(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115066243 A
(43)申请公布日 2022.09.16

(21)申请号 202080057984.0
(22)申请日 2020.06.19
(30)优先权数据
62/864,413 2019.06.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/038772 2020.06.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/257671 EN 2020.12.24
(71)申请人 赛尔基因昆蒂赛尔研究公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 C·比奇 S·罗丝 D·R·邓希
D·E·洛佩斯·德·梅内泽斯
K·麦克白 Y·戴 J·江
M·弗拉蒂尼
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 31/437(2006.01)
A61K 31/706(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61K 31/404(2006.01)
A61L 2/00(2006.01)
A61L 2/16(2006.01)
A61K 31/513(2006.01)

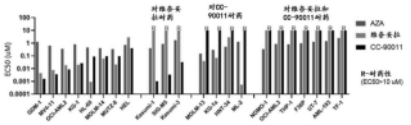
权利要求书7页 说明书48页 附图57页

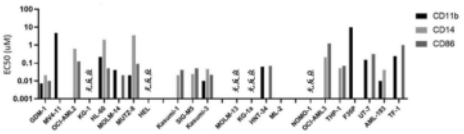
(54)发明名称

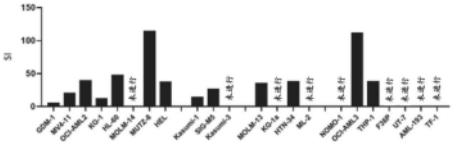
用于治疗白血病或骨髓增生异常综合征的与维奈妥拉、吉特替尼、米哚妥林或其他化合物组合的阿扎胞苷

(57)摘要

本文提供了使用5-氮杂胞苷与另外的药剂组合治疗包括AML在内的疾病和障碍的方法。







CN 115066243 A

1.一种治疗患有急性髓性白血病(AML)的人受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用以下的组合:(i)包含5-氮杂胞苷的药物组合物,(ii)至少一种另外的治疗剂,和(iii)赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者没有资格进行强化诱导化疗。

3.根据权利要求1所述的方法,其中:

(a)并行施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂;或者

(b)依序施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂,其中首先施用所述5-氮杂胞苷。

4.根据权利要求1所述的方法,其中:

(a)将所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂共同配制为单一单位剂型;或者

(b)将所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂配制为分开的剂型。

5.根据权利要求1所述的方法,其中:

(a)并行施用所述5-氮杂胞苷和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐;或者

(b)依序施用所述5-氮杂胞苷和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

6.根据权利要求1所述的方法,其中:

(a)并行施用所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐;或者

(b)依序施用所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

7.根据权利要求1所述的方法,其中按以下施用所述5-氮杂胞苷:

(a)皮下或静脉内;和/或

(b)皮下或静脉内以约75mg/m^2至约100mg/m^2的剂量;和/或

(c)皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量;和/或

(d)皮下或静脉内每日施用,持续28天周期的前七天。

8.根据权利要求1所述的方法,其中按以下施用所述5-氮杂胞苷:

(a)以约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg或600mg的剂量口服;和/或

(b)以约200mg的剂量;和/或

(c)以约300mg的剂量;和/或

(d)持续28天周期的前七天、前十四天或前二十一天;和/或

(e)向所述人受试者每天施用一次或两次;和/或

(f)以胶囊或片剂的形式。

9.根据权利要求8所述的方法,其中将所述5-氮杂胞苷以非肠溶包衣片剂的形式施用。

10.根据权利要求1所述的方法,其中按以下口服施用所述5-氮杂胞苷:

(a)以每天约200mg的剂量持续28天周期中的14天;

(b)以每天约300mg的剂量持续28天周期中的14天;

(c)以每天约200mg的剂量持续28天周期中的21天;或

(d)以每天约300mg的剂量持续28天周期中的21天。

11.根据权利要求1所述的方法,其中按以下口服施用所述5-氮杂胞苷:

(a)每日施用,持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或超过14天,任选地随后为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或超过14天的治疗给药假期;

(b)每日施用,持续14天或更长时间,任选地随后为7天或更长时间的治疗给药假期;

(c)持续21天或更长时间,任选地随后为7天或更长时间的治疗给药假期;

(d)持续14天,任选地随后为14天的治疗给药假期;

(e)持续21天或更长时间,随后为7天或更长时间的治疗给药假期;或

(f)持续14天,随后为14天的治疗给药假期。

12.根据权利要求1所述的方法,其中按以下口服施用所述5-氮杂胞苷:

(a)以每日约300mg的剂量持续14天,随后为14天的治疗给药假期;

(b)以每日约200mg的剂量持续14天,随后为14天的治疗给药假期;

(c)以每日约300mg的剂量持续21天,随后为7天的治疗给药假期;或

(d)以每日约200mg的剂量,随后为7天的治疗给药假期。

13.根据权利要求1所述的方法,其中按以下口服施用所述5-氮杂胞苷:

(a)使用如下治疗周期,所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷,持续28天周期中的7天;

(b)使用如下治疗周期,所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷,持续28天周期中的14天;或

(c)使用如下治疗周期,所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷,持续28天周期中的21天。

14.根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗剂包括吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼和/或维奈妥拉。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗剂是维奈妥拉。

16.根据权利要求15所述的方法,其中按以下施用所述维奈妥拉:

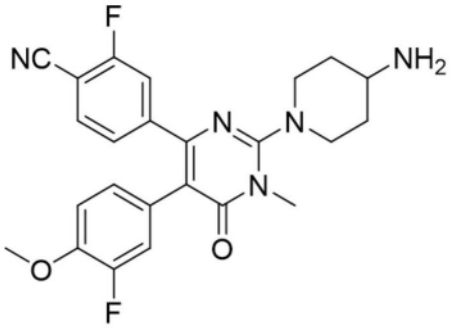
(a)口服;和/或

(b)以片剂的形式;和/或

(c)每日;和/或

(d)以约400mg的剂量。

17.根据权利要求1所述的方法,其中所述LSD-1抑制剂是具有以下结构的化合物:



或其药学上可接受的盐。

18.根据权利要求17所述的方法,其中按以下施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受

的盐：

(a)口服;和/或

(b)以片剂或胶囊的形式;和/或

(c)每周一次;和/或

(d)以约20mg、约40mg或约60mg的剂量。

19.根据权利要求1所述的方法,其中：

(a)所述AML对单独用所述5-氮杂胞苷的治疗有耐药性;和/或

(b)所述AML对单独用所述至少一种另外的治疗剂的治疗有耐药性;和/或

(c)所述AML对单独用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐的治疗有耐药性;和/或

(d)与单独的所述5-氮杂胞苷相比,所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡;和/或

(e)与单独的所述5-氮杂胞苷相比,所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％;和/或

(f)与单独的至少一种另外的治疗剂相比,所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡;和/或

(g)与单独的所述至少一种另外的治疗剂相比,所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％;和/或

(h)与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比,所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡;和/或

(i)与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比,5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％;和/或

(j)与5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比,5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡;和/或

(k)与5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比,5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％;和/或

(l)与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂相比,口服施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂增加了AML细胞死亡;和/或

(m)与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂相比,口服施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、

约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％；和/或

(n)与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡；和/或

(o)与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

20.根据权利要求1所述的方法，其中所述方法包括：

(a)每日一次向所述受试者皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前7天；

(b)在28天周期中，每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；以及

(c)在28天周期中，每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

21.根据权利要求1所述的方法，其中所述方法包括：

(a)在28天周期的第1、2、3、4、5、6和7天向所述受试者皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷；

(b)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；以及

(c)在28天周期的第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

22.根据权利要求21所述的方法，所述方法还包括：

(a)每天皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前七天；和/或

(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；和/或

(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

23.根据权利要求22所述的方法，其中所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。

24.根据权利要求1所述的方法，其中所述方法包括：

(a)每天皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前七天；和/或

(b)在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂；和/或

(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用

所述LSD-1抑制剂。

25.根据权利要求24所述的方法,其中施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

26.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括以下步骤:

(a)每日一次给所述受试者口服施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前14天;

(b)在28天周期中,每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;以及

(c)在28天周期中,每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

27.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括以下步骤:

(a)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14天给所述受试者口服施用所述5-氮杂胞苷;

(b)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;以及

(c)在28天周期的第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

28.根据权利要求27所述的方法,所述方法还包括:

(a)每天以约300mg的剂量施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或

(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或

(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。

30.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括:

(a)每天以约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或

(b)在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或

(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。

31.根据权利要求30所述的方法,其中施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

32.根据权利要求27所述的方法,所述方法还包括:

(a)每天以约200mg的剂量施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或

(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或

(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的

剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。

34.根据权利要求1所述的方法，其中所述方法包括：

(a)每天以约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前十四天；和/或

(b)在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂；和/或

(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。

35.根据权利要求34所述的方法，其中施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

36.根据权利要求1所述的方法，其中所述急性髓性白血病包括具有复发性遗传异常的急性髓性白血病、具有骨髓发育不良相关变化的急性髓性白血病、与疗法相关的髓样瘤、髓样肉瘤、与唐氏综合征相关的髓样增生、母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤和/或急性早幼粒细胞白血病。

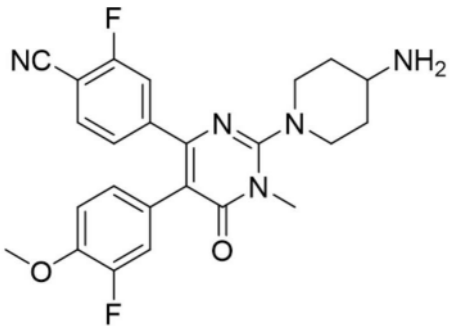
37.一种治疗患有急性髓性白血病(AML)且没有资格进行强化诱导化疗的人受试者的方法，所述方法包括向所述人受试者施用：

(i)在第一个连续28天周期中：

(a)第1至7天，皮下或静脉内每日约75mg/m^2剂量的5-氮杂胞苷；

(b)第1天约100mg、第2天约200mg、以及第3至28天每日约400mg剂量的口服维奈妥拉；以及

(c)第1、8、15和22天，包含以下化合物的苯磺酸盐的药物组合物：



；

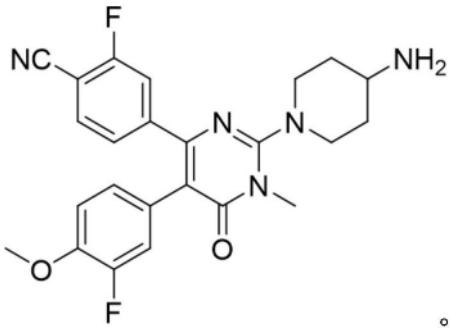
以及

(ii)在随后的28天周期中：

(d)每个后续周期的第1至7天，皮下或静脉内每日约75mg/m^2剂量的5-氮杂胞苷；

(e)每个后续周期的第1至28天，约400mg剂量的口服维奈妥拉；以及

(f)每个后续周期的第1、8、15和22天，包含以下化合物的苯磺酸盐的药物组合物：



。

38.根据权利要求37所述的方法,其中按以下施用所述药物组合物:

(a)在第一个连续28天周期和随后的28天周期中约20mg的剂量;

(b)在第一个连续28天周期和随后的28天周期中约40mg的剂量;或

(c)在第一个连续28天周期和随后的28天周期中约60mg的剂量。

39.根据权利要求38所述的方法,其中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中,以约20mg的剂量施用所述药物组合物;并且如果20mg的剂量是耐受的,则将开放第二剂量队列,在所述第二剂量队列中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。

40.根据权利要求39所述的方法,其中如果40mg的剂量是耐受的,则将开放第三剂量队列,在所述第三剂量队列中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。

用于治疗白血病或骨髓增生异常综合征的与维奈妥拉、吉特替尼、米哚妥林或其他化合物组合的阿扎胞苷

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年6月20日提交的美国临时申请62/864,413的优先权权益,将其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 提供了使用5-氮杂胞苷与一种或多种另外的治疗剂组合来治疗包括急性髓性白血病(AML)在内的疾病和障碍的方法。

背景技术

[0003] 急性髓性白血病(AML)是一种影响骨髓和血液的癌症。AML因多种名称而为人所知,这些名称包括急性髓细胞性白血病、急性成髓细胞性白血病、急性粒细胞白血病和急性非淋巴细胞白血病。急性髓细胞性白血病中的“急性”一词反映了该疾病的快速进展。它称为髓细胞性白血病,因为它会影响一组称为髓样细胞的白细胞,这些髓样细胞通常会发育成各种类型的成熟血细胞,如红细胞、白细胞和血小板。换言之,AML是髓样前体细胞系的恶性肿瘤,其特征是异常细胞的快速增殖,这些异常细胞在骨髓中积聚并干扰正常细胞的产生。

[0004] AML通常被归类为新发或继发性,当暴露于先前的细胞毒性化学疗法后或者在先前的骨髓增生异常综合征(MDS)或血液病障碍前驱征(AHD)之后出现。AML在遗传水平上的发病机制也是异质的。AML中的遗传改变包括酪氨酸激酶基因的内部串联重复、改变白血病发生相关基因功能的染色体重排、以及导致转录因子激活的突变等。对AML中遗传改变的综合分析将增强疾病分类、风险分层和预后,并最终允许更精确的治疗干预。MV4-11和MOLM-13是表达FLT3突变的AML细胞系。参见Quentmeier等人,Leukemia,17(1):120-4(2003年1月)。FLT3-ITD上调MCL-1以促进AML中干细胞的存活。参见Yoshimoto等人,Blood,114(24):5034-43(2009年12月3日)。

[0005] 目前的AML治疗策略包括用于缓解诱导的诱导化疗(IC)和旨在延长存活期的低强度疗法。缓解-诱导化疗是一种用于实现缓解或至少有效减少肿瘤负荷的细胞减灭方式。阿糖胞苷和蒽环类的组合已是诱导缓解的主流治疗方式。常见的诱导方案由以下组成:阿糖胞苷100至200mg/m^2/天持续7天,以及道诺霉素45至90mg/m^2/天持续3天,通常称为“7+3方案”。如果实现缓解,则采用另外的化疗周期或来自供体的干细胞移植(同种异体造血干细胞移植[HSCT])进行巩固。尽管IC已成为年轻合适患者的标准,但在老年人和不合适人群中仍存在争议。在已接受IC的老年患者中,结局不太理想,主要是由于治疗相关死亡率增加和不良预后因素,导致老年人群的缓解率较低。对于因年龄、体能状态和共病而被认为没有资格或不合适的患者或选择不接受IC当前化疗选择的患者的治疗选择包括低剂量阿糖胞苷、5-氮杂胞苷或地西他滨。

[0006] 尽管诱导化疗在新诊断为AML的约60％至80％的年轻成人和40％至50％的老年人

中产生了形态学完全缓解(CR),但仍有大量患者无法实现CR(即,难治性)。即使对于那些在诱导治疗后实现CR的人,很大一部分最终会复发,导致3年无复发存活率只有约29%。

[0007] 因此,需要对AML进行更有效的治疗,并且本公开文本解决了这种需要。

发明内容

[0008] 本文提供了使用5-氮杂胞苷与至少一种另外的治疗剂和赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐的组合来治疗包括AML在内的疾病和障碍的方法。

[0009] 本文的某些实施方案提供另外的治疗剂,选自吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼或维奈妥拉。

[0010] 在一方面提供了一种治疗患有急性髓性白血病(AML)的人受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用以下的组合:(i)包含5-氮杂胞苷的药物组合物,(ii)至少一种另外的治疗剂,和(iii)赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0011] 在一些实施方案中,所述受试者没有资格进行强化诱导化疗。

[0012] 在一些实施方案中,并行施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中,依序施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂,其中首先施用所述5-氮杂胞苷。

[0013] 在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂共同配制为单一单位剂型。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂配制为分开的剂型。

[0014] 在一些实施方案中,并行施用所述5-氮杂胞苷和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,依序施用所述5-氮杂胞苷和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0015] 在一些实施方案中,并行施用所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,依序施用所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0016] 在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以约75mg/m^2至约100mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以约75mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,每日皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前七天。

[0017] 在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、或600mg的剂量口服施用。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以约200mg的剂量施用。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以约300mg的剂量施用。在一些实施方案中,每日施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前七天、前十四天或前二十一天。在一些实施方案中,每天一次或两次向所述人受试者施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以胶囊或片剂的形式施用。在一些实施方案中,将所述5-氮杂胞苷以非肠溶包衣片剂的形式施用。

[0018] 在一些实施方案中，以每天约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的14天。在一些实施方案中，以每天约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的14天。在一些实施方案中，以每天约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的21天。在一些实施方案中，以每天约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的21天。

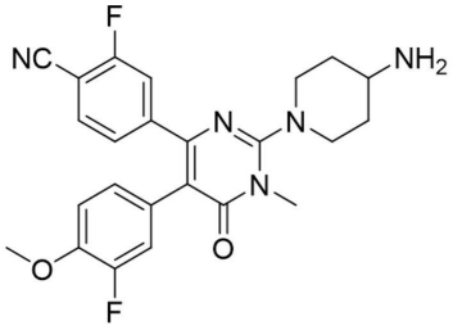
[0019] 在一些实施方案中，按以下施用所述5-氮杂胞苷：(a)每日施用，持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或超过14天，任选地随后为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或超过14天的治疗给药假期；(b)每日施用，持续14天或更长时间，任选地随后为7天或更长时间的治疗给药假期；(c)持续21天或更长时间，任选地随后为7天或更长时间的治疗给药假期；(d)持续14天，任选地随后为14天的治疗给药假期；(e)持续21天或更长时间，随后为7天或更长时间的治疗给药假期；(f)持续14天，随后为14天的治疗给药假期。在一些实施方案中，重复步骤(a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的至少一个。

