



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678029 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 18

(21) 申请号 200880018864. 9

(22) 申请日 2008. 04. 02

(30) 优先权数据

0706633. 5 2007. 04. 04 GB

60/921, 699 2007. 04. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 12. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/001189 2008. 04. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02008/122779 EN 2008. 10. 16

(73) 专利权人 西克拉塞尔有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 西蒙·格林 希拉格·弗雷姆

伊恩·弗莱明

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 邹宗亮

(51) Int. Cl.

A61K 31/52(2006. 01)

A61K 31/517(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 45/06(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

Ian N. Fleming et al.. Combination analysis between seliciclib (CYC202 R-roscovitine) and other molecularly targeted anti-cancer agents in non-small cell lung cancer. 《Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 》. 2006, 第 47 卷

审查员 原悦

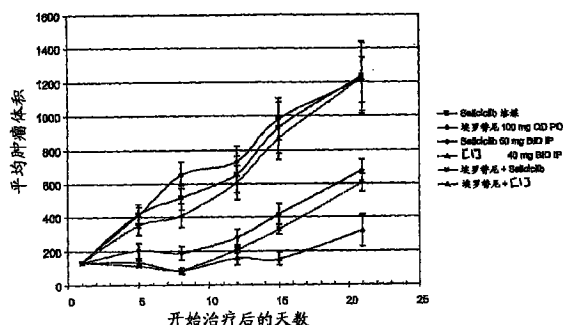
权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 5 页

(54) 发明名称

基于嘌呤的 CDK 抑制剂与酪氨酸激酶抑制剂的组合及其在治疗增生性疾病中的用途

(57) 摘要

本发明涉及组合, 其包含 (i) ErbB 抑制剂; 和 (ii) CDK 抑制剂, 或其可药用盐, 所述 CDK 抑制剂选自: (a) roscovitine; (b) 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇; (c) 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇; 和 (d) (2R, 3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基) 戊-2-醇。本发明的其它方面涉及包含本发明的组合的药物产品和药物组合物, 以及使用它们的治疗方法。



1. 组合产品,其包含 (i)ErbB 抑制剂,其选自 AG1478、埃罗替尼、吉非替尼、拉帕替尼和曲妥单抗;和 (ii)CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和 (d) (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

2. 根据上述权利要求中任一项的组合产品,其中 CDK 抑制剂为 R-roscovitine。

3. 权利要求 1 的组合产品,其中所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇或 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

4. 权利要求 1 的组合产品,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。

5. 权利要求 1 的组合产品,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

6. 药物组合物,其包含上述权利要求中任一项的组合产品和可药用载体或赋形剂。

7. 药物产品,其包含 (i)ErbB 抑制剂,其选自 AG1478、埃罗替尼、吉非替尼、拉帕替尼和曲妥单抗;和 (ii)CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和 (d) (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇,作为组合制剂用于在治疗中同时、依次或分开使用。

8. 权利要求 7 的药物产品,其中所述 CDK 抑制剂为 R-roscovitine。

9. 权利要求 7 的药物产品,其中所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇或 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

10. 权利要求 7 的药物产品,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。

11. 权利要求 7 的药物产品,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

12. 权利要求 7 的药物产品,其为包含可药用载体或赋形剂的药物组合物的形式。

13. 权利要求 7 的药物产品,其用于治疗增生性疾病。

14. 权利要求 13 的药物产品,其中所述增生性疾病为癌症。

15. 权利要求 14 的药物产品,其中所述癌症选自肺癌、头颈癌、卵巢癌和乳腺癌。

16. 权利要求 15 的药物产品,其中所述肺癌为非小细胞肺癌 (NSCLC)。

17. (i)ErbB 抑制剂,其选自 AG1478、埃罗替尼、吉非替尼、拉帕替尼和曲妥单抗,和 (ii)CDK 抑制剂或其可药用盐在制备用于治疗增生性疾病的药物中的用途,所述 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和 (d) (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异

丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

18. 权利要求 17 的用途,其中所述增生性疾病为癌症。

19. 权利要求 18 的用途,其中所述癌症选自肺癌、头颈癌、卵巢癌和乳腺癌。

20. 权利要求 19 的用途,其中所述肺癌为非小细胞肺癌(NSCLC)。

21. (i)ErbB 抑制剂,其选自 AG1478、埃罗替尼、吉非替尼、拉帕替尼和曲妥单抗,和 (ii)CDK 抑制剂或其可药用盐在制备用于治疗非小细胞肺癌的药物中的用途,所述 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和 (d) (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

22. 权利要求 17 或 21 的用途,其中向所述受试者给药所述 CDK 抑制剂,然后依次或分开向所述受试者给药所述 ErbB 抑制剂。

23. 权利要求 17 或 21 的用途,其中向所述受试者给药所述 ErbB 抑制剂,然后依次或分开向所述受试者给药所述 CDK 抑制剂。

24. 权利要求 17 或 21 的用途,其中所述 CDK 抑制剂为 R-roscovitine。

25. 权利要求 17 或 21 的用途,其中所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇或 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

26. 权利要求 17 或 21 的用途,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。

27. 权利要求 17 或 21 的用途,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

28. 权利要求 17 或 21 的用途,其中所述 CDK 抑制剂和所述 ErbB 抑制剂各自以相对于单个成分的治疗有效量给药。

29. 权利要求 17 或 21 的用途,其中所述 CDK 抑制剂和所述 ErbB 抑制剂各自以相对于单个成分的亚治疗量给药。

30. 试剂盒,其包含:

(i)ErbB 抑制剂,其选自 AG1478、埃罗替尼、吉非替尼、拉帕替尼和曲妥单抗;和

(ii)CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和 (d) (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

31. 权利要求 30 的试剂盒,其中所述 CDK 抑制剂为 R-roscovitine。

32. 权利要求 30 的试剂盒,其中所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇或 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

33. 权利要求 30 的试剂盒,其中所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。

34. 权利要求 30 的试剂盒, 其中所述 CDK 抑制剂为 (2R, 3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

基于嘌呤的 CDK 抑制剂与酪氨酸激酶抑制剂的组合及其在治疗增生性疾病中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及适于治疗癌症和其它增生性疾病的药物组合 (combination)。

[0002] 发明背景

[0003] 蛋白激酶是重要细胞过程的关键调节剂,且因为它们含有不同的活性位点,从而与化合物结合,激酶是抗癌药物开发感兴趣的领域 [1]。然而,直到伊马替尼才成功实现了临床开发,该药靶向 BCR-ABL,是第一个靶向蛋白激酶的抑制剂,称为批准的癌症化疗剂 [2]。当前蛋白激酶是癌症药物开发中非常活跃的领域,许多蛋白激酶家族是药物开发过程的焦点。这些开发过程通常靶向在肿瘤发展中反常的信号传导通路。

[0004] ErbB 家族的成员,像许多其它生长因子受体一样,受到配体刺激后形成二聚体,且它们的细胞质酪氨酸激酶区域经历自磷酸化作用。一旦活化,ErbB 激酶通过细胞蛋白激酶传导它们的信号,包括 ERK 和 PKB,最终导致细胞周期蛋白 D1 水平的向上调节,导致周期蛋白依赖激酶 (CDK) 的活化并引发细胞增殖 [3]。已经证明 ErbB 受体酪氨酸激酶信号的过度刺激出现在许多不同的人癌症中,包括 HER2 (ErbB2) 在乳腺癌患者中过表达高达 30% [4],而 EGFR (ErbB1) 在卵巢癌中过表达 (35-60%),在头颈肿瘤中过表达 (70-100%),且在非小细胞肺癌中过表达 (NSCLC ;50-90%) [5,6]。已经探寻了 2 种主要的方法用于开发靶向 ErbB 家族的药物。人单克隆抗体,如曲妥单抗和西妥昔单抗分别与 HER2 和 EGF 受体结合,由此阻断受体二聚化 / 活化,并促进这些蛋白质从细胞表面移除 [3]。相反,埃罗替尼和吉非替尼是小分子,其直接与 EGFR 的 ATP- 结合活性位点结合,阻断酪氨酸激酶活性 [7]。对于这些试剂,随后促有丝分裂信号的缺失导致细胞增殖的停止。

[0005] CDK 是第二类激酶家族,其也具有相当的药物开发前景 ;3 个最重要的化合物,seliciclib (CYC202, R-roscovitine)、alvocidib (flavopiridol) 和 SNS-032 (以前称 BMS-387032),所有的现在都在 II 期临床开发阶段 [8,9]。通过它们在涉及调节细胞周期检验点中的磷酸化蛋白的重要作用,CDK 控制细胞分裂周期有条理地进行 [8]。在癌细胞中,CDK 被它们的同族配偶体 (细胞周期蛋白) 的过表达,或内源性抑制剂 (如 p16) 的缺失而活化,导致细胞不适宜的增殖,正常情况下其会被停止或在特定细胞周期检验点经历细胞凋亡而恢复或诱导 [10]。除了控制细胞周期外,一些 CDK,如 CDK7 和 CDK9,通过磷酸化 RNA 聚合酶 II 的羧基 - 末端而调节转录。Seliciclib、alvocidib 和 SNS-032 均抑制 CDK7 和 / 或 9,由此导致转录的抑制,并下调蛋白质如 Mc1-1 和细胞周期蛋白 D1 [11,12],它们的半衰期很短,大约分别为 3 小时和 30 分钟 [13,14]。

[0006] 本发明提供了新的组合,其治疗一系列的增生性疾病,更特别地在癌症中具有治疗用途。

[0007] 发明概述

[0008] 第一方面涉及组合,其包含 (i) ErbB 抑制剂 ;和 (ii) CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自 : (a) roscovitine ; (b) 3-{9- 异丙基 -6-[(吡啶 -3- 基甲基) - 氨基] - 9H- 嘌呤 -2- 基氨基} -2- 甲基 - 戊 -2- 醇 ; (c) 3-{9- 异丙基 -6-[(吡啶 -3- 基甲

基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0009] 第二方面涉及药物组合物,其包含本发明的组合和可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0010] 第三方面涉及药物产品,其包含(i)ErbB抑制剂;和(ii)CDK抑制剂,或其可药用盐,所述CDK抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇,作为组合制剂用于在治疗中同时(simultaneous)、依次(sequential)或分开(separate)使用。

[0011] 第四方面涉及一种治疗增生性疾病的方法,所述方法包括同时、依次或分开向受试者给药(i)ErbB抑制剂;和(ii)CDK抑制剂,或其可药用盐,所述CDK抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0012] 第五方面涉及一种治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法,所述方法包括同时、依次或分开向受试者给药(i)ErbB抑制剂;和(ii)CDK抑制剂,或其可药用盐,所述CDK抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

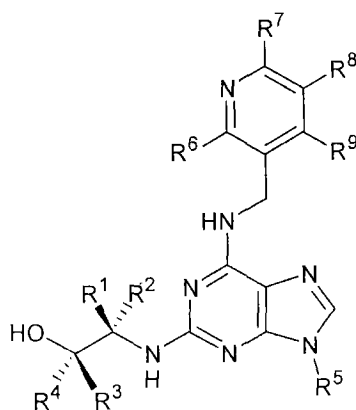
[0013] 第六方面涉及试剂盒,其包含:

[0014] (i)ErbB抑制剂;和

[0015] (ii)CDK抑制剂,或其可药用盐,所述CDK抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0016] 本发明的另一方面涉及组合,其包含(i)ErbB抑制剂;和(ii)式I化合物,或其可药用盐,

[0017]



(I)

[0018] 其中：

[0019] R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或烷基；

[0020] R^3 和 R^4 各自独立地为 H、烷基或芳基；

[0021] R^5 为烷基或环烷基，各自可任选被一个或多个 OH 基团取代；

[0022] R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地为 H、烷基、卤代烷基、卤素、 NO_2 、OH、OMe、CN、 NH_2 、COOH、 CONH_2 或 SO_2NH_2 。

[0023] 本发明的另一方面涉及包含所述组合的药物产品、药物组合物和试剂盒，和使用它们的治疗方法。

[0024] 发明详述

[0025] 下述优选的实施方案可用于本发明所有上述的方面。

[0026] 如上所述，本发明涉及组合，其包含如上所述的 ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂。

[0027] 在一个优选实施方案中，所述 ErbB 抑制剂为 ErbB1 (EGFR) 抑制剂。

[0028] 优选地，所述 EGFR 抑制剂选自 AG1478、西妥昔单抗 (trastuzumab)、埃罗替尼 (erlotinib)、吉非替尼 (gefitinib)、拉帕替尼 (lapatinib)、帕尼单抗 (panitumumab)、马妥珠单抗 (matuzumab)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab)、zalutumumab、帕妥珠单抗 (pertuzumab)、卡奈替尼 (canertiaib)、凡德他尼 (vandetanib)、EKB-569、HKI-272、BIBW-2992、AEE-788、XL647、BMS-599626、PKI-116 和 ARRY-334543。

[0029] 更优选地，所述 EGFR 抑制剂选自 AG1478、西妥昔单抗、埃罗替尼、吉非替尼和拉帕替尼。

[0030] 在另一个优选的实施方案中，所述 ErbB 抑制剂为 ErbB2 (Her2) 抑制剂。更优选地，所述 ErbB2 抑制剂为曲妥单抗。

[0031] 在一个优选实施方案中，所述 ErbB 抑制剂靶向 Her2 和 EGFR (例如、拉帕替尼、卡奈替尼、EKB-569、HKI-272、BIBW-2992、AEE-788、XL647、BMS-599626、PKI-116 和 ARRY-334543)。

[0032] 在一个优选实施方案中，所述 ErbB 抑制剂选自 AG1478、曲妥单抗、西妥昔单抗、埃罗替尼、吉非替尼、拉帕替尼、帕尼单抗、马妥珠单抗、尼妥珠单抗、zalutumumab、帕妥珠单抗、卡奈替尼、凡德他尼、EKB-569、HKI-272、BIBW-2992、AEE-788、XL647、BMS-599626、PKI-116、ARRY-334543。

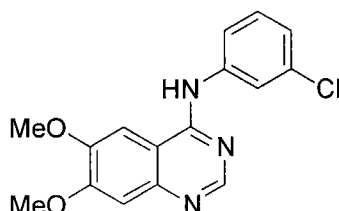
[0033] 更优选地，所述 ErbB 抑制剂选自 AG1478、曲妥单抗、西妥昔单抗、埃罗替尼、吉非

替尼和拉帕替尼。

[0034] 在一个尤其优选的实施方案中,所述 EGFR 抑制剂为 AG1478。

[0035] AG1478[4-(3-氯苯胺基)-6,7-二甲氧基喹唑啉]是一种 EGFR 酪氨酸激酶活性的可逆、高效 ($IC_{50} = 3nM$) 和选择抑制剂,通常用作 EGF 信号传导阻断剂 (www.alomone.com)。AG1478 的化学结构为:

[0036]



AG1478

[0037] 在另一个特别优选的实施方案中,所述 ErbB 抑制剂为曲妥单抗。

[0038] 如上所述,曲妥单抗(Herceptin[®])为重组 DNA- 源的人单克隆抗体,其在基于细胞的实验中以高亲和性 ($K_d = 5nM$) 与人表皮生长因子受体 2 蛋白 HER2 的细胞外区域选择性结合 (Coussens, L. 等人, Science, 1985 ;230 :1132-9 ;Slamon, D. J. 等人, Science, 1989 ; 244 :707-12)。抗体为 IgG₁ κ , 其包含具有与 HER2 结合的鼠类抗体 (4D5) 的互补性 - 检测区域的人框架区。

[0039] 对于单一疗法,曲妥单抗用于治疗患有乳腺癌转移的患者,其肿瘤过表达 HER2 蛋白,且该患者已经接受了一种或多种用于转移疾病的化疗方案。曲妥单抗已经被批准与紫杉醇组合使用用于治疗患有乳腺癌转移的患者,其肿瘤过表达 HER2 蛋白,且该患者没有接受用于其转移疾病的化学治疗。

[0040] 本申请人的研究表明 seliciclib 和曲妥单抗的组合在过表达 HER2 受体的乳腺癌细胞系中的作用。而且,检测 seliciclib 和酪氨酸磷酸化抑制剂 AG1478 的相互作用以测定 CDK 抑制剂和 EGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂之间是否发生协同作用 [18]。结果证明 seliciclib 与曲妥单抗在过表达 HER2 的乳腺癌细胞系 SkBr3 中协同作用。Seliciclib 还与 AG1478 在分别表达野生型和突变 EGFR 的 NSCLC 细胞系 H358 和 H1650 中协同作用。在每种情况中,协同作用涉及抑制 HER2/EGFR 信号传导通路。进一步扩展这些体外发现证明 seliciclib 和埃罗替尼之间的组合在 H358 异种移植模型中协同作用。本文所公开的数据表明 seliciclib 和 ErbB 受体家族抑制剂之间的组合能够导致癌症细胞生长的协同作用。

