、异噻唑、异噁唑、吡唑、吡嗪、三嗪、嘧啶、喹啉、异喹啉、吲哚、呋唑等。

[0110] 术语“杂芳基”是指其中芳香环或环的骨架中的至少一个原子是除碳以外的原子的芳基基团。因此，杂芳基基团含有一个或多个选自包括但不限于氮、氧和硫的非碳的原子。

[0111] 在本文中使用时，术语“酰基”是指其中羧基基团的 $-OH$ 已被另一个取代基替代的有机羧酸基团（即，由 $RCO-$ 表示，其中 R 是本文定义的烷基或芳基基团）。因此，术语“酰基”具体地包括芳基酰基基团，例如乙酰基呋喃和苯甲酰甲基基团。酰基基团的具体实例包括乙酰基和苯甲酰基。

[0112] “环状的”和“环烷基”是指含有约 3- 约 10 个碳原子（例如 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子）的非芳香的单环或多环体系。环烷基基团任选地可以是部分不饱和的。环烷基基团还可以任选地由本文定义的烷基基团的取代基、氧代和 / 或亚烷基取代。沿着环烷基链可以任选地插入一个或多个氧原子、硫原子或者取代或未取代的氮原子，其中氮的取代基是氢、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基，由此得到杂环基团。代表性的单环环烷基环包括环戊基、环己基和环庚基。多环的环烷基环包括金刚烷基、八氢萘基、萘烷、樟脑、蒽烷和降金刚烷基 (noradamantyl)。

[0113] 术语“杂环”或“杂环的”是指其中环状环的骨架碳原子中的一个或多个被杂原子（例如氮、硫或氧）替代的环烷基基团（即，上文所述的非芳香的环状基团）。杂环的实例包括但不限于四氢呋喃、四氢吡喃、吗啉、二氧杂环己烷、哌啶、哌嗪和吡咯烷。

[0114] “烷氧基 (alkoxy)”或“烷氧基 (alkoxy)”是指烷基 $-O-$ 基团，其中烷基如上所述。在本文中使用时，术语“烷氧基”可以指例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、叔丁氧基和戊氧基。术语“氧基烷基”可以与“烷氧基”互换使用。

[0115] “芳氧基 (aryloxy)”或“芳氧基 (aryloxy)”是指芳基 $-O-$ 基团，其中芳基基团如上所述，包括取代的芳基。在本文中使用时，术语“芳氧基”可以指苯氧基或己氧基，以及被

烷基、取代的烷基、卤代或烷氧基取代的苯氧基或己氧基。

[0116] “芳烷基”是指芳基-烷基-基团,其中芳基和烷基如上所述并且包括取代的芳基和取代的烷基。示例性芳烷基基团包括苄基、苯乙基和萘甲基。

[0117] “芳烷基氧基 (aralkyloxy)”或“芳烷基氧基 (aralkyloxy)”是指芳烷基-O-基团,其中所述芳烷基基团如上所述。示例性芳烷基氧基基团是苄氧基。

[0118] 术语“氨基”是指-NR'R”基团,其中R'和R”各自独立地选自包括以下基团的组: H以及取代和未取代的烷基、环烷基、杂环、芳烷基、芳基和杂芳基。在一些实施方案中,氨基基团是-NH₂。“氨基烷基”和“氨基芳基”是指-NR'R”基团,其中分别地,R'如上文关于氨基所定义的,R”是取代或未取代的烷基或芳基。

[0119] “酰氨基”是指酰基-NH-基团,其中酰基如上所述。

[0120] 术语“羰基”是指-(C=O)-,或者与上文命名的母体基团的碳原子连接的成双键的氧取代基。

[0121] 术语“羧基”是指-COOH基团。

[0122] 在本文中使用时,术语“卤代”、“卤化物”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘基团。

[0123] 术语“羟基 (hydroxyl)”和“羟基 (hydroxy)”是指-OH基团。

[0124] 术语“氧代”是指其中碳原子被氧原子替代的上文已述的化合物。

[0125] 术语“氰基”是指-CN基团。

[0126] 术语“硝基”是指-NO₂基团。

[0127] 术语“硫代”是指其中碳或氧原子被硫原子替代的上文已述的化合物。

[0128] II. 防止 DNA 损伤剂或事件的化合物和方法

[0129] 组织特异性干细胞和其他定居增殖细胞的亚群能够自我更新,意指它们能够在整个成年哺乳动物寿命中通过被调节的复制进行自我更新。此外,干细胞不对称地分裂产生“子代”细胞或“祖”细胞,其继而产生特定器官的各种组分。例如,在造血系统中,造血干细胞产生祖细胞,其继而产生血液的所有分化的组分(例如,白细胞、红细胞、淋巴细胞和血小板)。

[0130] 本发明公开的主题部分涉及成年哺乳动物中早期造血干细胞/祖细胞(HSPC)和其他增殖细胞的特定生化需求。具体地,已发现为了细胞复制,诸如HSPC的某些特定增殖细胞需要增殖性激酶细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)和/或细胞周期蛋白依赖性激酶6(CDK6)的酶活性。相比之下,成年哺乳动物中的绝大多数增殖细胞不需要CDK4和/或CDK6(即,CDK4/6)的活性。这些分化的细胞可以通过利用其他增殖性激酶例如细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)或细胞周期蛋白依赖性激酶1(CDK1)在CDK4/6活性不存在的情况下增殖。因此,认为用选择性CDK4/6抑制剂处理哺乳动物可以导致抑制诸如HSPC的非常有限的细胞区室中的增殖(即,药理性静止)。例如,用选择性CDK4/6抑制剂PD 0332991短暂处理(例如但不限于在少于48、24、20、16、12、10、8、6、4、2或1小时的时间中)使造血干细胞及其相关的造血祖细胞静止。人们相信静止的细胞比增殖细胞对DNA损伤剂或事件的细胞毒性效应更具抗性。

[0131] 因此,在一些实施方案中,本发明公开的主题提供通过用无毒性的选择性CDK4/6抑制剂(例如但不限于口服可利用的无毒性的CDK4/6抑制剂)短暂(例如但不限于在少于48、24、20、16、12、10、8、6、4、2或1小时的时间中)处理迫使造血干细胞和造血祖细胞

(HSPC) 进入静止状态来保护哺乳动物免受化疗化合物的急性和慢性的毒性效应的方法。在静止期中, 个体的 HSPC 对化疗化合物的某些效应更具抗性。用所述抑制剂处理停止之后, HSPC 从此暂时静止期中恢复, 然后正常发挥功能。因此, 用选择性 CDK4/6 抑制剂处理可以提供显著的骨髓保护, 并且可以使化疗和 / 或放疗后的外周血细胞计数 (血细胞比容、血小板、淋巴细胞和髓样细胞) 更快速地恢复。

[0132] Davis 等人的美国专利第 6, 369, 086 号 (下称“‘086 专利”) 看来描述: 选择性 CDK 抑制剂可以用于限制细胞毒性剂的毒性并且可以用来防止化疗诱导的脱发。具体地, ‘086 专利描述了作为特异性 CDK2 抑制剂的羟吡啶化合物。相关的期刊文献 (参见 Davis et al., *Science*, 291, 134-137 (2001)) 看来描述: CDK2 的抑制产生细胞周期停滞, 降低上皮细胞对细胞周期活性的抗肿瘤药的敏感性, 并且可以预防化疗诱导的脱发。但是, 该期刊文献由于不可再现结果而后被撤回。不同于这些标榜的选择性 CDK2 抑制剂的保护效应 (通过撤回所述期刊文章而对其质疑), 在一些实施方案中, 本发明公开的主题涉及保护 HSPC 和防止血液毒性。

[0133] 保护干细胞 / 祖细胞的能力在癌症治疗中以及在缓解意外暴露于或过量使用细胞毒性化学物质、辐射或其他 DNA 损伤剂的效应中均是期望的。选择性 CDK4/6 抑制剂的保护效应可以通过用所述抑制剂预处理 (即, 预定用 DNA 损伤剂治疗或有风险暴露于 DNA 损伤剂的个体的预先 CDK4/6 抑制剂治疗), 用 CDK4/6 抑制剂与 DNA 损伤剂同时治疗, 或者用 CDK4/6 抑制剂后治疗 (即, 在暴露于 DNA 损伤剂之后用 CDK4/6 抑制剂治疗) 来向个体提供。因此, 在一些实施方案中, 本发明公开的方法涉及选择性 CDK4/6 抑制剂化合物向正接受或将接受化疗化合物或辐射治疗的个体提供保护的用途, 以及保护个体免受对细胞毒性化合物和 / 或辐射的其他暴露的用途。

[0134] 在本文中使用时, 术语“选择性 CDK4/6 抑制剂化合物”是指这样的化合物, 其选择性抑制 CDK4 和 CDK6 中的至少一种, 或者其主要的作用模式是通过抑制 CDK4 和 / 或 CDK6。因此, 选择性 CDK4/6 抑制剂是这样的化合物, 其一般具有比对其他激酶更低的对 CDK4 和 / 或 CDK6 的 50% 抑制浓度 (IC_{50})。在一些实施方案中, 所述选择性 CDK4/6 抑制剂对其他 CDK (例如 CDK1 和 CDK2) 的 IC_{50} 可以是所述化合物对 CDK4 或 CDK6 的 IC_{50} 的至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 倍。在一些实施方案中, 所述选择性 CDK4/6 抑制剂对其他 CDK 的 IC_{50} 可以是所述化合物对 CDK4 或 CDK6 的 IC_{50} 的至少 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 倍。在一些实施方案中, 所述选择性 CDK4/6 抑制剂对其他 CDK 的 IC_{50} 可以是所述化合物对 CDK4 或 CDK6 的 IC_{50} 的 100 倍以上或 1000 倍以上。在一些实施方案中, 所述选择性 CDK4/6 抑制剂化合物是选择性抑制 CDK4 和 CDK6 的化合物。在一些实施方案中, 所述 CDK4/6 抑制剂不是天然存在的化合物 (例如, 异黄酮)。在一些实施方案中, 所述 CDK4/6 抑制剂是一种或多种酪氨酸激酶的较差的抑制剂 (例如, $> 1 \mu M$ 体外 IC_{50})。在一些实施方案中, 所述 CDK4/6 抑制剂是丝氨酸和 / 或苏氨酸激酶的高效抑制剂。在一些实施方案中, 所述 CDK4/6 抑制剂是较差的 CDK1 抑制剂 (例如, (例如, $> 1 \mu M$ 体外 IC_{50})。在一些实施方案中, 所述 CDK4/6 抑制剂的特征是与 CDK1 相比具有 10 倍或 50 倍或 100 倍或更大的抑制 CDK4 或 CDK6 的相对效力。

[0135] 在一些实施方案中, 所述选择性 CDK4/6 抑制剂化合物是选择性诱导 CDK4/6 依赖性细胞中的 G1 细胞周期停滞的化合物。因此, 当按照本发明公开的方法用所述选择性

CDK4/6 抑制剂化合物处理时,处于 G1 期的 CDK4/6 依赖性细胞的百分比升高,而处于 G2/M 期和 S 期的 CDK4/6 依赖性细胞的百分比降低。在一些实施方案中,所述选择性 CDK4/6 抑制剂是这样的化合物,其诱导 CDK4/6 依赖性细胞中的基本上纯粹的 (pure) (即“完全的”) G1 细胞周期停滞 (例如,其中用所述选择性 CDK4/6 抑制剂处理诱导细胞周期停滞,以致按照标准方法 (例如,碘化丙锭染色或其他) 测定,大多数的细胞停滞于 G1,处于 G2/M 和 S 期的细胞群体合计为总细胞群体的 20%、15%、12%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少)。

[0136] 虽然已报告非特异性激酶抑制剂星形孢菌素在一些细胞类型中间接地诱导 G1 停滞 (参见 Chen et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 92, 1999-2008 (2000)), 但是选择性 CDK4/6 抑制剂可以直接且选择性地诱导细胞 (例如特定部分的 HSPC) 中的 G1 细胞周期停滞以提供化学防护和辐射防护,具有减低的长期毒性,并且不需要在暴露于 DNA 损伤剂之前用所述抑制剂长时 (例如,48 小时或更长) 治疗。具体地,虽然一些非选择性激酶抑制剂可以通过降低 CDK4 蛋白水平引起一些细胞类型中的 G1 停滞,但是,不拘于任何一种理论,认为本发明公开的方法的益处至少部分归因于选择性 CDK4/6 抑制剂能够直接抑制 HSPC 中的 CDK4/6 的激酶活性而不降低它们的细胞浓度。

[0137] 在一些实施方案中,所述选择性 CDK4/6 抑制剂化合物是基本上没有脱靶效应 (特别是与抑制除 CDK4 和 / 或 CDK6 之外的激酶相关) 的化合物。在一些实施方案中,所述选择性 CDK4/6 抑制剂化合物是除 CDK4/6 之外的 CDK (例如,CDK 1 和 CDK2) 的较差的抑制剂 (例如, $> 1 \mu\text{M}$ IC_{50})。在一些实施方案中,所述选择性 CDK4/6 抑制剂化合物在非 CDK4/6 依赖性细胞中不诱导细胞周期停滞。在一些实施方案中,所述选择性 CDK4/6 抑制剂化合物是酪氨酸激酶的较差的抑制剂 (例如, $> 1 \mu\text{M}$ IC_{50})。其他不期望的脱靶效应包括但不限于长期毒性、抗氧化效应和雌激素效应。

[0138] 抗氧化效应可以通过本领域已知的标准测定进行测定。例如,无显著抗氧化效应的化合物是不显著地清除自由基例如氧自由基的化合物。可以将化合物的抗氧化效应与抗氧化活性已知的化合物例如染料木黄酮比较。因此,无显著的抗氧化活性的化合物可以是抗氧化活性为染料木黄酮的抗氧化活性的约 1/2、1/3、1/5、1/10、1/30 或 1/100 的化合物。雌激素活性也可以通过已知的测定进行测定。例如,非雌激素化合物是不显著地结合和激活雌激素受体的化合物。基本上没有雌激素效应的化合物可以是雌激素活性为具有雌激素活性的化合物 (例如,染料木黄酮) 的约 1/2、1/3、1/5、1/10、1/20 或 1/100 的化合物。

[0139] 可以按照本发明公开的方法使用的选择性 CDK4/6 抑制剂包括任何已知的小分子 (例如, < 1000 道尔顿, < 750 道尔顿、或者少于 < 500 道尔顿) 选择性 CDK4/6 抑制剂,或者其药学可接受的盐。在一些实施方案中,所述抑制剂是非天然的化合物 (即,自然界中未发现的化合物)。已报道几类化合物具有 CDK4/6 抑制能力 (例如,在无细胞测定中)。用于本发明公开的方法的选择性 CDK4/6 抑制剂可以包括但不限于,吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 (例如,吡啶并 [2,3-d] 嘧啶-7-酮和 2-氨基-6-氰基-吡啶并 [2,3-d] 嘧啶-4-酮)、三氨基嘧啶、芳基 [a] 吡咯并 [3,4-d] 咪唑、含氮的杂芳基取代的脒、5-嘧啶基-2-氨基噻唑、苯并噻二嗪、吡啶硫酮和异喹啉酮。

[0140] 在一些实施方案中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶为吡啶并 [2,3-d] 嘧啶酮。在一些实施方案中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶酮为吡啶并 [2,3-d] 嘧啶-7-酮。在一些实施方案

中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 酮由氨基芳基或氨基杂芳基基团取代。在一些实施方案中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 酮由氨基吡啶基团取代。在一些实施方案中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 酮为 2-(2- 吡啶基) 氨基吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 酮。例如,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 酮化合物可以具有 Barvian 等人 的美国专利公开第 2007/0179118 号中所述的式 (II) 的结构,该专利公开整体援引加入本文。在一些实施方案中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶化合物为 6- 乙酰基 -8- 环戊基 -5- 甲基 -2-(5- 哌嗪 -1- 基 - 吡啶 -2- 基氨基) -8H- 吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 酮 (即,PD 0332991) 或其药学可接受的盐。参见 Toogood et al., *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 2388-2406。

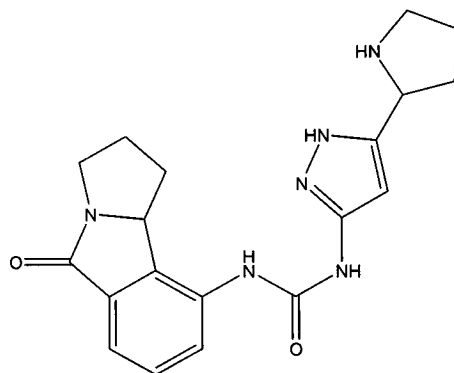
[0141] 在一些实施方案中,所述吡啶并 [2,3-d] 嘧啶酮为 2- 氨基 -6- 氰基 - 吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -4- 酮。例如,Tu 等人 描述了包括 2- 氨基 -6- 氰基 - 吡啶并 [2,3-d] 嘧啶 -4- 酮在内的选择性 CDK4/6 抑制剂。参见 Tu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16, 3578-3581。

[0142] 在本文中使用时,“三氨基嘧啶”是其中嘧啶环中的至少三个碳原子由具有式 $-NR_1R_2$ 的基团取代的嘧啶化合物,其中 R_1 和 R_2 独立地选自 H、烷基、芳烷基、环烷基、杂环、芳基和杂芳基。每个 R_1 和 R_2 的烷基、芳烷基、环烷基、杂环、芳基和杂芳基基团可以进一步由一个或多个羟基、卤代、氨基、烷基、芳烷基、环烷基、杂环、芳基或杂芳基基团取代。在一些实施方案中,所述氨基基团中的至少一个是具有 $-NHR$ 结构的烷基氨基基团,其中 R 为 C_1-C_6 烷基。在一些实施方案中,至少一个氨基基团是环烷基氨基基团或羟基取代的环烷基氨基基团,具有式 $-NHR$, 其中 R 是由或不由羟基基团取代的 C_3-C_7 环烷基。在一些实施方案中,至少一个氨基基团是杂芳基取代的氨基烷基基团,其中所述杂芳基基团可以进一步由芳基基团取代基取代。

[0143] 芳基 [a] 吡咯并 [3,4-d] 咪唑包括但不限于萘基 [a] 吡咯并 [3,4-c] 咪唑、吲哚并 [a] 吡咯并 [3,4-c] 咪唑、喹啉基 [a] 吡咯并 [3,4-c] 咪唑和异喹啉基 [a] 吡咯并 [3,4-c] 咪唑。参见例如 Engler et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 2261-2267; Sanchez-Martinez et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 3835-3839; Sanchez-Martinez et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 3841-3846; Zhu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 1231-1235; 和 Zhu et al., *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 2027-2030。合适的芳基 [a] 吡咯并 [3,4-d] 咪唑还公开于美国专利公开第 2003/0229026 号和第 2004/0048915 号中。

[0144] 含氮的杂芳基取代的脒是包含脒部分的化合物,其中脒氮原子之一由含氮的杂芳基基团取代。含氮的杂芳基基团包括但不限于包含至少一个氮原子的 5-10 元芳基基团。因此,含氮的杂芳基基团包括例如吡啶、吡咯、吲哚、咪唑、咪唑、噻唑、异噻唑、吡嗪、异噻唑、吡嗪、三唑、四唑、嘧啶、哒嗪、嘌呤、喹啉、异喹啉、喹啉、喹啉、噌啉、喹啉、苯并咪唑、苯邻二甲酰亚胺等。在一些实施方案中,所述含氮的杂芳基基团可以由一个或多个烷基、环烷基、杂环基、芳烷基、芳基、杂芳基、羟基、卤代、羰基、羧基、硝基、氰基、烷氧基或氨基基团取代。在一些实施方案中,所述含氮的杂芳基取代的脒为吡啶 -3- 基脒。所述吡啶可以进一步由环烷基或杂环基团取代。在一些实施方案中,所述吡啶 -3- 基脒为:

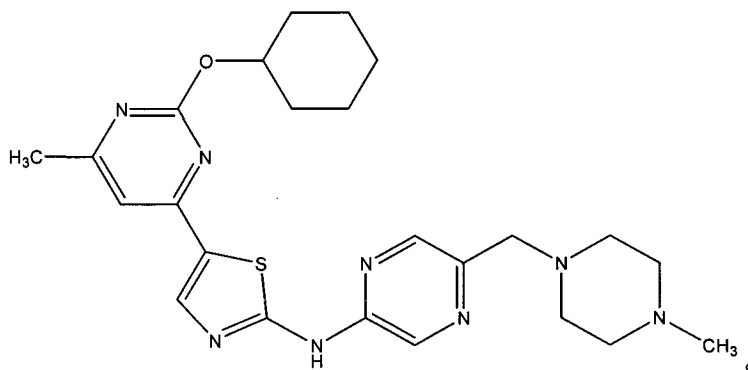
[0145]



[0146] 参见 Ikuta, et al., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 27548-27554。可以按照本发明公开的主题使用的其他脲包括美国专利公开第 2007/0027147 号中所述的式 (I) 的联芳基脲化合物。还参见, Honma et al., *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 4615-4627 ;和 Honma et al., *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 4628-4640。