[0020] 在一些实施方案中，按以下施用所述5-氮杂胞苷：(a)以每日约300mg的剂量持续14天，随后为14天的治疗给药假期；(b)以每日约200mg的剂量持续14天，随后为14天的治疗给药假期；(c)以每日约300mg的剂量持续21天，随后为7天的治疗给药假期；(d)以每日约200mg的剂量，随后为7天的治疗给药假期。在一些实施方案中，重复步骤(a)、(b)、(c)或(d)中的至少一个。

[0021] 在一些实施方案中，使用如下治疗周期口服施用5-氮杂胞苷，所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷，持续28天周期中的7天。在一些实施方案中，使用如下治疗周期口服施用5-氮杂胞苷，所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷，持续28天周期中的14天。在一些实施方案中，使用如下治疗周期口服施用5-氮杂胞苷，所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷，持续28天周期中的21天。

[0022] 在一些实施方案中，所述至少一种另外的治疗剂包括吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼和/或维奈妥拉。在一些实施方案中，所述至少一种另外的治疗剂是维奈妥拉。在一些实施方案中，口服施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中，以片剂形式施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中，每天施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中，以约400mg的剂量施用所述维奈妥拉。

[0023] 在一些实施方案中，所述LSD-1抑制剂是具有以下结构的化合物：



或其药学上可接受的盐。

[0024] 在一些实施方案中，口服施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，以片剂或胶囊的形式施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，每周一次施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，以约

20mg、约40mg或约60mg的剂量施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0025] 在一些实施方案中，所述AML对单独用所述5-氮杂胞苷的治疗有耐药性。在一些实施方案中，所述AML对单独用所述至少一种另外的治疗剂的治疗有耐药性。在一些实施方案中，所述AML对单独用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐的治疗有耐药性。

[0026] 在一些实施方案中，与单独的所述5-氮杂胞苷相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与单独的所述5-氮杂胞苷相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

[0027] 在一些实施方案中，与单独的至少一种另外的治疗剂相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与单独的所述至少一种另外的治疗剂相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

[0028] 在一些实施方案中，与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比，5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

[0029] 在一些实施方案中，与5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比，5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比，5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

[0030] 在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂相比，口服施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂相比，口服施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

[0031] 在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一

些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％。

[0032] 在一些实施方案中，所述方法包括：(a)每日一次向所述受试者皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前7天；(b)在28天周期中，每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；以及(c)在28天周期中，每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0033] 在一些实施方案中，所述方法包括：(a)在28天周期的第1、2、3、4、5、6和7天向所述受试者皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷；(b)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；以及(c)在28天周期的第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0034] 在一些实施方案中，所述方法还包括：(a)每天皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前七天；(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0035] 在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。

[0036] 在一些实施方案中，所述方法包括每天皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前七天。在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0037] 在一些实施方案中，所述方法包括：(a)每日一次给所述受试者口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前14天；(b)在28天周期中，每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；以及(c)在28天周期中，每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0038] 在一些实施方案中，所述方法包括：(a)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14天给所述受试者口服施用所述5-氮杂胞苷；(b)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂；以及(c)在28天周期的第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0039] 在一些实施方案中，所述方法还包括每天以约300mg的剂量施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前十四天。在一些实施方案中，所述方法还包括在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述方

法还包括在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0040] 在一些实施方案中，所述方法还包括每天以约200mg的剂量施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前十四天。在一些实施方案中，所述方法还包括在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述方法还包括在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0041] 在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。

[0042] 在一些实施方案中，所述方法还包括每天以约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前十四天。在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0043] 在一些实施方案中，所述方法还包括每天以约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前十四天。在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述方法包括在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0044] 在一些实施方案中，所述急性髓性白血病包括具有复发性遗传异常的急性髓性白血病、具有骨髓发育不良相关变化的急性髓性白血病、与疗法相关的髓样瘤、髓样肉瘤、与唐氏综合征相关的髓样增殖、母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤和/或急性早幼粒细胞白血病。

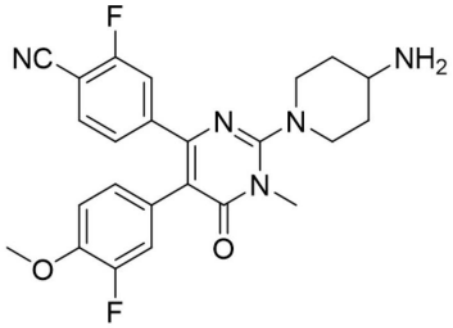
[0045] 在另一方面，提供了一种治疗患有急性髓性白血病(AML)且没有资格进行强化诱导化疗的人受试者的方法，所述方法包括向所述人受试者施用：

(i)在第一个连续28天周期中：

(a)第1至7天，皮下或静脉内每日约75mg/m^2剂量的5-氮杂胞苷；

(b)第1天约100mg、第2天约200mg、以及第3至28天每日约400mg剂量的口服维奈妥拉；以及

(c)第1、8、15和22天，包含以下化合物的苯磺酸盐的药物组合物：



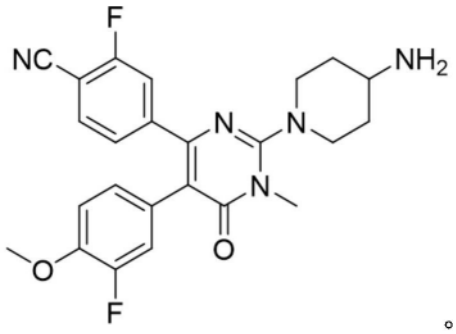
以及

(ii)在随后的28天周期中：

(d)每个后续周期的第1至7天，皮下或静脉内每日约75mg/m^2剂量的5-氮杂胞苷；

(e)每个后续周期的第1至28天，约400mg剂量的口服维奈妥拉；以及

(f)每个后续周期的第1、8、15和22天，包含以下化合物的苯磺酸盐的药物组合物：



。

[0046] 在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约20mg的剂量施用所述药物组合物。在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约60mg的剂量施用所述药物组合物。

[0047] 在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中，以约20mg的剂量施用所述药物组合物；并且如果20mg的剂量是耐受的，则将开放第二剂量队列，在所述第二剂量队列中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。

[0048] 在一些实施方案中，如果40mg的剂量是耐受的，则将开放第三剂量队列，在所述第三剂量队列中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。

[0049] 前述发明内容以及以下附图说明和具体实施方式两者都是示例性和说明性的。它们旨在提供本公开文本的进一步的细节，但不应解释为是限制性的。从本公开文本的以下具体实施方式中本领域技术人员将易于清楚其他目的、优点和新颖特征。

附图说明

[0050] 图1表示与吉特替尼组合的5-氮杂胞苷、以及与米哚妥林组合的5-氮杂胞苷的最大EC_{50}变动倍数；二者采用细胞系MV4-11和MOLM-13。示出了以下三种不同给药安排的结果：(i)首先施用5-氮杂胞苷(黑色条)；(ii)并行施用两种药剂(浅灰色条)；和(iii)第二个施用5-氮杂胞苷(中灰色条)。

[0051] 图2表示以下三种不同给药安排：(i)在FLT3抑制剂(FLT3i)之前以时间间隔首先施用5-氮杂胞苷(AZA)；(ii)并行施用两种药剂(5-氮杂胞苷和FLT3i)；和(iii)施用FLT3i之后以时间间隔第二个施用5-氮杂胞苷。FLT3抑制剂可以是任何合适的FLT3抑制剂，包括米哚妥林或吉特替尼。

[0052] 图3A-图3D表示在采用细胞系MV4-11(图3A)和MOLM-13(图3C)的情况下，与维奈妥拉组合的5-氮杂胞苷的最大EC_{50}变动倍数。示出了以下三种不同给药安排(如图例所指示)的结果：(i)首先施用5-氮杂胞苷(黑色条)；(ii)并行施用两种药剂(浅灰色条)；和(iii)第二个施用5-氮杂胞苷(中灰色条)。还示出了对于三种不同的给药安排，在采用细胞系MV4-

11(图3B)和MOLM-13(图3D)的情况下,与维奈妥拉组合施用的5-氮杂胞苷的协同指数。

[0053] 图4A-图4C表示响应面分析,其示出在MV4-11细胞中,当首先施用5-氮杂胞苷时(图4A)5-氮杂胞苷与维奈妥拉的协同效应,在同时施用的情况下协同作用相对更低(图4B),并且在首先施用维奈妥拉的情况下具有协同作用(图4C)。响应面方法(RSM)是一种熟知的统计方法,用于探索几个解释变量与一个或多个响应变量之间的关系。RSM使用一系列所设计的实验来获得最佳响应,在本申请的情形中为5-氮杂胞苷与维奈妥拉的协同效应。

[0054] 图5描绘了蛋白质印迹,其示出(a)5-氮杂胞苷和米哚妥林("aza+0.3μM Mido")和(b)5-氮杂胞苷和吉特替尼("aza+0.3μM Gilt")在MV4-11细胞系中加强MCL-1降解。

[0055] 图6描绘了蛋白质印迹,其示出5-氮杂胞苷和维奈妥拉处理降低了FLT3ITD MV4-11细胞中的MCL-1水平。

[0056] 图7A-图7C用存活百分比(y-轴)与第0至70天(x-轴)的图描绘了MOLM-13异种移植模型中5-氮杂胞苷组合的体内评估。图7A示出5-氮杂胞苷与米哚妥林的组合的结果,图7B示出与维奈妥拉组合的5-氮杂胞苷的结果,并且图7C示出5-氮杂胞苷与吉特替尼的组合的结果。图7A-图7C中所示实验的给药如下:(i)5-氮杂胞苷(低暴露,延长持续时间,LEED):1mg/kg,腹膜内(IP),每日一次,持续五天,三次(qdx 5x3);(ii)5-氮杂胞苷(高暴露,有限持续时间,HELD):3mg/kg,腹膜内(IP),每日一次,持续五天(qdx5);(iii)米哚妥林(100mg/kg,口服(PO),每日一次,持续二十一天(qdx21));(iv)吉特替尼(4mg/kg,口服(PO),每日一次,持续二十一天(qdx21));以及(v)维奈妥拉(100mg/kg,口服(PO),每日一次,持续二十一天(qdx21))。P值(相对于最佳单一药剂)*P<0.05;**P<0.001;***P<0.0001。

[0057] 图8A、图8B和图8C描绘了22种AML细胞系对作为单一药剂的5-氮杂胞苷(AZA)和维奈妥拉(分别为图8A和图8B)以及5-氮杂胞苷与维奈妥拉的组合(图8C)的敏感性。

[0058] 图9A-图9F示出用5-氮杂胞苷和维奈妥拉开始处理后七天MV4-11细胞(图9A-图9C)和MOLM-13细胞(图9D-图9F)的细胞存活率。测试了以下时间表:在第1、2和3天施用5-氮杂胞苷,随后在第4天施用维奈妥拉(首先为5-氮杂胞苷(AZA))(图9A和图9D);在第1天共施用5-氮杂胞苷和维奈妥拉,随后在第2和3天施用5-氮杂胞苷(同时)(图9B和图9E);以及在第1天施用维奈妥拉,随后在第2、3和4天施用5-氮杂胞苷(首先为维奈妥拉)(图9C和图9F)。

[0059] 图10A、图10B和图10C描绘了在表达野生型FLT3、FLT3-ITD或FLT3(D835Y)突变的一组套工程化BaF3细胞系中MCL-1表达与5-氮杂胞苷-维奈妥拉组合的协同效应程度的相关性。

[0060] 图11描绘了在一组套20种AML细胞系中如通过RNASeq测量的MCL1 RNA水平与协同指数的相关性(r^2=-0.5607,p=0.0101)。

[0061] 图12A-图12H描绘了以下四种不同AML细胞系中5-氮杂胞苷介导的MCL-1降解的程度:KG1α(图12A)、MV4-11(图12B)、THP-1(图12C)和OCI-AML2(图12D)。结果示出在采用KG1α(图12E)和MV4-11(图12F)细胞系的情况下的5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同活性(协同指数(SI)分别为70和35.5),并且在采用THP-1(图12G)和OCI-AML-2(图12H)细胞系的情况下很少或没有协同活性(SI分别为20.2和10.8)。对于KG1α(图12A)和MV4-11(图12B)细胞系,其中5-氮杂胞苷-维奈妥拉具有最大的协同效应(图12E和图12F),5-氮杂胞苷导致MCL-1降解最快,处理后6小时就开始了。相比之下,对于THP-1(图12G),其中5-氮杂胞苷-维奈妥拉仅提供小的协同活性,示出5-氮杂胞苷介导的MCL-1降解更晚,从16小时开始,到24小时时降

解不完全(图12C)。对于OCI-AML2(图12D),其中5-氮杂胞苷-维奈妥拉具有最低的协同效应(图12H),5-氮杂胞苷处理不会导致MCL-1的任何降解。

[0062] 图13A描绘了评价半胱天冬酶3降解的蛋白质印迹。用泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK处理细胞,并测量5-氮杂胞苷对MCL-1的降解程度。图13B示出5-氮杂胞苷对MCL-1降解的条形图,其中将细胞用20μM Z-VAD-FMK处理1小时,之后5-氮杂胞苷处理另外16小时。半胱天冬酶抑制部分地消除了MV4-11细胞中5-氮杂胞苷对MCL-1的降解,这表明了其他不依赖于半胱天冬酶的MCL-1降解机制。

[0063] 图14A和图14B描绘了对用PBS(媒介物)、1μM 5-氮杂胞苷处理24小时(图14A)或1μM 5-氮杂胞苷处理48小时(图14B)的MV4-11细胞进行的RNAseq的结果。图14A和图14B示出在24小时(图14A)和48小时(图14B)显著修饰基因的火山图,示出了5-氮杂胞苷在24小时诱导133种差异表达基因和在48小时诱导226种差异表达基因。在进一步分析5-氮杂胞苷诱导的差异表达基因后,鉴定出两种先前已显示可调节MCL1表达的基因:激活转录因子3(ATF3)和硬脂酰CoA去饱和酶(SCD)。5-氮杂胞苷处理后48小时,ATF3表达增加两倍。在48小时时,5-氮杂胞苷处理将脂质代谢和MCL1的调节物SCD(硬脂酰CoA去饱和酶)的表达降低2.5倍。ATF3(图14C)和SCD(图14D)表达的改变在使用实时PCR的单独实验中得到验证。ATF3表达以时间和浓度依赖性方式增加,因为0.3μM 5-氮杂胞苷处理不足以在24或48小时诱导ATF3表达(图14C)。类似地,当用3μM 5-氮杂胞苷处理时,SCD表达在24小时内迅速下降,但此时它不受低浓度5-氮杂胞苷的影响(图14D)。

[0064] 图15A-图15C示出MV4-11细胞中siRNA敲低ATF3和/或SCD基因的结果,以评估它们的协同作用。MV4-11细胞未转染或用ATF3、SCD或对照(乱序)siRNA转染。作为对照,将细胞用siRNA转染,并在转染后72小时收集RNA并用于qPCR(图15A)。在用乱序siRNA处理的细胞中,未观察到ATF3(图15B)或SCD(图15C)表达的变化。转染后,将细胞每日用不同浓度的5-氮杂胞苷处理,持续第1-3天。在第4天,向细胞给予维奈妥拉,随后在处理开始后使用CellTiter-Glo®7进行细胞活力测试。使用Combenefit和最高单用药效法(Highest Single Agent)分析来计算5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用(图15D-图15G)。图15D=未转染的细胞;图15E=乱序RNAi;图15F=ATF3敲低;和图15G=SCD敲低。

[0065] 图16A、图16B、图16C、图16D、图16E和图16F描绘了关于5-氮杂胞苷和维奈妥拉按对应于注射用5-氮杂胞苷(HELD)或口服5-氮杂胞苷的剂量和时间表是否具有体内协同活性的评价结果。两种示出5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用的细胞系MV4-11(图16A-图16C)和MOLM-13(图16D-图16F)用于在免疫缺陷动物中产生播散性AML异种移植小鼠。在体外,维奈妥拉使两种细胞系都对维奈妥拉敏感(图16A和图16D),并与5-氮杂胞苷协同作用(图16B和图16E)。为了模拟口服5-氮杂胞苷(LEED)方案,将小鼠用1mg/kg 5-氮杂胞苷处理15天(低暴露,延长持续时间)。可替代地,为了使用相同的累积剂量但采用注射用5-氮杂胞苷(HELD)方案,将小鼠用3mg/ml 5-氮杂胞苷处理5天(高暴露,有限持续时间)。

[0066] 图17A、图17B、图17C、图17D、图17E、图17F、图17G、图17H、图17I、图17J和图17K描绘了关于用5-氮杂胞苷和FLT3抑制剂共同处理是否在AML细胞中具有协同效应的研究结果。图17A-图17D示出来自采用MV4-11细胞的实验结果,并且图17E-图17H示出来自采用MOLM-13细胞的实验的结果。图17A、图17B、图17E和图17F示出用5-氮杂胞苷和米哚妥林处理的结果。图17C、图17D、图17G和图17H示出用5-氮杂胞苷和吉特替尼处理的结果。将细胞