[0041] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述 EGFR 抑制剂为西妥昔单抗。

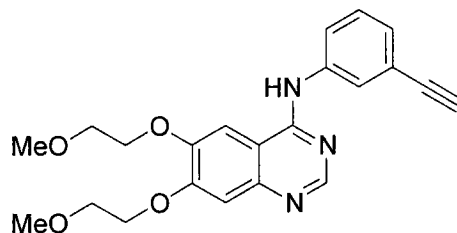
[0042] 西妥昔单抗是重组的人 / 小鼠嵌合单克隆抗体,其特异性地与人表皮生长因子受体 (EGFR) 的细胞外区域结合。西妥昔单抗由具有人 IgG1 重链和 κ 轻链恒定区域的鼠类抗 -EGFR 抗体的 Fv 区域构成,且分子量大约为 152kDa。西妥昔单抗在哺乳动物 (鼠类骨髓瘤) 细胞培养物中制备。

[0043] 西妥昔单抗已经被批准以单独试剂和与其它方案组合用于治疗头颈癌和结肠直肠癌。

[0044] 在另一个优选实施方案中,所述 EGFR 抑制剂为埃罗替尼。

[0045] 埃罗替尼 [Tarceva[®]; N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)-4-喹唑啉-胺] 为 HER1/EGFR 抑制剂, 且具有下述化学结构:

[0046]



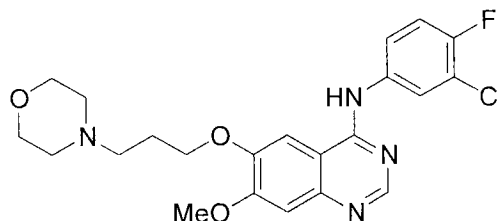
[0047] 埃罗替尼

[0048] 埃罗替尼单一疗法已经被批准用于治疗患有局部晚期非小细胞肺癌或非小细胞肺癌转移的患者 (在用至少一种之前的化疗方案失败后)。

[0049] 在另一个尤其优选的实施方案中, 所述 EGFR 抑制剂为吉非替尼。

[0050] 吉非替尼 [Iressa[®]; N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-[(3,4-吗啉)丙氧基]-4-喹唑啉胺] 具有下述化学结构:

[0051]

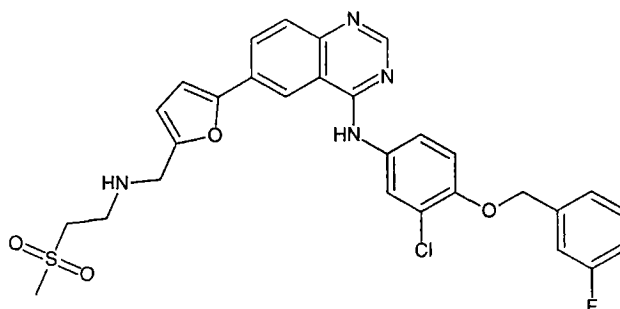


[0052] 吉非替尼

[0053] 吉非替尼已经被批准作为单一疗法用于继续治疗患有局部晚期非小细胞肺癌或非小细胞肺癌转移的患者 (在基于铂和多西紫杉醇化学治疗都失败后)。

[0054] 在本发明的一个优选实施方案中, 所述 ErbB 抑制剂为拉帕替尼 (Tykerb[®])。拉帕替尼已知为 N-[3-氯-4-[(3-氟苯基)甲氧基]苯基]-6-[5-[(2-甲基磺酰基乙基氨基)甲基]-2-呋喃基]喹唑啉-4-胺化合物, 具有下述结构:

[0055]



[0056] 拉帕替尼

[0057] 拉帕替尼 (INN) 或二甲苯磺酸拉帕替尼 (USAN), 也已知为 GW572016, 是用于治疗实体瘤如乳腺癌和肺癌的抗癌药物。已经批准与化疗药物希罗达 (Xeloda) 组合用于患有晚期乳腺癌转移的患者。更特别地, 对于先前已经用赫赛汀 (Herceptin) 和紫杉烷类和蒽环类抗生素治疗的女性, 每天一次口服给予拉帕替尼。拉帕替尼为 EGFR 和 HER2/

neu (ErbB-2) 双重酪氨酸激酶抑制剂, 其与细胞内磷酸化区域结合以预防在配体结合时受体的自磷酸化。

[0058] 在尤其优选的实施方案中, 所述 ErbB 抑制剂选自 AG1478、曲妥单抗和埃罗替尼。

[0059] 本发明的组合包含多种基于嘌呤的 CDK 抑制剂, 例如 roscovitine 和通式 (I) 的相关化合物。

[0060] 优选地, 本发明所要求的组合的 CDK 抑制剂对于 CDK2 是最有效的。

[0061] 更优选地, 本发明所要求的组合的 CDK 抑制剂对于 CDK2 和 CDK9 是最有效的, 至少是对于 CDK1 和 CDK4 的活性的 20 倍以上。

[0062] 甚至更优选地, 本发明所要求的组合的 CDK 抑制剂对于 CDK2 和 CDK9 是最有效的, 至少是对于 CDK1 和 CDK4 的活性的 50 倍以上。

[0063] 甚至更优选地, 本发明所要求的组合的 CDK 抑制剂对于 CDK2 和 CDK9 是最有效的, 至少是对于 CDK1 和 CDK4 的活性的 100 倍以上。

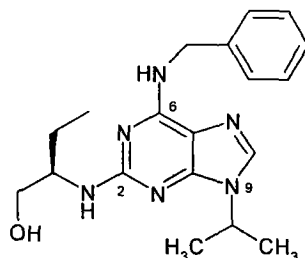
[0064] 在一个更优选的实施方案中, 所述 CDK 抑制剂抑制 CDK2、CDK7 和 CDK9 是最有效的, 至少是对于 CDK1 和 CDK4 的活性的 20 倍以上。

[0065] 在本发明的一个优选实施方案中, CDK 抑制剂为 roscovitine 或其可药用盐。

[0066] Roscovitine 或 2-[(1-乙基-2-羟基乙基)氨基]-6-苄基胺-9-异丙基嘌呤, 也称为 2-(1-D, L-羟基甲基丙基氨基)-6-苄基胺-9-异丙基-嘌呤。本文所用的术语“roscovitine”包括拆分的 R 和 S 对映异构体, 其混合物, 和其外消旋体。

[0067] 本文所用的术语“seliciclib”是指 roscovitine 的 R 对映异构体, 即 2-(1-R-羟基甲基丙基氨基)-6-苄基氨基-9-异丙基嘌呤, 其结构如下所示:

[0068]



[0069] 对于本发明的所有实施方案, 优选地 roscovitine 为 R 对映异构体形式, 即 2-(1-R-羟基甲基丙基氨基)-6-苄基氨基-9-异丙基-嘌呤, 下文称为“seliciclib”或“CYC202”或“R-roscovitine”。

[0070] roscovitine 的体外活性如下所示:

[0071]

激酶	IC ₅₀ (M)
Cdk1/ 细胞周期蛋白 B	2.7
Cdk2/ 细胞周期蛋白 A	0.7
Cdk2/ 细胞周期蛋白 E	0.1

Cdk7/ 细胞周期蛋白 H	0.5
Cdk9/ 细胞周期蛋白 T1	0.8
Cdk4/ 细胞周期蛋白 D1	14.2
PKA	> 50
PKC	> 50

[0072] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂选自:

[0073] (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [1];

[0074] (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [2];

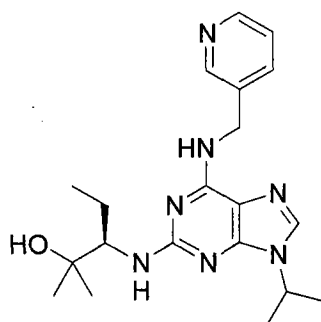
[0075] (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇 [3];和

[0076] (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇 [4]。

[0077] 在另一个优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂为 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。本文所用的 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇包括拆分的 R 和 S 对映异构体,其混合物,和其外消旋体。

[0078] 在一个更优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [1],其结构如下所示:

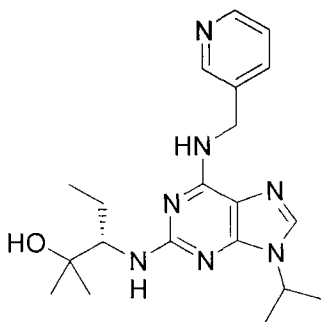
[0079]



[1]

[0080] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂为 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [2],其结构如下所示:

[0081]

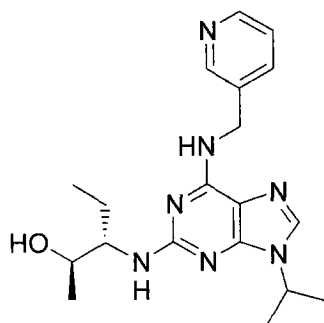


[2]

[0082] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂为 3-{9- 异丙基 -6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。本文所用的 3-{9- 异丙基 -6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇包括拆分的,以及未拆分的非对映异构体,及其混合物。

[0083] 在一个尤其优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-{9- 异丙基 -6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇 [3],其结构如下所示:

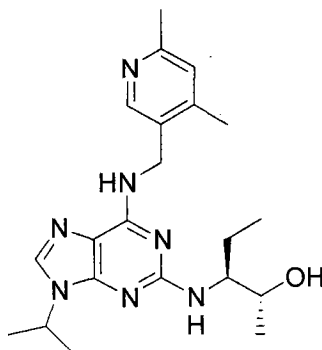
[0084]



[3]

[0085] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇 [4],其结构如下所示:

[0086]



[4]

[0087] 另一方面涉及药物组合物,其包含本发明的组合和可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0088] 另一方面涉及药物产品,其包含本发明的组合,其用于治疗增生性疾病。

[0089] 在组合中给出许多抗癌剂使治疗方案最佳化。药物组合的效果本身是不可预料的,且通常倾向于一种药物部分或完全抑制其它药物的效果。

[0090] 本发明基于下述出人意料的发现,即同时、分开或依次给药一种组合(包含 ErbB 抑制剂(如 EGFR 抑制剂)或其可药用盐,以及 CDK 抑制剂)不会导致两种药物之间任何明显的或严重的不良相互作用。人意料的没有任何此类拮抗相互作用对于临床使用是非常重要的。

[0091] 优选地,本发明的组合为协同组合(其包含 ErbB 抑制剂(如 EGFR 抑制剂),和如上所述的 CDK 抑制剂,或其可药用盐),即具有协同效果的组合。

[0092] 在一个优选实施方案中,与每种药物单独给药相比,ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐的组合提供了增强的效果。该令人惊奇的发现与根据现有技术预期的相反。有利地,协同相互作用可使得向患者给药的每种成分的剂量更低,由此降低化疗的毒性,同时产生和/或保持相同的治疗效果。因此,在尤其优选的实施方案中,每种成分以亚治疗量给药。

[0093] 在另一个优选的实施方案中,ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐以一定方式相互作用,从而使得减少或消除与使用单个成分作为单一治疗相关的不良副作用,或与使用已知组合相关的不良副作用。

[0094] 如上所述,本发明的一个方面涉及药物产品,其包含 ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自:(a) roscovitine;(b) 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c) 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d) (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇,作为组合制剂用于在治疗中同时、依次或分开使用。

[0095] 包含 ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐的组合可以同时、依次或分开给药(作为给药方案的一部分)。

[0096] 本文所用的“同时(simultaneously)”是指两种试剂同时给药。因此,“依次(sequentially)”给药可以为在给药一种试剂后的5分钟、10分钟或几小时内给药另一种试剂,条件是第一次给药的药物的循环半衰期使得它们同时以治疗有效量存在。给药各成分之间的时间间隔会根据各成分的确切性质、它们之间的相互作用和它们各自的半衰期而变化。

[0097] 与“依次”形成对比的是,本文所用的“分开(separately)”是指给药一种试剂和其它试剂之间的间隔足够大,即当给予第二试剂时,第一次给药的试剂可不再以治疗有效量存在于血流中。

[0098] 在一个优选实施方案中,在给药第一试剂之后的至少2小时,更优选地至少4小时,甚至更优选地至少8小时,甚至更优选地至少12或24或48或72小时,给药第二试剂。在一个尤其优选的实施方案中,在给药第一试剂后的至少24小时,给药第二试剂。

[0099] 在一个方面中,本发明涉及一种治疗增生性疾病的方法,所述方法包括同时、依次或分开向受试者给药 ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自:(a) roscovitine;(b) 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c) 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基

氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0100] 优选地,所述受试者为哺乳动物,更优选地为人。

[0101] 在一个优选实施方案中,ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐同时给药。

[0102] 在另一个优选的实施方案中,ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐依次或分开给药。

[0103] 优选地,给药 ErbB 抑制剂至少 2 小时,更优选地至少 4 小时,甚至更优选地至少 8 小时,甚至更优选地至少 12 或 24 或 48 或 72 小时后,给药 CDK 抑制剂或其可药用盐。在一个尤其优选的实施方案中,给药 ErbB 抑制剂至少 24 小时后,给药 CDK 抑制剂或其可药用盐。

[0104] 在另一个优选的实施方案中,ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐各自以相对于单个成分的治疗有效量给药。

[0105] 在另一个优选实施方案中,ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐各自以相对于单个成分的亚治疗有效量给药。

[0106] 术语“亚治疗有效量”是指该量低于产生对于使用 ErbB 抑制剂或 CDK 抑制剂或其可药用盐单独治疗的治疗效果通常所需的量。

[0107] 在一个尤其优选的实施方案中,ErbB 抑制剂先于 CDK 抑制剂或其可药用盐依次或分开给药。

[0108] 在另一个尤其优选的实施方案中,CDK 抑制剂或其可药用盐先于 ErbB 抑制剂依次或分开给药。

[0109] 增生性疾病

[0110] 本文使用的术语“增生性疾病”在广义上包括任何需要控制细胞周期的疾病,例如心血管病症,如再狭窄和心肌病,自身免疫性疾病,如肾小球肾炎、狼疮肾炎、肾小球系膜增生性疾病(mesangial proliferative disorder)和类风湿性关节炎,囊性病(cystic disease)如多囊性肾病、多囊性肝病、髓质囊性病,皮肤病,如牛皮癣,抗炎、抗真菌、抗寄生物疾病,如疟疾、肺气肿和脱发。在这些疾病中,本发明化合物可根据需要在所需细胞内诱导细胞凋亡或保持停滞。

[0111] 对于上述所有方面和实施方案,优选地所述增生性疾病为癌症。

[0112] 在一个更优选的实施方案中,所述增生性疾病为卵巢癌。

[0113] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述增生性疾病为头或颈癌。

[0114] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述增生性疾病为乳腺癌。

[0115] 在另一个尤其优选的实施方案中,所述增生性疾病为肺癌,更优选地为 NSCLC。

[0116] 在一个优选实施方案中,本发明涉及一种治疗非小细胞肺癌的方法,所述方法包括同时、依次或分开向受试者给药 ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂,或其可药用盐,所述 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0117] 肺癌(支气管癌)可分为两大类,即小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。

这两种癌症之间的差别在于显微镜下观察到的肿瘤细胞的外观。

[0118] SCLC 占 20% 所诊断的肺癌, 且其特征在于小细胞几乎被细胞核填满 (由此而得名)。有时也称作“燕麦细胞”癌症。SCLC 是最具攻击性的癌症, 其迅速转移至身体的其它部分。通常仅在癌症已经遍及全身后才诊断为 SCLC。通常, SCLC 总是由吸烟引起的。

[0119] NSCLC 可以细分为一些相关的肺癌, 其包括表皮样或鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌。

[0120] 鳞状细胞肺癌约占全部肺癌病例的 30%, 且从肺和支气管系的储备细胞 (其具有替代受损的上皮细胞的功能) 发展而来。结果, 该癌症通常最初在胸的中间发展。鳞状细胞肺癌通常生长缓慢且从受限肿瘤 (confined tumour) 发展为侵袭性癌症可能需要几年的时间。在 10-20% 的病例中, 癌症在肺内成穴。对于转移, 其通常扩散至骨、肝、肾上腺、小肠和脑。

[0121] 腺癌是最常见形式的肺癌, 占全部肺癌病例的 30-40%。腺癌在肺的外部发展且从粘液细胞 (mucus-producing cells) 发展而来。这种癌症的过程变化很大, 但通常进程缓慢, 且患者将几乎没有或没有症状。然而在一些病例中, 其可能是非常具有攻击性的且迅速致命的。在 50% 的病例中, 当其转移时, 其仅扩散至脑。其它腺癌扩散的位置包括肝、肾上腺和骨。

[0122] 大细胞癌的发病率小于腺癌或鳞状细胞癌, 且占肺癌病例的 10-20%。该癌症由大体积的细胞组成, 这些细胞在自然状况下是间变的 (anaplastic) 且通常在支气管中产生。大细胞癌在肺的边缘, 且可能扩散至 plura。