[0147] Shimamura 等人描述了合适的 5-咪唑基-2-氨基噻唑 CDK4/6 抑制剂。参见 Shimamura et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16, 3751-3754。在一些实施方案中,所述 5-咪唑基-2-氨基噻唑具有结构:

[0148]



[0149] 有用的苯并噻二嗪和吡啶硫酮化合物包括例如 Kubo 等人公开的那些。参见 Kubo et al., *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 4279-4286 和美国专利公开第 2004/0006074 号,这些文献整体援引加入本文。在一些实施方案中,所述苯并噻二嗪由一个或多个卤代、卤代芳基或烷基基团取代。在一些实施方案中,所述苯并噻二嗪选自 4-(4-氟苄基氨基)-1,2,3-苯并噻二嗪-1,1-二氧化物、3-氯-4-甲基-4H-苯并[e][1,2,4]噻二嗪-1,1-二氧化物和 3-氯-4-乙基-4H-苯并[e][1,2,4]噻二嗪-1,1-二氧化物。在一些实施方案中,所述吡啶硫酮由一个或多个氨基或烷氧基基团取代。在一些实施方案中,所述吡啶硫酮选自 3-氨基-10H-吡啶酮-9-硫酮 (3ATA)、9(10H)-吡啶硫酮、1,4-二甲氧基-10H-吡啶-9-硫酮和 2,2'-二苯基二胺-二-[N,N'-(3-酰氨基-N-甲基氨基)-10H-吡啶-9-硫酮]]。

[0150] 在一些实施方案中,本发明公开的方法的个体是在接受增殖性病征的治疗时已暴露于、正暴露于、或预定暴露于 DNA 损伤剂的个体。此类病症包括癌性和非癌性的增殖性疾病。例如,认为本发明公开的化合物在化疗治疗广泛的肿瘤类型(包括但不限于以下癌症:乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌、肺癌、结肠直肠癌、脑癌(即,神经胶质瘤)和肾癌)的过程中有效地保护健康的 HSPC。

[0151] 理想地,优选所述选择性 CDK4/6 抑制剂不损及 DNA 损伤剂自身阻止癌细胞生

长的效力。大多数癌症的增殖看来不依赖于 CDK4/6 的活性,因为它们可以非选择性地 (promiscuously) 利用增殖性激酶 (例如,可以利用 CDK 1/2/4/6),或者缺少视网膜母细胞瘤抑癌蛋白 (RB,其被 CDK 灭活) 的功能。因此,孤立地抑制 CDK4/6 应当不会不良影响大多数癌症中的 DNA 损伤剂应答。根据本公开的综述,本领域技术人员会理解,基于肿瘤类型和分子遗传学可以推断某些肿瘤对 CDK4/6 抑制的可能的敏感性。预期不受 CDK4/6 抑制影响的癌症是特征可以在于包括但不限于以下方面中的一个或多个方面的那些癌症:CDK1 或 CDK2 活性增高、视网膜母细胞瘤抑癌蛋白 (RB) 丧失或缺乏、高水平的 MYC 表达、细胞周期蛋白 E (例如, E1 或 E2) 增多和细胞周期蛋白 A 增多、或者 RB 灭活蛋白 (例如 HPV 编码的 E7) 的表达。此类癌症可以包括但不限于小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤、HPV 阳性恶性肿瘤如宫颈癌和某些头颈癌、MYC 扩增的肿瘤例如 Burkitts 淋巴瘤、以及三阴性乳腺癌;某些种类的肉瘤、某些种类的非小细胞肺癌、某些种类的黑素瘤、某些种类的胰腺癌、某些种类的白血病、某些种类的淋巴瘤、某些种类的脑癌、某些种类的结肠癌、某些种类的前列腺癌、某些种类的卵巢癌、某些种类的子宫癌、某些种类的甲状腺癌及其他内分泌组织癌、某些种类的唾液腺癌、某些种类的胸腺癌、某些种类的肾癌、某些种类的膀胱癌以及某些种类的睾丸癌。

[0152] 例如,在一些实施方案中,所述癌症选自小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤以及三阴性 (ER/PR/Her2 阴性) 或“基底样”乳腺癌。小细胞肺癌和视网膜母细胞瘤几乎总是灭活视网膜母细胞瘤抑癌蛋白 (RB),因此不需要 CDK4/6 活性来增殖。因此 CDK4/6 抑制剂治疗会在骨髓和其他正常宿主细胞中引起药理性静止,但是不会在肿瘤中引起药理性静止。三阴性 (基底样) 乳腺癌也几乎总是在遗传上或功能上 RB 无效的。而且,某些病毒诱导的癌症 (例如宫颈癌和头颈癌的亚类) 表达灭活 RB 的病毒蛋白 (E7),使这些肿瘤在功能上是 RB 无效的。一些肺癌也被认为是由 HPV 引起的。本领域技术人员会理解,预期不受 CDK4/6 抑制剂影响的癌症 (例如, RB 无效的、表达病毒蛋白 E7 的或者过量表达 MYC 的那些癌症) 可以通过包括但不限于 DNA 分析、免疫染色、蛋白印迹分析和基因表达图谱的方法来确定。

[0153] 选择性 CDK4/6 抑制剂还可以在 DNA 损伤剂治疗非癌性增殖性疾病中的异常组织的过程中用于保护健康的 HSPC,所述非癌性增殖性疾病包括但不限于以下:婴儿血管瘤、继发性进行性多发性硬化、慢性进行性骨髓变性病、神经纤维瘤病、神经节瘤、瘢痕疙瘩形成、骨的佩吉特病、乳腺纤维囊性病、Peronies&Duputren 纤维化、再狭窄和肝硬化。此外,在意外暴露或用药过量 (例如,甲氨蝶呤用药过量) 的事件中选择性 CDK4/6 抑制剂可以用于改善 DNA 损伤剂的效应。因此,本发明公开的方法可以用来保护化学和核电厂工人、科研人员和急诊应答者免受职业性暴露,例如如果发生化学物质溢出或辐射泄露。

[0154] 根据本发明公开的主题,可以符合治疗的疗程的任何时间表和任何剂量向个体给予 DNA 损伤剂,只要在给予所述 DNA 损伤剂之前、期间或之后给予选择性 CDK4/6 抑制剂化合物。通常,在从暴露于所述 DNA 损伤剂之前 24 小时至暴露之后 24 小时的时间段中向所述个体给予选择性 CDK4/6 抑制剂化合物。但是,此时间段可以扩展至早于暴露于所述 DNA 损伤剂前 24 小时的时间 (例如,基于任何 DNA 损伤性化合物达到合适的血浆浓度所需的时间和 / 或所述 DNA 损伤性化合物的血浆半衰期)。此外,所述时间段可以扩展长于暴露于所述 DNA 损伤剂之后的 24 小时,只要较晚给予所述 CDK4/6 抑制剂至少产生一些保护作用。这样的暴露后治疗在意外暴露或用药过量的情况下可以特别有用。

[0155] 在一些实施方案中,可以在给予 DNA 损伤剂之前的时间段向个体给予选择性 CDK4/6 抑制剂,以致所述选择性 CDK4/6 抑制剂的血浆水平在给予所述 DNA 损伤剂时达到峰值。若方便的话,选择性 CDK4/6 抑制剂可以与 DNA 损伤剂同时给予以简化治疗方案。在一些实施方案中,化疗保护剂和 DNA 损伤剂可以单一制剂的形式提供。

[0156] 若期望,可以向个体给予多剂量的选择性 CDK4/6 抑制剂化合物。或者,可以向个体给予单剂量的选择性 CDK4/6 抑制剂。

[0157] 在一些实施方案中,选择性 CDK4/6 抑制剂可以与其他化合物或治疗一起使用以降低不期望的 DNA 损伤剂或事件的效应。例如,在一些实施方案中,本发明公开的主题涉及增加毒性降低剂在需要治疗的个体中的效力的方法,所述方法包括:提供个体,所述个体已暴露于、正暴露于或有风险暴露于 DNA 损伤剂或事件;向所述个体给予毒性降低剂;以及向所述个体给予药学有效量的选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0158] 所述毒性降低剂可以是任何已知的毒性降低剂。理想地,所述毒性降低剂没有选择性 CDK4/6 抑制活性。

[0159] 在一些实施方案中,所述毒性降低剂是用来降低与使用(或暴露于)化疗相关的不期望的细胞毒性 / 副作用的物质,或者是已知具有降低与使用(或暴露于)化疗相关的不期望的细胞毒性 / 副作用的能力的物质。在一些实施方案中,所述毒性降低剂是用来降低与使用(或暴露于)辐射相关的不期望的毒性 / 副作用的物质,或者是已知具有降低与使用(或暴露于)辐射相关的不期望的毒性 / 副作用的能力的物质。因此,在一些实施方案中,所述毒性降低剂为化疗保护剂或辐射保护剂。

[0160] 在一些实施方案中,所述毒性降低剂是这样的物质,使用该物质以便正在治疗癌症或另一增殖性疾病的个体可以忍受更高剂量的化疗或辐射。在一些实施方案中,使用所述毒性降低剂以便正在治疗癌症或另一增殖性疾病的个体可以更频繁地用化疗或辐射治疗。在一些实施方案中,所述毒性降低剂用来降低或预防与使用 DNA 损伤剂相关的副作用,例如但不限于恶心、呕吐、脱发、贫血、疲劳、周围神经病、出血问题、腹泻、便秘等。

[0161] 在一些实施方案中,所述毒性降低剂为生长因子或其他天然存在的化合物,或者它们的衍生物。在一些实施方案中,所述毒性降低剂选自包括但不限于以下物质的组:生长因子、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、聚乙二醇化 G-CSF、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、血小板生成素、红细胞生成素(EPO)、聚乙二醇化红细胞生成素、白介素(IL)-12、青灰因子、角质形成细胞生长因子或者上述物质的衍生物(例如,具有基于上述毒性降低剂之一的结构的化学修饰的化合物,例如烷基化或酯化衍生物)或组合。

[0162] 在一些实施方案中,使用毒性降低剂和选择性 CDK4/6 抑制剂可以导致协同保护效应以对抗 DNA 损伤剂或事件。在一些实施方案中,选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物在个体内的一种或多种细胞中诱导药理性静止。例如,用选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物短暂治疗(例如,在约 48 小时或更少的时间中)可以在个体内的一种或多种细胞中暂时诱导药理性静止。在一些实施方案中,被诱导进入药理性静止的一种或多种细胞为例如,血液细胞、血液干细胞和 / 或血液前体细胞。因此,在一些实施方案中,生长因子和选择性 CDK4/6 抑制剂化合物可以在这样的方法中使用,所述方法在从 DNA 损伤剂或事件拯救和支持各种造血群体中提供协同效应。

[0163] 在一些实施方案中,选择性 CDK4/6 抑制剂和毒性降低剂可以联用以从 DNA 损伤剂

或事件（例如电离辐射或化疗）拯救和支持各种非血液组织。所述非血液组织可以包括但不限于来自肾、肠、心脏、肝、脑、甲状腺、皮肤、肠粘膜、听觉系统、肺、膀胱、卵巢、子宫、睾丸、肾上腺、胆囊、胰、胰岛、胃、血管、骨及它们的组合的细胞或组织。

[0164] 毒性降低剂和选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物可以一起（例如，在同一制剂中或者同时在不同制剂中）或在不同时间给予。毒性降低剂和 CDK4/6 抑制剂中的任一种或两者可以单剂量或多剂量给予。在一些实施方案中，可以在暴露于 DNA 损伤剂或事件之前给予 CDK4/6 抑制剂或毒性降低剂，而 CDK4/6 抑制剂和毒性降低剂中的另一种可以在暴露于 DNA 损伤剂或事件期间或之后给予。在一些实施方案中，CDK4/6 抑制剂和毒性降低剂均可以在暴露于 DNA 损伤剂期间（例如，给予化疗或放疗期间）给予。或者 CDK4/6 抑制剂和毒性降低剂均可以在暴露于 DNA 损伤剂之前或之后给予。在一些实施方案中，在个体暴露于 DNA 损伤剂或事件之后约 24 至约 48 小时之间（例如，约 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46 或 48 小时）向所述个体给予选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0165] 在一些实施方案中，本发明公开的主题涉及选择性 CDK4/6 抑制剂保护非血液细胞或组织免受 DNA 损伤剂或事件的能力。因此，在一些实施方案中，本发明公开的主题提供一种在需要治疗的个体的非血液细胞或组织暴露于 DNA 损伤剂或事件之前或之后缓解所述细胞或组织中的 DNA 损伤的方法，其中所述方法包括向所述个体给予药学有效量的选择性抑制 CDK4/6 的化合物。

[0166] 在一些实施方案中，所述非血液细胞或组织包括来自包括但不限于来自以下的细胞或组织的组的细胞或组织：肾、肠、心脏、肝、脑、甲状腺、皮肤、肠粘膜、听觉系统、肺、膀胱、卵巢、子宫、睾丸、肾上腺、胆囊、胰、胰岛、胃、血管、骨及它们的组合。在一些实施方案中，DNA 损伤剂为化疗剂，例如但不限于卡那霉素、异环磷酰胺、喜树碱、环磷酰胺、L-天冬酰胺酶、多柔比星、柔红霉素、甲氨蝶呤 (methotrexate)、伊立替康、顺铂、链脲佐菌素、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、博来霉素、白消安、长春新碱及它们的组合。因此，例如，本发明公开的方法可以涉及使用 CDK4/6 抑制剂以保护肾细胞免受化疗诱导的上皮细胞损伤。

[0167] 选择性 CDK4/6 抑制看来对初次免疫应答和记忆免疫应答具有不同效应。在一些实施方案中，本发明公开的主题涉及这样的发现，当与幼稚 T 细胞增殖相比时，选择性 CDK4/6 抑制剂优先减少记忆 T 细胞增殖。因此，在一些实施方案中，本发明公开的主题提供一种减少或抑制需要治疗的个体中的记忆 T 细胞增殖的方法，其中所述方法包括向所述个体给予药学有效量的选择性抑制 CDK4/6 的化合物。

[0168] 在一些实施方案中，所述个体患有或有风险发展自身免疫病或变应性疾病，例如但不限于系统性红斑性狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎 (RA)、自身免疫性关节炎、硬皮病、溶血性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性粒性白细胞减少、I 型糖尿病、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、银屑病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、风湿性多肌痛、葡萄膜炎、免疫性肺炎、自身免疫性肝炎、免疫性肾炎、免疫性肾小球肾炎、多发性硬化、自身免疫性神经病、白癜风、盘状狼疮、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性脉管炎、皮炎、外在和内在反应性呼吸道疾病（哮喘）、重症肌无力、自身免疫性卵巢衰竭、恶性贫血、艾迪生病、自身免疫性甲状

旁腺功能减退或者不适当的细胞免疫应答的其他综合征。所述个体还可以患有或有风险发展与不期望的记忆 T 细胞增殖相关的另一疾病状况。

[0169] 选择性 CDK4/6 抑制剂还可以阻抑生发中心形成,生发中心形成是记忆 B 细胞生成所涉及的过程。因此,在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种减少或抑制需要治疗的个体中的 B 细胞祖细胞增殖的方法,所述方法包括向所述个体给予药理学有效量的选择性抑制 CDK4/6 的化合物。在一些实施方案中,所述个体可以患有或有风险发展自身免疫病或变应性疾病或者与不期望的 B 细胞增殖相关的另一疾病状况。在一些实施方案中,所述自身免疫病或变应性疾病可以是例如但不限于 SLE、RA、硬皮病、溶血性贫血、ITP、获得性血友病、TTP、肺出血肾炎综合征、冷和温凝集素病、冷球蛋白血症或者不适当的抗体生成的综合征。

[0170] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种缓解需要治疗的个体的自身免疫病或变应性疾病的方法,所述方法包括向所述个体给予药理学有效量的选择性抑制 CDK4/6 的化合物,其中所述化合物减少或抑制记忆 T 细胞增殖、B 细胞祖细胞增殖、或者记忆 T 细胞增殖与 B 细胞祖细胞增殖。在一些实施方案中,所述自身免疫病选自包括但不限于以下疾病的组: SLE、RA、自身免疫性关节炎、硬皮病、溶血性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性粒性白细胞减少、I 型糖尿病、TTP、银屑病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、风湿性多肌痛、葡萄膜炎、免疫性肺炎、自身免疫性肝炎、免疫性肾炎、免疫性肾小球肾炎、多发性硬化、自身免疫性神经病、白癜风、盘状狼疮、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性脉管炎、皮炎、外在和内在反应性呼吸道疾病(哮喘)、重症肌无力、自身免疫性卵巢衰竭、恶性贫血、艾迪生病、自身免疫性甲状旁腺功能减退、不适当的细胞免疫应答的其他综合征、肺出血肾炎综合征、冷和温凝集素病、冷球蛋白血症或者不适当的抗体生成的综合征。

[0171] 在一些实施方案中,所述选择性 CDK4/6 抑制剂可以在治疗癌症的方法中使用,其中所述癌症的特征是升高的 CDK2 活性水平或者是降低的视网膜母细胞瘤抑癌蛋白或视网膜母细胞瘤家族成员蛋白或多种蛋白(例如但不限于 p107 和 p130)的表达,所述方法包括向所述个体给予药理学有效量的选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。在一些实施方案中,所述升高的 CDK2 活性水平与 MYC 原癌基因扩增或过量表达和 / 或细胞周期蛋白 E1、E2 或细胞周期蛋白 A 的过量表达有关。不认为选择性 CDK4/6 抑制剂在这些类型的癌症的癌细胞中诱导药理性静止。但是,本发明公开的主题涉及这样的观点,即选择性 CDK4/6 抑制剂可以提高某些类型的癌症的癌细胞对诸如化疗化合物和电离辐射的 DNA 损伤剂的敏感性。因此,在一些实施方案中,使用选择性 CDK4/6 抑制剂可以提高某些类型的癌细胞对诸如化疗化合物或 IR 的 DNA 损伤剂的损伤的敏感性,从而与在不给予所述选择性 CDK4/6 抑制剂的情况下使用所述 DNA 损伤剂时相比,增加癌细胞死亡。因此,在一些实施方案中,用 DNA 损伤剂与 CKD4/6 抑制剂化合物联合治疗可以提供比单独用所述 DNA 损伤剂治疗更大的肿瘤负荷的减少。在一些实施方案中,给予选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物可以缓解与暴露于 DNA 损伤剂或事件(例如,化疗化合物或 IR)相关的血液毒性。在一些实施方案中,所述血液毒性为长期毒性,例如但不限于脊髓发育不良。给予选择性 CDK4/6 抑制剂化合物还可以防止与暴露于 DNA 损伤剂或事件相关的其他长期毒性,包括血液毒性和非血液毒性,例如血液和非血液继发性恶性肿瘤。

[0172] 可以在个体暴露于 DNA 损伤剂或事件之前、期间或之后在任何合适的时间给予选择性抑制 CDK4/6 的化合物。在一些实施方案中,在个体暴露于 DNA 损伤剂或事件之后约 24 至约 48 小时之间(例如,约 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47 或 48 小时)向所述个体给予选择性 CDK4/6 抑制剂。

[0173] 已发现利用辐射或化疗治疗癌症的个体具有更高的风险发展进一步的癌症(即,继发性恶性肿瘤,例如已从最初的位置扩散的癌症或新癌症),即使在最初的癌症治疗成功地消除或以其他方式治疗(例如,通过减少肿瘤负荷)最初的(即,原发性)癌症时也是如此。所述继发性恶性肿瘤可以是例如白血病或另一血液或非血液癌症。这些继发性恶性肿瘤有时可以在最初的癌症已被治疗之后几年(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30 或更多年)发生,并且可以与最初的癌症治疗的长期毒性有关。

[0174] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种缓解个体中化疗诱导或辐射诱导的血液起源或非血液起源的继发性恶性肿瘤的方法。在一些实施方案中,所述方法可以包括向所述个体给予药理有效量的选择性抑制 CDK4/6 的化合物。在一些实施方案中,在个体接受化疗或基于辐射的疗法以治疗原发性恶性肿瘤之前或期间向所述个体给予选择性抑制 CDK4 和 / 或 CDK6 的化合物。

[0175] III. 活性化合物、盐和制剂

[0176] 在本文中使用时,术语“活性化合物”是指选择性 CDK 4/6 抑制剂化合物,或者其前药(例如但不限于可以在体外或体内形成所述选择性 CDK4/6 抑制剂的各种酯和其他衍生物)、溶剂化物(例如但不限于水合物)和 / 或药学可接受的盐。活性化合物可以通过任何合适的方法向所述个体给药。当然,给予活性化合物的量和时机可以取决于治疗的个体、所述个体已暴露于、正暴露于或预定暴露于的 DNA 损伤剂的剂量、给药方式、所述活性化合物的药代动力学性质、以及处方医师的判断。因此,由于个体的差异性,下述剂量仅作参考,并且医师可以逐步增加(titrate)所述化合物的剂量以实现医师认为适合所述个体的治疗。在考虑期望的治疗程度时,医师可以权衡各种因素如个体的年龄和体重、先前存在的疾病的存在、以及其他疾病的存在。可以制备药物制剂用于任何期望的给药途径,包括但不限于口服给药、静脉内给药或气雾剂给药,这会下文中更详细地讨论。