在第1-3天用每日剂量的5-氮杂胞苷处理，并然后在第4天用FLT-3抑制剂(米哚妥林或吉特替尼)处理。在第7天收集细胞并通过CellTiter-Glo®测定评估细胞活力。米哚妥林使MV4-11对5-氮杂胞苷敏感(图17A)，并示出与5-氮杂胞苷的协同活性(图17B)。在用5-氮杂胞苷和吉特替尼(图17C和图17D)处理的MV4-11细胞中，以及在用5-氮杂胞苷和米哚妥林(图17E和图17F)或吉特替尼(图17G和图17H)处理的MOLM-13细胞中，观察到相似的作用。图17I示出对于施用媒介物、5-氮杂胞苷(LEED)、5-氮杂胞苷(HELD)、米哚妥林、5-氮杂胞苷(LEED)+米哚妥林、以及5-氮杂胞苷(HELD)+米哚妥林，MOLM-13细胞的存活百分比(y轴)在第1-70天的结果。图17J示出对于施用媒介物、5-氮杂胞苷(LEED)、5-氮杂胞苷(HELD)、米哚妥林、5-氮杂胞苷(LEED)+米哚妥林、以及5-氮杂胞苷(HELD)+米哚妥林，MV4-11细胞的存活百分比(y轴)在第1-91天的结果。图17K示出对于施用媒介物、5-氮杂胞苷(LEED)、5-氮杂胞苷(HELD)、吉特替尼、5-氮杂胞苷(LEED)+吉特替尼、以及5-氮杂胞苷(HELD)+吉特替尼，MOLM-13细胞的存活百分比(y轴)在第1-70天的结果。

[0067] 图18A-图18C描绘了各种药剂的细胞毒性的评估。在22种AML细胞系中评估了CC-90011、AZA和维奈妥拉作为单一药剂处理诱导细胞毒性的功效(图18A)。图18A示出单一药剂细胞毒性(EC50)；图18B示出CC-90011对分化标记物的诱导(EC50)；以及图18C示出CC-90011/(AZA+Ven)协同指数(SI)。四种细胞系对AZA和维奈妥拉敏感，但对CC-90011有耐药性(EC_{50}>10μM)，而7种细胞系对维奈妥拉和CC-90011二者有耐药性(图18A)。LSD抑制剂增加了几种AML细胞系和人AML异种移植模型中的分化(图18B)。为了研究CC-90011对分化标记物的诱导，在CC-90011处理后使用流式细胞术测量在22种AML细胞系中的CD11b、CD14和CD86表面标记物表达。这些细胞系中的十七种增加了这些分化标记物中的至少一种的表达，而五种细胞系中这些分化标记物中的任何一种都没有变化，这五种细胞系包括HEL、KG-1、MOLM-13、KG-1a和NOMO-1(图18B)。为了检查AZA+Ven+CC-90011三重组合是否在AML细胞系中展现出协同作用，将22种AML细胞系中的13种用不同浓度的AZA+Ven+CC-90011处理(图18C)。

[0068] 图19A-图19M描绘了使用CellTiter-Glo®分析细胞活力，以及使用Combenefit计算协同作用和使用“最高单用药效法”建模进行面映射。图19A＝MV4-11细胞；图19B＝OCI-AML2细胞；图19C＝Molm-13细胞；图19D＝KG1细胞；图19E＝HL-60细胞；图19F＝Kasumi-1细胞；图19G＝GDM-1细胞；图19H＝THP-1细胞；图19I＝MUTZ-8细胞；图19J＝HNT-34细胞；图19K＝OCI-AML3细胞；图19L＝HEL细胞；以及图19M＝SIG-M5细胞。

[0069] 图20A-图20C描绘了不同组合处理的比较。为了查明与AZA+CC-90011或Ven+CC-90011相比，AZA+Ven+CC-90011三重组合是否更有效，将三重组合与这些药剂的成对组合进行比较(图20A-图20D)。在OCI-AML-2中，AZA+CC-90011(图20A)、Ven+CC-90011(图20B)或AZA+Ven(图20C)的双重组合在OCI-AML2细胞中没有展现出协同作用。然而，当将OCI-AML2用AZA+Ven+CC-90011组合处理时(图20D)，协同作用明显增加。

[0070] 图21描绘了实施例2的研究设计。

具体实施方式

I.概述

[0071] 本公开文本涉及通过向人受试者施用以下来治疗急性髓性白血病(AML)的方法：

(i)包含5-氮杂胞苷的药物组合物;和(ii)至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂包括吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼和/或维奈妥拉。在一些实施方案中,将赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐与以下组合施用:(i)包含5-氮杂胞苷的药物组合物;和(ii)至少一种另外的治疗剂。还公开了用于治疗人受试者的AML的药物组合物,所述药物组合物包含5-氮杂胞苷与至少一种另外的治疗剂和任选的LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0072] 在另一方面,描述了一种通过向人受试者施用以下来治疗急性髓性白血病(AML)的方法:(i)包含5-氮杂胞苷的药物组合物;(ii)至少一种另外的治疗剂;和(iii)赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂包括吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼和/或维奈妥拉。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是维奈妥拉。本文还公开了用于治疗人受试者的AML的药物组合物,所述药物组合物包含5-氮杂胞苷与至少一种另外的治疗剂和赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0073] 在一些实施方案中,某些组合在治疗包括以下的特定疾病或障碍中协同作用:例如癌症类型,以及与不希望的血管生成或异常细胞增殖相关或以不希望的血管生成或异常细胞增殖为特征的某些疾病和病症。

[0074] 急性髓性白血病(AML),也称为急性髓细胞性白血病,是一种侵袭性异质性的髓性恶性肿瘤。根据美国癌症协会,AML是成人中诊断的最常见白血病类型,并占所有成人白血病病例的32%。据估计,到2020年,美国(US)将有大约19,940人被诊断出患有AML,估计有11,180名患者死于该疾病。在占患者大多数的老年人中,这种疾病特别难以治疗;因此,5年总存活率仅为大约29%。National Cancer Institute,SEER Cancer Stat Facts:Leukemia-Acute Myeloid Leukemia(AML),https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html(2020年6月10日访问)。自二十世纪七十年代以来,最初的标准疗法,对于那些足以接受它的合适的人来说,由"7+3"方案组成,其中包括7天连续输注阿糖胞苷和3天蒽环类。Rai等人Blood 1981:58:1203-1212。在接下来的35年中,已经进行了许多试图加强AML治疗的临床试验,其中护理标准几乎没有变化。然而,最近的详细说明AML分子个体发生的数据已经阐明了导致开发靶向药物疗法的努力的因果途径。E.Winer和R.Stone,Ther.Adv.Hematol.,10:PMC6624910(2019年7月)。

[0075] 长期以来一直需要本文所述的组合治疗,因为AML具有高复发率,并且此外,复发性和难治性AML是一种非常困难的疾病状态,并且可能由多种异常信号传导通路驱动,所述多种异常信号传导通路使白血病细胞具有克服任何被抑制的单一通路的优势。因此,在对抗AML的努力中,非常需要成功的组合治疗。

[0076] 在本文所述的治疗方法的一个方面,待治疗的患者是约60岁以上。在本文所述的治疗方法的另一方面,待治疗的患者是约65岁以上、约70岁以上、约75岁以上、或约80岁以上。在又另一方面,患者是复发性AML受试者。在另一方面,患者是难治性AML受试者。待治疗的受试者还可以是低于约60岁、低于约55岁、低于约50岁、低于约45岁或低于约40岁。在其他方面,待治疗的患者具有FLT3突变:FLT3-ITD或FLT3-TKD。在一些方面,待治疗的患者具有复发性AML突变。示例性AML突变包括但不限于Fms相关酪氨酸激酶3(FLT3)、Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)、神经母细胞瘤RAS病毒(V-Ras)癌基因同源物(NRAS)、原癌

基因c-Kit(KIT)、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体11型(PTPN11)、神经纤维瘤蛋白1(NF1)、DNA甲基转移酶3A(DNMT3A)、异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)、异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)、十-十一易位-2(TET2)、附加性梳样1(ASXL1)、zeste增强子同源物2(EZH2)、混合谱系白血病1/组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶2A(MLL/KMT2A)、核仁磷蛋白(NPM1)、CCAAT增强子结合蛋白α(CEBPA)、runt相关转录因子1(RUNX1)、GATA结合因子2(GATA2)、肿瘤蛋白p53(TP53)、富含丝氨酸和精氨酸剪接因子2(SRSF2)、U2小核RNA辅助因子1(U2AF1)、剪接因子3b亚基1(SF3B1)、锌指(CCCH型),RNA结合基序和富丝氨酸/精氨酸2(ZRSR2)、RAD21黏连蛋白复合物组分(RAD21)、基质抗原1(STAG1)、基质抗原2(STAG2)、染色体结构维持蛋白1A(SMC1A)和染色体结构维持蛋白3(SMC3)。

II.实验方案

[0077] 待测试的药物组合包括与伊沃德尼、依那德尼、维奈妥拉或FLT3抑制剂组合给予的5-氮杂胞苷(在具有FLT3 ITD或TKD突变的AML受试者中)。在一些实施方案中,将5-氮杂胞苷与维奈妥拉组合施用。

[0078] 异柠檬酸脱氢酶(IDH)是柠檬酸循环中的关键酶。IDH的突变形式产生高水平的2-羟基戊二酸的(R)-对映异构体(R-2-HG),并可促成肿瘤的生长。IDH1在细胞质中催化该反应,而IDH2在线粒体中催化该反应。伊沃德尼和依那德尼是IDH抑制剂。

[0079] 伊沃德尼(Tibsovo®)是IDH1的小分子抑制剂。在来自诊断为患有神经胶质瘤、急性髓性白血病(AML)、胆管癌和软骨肉瘤的患者的肿瘤中,观察到异柠檬酸脱氢酶(IDH)1和2的保守活性位点的体细胞突变。随着这些新的突变,这些酶展现出新的新形态行为,导致α-酮戊二酸还原为癌代谢物R-2-羟基戊二酸。伊沃德尼竞争性抑制α-酮戊二酸依赖性酶,最终导致表观遗传改变和造血分化受损。

[0080] 在体外研究中,伊沃德尼对α-酮戊二酸(α-KG)底物和NADPH辅因子显示出非竞争性抑制行为。这被认为是导致伊沃德尼成为mIDH1-R132H同二聚体的快速平衡抑制剂的原因。

[0081] 依那德尼(Idhifa®)是异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)基因的小分子抑制剂。如上所述,IDH的突变形式产生高水平的R-2-HG,其中IDH1在细胞质中催化这种反应,而IDH2在线粒体中催化这种反应。依那德尼通过降低线粒体中的总(R)-2-HG水平来破坏这一循环。

[0082] 维奈妥拉(Venclexta®和Venclyxto®)是一种BH3(Bcl-2同源结构域3)模拟物,因为它阻断抗凋亡B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)蛋白,导致慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞的程序性细胞死亡。Bcl-2在一些淋巴样恶性肿瘤中的过度表达有时显示与对化疗的耐药性增加有关。

[0083] FLT3抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。与其他酪氨酸激酶抑制剂一样,它们竞争激酶活性结构域中的腺苷三磷酸(ATP)结合位点,从而抑制蛋白质被磷酸化的能力,并随后降低该蛋白质的活性。FLT3突变是急性髓性白血病(AML)中最常见的发现之一。FLT3/ITD基因存在于大约30%的细胞遗传学正常的AML患者中。FLT3基因主要在人造血祖细胞和树突状细胞中表达,并在白血病细胞增殖、分化和存活中起关键作用。FLT3/ITD基因的组成型激活触发多个下游信号级联,如STAT5、RAS、MEK和PI3K/AKT通路,并最终导致抑制白血病细胞凋亡和分化,包括白血病细胞增殖的失调。评价的FLT3抑制剂包括米哚妥林(Rydapt®)和吉

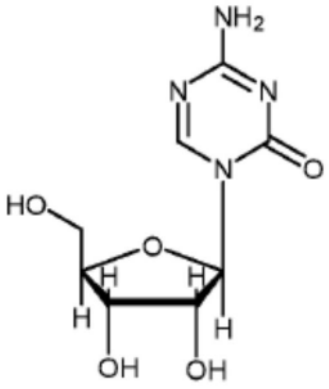
特替尼(Xospata®)。米哚妥林是星孢菌素(为一种来自细菌棍孢链霉菌(Streptomyces staurosporeus)的生物碱)的半合成衍生物,并对致癌性CD135(FMS样酪氨酸激酶3受体,FLT3)具有活性。吉特替尼也可作为AXL受体酪氨酸激酶的抑制剂。

[0084] 实施例2描述了评价与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011在没有资格进行强化诱导化疗的AML初治受试者中的安全性和耐受性的实验,所述CC-90011是4-[2-(4-氨基-哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-2-氟-苄腈的苯磺酸盐。CC-90011是一种赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂。图21示出实施例2的总体研究设计。

[0085] 实验的目标是(1)评价与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011在没有资格进行强化诱导的AML初治受试者中的安全性和耐受性;(2)评估与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011在没有资格进行强化诱导化疗的AML初治受试者中的初步功效;以及(3)通过多色流式细胞仪(MFC)和/或下一代测序(NGS)评价微小残留病(MRD)反应率和MRD转化率。另外的目标还包括:(1)通过骨髓抽吸评估和外周血涂片检查来探索MRD反应的持续时间;(2)表征CC-90011在与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合给予时的PK曲线;(3)表征PD以了解与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的机制效应;(4)探索与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的PK、PD生物标记物和/或临床结局之间的关系;(5)评价骨髓和血液中与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的功效相关的分子和/或细胞标记物;和(6)评价与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的基线后输注非依赖率。

A.5-氮杂胞苷

[0086] 5-氮杂胞苷(美国国家服务中心名称NSC-102816;CAS登记号320-67-2)也称为阿扎胞苷、AZA或4-氨基-1-B-D-呋喃核糖基-1,3,5-三嗪-2(1H)-酮。市购产品VIDAZA®(注射用5-氮杂胞苷)含有5-氮杂胞苷,用于皮下或静脉内使用。5-氮杂胞苷是胞苷的嘧啶核苷类似物。5-氮杂胞苷具有以下结构:



5-氮杂胞苷。

[0087] 在掺入复制中的DNA后,5-氮杂胞苷与DNA甲基转移酶形成共价复合物。DNA甲基转移酶负责在复制中的DNA的子DNA链中从头DNA甲基化和重产生已建立的甲基化模式。5-氮杂胞苷对DNA甲基转移酶的抑制导致DNA低甲基化,从而通过重新表达参与正常细胞周期调节、分化和死亡的基因来恢复形态发育异常的未成熟造血细胞和癌细胞的正常功能。这些胞苷类似物的细胞毒性作用导致快速分裂的细胞死亡,这样的细胞包括癌细胞,不再对正常的细胞生长控制机制作出反应。5-氮杂胞苷还掺入RNA中。5-氮杂胞苷的细胞毒性作用可

能由多种机制引起，包括抑制DNA、RNA和蛋白质合成，掺入RNA和DNA中，以及激活DNA损伤通路。

[0088] 注射用5-氮杂胞苷已在临床试验中测试，并在例如以下的治疗中示出显著的抗肿瘤活性：骨髓增生异常综合征(MDS)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)。参见例如Aparicio等人，Curr.Opin.Invest.Drugs 3(4):627-33(2002)。

[0089] 5-氮杂胞苷被批准用于皮下(SC)或静脉内(IV)施用，以治疗各种增殖性障碍。口服给药已在临床试验如NCT00761722、NCT01519011、NCT00528982和NCT01757535中进行了研究。使用5-氮杂胞苷的口服配制品和治疗方法披露于美国专利号8,846,628中，将该文献关于此类配制品和治疗方法的披露内容通过引用并入。在一些实施方案中，皮下施用5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，静脉内施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以约75mg/m^2至约100mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用，包括约75mg/m^2、约80mg/m^2、约85mg/m^2、约90mg/m^2、约95mg/m^2或约100mg/m^2皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以约75mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，每日皮下或静脉内施用5-氮杂胞苷，持续28天周期的前七天。

[0090] 在一些实施方案中，口服施用5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以胶囊或片剂的形式施用。在一些实施方案中，所述片剂是非肠溶包衣片剂。在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg、约150mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg、约200mg、约210mg、约220mg、约230mg、约240mg、约250mg、约260mg、约270mg、约280mg、约290mg、约300mg、约310mg、约320mg、约330mg、约340mg、约350mg、约360mg、约370mg、约380mg、约390mg、约400mg、约410mg、约420mg、约430mg、约440mg、约450mg、约460mg、约470mg、约480mg、约490mg、约500mg、约510mg、约520mg、约530mg、约540mg、约550mg、约560mg、约570mg、约580mg或约600mg的剂量口服施用。在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以约200mg的剂量施用。在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以约300mg的剂量施用。在一些实施方案中，每日口服施用5-氮杂胞苷，持续28天周期的前七天、前十四天或前二十一天。在一些实施方案中，每日口服施用5-氮杂胞苷，持续28天周期的前十四天。在一些实施方案中，每天一次向所述受试者施用5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，每天两次向所述受试者施用5-氮杂胞苷。