[0123] 当前, 肺癌可通过手术、放疗或化疗来治疗。化疗可以单独或与其它治疗选择组合的形式使用。常见的 NSCLC 药物和方案包括 **Camptosar[®]** (伊立替康; CPT-11)、喜树碱、**Paraplatin[®]** (卡铂)、**Platinol[®]** (顺铂)、表柔比星、**Gemzar[®]** (吉西他滨)、**Navelbine[®]** (长春瑞滨)、奥沙利铂、**Taxol[®]** (紫杉醇) 和 **Taxotere[®]** (多西紫杉醇) (NSCLC Treatment-Chemotherapy, Lung CancerOnline)。

[0124] 然而, 化疗并不能治愈癌症。该治疗的其它缺点包括毒性、对于正常组织的旁路损伤 (bystander damage) 和抗药性 (W. Wang 等人, Cancer Sci., 2005, 96(10), 706)。而且, 研究已经表明一些已知的治疗几乎没有存活益处, 如长春瑞滨 (M. A. Socinski 等人, Clin. Adv. Hematol. Oncol., 2003, 1(1), 33)。甚至一些新的活性物质如曲沙他滨每 3 周经 30 分钟以 10mg/m² 剂量静脉给药对于 NSCLC 几乎没有作用 (S. F. Dent 等人, Lung, 2005, 183(4), 265)。

[0125] 吉西他滨 / 顺铂的组合在欧洲已经广泛用于治疗 NSCLC。然而, 公认的顺铂具有一些缺点, 即在患者中出现明显的非血液毒性 (耳毒性和肾毒性), 并伴随有呕吐 (P. Zatloukal 等人, Lung Cancer, 2002, 38, S33)。

[0126] 对于患者, 诊断出肺癌是糟糕的 - 对于所有治疗病例达到 10 年的存活率仅大约 8% - 因此需要继续研究有效的治疗。

[0127] 在一个更优选的实施方案中, 所述 EGFR 抑制剂为埃罗替尼, 且所述 CDK 抑制剂为 seliciclib。优选地, 所述增生性疾病为肺癌, 更优选地为非小细胞肺癌。

[0128] 在另一个尤其优选的实施方案中, 所述 EGFR 抑制剂为埃罗替尼, 且所述 CDK 抑制

剂选自：

[0129] (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇；

[0130] (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇；

[0131] (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇；和

[0132] (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0133] 在一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂为 AG1478，且所述 CDK 抑制剂为 seliciclib。优选地，所述增生性疾病为肺癌，更优选地，为非小细胞肺癌。

[0134] 在另一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂为 AG1478，且所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为肺癌或乳腺癌。

[0135] 在另一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂为 AG1478，且所述 CDK 抑制剂为 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为肺癌或乳腺癌。

[0136] 在另一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂为 AG1478，且所述 CDK 抑制剂为 (2R3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为肺癌或乳腺癌。

[0137] 在尤其优选的实施方案中，所述 ErbB 抑制剂为曲妥单抗，且所述 CDK 抑制剂为 seliciclib。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌。

[0138] 在尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂为拉帕替尼，且所述 CDK 抑制剂为 seliciclib。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌。

[0139] 在尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂为拉帕替尼，且所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌。

[0140] 在一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂选自埃罗替尼、吉非替尼、AG1478 和拉帕替尼，且所述 CDK 抑制剂为 seliciclib。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌或肺癌。

[0141] 在一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂选自埃罗替尼、吉非替尼、AG1478 和拉帕替尼，且所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌或肺癌。

[0142] 在一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂选自埃罗替尼、吉非替尼、AG1478 和拉帕替尼，且所述 CDK 抑制剂为 (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌或肺癌。

[0143] 在一个尤其优选的实施方案中，所述 EGFR 抑制剂选自埃罗替尼、吉非替尼、AG1478 和拉帕替尼，且所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。优选地，所述增生性疾病为乳腺癌或肺癌。

[0144] 在一个尤其优选的实施方案中,所述 EGFR 抑制剂选自埃罗替尼、吉非替尼、AG1478 和拉帕替尼,且所述 CDK 抑制剂为 (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。优选地,所述增生性疾病为乳腺癌或肺癌。

[0145] 在一个尤其优选的实施方案中,所述 EGFR 抑制剂为埃罗替尼,且所述 CDK 抑制剂为 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。优选地,所述增生性疾病为肺癌。

[0146] 在一个更优选的实施方案中,本发明涉及一种治疗肺癌的方法,所述方法包括向受试者给药包含埃罗替尼和 seliciclib 的组合。

[0147] 在另一个尤其优选的实施方案中,本发明涉及一种治疗乳腺癌的方法,所述方法包括向受试者给药包含埃罗替尼和 seliciclib 的组合。

[0148] 在另一个尤其优选的实施方案中,本发明涉及一种治疗肺癌的方法,所述方法包括向受试者给药包含曲妥单抗和 seliciclib 的组合。优选地,组合的试剂同时给予。

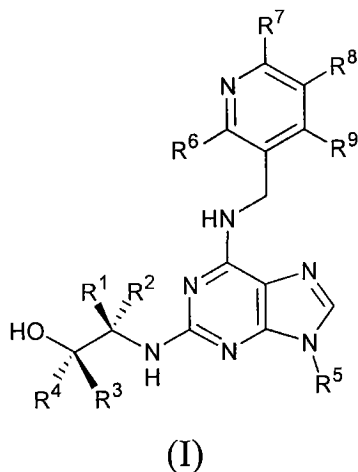
[0149] 在另一个尤其优选的实施方案中,本发明涉及一种治疗乳腺癌的方法,所述方法包括向受试者给药包含曲妥单抗和 seliciclib 的组合。优选地,组合的试剂同时给予。

[0150] 在另一个尤其优选的实施方案中,本发明涉及一种治疗肺癌的方法,所述方法包括向受试者给药包含 AG1478 和 seliciclib 的组合。优选地,组合的试剂同时给予。

[0151] 包含式 (I) 化合物的组合

[0152] 本发明的一个方面涉及组合,其包含 (i) ErbB 抑制剂;和 (ii) 式 I 化合物,或其可药用盐,

[0153]



[0154] 其中:

[0155] R^1 和 R^2 各自独立地为 H 或烷基;

[0156] R^3 和 R^4 各自独立地为 H、烷基或芳基;

[0157] R^5 为烷基或环烷基,每个可任选被一个或多个 OH 基团取代;

[0158] R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地为 H、烷基、卤代烷基、卤素、 NO_2 、OH、OMe、CN、 NH_2 、COOH、 CONH_2 或 SO_2NH_2 。

[0159] 本文所用的术语“烷基”包括饱和的直链和支链烷基。优选地,烷基为 C_{1-20} 烷基,更优选地为 C_{1-15} 烷基,更优选地为 C_{1-12} 烷基,更优选地为 C_{1-6} 烷基,更优选地为 C_{1-3} 烷基。

尤其优选的烷基包括,例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。

[0160] 本文所用的术语“环烷基”是指环状烷基。优选地,环烷基为 C_{3-12} 环烷基。

[0161] 本文所用的术语“芳基”是指 C_{6-12} 芳香基团。典型的实例包括苯基和萘基等。

[0162] 优选地,对于本发明的该方面, R^3 和 R^4 中至少一个不是 H。

[0163] 在一个优选实施方案中, R^3 和 R^4 各自独立地为 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基或苯基。

[0164] 更优选地, R^3 和 R^4 各自独立地为 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基或叔丁基。

[0165] 甚至更优选地, R^3 和 R^4 各自独立地为 H、甲基、乙基、异丙基或叔丁基。

[0166] 在一个优选实施方案中, R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地为 H、烷基或卤代烷基。更优选地, R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地为 H 或烷基。在一个尤其优选的实施方案中, R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 全为 H。在另一个尤其优选的实施方案中, R^6 和 R^8 为 H,且 R^7 和 R^9 为 Me。

[0167] 在一个优选实施方案中, R^1 和 R^2 之一为乙基或异丙基,且另一个为 H。更优选地, R^1 和 R^2 之一为乙基,且另一个为 H。

[0168] 在一个优选实施方案中, R^5 为异丙基或环戊基。

[0169] 在本发明一个尤其优选的实施方案中,式 (I) 化合物选自:

[0170] 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;

[0171] 3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;

[0172] (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇;

[0173] (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;和

[0174] (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

[0175] 药物组合物

[0176] 在尤其优选的实施方案中,本发明的药物产品为药物组合物的形式,其包含可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0177] 尽管本发明的化合物(包括它们的可药用盐、酯和可药用溶剂合物)可以单独给药,但是它们通常与药物载体、赋形剂或稀释剂混合给药,尤其是用于人的治疗。药物组合物可以人用药或兽用药形式用于人或动物。

[0178] 对于本文所述的各种不同形式的药物组合物的此类适宜的赋形剂的实例可见于“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第2版,(1994),A Wade 和 PJ Weller 编。

[0179] 治疗用可接受的载体或稀释剂是药学领域公知的,且描述于,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 编. 1985)。

[0180] 适宜的载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、山梨醇等。适宜的稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。

[0181] 药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可根据意欲的给药途径和标准药物实践进行选择。药物组合物可包含(或除载体、赋形剂或稀释剂外还可包含)任何适宜的粘合剂、润滑

剂、助悬剂、包衣剂、助溶剂。

[0182] 适宜的粘合剂的实例包括淀粉,明胶,天然糖如葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖,玉米增甜剂,天然和合成胶如阿拉伯胶、西黄蓍胶或海藻酸钠,羧甲基纤维素和聚乙二醇。

[0183] 适宜的润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。

[0184] 防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂可包含在药物组合物中。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可使用抗氧化剂和助悬剂。

[0185] 前药

[0186] 本发明还包括前药形式的本发明试剂。这种前药通常为一个或多个适当基团已被修饰以使在对人或哺乳动物对象给药后所述的修饰可被逆转的化合物。虽然为了实现体内逆转可与这种前体药物一起给药第二种药物,但通常通过在这类对象中天然存在的酶进行此类逆转。这类修饰的例子包括酯(例如上述那些中的任一种),其中可通过酯酶等进行逆转。其它这类体系为本领域中那些技术人员所熟知。

[0187] 盐 / 酯

[0188] 本发明的试剂可以以盐或酯的形式,尤其是可药用的盐或酯的形式提供。

[0189] 本发明试剂的可药用盐包括它们适宜的酸加成盐或碱加成盐。适宜的可药用盐的评论可参见 Berge 等人的 J. Pharm Sci, 66, 1-19 (1977)。例如,盐为与以下酸形成的盐:强无机酸,如矿物酸,例如硫酸、磷酸或氢卤酸;强有机羧酸,如未被取代或取代(如被卤代)的 1 至 4 个碳原子的链烷羧酸,例如乙酸;饱和或不饱和的二元羧酸,例如草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸或对苯二甲酸;羟基羧酸,例如抗坏血酸、羟基乙酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸;氨基酸,例如天冬氨酸或谷氨酸;苯甲酸;或有机磺酸,如未被取代或取代(如被卤代)的(C₁-C₄)烷基磺酸或芳基磺酸,如甲磺酸或对甲苯磺酸。

[0190] 取决于被酯化的官能团,使用有机酸或醇 / 氢氧化物形成酯。有机酸包括羧酸,如未被取代或取代(如被卤代)的 1 至 12 个碳原子的链烷羧酸,例如乙酸;饱和或不饱和的二元羧酸,例如草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸或对苯二甲酸;羟基羧酸,例如抗坏血酸、羟基乙酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸;氨基酸,例如天冬氨酸或谷氨酸;苯甲酸;或有机磺酸,如未被取代或取代(如被卤代)的(C₁-C₄)烷基磺酸或芳基磺酸,如甲磺酸或对甲苯磺酸。适宜的氢氧化物包括无机氢氧化物,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝。醇包括未被取代或取代(如被卤代)的 1 至 12 个碳原子的链烷醇。

[0191] 对映异构体 / 互变异构体

[0192] 本发明还适宜地包括试剂的全部对映异构体和互变异构体。本领域的技术人员能认识到具有光学性质(一个或多个手性碳原子)或互变异构特征的化合物。可通过本领域中已知的方法分离 / 制备相应的对映异构体和 / 或互变异构体。

[0193] 立体异构体和几何异构体

[0194] 一些本发明的试剂可以以立体异构体和 / 或几何异构体的形式存在,例如其可具有一个或多个不对称和 / 或几何中心,并因此可以二种或多种立体异构和 / 或几何形式存在。本发明包括那些抑制剂试剂的所有单个立体异构体和几何异构体及其混合物的使用。权利要求中使用的术语包括这些形式,只要所述形式保留适当的功能活性(但不必到相同

程度)。

[0195] 本发明还包括试剂或其可药用盐的所有适宜的同位素变体。本发明药物或其可药用盐的同位素变体定义为其中至少一个原子被具有相同原子序数但原子质量与自然界中通常发现的原子质量不同的原子所取代的物质。可被掺入到药物和其可药用盐的同位素的例子包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟和氯的同位素,分别如 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 和 ^{36}Cl 。本发明的药物和其可药用盐的一些同位素变体,例如结合放射性同位素如 ^3H 或 ^{14}C 的那些化合物,在药物和 / 或底物组织分布研究中是有用的。含氟的即 ^3H 和碳-14 即 ^{14}C 同位素因其容易制备和可检测性而特别优选。此外,用同位素如氘即 ^2H 的取代可因较大的代谢稳定性而提供特定的治疗益处,例如体内半衰期增加或剂量要求降低,并因此可在一些情况下是优选的。通常可使用合适试剂的适当同位素变体,通过常规步骤制备本发明药物和其可药用盐的同位素变体。

[0196] 溶剂合物

[0197] 本发明还包括本发明试剂的溶剂合物形式。权利要求中使用的术语包括这些形式。

[0198] 多晶型物

[0199] 本发明还涉及本发明试剂的各种结晶形式、多晶型形式和无水(水合)形式。众所周知,在制药工业中可通过稍微改变纯化和或分离方法,从在合成制备此类化合物的溶剂中,分离得到任一此类形式的化合物。

[0200] 给药

[0201] 可调节本发明的药物组合物,使其适于口服、直肠、阴道、肠胃外、肌内、腹膜内、动脉内、鞘内、支气管内、皮下、皮内、静脉内、鼻、口腔或舌下给药途径。

[0202] 对于口服给药,特别利用压缩片剂、药丸、片剂、凝胶剂(gellules)、滴剂和胶囊剂。优选地,这些组合物每剂包含 1-2000mg 的有效成分,更优选包含 50-1000mg 的有效成分。

[0203] 其它给药形式包括溶液剂或乳剂,它们可经静脉内、动脉内、鞘内、皮下、皮内、腹膜内或肌内给药,并由无菌或可灭菌溶液制备。本发明的药物组合物还可为栓剂、阴道栓剂、混悬剂、乳剂、洗剂、软膏、乳膏剂、凝胶、喷雾剂、溶液剂或扑粉(dusting powder)的形式。

[0204] 经皮给药的替代方式是利用透皮贴片(skin patch)。例如,可将有效成分掺入到由聚乙二醇含水乳液或液体石蜡组成的乳膏剂内。还可以 1-10wt% 的浓度将有效成分掺入到由白蜡或白色软石蜡基质与所需要的稳定剂和防腐剂共同组成的软膏内。

[0205] 可注射形式每剂可包含 10-1000mg 的有效成分,优选 10-500mg 的有效成分。

[0206] 组合物可被配制成单位剂型,即包含单位剂量或单位剂量的多重单位或亚单位的形式分散部分。

[0207] 在一个优选实施方案中,CDK 抑制剂或其可药用盐口服或静脉给药。

[0208] 在一个优选实施方案中,AG1478 静脉给药。

[0209] 在一个优选实施方案中,曲妥单抗静脉给药。

[0210] 在一个优选实施方案中,西妥昔单抗静脉给药。

[0211] 在一个优选实施方案中,埃罗替尼口服给药。

[0212] 在一个优选实施方案中,吉非替尼口服给药。

[0213] 在一个优选实施方案中,拉帕替尼口服给药。

[0214] 剂量

[0215] 本领域的普通技术人员无需过度试验就可容易地确定对患者给药的本发明组合物的适宜剂量。通常,医师会确定对个体患者最适宜的实际剂量,并且根据多种因素包括使用的具体化合物的活性、化合物的代谢稳定性以及作用时间的长短、病人的年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药的方式以及时间、排泄速率、药物组合以及具体疾病的严重程度以及接受治疗的个体进行调整。本文公开的剂量为一般情况的示例。当然也可有有益的较高或较低剂量范围个别情况,这都在本发明的范围内。