[0177] 任何特定活性化合物的治疗有效量(其用途在本文所述的实施方案的范围内)可以随化合物和个体稍微改变,并且可以取决于所述个体的疾病状况和递送途径。作为一般性的提议,约 0.1-约 200mg/kg 的剂量可以具有疗效,其中所有重量是基于活性化合物的重量计算的,包括使用盐的情况在内。在一些实施方案中,剂量可以是提供达到约 1-5 μ M 或更高的活性化合物的血清浓度所需的化合物的量。较高水平时的毒性问题可以将静脉给药剂量限制至较低水平,例如达到约 10mg/kg,其中所有重量是基于活性化合物(base)的重量计算的,包括使用盐的情况在内。约 10mg/kg-约 50mg/kg 的剂量可以用于口服给药。典型地,约 0.5mg/kg-5mg/kg 的剂量可以用于肌肉内注射。在一些实施方案中,对于静脉内或口服给药,剂量可以是约 1 μ mol/kg-约 50 μ mol/kg,或者,任选地,约 22 μ mol/kg-约 33 μ mol/kg 的所述化合物。

[0178] 根据本发明公开的方法,本文所述的药学活性化合物可以固体或液体的形式口服给药,或者可以溶液剂、混悬剂或乳剂的形式肌肉内给药、静脉内给药或者经吸入给药。在一些实施方案中,所述化合物或盐还可以脂质体混悬剂的形式经吸入给药、静脉内给药或

肌肉内给药。当通过吸入给药时,所述活性化合物或盐可以是粒度为约 0.5- 约 5 微米并且任选地为约 1- 约 2 微米的多个固体颗粒或液滴的形式。

[0179] 药物制剂可以包含任何药学可接受的载体中的本文所述的活性化合物或其药学可接受的盐。若期望溶液剂,对于水溶性化合物或盐,水是可选的载体。对于水溶性化合物或盐,适合的可以是有机媒介物,例如甘油、丙二醇、聚乙二醇或其混合物。在后一情况中,有机媒介物可以含有大量的水。然后,可以本领域技术人员已知的合适的方式,典型地通过 0.22 微米滤器过滤,来灭菌处理在两种情况的任一种中的溶液剂。灭菌之后,可以将溶液剂分配入适当的容器中,例如去热原的玻璃小瓶。任选地,通过无菌的方法进行此分配过程。然后可以对小瓶进行灭菌密闭,并且,如果需要,可以冻干小瓶的内容物。

[0180] 除了活性化合物或其盐之外,药物制剂还可以含有其他添加剂,例如 pH- 调节添加剂。具体地,有用的 pH- 调节剂包括诸如盐酸的酸、碱或缓冲剂,例如乳酸钠、乙酸钠、磷酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或葡萄糖酸钠。此外,制剂可以含有抗菌防腐剂。有用的抗菌防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯和苯醇。当制剂被置于设计用于多次给药用途的小瓶中时,通常使用抗菌防腐剂。可以利用本领域公知的技术冻干本文所述的药物制剂。

[0181] 为了口服给药,药物组合物可以采用溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂等形式。含有各种赋形剂(例如柠檬酸钠、碳酸钙和磷酸钙)的片剂与各种崩解剂(例如淀粉(例如,马铃薯淀粉或木薯淀粉)和某些复杂的硅酸盐)及粘合剂(例如聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、明胶和阿拉伯树胶)一起使用。此外,为了压片目的,润滑剂例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石通常很有用。相似类型的固体组分还用作软-和硬-填充明胶胶囊中的填充剂。此方面的材料还包括乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量的聚乙二醇。当期望含水的混悬剂和/或酏剂用于口服给药时,本发明公开的主题的化合物可以与各种甜味剂、调味剂、着色剂、乳化剂和/或助悬剂,以及稀释剂(如水、乙醇、丙二醇、甘油)及其各种组合联用。

[0182] 在本文所述的主题的另一实施方案中,提供在密封容器中的单位剂型形式的、可注射的、稳定无菌制剂,其包含本文所述的活性化合物或其盐。所述化合物或盐以冻干物的形式提供,所述冻干物能够用适当的药学可接受的载体复原(reconstitute)以形成适合注射入个体的液体制剂。当所述化合物或盐基本上不溶于水时,可以使用足量的生理可接受的乳化剂以乳化含水载体中的所述化合物或盐。特别有用的乳化剂包括磷脂酰胆碱和卵磷脂。

[0183] 本文提供的其他实施方案包括本文公开的活性化合物的脂质体制剂。配制脂质体混悬剂的技术是本领域公知的。当所述化合物是水溶性盐时,利用常规的脂质体技术,可以将所述化合物掺入脂质囊泡中。在这种情况下,由于所述活性化合物的水溶性,所述活性化合物可以大量包含在脂质体的亲水性中心或核内。采用的脂质层可以具有任何常规组成,并且可以含有胆固醇,或者可以不含胆固醇。当所关注的活性化合物是水不溶性的时,仍然采用常规的脂质体制剂技术,盐可以大量包含在形成脂质体的结构的疏水性脂质双层内。在两种情况的任一种中,通过使用标准的超声和均质化技术,可以降低制得的脂质体的大小。可以冻干包含本文公开的活性化合物的脂质体制剂以制备冻干物,所述冻干物可以用药学可接受的载体例如水复原以重新产生脂质体混悬剂。

[0184] 本文还提供药物制剂,其适合作为气雾剂通过吸入给药。这些制剂包含期望的本文所述化合物或其盐的溶液剂或混悬剂,或者所述化合物或盐的多个固体颗粒。可以将期望的制剂置于小室中并雾化。雾化可以通过压缩空气或通过超声能量来完成以形成包含所述化合物或盐的多个液滴或固体颗粒。液滴或固体颗粒的粒度应为约 0.5- 约 10 微米,并且任选为约 0.5- 约 5 微米。固体颗粒可以通过以本领域已知的任何适当的方式,例如通过微粉化处理固体化合物或其盐来获得。任选地,固体颗粒或液滴的粒度可以是约 1- 约 2 微米。在此方面,商品雾化器可用于实现此目的。所述化合物可以美国专利第 5,628,984 号中所述的方式,通过可呼吸颗粒的气雾悬浮剂给药,该专利整体公开援引加入本文。

[0185] 当适合以气雾剂形式给予的药物制剂是液体形式时,所述制剂可以包含在含水载体中的水溶性活性化合物。可以存在表面活性剂,其使制剂的表面张力降低以致在接受雾化时足以形成期望粒度范围内的液滴。

[0186] 如本文所示,本发明提供水溶性和水不溶性的活性化合物。在本文中使用时,术语“水溶性的”意在限定以约 50mg/mL 或更大的量溶于水的任何组分。此外,在本文中使用时,术语“水不溶性的”意在限定在水中的溶解度小于约 20mg/mL 的任何组分。在一些实施方案中,水溶性化合物或盐可以是令人期望的,而在其他实施方案中,水不溶性化合物或盐也可以是期望的。

[0187] 在本文中使用时,术语“药学可接受的盐”是指在正确的医学判断范围内,适合与个体(例如,人个体)接触使用而没有不适合的毒性、刺激、变应性反应等,与适当的益处/风险比相称,并且对其预期用途有效的本发明公开的主题的化合物的那些盐,以及两性离子形式(如果可能的话)。

[0188] 因此,术语“盐”是指本发明公开的主题的化合物的相对无毒性的无机酸和有机酸加成盐。这些盐可以在最终分离和纯化所述化合物的过程中原位制备,或者通过分开地使游离碱形式的纯化的化合物与合适的有机酸或无机酸反应并分离由此形成的盐进行制备。就本发明公开的主题的化合物是碱性化合物而言,它们均能够与各种无机酸和有机酸形成很多种不同的盐。虽然对于向动物给药,这些盐必须是药学可接受的,但实际上,通常期望首先从反应混合物中分离药学不可接受的盐形式的碱性化合物,然后通过用碱性试剂处理简单地转化成游离碱化合物,其后将所述游离碱转化成药学可接受的酸加成盐。碱性化合物的酸加成盐通过以常规方式使游离碱形式与足量的期望的酸接触产生所述盐来进行制备。游离碱形式可以通过以常规方式使盐形式与碱接触并分离所述游离碱来再生。游离碱形式与其各种盐形式在某些物理性质方面(例如在极性溶剂中的溶解度)略微不同,但在其他方面,对于本发明公开的主题的目的而言,盐相当于其各自的游离碱。

[0189] 药学可接受的碱加成盐是与金属或胺例如碱金属和碱土金属的氢氧化物或者有机胺形成的。用作阳离子的金属的实例包括但不限于钠、钾、镁、钙等。合适的胺的实例包括但不限于 N, N' - 二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、N- 甲基葡糖胺和普鲁卡因。

[0190] 酸性化合物的碱加成盐通过以常规方式使游离酸形式与足量的期望的碱接触产生所述盐来进行制备。游离酸形式可以通过以常规方式使盐形式与酸接触并分离所述游离酸来再生。游离酸形式与其各自的盐形式在某些物理性质方面(例如在极性溶剂中的溶解度)略微不同,但在其他方面,对于本发明公开的主题的目的而言,盐相当于其各自的游离

酸。

[0191] 盐可以从无机酸例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸等制备,盐的实例是硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、硝酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘甲酸盐 (naphthylate)、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐、月桂基磺酸盐和羟乙基磺酸盐等。盐还可以从有机酸例如脂肪族一元羧酸和二元羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、链烷双酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸等。代表性的盐包括乙酸盐、丙酸盐、辛酸盐、异丁酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐等。药学可接受的盐可以包括基于碱金属和碱土金属(例如钠、锂、钾、钙、镁等)的阳离子,以及无毒性的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。还包括氨基酸的盐,例如精氨酸盐、葡糖酸盐、半乳糖醛酸盐等。参见,例如, Berge et al., *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1-19, 其援引加入本文。

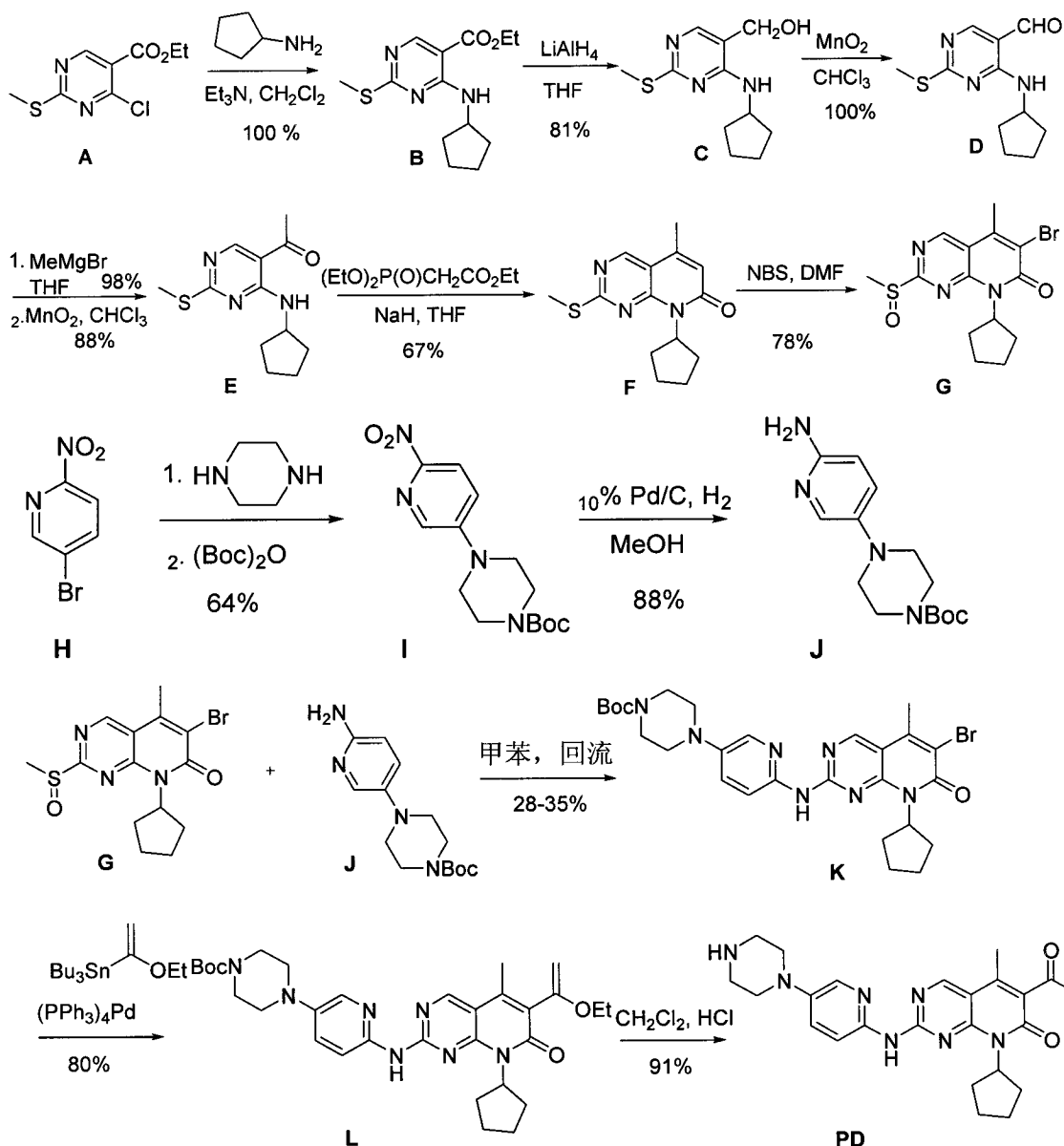
实施例

[0192] 以下实施例提供示例性实施方案而不是为了以任何方式限制本发明公开的主题的范围。由于本公开和本领域技术的一般水平,技术人员可以理解以下实施例仅是示例性意图,并且在不脱离本发明公开的主题的范围的情况下可以使用许多变化、修改和变型。

[0193] 除非另有说明,本发明公开的主题的实施可以采用在本领域的技术之内的蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药理学的常规方法。这类技术在文献中充分解释。参见,例如, T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current edition); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods in Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg, *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)。

[0194] 实施例 1 合成 PD

[0195]

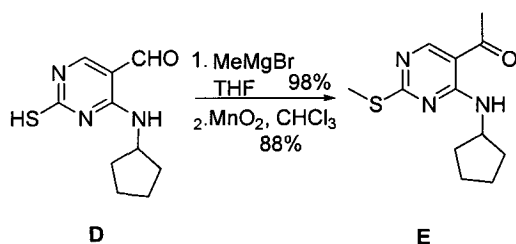


[0196] 路线 1 :合成 PD。

[0197] 如以上路线 1 中所示合成 PD。除了将化合物 D 转化成化合物 E 的反应以及将化合物 F 转化成化合物 G 的反应之外,路线 1 中所示的反应大体上按照之前报道的方法进行(参见 [Vandelwel et al.](#), *J. Med. Chem.*, 48, 2371-2387 (2005); 和 [Toogood et al.](#), *J. Med. Chem.*, 48, 2388-2406 (2005))。

[0198] 化合物 D 转化成化合物 E:

[0199]



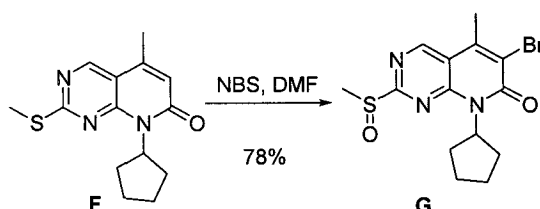
[0200] 在氮气下将化合物 D (40g, 169mmol) 溶于无水 THF (800mL) 并在冰浴中冷却该溶液,向其缓慢地加入 MeMgBr (160mL, 480mmol, 3M 在乙醚中) 并搅拌 1h。用饱和 NH_4Cl 水溶

液终止反应,并在水和 EtOAc 之间分配。分离有机层,并用 EtOAc 萃取水层。将合并的有机层用盐水洗涤,然后用 $MgSO_4$ 干燥。浓缩得到油状中间体产物 (41.9g, 98%)。

[0201] 将上述中间体 (40g, 158mmol) 溶于无水 $CHCl_3$ (700mL)。加入 MnO_2 (96g, 1.11mol), 在搅拌下将混合物加热至回流,持续 18h,再另外加入 MnO_2 (34g, 395mmol),继续回流 4h。通过硅藻土 (Celite) 垫过滤固体并用 $CHCl_3$ 洗涤。浓缩滤液得到黄色固体状化合物 E (35g, 88%), Mp: 75.8-76.6°C。

[0202] 化合物 F 转化成化合物 G:

[0203]



[0204] 将化合物 F (5g, 18.2mmol) 溶于无水 DMF (150mL) 并加入 NBS (11.3g, 63.6mmol)。在 r. t. 下搅拌反应混合物 3.5h, 然后倒入 H_2O (500mL) 中, 过滤沉淀并用 H_2O 洗涤。从 EtOH 重结晶固体得到白色固体状化合物 G (5.42g, 80.7%), mp: 210.6-211.3°C。

[0205] PD 的表征数据:

[0206] LC-MS: 448.5 (ESI, M+H). 纯度: ~ 99%

[0207] 1H NMR (300MHz, D_2O): 9.00 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 9.3Hz, 2.1Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.4Hz, 1H), 7.46 (d, J = 9.6Hz, 1H), 5.80-5.74 (m, 1H), 3.57-3.48 (m, 8H), 2.48 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.13-1.94 (m, 6H), 1.73-1.71 (m, 2H).

[0208] ^{13}C NMR (75MHz, D_2O): 203.6, 159.0, 153.5, 153.3, 152.2, 139.9, 139.4, 139.2, 133.1, 129.0, 118.7, 113.8, 107.4, 51.8, 42.2, 40.0, 28.0, 25.2, 22.6, 10.8.

[0209] 实施例 2 体外和体内研究的一般方法

[0210] 化合物: 如实施例 1 所述合成 PD0332991。

[0211] 细胞、细胞周期分析、通过流式细胞术的 γ H2AX、细胞增殖测定和细胞毒性: 根据制造商的建议, 在补充了肾上皮细胞生长试剂盒的肾上皮细胞基础培养基中培养原代正常人肾近端上皮细胞 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC), Manassas, Virginia, United States of America)。按照生产商的方案, 利用 BrdU (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California) 或 EdU (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, United States of America) 与碘化丙啶进行细胞周期分析。对于 γ H2AX 测定, 将细胞固定、透化并按照 γ H2AXFlow Kit (Millipore, Billerica, Massachusetts, United States of America) 用抗 γ H2AX 染色。通过流式细胞术评价 γ H2AX 水平。通过于 96-孔组织培养板中的 100 μ L 生长培养基中接种 1×10^3 个细胞 / 孔来评价细胞增殖。如本文所示用 Cdk4/6 抑制剂和依托泊苷处理细胞。处理之后, 允许细胞在正常生长培养基中恢复 7 天。在恢复期结束时, 利用 CellTiter-Glo[®] (Promega, Fitchburg, Wisconsin, United States of America) 或 WST-1 试剂 (TaKaRa Bio USA, Madison, Wisconsin, United States of America) 定量细胞数量。利用通过定量腺苷酸激酶释放入培养基来测量细胞溶解的 Toxilight[™] 生物测定试剂盒 (Lonza, Basel, Switzerland) 评价细胞毒性。简单地说, 从含有不同浓度的 PD0332991 处理的细胞的 96 孔板的每个孔吸出 20 μ L。加入 100 μ L Toxilight[™] 试剂并孵育 5 分钟,

并且在发光计中以 1 秒 / 孔读数。

[0212] 动物:所有动物实验均按照UNC Institutional Animal Care and Use Committee 进行。利用 137Cs AECL GammaCell 40 辐照器 (Atomic Energy of Canada Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) 辐射青年 C57Bl/6 和 FVB 小鼠。除非另有说明,所分析的小鼠为购自 Jackson Labs (Bar Harbor, Maine, United States of America) 的青年 (8-12 周龄) 处女型雌性 C57Bl/6 或 FVB。

[0213] C3-TAg 小鼠是基底样乳腺癌的模型。C3-TAg 小鼠含有表达猿猴病毒 40 早期区域转化序列 (SV40 大 T 抗原) 的重组基因,据证实其灭活 p53 和 Rb。MMTV-c-neu 模型表达小鼠乳癌病毒 (MMTV) 启动子驱动的 c-neu (人 HER2 的小鼠直向同源物),并且是 HER2+ 乳腺癌的模型。当记录到肿瘤大小为 $\sim 0.2\text{cm}^2$ 时,如本文所述处理动物,并且通过每天卡尺测量来评价肿瘤反应。

[0214] 药物制备及剂量给药:将 PD0332991 溶解于乳酸钠缓冲液 (pH 4.0) 中至终浓度 15mg/ml。用 150mg/kg 剂量的 PD0332991 处理小鼠。将 2BrIC (在本文中也称为 L4D) 溶解于 DMSO 中并添加至细胞,其中 DMSO 的终浓度 $< 0.1\%$ 。

[0215] BrdU 掺入分析:对于肾增殖实验,用单剂量的 PD0332991 (150mg/kg 口腔管饲) 或媒介物对照处理小鼠,然后顺铂 (10mg/kg IP) 处理。通过利用 BrdU (1mg IP 注射) 在处死之前每 6 小时持续 24 小时或者 $100\mu\text{g}$ EdU (0.1mg IP) 在处死之前每 24 小时持续 3 天来评价增殖。