[0091] 在一些实施方案中，以每天约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的14天。在一些实施方案中，以每天约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的14天。在一些实施方案中，以每天约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的21天。在一些实施方案中，以每天约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期中的21天。

[0092] 在一些实施方案中，每日口服施用5-氮杂胞苷，持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或超过14天，任选地随后为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或超过14天的治疗给药假期。在一些实施方案中，每日口服施用5-氮杂胞苷，持续14天或更长时间，任选地随后为7天或更长时间的治疗给药假期。在一些实施方案中，口服施用5-氮杂胞苷，持续21天或更长时间，任选地随后为7天或更长时间的治疗给药假期。在一些实施方案中，口服施用5-氮杂胞苷，持续14天，任选地随后为14天的治疗给药假期。在一些实施方案中，口

服施用5-氮杂胞苷,持续21天或更长时间,随后为7天或更长时间的治疗给药假期。在一些实施方案中,口服施用5-氮杂胞苷,持续14天,随后为14天的治疗给药假期。

[0093] 在一些实施方案中,按以下口服施用5-氮杂胞苷:以每日约300mg的剂量持续14天,随后为14天的治疗给药假期。在一些实施方案中,按以下口服施用5-氮杂胞苷:以每日约200mg的剂量持续14天,随后为14天的治疗给药假期。在一些实施方案中,按以下口服施用5-氮杂胞苷:以每日约300mg的剂量持续21天,随后为7天的治疗给药假期。在一些实施方案中,按以下口服施用5-氮杂胞苷:以每日约200mg的剂量,随后为7天的治疗给药假期。

[0094] 在一些实施方案中,使用如下治疗周期口服施用5-氮杂胞苷,所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷,持续28天周期中的7天。在一些实施方案中,使用如下治疗周期口服施用5-氮杂胞苷,所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷,持续28天周期中的14天。在一些实施方案中,使用如下治疗周期口服施用5-氮杂胞苷,所述治疗周期包括每天施用5-氮杂胞苷,持续28天周期中的21天。

[0095] 5-氮杂胞苷对细胞活力和细胞的表观遗传重编程产生影响。Taylor和Jones,Cell20(1):85-93(1980)。在高剂量时,5-氮杂胞苷被认为发挥主要的急性细胞毒性作用(Khan等人,Experimental Hematology 36(2):149-57,2008),而在低剂量时,它通过分化来抑制肿瘤细胞的克隆形成(Tsai等人,Cancer Cell,21(3):430-46,2012)。

[0096] 与美国专利号8,846,628中描述的5-氮杂胞苷的口服非肠溶包衣配制品(包括CC-486)相比,作为5-氮杂胞苷的可注射配制品的市售产品VIDAZA®以相对更高的剂量和更短的持续时间施用。临床研究揭示,与VIDAZA®相比,CC-486诱导更持续性的去甲基化作用(Laille等人,PLOSOne 10(8):e0135520,2015),但CC-486的14或21天方案的累积暴露量低于施用5天的VIDAZA® (Garcia-Manero等人,Leukemia 30(4):889-96,2016)。

[0097] 为了检查随着暴露于5-氮杂胞苷持续时间变化的细胞毒性和表观遗传效应方面的差异,将注射用5-氮杂胞苷的高暴露有限持续时间(HELD)施用与口服施用的5-氮杂胞苷的低暴露延长持续时间(LEED)施用进行了比较。为了模拟非临床系统中的注射和口服氮杂胞苷给药,5-氮杂胞苷的总暴露量保持不变,而改变暴露的持续时间。在一些实施方案中,为了模拟5-氮杂胞苷的口服施用,将5-氮杂胞苷在低暴露延长持续时间(LEED)下以1mg/kg的剂量每日一次递送十五天(QDx15)。为了模拟通过静脉内或皮下施用5-氮杂胞苷的相同累积剂量,将5-氮杂胞苷在高暴露有限持续时间(HELD)下以3mg/kg的剂量每日一次施用5天(QDx5)。

[0098] 在一些实施方案中,与其他药剂组合的5-氮杂胞苷的LEED施用提供了持续的药效学作用和/或改善的患者依从性。持续的药效学作用可包括由5-氮杂胞苷引发的任何变化,包括例如MCL-1降解和/或ATF3或SCD基因表达的变化。在一些实施方案中,与和其他药剂组合的5-氮杂胞苷的HELD相比,与其他药剂组合的5-氮杂胞苷的LEED提供了持续直到治疗周期(即28天周期)结束的整体DNA甲基化降低(例如,由于增加的核酸掺入)。在一些实施方案中,与其他药剂组合的5-氮杂胞苷的LEED提供了分化标记物上调(其在28天周期的第21天达到峰值),并且具有细胞死亡(其表征为直到28天周期的第28天逐渐丧失活力)。在一些实施方案中,与其他药剂组合的5-氮杂胞苷的HELD提供了分化标记物上调(其在28天周期的第7天达到峰值),并且具有细胞死亡(其表征为在28天周期中,在第14天达到峰值,随后恢复)。在一些实施方案中,与和其他药剂组合的5-氮杂胞苷的HELD相比,与其他药剂组合的

5-氮杂胞苷的LEED提供了髓样分化标记物(包括但不限于CD11b、CD14、CD86、HLA-DR和MERTK)的更高表达,这在整个治疗周期(即28天周期)中持续如此。在一些实施方案中,与和其他药剂组合的5-氮杂胞苷的HELD相比,与其他药剂组合的5-氮杂胞苷的LEED提供更显著的表观遗传变化和更广泛的分化。

III.药物配制品

A.5-氮杂胞苷

[0099] 在某些实施方案中,本文的方法包括施用本文提供的特定口服配制品,以例如克服与IV或SC施用5-氮杂胞苷相关的限制。例如,IV或SC施用可限制长时间段定期递送5-氮杂胞苷的能力,从而有可能限制5-氮杂胞苷的最大功效。由于难以遵守长期IV或SC给药时间表的严格要求,长期SC或IV暴露于5-氮杂胞苷可能导致受试者(例如,患有多发性血细胞减少症的受试者)中止该方案。参见例如Lyons等人,Hematologic Response to Three Alternative Dosing Schedules of Azacitidine in Patients With Myelodysplastic Syndromes,J.Clin.Oncol.(2009)(DOI:10.1200/JCO.2008.17.1058)。因此,在某些实施方案中,本文提供的方法包括施用本文提供的口服配制品以克服与SC或IV 5-氮杂胞苷施用相关的这些或其他限制。

[0100] 本文的某些实施方案提供了包括施用本文提供的5-氮杂胞苷的口服配制品的方法,所述方法包括与IV或SC施用相比,在更长的时间段内以更低的剂量递送5-氮杂胞苷(例如阿扎胞苷)。在特定实施方案中,此类方法包括通过施用本文提供的口服配制品来管理剂量相关血细胞减少症(包括例如与氮杂胞苷相关的剂量相关血细胞减少症)。在某些实施方案中,本文提供的方法包括施用本文提供的口服配制品以实现与包含5-氮杂胞苷的IV或SC剂量相比改善的安全性特征。

[0101] 本文的实施方案涵盖包含5-氮杂胞苷和渗透增强剂(或没有渗透增强剂)的药物配制品和组合物,其中所述配制品和组合物被制备用于口服施用。特定实施方案涉及使用5-氮杂胞苷以用于制备用于治疗特定医学适应症的药物配制品和组合物,如本文所提供的。本文提供的包含5-氮杂胞苷的药物配制品和组合物旨在用于在有需要的受试者中口服递送5-氮杂胞苷。口服递送形式包括但不限于片剂、胶囊、囊片、溶液、混悬剂和糖浆。

[0102] 本文的特定实施方案提供呈片剂或胶囊的固体口服剂型。在某些实施方案中,所述配制品是包含5-氮杂胞苷的片剂。在某些实施方案中,所述配制品是包含5-氮杂胞苷的胶囊。在某些实施方案中,本文提供的片剂或胶囊包含一种或多种赋形剂或不需要一种或多种赋形剂,例如助流剂、稀释剂、润滑剂、着色剂、崩解剂、成粒剂、粘合剂、聚合物和包衣剂。在某些实施方案中,本文的实施方案涵盖5-氮杂胞苷在制备用于治疗与异常细胞增殖相关的疾病的药物组合物中的用途,其中所述组合物被制备用于口服施用。

B.至少一种另外的治疗剂

[0103] 在特定实施方案中,本文提供的5-氮杂胞苷组合物还包含一种、两种、三种或更多种其他药理活性物质(本文也称为“另外的治疗剂”、“第二活性剂”等)。在一些实施方案中,5-氮杂胞苷组合物是口服配制品。在一些实施方案中,具有至少一种另外的治疗剂的5-氮杂胞苷口服组合物用于治疗本文公开的任何疾病或障碍。在特定实施方案中,本文提供的口服配制品包含治疗有效量的一种或多种另外的治疗剂。

[0104] 另外的治疗剂的例子包括但不限于吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊

沃德尼和维奈妥拉。

[0105] 另外的治疗剂的例子包括但不限于FLT3抑制剂、IDH2抑制剂、IDH1抑制剂和BCL2抑制剂。第一代FLT3抑制剂的例子包括但不限于米哚妥林、来他替尼、舒尼替尼(Sutent®)和索拉非尼(Nexavar®)。第二代FLT3抑制剂的例子包括但不限于奎扎替尼、克瑞拉尼、培达替尼(PLX3397)和吉特替尼(ASP2215),它们比第一代抑制剂更有效且更具选择性。包括IDH1和/或IDH2抑制剂在内的IDH抑制剂的例子包括但不限于伊沃德尼和依那德尼。BCL2抑制剂的例子包括但不限于维奈妥拉(ABT-199)、那维妥拉(ABT-263)、ABT-737(4-[4-[[2-(4-氯苯基)苯基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[4-[[(2R)-4-(二甲基氨基)-1-苯基硫烷基丁-2-基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基苯甲酰胺)、甲磺酸奥巴拉克(GX15-070)、TW-37(N-[4-(2-叔丁基苯基)磺酰基苯基]-2,3,4-三羟基-5-[(2-丙-2-基苯基)甲基]苯甲酰胺、AT101((R)-(-)-棉酚)、HA14-1(2-氨基-6-溴-α-氰基-3-(乙氧基羰基)-4H-1-苯并吡喃-4-乙酸乙酯)和sabutoclax。

[0106] 另外的治疗剂的例子包括但不限于吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼和维奈妥拉。示例性的另外的治疗剂是维奈妥拉。

C.作为至少一种另外的治疗剂的维奈妥拉

[0107] 在一些实施方案中,将包含5-氮杂胞苷的口服药物组合物与作为另外的治疗剂的维奈妥拉一起使用。在一些实施方案中,将5-氮杂胞苷口服组合物与维奈妥拉一起用于治疗本文公开的任何疾病或障碍。

[0108] 维奈妥拉是BCL-2的小分子抑制剂,并以片剂形式的VENCLEXTA™销售。维奈妥拉被指示:(i)用于治疗患有慢性淋巴细胞白血病(CLL)或小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的成年患者;(ii)与注射用5-氮杂胞苷或地西他滨或低剂量阿糖胞苷组合用于治疗75岁以上成人或患有排除使用强化诱导化疗的共病的新诊断急性髓性白血病(AML)。

[0109] 根据在几天或几周的特定时间段内的每周斜升时间表开始用维奈妥拉的疗法,直至推荐的每日剂量。对于治疗CLL和SLL,按以下施用维奈妥拉:第1周以20mg的每日剂量,第2周以50mg的每日剂量,第3周以100mg的每日剂量,第4周以200mg的每日剂量,以及第5周及之后以400mg的每日剂量。对于以与另一种药剂(如注射用5-氮杂胞苷)组合的疗法治疗AML,按以下施用维奈妥拉:第1天以100mg的日剂量,第2天以200mg的日剂量,以及第3天及之后以400mg的日剂量。以28天周期施用注射用5-氮杂胞苷,从维奈妥拉治疗的第1天开始,剂量为75mg/m^2,IV或皮下,在每个周期的第1-7天进行。

[0110] 在一些实施方案中,口服施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中,以片剂形式施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中,每天施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中,以约20mg至约400mg,如约20mg、约50mg、约100mg、约200mg或约400mg的剂量施用维奈妥拉。在一些实施方案中,以约400mg的剂量施用所述维奈妥拉。

[0111] 在一些实施方案中,并行施用5-氮杂胞苷和维奈妥拉。在一些实施方案中,依序施用5-氮杂胞苷和维奈妥拉。在其中依序施用5-氮杂胞苷和维奈妥拉的一些实施方案中,首先施用5-氮杂胞苷。在一些实施方案中,作为分开的剂型施用5-氮杂胞苷和维奈妥拉,如适合静脉内或皮下使用的注射剂和/或用于口服使用的片剂或胶囊。在一些实施方案中,将5-氮杂胞苷和维奈妥拉共同配制为单一剂型,如适合静脉内或皮下使用的注射剂或用于口服使用的片剂或胶囊。

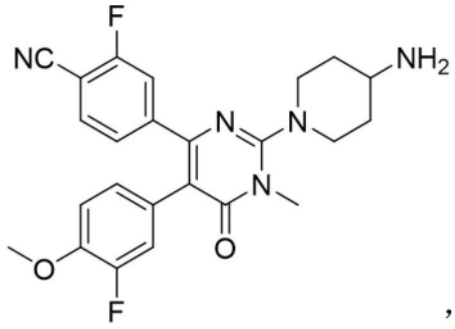
D.LSD-1抑制剂

[0112] 最近的研究显示,白血病干细胞(LSC)的存活可能在疾病复发和最终疗法耐药性的机制中起主要作用。目前的治疗可能会留下允许通过癌前或恶性克隆进行肿瘤再生的LSC。因此,根除LSC可导致增加的长期存活。此外,已经显示赖氨酸特异性去甲基化酶1A(LSD1)活性在LSC室中存在并升高,这表明LSD1活性的抑制可能会根除LSC室。

[0113] 无资格进行强化诱导化疗的患者的治疗选项有限,并且与足够适合标准强化诱导化疗的患者相比,无资格进行强化诱导化疗的患者的存活结局更差。尽管与之前的方案相比,使用氮杂胞苷和其他另外的治疗剂(如维奈妥拉)的组合方案在该患者群体中的反应率有所提高,但添加赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂可选择性抑制在AML的发病机制以及AML干细胞群体的增殖中涉及的LSD1的异常表达,并产生更深入且更持久的反应。

[0114] 因此,本公开文本还涉及使用(i)包含5-氮杂胞苷的组合物以及赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂和至少一种另外的治疗剂(如维奈妥拉)治疗包括AML在内的疾病和障碍的方法。在一些实施方案中,治疗的受试者是≥75岁和/或≥60岁至74岁且患有排除使用强化诱导化疗的共病的AML初治受试者。

[0115] 在本文所述的包括使用LSD-1抑制剂的实施方案中,LSD-1抑制剂是具有以下结构的化合物:



,

或其药学上可接受的盐。上述化合物的化学名称为4-[2-(4-氨基-哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-2-氟-苄腈,化学式为$C_{23}H_{21}F_2N_5O_2$,分子量为437.44,并且CAS号为1821307-10-1。4-[2-(4-氨基-哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-2-氟-苄腈描述于美国专利号US 9,255,097中。

[0116] 在本文所述的任何实施方案中,LSD-1抑制剂可以口服施用。口服剂量可以通常在约1.0mg至约1000mg的范围内,每天一次至四次或更多次。在一些实施方案中,以约20mg、约40mg或约60mg的剂量施用LSD-1抑制剂。在本文所述的任何实施方案中,可以以片剂或胶囊的形式施用LSD-1抑制剂。在本文所述的任何实施方案中,可以每周施用一次LSD-1抑制剂。在本文所述的任何实施方案中,可以以约60mg的剂量施用LSD-1抑制剂。

IV.治疗方法

[0117] 如本文所述,本文的某些实施方案提供了治疗患有急性髓性白血病(AML)的人受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用以下的组合:(i)包含5-氮杂胞苷的药物组合物,(ii)至少一种另外的治疗剂,和(iii)赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0118] 需要治疗的受试者可以是具有增加的AML风险的患者群体的成员。例如,几种遗传

性遗传障碍和免疫缺陷状态与增加的AML风险相关。这些包括具有DNA稳定性缺陷导致随机染色体断裂的障碍，如布卢姆综合征、范科尼贫血、李法美尼家族、共济失调-毛细血管扩张症和X连锁无丙种球蛋白血症。

[0119] 在一些实施方案中，本文所述的方法可用于治疗特定类型的AML。说明性的AML类型包括但不限于具有复发性遗传异常的AML、具有骨髓发育不良相关变化的AML、与疗法相关的髓样瘤、髓样肉瘤、与唐氏综合征相关的髓样增殖、母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤和/或急性早幼粒细胞白血病。