[0216] 根据需要,可以以 0.1-30mg/kg 体重,如 0.1-10mg/kg 体重,更优选 2-20mg/kg 体重的剂量给药所述药物。

[0217] CDK 抑制剂或其可药用盐,通常以约 0.05 至约 5g/天给药,优选地约 0.4 至约 3g/天给药。Roscovitine 优选地以片剂或胶囊口服给药。roscovitine 的总日剂量可作为单一剂量给予,或成分分开的剂量每天给药 2、3 或 4 次。

[0218] 优选地,roscovitine 以 0.4 至 3g/天的剂量口服或静脉给药。

[0219] 用于指导,ErbB 抑制剂通常根据医师的指导以相关文献中所述的剂量或在所述 ErbB 抑制剂所批准的剂量范围内给药。对于每种试剂,所述批准的剂量来自 Summary of Product Characteristics,所述试剂可从制造商或从文献如 www.emea.eu.int/htms/human/epar/a-zepar.htm 中获得。

[0220] 试剂盒 (kit of parts)

[0221] 本发明的另一方面涉及试剂盒,其包含

[0222] (i)ErbB 抑制剂;和

[0223] (ii)CDK 抑制剂,或其可药用盐,该 CDK 抑制剂选自:(a)roscovitine;(b)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇;(c)3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇;和(d)(2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0224] 优选地,所述 ErbB 抑制剂和 CDK 抑制剂或其可药用盐各自为单位剂型。优选地,所述试剂盒包含许多每种成分(即上述成分(i)和(ii))的单位剂型。

[0225] 任选地,所述试剂盒还可包含根据具体给药方案促进顺应性的工具,例如,指导应该何时、怎样和多少频率服用每种成分的单位剂型的说明书。

[0226] 本发明进一步参考下图通过实施例的方式描述,其中:

[0227] 图 1 表明 seliciclib 和曲妥单抗协同下调 SkBr3 细胞中的 HER2 水平。更详细地,将 SkBr3 细胞以大约 8×10^5 细胞/板接种在 10cm 盘中,并放置过夜。细胞用所示浓度的曲妥单抗(A),seliciclib(B)或 seliciclib+曲妥单抗(C)培养 24 小时,然后收获。将来自每种处理的蛋白裂解产物(30 μ g)在 3-8%丙烯酰胺 Tris-acetate 凝胶或 10%丙烯酰胺 Bis-Tris 凝胶中分离,转移至硝基纤维素膜,并用所示抗体探测。结果代表 2 个独立的实验。

[0228] 图 2 表示在 A549、H460 和 H358 细胞裂解产物中对 EGFR 信号传导通路蛋白的分

析。更详细地,将来自未处理的 A549、H460 和 H358 细胞的裂解产物 (30 μ g) 在 3-8% 丙烯酰胺 Tris-acetate 凝胶或 10% 丙烯酰胺 Bis-Tris 凝胶中分离,转移至硝基纤维素膜,并用所示抗体探测。结果代表 2 个独立的实验。

[0229] 图 3 表示的为 seliciclib 和 AG1478 协同下调 H358 细胞中的 EGFR 信号传导。更详细地, H358 细胞以大约 8×10^5 细胞 / 板接种在 10cm 盘中,并放置过夜。细胞在有 (+) 或没有 (-) seliciclib 和 AG1478 存在下培养 72 小时,然后收获。在 H358 细胞中,对于 seliciclib 的 IC_{50} 为 8.5 μ M,且对于 AG1478 的 IC_{50} 为 4.0 μ M。将来自每种处理的蛋白裂解产物 (30 μ g) 在 3-8% 丙烯酰胺 Tris-acetate 凝胶或 10% 丙烯酰胺 Bis-Tris 凝胶中分离,转移至硝基纤维素膜,并用所示抗体探测。结果代表 2 个独立的实验。

[0230] 图 4 表明 seliciclib 和 AG1478 以细胞系依赖方式诱导细胞凋亡增强。更详细地, H358 细胞或 H1650 细胞用 $1 \times IC_{50}$ 的 seliciclib、AG1478,或 seliciclib 和 AG1478 处理 72 小时,然后收获并分析凋亡标记。(A) 将来自每种处理的蛋白裂解产物 (25 μ g) 在 4-12% 丙烯酰胺 Bis-Tris 凝胶中分离,转移至硝基纤维素膜,并用识别裂解的 PARP 的抗体和肌动蛋白 (作为加样对照) 探测。(B) 碘化丙锭染色后通过流式细胞仪分析细胞的 DNA 含量。Sub-G1 为那些含有 DNA 比正常二倍体细胞少的细胞。结果代表 2 个独立的实验。

[0231] 图 5 表明 seliciclib 和埃罗替尼的组合对 H358 异种移植植物生长的影响。更详细地,小鼠 (nu/nu) 单侧肋腹皮下注射 $\sim 1 \times 10^7$ H358 细胞 / 小鼠。当肿瘤为 $\sim 110mm^3$ 时开始治疗,并持续 28 天。结果表明每个治疗组 (9 只小鼠 / 组) 的平均肿瘤体积 ($\pm$ SEM),且表示下述治疗:用溶媒、seliciclib (50mg/kg) 每天 2 次腹膜内注射,持续 5 天,然后停 2 天,然后共重复 4 个循环,埃罗替尼 (100mg/kg) 每天口服强饲持续 28 天,或两种试剂的组合。

[0232] 图 6 表示使用 H292 异种移植植物模型, seliciclib (50mg BID IP)、化合物 [1] (40mg BID IP)、埃罗替尼 (100mg QD PO),以及埃罗替尼 + seliciclib 组合,以及埃罗替尼 + 化合物 [1] 组合的效果,以平均肿瘤体积表示。

实施例

[0233] 材料和方法

[0234] 总则

[0235] 除非另有说明,化学物品和溶剂购自市售源,且以得到状态使用。THF 和 Et_2O 在 N_2 下用钠 - 二苯甲酮通过回流加热干燥,并通过蒸馏收集。甲苯通过在 N_2 下经钠回流加热干燥。 CH_2Cl_2 通过在 N_2 下经 CaH_2 回流加热干燥。所用的微波发生器为 CEM “Discover” 型,具有循环单模腔设计 (circular singlemode cavity design),其将微波辐射集中在样品管上。使用涂覆硅胶 G60 (0.25cm) 的玻璃板进行 TLC (薄层层析法)。风干显影板,并在 UV 灯下 (254/365nm) 分析。除非另有说明,使用无水 $MgSO_4$ 作为有机溶液的标准干燥剂。使用 Flurochem 硅胶 (35-70 μ m) 进行快速柱层析。熔点 (mp) 通过 Electrothermal 19100 毛细管熔点仪测定,且未校正。缩写 (dec) 表示分解点。 1H -NMR 谱在 Bruker Avance 300 (300.1MHz) 或 Varian Gemini 2000 (300MHz) 光谱仪上记录,在所有情况中使用氘代溶剂锁定 (lock),且残余溶剂作为内标。使用 PENDANT 序列的 ^{13}C -NMR 谱记录在 Bruker Avance 300 (75.5MHz) 光谱仪上。所有其它 ^{13}C -谱使用混合脉冲 1H 去偶记录在 Varian Gemini 2000 (75.5MHz) 光谱仪上。偶合常数 (J) 精确到 0.1Hz。使用下述缩写:s,单峰;d,双峰;t,三重峰;q,四重峰;

qu, 五重峰 ;m, 多重峰和 br, 宽峰。元素分析使用 Mrs S Williamson, School of Chemistry, Purdie Building, University of St. Andrews, UK 进行。所得结果在计算值的 0.4% 范围内。电喷雾质谱 (ESI) 记录在 LCT 质谱仪上, 联合 Waters 2975 HPLC。分析型 RP-HPLC 使用 Dionex ASI-100 自动进样注射器 (偶联 Dionex P580 泵) 进行。使用 Phenomenex 柱 (150×4.60mm, Synergi 4 μ hydro-RP 80 Å) (保持温度为 25℃) 用于分析。HPLC 元件使用 Chromeleon 软件控制。线性梯度洗脱使用 H₂O/MeCN 体系 (含 0.1% CF₃COOH), 以 1mL/分钟的流速进行。纯度通过色谱图的积分进行评估 (λ = 254nm)。

[0236] ErbB 抑制剂

[0237] AG 1478 得自 Tocris Biosciences。曲妥单抗得自 Genentech。西妥昔单抗得自 Imclone。埃罗替尼得自 Genentech。吉非替尼得自 Astra Zeneca。Lapatinib 得自 Glaxo SmithKline。

[0238] seliciclib 的制备

[0239] Roscovitine 根据 EP0874847B(CNRS) 中描述的方法制备。Seliciclib 得自 Cyclacel(Dundee, UK)。(3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [1]、(3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [2] 和 (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇 [3], 和其它式 (I) 化合物根据 WO2004/016612(Cyclacel Ltd) 中所述的方法制备。

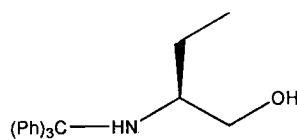
[0240] (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)-戊-2-醇 [4] 的制备

[0241] (2R,3S)-3-氨基-戊-2-醇通过 2 种途径中的一种或另一种制备, 2 种途径的区别在于对于胺所用的保护基不同。式 (I) 化合物的进一步详细说明可见于正在审查的 PCT 申请 <代理人编号 P29055W0>, 要求 GB0706632.7 和 US60/921,897 的优先权。

[0242] 途径 1 使用三苯甲基作为保护基

[0243] (S)-2-(三苯甲基氨基)丁-1-醇

[0244]



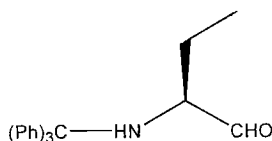
[0245] 在氩气氛下于室温, 向搅拌的 (S)-(+)-2-氨基丁-1-醇 (10g, 112.18mmol) 在二氯甲烷 (DCM, 250ml) 中的溶液中加入二异丙基乙基胺 (DIEA, 19.4ml, 112.18mmol), 然后加入三苯甲基氯 (31, 2g, 112.18mmol)。将反应混合物在该温度搅拌 48 小时, 这时 TLC (己烷: 乙醚: MeOH; 55: 40: 5) 表明反应完全。真空下蒸发溶剂, 且将残余物溶于乙酸乙酯中。有机溶液用水 (2x) 洗涤, 用硫酸钠干燥。除去溶剂, 得到 (S)-2-(三苯甲基-氨基)-丁-1-醇, 为淡黄色油状物; 产量: 33g (89%)。

[0246] ¹H-NMR (CDCl₃, 250MHz): δ 0.72 (3H, t, J = 7.5Hz, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 1.15-1.10 (m, 2H, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 2.05 (1H, s, br, NH), 2.24 (1H, s, br, OH), 2.62-2.54 (m, 1H, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 3.17-3.08 (1H m, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 3.35-3.29 (1H, m, NHCH-(CH₂CH₃)-CH₂OH), 7.37-7.2 (12H, m, ArH), 7.65-7.58 (3H, m, ArH);

δ_c (250MHz, $CDCl_3$) 146.86 (C), 129.43 (6xCH), 127.90 (6xCH), 126.48 (3xCH), 71.27 (C), 62.72 (CH_2), 48.91 (CH), 24.55 (CH_2), 10.47 (CH_3)。

[0247] (S)-2-(三苯甲基氨基)丁醛

[0248]

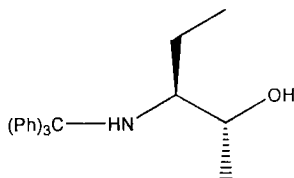


[0249] 在氩气氛下于 -78°C , 向搅拌的无水二甲亚砜 (2.4ml, 2.8 当量, 33.82mmol) 在无水二氯甲烷 (30ml) 中的溶液中滴加草酰氯 (2M 的 DCM 溶液, 8.45ml, 1.40 当量, 16.9mmol)。将反应混合物于 -78°C 搅拌 1 小时, 之后滴加 (S)-2-(三苯甲基-氨基)-丁-1-醇 (4g, 1 当量, 12.07mmol) 在 DCM (30ml) 中的溶液, 同时搅拌。反应混合物在该温度搅拌 2 小时, 然后加入三乙胺 (TEA, 8.4ml, 5 当量, 60.27mmol) 在 DCM (30ml) 中的溶液, 且经 1 小时将溶液温热至室温。反应混合物用另一些 DCM (100ml) 稀释, 并用水 (250ml) 洗涤。水相用 DCM (3×50ml) 萃取, 且合并的有机相用盐水 (50ml) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 并在真空下蒸发。残余物通过快速硅胶色谱法 (乙酸乙酯: 己烷 1:4) 纯化, 得到 (S)-2-(三苯甲基-氨基)-丁醛, 为淡黄色油状物; 产量: 3.64g (91%)。

[0250] $^1\text{H-NMR}$ ($CDCl_3$, 250MHz): δ 0.95 (3H, t, $J = 7.5\text{Hz}$, $-NHCH(CH_2CH_3)-CHO$), 1.72-1.52 [2H, m, $NHCH(CH_2CH_3)CHO$], 2.76 (1H, s, br, $-NH$), 3.41-3.36 [1H, m, $NHCH(CH_2CH_3)CHO$], 7.35-7.17 (12H, m, ArH), 7.67-7.51 (3H, m, ArH), 9.05 (1H, s, $NHCH(CH_2CH_3)CHO$); δ_c (250MHz, $CDCl_3$) 202.95 (C=O), 146.23 (C), 129.23 (6xCH), 127.96 (6xCH), 126.85 (3xCH), 71.13 (C), 62.62 (CH), 24.78 (CH_2), 10.48 (CH_3)。

[0251] (2R,3S)-3-(三苯甲基氨基)戊-2-醇

[0252]



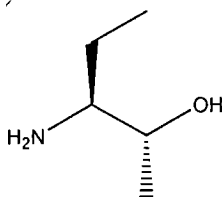
[0253] 在氩气氛下于 -78°C , 向搅拌的 $CuBr \cdot SMe_2$ (3g, 14.6mmol) 在无水乙醚 (100ml) 中的悬浮液中滴加甲基锂 (1.6M 的乙醚溶液, 16.5ml, 4.0 当量, 26.5mmol), 且经 1 小时将溶液温热至室温。将混合物冷却至 -78°C , 且滴加 (S)-2-(三苯甲基-氨基)-丁醛 (2.2g, 6.62mmol) 在乙醚 (25ml) 中的溶液, 同时搅拌。反应混合物在该温度搅拌 2 小时, 然后经 1 小时温热至室温。加入饱和的 NH_4Cl 水溶液 (50ml), 并分离 2 层。有机相用盐水 (50ml) 洗涤, 干燥 ($MgSO_4$), 并在真空下蒸发。残余物通过快速硅胶柱色谱法纯化, 用己烷: 乙酸乙酯 (80:20) 洗脱, 得到 (2R,3S)-3-(三苯甲基-氨基)-戊-2-醇, 为淡黄色油状物; 产量: 1.5g (66%)。

[0254] (75 % de 2R,3S; 25 % de 2S,3S)。 $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 250MHz): δ 0.047+0.55 (2×t, $J = 7.50+7.26\text{Hz}$, $-NHCH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 0.99-1.12 (m, 5H, $-NHCH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 2.01 (1H, m, $-NHCH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 3.22-3.43 (m, 1H, $-NHCH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 4.41 [1H, d, $J = 3.3$, $NHCH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$],

7.14-7.56 (15H, m, ArH) ; δ_c (250MHz, $CDCl_3$) 146.88 (C), 128.97 (6xCH), 127.83 (6xCH), 126.43 (3xCH), 71.03 (C), 68.13 (CH), 58.77 (CH), 23.09 (CH_2), 17.88 (CH_3), 10.47 (CH_3)。

[0255] (2R,3S)-3-氨基-戊-2-醇

[0256]



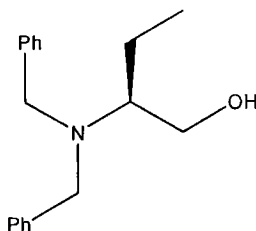
[0257] 在氩气氛下于室温,向搅拌的(2R,3S)-3-(三苯甲基-氨基)-戊-2-醇(1.64g, 4.75mmol)在二氯甲烷(20ml)中的溶液中滴加三氟乙酸(10ml),并将溶液在该温度搅拌1小时。真空下蒸发溶剂,且残余物使用己烷(150ml)从乙醚(15ml)中沉淀,同时搅拌,得到黄色油状物。从油状物中倒出溶剂,且该油状物用己烷(30ml)洗涤,并在真空中干燥,得到(2R,3S)-3-氨基-戊-2-醇,为淡黄色油状物;产量:0.30g(98%)。

[0258] (75 % de 2R,3S; 25 % de 2S,3S)。 1H -NMR (d_6 -DMSO, 250MHz) : δ 0.913+0.923 (2xt, 3H, J = 7.50+7.50Hz, $NH_2CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 1.11+1.18 (3H, 2xd, J = 6.48+6.48Hz, $NH_2CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 1.41-1.65 (2H, m, $NH_2CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$), 2.76+2.93 [2x1H, m, $NH_2CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$], 3.61-3.69+3.80-3.90 [2x1H, m, $NH_2CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)OH$], 7.73 (2H, s, br, NH_2)。