[0216] 通过流式细胞术分析 EdU 掺入:从小鼠收获肾,并且利用 gentleMACS™ 组织分离器 (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 分离单细胞。简单地说,将肾切成小块并放置在 gentleMACS™ C 管 (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 中的 10ml 胶原酶 (1mg/ml) 中。按照制造商的建议 (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 分离组织。然后将细胞在 ACK 缓冲液中孵育 5 分钟以溶解红细胞,过滤并沉淀。将细胞重悬在 4% 多聚甲醛中,并且在 4°C 下储存过夜。为了定量 EdU 掺入,将细胞固定、透化并按照制造商的说明用 APC EdU Flow Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, United States of America) 染色。利用 CyAn ADP (Dako, Glostrup, Denmark) 进行流式细胞术分析。对于每个样品,分析最少 500,000 个细胞,并且利用 FlowJo 软件 (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, United States of America) 分析数据。

[0217] 骨髓抑制测定:每周全血细胞计数:在辐射防护实验中,在暴露于辐射 (6.5Gy) 之前 1 小时用 PD0332991 150mg/kg 通过口腔管饲或媒介物对照处理小鼠。在暴露于辐射之后第 3 天开始并持续连续 3 天给予红细胞生成素 (4000 单位 / 天)。

[0218] 给药之前,对小鼠亚群进行基线全血细胞 (CBC) 分析。给药之后 (化疗 / 辐射 +/-CDK4/6 抑制剂 / 红细胞生成素或对照),在处理之后第 10 天和第 17 天进行 CBC 分析。通过尾静脉切口采集 $40\mu\text{L}$ 血液于含有 K2E (K_2EDTA) 的 BD Microtainer 管中。利用 Hemavet CBC-Diff Veterinary Hematology System (Drew Scientific Inc., Dallas, Texas, United States of America) 分析血液。CBC 分析包括测定白细胞、淋巴细胞、粒细胞、单核细胞、血细胞比容、红细胞、血红蛋白、血小板及其他常用的血液参数。

[0219] 统计学分析:除非另外说明,用单因素 ANOVA 进行比较,适当时,使用 Bonferroni 校正进行多重比较。如本文所示,误差棒是 +/- 平均标准误差 (SEM) 或标准差。

[0220] 实施例 3 通过 CDK4/6 增加生长因子效力

[0221] 在正要接受亚致死剂量的辐射 (6.5Gy) 之前向 FVB 野生型小鼠的群组给予安慰剂或 CDK4/6 抑制剂 (PD0332991, 150mg/kg 口腔管饲)。在辐射后 72、96 和 120 小时的时间通过皮下注射给予 3 个剂量的生理盐水 (对照) 或红细胞生成素 (EPO) 100 单位。总的来说, 有 4 个处理群组 (PD0332991+ 盐水、PD0332991+EPO、盐水 +EPO、盐水 + 盐水)。每个群组的样本大小为: 对照 = 7; EPO = 8; PD0332991 = 8, PD/EPO = 6。在基线、辐射后第 10 天和辐射后第 17 天进行连续取血。评价全血细胞计数 (CBC) 以测定红细胞、各种白细胞亚群和血小板的数量。

[0222] EPO 单独或与 PD0332991 联用对血小板 (图 1) 或其他非类红细胞谱系没有影响, 但是接受 PD0332991 的两个处理群组表现出提高的血小板计数 (图 1) 以及其他非类红细胞谱系。EPO 单独不能提高类红细胞谱系。不拘于任何一种理论, 相信这是因为 EPO 处理刺激带有 DNA 损伤的祖红细胞进入细胞周期, 导致随后的细胞凋亡。然而, 如提高的 RBC、Hb 和 HCT 测量所示, 用 PD0332991 联合 EPO 处理小鼠表现出红细胞类功能的显著提高。再次不拘于任何一种理论, 相信 PD0332991 允许祖红细胞修复来自辐射的 DNA 损伤, 然后相信随后的 EPO 处理刺激祖细胞加快红细胞类更替。综上所述, 看来 CDK4/6 抑制剂增强生长因子拯救和支持暴露于诸如辐射或化疗的 DNA 损伤剂之后的各种造血群体的效力。因此, 例如, 作为基于化疗的癌症治疗方案的部分, 通过允许骨髓干细胞和祖细胞在生长因子给药开始之前修复 DNA 损伤, 在 DNA 损伤的时间附近的 CDK4/6 抑制可以用于增强生长因子支持骨髓抑制。此外, CDK4/6 抑制会缓解从疾病存活的癌症患者中与使用生长因子相关的长期 (例如, 化疗后 3 年或更多年) 骨髓毒性 (例如, 脊髓发育不良)。

[0223] 在 DNA 损伤性暴露的时间附近的 CDK4/6 抑制可以增加生长因子的效力, 所述生长因子例如 (但不限于) G-CSF 和衍生物 (例如聚乙二醇化 G-CSF)、GM-CSF 和衍生物、血小板生成素和衍生物、红细胞生成素和衍生物 (例如聚乙二醇化红细胞生成素)、IL12、青灰因子、角质形成细胞生长因子。这些物质, 特别是 G-CSF、GM-CSF 和红细胞生成素及衍生物临床上在癌症患者的护理中用于降低化疗和辐射的毒性。通过在 DNA 损伤性暴露的时间附近的 CDK4/6 抑制诱导药理性静止可以在稍后的时间点增加这些物质的效力 (例如, 通常在 DNA 损伤性治疗剂之后 24-72 开始生长因子给药)。

[0224] 实施例 4 通过 CDK4/6 抑制保护非血液组织和细胞

[0225] 使用诸如 PD0332991 的有效和选择性 CDK4/6 抑制剂在正常人原代肾近端小管上皮细胞中诱导 G1 停滞。参见图 2A 和 2B。观察到细胞周期的 G0/G1 分数中的剂量依赖性增加, 伴随着 G2/M 和 S- 期分数的完全减少。在这种情况下, 细胞进入药理性静止并维持在这种状态中直至它们从这种停滞释放。

[0226] 将正常人原代肾近端小管上皮细胞平板接种, 并且之后的 24 小时暴露于浓度为 0、10nM、30nM、100nM、300nM 或 1 μ M 的 PD0332991。处理后 16 小时; 通过标准方法收获细胞, 在冰冷的甲醇中固定直至 DNA 染色的时间。处理样品, 将 DNA 用碘化丙啶 (PI) 溶液染色并通过流式细胞术分析。利用来自 Verity (Verity Software House, Topsham, Maine, United States of America) 的细胞周期分析软件 Mod-Fit™ 进一步分析来自流式细胞仪的 FCS 文件, 其中细胞周期分数计算为整个群体的百分比。

[0227] CDK4/6 抑制阻断正常人原代肾近端小管上皮细胞的增殖。将这些细胞以适当的密

度接种于 96 孔板中,并且在 37°C 下于湿润培养箱中在 5% CO₂ 下培养 24 小时。之后的 24 小时将这些细胞暴露于横跨广泛的剂量范围的有效和选择性 CDK4/6 抑制剂,在这种情况下为 PD0332991。所研究的剂量范围是 0、10nM、30nM、100nM、300nM、1 μ M 或 3 μ M PD0332991。暴露后 72 小时,根据制造商的说明,用 CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, United States of America) 处理 CDK4/6 抑制的细胞。将平板在发光计中以 1 秒 / 孔读数。将结果放置在 Microsoft Excel 中并分析。在图 3 中,当与处理后 72 小时的 DMSO 对照相比时,在这种抑制剂存在的情况下获得了明显的细胞增殖的剂量依赖性抑制。这个结果与图 2A 和 2B 证实 Cdk4/6 依赖性非血液细胞可以进入药理性静止,从而被抑制增殖。

[0228] CDK4/6 抑制在正常人原代肾近端小管上皮细胞中抑制依托泊苷诱导的 DNA 损伤。在暴露于 DNA 损伤性小分子或电离辐射的细胞培养物中,很快产生双链 DNA 断裂,这会导致 H2AX 的磷酸化。H2AX 的磷酸化对应于双链 DNA 断裂。在图 4 中,将正常人原代肾近端小管上皮细胞平板接种,并且之后的 24 小时将它们用 0、100nM、300nM 或 1 μ M PD0332991 处理。16 小时之后,将这些样品暴露于 2.5 μ M 依托泊苷 8 小时。然后将样品收获、固定并利用 Millipore Corporation 的用于流式细胞术的 H2AXx 磷酸化测定试剂盒 (Millipore, Billerica, Massachusetts, United States of America) 染色 γ H2AX。将样品在我们的流式细胞仪上运行,并且通过 FlowJo 流式细胞术分析软件 (Treestar, Inc., Ashland, Oregon, United States of America) 处理结果。这些结果证实药理性静止以剂量依赖性方式通过药理静止提供化疗诱导的 DNA 损伤的保护。

[0229] CDK4/6 抑制保护正常人原代肾近端小管上皮细胞免受依托泊苷诱导的细胞死亡。在图 5 中证实依赖于 CDK4/6 的非血液细胞中使用选择性和有效的 CDK4/6 抑制剂可以提供对抗 DNA 损伤剂的保护,例如但不限于依托泊苷。将正常人原代肾近端小管上皮细胞平板接种,并且在接种之后用渐增剂量的 CDK4/6 抑制剂 PD0332991 处理 24 小时。处理之后 16 小时,将这些细胞用 2.5 μ M 依托泊苷剂量给药 8 小时。去除培养基并用新鲜培养基替换。将细胞在培养中维持 7 天,根据制造商的说明,用 CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, United States of America) 评价它们对细胞增殖的影响。将平板在发光计中以 1 秒 / 孔读数。将结果放置在 Microsoft Excel 中并分析。用渐增剂量的 PD0332991 处理的细胞表现出以剂量依赖性方式保护免受依托泊苷诱导的细胞死亡。

[0230] 肾是相对静止的,直至遭遇肾损伤。因此,为了确定体内肾细胞增殖是否依赖于 CDK4/6 活性,通过用已知的肾毒性化疗剂顺铂处理雌性 FVBwt 小鼠来刺激肾细胞增殖。在时间 0hr,小鼠开始饲料递送 PD0332991 100mg/kg 每天或者标准饲料而无药物。在 24 小时,小鼠通过 IP 注射接受单剂量的顺铂 15mg/kg,并且接受 IP 注射的 100mcg EdU。在 48 小时,所有小鼠均通过 IP 注射接受第二剂量的 100mcg EdU。72 小时之后,将小鼠安乐死并收获肾。通过利用 gentleMACS™ 组织分离器 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 温和研磨肾来制备肾细胞的单细胞悬浮液。然后将单细胞悬浮液用于测量 EdU 掺入流式细胞术分析。用顺铂和媒介物处理的小鼠显示约 17% 的细胞标记了 EdU,而用顺铂和 PD0332991 处理的小鼠仅有约 2% 的细胞为 EdU 掺入染色阳性。参见图 6。因此,CDK4/6 抑制导致细胞增殖中的 88% 降低,进一步证实肾细胞增殖依赖于 CDK4/6 活性的体外分析。

[0231] 为了确定在 DNA 损伤的时间附近的 CDK4/6 抑制是否会保护肾功能,将小鼠用已知的人的肾小管损伤的病原物质顺铂处理。将小鼠通过口腔管饲用 PD0332991 150mg/kg 或

媒介物对照处理,然后通过 IP 注射接受单剂量的顺铂 15mg/kg。处理后 72 小时,将小鼠安乐死并通过心脏穿刺采集血液用于 BUN(血尿素氮)和血清肌酸酐(SrCr)分析。血清 BUN 和 SrCr 是肾功能的常用标志,并且当肾功能被急性损伤时血清水平迅速上升。图 7 显示给予顺铂之后 BUN 和 SrCr 显著上升,并且与顺铂共给药的单剂量 PD0332991 能够抑制顺铂诱导的肾毒性。

[0232] 看来 CDK4/6 在诸如肾的某些非血液组织的细胞增殖中起作用。因此,CDK4/6 抑制剂可以用来保护非血液组织免受诸如辐射和化疗的 DNA 损伤剂,所述非血液组织包括但不限于肾、肠、心脏、肝、脑、甲状腺、皮肤、肠粘膜、听觉系统、肺、膀胱、卵巢、子宫、睾丸、肾上腺、胆囊、胰和胰岛、胃、血管以及骨。

[0233] 实施例 5 通过 CDK4/6 抑制增加 DNA 损伤剂效力

[0234] 评价了 CDK4/6 抑制对一组具有完整的 RB 的小细胞肺癌 (SCLC) 细胞系 (H417) 或 RB 缺陷的小细胞肺癌 (SCLC) 细胞系 (H69, H82, H209, H345) 的增殖效应。将细胞用 DMSO 或 PD0332991 100nM 处理 48 小时,然后利用测量细胞呼吸的 WST-1 测定来估计细胞数量。参见图 8。在 RB 完整的 SCLC 细胞系 (H417) 中,细胞增殖减少,而在所有 4 个 RB 缺陷的细胞系中,通过 CDK4/6 抑制,细胞增殖实际上增加。

[0235] 还评价了 CDK4/6 抑制在基底样乳腺癌的 C3-Tag 转基因小鼠模型中的效应。C3-TAg 模型含有表达猿猴病毒 40 早期区域转化序列 (SV40 大 T 抗原) 的重组基因,据证实其灭活 p53 和 RB。将小鼠安置为 5 只 / 笼,随意获得标准饲料和水。每周通过卡尺测量肿瘤体积。利用以下式计算肿瘤体积:体积 = [(宽度)² × 长度] / 2。建立足够的肿瘤体积 (50-60mm³) 之后,通过肿瘤大小将小鼠分层并随机分配至每个研究群组 (未处理的,每天标准饲料中 PD0332991 100mg/kg,化疗加上媒介物对照每周一次持续 3 周,或者化疗和 PD0332991 每周一次持续 3 周)。在每周一次持续 3 周的处理群组中,通过 IP 注射给予化疗,并且通过口腔管饲给予 PD0332991 150mg/kg 或媒介物对照。化疗方案由每周一次持续 3 周的卡铂 75mg/kg 组成。在第 0 天、第 7 天和第 14 天给予处理,并且每周测量肿瘤体积,直至由于毒性或肿瘤负荷小鼠死亡或被安乐死。

[0236] 在第 21 天,每天给予 CDK4/6 抑制剂 PD0332991 在 C3-Tag 模型中对肿瘤生长没有影响 (参见图 9),然而每周一次持续 3 周共给予 PD0332991 150mg/kg 与卡铂 75mg/kg 在 C3-Tag 小鼠中导致提高的肿瘤反应 (图 9)。此外, C3-Tag 小鼠的长期跟进显示与模拟管饲 / 卡铂群组相比,在 PD0332991 / 卡铂群组中肿瘤进展被延迟 (图 10)。这些数据一起显示,在具有严重紊乱的细胞周期的肿瘤的治疗中,CDK4/6 抑制可以提高化疗的效力。

[0237] 因此,看来 CDK4/6 抑制可以增加 DNA 损伤剂在治疗具有严重紊乱的细胞周期的某些癌症中的效力,例如,特征是非常高水平的 CDK2 活性 (例如作为 MYC 原癌基因扩增的结果) 或丧失 RB 肿瘤抑制蛋白的癌症。在这类肿瘤中,CDK4/6 抑制剂在肿瘤细胞中并不诱导药理性静止,而是增加该癌症对 DNA 损伤剂的敏感性,从而增加肿瘤杀死。CDK4/6 抑制剂处理同时防止 DNA 损伤剂的宿主血液毒性 (通过在某些其他细胞中诱导静止)。RB 无效或 MYC 扩增的癌症的肿瘤杀死的这种增加联合减少的宿主毒性意味着这类肿瘤的治疗窗的增加,允许这类肿瘤更容易治愈,对患者具有较低毒性。

[0238] 预期诸如 Her2 扩增的乳腺癌的肿瘤类型的亚群对 CDK4/6 抑制敏感,因此共给予 CDK4/6 抑制剂与化疗可能导致肿瘤保护。然而,大多数癌症看来非选择性地使用增殖性激

酶（例如，可以使用 CDK 1/2/4/ 或 6）。因此，孤立地抑制 CDK4/6 应当在大多数癌症中不影响肿瘤生长，并且 CDK4/6 抑制不会在这些肿瘤类型中负面影响化疗效力。事实上，如上所述，预期用选择性小分子抑制剂的 CDK4/6 抑制增加化疗剂在不是 CDK4/6 依赖性的某些肿瘤中的效力。本领域技术人员会理解，这类肿瘤可以基于肿瘤类型和分子遗传学来推断，并且例如可以是特征在于包括但不限于以下方面的组的一个或多个方面的那些癌症：CDK1 或 CDK2 活性增高、视网膜母细胞瘤抑癌蛋白（RB）丧失或缺乏、高水平的 MYC 表达、增加的细胞周期蛋白 E 以及增加的细胞周期蛋白 A。这类癌症可以包括但不限于小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤、HPV 阳性恶性肿瘤如宫颈癌和某些头颈癌、MYC 扩增的肿瘤如 Burkitts 淋巴瘤、以及三阴性乳腺癌；某些种类的肉瘤、某些种类的非小细胞肺癌、某些种类的黑素瘤、某些种类的胰腺癌、某些种类的白血病、某些种类的淋巴瘤、某些种类的脑癌、某些种类的结肠癌、某些种类的前列腺癌、某些种类的卵巢癌、某些种类的子宫癌、某些种类的甲状腺癌及其他内分泌组织癌、某些种类的唾液腺癌、某些种类的胸腺癌、某些种类的肾癌、某些种类的膀胱癌以及某些种类的睾丸癌。

[0239] 在非限制性实例中，所述癌症选自小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤以及三阴性（ER/PR/Her2 阴性）或“基底样”乳腺癌。小细胞肺癌和视网膜母细胞瘤几乎总是灭活视网膜母细胞瘤抑癌蛋白（RB），因此不需要 CDK4/6 活性来增殖。因此 CDK4/6 抑制剂治疗会在骨髓和其他正常宿主细胞中引起药理性静止，但是不会在肿瘤中引起药理性静止。三阴性（基底样）乳腺癌也几乎总是 RB 无效的。而且，某些病毒诱导的癌症（例如宫颈癌和头颈癌的亚群）表达病毒蛋白（E7），其灭活 RB，使这些肿瘤在功能上是 RB 无效的。一些肺癌也被认为是由 HPV 引起的。本领域技术人员会理解，预期不受 CDK4/6 抑制剂影响的癌症（例如，RB 无效的、表达病毒蛋白 E7 的或过量表达 MYC 的那些癌症）可以通过包括但不限于 DNA 分析、免疫染色、蛋白印迹分析和基因表达图谱的方法来确定。

[0240] 实施例 6 通过 CDK4/6 抑制阻断 T 细胞增殖

[0241] CDK4/6 的急性药理抑制阻抑淋巴细胞增殖，对小鼠中的记忆 T 细胞稳态增殖和生发中心形成有最显著的影响。为了确定抑制 CDK4/6 是否影响记忆细胞生成和维持，将小鼠用选择性 CDK4/6 抑制剂 PD 0332991 或无关的选择性 CDK4/6 抑制剂 2BrIC 处理。2BrIC 由 OTAVA Chemicals (Kiev, Ukraine) 合成，并且可以根据 Zhu et al., J. Med. Chem. 46, 2027-2030 (2003) 所述的方法来制备。如通过人和小鼠细胞中的 BrdU 掺入和 Ki67 表达所测量的，通过 PD 0332991 或 2BrIC 急性抑制 CDK4/6 导致与幼稚 T 细胞相比，记忆 T 细胞的稳态增殖更显著降低。参见图 11、17、18 和 21。在图 11A 中，PD0332991 对体内 CD4+ 和 CD8+ 小鼠 T 细胞的 BrdU 掺入的影响，在 CD44+CD25+ 记忆细胞中观察到最大影响（图 11B 中定量）。利用 Ki67 染色，在未刺激的脾 T 细胞中观察到相似的对体内稳态增殖的影响（图 21）。降低的 CDK4/6 活性还阻抑生发中心形成，这与记忆 B 细胞的生成有关。参见图 11C。这些数据揭示了 CDK4/6 在记忆细胞稳态中的作用。

[0242] 利用人淋巴细胞观察到相似结果。图 12 示出了在人细胞中解决相似问题的实验方案。将人淋巴细胞分选为 T (CD3+) 和 B (CD19+) 细胞，并且在用 PMA 和肌毒素 (P+I)+OKT3 (T 细胞) 或 IgM (B 细胞) 刺激之前在体外用 CDK4/6 抑制剂处理，通过 BrdU 吸收和 Ki67y 表达评价增殖，并且通过 CD25 表达评价活化。图 13 显示在小鼠细胞中，CDK4/6 抑制剂阻断应答 T 细胞受体 (TCR) 刺激 (P+I) 的增殖，在 CD45RA 低记忆细胞中具有更大效