[0120] 在一些实施方案中，AML的特征在于具有以下突变中的任何一种：Fms相关酪氨酸激酶3(FLT3)、Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)、神经母细胞瘤RAS病毒(V-Ras)癌基因同源物(NRAS)、原癌基因c-Kit(KIT)、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体11型(PTPN11)、神经纤维瘤蛋白1(NF1)、DNA甲基转移酶3A(DNMT3A)、异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)、异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)、十-十一易位-2(TET2)、附加性梳样1(ASXL1)、zeste增强子同源物2(EZH2)、混合谱系白血病1/组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶2A(MLL/KMT2A)、核仁磷蛋白(NPM1)、CCAAT增强子结合蛋白α(CEBPA)、runt相关转录因子1(RUNX1)、GATA结合因子2(GATA2)、肿瘤蛋白p53(TP53)、富含丝氨酸和精氨酸剪接因子2(SRSF2)、U2小核RNA辅助因子1(U2AF1)、剪接因子3b亚基1(SF3B1)、锌指(CCCH型)，RNA结合基序和富丝氨酸/精氨酸2(ZRSR2)、RAD21黏连蛋白复合物组分(RAD21)、基质抗原1(STAG1)、基质抗原2(STAG2)、染色体结构维持蛋白1A(SMC1A)和染色体结构维持蛋白3(SMC3)。

[0121] 在一些实施方案中，AML的特征在于具有FLT3-ITD突变。在一些实施方案中，所述AML对单独用所述至少一种另外的治疗剂的治疗有耐药性。在一些实施方案中，在所述至少一种另外的治疗剂之前施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，AML对用FLT3抑制剂的治疗有反应。在一些实施方案中，AML的特征在于具有MCL-1的过表达。

[0122] 在一些实施方案中，5-氮杂胞苷通过下调MCL-1的表达来将癌细胞准备好以用于由所述至少一种另外的治疗剂介导的细胞凋亡。在一些实施方案中，下调MCL-1的表达是由半胱天冬酶依赖性和非依赖性机制介导的。在一些实施方案中，所述5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂加强了MCL-1降解。

V.使用5-氮杂胞苷、另外的治疗剂和LSD-1抑制剂的方法

[0123] 在一方面提供了一种治疗包括AML在内的疾病和障碍的方法，所述方法使用与赖氨酸特异性去甲基化酶-1(LSD-1)抑制剂或其药学上可接受的盐、以及至少一种另外的治疗剂(如维奈妥拉)组合的包含5-氮杂胞苷的药物组合物。在一些实施方案中，所述受试者没有资格进行强化诱导化疗。

[0124] 在一些实施方案中，并行施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，依序施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂共同配制为单一剂型。在一些实施方案中，并行施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，依序施用所述5-氮杂胞苷和所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，并行施用所述至少一种治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，依序施用所述至少一种治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，并行施用所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的

盐。在一些实施方案中，依序施用所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0125] 在一些实施方案中，皮下施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，静脉内施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷以约75mg/m^2至约100mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷以约75mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，每日皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷，持续28天周期的前7天。

[0126] 在一些实施方案中，口服施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷以约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、或600mg的剂量口服施用。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷以约200mg的剂量施用。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷以约300mg的剂量施用。在一些实施方案中，口服施用5-氮杂胞苷，持续一个周期的前七天、前十四天或前二十一天。在一些实施方案中，每天一次或两次向所述受试者施用所述5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，将所述5-氮杂胞苷以胶囊或片剂的形式施用。在一些实施方案中，所述片剂是非肠溶包衣片剂。

[0127] 在一些实施方案中，所述另外的治疗剂选自吉特替尼、米哚妥林、奎扎替尼、依那德尼、伊沃德尼或维奈妥拉。在一些实施方案中，所述另外的治疗剂是维奈妥拉。

[0128] 在一些实施方案中，口服施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中，以片剂形式施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中，每天施用所述维奈妥拉。在一些实施方案中，以约400mg的剂量施用所述维奈妥拉。

[0129] 在一些实施方案中，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂和所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐提供了在治疗本文公开的疾病中的协同效应。协同作用可以通过使用最高单用药效法(HSA)模型和Combenefit包测量(Di Veroli等人，Bioinformatics.2016年9月15日;32(18):2866-8。)阴性细胞系用作对照以确定EC_{50}是否发生变动和/或最大抑制作用是否加强。换言之，来自阴性对照细胞系的EC_{50}和最大抑制作用提供了基线效力结果，并且将药物组合的EC_{50}和最大抑制作用的变动与来自阴性对照细胞系的结果进行比较以确定药物组合是否提供了协同效应。具体而言，以下步骤用于确定两种药物之间的协同相互作用：(a)证明与来自阴性对照细胞系的结果相比，由EC_{50}确定的剂量反应曲线的变动(即效力变动)和/或最大抑制作用的加强；(b)响应面分析，以可视化两种药物之间在一系列浓度上的协同作用、加和作用或拮抗作用；以及(c)分析组合指数得分(使用软件应用程序Combenefit得出)。协同指数变得显著的极限(使得药物组合展现出协同效应)是根据经验确定的，并且是基于数据的差异性和以EC_{50}计的效力变动的确认。换言之，如果没有剂量反应曲线的明显变动，组合指数不会构成协同相互作用。如本文所用，在一些实施方案中，协同效应被定义为具有约大于约4的EC_{50}变动和/或如通过HSA模型和Combenefit包测量的大于约20的协同指数。

[0130] 在一些实施方案中，AML的特征在于具有FLT3-ITD突变。在一些实施方案中，所述AML对单独用所述至少一种另外的治疗剂的治疗有耐药性。在一些实施方案中，所述AML对单独用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐的治疗有耐药性。

[0131] 在一些实施方案中，与单独的所述5-氮杂胞苷相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些

实施方案中，与单独的所述5-氮杂胞苷相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0132] 在一些实施方案中，与单独的5-氮杂胞苷相比，5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与单独的所述5-氮杂胞苷相比，所述5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0133] 在一些实施方案中，与单独的至少一种另外的治疗剂相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与单独的所述至少一种另外的治疗剂相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0134] 在一些实施方案中，与单独的维奈妥拉相比，5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与单独的维奈妥拉相比，所述5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0135] 在一些实施方案中，与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比，所述5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比，5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0136] 在一些实施方案中，与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比，所述5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐相比，5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0137] 在一些实施方案中，与5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比，5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与5-

氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比，5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0138] 在一些实施方案中，与5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比，5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐中的任两者的组合相比，5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0139] 在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂相比，口服施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂相比，口服施用的5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0140] 在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和维奈妥拉相比，口服施用的5-氮杂胞苷和维奈妥拉增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷和维奈妥拉相比，口服施用的5-氮杂胞苷和维奈妥拉使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0141] 在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、所述至少一种另外的治疗剂、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的技术所测量。

[0142] 在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合增加了AML细胞死亡。在一些实施方案中，与静脉内或皮下施用的5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合相比，口服施用的5-氮杂胞苷、维奈妥拉、LSD-1抑制剂及其药学上可接受的盐的组合使AML细胞死亡增加了约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约100％，如通过任何临床公认的

技术所测量。

[0143] 在一些实施方案中，将治疗方法施用一个或多个周期，包括一个、两个、三个、四个和更多个周期。在一些实施方案中，一个周期是约7天、约14天、约21天或约28天的时间段。在一些实施方案中，一个周期是约28天的时间段。

[0144] 在一些实施方案中，每日一次向所述受试者皮下或静脉内施用5-氮杂胞苷，持续约28天周期的约前7天。在一些实施方案中，在约28天周期的第1-7天，每日一次向所述受试者皮下或静脉内施用5-氮杂胞苷。在一些实施方案中，在约28天周期的连续七天，每日一次向所述受试者皮下或静脉内施用5-氮杂胞苷。

[0145] 在一些实施方案中，在约28天周期中约每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，在约28天周期的约第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，在约28天周期的约第7、14、21和28天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0146] 在一些实施方案中，在约28天周期中，每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，在约28天周期中的约第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天，向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述另外的治疗剂是维奈妥拉。

[0147] 在一些实施方案中，将5-氮杂胞苷以约75mg/m^2至约100mg/m^2，包括约75mg/m^2、约80mg/m^2、约85mg/m^2、约90mg/m^2、约95mg/m^2或约100mg/m^2的剂量施用，优选皮下或静脉内，每日一次，持续约28天周期的前七天。在一些实施方案中，在约28天周期的连续7天，将5-氮杂胞苷以约75mg/m^2至约100mg/m^2，包括约75mg/m^2、约80mg/m^2、约85mg/m^2、约90mg/m^2、约95mg/m^2或约100mg/m^2的剂量施用，优选皮下或静脉内，每日一次。

[0148] 在一些实施方案中，在约28天周期中，每周一次以约20mg至60mg，包括约20mg、约30mg、约40mg、约50mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，在约28天周期的第1、8、15和22天，每天一次以约20mg至60mg，包括约20mg、约30mg、约40mg、约50mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中，在约28天周期的第7、14、21和28天，每天一次以约20mg至60mg，包括约20mg、约30mg、约40mg、约50mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0149] 在一些实施方案中，在约28天周期中，每日一次以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂(例如，维奈妥拉)。在一些实施方案中，在约28天周期中的约第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天，每日一次以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂(例如，维奈妥拉)。

[0150] 在一些实施方案中，在约28天周期中，每日一次以约100mg至约400mg，包括约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、或约400mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂(例如，维奈妥拉)。在一些实施方案中，在约28天周期中的约第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天，每日一次以约100mg至约400mg，包括约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg和约400mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂(例如，维奈妥拉)。在一些实施方案中，在约28天周期中，每日一次以约400mg的剂量向所述受试者施用所述至

少一种另外的治疗剂(例如,维奈妥拉)。在一些实施方案中,在约28天周期中的约第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天,每日一次以约400mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂(例如,维奈妥拉)。

[0151] 在一些实施方案中,在约28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及约第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂(例如,维奈妥拉)。

[0152] 在一些实施方案中,所述方法包括:每日一次向所述受试者皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前7天;在28天周期中,每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;以及在28天周期中,每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0153] 在一些实施方案中,所述方法包括:(a)在28天周期的第1、2、3、4、5、6和7天向所述受试者皮下或静脉内施用所述5-氮杂胞苷;(b)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;以及(c)在28天周期的第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0154] 在一些实施方案中,所述方法还包括:(a)每天皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前七天;和/或(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0155] 在一些实施方案中,所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中,施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0156] 在一些实施方案中,所述方法包括:(a)每天皮下或静脉内以约75mg/m^2的剂量施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前七天;和/或(b)在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中,施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0157] 在一些实施方案中,方法包括:(a)每日一次给所述受试者口服施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前14天;(b)在28天周期中,每日一次向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;以及(c)在28天周期中,每周一次向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0158] 在一些实施方案中,所述方法包括:(a)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14天给所述受试者口服施用所述5-氮杂胞苷;(b)在28天周期的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27和28天向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;以及(c)在28天周期的第1、8、15和22天向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0159] 在一些实施方案中,所述方法还包括:(a)每天以约300mg的剂量施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述

受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

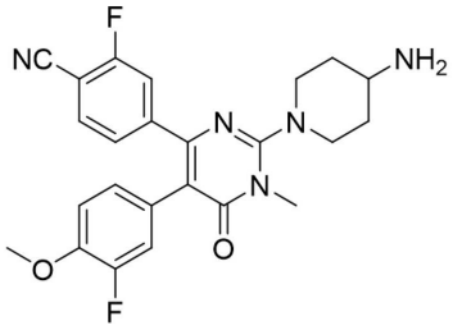
[0160] 在一些实施方案中,所述方法还包括:(a)每天以约200mg的剂量施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或(b)在28天周期中每天以至少约100mg的剂量向所述受试者施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量向所述受试者施用所述LSD-1抑制剂。

[0161] 在一些实施方案中,所述方法包括在28天周期的第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、第3天以约300mg的剂量以及第4-28天以约400mg的剂量向所述受试者并行施用所述至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中,施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

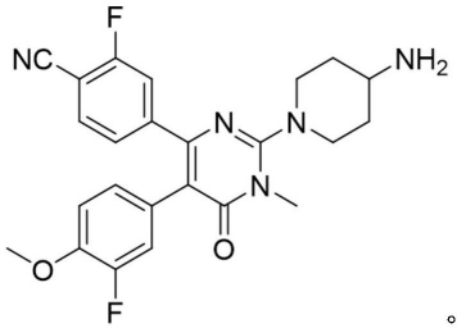
[0162] 在一些实施方案中,所述方法包括:(a)每天以约300mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或(b)在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中,施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0163] 在一些实施方案中,所述方法包括:(a)每天以约200mg的剂量口服施用所述5-氮杂胞苷,持续28天周期的前十四天;和/或(b)在28天周期中每天以约400mg的剂量给所述受试者口服施用所述至少一种另外的治疗剂;和/或(c)在28天周期中每周一次以约20mg、约40mg或约60mg的剂量给所述受试者口服施用所述LSD-1抑制剂。在一些实施方案中,施用所述至少一种另外的治疗剂包括施用维奈妥拉。

[0164] 在另一方面,还提供了一种治疗患有急性髓性白血病(AML)且没有资格进行强化诱导化疗的受试者的方法,所述方法包括按以下向所述受试者施用:(i)在第一个连续的28天周期中:(a)在第1至7天以约75mg/m^2的剂量每日皮下或静脉内施用5-氮杂胞苷;(b)第1天以约100mg的剂量、第2天以约200mg的剂量、以及第3至28天以约400mg的日剂量口服施用维奈妥拉;和(c)第1、8、15和22天施用包含以下化合物的苯磺酸盐的药物组合物:



以及(ii)在随后的28天周期中:(d)在每个后续周期的第1至7天,每日以约75mg/m^2的剂量皮下或静脉内施用5-氮杂胞苷;(e)在每个后续周期的第1至28天以约400mg的剂量口服施用维奈妥拉;和(f)在每个后续周期的第1、8、15和22天施用包含以下化合物的苯磺酸盐的药物组合物



。

[0165] 在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约20mg的剂量施用所述药物组合物。在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约60mg的剂量施用所述药物组合物。

[0166] 在一些实施方案中，在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约20mg的剂量施用所述药物组合物。在一些实施方案中，如果20mg的剂量是耐受的，则将开放第二剂量队列，在所述第二剂量队列中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。

[0167] 在一些实施方案中，如果40mg的剂量是耐受的，则将开放第三剂量队列，在所述第三剂量队列中在第一个连续28天周期和随后的28天周期中以约40mg的剂量施用所述药物组合物。

[0168] 通过引用并入：贯穿本说明书引用的所有披露内容(例如，专利、出版物和网页)均通过引用以其整体并入。此外，以下披露内容也通过引用以其整体并入本文：(1)Skikne等人的2008ASCO poster abstract,Leukemia,2008,22,1680-84。

VI.定义

[0169] 除非另外定义，否则本文中使用的所有技术术语和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体并入本文。

[0170] 如在本说明书和所附权利要求中使用的，不定冠词“一个/一种”(“a”和“an”)以及定冠词“所述”包括复数以及单数指示物，除非上下文清楚地另外指明。

[0171] 术语“约”或“大约”意指在如通过本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差，所述误差部分取决于如何测量或确定所述值。在某些实施方案中，术语“约”或“大约”意指在1、2、3或4个标准差内。在某些实施方案中，术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的30％、25％、20％、15％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.1％或0.05％内。

[0172] 如本文所用，并且除非另有规定，否则术语“治疗”(“treat”、“treating”和“treatment”)是指疾病或障碍或与所述疾病或障碍相关的一种或多种症状的根除或改善。在某些实施方案中，该术语是指使由于将一种或多种预防剂或治疗剂施用于患有这种疾病或障碍的受试者而导致的疾病或障碍的扩散或恶化最小化。在一些实施方案中，该术语是指在特定疾病的症状发作后施用本文提供的化合物或剂型，采用或不采用一种或多种另外的活性剂。

[0173] 如本文所用，并且除非另有规定，否则术语“预防”(“prevent”、“preventing”和

“prevention”)是指预防疾病或障碍或其一种或多种症状的发作、复发或扩散。在某些实施方案中,该术语是指特别是对有本文提供的疾病或障碍风险的受试者,在症状发作之前,用本文提供的化合物或剂型(采用或不采用一种或多种其他另外的活性剂)治疗或施用。该术语涵盖抑制或减少特定疾病的症状。在某些实施方案中,具有疾病家族史的受试者特别是预防方案的候选者。此外,有复发症状史的受试者也是预防的潜在候选者。在这方面,术语“预防”可以与术语“预防性治疗”互换使用。

[0174] 如本文所用,并且除非另有规定,否则术语化合物的“治疗有效量”和“有效量”意指足以在疾病或障碍的治疗或管理中提供治疗益处、或延迟或最小化与疾病或障碍相关的一种或多种症状的量。化合物的“治疗有效量”和“有效量”意指单独或与一种或多种其他药剂组合的治疗剂的量,所述量在疾病或障碍的治疗或管理中提供治疗益处。术语“治疗有效量”和“有效量”可涵盖改善整体疗法、减少或避免疾病或障碍的症状或原因、或增强另一种治疗剂的治疗功效的量。

[0175] 如本文所用,并且除非另有规定,化合物的“预防有效量”是足以预防疾病或障碍或预防其复发的量。化合物的预防有效量意指单独或与一种或多种其他药剂组合的治疗剂的量,所述量在预防疾病中提供预防益处。术语“预防有效量”可涵盖改善整体预防或增强另一种预防剂的预防功效的量。

[0176] 如本文所用,“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖(无论恶性还是良性)以及所有癌前和癌性细胞和组织。如本文所用,“赘生性”是指导致异常组织生长的任何形式的失调或未调节的细胞生长,无论恶性还是良性。因此,“赘生性细胞”包括具有失调或未调节细胞生长的恶性和良性细胞。