[0259] 途径2通过二苄基化保护胺

[0260] (S)-2-(二苄基氨基)丁-1-醇

[0261]

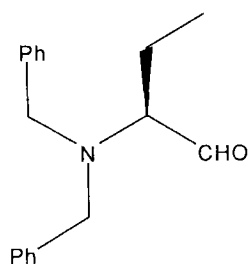


[0262] 向搅拌的(S)-(+)-2-氨基丁-1-醇(5g, 56.18mmol)在无水乙腈(100ml)中的溶液中加入粉末的碳酸钾(31g, 224.72mmol),然后加入溴苄(19g, 111.11mmol)。反应在室温搅拌24小时。真空下除去溶剂,并将残余物溶于乙酸乙酯(100ml)和水(100ml)中。有机相再次用水洗涤,干燥(Na_2SO_4),并浓缩得到纯产物,为微黄色油状物(14.5g, 97.3%)。

[0263] δ_H (250MHz, $CDCl_3$) 0.98 (3H, t, J 7.5, $CHCH_2CH_3$), 1.38-1.2 (1H, m, $CHCH_2CH_3$), 1.94-1.78 (1H, m, $CHCH_2CH_3$), 2.83-2.71 (1H, m, $CHCH_2CH_3$), 3.22 (1H, s, b, OH), 3.65-3.4 (2H, m, CH_2OH), 3.47 (2H, d, J 17.5, 2x $CHHPh$), 3.94 (2H, d, J 17.5, 2x $CHHPh$), 7.46-7.26 (10H, m, 2xC $_6$ H $_5$) ; δ_c (250MHz, $CDCl_3$) 139.42 (2xC), 129.1 (2xCH), 128.52 (2xCH), 127.25 (2xCH), 61.97 (CH), 60.67 (CH_2), 53.23 (CH_2), 17.92 (CH_2), 11.83 (CH_3) ; m/z 270.2 (M+H)。

[0264] (S)-2-(二苄基氨基)丁醛

[0265]

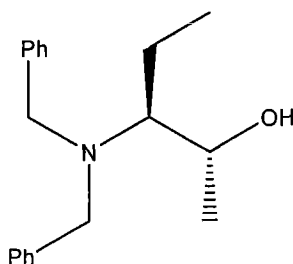


[0266] 在干燥氮气下,将 2M 草酰氯的二氯甲烷溶液 (3.18ml,6.36mmol) 冷却至 -78°C ,并用无水二氯甲烷 (20ml) 稀释。将二甲亚砜 (1g,12.72mmol) 在无水二氯甲烷中的溶液滴加至冷却的搅拌溶液中。加入完成后再搅拌反应 1 小时。经 5 分钟加入 (S)-2-(二苄基氨基)丁-1-醇 (1.43g,5.3mmol) 在二氯甲烷中的溶液。10 分钟后,加入二异丙基乙基胺 (2.73g,21.2mmol)。将反应温热至室温,并搅拌 1 小时。将其冷却至 0°C ,并加入乙酸乙酯/水 (50ml : 50ml)。有机层用水 (50ml),盐水 (50ml) 洗涤,干燥 (MgSO_4) 并浓缩。产物通过快速硅胶柱色谱法 (乙酸乙酯:己烷 1 : 4) 纯化,得到纯产物 (1.28g,90.5%)。

[0267] δ_{H} (250MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, t, J 7.5, CHCH_2CH_3), 1.77-1.54 (2H, m, CH_2CH_3), 2.99 (1H, t, J 7.5, CHCH_2CH_3), 3.74-3.57 (4H, m, $2\times\text{CH}_2\text{Ph}$), 7.31-7.11 (10H, m, $2\times\text{C}_6\text{H}_5$) 9.64 (1H, s, CHO); δ_{C} (250MHz, CDCl_3) 203.9 (CO), 139.33 ($2\times\text{C}$), 128.99 ($4\times\text{CH}$), 128.45 ($4\times\text{CH}$), 127.3 ($2\times\text{CH}$), 68.46 (CH), 54.85 (CH_2), 17.44 (CH_2), 11.83 (CH_3); m/z 268.2 (M+H)。

[0268] (2R,3S)-3-(二苄基氨基)戊-2-醇

[0269]



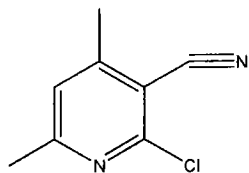
[0270] 在氩气氛下于 -78°C ,向 $\text{CuBr} \cdot \text{SMe}_2$ (1.54g,7.5mmol) 在无水乙醚中的搅拌悬浮液中滴加甲基锂 (1.6M 在乙醚中,9.4ml,15mmol)。加入完成后,将反应温热至室温。将反应冷却至 -78°C ,并滴加 (S)-2-(二苄基氨基)丁醛 (1g,3.75mmol) 在乙醚 (20ml) 中的溶液。加入后,继续搅拌 2 小时。然后反应用饱和的 NH_4Cl 水溶液 (10ml) 终止。反应混合物用乙醚 ($2\times 30\text{ml}$) 萃取,且合并的有机相用盐水 (20ml) 洗涤,干燥 (MgSO_4),并在真空下蒸发。残余物通过快速硅胶梯度柱色谱法纯化,用己烷:乙酸乙酯 (100 : 0 $\rightarrow$ 80 : 20) 洗脱,得到产物,为淡黄色油状物 (0.95g,89%),为唯一异构体。

[0271] δ_{H} (250MHz, CDCl_3) 1.05 (3H, t, J 7.5, CHCH_2CH_3), 1.25 [3H, d, J 7.5, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$], 1.6-1.49 (1H, m, CHCH_2CH_3), 1.88-1.73 (1H, m, CHCH_2CH_3), 2.41 (1H, s, br, OH), 2.66-2.59 (1H, m, CHCH_2CH_3), 3.85-3.65 (4H, m, $2\times\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.05-3.9 (1H, m, CHOH), 7.41-7.25 (10H, m, ArH); δ_{C} (250MHz, CDCl_3) 140.05 ($2\times\text{C}$), 128.98 ($4\times\text{CH}$), 128.37 ($4\times\text{CH}$), 127.3 ($2\times\text{CH}$), 66.81 (CH), 63.65 (CH), 55.41 (CH_2), 20.63 (CH_3), 18.44 (CH_2), 12.5 (CH_3)。

[0272] 实施例 1

[0273] 2-氯-4,6-二甲基烟碱甲腈 (nicotinonitrile)

[0274]

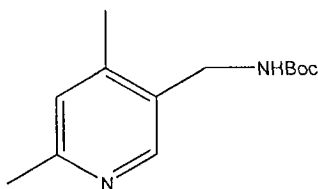


[0275] 将 4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-甲腈 (5g, 34mmol) 加入到三氯氧磷 (20ml) 中。反应在回流下搅拌 2 小时, 之后观察到完成。移除挥发物, 且残余物用石油醚研磨。滤出所得固体, 并用己烷洗涤, 然后干燥得到纯白色固体 (5.1g, 90%)。

[0276] δ_{H} (250MHz, CDCl_3) 2.55 (3H, s, CH_3), 2.57 (3H, s, CH_3), 7.09 (1H, s, ArH); δ_{C} (250MHz, CDCl_3) 162.64 (C), 154.39 (C), 152.26 (C), 123.22 (CH), 114.28 (C), 108.31 (C), 24.5 (CH_3), 20.54 (CH_3); m/z 189 (M+Na)。

[0277] 4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基甲酸叔丁酯

[0278]

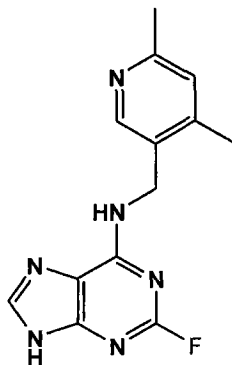


[0279] 将 2-氯-4,6-二甲基-烟碱甲腈 (5g, 30.1mmol) 溶于 10% 乙酸 / 乙醇 (30ml) 中。加入 10% 钯 / 炭催化剂 (0.5g), 且反应在氢气氛下于 60°C 搅拌 24 小时。混合物通过硅藻土垫过滤。移除挥发物, 且将粗残余物溶于二氯甲烷 (30ml) 中。然后向搅拌的溶液中加入三乙胺 (5ml), 然后加入焦碳酸二叔丁酯 (6.5g, 30mmol)。3 小时后, 除去溶剂, 且将残余物溶于乙酸乙酯中。用水 (50ml), 饱和的碳酸氢盐 (50ml) 洗涤, 干燥并蒸发。粗产物通过硅胶快速柱色谱法纯化 (乙酸乙酯: 己烷 1:2), 得到 1.4g 纯标题化合物 (20% 产率)。

[0280] δ_{H} (250MHz, CDCl_3) 1.43 (9H, s, 3x CH_3), 2.19 (3H, s, CH_3), 2.38 (3H, s, CH_3), 4.19 (2H, s, br, ArCH_2NH), 6.84 (1H, s, ArH), 8.15 (1H, s, ArH); δ_{C} (250MHz, CDCl_3) 157.41 (CO), 155.63 (C), 148.93 (CH), 145.91 (C), 129.51 (C), 124.76 (CH), 79.44 (C), 46.12 (CH_2), 28.32 (3x CH_3), 23.74 (CH_3), 18.97 (CH_3); m/z 237.2 (M+H)。

[0281] (4,6-二甲基吡啶-3-基甲基)-(2-氟-9H-嘌呤-6-基)-胺

[0282]



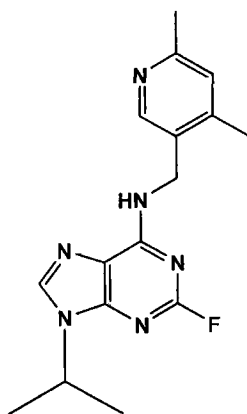
[0283] 在氩气氛下于 0°C, 向搅拌的 6-氯-2-氟嘌呤 (0.83g, 4.9mmol) 在 n-BuOH (50ml) 中的溶液中加入 DIEA (2.5ml, 14.7mmol), 然后加入 (4,6-二甲基吡啶-3-基) 甲胺 (1g, 7.35mmol)。反应混合物在该温度搅拌 1 小时, 然后返回至室温, 并搅拌 4 小时, 仍不完全,

因此将反应加热至 100℃,并在此温度放置 2 小时。真空下蒸发溶剂,且残余物通过梯度快速硅胶柱色谱纯化,用 CHCl_3 : MeOH (100 : 0 $\rightarrow$ 90 : 10) 洗脱,得到产物,为白色固体;产量:0.86g(65%)。

[0284] δ_{H} (250MHz, CDCl_3) 2.35(3H, s, CH_3), 2.39(3H, s, CH_3), 4.61(2H, s, br, NHCH_2), 7.07(1H, s, ArH), 8.13(1H, s, ArH), 8.33(1H, s, ArH), 8.69(1H, s, br, NH); δ_{C} (250MHz, CDCl_3) 161.2(C), 158.57(C), 156.08(C), 150(C), 148.08(CH), 148.14(CH), 147.9(CH), 145.93(C), 129.92(C), 129.76(C), 124.37(CH), 41.7(CH_2), 23.17(CH_3), 18.14(CH_3); m/z 273.2(M+H)。

[0285] (4,6-二甲基吡啶-3-基甲基)-(2-氟-9-异丙基-9H-嘌呤-6-基)-胺

[0286]

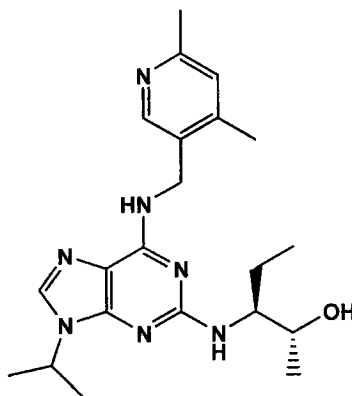


[0287] 在氩气氛下于室温,向搅拌的(4,6-二甲基-吡啶-3-基甲基)-(2-氟-9H-嘌呤-6-基)-胺(0.6g,1.9mmol)在DMF(10ml)中的溶液中加入 K_2CO_3 (粉末化的,无水,1.77g,5当量,13mmol),然后加入2-溴丙烷(1.8ml,10当量,19mmol)。反应混合物在室温搅拌24小时,这时TLC(CHCl_3 : MeOH ;90 : 10)表明反应完成。真空下蒸发溶剂,且将残余物分配于水(50ml)和乙酸乙酯(50ml)之间,分离水相并用另一些EtOAc(2 $\times$ 50ml)萃取。收集的有机相用盐水(50ml)洗涤,干燥(MgSO_4),并在真空下蒸发,且残余物通过梯度硅胶柱色谱法纯化,用 CHCl_3 : MeOH (100 : 0 $\rightarrow$ 95 : 5) 洗脱,得到产物,为黄色膜状物(0.4g, 59%)。

[0288] δ_{H} (250MHz, CDCl_3) 1.52[6H, d, J 7.5CH(CH_2)₂] 2.27(3H, s, CH_3), 2.45(3H, s, CH_3), 4.73-4.62(3H, m, NHCH_2 和 $\text{CH}[\text{CH}_3]$ ₂), 6.91(1H, s, ArH), 7.12(1H, NH), 7.47(1H, s, ArH), 8.32(1H, s, ArH); δ_{C} (250MHz, CDCl_3) 160.77(C), 157.89(C), 157.43(C), 156.12(C), 155.79(C), 149.14(CH), 137.7(CH), 128.7(C), 129.76(C), 124.83(CH), 47.2(CH), 40.14(CH_2), 23.9(CH_3), 22.47(2 $\times$ CH_3), 18.54(CH_3); m/z 315.3(M+H)。

[0289] (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇

[0290]



[0291] 在氩气氛下于室温,向搅拌的(4,6-二甲基-吡啶-3-基甲基)-(2-氟-9-异丙基-9H-嘌呤-6-基)-胺(300mg,0.84mmol)在n-BuOH/DMSO(5ml,4:1)中的溶液中加入DIEA(1.7ml,10当量,8.4mmol),然后加入(2R,3S)-3-氨基-戊-2-醇(0.5g,4.8mmol)。在烧瓶上装上冷凝器,并将反应混合物置于在140℃预热的油浴中,并在该温度搅拌72小时。将反应混合物冷却至室温,并在真空下蒸发溶剂。将残余物分配于乙酸乙酯(50ml)和水(50ml)之间,水相用另一些EtOAc(2×25ml)萃取,且合并的有机相用盐水(50ml)洗涤,干燥(MgSO₄),并在真空下蒸发。残余物通过快速梯度硅胶柱色谱纯化,用CHCl₃:MeOH(100:0→95:5)洗脱,得到55mg纯标题化合物(12%)。

[0292] δ_H (250MHz, CDCl₃) 0.95(3H, t, J 7.5, CHCH₂CH₃), 1.06(3H, d, J 7.5, CHCH₃OH) 1.48[6H, d, J 7.5CH(CH₃)₂], 2.24(3H, s, CH₃), 2.4(3H, s, CH₃), 3.92-3.82(2H, m, NHCH₂), 4.67-4.45(3H, m, CH₂CHMeOH), 6.15(1H, s, br, NH), 6.87(1H, s, ArH), 7.37(1H, ArH), 8.31(1H, s, ArH); δ_C (250MHz, CDCl₃) 160.11(C), 157.68(C), 154.57(C), 149.42(CH), 146.38(C), 134.54(CH), 129.24(C), 124.84(CH), 71.52(CH), 59.65(CH), 46.47(CH), 40.33(CH₂), 24.94(CH₂), 23.89(CH₃), 23.52(2xCH₃), 17.37(CH₃), 12.57(CH₃); m/z 398.3(M+H)。

[0293] 缩写

[0294] 所用的缩写为:CTD,羧基末端区域;DMEM, Dulbecco 改良的 Eagle 培养基;DMSO, 二甲亚砜;EGF,表皮生长因子;EGFR,表皮生长因子受体;ERK,细胞外信号调节激酶;FCS,胎牛血清;NSCLC,非小细胞肺癌;PARP,聚-ADP核糖聚合酶;PBS,磷酸盐缓冲盐水;PKB,蛋白激酶B;SDS-PAGE,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0295] 细胞系、细胞培养物和试剂

[0296] MCF7、A549、H460、SkBr3、H1650 和 H358 细胞购自 ATCC(Mannassas, USA)。将细胞培养物保存在 DMEM 中, H1650 和 H358 细胞除外, 它们在 RPMI 培养基中生长。细胞在 37℃ 在增湿的 5% CO₂ 气氛下, 在含 10% (v/v) 胎牛血清 (FCS), 100 单位/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的培养基中培养。除非另有说明, 所有试剂购自 Sigma(Poole, UK)。