应。这些数据在图 14 中制成图表。在图 15 中,评价了 CDK4/6 抑制对特定 T 细胞部分的影响,有或无 TCR,表明相对于幼稚细胞,CDK4/6 抑制对记忆细胞的增殖具有更大影响。在 CD8⁺ 细胞中观察到相似影响。图 16 示出了如图 15 中的相似数据,但是利用 Ki67 作为增殖的标志代替 BrdU。这些对增殖的影响改变了 CD4⁺(参见图 17A、17B 和 17C) 和 CD8⁺(参见图 18) 细胞的相对频率。与幼稚细胞相比,CDK4/6 抑制剂更大程度地降低 CD4⁺ 效应记忆 (EM) 细胞频率。参见图 17A 和 17C。在 CD8⁺ 细胞中观察到相似结果。作为这些对增殖的影响的结果,在 CD4⁺ 和 CD8⁺ 区室中记忆 / 幼稚比例降低了一半。参见图 17B 和 20。如通过 CD25 表达所测量的,增殖的这些改变与减少的 T 细胞活化有关。参见图 19。

[0243] 抑制 T 细胞增殖的这种能力可以用于自身免疫病和变应性疾病的治疗。目前用各种具有显著毒性的细胞毒性和类固醇物质治疗这些疾病状况。记忆 T 细胞区室一直难以靶向以减弱回忆免疫应答,并且使用 CDK4/6 抑制剂减少这部分的增殖会特别有利于自身免疫病和变应性疾病的治疗。

[0244] **胸腺细胞分化**:通过 FACS 测定在不同阶段的胸腺细胞 (双阴性 (DN) :CD4⁻CD8⁻; 双阳性 (DP) :CD4⁺CD8⁺; 单阳性 (SP) :CD4⁺ 或 CD8⁺) 的百分比和绝对数量来评价 CDK4/6 抑制对胸腺细胞发展的影响。将 DN 细胞转化为 DP 细胞,然后将 DP 细胞转化为 CD4 或 CD8 单阳性的细胞。暂时的 CDK4/6 抑制引起 DP 和 SP 细胞明显减少,保留 DN 细胞。这个结果显示在胸腺作用期间为了新幼稚 T 细胞的生成需要 CDK4/6 活化。参见图 23。

[0245] 实施例 7 通过 CDK4/6 抑制阻断 B 细胞增殖

[0246] 如图 11 所示将野生型小鼠的群组用媒介物或 CDK4/6 抑制剂处理。淋巴结中的生发中心的 Ki67 染色显示随着 CDK4/6 抑制,增殖显著减少。在脾 CD45R⁺B⁻ 细胞中观察到相似结果。参见图 21。将未刺激的小鼠用 PD0332991 处理 24 小时,并且在适当分选之后通过 Ki67 染色测量稳态 B 细胞增殖。利用 BrdU 掺入以测量脾 B 细胞增殖获得了相似结果。参见图 22。如图 12 所述在人细胞中用 B 细胞受体刺激进行相似实验。图 20 显示 CDK4/6 抑制阻断通过 P+I 的 B 细胞刺激。这些结果显示在小鼠和人中,稳态、生发中心和 BCR 诱导的 B 细胞增殖需要 CDK4/6 活性。

[0247] 实施例 8 通过 CDK4/CDK6 抑制来阻抑自身免疫病发展

[0248] 已开发了几个自身免疫小鼠模型的系,包括 NOD 小鼠 (自发性自身免疫糖尿病) 和 Lyn^{-/-} (狼疮样自身免疫病)。参见,例如, Anderson and Bluestone, Annual Review of Immunology 23, 447-485 (2005); 和 Hibbs et al., Cell 83, 301-311 (1995)。将青年 (约 4-6 周龄) 和老年 (> 30 周龄) 小鼠的群组用安慰剂或 CDK4/6 抑制剂处理确定的时间段,然后分析自身免疫表型。