[0177] 如本文所用,术语“组合物”、“配制品”和“剂型”旨在涵盖包含一种或多种指定成分(如果指示的话,以指定量)的组合物,以及直接或间接地由一个或多个指定量的一种或多种指定成分的组合产生的任何产品。“药学上的”或“药学上可接受的”意味着组合物、配制品或剂型中的任何一种或多种稀释剂、赋形剂或载体与其他一种或多种成分相容并且对其接受者无害。除非另有说明,否则术语“组合物”、“配制品”和“剂型”在本文中可互换使用。

[0178] 当在本文中使用时,术语“非肠溶包衣”是指不包含旨在将一种或多种活性成分释放到胃之外(例如,在肠中)的包衣的药物组合物、配制品或剂型。在某些实施方案中,非肠溶包衣组合物、配制品或剂型被设计为基本上在胃中释放一种或多种活性成分。

[0179] 如本文所定义的术语“受试者”是人。

实施例

实施例1

材料和方法:

细胞、培养条件和试剂

[0180] AML细胞系购自美国组织培养物保藏中心(ATCC)或获自Celgene主细胞系库。将细胞在补充有10%或20%胎牛血清和10mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中在37℃和5% CO_2的湿润气氛中培养。BaF3-FLT3wt、BaF3-FLT3ITD、BaF3-FLT3D538Y由Kyinno(中国北京)生产。使细胞在具有10%FBS和0.5ug/ml嘌呤霉素的RPMI中生长。指数生长的细胞用于所有体外研究。5-氮杂胞苷(10mM于DMSO中)获自Celgene化合物收集库。吉特替尼(ASP2215)、米

哚妥林(PKC412)、维奈妥拉(ABT-199)、奎扎替尼(AC220)、泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK购自Selleckchem(休斯顿,得克萨斯州),并在DMSO中重构为10mM原液。

细胞活力测定

[0181] 将细胞以2000个细胞/孔在50μl培养基中铺板在384孔板(Coming目录号3764)中。根据制造商的说明,使用Cell Titer-Glow(Promega,麦迪逊,威斯康星州)测量相对细胞数,计算为DMSO对照孔%。在指示的时间使用EnvVsion板读取器(PerkinElmer)对发光值进行量化。将细胞每日用5-氮杂胞苷处理,持续三天,和/或用米哚妥林、吉特替尼或维奈妥拉处理一次。将根据对5-氮杂胞苷的敏感性逐渐调整的九个剂量的5-氮杂胞苷与六个剂量的所评价的第二种药物组合,产生54种可能的组合,对于每个实验均各自一式两份评价。Prism 7.03版(Prism Software Corporation)用于计算EC_{50}值。

组合效应的数据分析

[0182] 细胞存活率绘制为随药物浓度变化,并用于使用GraphPad Prism软件(圣地亚哥,加利福尼亚州)计算EC_{50}值。协同指数是通过最高单用药效法模型和Combenefit软件计算得出,Combenefit:一个用于分析和可视化药物组合的交互式平台(Di Veroli等人,Bioinformatics.2016年9月15日;32(18):2866-8)。

蛋白质印迹

[0183] 在以指示剂量/时间用5-氮杂胞苷和/或抑制剂处理后,使用含有1mM PMSF的裂解缓冲液(Cell Signaling,#9803,Cell Signaling Technologies,丹佛,马萨诸塞州)收获蛋白质。使用二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(Piece/Thermo Fisher,沃尔瑟姆,马塞诸塞州)对裂解物进行量化。将20至30μg蛋白质在4%-12%SDS-PAGE凝胶上分离,转移至PVDF膜(通过湿转移,80V/90分钟),并用Oddysey TBS封闭缓冲液封闭1小时,然后使用制造商推荐的稀释度用适当的一抗在4℃探测过夜。将膜洗涤三次,共30分钟,然后在室温下与二抗在黑暗中孵育1小时。在另外三次洗涤后,根据制造商的说明,使用Odyssey红外成像系统和配套软件(LI-COR biosciences,林肯,内布拉斯加州,美国)扫描免疫印迹膜并量化条带强度。将经处理的样品中的目的蛋白质与上样对照的比率归一化为在未处理细胞中的相应比率。用于免疫印迹的抗体购自以下来源:来自Santa Cruz Biotechnology(达拉斯,得克萨斯州,美国)的BCL-2(sc-7382)、MCL1-(sc-819);来自Cell Signaling Technology的Bim(2819)、半胱天冬酶-3(9664);来自Sigma-Aldrich的β-肌动蛋白(A2228);来自AbCam的DNMTI(abl88453);IRDye 680山羊抗兔和IRDye800山羊抗小鼠二抗(#925-68073和#925-32212)购自Li-COR Biosciences(林肯,内布拉斯加州)。

流式细胞术

[0184] PE小鼠抗人CD14单克隆抗体(克隆M5E2,目录号#301850,BioLegend,圣地亚哥,加利福尼亚州)、BV421缀合的小鼠抗人CD11b单克隆抗体(克隆M1/70,目录号101235,Biolegend)、FITC缀合的小鼠抗人CD86单克隆抗体(克隆2331,目录号#560958,BD Pharmingen,圣地亚哥,加利福尼亚州)用于以1:200稀释度进行FACS染色。使用BD FACSCanto II采集FACS样品。根据制造商的说明,还用Fixable活力染料780(Thermofisher Scientific,沃尔瑟姆,马塞诸塞州)通过FACS分析来检查细胞活力。简而言之,将10^5个细胞接种在U底96孔板中,第二天用9个剂量的CC-90011处理(从10uM开始,向下3倍稀释),将细胞在37℃孵育6天并收获用于染色。将细胞用DPBS洗涤一次,并用1X FVS780染色,并用染

色缓冲液洗涤两次。将样品用1:200稀释度的表面抗体染色。然后用FlowJo V10软件(TreeStar Inc.,阿什兰,俄勒冈州)分析结果。所有阳性表面标记物的活细胞百分比用于计算EC_{50}值,相对于为100%的用于曲线对照的经DMSO处理的样品归一化。

RNASeq分析

[0185] 将MV4-11细胞用PBS或1μM 5-氮杂胞苷处理24小时或每日用1μM 5-氮杂胞苷处理48小时,一式三份。处理后,回收细胞,在PBS中洗涤一次,然后快速冷冻为细胞团块。将细胞团块送到Canopy Biosciences进行RNA提取、以及文库制备和测序。根据制造商的说明,使用Qiagen RNeasy迷你试剂盒提取RNA。使用修改的方案保存miRNA种类。使用200ng总RNA和NEBNext Ultra II定向文库制备试剂盒制备总RNA Seq文库。使用基于RNase-H的方法(New England Biolabs,伊普斯维奇,马萨诸塞州)进行rRNA消耗。使用标准方法通过RNASeq对其他细胞系中的MCL1 RNA水平进行量化。

[0186] 使用Illumina HiSeq对文库进行多路复用和测序。然后将所有基因计数导入R/Bioconductor包EdgeR中,并计算TMM归一化大小因子以针对文库大小的差异调整样品。核糖体基因和未以大于百万分之一计数在最小组大小减一个样品中表达的基因被排除在进一步分析之外。然后进行差异表达分析以分析条件之间的差异,并仅过滤Benjamini-Hochberg假发现率调整后p值小于或等于0.05的那些基因的结果。按以下方式检测已知基因本体(GO)项和KEGG通路中的全局扰动:使用R/Bioconductor包GAGE以测试Limma在每个项中报告的报告log 2变化倍数相对于相应项之外发现的所有基因的背景log 2变化倍数而言的表达变化。R/Bioconductor包热图和Pathview用于显示每个GO项或KEGG通路(分别)的样品组中的热图或注释的KEGG图,其中Benjamini-Hochberg假发现率调整后的p值小于或等于0.05。为了找到差异表达的基因,将原始计数用R/Bioconductor包DESeq2进行方差稳定。

[0187] 为了验证ATF3和SCD表达,将MV4-11细胞用PBS或0.3μM 5-氮杂胞苷、1μM 5-氮杂胞苷或3μM 5-氮杂胞苷处理24小时和48小时。此时,根据制造商的说明,使用Qiagen RNeasy试剂盒回收细胞并提取RNA。使用SuperScript VILO cDNA合成试剂盒进行逆转录。将经验证的Taqman探针和Taqman Fast Advanced Master Mix与Viia 7实时PCR系统(Invitrogen/ThermoFisher Scientific,沃尔瑟姆,马塞诸塞州)一起使用,以量化ATF3、SCD和18S mRNA的转录物。

干扰RNA基因沉默

[0188] 根据制造商建议的方案,使用Lipofectamine 2000将ATF3、SCD或对照Silencer Select siRNA(16nM siRNA,Invitrogen)转染到MV4-11细胞中。未经处理的细胞在没有siRNA的情况下进行模拟转染。然后将细胞每日用不同浓度的5-氮杂胞苷处理3天。在第4天,将细胞用维奈妥拉处理,随后根据制造商的方案在第7天使用Cell Titer Glo检查细胞活力。协同作用是使用Combenefit计算的,并使用最高单用药效法分析进行比较。

[0189] 在转染后72小时对siRNA转染的细胞(未经5-氮杂胞苷或维奈妥拉处理)进行基因敲低确认。使用Qiagen RNeasy试剂盒提取RNA,并使用SuperScript VILO cDNA合成试剂盒进行逆转录。将经验证的Taqman探针和Taqman Fast Advanced Master Mix与Viia 7实时PCR系统(Invitrogen/ThermoFisher Scientific,沃尔瑟姆,马塞诸塞州)一起使用,以量化ATF3、SCD和18S mRNA的转录物。

5-氮杂胞苷和至少一种另外的治疗剂双重组合测定

[0190] 如在整个实施例中所使用的,LEED是指以1mg/kg以低暴露延长持续时间(LEED)递送5-氮杂胞苷,每日一次,持续十五天(QDx15)。为了递送相同累积剂量的5-氮杂胞苷,将5-氮杂胞苷以3mg/kg以高暴露有限持续时间(HELD)施用,每日一次,持续五天(QDx5)。LEED模拟AZA的口服施用,而HELD模拟AZA的静脉内或皮下施用。

[0191] 在Charles River实验室(莫里斯维尔(Morissville),北卡罗来纳州),用在研究的第1天为八周龄、体重(BW)范围为17.6至28.4克的雌性NOD/SCID小鼠(NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl,Charles River)进行实验。给动物随意饲喂水(反渗透,1ppm Cl)和由18.0%粗蛋白、5.0%粗脂肪和5.0%粗纤维组成的NIH 31改良和辐照的Lab Diet®。将小鼠安置在20℃-22℃(68°F-72°F)和40%-60%湿度下进行12小时光照循环的静态微型隔离器中经辐照的Enrich-o'cobs™实验室动物垫料上。

[0192] Celgene提供LEED 5-氮杂胞苷、HELD 5-氮杂胞苷(米哚妥林(MedChemExpress,蒙茅斯章克申(Monmouth Junction),新泽西州)、吉特替尼(Sigma Aldrich,圣路易,密苏里州)和维奈妥拉(ABT-199,Sigma Aldrich,圣路易,密苏里州)。本研究中使用的媒介物是PO(口服)给药的在去离子(DI)水中的6% Gelucire® 44/14(Gattefossé,帕拉默斯,新泽西州),这是一种蜡状固体,需要水浴加热到44℃才能熔化;和IP(腹膜内)给药的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在给药的每一天,将适量的LEED或HELD 5-氮杂胞苷重新悬浮在PBS中,以分别产生0.1或0.3mg/mL的给药悬浮液。在给药的每一天,将适量的米哚妥林溶解于6% Gelucire 44/14中以产生10mg/mL的给药溶液。在给药的每一天,将适量的吉特替尼溶解于在DI水中的0.5%甲基纤维素中,以产生0.4mg/mL的给药溶液。每一周,将适量的维奈妥拉溶解于10%乙醇:30%PEG400:60%phosal 50丙二醇中,以产生10mg/mL的给药溶液。在对数期生长期间收获用于接种的细胞,并以5x 107个细胞/mL的浓度重新悬浮在PBS中。每只测试小鼠通过尾静脉注射接受5 x 10^6个MOLM-13细胞或10^7个MV4-11细胞(0.2mL细胞悬浮液)。在肿瘤细胞接种后三天(这被指定为研究的第1天)开始给药。NOD/SCID小鼠(n=9-12/组)根据体重随机分配并给药。磷酸盐缓冲盐水、LEED 5-氮杂胞苷和HELD 5-氮杂胞苷腹膜内(IP)施用,而米哚妥林、吉特替尼和维奈妥拉则为PO施用。将媒介物经IP和PO施用。所有处理的给药体积为10mL/kg,按每只单独动物的体重调整。

[0193] 单独监测动物的因白血病进展而垂死的终点。由于肿瘤进展,完全后肢瘫痪、严重眼球突出或垂死被认为足以进行安乐死。垂死动物被定义为无法获得食物和水的生病动物。这些死亡被归类为存活研究死亡。记录每只死于其疾病或因肿瘤广泛进展而被安乐死的小鼠的终点时间(TTE),以天为单位。未达到终点的动物在研究结束时被安乐死,并被分配等于最后一天的TTE值。归类为已死于处理相关(TR)原因的动物被分配的TTE值等于死亡日期。归类为已死于非处理相关(NTR)原因或用于在终点前取样的动物被排除在TTE计算和所有进一步分析之外。计算每组的中位TTE值。处理小鼠的中位TTE表示为占对照小鼠中位TTE的百分比(%T/C),并且寿命增加(ILS)计算为:ILS=%T/C-100%,其中T=处理的中位TTE,C=对照的中位TTE。因此,如果T=C,则ILS=0%。

[0194] 在第1-5天每日对动物称重,然后每周两次称重,直到研究完成。频繁观察小鼠的任何不良的处理相关(TR)副作用的明显征象,并且当观察时记录临床征象。根据方案监测个体体重减轻,并对任何超过可接受体重减轻限度的动物实施安乐死。还根据方案监测组

平均体重减轻。在超过可接受的平均体重减轻限度的任何组中暂停给药。如果平均体重恢复,则可以在该组中恢复给药,但以更低剂量或更不频繁的给药时间表进行。最大耐受剂量的可接受毒性定义为研究期间组平均体重减轻小于20%,并且在十只处理的动物中不超过1例TR死亡。如果归因于如临床征象和/或尸检所证实的处理副作用,则死亡被归类为TR,或者如果由于在给药时间段期间或在最后一次给药的14天内由于未知原因的死亡,也可以被归类为TR。如果没有证据表明死亡与处理副作用或肿瘤进展有关,则死亡被归类为NTR。非处理相关的死亡可以根据死因进一步表征。如果死亡是由事故或人为错误造成的,则可将死亡归类为NTRa。如果死因未知,并且没有与处理副作用、转移、事故或人为错误相关的死亡的可用证据,但不能排除因这些病因导致的死亡,则可将死亡归类为NTRu。基于TTE值,通过Kaplan-Meier方法分析存活率。基于TTE值,对数秩(Mantel-Cox)和Gehan-Breslow-Wilcoxon检验确定了两组总体存活经验(存活曲线)之间差异的显著性。

5-氮杂胞苷与维奈妥拉的组合结果

[0195] 图1-图7提供了有关实验的各种信息和数据。例如,图1是表示与吉特替尼组合的5-氮杂胞苷、以及与米哚妥林组合的5-氮杂胞苷的最大EC_{50}变动倍数的条形图,二者采用细胞系MV4-11和MOLM-13。示出了以下三种不同给药安排的结果:(i)首先施用5-氮杂胞苷(黑色条);(ii)并行施用所述两种药剂(浅灰色条);和(iii)第二个施用5-氮杂胞苷(中灰色条)。图2表示以下三种不同给药安排:(i)在FLT3抑制剂(FLT3i)之前以时间间隔首先施用5-氮杂胞苷(AZA);(ii)并行施用两种药剂(5-氮杂胞苷和FLT3i);和(iii)施用FLT3i之后以时间间隔第二个施用5-氮杂胞苷;其中FLT3i可以是任何合适的FLT3抑制剂,如米哚妥林或吉特替尼。图3A-图3D表示在采用细胞系MV4-11(图3A)和MOLM-13(图3C)的情况下,与维奈妥拉组合的5-氮杂胞苷的最大EC_{50}变动倍数。示出了以下三种不同给药安排:(i)首先施用5-氮杂胞苷(黑色条);(ii)并行施用所述两种药剂(浅灰色条);和(iii)第二个施用5-氮杂胞苷(中灰色条)。还示出了对于三种不同的给药安排,在采用细胞系MV4-11(图3B)和MOLM-13(图3D)的情况下,与维奈妥拉组合施用的5-氮杂胞苷的协同指数。

[0196] 图4A-图4C表示响应面分析,其示出在MV4-11细胞中,当首先施用5-氮杂胞苷时(图4A)5-氮杂胞苷与维奈妥拉的协同作用,在同时施用的情况下协同作用相对更低(图4B),并且在首先施用维奈妥拉的情况下具有协同作用(图4C)。响应面方法(RSM)探索了几个解释变量与一个或多个响应变量之间的统计关系。RSM使用一系列所设计的实验来获得最佳响应,在本申请的情形中为5-氮杂胞苷与维奈妥拉的协同效应。