[0297] 药物组合分析

[0298] 实验在 96-孔板中进行。SkBr3 和 MCF7 细胞以 5,000 细胞/孔的密度接种在含 1% (v/v)FCS 的培养基中。H358、H1650 和 H460 细胞以 3,000 细胞/孔, 且 A549 细胞以 2,000 细胞/孔接种在含 10% (v/v)FCS 的培养基中。Seliciclib(Cyclacel Ltd., Dundee, UK) 和 AG1478(Tocris Bioscience, Bristol, UK) 的储备液在二甲亚砜 (DMSO) 中制备, 而将曲

妥单抗 (Genentech Inc, South San Francisco, USA) 溶于 0.9% (w/v) 无菌盐水溶液中。对每种化合物进行连续稀释 (1.5- 倍), 浓度范围覆盖每种药物的 IC_{50} 值。

[0299] 对于可能协同相互作用的实验评估, 伴行 (concomitant) 处理方案包括同时用 seliciclib 和曲妥单抗 (或 AG1478) 处理细胞 72 小时, 同时适宜的对照细胞用每个化合物单独处理 72 小时。在依次处理方案中, 铺板后 2 小时将一种药物添加到细胞中, 并放置 24 小时。然后吸出培养基, 用新鲜的含第二种药物的培养基替换, 并再培养 72 小时。对于依次处理方案的 2 个单独处理对照包括用不含药物的培养基替代其中一种药物处理。所有处理一式三份进行。

[0300] 药物处理后, 在每孔中存活细胞的数量通过在含 10% 阿尔玛蓝 (alamarblue) (Roche, Lewes, East Sussex, U. K.) 的培养基中培养 1 小时, 并在 488-595nm 处检测吸收来评估。使用 Calcsyn 软件包 (BioSoft, Cambridge, U. K.) 分析药物相互作用, 其基于 Chou 和 Talalay 的半数有效模型 [19]。组合指数 (C. I.) 为 1 表明加和药物相互作用, 而 C. I. 大于 1 为拮抗作用, 且分数小于 1 为协同作用。

[0301] 蛋白质印迹分析

[0302] 将细胞以大约 8×10^5 细胞 / 板接种在 10cm 板上, 并放置过夜。将化合物添加到板上, 并将细胞培养所示的时间。从每个孔中移出培养基, 并以 1,000xg 离心 5 分钟使任何从板表面脱离的细胞沉淀。保持贴附在板上的细胞用冰冷的缓冲液 A (50mM HEPES, pH 7.0, 含 20mM NaCl, 1mM DTT, 和蛋白酶抑制剂混合物 (Merck, Nottingham, U. K.)) 洗涤一次, 然后刮到 0.350ml 缓冲液 B (含 10mM 焦磷酸钠、10mM 氟化钠和 1mM 正钒酸钠的缓冲液 A) 中。然后将重悬的细胞与适宜培养基细胞沉淀合并, 并通过超声 ($2 \times 3s$ 脉冲, 使用 Sanyo soniprep 150, 5amp) 裂解。使用 BCA 测试 (Perbio Science, Northumberland, U. K.) 测定各裂解产物的蛋白质浓度。将裂解产物 ($20-30 \mu g$ 蛋白质 / 孔) 在 3-8% 丙烯酰胺 Tris-acetate 凝胶或 10% 丙烯酰胺 Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, Glasgow, U. K.) 上分离, 并使用 Invitrogen 湿转移系统将蛋白质转移到硝基纤维素膜 (Schleicher&Schuell, London, U. K.)。将该膜在室温于含 0.02% (v/v) Tween 20 (PBST) 和 5% (w/v) 脱脂无水牛奶中封闭 1 小时。一抗培养在 $2-8^{\circ}C$ 于含 3% (w/v) 无水牛奶的 PBST 中, 并使用下述一抗进行: ErbB2 (Calbiochem, Nottingham, U. K.), EGFR (Calbiochem), 磷酸-Tyr1068 EGFR (New England Biolabs, Hertfordshire, U. K.), 细胞周期蛋白 D1 (Lab Vision, Suffolk, U. K.), 磷酸-Thr185 ERK1 和磷酸-Thr202 ERK2 (Abcam, Cambridge, U. K.), ERK2 (Abcam), Asp-214 裂解的 PARP (BD Pharmingen, Oxford, UK.) 和 β -Actin。该膜在 PBST 中洗涤 3 次, 然后在含 3% (w/v) 牛奶的 PBST 中以 1 : 5000 稀释的适宜的辣根过氧化物酶 - 结合的二抗 (Perbio) 培养。该膜在 PBST 中洗涤 3 次, 然后使用改良的化学发光试剂盒 (Amersham Corporation, Buckinghamshire, U. K.) 显影。

[0303] 流式细胞术

[0304] 将 H358 或 H1650 细胞以大约 5×10^5 细胞 / 板接种在 10cm 板中, 并放置过夜。细胞用 $1 \times IC_{50}$ seliciclib、AG1478 或两种药物一起处理。处理 72 小时后, 细胞通过胰蛋白酶法收获, 在 PBS 中洗涤 2 次, 然后在 $-20^{\circ}C$ 于 70% (v/v) 乙醇中固定过夜。细胞在含 1% (w/v) BSA 的 PBS 中洗涤 2 次, 然后在室温用 $50 \mu g/ml$ 碘化丙锭和 $50 \mu g/ml$ 核糖核酸酶 A 培养 20 分钟。通过流式细胞术使用 CellQuest 程序在 Becton Dickinson LSR 流式细胞仪上分

析细胞的 DNA 含量。

[0305] 体内研究

[0306] 雌性 (nu/nu) 小鼠在其肋腹侧单点皮下注射 $\sim 1 \times 10^7$ H358 细胞 / 小鼠。使肿瘤生长至 $\sim 110\text{mm}^3$, 然后根据肿瘤大小配对匹配为各治疗组 (9 只小鼠 / 组)。1 组用 seliciclib (50mg/kg) 治疗, 每天 2 次腹膜内注射, 连续 5 天, 然后停用 2 天; 然后重复治疗总共 4 个循环。埃罗替尼 (100mg/kg) 每天口服强饲, 连续 28 天。使用组合治疗的组以与单药物两组相同的方式给药。小鼠每周称重至少 2 次以评估治疗毒性, 且每周至少 2 次用测径仪测量肿瘤以确定肿瘤生长。在治疗的第一周, 动物有一些体重下降。然而, 这似乎与对于 seliciclib 所用的初始溶媒 (50mM HCl) 有关, 因为在溶媒对照组中也出现体重下降 (在第 8-11 天中最大体重下降为 11%)。在第 10 天, 对于对照组和 2 个接受 seliciclib 的组, 将溶媒改为 10% 克列莫佛 (cremophor)、10% 乙醇、80% 盐水; 所有 3 个组立即开始体重增加。使用下式将肿瘤检测转化为体积: 肿瘤体积 (mm^3) = 宽² (mm) $\times$ 长 (mm) $\times 0.52$ 。肿瘤生长抑制百分比用下式确定: $1 - (\text{治疗组肿瘤体积的改变} / \text{对照组肿瘤体积的改变}) \times 100$ 。对于每组, 通过使用单因素 ANOVA 然后用 Dunnett 检验与对照组比较来确定统计学意义。不同治疗组之间的差异使用双因素非配对 Student's T- 检验确定。

[0307] 结果和讨论

[0308] 靶向 CDK 或 ErbB 家族成员的化合物在癌症治疗中已经引起了广泛的关注。这些激酶家族成员的抑制剂已经表现出一些作为单一试剂的临床活性, 但是最终更可能与其它药物的组合使用 [20]。这一系列的实验的目的为确定这些 2 种蛋白激酶家族的抑制剂是否可以协同组合。

[0309] 为了评估 seliciclib 和曲妥单抗之间的相互作用, 组合实验在下列乳腺癌细胞系中进行: SkBr3, 其过表达 HER2, 或 MCF7, 其表达低水平的 HER2 [15]。用曲妥单抗 (1-100nM) 培养使 SkBr3 细胞的增殖的降低高达 40%, 但对于 MCF7 细胞没有明显效果 (数据未示出), 这与以前的数据相符 [15]。Seliciclib 抑制两种细胞系的生长, 在 SkBr3 和 MCF7 细胞中的 IC_{70} 分别为 $20.4 \mu\text{M}$ 和 $15.4 \mu\text{M}$ 。seliciclib 和曲妥单抗的共同培养在 SkBr3 细胞系中导致中等协同抑制细胞生长 (表 1), 在 ED_{50} (在该点该组合抑制 50% 细胞生长) 得到的 Calculusyn 组合指数 (CI) 为 0.73。通过 HER2 信号通路转导的有丝分裂刺激导致细胞周期蛋白 D1 的表达, 且随后的活化 CDK 导致细胞增殖 [3]。因此, 这些受体的过表达或组成性激活导致致癌转化。事实上, 已经表明对于通过 HER2 受体的转化需要细胞周期蛋白 D [21], 且细胞周期蛋白 D1- 缺乏的小鼠抵抗 HER2- 介导的肿瘤发生 [22, 23]。为了评估协同性 seliciclib/ 曲妥单抗组合的机理, 对 HER2 信号传导通路的作用进行分析。SkBr3 细胞用 seliciclib、曲妥单抗或两种试剂的组合培养 24 小时, 制备细胞裂解产物, 且通过蛋白质印迹检测 HER2 和细胞周期蛋白 D1 蛋白的水平。曲妥单抗处理 (在高达 28nM 的浓度下) 对 HER2 水平具有适度作用 (图 1A), 这与之前的发现一致, 证明该药物在 SkBr3 细胞中不会明显地下调 HER2 水平 [24]。另一方面, 用 seliciclib 单独处理以剂量依赖方式降低 HER2 水平 (图 1B)。seliciclib 下调 HER2 受体的水平很可能是由于其对 CDK 7 和 9 的抑制作用 [25, 26] 导致受体转录降低和 HER2 蛋白损失, 因为其在细胞内自然地代谢更替 (turnover) [27]。与单独试剂处理相比, 当一起给药曲妥单抗和 seliciclib 时会产生更大的 HER2 受体下调, 这表明药物协同下调该受体的水平 (图 1C)。

[0310] 作为 HER2 信号传导通路的最后下游成分之一,检测该组合对于细胞周期蛋白 D1 蛋白水平的作用值得关注。以在这些实验中所测试的浓度,单独曲妥单抗处理对于细胞周期蛋白 D1 水平没有明显作用(图 1A),而 seliciclib 显著地以剂量依赖方式降低细胞周期蛋白 D1 水平(图 1B)。该细胞周期蛋白 D1 的损失通过 seliciclib 与曲妥单抗的组合稍微增加(图 1C)。HER2 信号下降的结果且也被 seliciclib- 介导的细胞周期蛋白 D1 转录的抑制,细胞周期蛋白 D1 水平很可能已经被下调[12]。这些数据表明在 SkBr3 细胞中, seliciclib 通过促进 HER2 受体下调和细胞周期调节剂细胞周期蛋白 D1 的损失(已经表明其对于增殖 HER2 有丝分裂信号是重要的)来增强曲妥单抗对抗 HER2 信号传导通路的作用[21-23]。

[0311] 为了深入分析 seliciclib 和 ErbB 家族成员的抑制剂之间的协同相互作用,在与 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 AG1478(埃罗替尼的类似物)的组合中测试 seliciclib[18,28]。埃罗替尼已经批准用于处理晚期 NSCLC,该药在治疗肺癌临床实验中已经表现出存活益处[29]。在下列 3 个 NSCLC 细胞系中初始评估 seliciclib 和 AG1478 之间的组合:NCI-H358、A549 和 NCI-H460。这些细胞系表达不同水平的野生型 EGFR, A549 细胞表达最高水平的该受体,且 H358 细胞表达最小的水平(图 2)。AG1478 在 H358、A549 和 H460 细胞中的 IC_{50} 值分别为 $4\mu M$ 、 $6.6\mu M$ 和 $10.4\mu M$,表明了 EGFR 蛋白水平和对于 AG1478 的敏感性没有直接联系。已经报导了对于埃罗替尼的敏感性等价模型,得到对这 3 种细胞系分别描述为敏感的,中间的和抵抗的[30]。进行组合分析评估伴行培养和依次添加(两种顺序)。在 H358 细胞中,伴行药物处理和用 AG1478 预处理然后用 seliciclib 处理导致协同抑制细胞生长(ED_{50} , CI 值分别为 0.74 和 0.81(表 2))。

[0312] 为了阐明 seliciclib 和 AG1478 的协同作用的分子机理, H358 细胞用每种试剂单独处理或用组合处理(以与用于细胞毒分析的那些浓度相同的浓度);制备细胞裂解产物,并通过蛋白质印迹分析蛋白质(图 3)。初始研究化合物对于 EGFR 水平及其磷酸化状态的作用。使用 AG1478 或 seliciclib 的处理以剂量依赖方式降低 EGFR 水平。当 AG1478 和 seliciclib 一起使用时,与单独使用 2 种单个的药物处理相比,EGFR 蛋白水平更有效地降低,这表明药物协同促进下调该受体(图 3)。而且, AG1478 处理导致以剂量依赖性降低 EGFR 磷酸化,而 seliciclib 处理作用有限。EGFR 磷酸化水平的降低通过伴行处理增强,这表明化合物协同下调 EGFR 的量和活化状态。

[0313] 为了进一步研究 seliciclib 和 AG1478 的组合对于 EGFR 信号传导通路的作用,分析该通路的两个下游成分;ERK 的磷酸化状态,和细胞周期蛋白 D1 蛋白水平。在测试浓度下,单独的 Seliciclib 对于 ERK 磷酸化没有明显作用。另一方面,AG1478 在低浓度下刺激 ERK 磷酸化,也已经在使用吉非替尼的 NSCLC 细胞系中观察到此效果[31],而在较高浓度下具有最小的作用。然而,该组合非常有效地降低 ERK 磷酸化,导致磷酸-ERK 水平的明显下降,这表明 EGFR 信号传导被抑制。细胞周期蛋白 D1 处于大多数 ErbB 受体信号传导通路的下游,是一种重要的细胞周期调节剂。事实上,已经表明细胞周期蛋白 D1 水平的下降在体外和患者中对于获得对 EGFR 抑制剂的响应都是重要的[32,33]。在等于或大于细胞 IC_{50} 值的浓度下, Seliciclib 在 H358 细胞中适度降低了细胞周期蛋白 D1 水平,而在测试浓度下, AG1478 对于该蛋白几乎没有作用。然而,当一起使用时,这两种药物以剂量依赖方式明显降低细胞周期蛋白 D1 的表达(图 3)。再次, seliciclib 对于协同性相互作用的贡献很可能

是由于抑制 CDK 7 和 9, 导致 EGFR 信号传导通路的重要成分的水平下降。

[0314] 已知 Seliciclib 处理导致凋亡性细胞死亡 [11, 34], 但在许多用 AG1478、埃罗替尼或曲妥单抗处理的细胞系中没有观察到明显的细胞凋亡诱导 [17, 35-37]。因此, 当组合 seliciclib 和 AG1478 时不能预期到协同诱导细胞凋亡。使用 PARP 裂解作为细胞凋亡的标记, 蛋白质印迹分析表明在 H358 细胞中, AG1478 在测试浓度下没有增加 PARP 裂解 (图 3)。相反, seliciclib 以剂量依赖性地诱导裂解的 PARP 增加, 但在 AG1478 存在下没有增强 (图 3)。综上所述, 这些结果表明在 H358 细胞中, seliciclib 和 AG1478 的组合导致协同抑制细胞生长, 主要是通过下调 EGFR 信号传导通路, 导致细胞增殖终止, 而不是增加诱导凋亡性细胞死亡。