[0249] 应当理解,在不脱离本发明公开的主题的范围的情况下可以改变本发明公开的主题的各种细节。此外,上述说明仅是出于例证目的而非限制性目的。

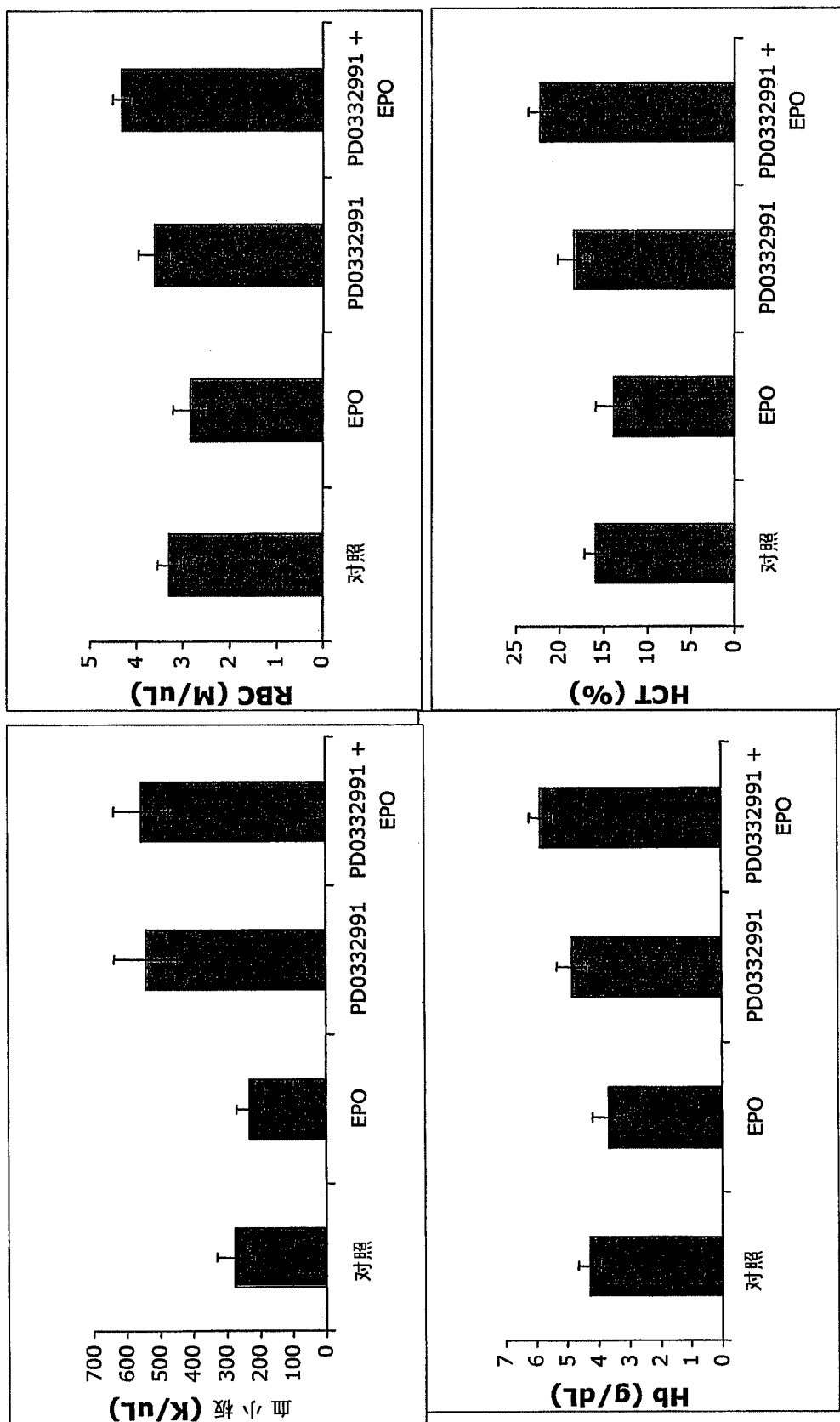


图 1

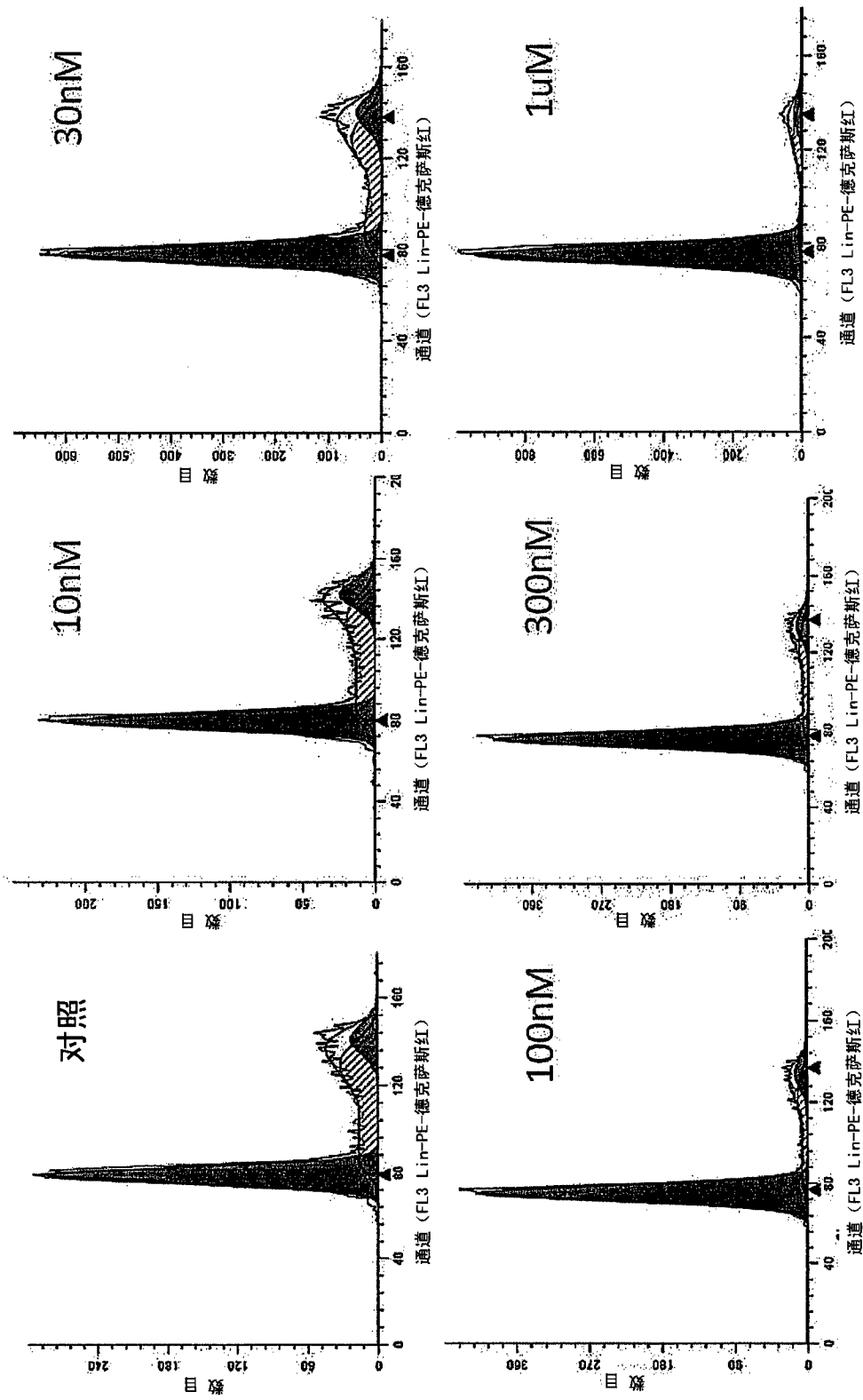


图 2A

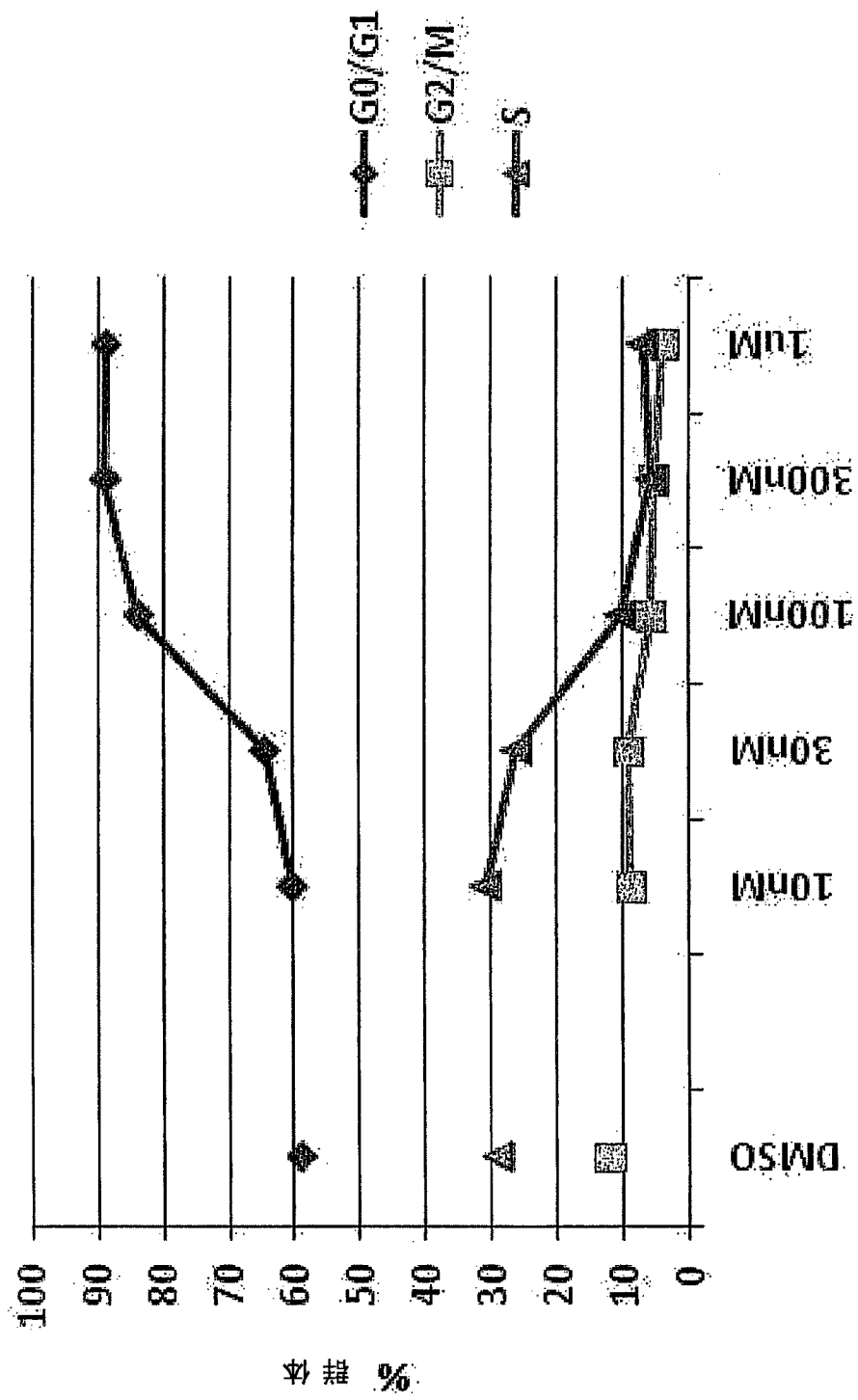


图 2B

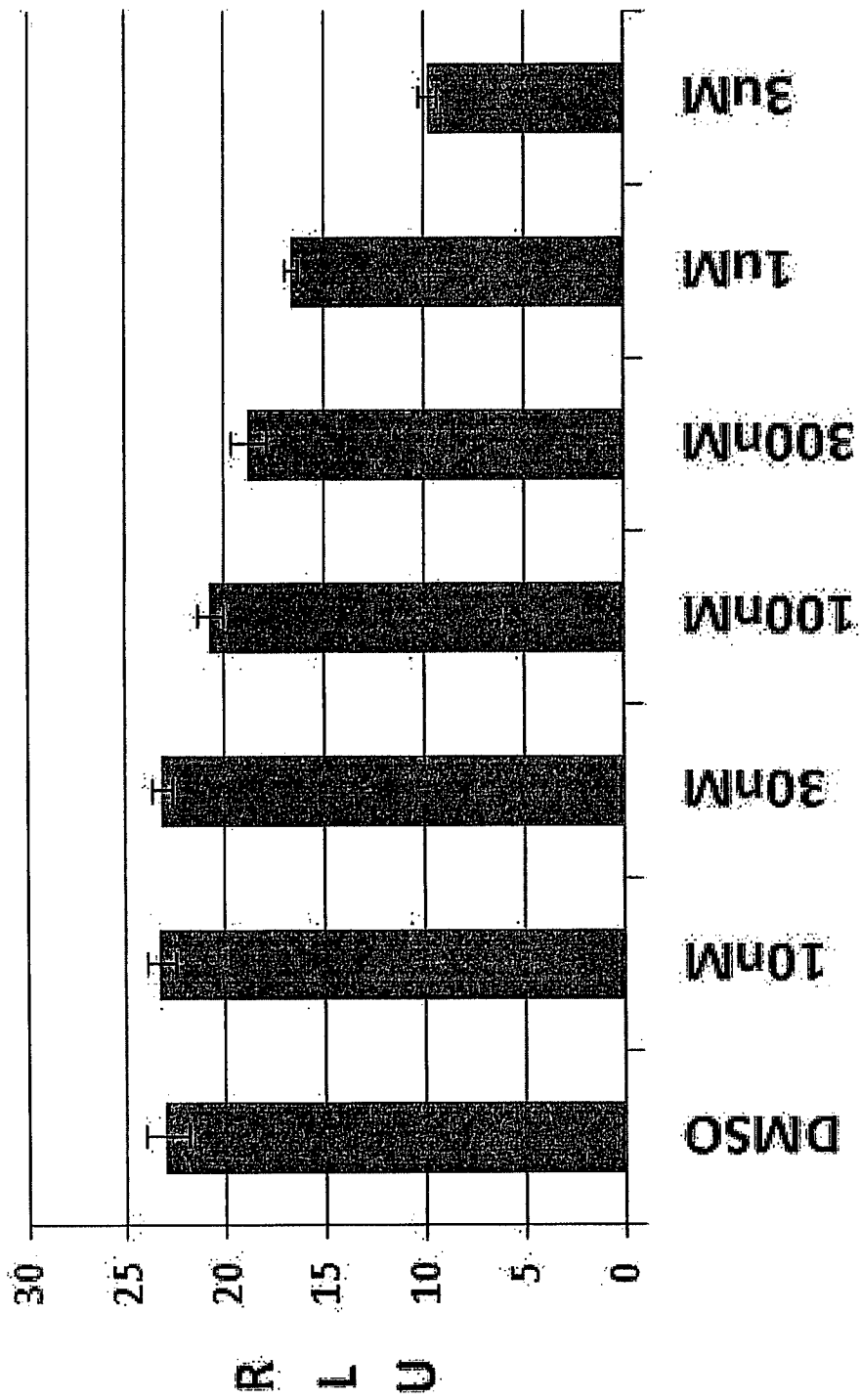


图 3

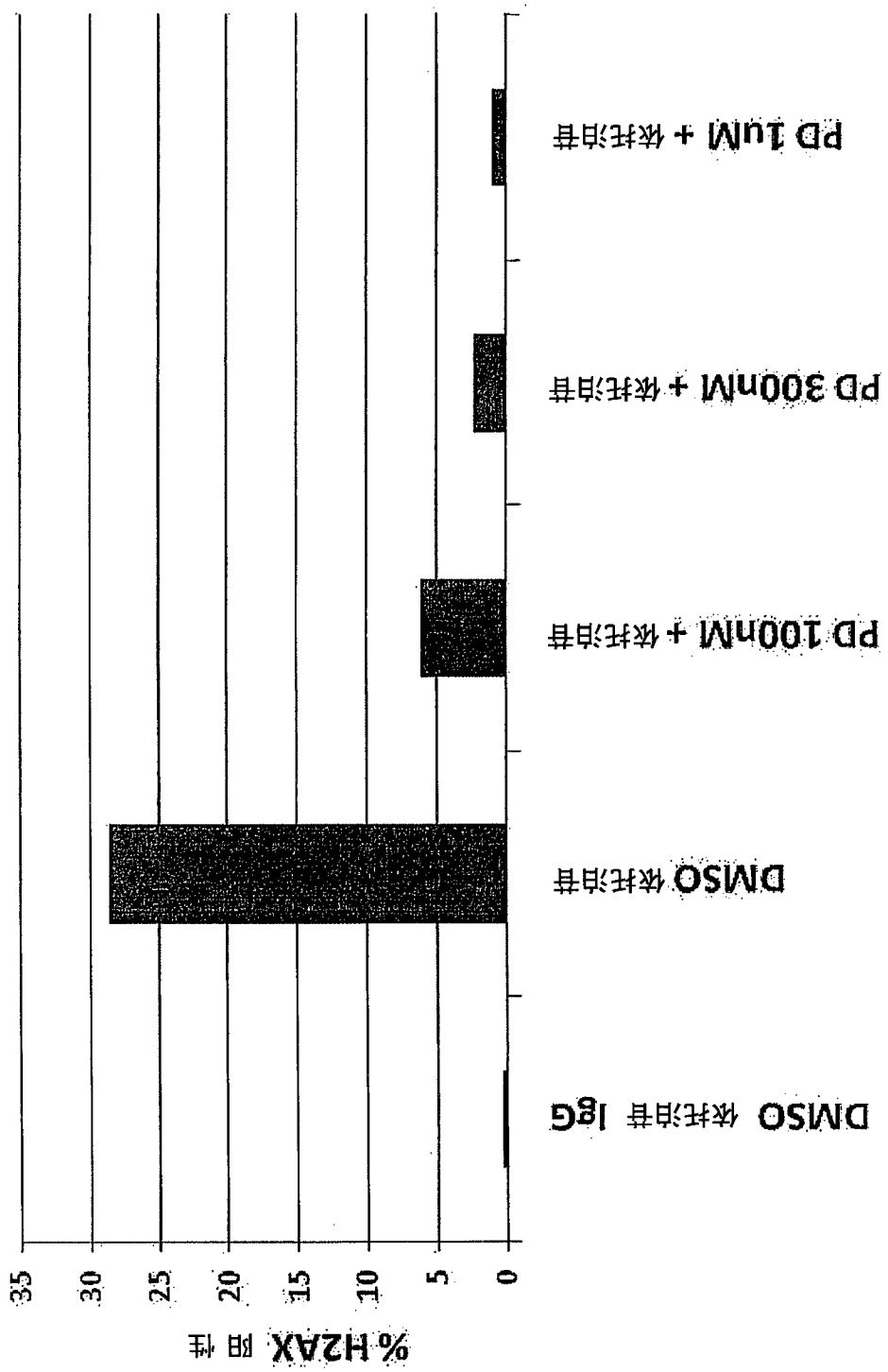


图 4

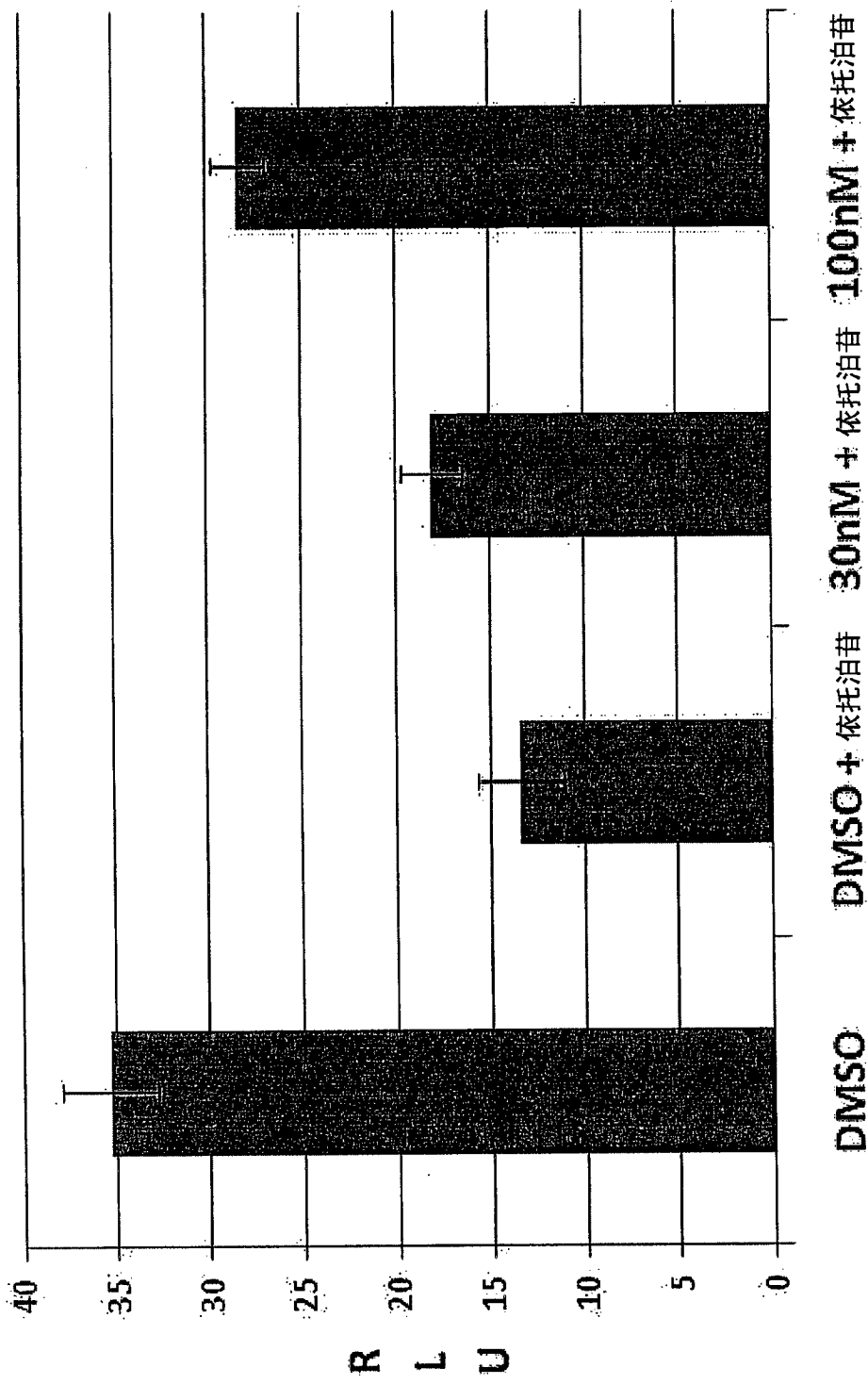


图 5

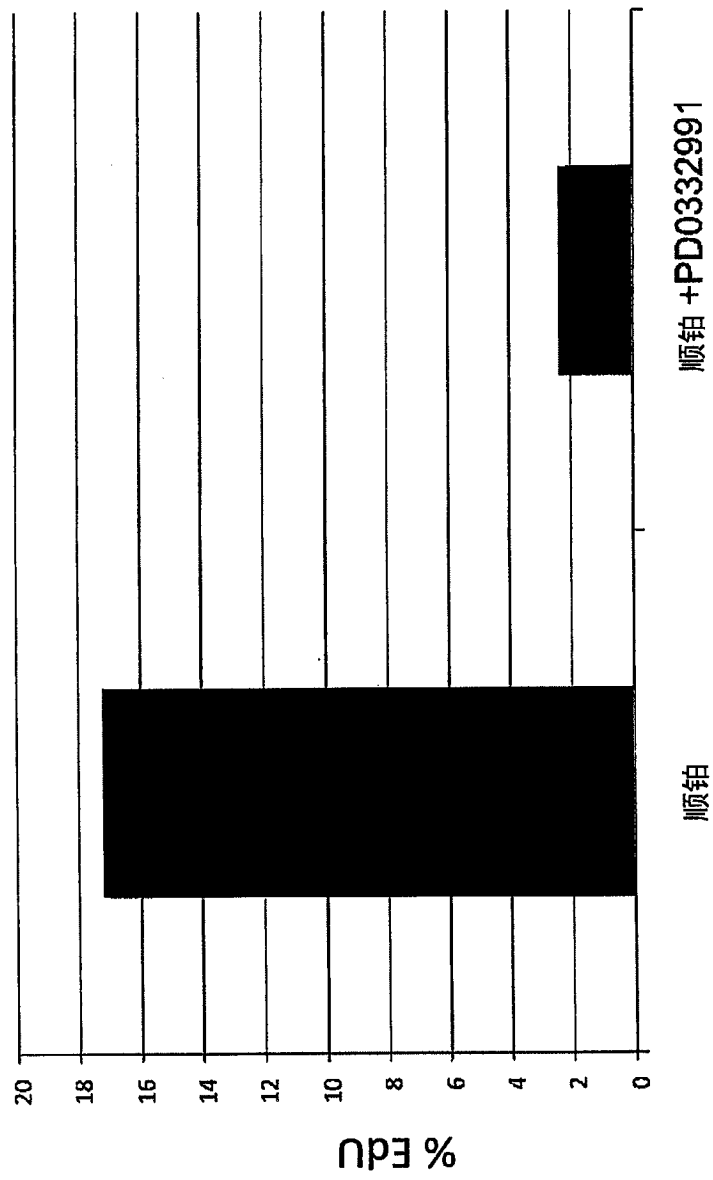


图 6

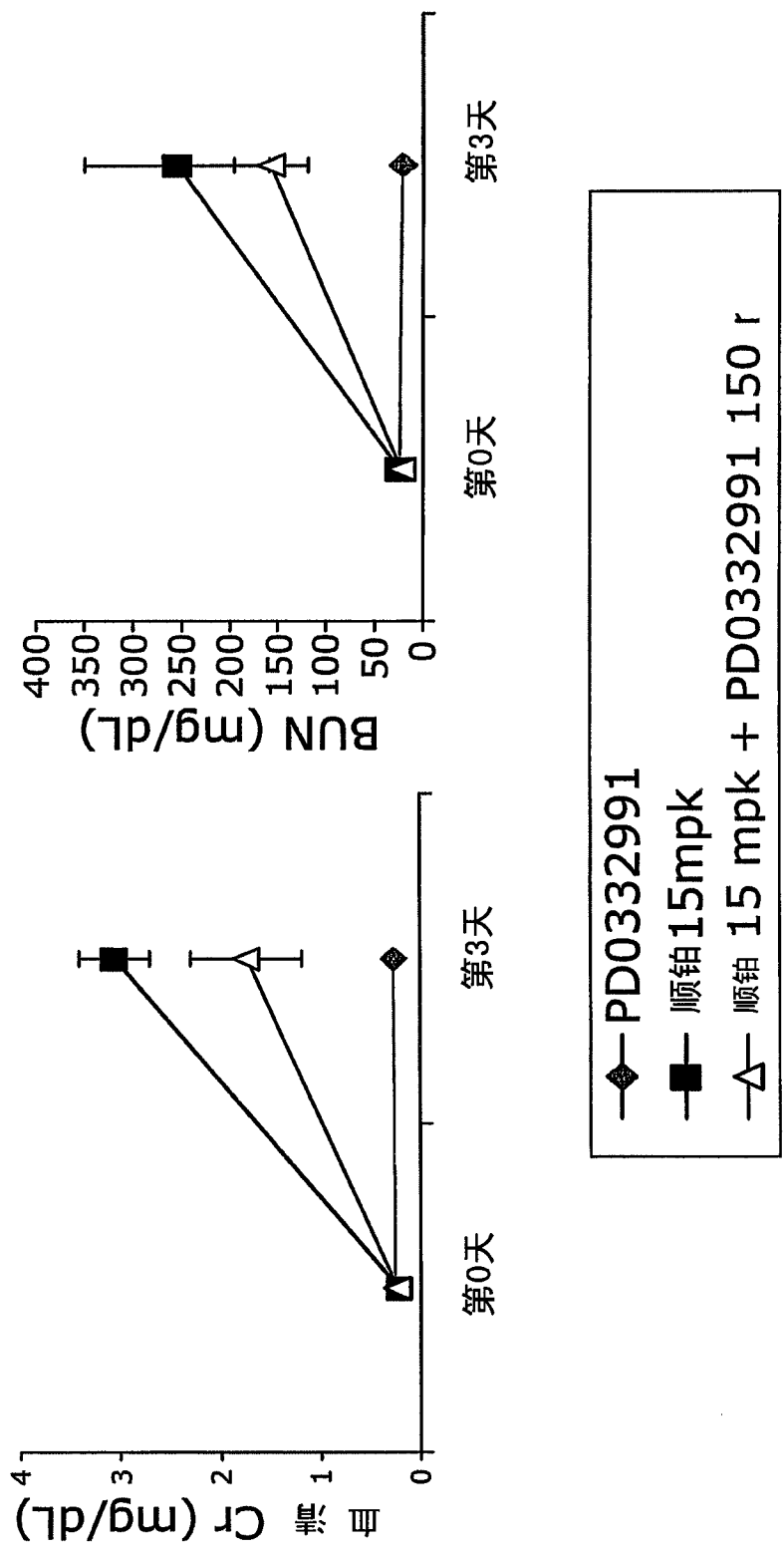