[0197] 图5描绘了蛋白质印迹,其示出(a)5-氮杂胞苷和米哚妥林("aza+0.3μM Mido")和(b)5-氮杂胞苷和吉特替尼("aza+0.3μM Gilt")在MV4-11细胞系中加强MCL-1降解。

[0198] 此外,图6描绘了蛋白质印迹,其示出5-氮杂胞苷和维奈妥拉处理降低了FLT3ITD MV4-11细胞中的MCL-1水平。

[0199] 最后,图7A-图7C用存活百分比(y-轴)与第0至70天(x-轴)的图描绘了MOLM-13异种移植模型中5-氮杂胞苷组合的体内评估。图7A-图7C中所示实验的给药如下:(i)5-氮杂胞苷(低暴露,延长持续时间,LEED):1mg/kg,腹膜内(IP),每日一次,持续五天,三次(qdx 5x3);(ii)5-氮杂胞苷(高暴露,有限持续时间,HELD):3mg/kg,腹膜内(IP),每日一次,持续五天(qdx5);(iii)米哚妥林(100mg/kg,口服(PO),每日一次,持续二十一天(qdx21));(iv)吉特替尼(4mg/kg,口服(PO),每日一次,持续二十一天(qdx21));以及(v)维奈妥拉(100mg/

kg,口服(PO),每日一次,持续二十一天(qdx21))。P值(相对于最佳单一药剂)*P<0.05;**P<0.001;***P<0.0001。图7A示出5-氮杂胞苷与米哚妥林的组合的结果,图7B示出与维奈妥拉组合的5-氮杂胞苷的结果,并且图7C示出5-氮杂胞苷与吉特替尼的组合的结果。对于图7A,测试的组合物是媒介物、5-氮杂胞苷(低暴露延长持续时间LEED,1mg/kg 5-氮杂胞苷的时间表,每日一次,持续十五天(qdx15))、5-氮杂胞苷(高暴露有限持续时间HELD,3mg/kg 5-氮杂胞苷的时间表,每日一次,持续五天(qdx5))、米哚妥林(100/kg,每日一次,持续二十八天(qdx28))、LEED+米哚妥林、和HELD+米哚妥林。对于图7B,测试的组合物是媒介物、5-氮杂胞苷(LEED)、5-氮杂胞苷(HELD)、维奈妥拉、LEED+维奈妥拉、和HELD+维奈妥拉。对于图7C,测试的组合物是媒介物、5-氮杂胞苷(LEED)、5-氮杂胞苷(HELD)、吉特替尼、LEED+吉特替尼、和HELD+吉特替尼。与单独的媒介物相比,LEED和HELD 5-氮杂胞苷给药导致存活率在统计学上显著增加(LEED相比媒介物,通过Gehan-Breslow-Wilcoxon检验,p=0.003;HELD相比媒介物,通过Gehan-Breslow-Wilcoxon检验,p=0.003)。与单独的媒介物相比,单独的以及与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的米哚妥林显著提高了存活率(米哚妥林相比媒介物,p=0.027;LEED+米哚妥林相比媒介物,p=0.012;HELD+米哚妥林相比媒介物,p=0.003)。分别与LEED或HELD 5-氮杂胞苷相比,与米哚妥林组合的HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+米哚妥林相比LEED,p=0.028;HELD+米哚妥林相比HELD,p=0.039)。与单独的米哚妥林处理相比,与米哚妥林组合的LEED或HELD未观察到存活率的显著变化。与媒介物或单一药剂相比,采用与米哚妥林组合的LEED或HELD5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+米哚妥林=45天,HELD+米哚妥林=43天,媒介物=19天,米哚妥林=34天,LEED=36天,HELD=32天(图7A)。与单独的媒介物相比,单独的以及与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的吉特替尼显著提高了存活率(吉特替尼相比媒介物,p=0.003;LEED+吉特替尼相比媒介物,p=0.003;HELD+吉特替尼相比媒介物,p=0.003)。与单独的LEED或HELD 5-氮杂胞苷相比,与吉特替尼组合的低暴露延长持续时间或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+吉特替尼相比LEED,p=0.019;LEED+吉特替尼相比HELD,p=0.004;HELD+吉特替尼相比LEED,p=0.008;HELD+吉特替尼相比HELD,p=0.003。此外,与单独的吉特替尼相比,与吉特替尼组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+吉特替尼相比吉特替尼,p<0.001;HELD+吉特替尼相比吉特替尼,p<0.001)。与单独的媒介物相比,单独的以及与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的维奈妥拉显著提高了存活率(维奈妥拉相比媒介物,p=0.003;LEED+维奈妥拉相比媒介物,p=0.002;HELD+维奈妥拉相比媒介物,p=0.004)(图7B)。与单独的LEED或HELD 5-氮杂胞苷相比,与维奈妥拉组合的低暴露延长持续时间或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+维奈妥拉相比LEED,p=0.001;LEED+维奈妥拉相比HELD,p<0.001;HELD+维奈妥拉相比LEED,p=<0.001;HELD+维奈妥拉相比HELD,p=<0.001。此外,与单独的维奈妥拉相比,与维奈妥拉组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+维奈妥拉相比维奈妥拉,p<0.001;HELD+维奈妥拉相比维奈妥拉,p<0.001)。和维奈妥拉组合的低暴露延长持续时间与和维奈妥拉组合的HELD相比没有显著差异。与媒介物或单一药剂相比,采用与维奈妥拉组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+维奈妥拉=46天,HELD+维奈妥拉=45天,媒介物=19天,维奈妥拉=29天,LEED=36天,HELD=32天)。与媒介物或单一药剂相比,采用与吉特替尼组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+吉特替尼=45天,HELD+吉特替尼=43天,媒介物=19

天,吉特替尼＝34天,LEED＝36天,HELD＝32天(图7C)。

[0200] 图8A、图8B和图8C示出22种AML细胞系对作为单一药剂的5-氮杂胞苷(AZA)和维奈妥拉、以及5-氮杂胞苷与维奈妥拉的组合的敏感性。图8A示出5-氮杂胞苷在大多数细胞系中显示出细胞毒性作用,其中EC_{50}值范围为0.15μM至2.5μM。相比之下,图8B示出11/22的所检查AML细胞系对维奈妥拉敏感(EC_{50}<10μM)。图8C示出使用响应面分析和最高单用药效法模型得出的5-氮杂胞苷与维奈妥拉的组合活性,其中10/22的细胞系显示出高于任意阈值20的协同活性。值得注意的是,对维奈妥拉具有耐药性的三种细胞系(Kasumi-1、Kasumi-2和NOMO-1)在用5-氮杂胞苷的共同处理下显示出维奈妥拉耐药性的逆转。携带FLT3-ITD(一种AML中的频发突变)的细胞系还显示出与5-氮杂胞苷和维奈妥拉的协同活性。

[0201] 这些结果出人意料地证明5-氮杂胞苷与维奈妥拉的组合在AML细胞系中,并且特别是对维奈妥拉具有耐药性的AML细胞系中提供了协同效应。

[0202] 还研究了5-氮杂胞苷和维奈妥拉施用的具体时间表是否对5-氮杂胞苷和维奈妥拉提供的协同效应具有影响。图9A-图9F示出用5-氮杂胞苷和维奈妥拉开始处理后MV4-11细胞(图9A-图9C)和MOLM-13细胞(图9D-图9F)的细胞存活率。测试了以下时间表:在第1、2和3天施用5-氮杂胞苷,随后在第4天施用维奈妥拉(首先为5-氮杂胞苷(AZA))(图9A和图9D);在第1天共施用5-氮杂胞苷和维奈妥拉,随后在第2和3天施用5-氮杂胞苷(同时)(图9B和图9E);以及在第1天施用维奈妥拉,随后在第2、3和4天施用5-氮杂胞苷(首先为维奈妥拉)(图9C和图9F)。正如所显示的协同指数(SI)所反映的,结果显示,对于两种细胞系,首先施用5-氮杂胞苷的方案提供了最大的协同效应。这些结果表明5-氮杂胞苷可将AML细胞准备好以用于维奈妥拉活性。

[0203] 维奈妥拉耐药性的因素之一是细胞凋亡调节物MCL-1的表达,所述细胞凋亡调节物在FLT3突变的AML中上调,并在5-氮杂胞苷处理后下调。为了检查MCL-1水平是否与5-氮杂胞苷-维奈妥拉组合的协同效应程度相关,检查了表达野生型FLT3、FLT3-ITD或FLT3(D835Y)突变的一组套工程化BaF3细胞系。工程化BaF3细胞系也独立于IL-3增殖。图10A示出这些工程化BaF3细胞系对维奈妥拉具有耐药性(EC_{50}>1μM),但对FLT3抑制剂(如吉特替尼、米哚妥林和奎扎替尼)敏感。示于图10A中的数据也示于下表1中。

表1

表达不同FLT3的BaF3细胞(EC50,nM)

	BaF-FLT3(WT)	BaF-FLT3-ITD	BaF-FLT3(D835Y)
AZA	189	598	456
吉特替尼	4	1.8	1.8
米哚妥林	23	5.5	5.4
奎扎替尼	3	0.008	9.5
维奈妥拉	＞10000	＞10000	4332

[0204] 图10B示出在所有细胞系中都检测到MCL-1,其中在FLT-ITD突变细胞系中观察到最高表达水平,其次是FLT3(D835Y)。5-氮杂胞苷与维奈妥拉的组合显示出协同效应,其中在表达最低水平MCL-1的FLT3(野生型)中观察到的协同指数最高,其次是FLT3(D835Y)(中间MCL-1水平)和FLT3-ITD(最高MCL-1)(图10C)。这些结果表明MCL-1表达可能是5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用的决定因素。

[0205] 为了进一步探索MCL-1与5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用之间的关系,进一步在一组套20种AML细胞系中探索了MCL1 RNA水平与5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同指数之间的关系。图11示出在一组套20种AML细胞系中与协同指数直接相关的MCL1 RNA水平(r^2=-0.5607,p=0.0101)。这些结果显示,MCL-1可能是AZA引发维奈妥拉诱导的细胞凋亡的关键调节物,特别是5-氮杂胞苷可以将MCL-1降低至某个阈值之下,以允许维奈妥拉介导的细胞凋亡。

[0206] 接下来,探索了以下四种不同AML细胞系中5-氮杂胞苷介导的MCL-1降解的程度:KG1α(图12A)、MV4-11(图12B)、THP-1(图12C)和OCI-AML-2(图12D)。结果示出在采用KG1α(图12E)和MV4-11(图12F)细胞系的情况下的5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同活性(协同指数(SI)分别为70和35.5),并且在采用THP-1(图12G)和OCI-AML-2(图12H)细胞系的情况下很少或没有协同活性(SI分别为20.2和10.8)。对于KG1α(图12A)和MV4-11(图12B)细胞系,其中5-氮杂胞苷-维奈妥拉具有最大的协同效应(图12E和图12F),5-氮杂胞苷导致MCL-1降解最快,处理后6小时就开始了。相比之下,对于THP-1(图12C),其中5-氮杂胞苷-维奈妥拉仅提供小的协同活性,示出5-氮杂胞苷介导的MCL-1降解更晚,从16小时开始,到24小时时降解不完全(图12G)。对于OCI-AML2(图12D),其中5-氮杂胞苷-维奈妥拉具有最低的协同效应(图12H),5-氮杂胞苷处理不会导致MCL-1的任何降解。这些结果支持这样的假设,即5-氮杂胞苷通过降低MCL-1水平来将细胞准备好以用于维奈妥拉介导的细胞凋亡。

[0207] 5-氮杂胞苷下调MCL-1的一种可能机制是通过诱导半胱天冬酶激活。半胱天冬酶激活可以通过在蛋白质印迹中评价半胱天冬酶3的降解来测定(图13A)。为了查明这种作用是否依赖于半胱天冬酶,用泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK处理细胞,并测量5-氮杂胞苷对MCL-1的降解程度(图13B)。特别地,图13B示出5-氮杂胞苷对MCL-1降解的条形图,其中将细胞用20μM Z-VAD-FMK处理1小时,之后5-氮杂胞苷处理另外16小时。半胱天冬酶抑制部分地消除了MV4-11细胞中5-氮杂胞苷对MCL-1的降解,表明了其他不依赖于半胱天冬酶的MCL-1降解机制。发现Z-VAD-FMK部分地消除了5-氮杂胞苷降解MCL-1的能力,表明该过程是由半胱天冬酶依赖性和独立机制介导的。

[0208] 为了进一步了解5-氮杂胞苷如何引发维奈妥拉用于急性细胞凋亡,对用PBS(媒介物)、1μM AZA处理24小时(图14A)或1μM AZA处理48小时(图14B)的MV4-11细胞进行RNAseq。表2是图14A中RNASeq数据的通路分析,并示出5-氮杂胞苷处理后的分析,这是基于KEGG通路对5-氮杂胞苷显著诱导或抑制的基因进行的分类。

表2

在24h时的显著Kegg通路(在48h时无显著)

通路	平均logFC	p值	调整的p值
核糖体	-10.50	10.49547	5.44E-21
氧化磷酸化	-7.32	7.315598	2.01E-12
代谢通路	-5.79	5.788892	4.06E-09
细胞周期	-5.75	5.746475	1.43E-08
内质网中的蛋白质加工	-4.96	4.958095	6.26E-07
DNA复制	-4.45	4.450573	1.83E-05
蛋白酶体	-4.41	4.410196	2.17E-05
吞噬体	-4.13	4.134259	2.49E-05
剪接体	-4.10	4.100521	2.90E-05
坏死性凋亡	-3.78	3.779974	9.92E-05
脂肪酸代谢	-3.43	3.425249	4.51E-04
抗原加工和呈递	-3.39	3.393502	5.02E-04
碳代谢	-3.35	3.354515	4.75E-04
不饱和脂肪酸的生物合成	-3.26	3.260586	1.11E-03
蛋白质外排	-3.19	3.191372	1.46E-03
RNA转运	-3.08	3.081532	1.15E-03
错配修复	-2.98	2.975621	2.43E-03
脂肪酸延长	-2.87	2.867612	3.26E-03
溶酶体	-2.82	2.816478	2.65E-03
细胞衰老	-2.69	2.691944	3.78E-03
心肌收缩	-2.61	2.614268	5.21E-03
类固醇生物合成	-2.48	2.481832	9.05E-03
肌动蛋白细胞骨架的调节	-2.46	2.456262	7.30E-03
味觉转导	2.44	2.436918	8.81E-03
p53信号传导通路	-2.42	2.419681	8.46E-03

[0209] 处理48小时后，在5-氮杂胞苷调节的KEGG通路中未观察到显著差异。然而，在5-氮杂胞苷处理24小时后差异调节的前几个KEGG通路是“核糖体”、“氧化磷酸化”、“代谢通路”和“细胞周期”。这些结果支持了这样的假设，即5-氮杂胞苷在改变细胞代谢、引起细胞周期停滞、抑制氧化磷酸化方面发挥作用，这于先前在用5-氮杂胞苷+维奈妥拉组合治疗的患者中观察到。

[0210] 在24小时(图14A)和48小时(图14B)显著修饰基因的火山图示出了5-氮杂胞苷在24小时诱导133种差异表达基因和在48小时诱导226种差异表达基因。在进一步分析5-氮杂胞苷诱导的差异表达基因后，鉴定出两种先前已显示可调节MCL1表达的基因：激活转录因子3(ATF3)和硬脂酰CoA去饱和酶(SCD)。ATF3是一种应激反应转录因子，显示其可调节MCL-1以及免疫和代谢基因。5-氮杂胞苷处理后48小时，ATF3表达增加两倍。在另一方面，5-氮杂胞苷处理后48小时，脂质代谢和MCL1的调节物SCD的表达降低2.5倍ATF3(图14C)和SCD(图14D)表达的改变在使用实时PCR的单独实验中得到验证。ATF3表达以时间和浓度依赖性方式增加，因为0.3μM 5-氮杂胞苷处理不足以在24或48小时诱导ATF3表达(图14C)。类似地，当用3μM 5-氮杂胞苷处理时，SCD表达在24小时内迅速下降，但此时它不受低浓度5-氮杂胞苷的影响(图14D)。

[0211] 鉴于它们与调节MCL1表达的联系，假设ATF3和/或SCD可促成5-氮杂胞苷-维奈妥

拉协同作用。为了进一步探索这一点，在MV4-11细胞中利用siRNA敲低这些基因来评估它们的协同作用。MV4-11细胞未转染或用ATF3、SCD或对照(乱序)siRNA转染。作为对照，将细胞用siRNA转染，并在转染后72小时收集RNA并用于qPCR。(图15A)这证实当将细胞分别用ATF3或SCD siRNA转染时，siRNA敲低降低但没有完全消除ATF3或SCD的mRNA表达。另外，在用乱序siRNA处理的细胞中，未观察到ATF3(图15B)或SCD(图15C)表达的变化。转染后，将细胞每日用不同浓度的5-氮杂胞苷处理，持续第1-3天。在第4天，向细胞给予维奈妥拉，随后在处理开始后使用CellTiter-Glo®7进行细胞活力测试。使用Combenefit和最高单用药效法(Highest Single Agent)分析来计算5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用(图15D-图15G)。在未转染的细胞中证实了5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用(协同指数＝43)(图15D)，并且该协同作用不受转染本身影响，因为转染乱序siRNA的细胞(图15E)具有协同指数46。当ATF3被敲低时(图15F)，5-氮杂胞苷-维奈妥拉具有降低的协同作用(协同指数＝19)。在另一方面，当SCD被敲低时(图15G)，5-氮杂胞苷-维奈妥拉具有增加的协同作用(协同指数＝60)。该数据表明，5-氮杂胞苷诱导的ATF3增加和SCD减少在5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用中起至少部分的作用。