[0315] 为了更详细地研究细胞凋亡的诱导, 将这些研究扩展至在 NCI-H1650 NSCLC 细胞系中评估该组合。该细胞系表达突变 EGFR, 且据报导其对埃罗替尼非常敏感, 埃罗替尼处理后诱导细胞凋亡 [38]。Calculusyn 分析表明 seliciclib/AG1478 组合在 H1650 细胞系中比在 H358 细胞中具有稍微更强的协同作用 (数据未示出)。为了评估该组合对细胞凋亡的作用, H1650 和 H358 细胞用化合物 (以它们适当的细胞毒 IC_{50} 浓度) 处理, 并通过蛋白质印迹分析测定裂解的 PARP 水平, 以及通过流式细胞术分析含 sub-G1 DNA 内含物的细胞的数量, 从而对细胞凋亡的诱导进行测定。如之前所证明的那样 (图 3), 在 IC_{50} 浓度下, 单个试剂或组合在 H358 细胞中对于诱导裂解 PARP 均没有显著作用 (图 4A)。在 DMSO 对照中少量的裂解 PARP 表示在该细胞系中的自然凋亡更替, 其没有被任何处理增强。相反, 在 H1650 细胞中, 与用 DMSO 处理的对照相比, seliciclib 和 AG1478 均导致裂解的 PARP 的水平少量增加。而且, 用组合处理后裂解的 PARP 的增加大于每个试剂单独时的情况 (图 4A)。来自相同实验的细胞的流式细胞术分析表明用 seliciclib 处理 H358 和 H1650 细胞后 G2/M 期细胞特有的增加 (图 4B)。在 H358 细胞中, 所有处理都没有导致含 sub-G1 DNA 内含物细胞 (凋亡细胞) 的明显增加, 即高于用 DMSO 处理的对照细胞的 $\sim 10\%$ 。在 H1650 细胞中, 对照组细胞中只有非常少量的细胞具有 sub-G1 内含物 ($\sim 2.5\%$); 两种单个试剂处理均导致 sub-G1 数量的少量增加, 且该组合导致凋亡数量的更大的增加 (图 4B), 方式相似于裂解的 PARP 数据 (图 4A)。在 H1650 细胞中得到相同的结果, 但重要的是如果在每种情况向治疗浓度增加到细胞毒 IC_{50} 值的 1.5 倍或 2.25 倍, 检测到更大百分比的凋亡细胞 (数据未示出)。这些数据表明在 AG1478 处理后易于受到凋亡诱导的细胞系中, 使用 seliciclib 的组合将导致更大水平的细胞凋亡诱导。

[0316] 最后, 在 H358 NSCLC 异种移植模型中体内评估 seliciclib 和埃罗替尼的组合。具有 $\sim 110mm^3$ 的 H358 肿瘤的小鼠每天 2 次腹膜内给予 seliciclib (50mg/kg), 连续 5 天, 然后停用 2 天, 总共重复该方案 28 天。口服强饲给予埃罗替尼 (100mg/kg), 每天 1 次连续 28 天, 而对于组合治疗小鼠, 接受对于每种单个试剂相同的方案。对照组小鼠按每天 2 次的方案接受 seliciclib 溶媒。在第 49 天, 所有治疗已经停止 3 周后, 对照组小鼠肿瘤的平均体积为 $700mm^3$, 显示肿瘤大小增长 > 6 倍 (图 5)。用单个试剂 seliciclib 或埃罗替尼治疗的小鼠的平均肿瘤体积分别为 $717mm^3$ 和 $444mm^3$, 表明试剂在这些剂量下对于它们的肿瘤没有明显活性。低水平的埃罗替尼活性 (44% 肿瘤生长抑制 $p > 0.05$) 与之前对于这种肿瘤类型报导的适度活性相符 [30]。然而, 到第 49 天, 用 seliciclib 和埃罗替尼的组合治疗的小鼠的平均肿瘤体积为 $153mm^3$, 表示 93% 肿瘤生长抑制。当利用 ANOVA 然后 Dunett's 多重

比较检验将所有组与溶媒对照组相比时,具有统计学不同的组仅有该组合组 ($p < 0.01$)。如果使用 Student's T 检验将单个组之间彼此进行比较,则该组合与单个试剂 seliciclib 和埃罗替尼治疗之间具有统计学意义 ($p < 0.002$)。到第 49 天,最佳 T/C 比(以百分比表示的治疗的肿瘤体积中值与对照的肿瘤体积中值的比)为 22%。因此,在该 H358 异种移植物中当以单个试剂使用时埃罗替尼和 seliciclib 都不是特别有效的,两种化合物的组合导致明显的肿瘤生长延迟。

[0317] 本文中的数据表明 CDK 抑制剂(如 seliciclib)能够与 ErbB 信号传导通路抑制剂协同相互作用以防止细胞生长。该数据表明是本文第一次报导了 CDK 抑制剂和 EGFR 抑制剂之间的协同作用。重要的是,seliciclib 和 AG1478 的组合在表达突变 EGFR 或野生型 EGFR 的细胞中协同作用。有意义的是,seliciclib 和埃罗替尼的组合在表达野生型 EGFR 的 H358 异种移植物模型中表现出显著的体内协同作用。在分子水平,协同似乎主要涉及加强的 ErbB 受体水平的下调和抑制下游信号传导,导致细胞周期蛋白 D1 的损失增加,所述细胞周期蛋白 D1 是 ErbB 信号传导通路的重要下游成分之一。由于 seliciclib 与 ErbB 受体家族抑制剂的组合明显在机理水平具有协同作用,因此这些试剂的组合能够有效提高 ErbB 抑制剂的临床功效,且也能扩展对于这些试剂敏感的肿瘤的数量。这些数据表明这些组合值得进一步研究。

[0318] seliciclib 或第二代 CDK 抑制剂与其它 EGFR 或 Her2 抑制剂在 H292 和 SkBr3 细胞中的体外及体内协同作用研究

[0319] H292 细胞用多种浓度的 (i) seliciclib 或第二代抑制剂 [1]–[4], (ii) ErbB 抑制剂 AG1478 埃罗替尼、吉非替尼或拉帕替尼,或 (iii) 其组合,处理 72 小时。细胞用阿尔玛蓝试剂培养,且通过 Calcusyn 分析吸光度读数得到 50%有效剂量值。重复实验至少 3 次,一式三份。结果示于下表 3 中。

[0320] 实验也用 seliciclib 或化合物 [4] 与拉帕替尼的组合在过表达 Her2 的乳腺癌细胞系 SkBr3 中进行,以评估靶向 Her2 信号传导通路的协同作用(表 4)。

[0321] 对于所有的第二代化合物,在 ED50 观察到明显的协同作用,与用 seliciclib 所观察的相符。

[0322] 这些有希望的结果继续在体内研究,使用 H292 异种移植物模型。将肿瘤细胞注射到裸小鼠中,并使其生长到大约 130mm^3 。此时,开始治疗。向各组小鼠给药溶媒、seliciclib、埃罗替尼或两个化合物,大约 2 周。监测小鼠的毒性指标,且每 2–3 天检测肿瘤,并绘于下图中。在第 1–5 和 11–15 天分别以 50mg 和 40mg 每日 2 次给药 Seliciclib 或 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [1],且埃罗替尼在第 1–7 和 11–15 天给药。在头 7 天,开始以 100mg 每天口服给药埃罗替尼,但从第 11 天开始降低到每天口服给药 50mg。

[0323] Seliciclib 和 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [1] 在这些剂量下作为单个试剂具有最小的效果(如果有的话)(图 6)。埃罗替尼在该剂量下作为单个试剂具有中等效果。埃罗替尼与 seliciclib 的组合稍好于单独用埃罗替尼,但通过组合 (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇 [1] 和埃罗替尼获得最好的效果。在第 8 天,发现两种组合与埃罗替尼单独试剂治疗相比具有显著的不同 ($p \sim 0.02$)。然而,之

后,仅 (3R)-3-{9- 异丙基 -6-[(吡啶 -3- 基甲基)-氨基]-9H- 嘌呤 -2- 基氨基}-2- 甲基 - 戊 -2- 醇 [1] 和埃罗替尼组合保持有统计学意义,在第 15 天,达到 $p = 0.007$ 。

[0324] 综上所述,该数据证明 CDK 抑制剂如 seliciclib 或第二代抑制剂如化合物 [1]-[4] 与 EGFR 抑制剂的组合在体外和体内具有协同作用。

[0325] 本发明的多种改变和变化对于本领域技术人员是明显的,没有背离本发明的范围和精神。虽然本发明已经结合具体优选的实施方案进行描述,但是应该理解所要求的本发明不应该局限于这些具体实施方案中。事实上,那些对于相关领域技术人员显而易见的对本发明所述的方式进行多种修改也包括在本发明中。

[0326] 表 1:在 SkBr3 细胞中 Seliciclib 与曲妥单抗的组合

[0327] 在 SkBr3 细胞中,使用在方法和材料中所述的方案,对 Seliciclib 和曲妥单抗的组合进行测试。使用伴行治疗方案,且得到对于 ED_{50} (在曲线上其中细胞增殖被抑制 50% 的点) 所示的组合指数值 (CI)。结果为至少 3 个独立实验的平均值。CI 值定义为:1.1-0.9 为加和作用,0.9-0.85 为轻微协同作用,0.85-0.7 为中度协同作用,0.7-0.3 为协同作用。

[0328]

细胞系	方案	在 ED_{50} 的 CI
SkBr3	seliciclib+ 曲妥单抗	0.73

[0329] 表 2:在 NSCLC 细胞系 H358 中 Seliciclib 与 EGFR 抑制剂 AG1478 的组合

[0330] 使用在方法和材料中所述的方案,在 NSCLC 细胞系 H358 中,对 Seliciclib 和 AG1478 的组合进行测试。检测伴行 (+) 和依次 (/) 治疗方案,并得到对于 ED_{50} (在曲线上其中细胞增殖被抑制 50% 的点) 所示的组合指数值。结果为至少 3 个独立实验的平均值。CI 值定义为:1.45-1.2 为中等拮抗作用,1.2-1.1 为轻微拮抗作用,1.1-0.9 为加和作用,0.9-0.85 为轻微协同作用,0.85-0.7 为中等协同作用,0.7-0.3 为协同作用。

[0331]

细胞系	方案	在 ED_{50} 的 CI
H358	seliciclib/AG1478	0.96
	AG1478/seliciclib	0.81
	seliciclib + AG1478	0.74

[0332] 表 3:在 H292 细胞中 (i) seliciclib 或第二代抑制剂 [1]-[4], 和 (ii) EGFR 抑制剂 AG1478、埃罗替尼、吉非替尼或拉帕替尼的组合。

[0333]

药物组合	AG1478	埃罗替尼	吉非替尼	拉帕替尼
Seliciclib	0.38	0.68	0.53	0.57
[1]	0.42	0.71	0.50	0.69
[2]	0.26	0.62	0.54	0.79

[3]	0.31	0.68	0.49	0.76
[4]	0.36	0.87	0.55	0.59

[0334] : (3R)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

[0335] : (3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-2-甲基-戊-2-醇。

[0336] : (2R,3S)-3-{9-异丙基-6-[(吡啶-3-基甲基)-氨基]-9H-嘌呤-2-基氨基}-戊-2-醇。

[0337] : (2R,3S)-3-(6-((4,6-二甲基吡啶-3-基甲基氨基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-基氨基)戊-2-醇。

[0338] 表4:在过表达 Her2 的乳腺癌细胞系 SkBr3 中 Seliciclib 或化合物 [4] 与拉帕替尼的组合

[0339]

药物组合	拉帕替尼
Seliciclib	0.72
[4]	0.67

[0340] 参考文献:

[0341] 1. Dancey, J. and E. A. Sausville, Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. 2 : p. 296-313.

[0342] 2. Kantarjian, H., 等人, Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. N Engl J Med, 2002. 346(9) : p. 645-652.

[0343] 3. Harari, D. and Y. Yarden, Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. Oncogene., 2000. 19(53) : p. 6102-14.

[0344] 4. Slamon, D. J., 等人, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science., 1987. 235(4785) : p. 177-82.

[0345] 5. Tortora, G. and F. Ciardiello, Anti-epidermal growth factor receptor drugs in cancer therapy. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2002. 11(6) : p. 755-768.

[0346] 6. Salomon, D. S., 等人, Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol., 1995. 19(3) : p. 183-232.

[0347] 7. Silvestri, G. A. and M. P. Rivera, Targeted Therapy for the Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer: A Review of the Epidermal Growth Factor

Receptor Antagonists

- [0348] 10. 1378/chest. 128. 6. 3975. Chest, 2005. 128(6) :p. 3975-3984.
- [0349] 8. Shapiro, G. I., Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. J Clin Oncol., 2006. 24(11) :p. 1770-83.
- [0350] 9. Senderowicz, A. M., Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. Oncogene, 2003. 22 :p. 6609-6620.
- [0351] 10. Shapiro, G. I. and J. W. Harper, Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. Journal of Clinical Investigation, 1999. 104(12) : p. 1645-1653.
- [0352] 11. MacCallum, D. E., 等人, Seliciclib (CYC202, R-Roscovitin) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II-Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. Cancer Res, 2005. 65(12) :p. 5399-5407.
- [0353] 12. Whittaker, S. R., 等人, The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitin) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. Cancer Research, 2004. 64(1) :p. 262-272.
- [0354] 13. Schubert, K. M. and V. Duronio, Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. Biochemical journal, 2001. 356 :p. 473-480.
- [0355] 14. Carlson, B., 等人, Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. Cancer Res., 1999. 59(18) :p. 4634-41.
- [0356] 15. Wu, K., 等人, Flavopiridol and trastuzumab synergistically inhibit proliferation of breast cancer cells: association with selective cooperative inhibition of cyclin D1-dependent kinase and Akt signaling pathways. Molecular Cancer Therapeutics, 2002. 1(9) :p. 695-706.
- [0357] 16. Nahta, R., 等人, Rate-limiting effects of Cyclin D1 in transformation by ErbB2 predicts synergy between herceptin and flavopiridol. Cancer Research, 2002. 62(8) :p. 2267-71.
- [0358] 17. Nahta, R., 等人, Epidermal growth factor receptor expression is a candidate target of the synergistic combination of trastuzumab and flavopiridol in breast cancer. Cancer Research, 2003. 63(13) :p. 3626-31.
- [0359] 18. Osherov, N. and A. Levitzki, Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. Eur J Biochem., 1994. 225(3) :p. 1047-53.
- [0360] 19. Chou, T. C. and P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul, 1984. 22 :p. 27-55.
- [0361] 20. Dancey, J. E. and H. X. Chen, Strategies for optimizing combinations

ofmolecularly targeted anticancer agents.2006.5(8) :p.649-659.

[0362] 21.Lee,R. J.,等人,Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway.Mol Cell Biol., 2000. 20(2) :p.672-83.

[0363] 22.Yu, Q., Y.Gaeng, and P.Sicinski, Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation.Nature,2001.411(6841) :p.1017-1021.

[0364] 23.Landis, M. W., 等人, Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis.Cancer Cell.,2006.9(1) :p.13-22.

[0365] 24.Longva, K. E.,等人, Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. Int J Cancer.,2005.116(3) :p.359-67.

[0366] 25.Ljungman, M. and M. T. Paulsen, The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. Mol Pharmacol,2001.60(4) :p.785-9.

[0367] 26.Dubois, M. F., 等人, Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole and ioquinoline sulphonamide derivatives (H-8 and H-7) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. Journal of biological chemistry, 1994. 269 :p.13331-13336.

[0368] 27.Scott, G. K., 等人, Transcriptional repression of ErbB2 by histone deacetylase inhibitors detected by a genomically integrated ErbB2 promoter-reporting cell screen. Mol Cancer Ther.,2002.1(6) :p.385-92.

[0369] 28.Levitzki, A. and A. Gazit, Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. Science., 1995. 267(5205) :p.1782-8.

[0370] 29.Shepherd, F. A.,等人, Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med,2005.353(2) :p.123-132.

[0371] 30.Thomson, S., 等人, Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. Cancer Res., 2005. 65(20) :p.9455-62.

[0372] 31.Janmaat, M. L., 等人, Response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Limited Antiproliferative Effects and Absence of Apoptosis Associated with Persistent Activity of Extracellular Signal-regulated Kinase or Akt Kinase Pathways. Clin Cancer Res,2003.9(6) :p.2316-2326.

[0373] 32.Kalish, L. H., 等人, Deregulated Cyclin D1 Expression Is Associated with Decreased Efficacy of the Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines

- [0374] 10.1158/1078-0432.CCR-04-0012. Clin Cancer Res, 2004. 10(22) : p. 7764-7774.
- [0375] 33. Petty, W. J., 等人, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition represses cyclin D1 in aerodigestive tract cancers. Clin Cancer Res., 2004. 10(22) : p. 7547-54.
- [0376] 34. McClue, S., 等人, In vitro and in vivo antitumour properties of the cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202(R-roscovitine). International journal of cancer, 2002. 102(463-468).
- [0377] 35. Chinnaiyan, P., 等人, Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib(Tarceva). Cancer Res., 2005. 65(8) : p. 3328-35.
- [0378] 36. Huang, S., 等人, Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor(EGFR) : combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. Cancer Res., 2004. 64(15) : p. 5355-62.
- [0379] 37. Zhou, Y. and M. G. Brattain, Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis. Cancer Res., 2005. 65(13) : p. 5848-56.
- [0380] 38. Yauch, R. L., 等人, Epithelial versus Mesenchymal Phenotype Determines In vitro Sensitivity and Predicts Clinical Activity of Erlotinib in Lung Cancer Patients
- [0381] 10.1158/1078-0432.CCR-05-1492. Clin Cancer Res, 2005. 11(24) : p. 8686-8698.