图 7

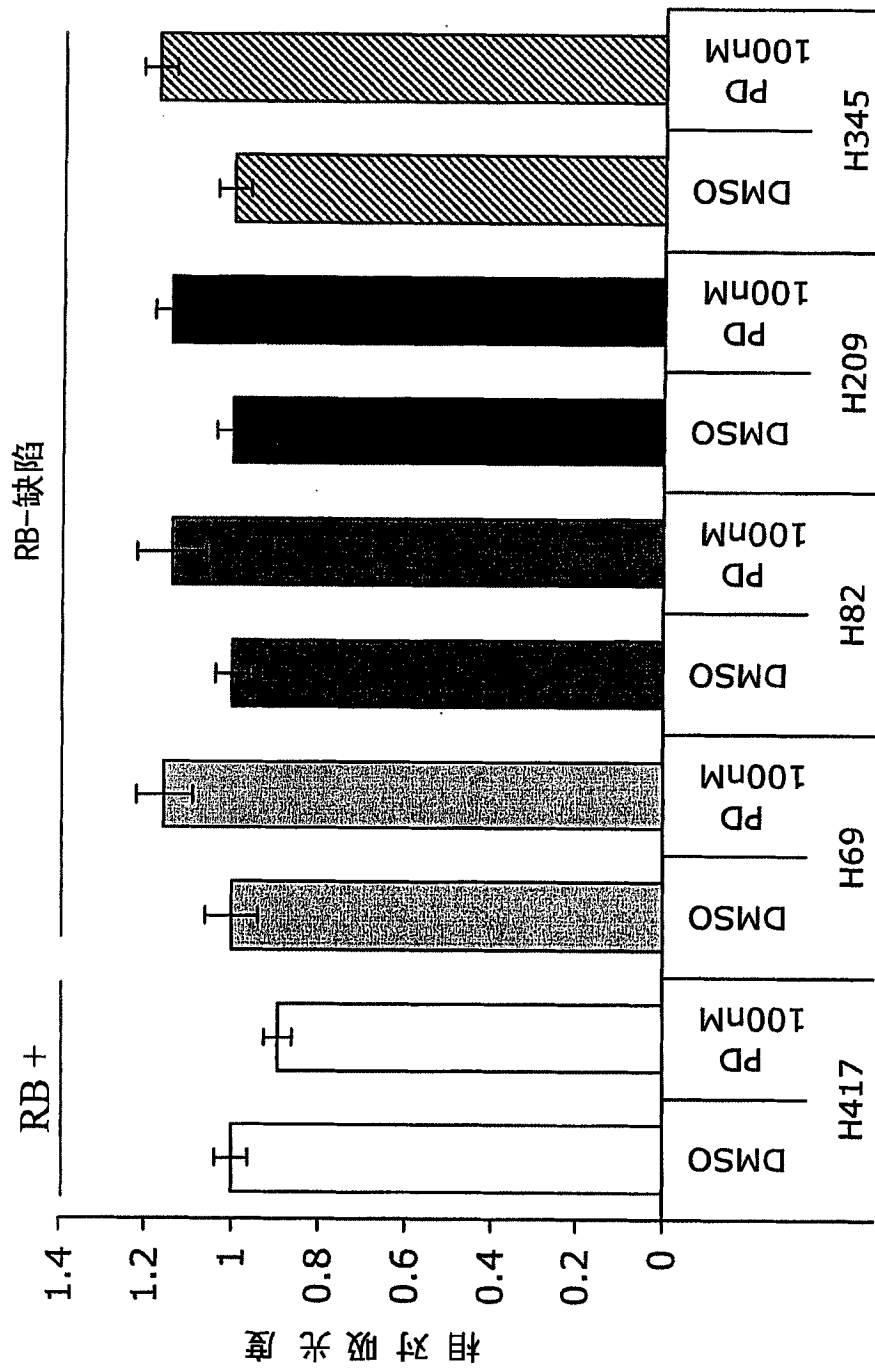


图 8

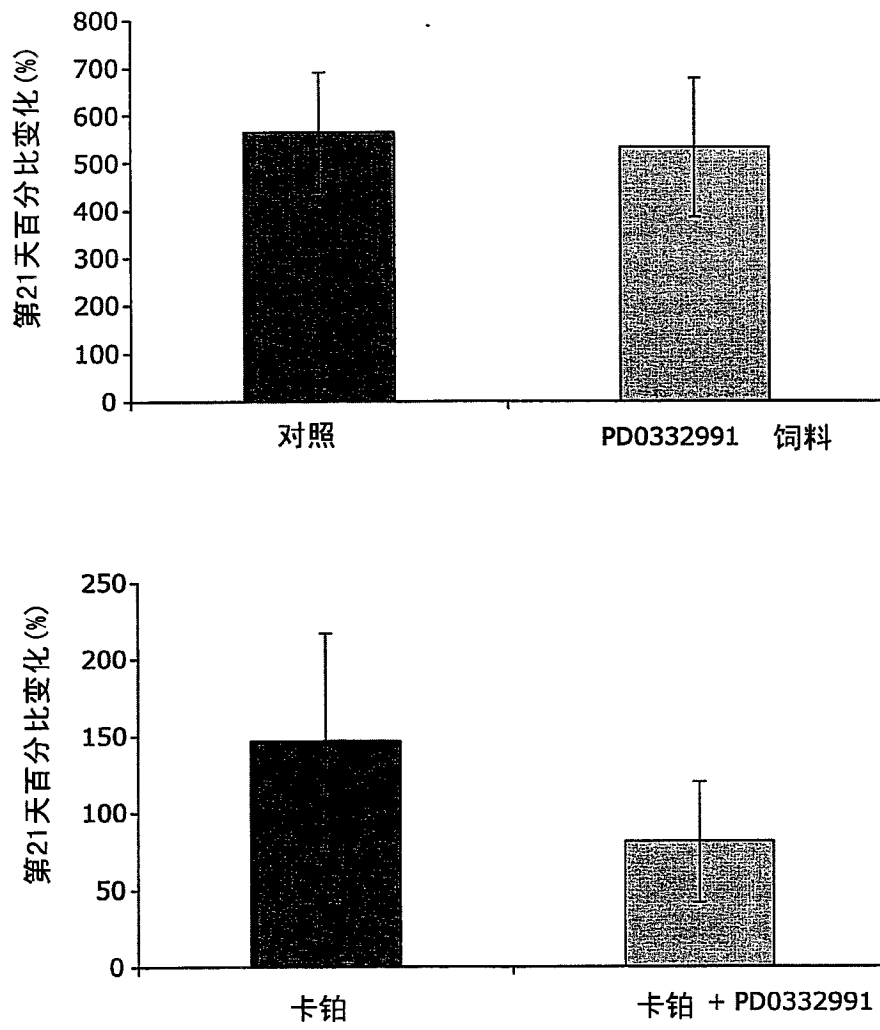


图 9

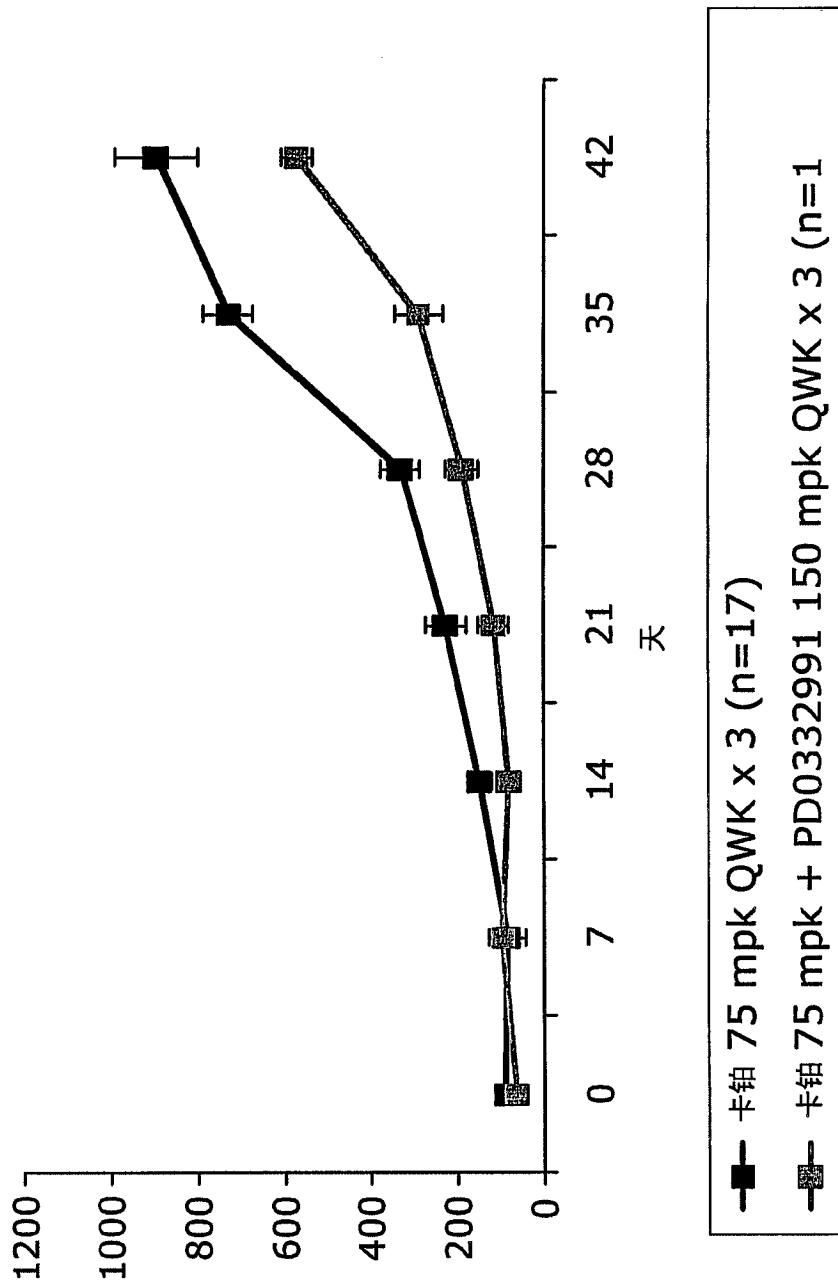


图 10

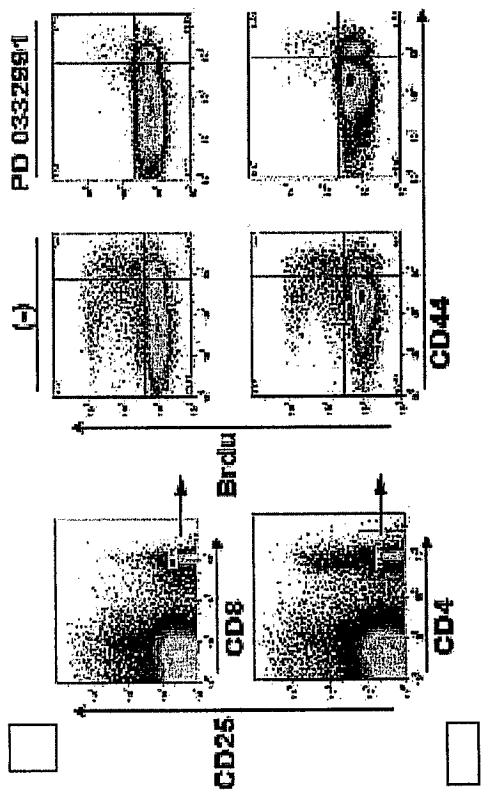


图11A



图11B

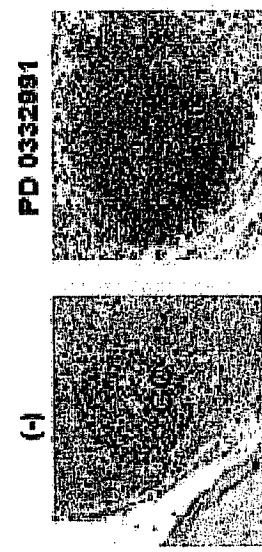


图11C

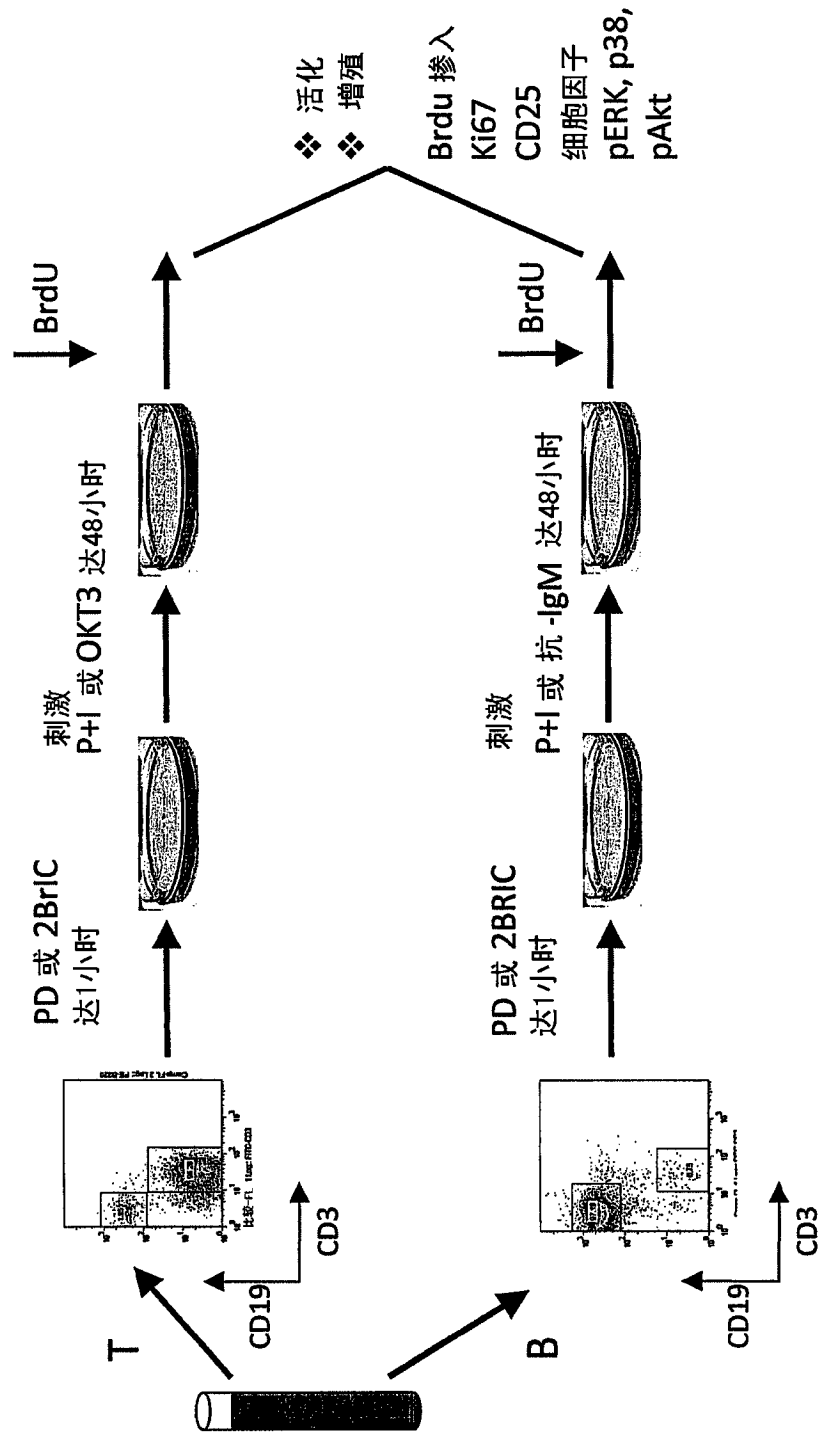
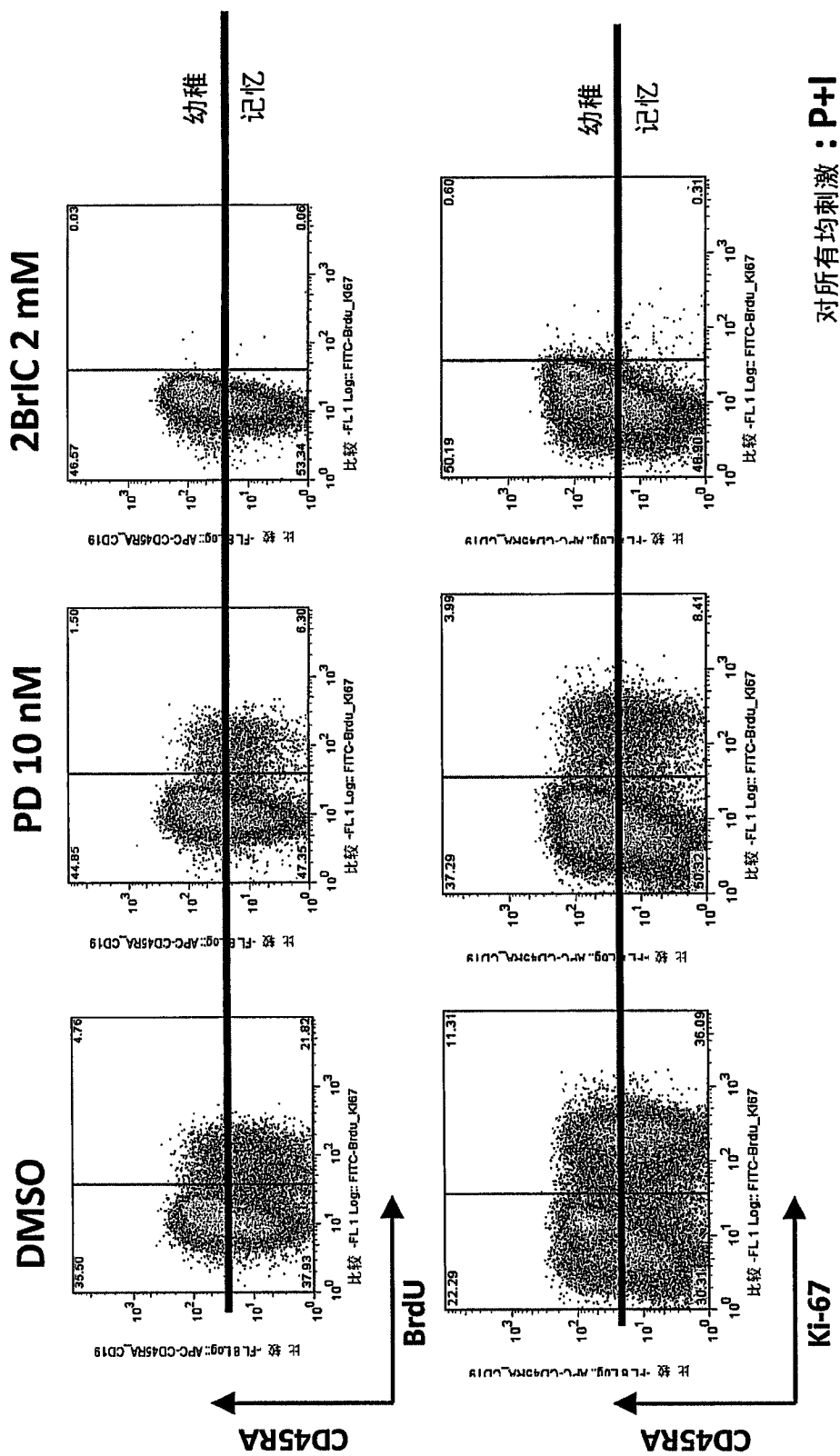


图 12



对所有均刺激 : P+I

图 13

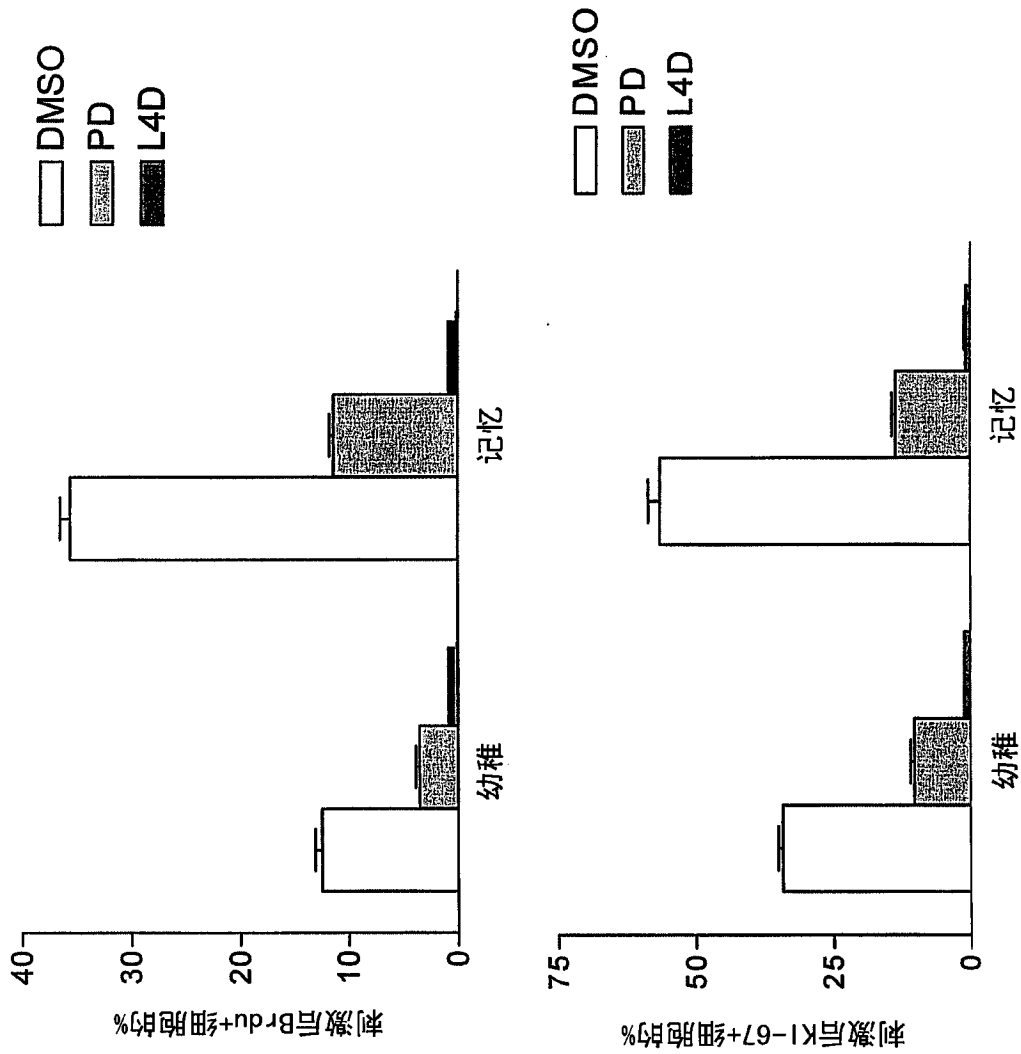
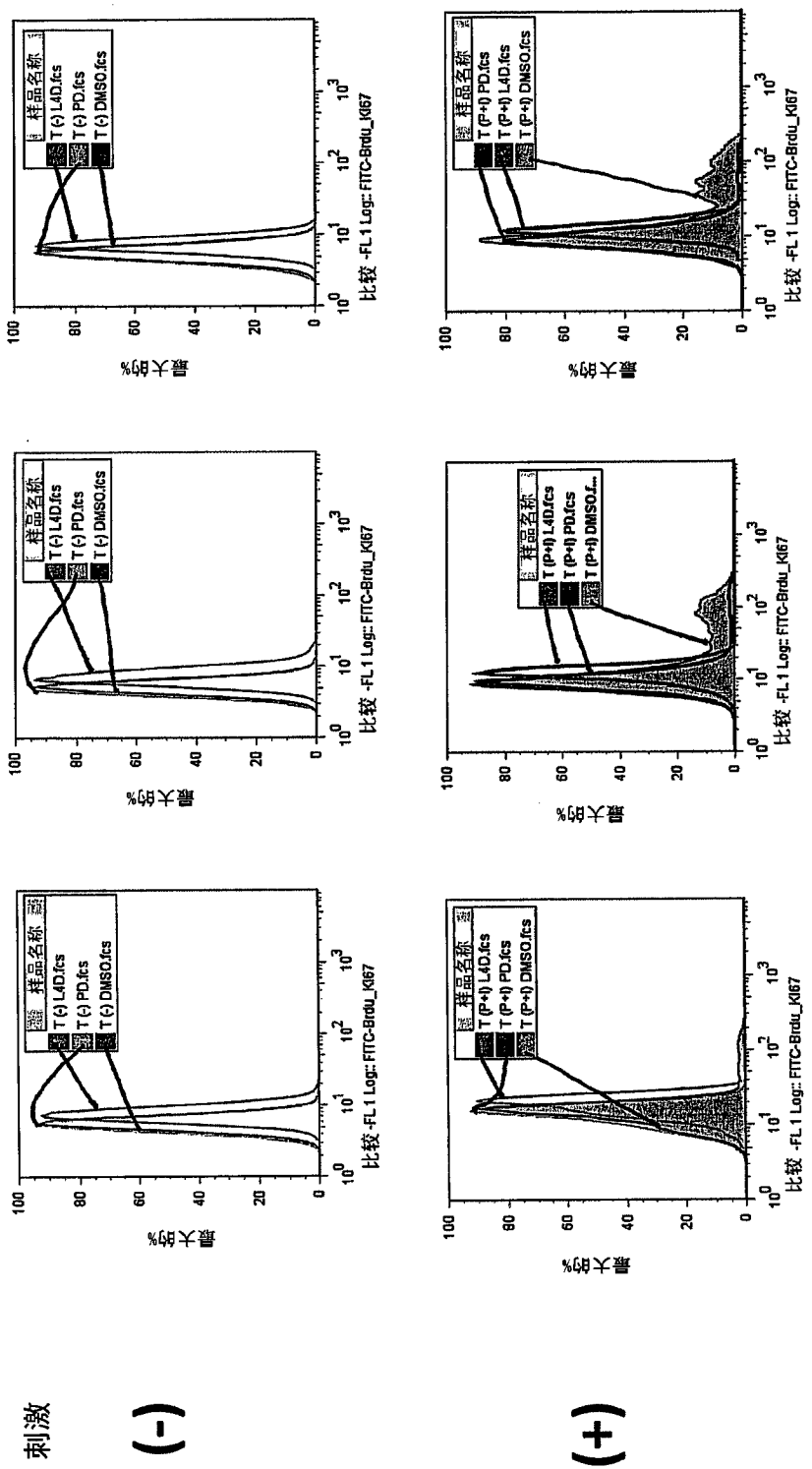