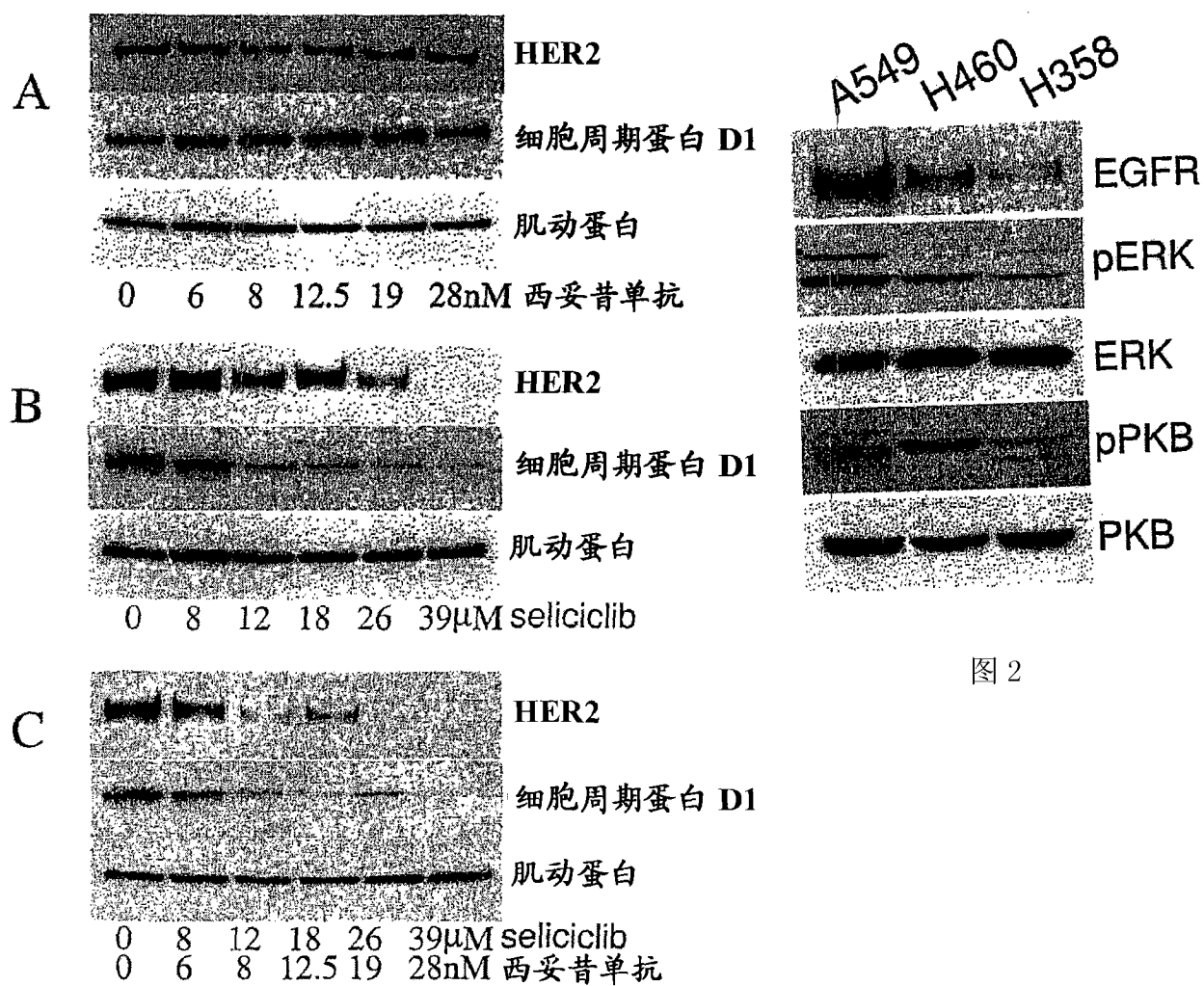


图 2

图 1

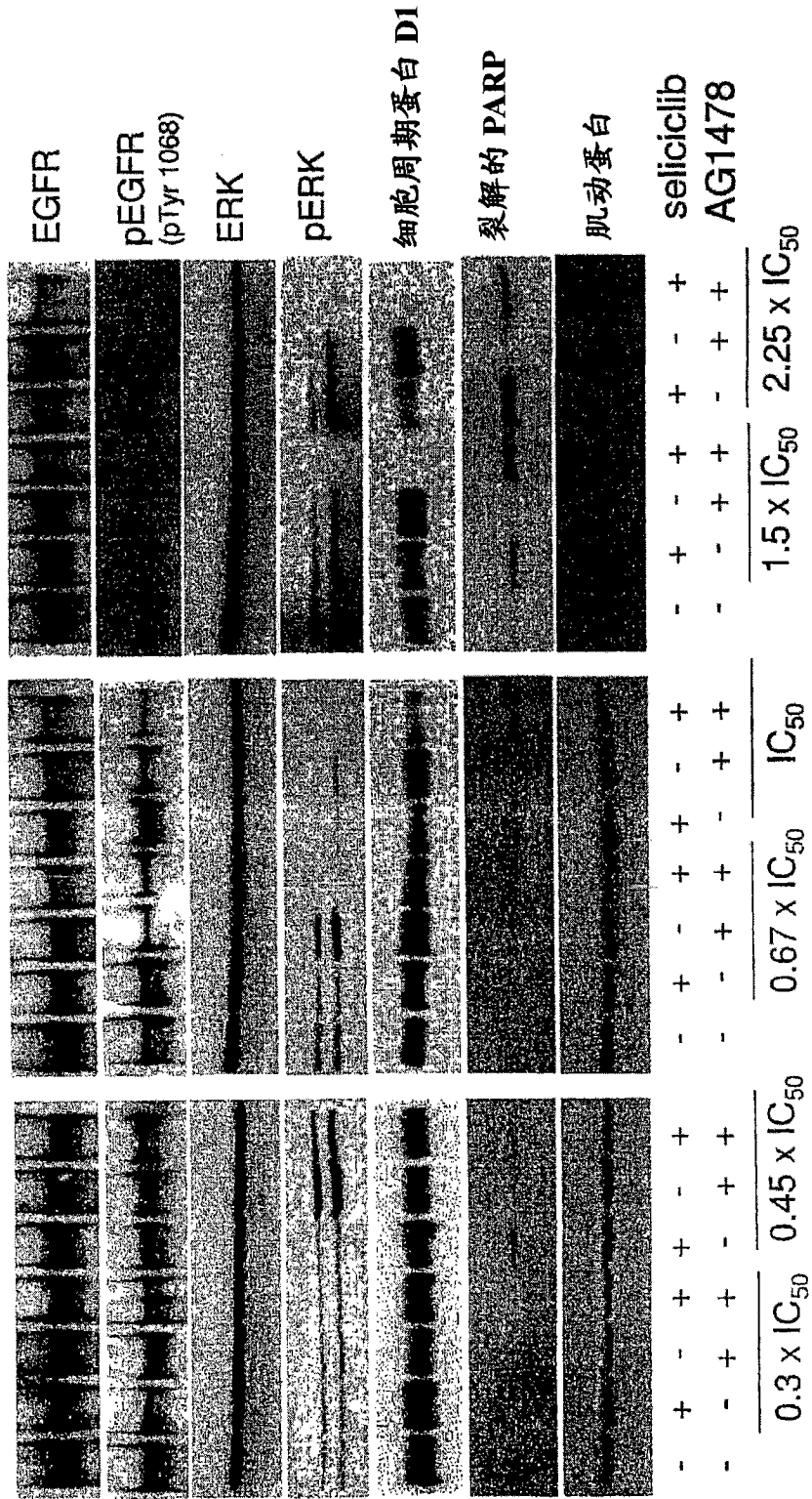


图 3

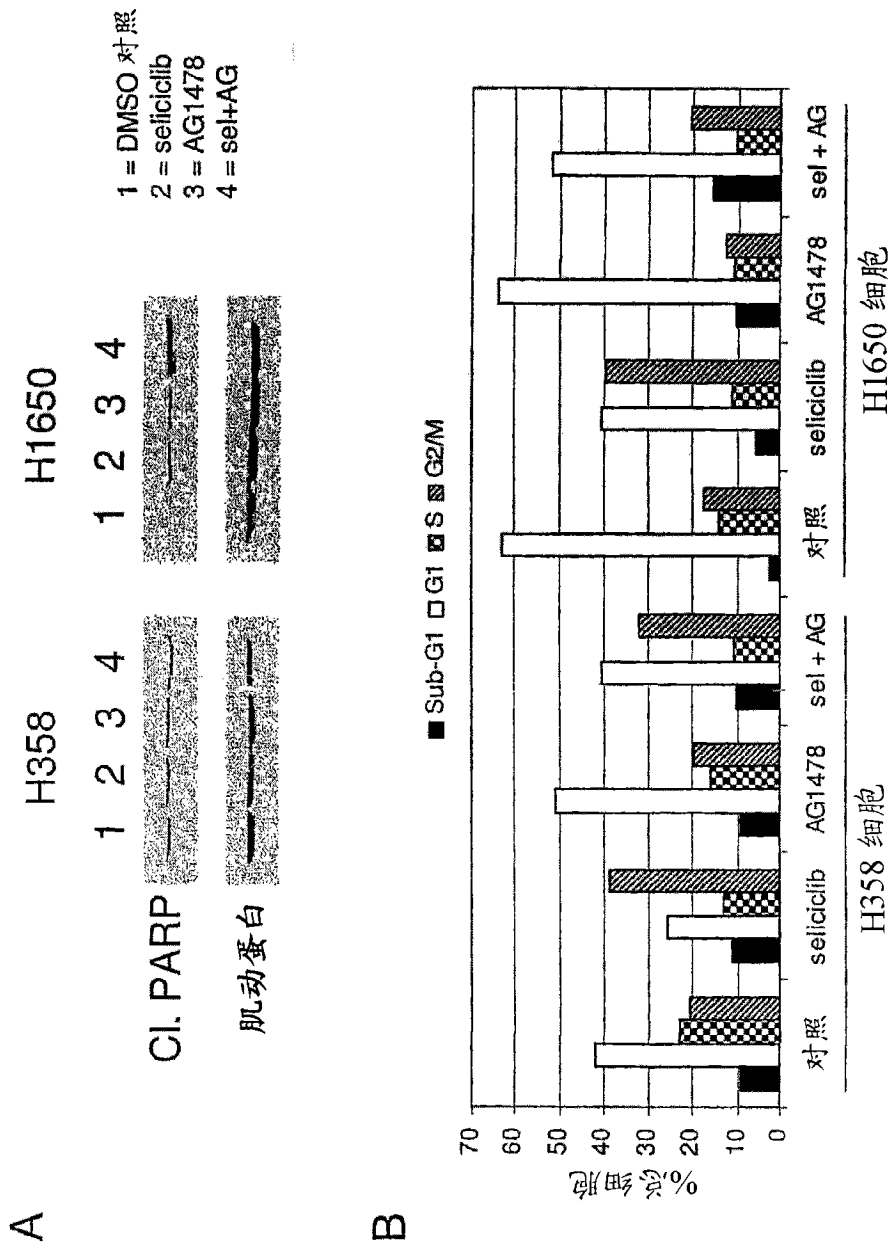


图 4

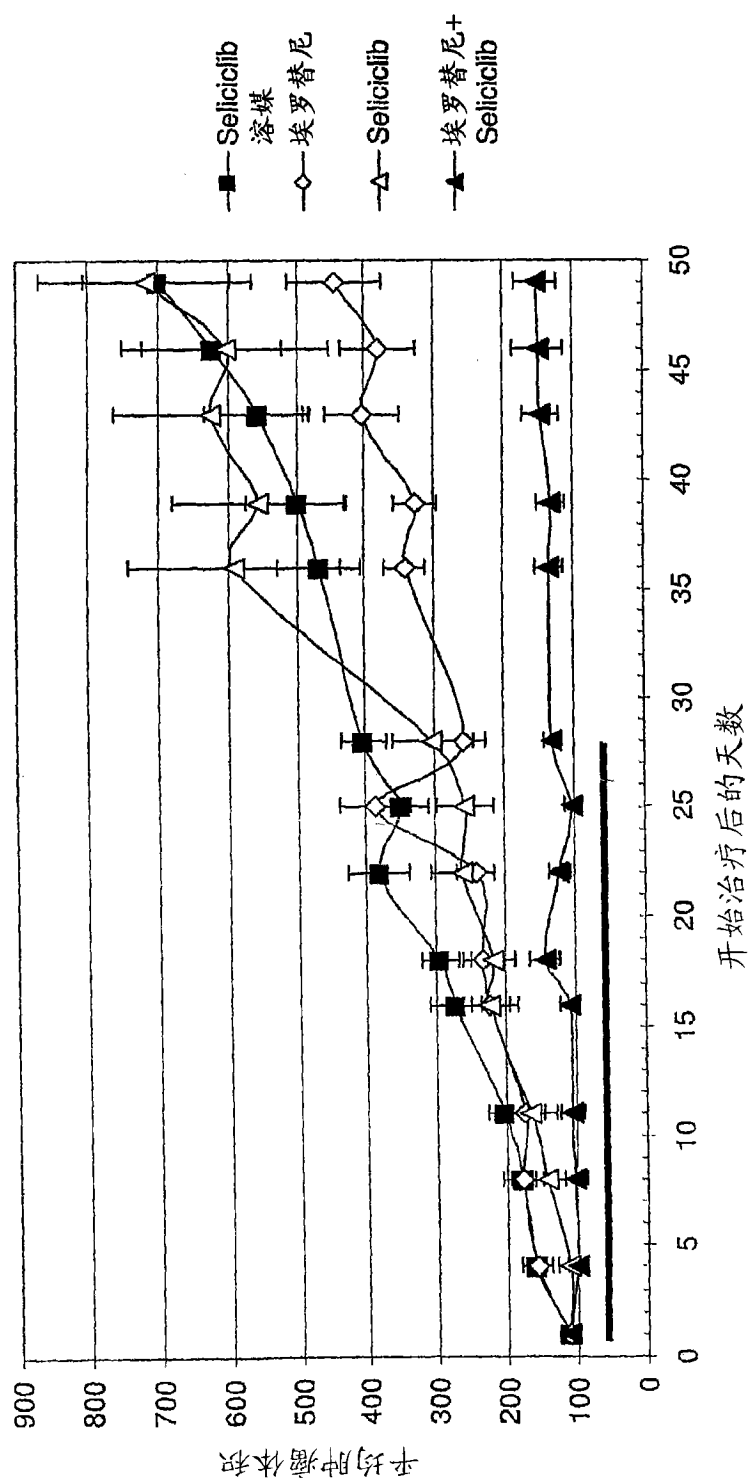


图 5

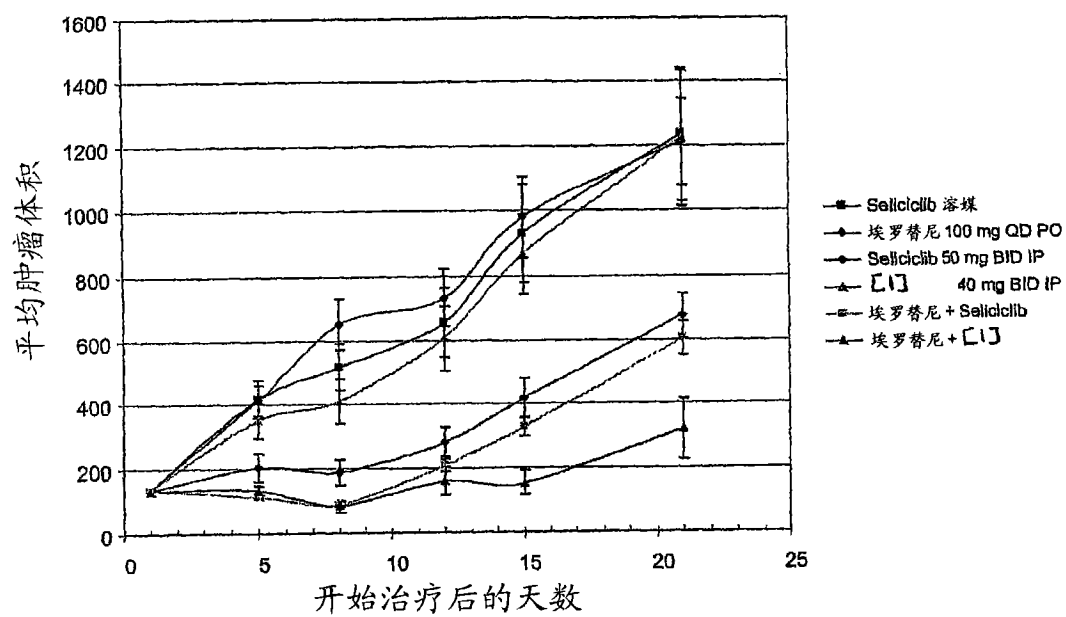


图 6