图 14



CD8+ 区室中的相似结果

图 15

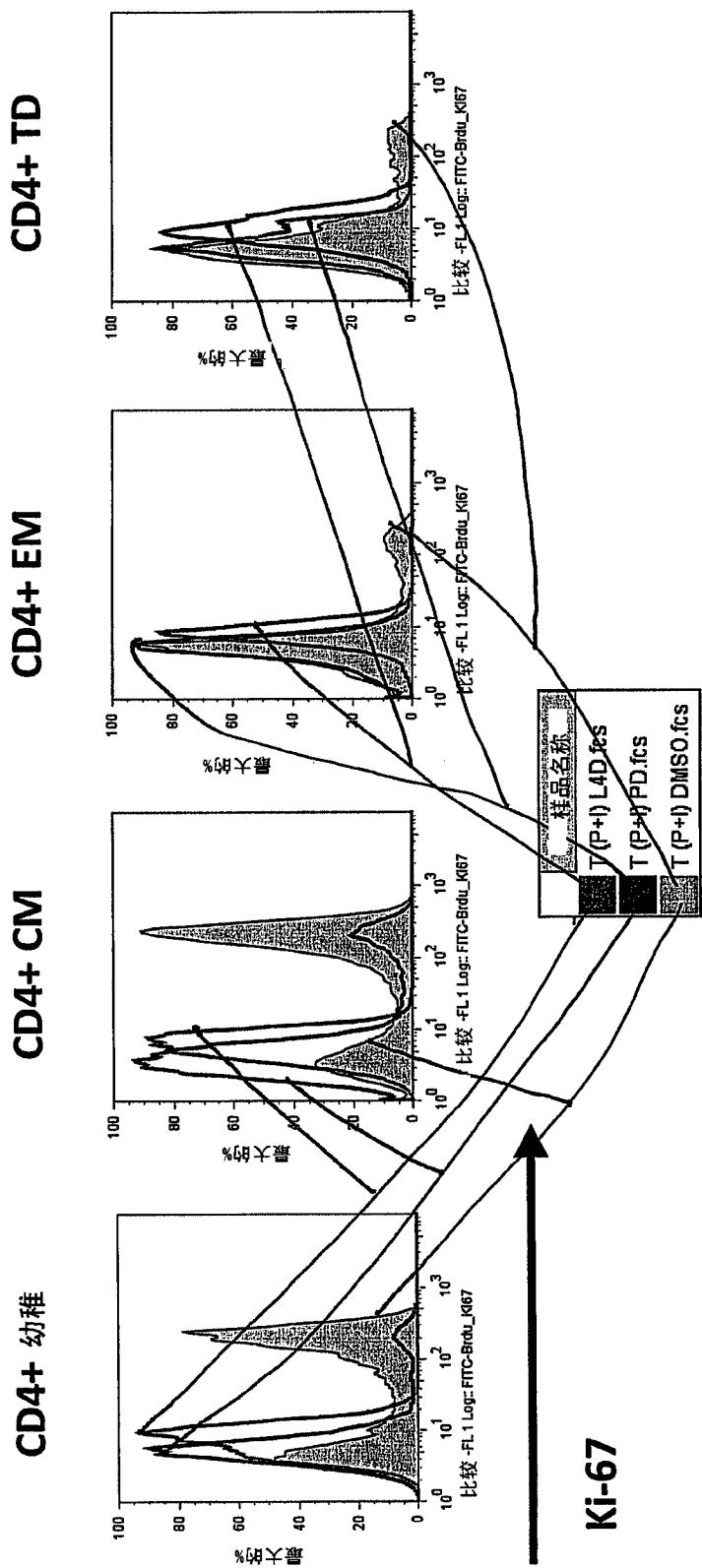


图 16

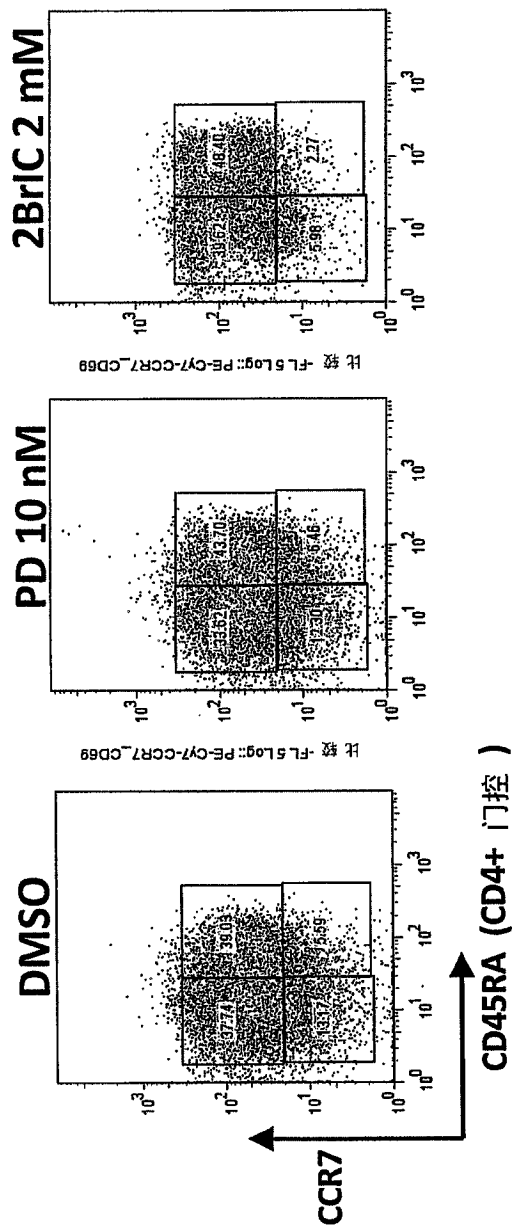


图 17A

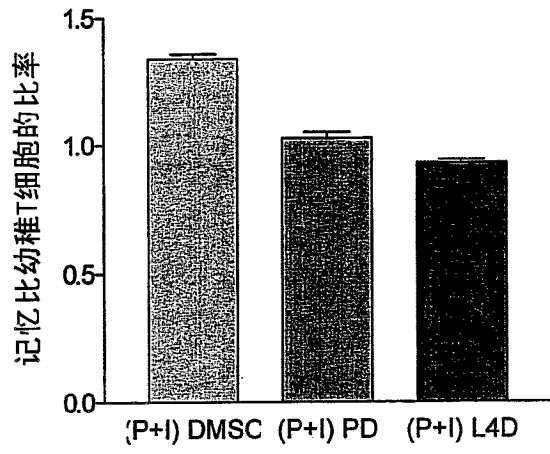


图 17B

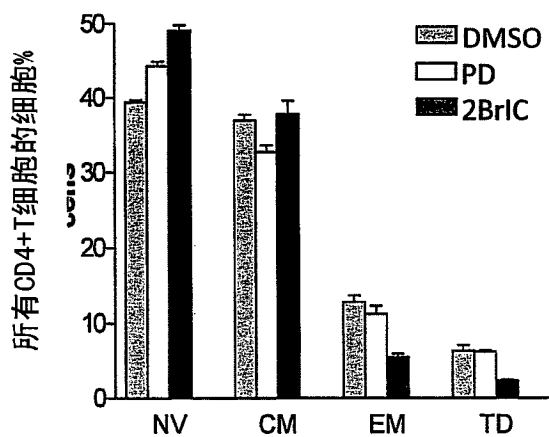


图 17C

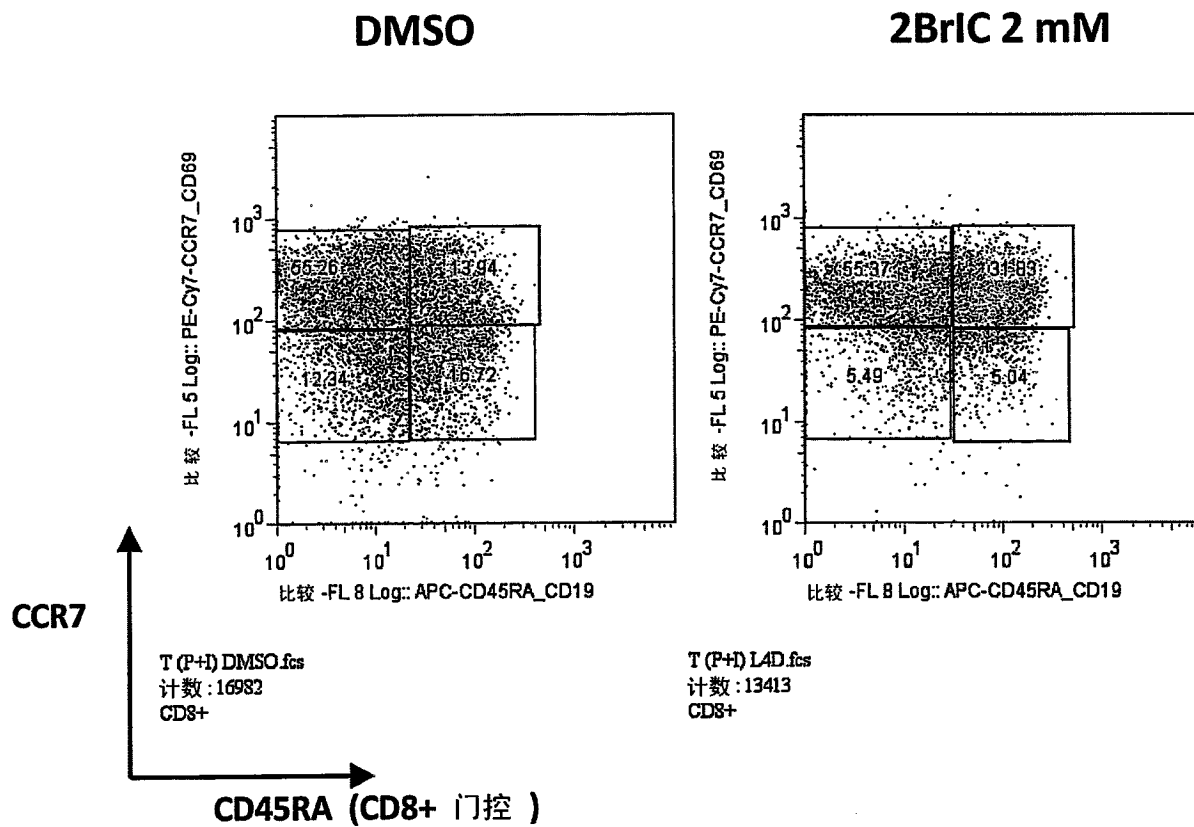


图 18

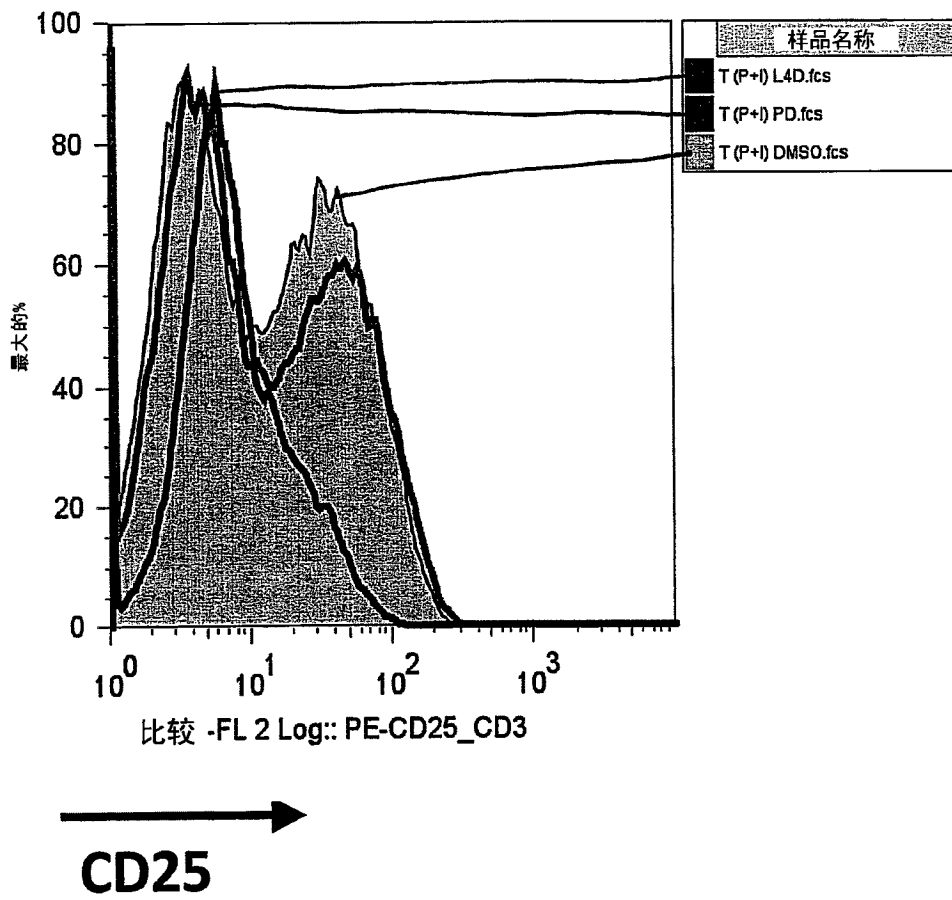


图 19

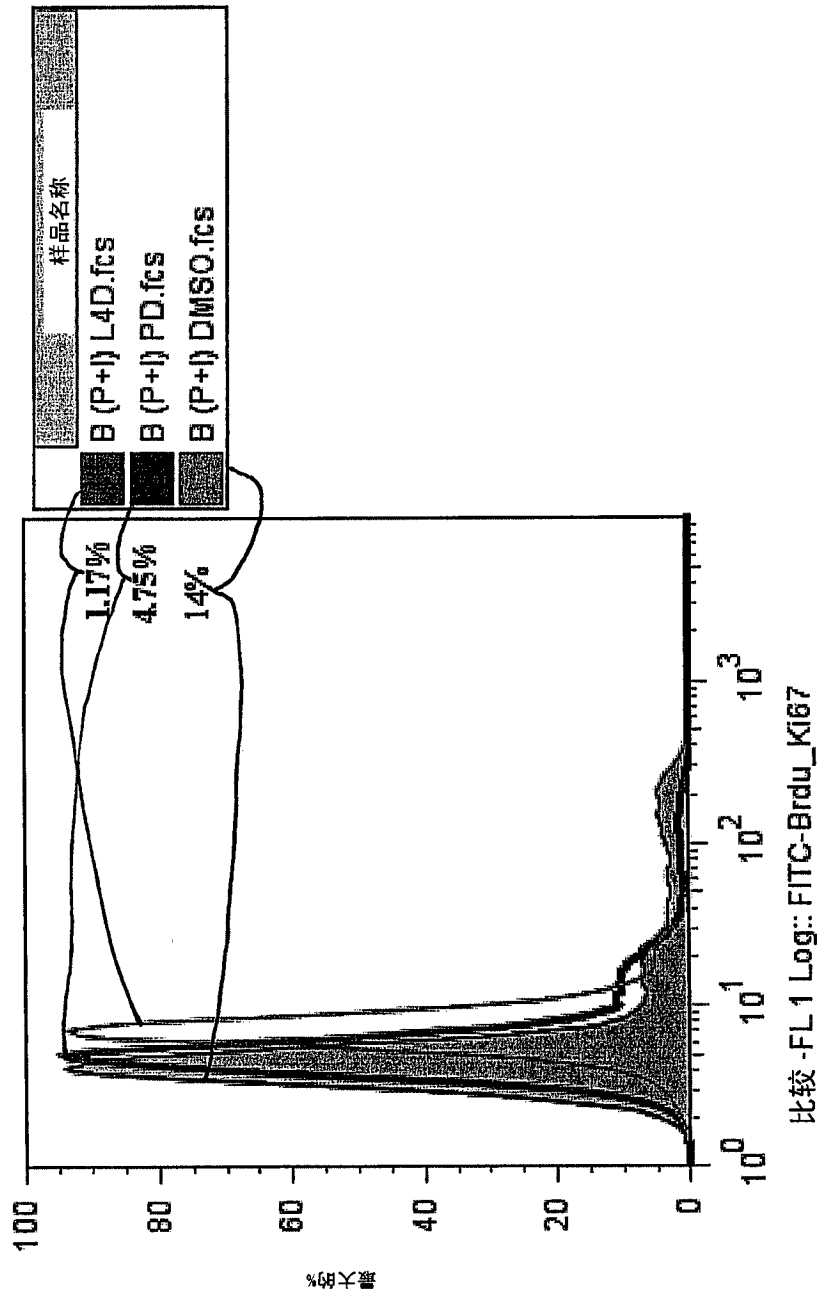


图 20

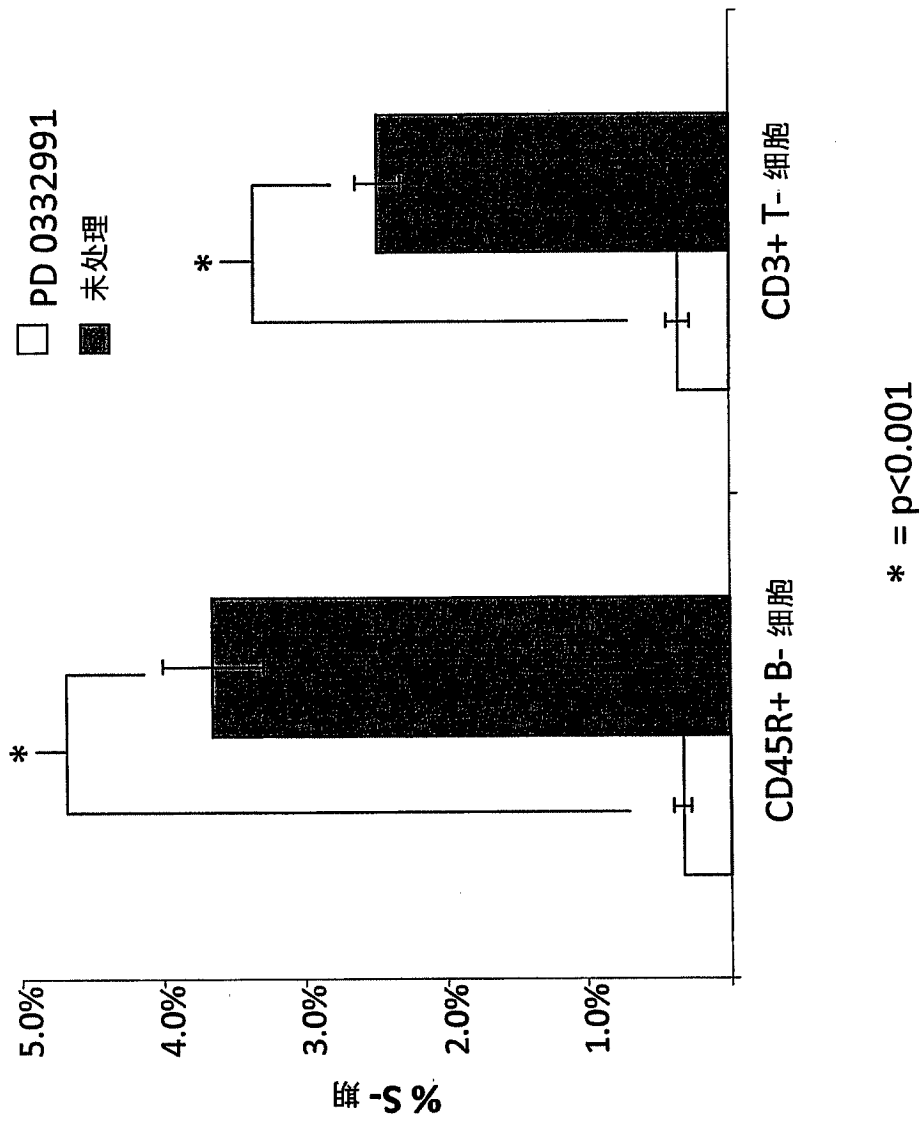


图 21

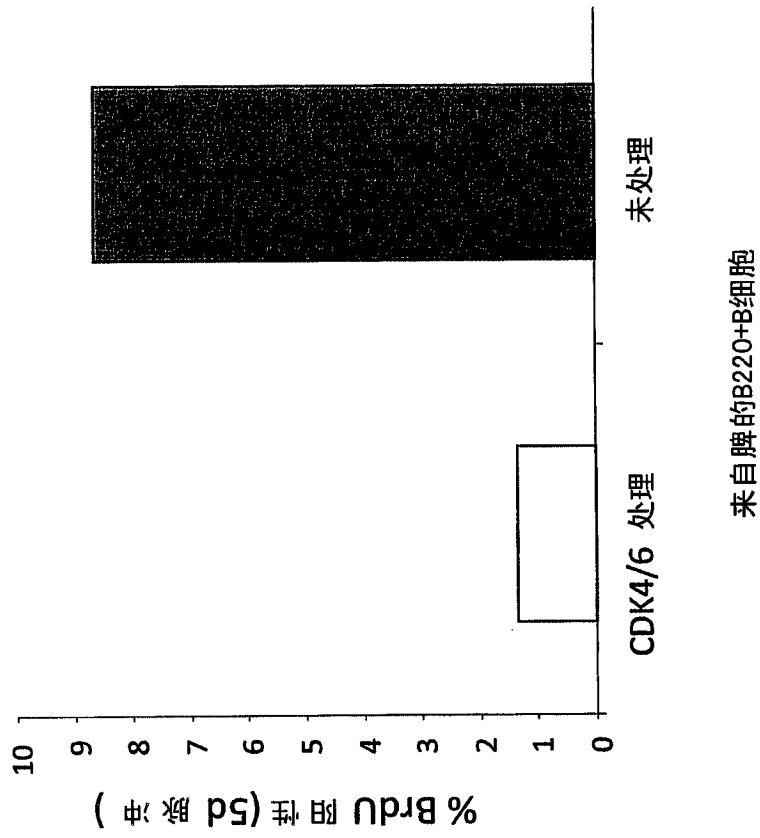


图 22

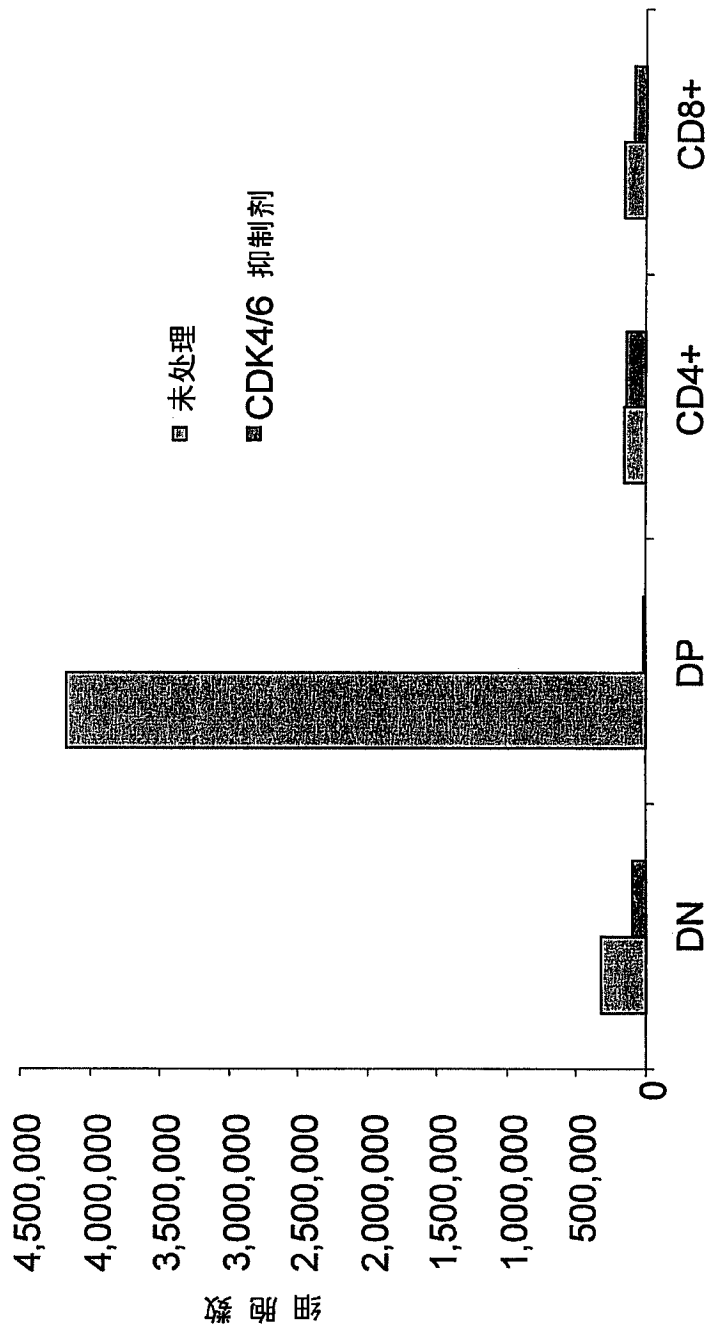


图 23