[0212] 接下来在与注射用5-氮杂胞苷(HELD)或口服5-氮杂胞苷(LEED)相对应的剂量和时间表下，评价5-氮杂胞苷和维奈妥拉在体内是否具有协同活性。两种示出5-氮杂胞苷-维奈妥拉协同作用(图8C)的细胞系MV4-11(图16A-图16C)和MOLM-13(图16D-图16F)用于在免疫缺陷动物中产生播散性AML异种移植小鼠。在体外，维奈妥拉使两种细胞系都对维奈妥拉敏感(图16A和图16D)，并与5-氮杂胞苷协同作用(图16B和图16E)。为了模拟口服5-氮杂胞苷(LEED)方案，将小鼠用1mg/kg 5-氮杂胞苷处理15天(低暴露，延长持续时间)。可替代地，为了使用相同的累积剂量但采用注射用5-氮杂胞苷(HELD)方案，将小鼠用3mg/ml 5-氮杂胞苷处理5天(高暴露，有限持续时间)。

[0213] 对于MV4-11植入，对雌性NCG小鼠通过尾静脉注射0.2mL细胞悬浮液中的$1x10^7$个细胞。第1天被指定为植入后十四天。在第1天，根据体重将小鼠分到处理组中，并按如下方式开始给药：用媒介物、高剂量5-氮杂胞苷(HELD，3mg/kg，每日一次，持续五天(qdx5))、低剂量5-氮杂胞苷(LEED，1mg/kg，每日一次，持续五天，三次(qdx5x3))、维奈妥拉(100mg/kg，qdx21)、HELD+维奈妥拉、或LEED+维奈妥拉处理小鼠。在初始处理后，监测小鼠的体重减轻和垂死状态长达56天，以确定小鼠何时死于肿瘤负荷。与单独的媒介物相比，单独的或者与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的维奈妥拉显著提高了存活率(维奈妥拉相比媒介物，p＝0.0493；LEED+维奈妥拉相比媒介物，p＝0.0123；HELD+维奈妥拉相比媒介物，p＝0.04)。与单独的5-氮杂胞苷相比，与维奈妥拉组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷显著提高了存活率(LEED+维奈妥拉相比LEED，p＝0.001；HELD+维奈妥拉相比HELD，p＝0.0004)。然而，只有LEED+5-氮杂胞苷显著优于单独的维奈妥拉(LEED+维奈妥拉相比维奈妥拉，p＝0.0378)。另外，与单一药剂相比，与维奈妥拉组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷确实增加了中值存活期(LEED+维奈妥拉＝38，HELD+维奈妥拉＝37，媒介物＝29.5，HELD＝35，LEED＝35，维奈妥拉＝35.5)。(图16C)

[0214] 用第二种FLT3-ITD细胞系MOLM-13重复这些实验。简而言之，将$5x10^6$个MOLM-13细胞注射到每组12只NOD/SCI小鼠中。肿瘤细胞接种后三天，将小鼠用与MV4-11细胞相同的给药方案处理。在初始处理后，监测小鼠的体重减轻和垂死状态长达70天，以确定小鼠何时死

于疾病负荷。与单独的媒介物相比，单独的和与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的维奈妥拉显著提高了存活率(维奈妥拉相比媒介物，p＝0.003;LEED+维奈妥拉相比媒介物，p＝0.002;HELD+维奈妥拉相比媒介物，p＝0.004)。与单独的LEED或HELD 5-氮杂胞苷相比，与维奈妥拉组合的低暴露延长持续时间或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+维奈妥拉相比LEED，p＝0.001;LEED+维奈妥拉相比HELD，p<0.001;HELD+维奈妥拉相比LEED，p＝<0.001;HELD+维奈妥拉相比HELD，p＝<0.001。此外，与单独的维奈妥拉相比，与维奈妥拉组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+维奈妥拉相比维奈妥拉，p<0.001;HELD+维奈妥拉相比维奈妥拉，p<0.001)。与媒介物或单一药剂相比，采用与维奈妥拉组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+维奈妥拉＝46天，HELD+维奈妥拉＝45天，媒介物＝19天，维奈妥拉＝29天，LEED＝36天，HELD＝32天)。(图16F)。

[0215] 总之，这些结果显示具有FLT3-ITD突变的受试者可受益于AZA+Ven组合疗法。

5-氮杂胞苷与FLT-3抑制剂的组合结果

[0216] FLT3突变发生在约30％的AML患者中，并且与预后不良相关。广效FLT-3抑制剂米哚妥林和选择性FLT3抑制剂吉特替尼已被批准用于治疗AML。为了研究5-氮杂胞苷和FLT3抑制剂的共同治疗是否在AML细胞中具有协同效应，用5-氮杂胞苷+米哚妥林或5-氮杂胞苷+吉特替尼处理两种FLT3-ITD细胞系，即MV4-11和MOLM-13细胞。将细胞在第1-3天用每日剂量的5-氮杂胞苷处理，并然后在第4天用FLT-3抑制剂(米哚妥林或吉特替尼)处理。在第7天收集细胞并通过CellTiter-Glo®测定评估细胞活力。米哚妥林使MV4-11对5-氮杂胞苷敏感(图17A)，并示出与5-氮杂胞苷的协同活性(图17B)。在用5-氮杂胞苷和吉特替尼(图17C和图17D)处理的MV4-11细胞中，以及在用5-氮杂胞苷和米哚妥林(图17E和图17F)或吉特替尼(图17G和图17H)处理的MOLM-13细胞中，观察到相似的作用。

[0217] 接下来检查了FLT3抑制剂与5-氮杂胞苷之间的协同活性，所述5-氮杂胞苷是使用类似于注射(高暴露有限持续时间或HELD方案)或口服(低暴露延长持续时间，LEED)的剂量和时间表施用的。使用基于MOLM-13和MV4-11细胞系的两种播散性AML异种移植模型。使用HELD方案(每日3mg/kg，持续5天)或LEED(1mg/kg，每日一次，持续十五天(qdx15))用5-氮杂胞苷处理小鼠。作为单一药剂，每日以100mg/kg施用FLT3抑制剂米哚妥林持续21天以及以4mg/kg施用吉特替尼(qdx21)，或与HELD或LEED 5-氮杂胞苷方案一起施用。在MOLM-13异种移植模型中，与单独的媒介物相比，单独的以及与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的米哚妥林显著提高了存活率(米哚妥林相比媒介物，p＝0.027;LEED+米哚妥林相比媒介物，p＝0.012;HELD+米哚妥林相比媒介物，p＝0.003)(图17I)。与LEED或HELD 5-氮杂胞苷相比，与米哚妥林组合的低暴露延长持续时间或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+米哚妥林相比LEED，p＝0.028;HELD+米哚妥林相比HELD，p＝0.039)。与单独的米哚妥林处理相比，与米哚妥林组合的LEED或HELD未观察到存活率的显著变化。与媒介物或单一药剂相比，采用与米哚妥林组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+米哚妥林＝45天，HELD+米哚妥林＝43天，媒介物＝19天，米哚妥林＝34天，LEED＝36天，HELD＝32天(图17I)。

[0218] 在MV4-11异种移植模型中，与单独的媒介物相比，单独的以及与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的米哚妥林提高了存活率(米哚妥林相比媒介物，p＝0.0067;LEED+米哚妥林相比媒介物，p＝0.0084;HELD+米哚妥林相比媒介物，p＝0.0625)。与单独的LEED或HELD 5-氮

杂胞苷相比，与米哚妥林组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+米哚妥林相比LEED，p＝<0.0001;HELD+米哚妥林相比HELD，p＝0.0015)。另外，与单独的米哚妥林相比，与米哚妥林组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷并没有显著提高存活率(LEED+米哚妥林相比米哚妥林，p＝0.1704;HELD+米哚妥林相比米哚妥林，p＝0.8308)。与媒介物或单一药剂HELD或LEED相比，采用与米哚妥林组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+米哚妥林＝64.5，HELD+米哚妥林＝59.5，媒介物＝29.5，LEED＝35，HELD＝35，米哚妥林＝57)(图17J)。

[0219] 在MOLM-13异种移植模型中，与单独的媒介物相比，单独的以及与LEED或HELD 5-氮杂胞苷组合的吉特替尼显著提高了存活率(吉特替尼相比媒介物，p＝0.003;LEED+吉特替尼相比媒介物，p＝0.003;HELD+吉特替尼相比媒介物，p＝0.003)。与单独的LEED或HELD 5-氮杂胞苷相比，与吉特替尼组合的低暴露延长持续时间或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+吉特替尼相比LEED，p＝0.019;LEED+吉特替尼相比HELD，p＝0.004;HELD+吉特替尼相比LEED，p＝0.008;HELD+吉特替尼相比HELD，p＝0.003。此外，与单独的吉特替尼相比，与吉特替尼组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷给药显著提高了存活率(LEED+吉特替尼相比吉特替尼，p<0.001;HELD+吉特替尼相比吉特替尼，p<0.001)。与媒介物或单一药剂相比，采用与吉特替尼组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷增加了中值存活期(LEED+吉特替尼＝45天，HELD+吉特替尼＝43天，媒介物＝19天，吉特替尼＝34天，LEED＝36天，HELD＝32天)(图17K)。

[0220] 总之，这些结果表明与FLT3抑制剂组合的LEED或HELD 5-氮杂胞苷在杀伤AML细胞方面比单独的单一药剂5-氮杂胞苷或FLT3抑制剂显著更有效。

5-氮杂胞苷/维奈妥拉/CC-90011三重组合测定

[0221] 如以下实施例中所用，CC-90011是指4-[2-(4-氨基-哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-2-氟-苄腈，包括苯磺酸盐。

[0222] CC-90011(30mM于DMSO中)获自Celgene化合物收集库，用DMSO稀释为10mM原液，并等分并储存在-80℃中。将AML细胞系以每孔2,000个细胞接种在384孔板中，然后在具有以下的矩阵形式中处理：在第0天6种浓度的CC-90011以及9种浓度的5-氮杂胞苷与维奈妥拉的混合物(其比率对应于每种化合物的EC_{50})。在第1、2和3天每日施用5-氮杂胞苷，而在第4天施用维奈妥拉。随后根据制造商的说明(Promega Inc.)使用CellTiter-Glo®试剂测定细胞活力。使用Prism 7.03(GraphPad软件)通过非线性回归算法确定诱导50％细胞死亡的有效浓度(EC_{50})。通过Combenefit软件(DiVeroli Bioinformatics2016)使用最高单用药效法模型分析协同指数和3D图。

5-氮杂胞苷、维奈妥拉和CC-90011的组合结果

[0223] 在22种AML细胞系中评估了CC-90011、AZA和维奈妥拉作为单一药剂处理诱导细胞毒性的功效(图18A)。这些细胞系中的十一种细胞系对CC-90011敏感，其中8种细胞系对CC-90011、AZA和维奈妥拉敏感，并且3种细胞系对AZA和CC-90011敏感但对维奈妥拉不敏感(EC_{50}大于使用的维奈妥拉的最大浓度，10μM)。四种细胞系对AZA和维奈妥拉敏感，但对CC-90011有耐药性(EC_{50}>10μM)，而7种细胞系对维奈妥拉和CC-90011二者有耐药性(图18A)。

[0224] LSD抑制剂增加了几种AML细胞系和人AML异种移植模型中的分化(图18B)。为了研究CC-90011对分化标记物的诱导，在CC-90011处理后使用流式细胞术测量在22种AML细胞

系中的CD11b、CD14和CD86表面标记物表达。这些细胞系中的十七种增加了这些分化标记物中的至少一种的表达，而五种细胞系中这些分化标记物中的任何一种都没有变化，这五种细胞系包括HEL、KG-1、MOLM-13、KG-1a和NOMO-1(图18B)。值得注意的是，增加的分化标记物表达与对CC-90011细胞毒性的敏感性不相关。

[0225] 为了检查AZA+Ven+CC-90011三重组合是否在AML细胞系中展现出协同作用，将22种AML细胞系中的13种用不同浓度的AZA+Ven+CC-90011处理(图18C和图19A-图19M)。在处理7天后，使用CellTiter-Glo®检查细胞活力，并使用Combenefit计算协同作用，并使用“最高单用药效法”建模(图19A-图19M)进行面映射。用AZA+Ven+CC-90011处理的AML细胞系具有不同程度的协同作用，因为MUTZ-8和OCI-AML3具有极高的协同作用(协同指数得分分别为115和112)。相比之下，GDM-1和Kasumi-1几乎没有协同作用(协同指数分别为6和15)。对单一药剂维奈妥拉或CC-90011有耐药性的细胞系(SIG-M5、MOLM-13、HNT-34、OCI-AML3和THP-1)对AZA+Ven+CC-90011三重组合有反应。这表明AZA+Ven+CC-90011三重组合可能在AML患者中具有功效，即使这些患者最初对维奈妥拉或CC-90011有耐药性也如此。

[0226] 为了确定与AZA+CC-90011或Ven+CC-90011相比，AZA+Ven+CC-90011三重组合是否更有效，将三重组合与这些药剂的成对组合进行比较(图20A-图20D)。在OCI-AML-2中，AZA+CC-90011(图20A)、Ven+CC-90011(图20B)或AZA+Ven(图20C)的双重组合在OCI-AML2细胞中没有展现出协同作用。然而，当将OCI-AML2用AZA+Ven+CC-90011组合处理时(图20D)，协同作用明显增加。

[0227] 这证明在OCI-AML2细胞中，三重组合比单独的单一药剂或任何双重组合在杀伤白血病细胞方面更佳。

实施例2

[0228] 如以下实施例中所用，CC-90011是指4-[2-(4-氨基-哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基-苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-2-氟-苄腈的苯磺酸盐。

[0229] 研究目标：本研究的一个示例性目标是评价与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011在没有资格进行强化诱导的AML初治受试者中的安全性和耐受性。

[0230] 另一个目标包括：(1)评估与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011在没有资格进行强化诱导化疗的AML初治受试者中的初步功效；以及(2)通过多色流式细胞术(MFC)和/或下一代测序(NGS)评价微小残留病(MRD)反应率和MRD转化率。

[0231] 另外的目标包括：(1)通过骨髓抽吸评估和外周血涂片检查来探索MRD反应的持续时间；(2)表征CC-90011在与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合给予时的PK曲线；(3)表征PD以了解与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的机制效应；(4)探索与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的PK、PD生物标记物和/或临床结局之间的关系；(5)评价骨髓和血液中与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的功效相关的分子和/或细胞标记物；和(6)评价与维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的CC-90011的基线后输注非依赖率

[0232] 研究终点显示在下表3中。

表3：研究的研究终点

终点	名称	描述	时间范围
主要	安全性和耐受性	不良事件(使用NCI CTCAE 5.0版)、实验室检查、生命体征、ECG、ECOG体能状态、LVEF、体格检查、伴随用药和剂量修改。	从ICF签名直到最后一次CC-90011给药后28天
	RP2D	使用NCI CTCAE标准5.0版评价的DLT和MTD(如果达到)	在剂量递增部分中从C1D1到周期1结束
次要	初步功效	CR/CRh率：定义为实现CR或CRh的比率(由研究者评估)	从C1D1直到最后一次给药后28天。功效评估将在周期2、3、4的第1天进行，然后之后每2个周期进行一次(例如，周期6、8、10等)
		ORR：定义为实现CR/CR_{MRD-}/CRi/PR/MLFS的比率	从C1D1直到最后一次给药后28天。功效评估将在周期2、3、4的第1天进行，然后之后每2个周期进行一次(例如，周期6、8、10等)
		DOR(CR/CRh)	从第一次CR或CRh起的时间到记录的疾病复发或死亡日期，以较早者为准。
		DOR(CR/ CR_{MRD-}/CRi/ PR/MLFS)	从第一次CR、CR_{MRD-}、CRi、PR或MLFS起的时间到记录的疾病复发、进展或死亡日期，以较早者为准。

次要(续)	初步功效	EFS	从第一剂CC-90011到首次出现来自任何原因的复发或进展或死亡。在数据截止日期没有复发/进展或死亡的受试者将在其最后一次充分的肿瘤评估日期时删失。
		OS	从第一剂CC-90011到因任何原因死亡之日。在分析截止日期时还存活的受试者将在最后一次接触日期删失。
	MRD反应率	疾病负荷至少减少一个对数或MRD阴性(10^{-3})测试结果的比率	MRD评估将在筛选时在周期2、3、4的第1天进行，然后之后每2个周期进行一次(例如，周期6、8、10等)
	MRD转化率	在治疗的任何时间实现MRD阴性(10^{-3})的受试者比率	MRD评估将在筛选时在周期2、3、4的第1天进行，然后之后每2个周期进行一次(例如，周期6、8、10等)
探索性	MRD反应的持续时间	通过针对MRD进行连续骨髓抽吸评估来评价MRD反应的持久性	从实现第一次MRD反应到具有阳性MRD结果或疾病负荷增加至少一个对数的时间。死亡将删失。
	PK	表征CC-90011的PK	周期1-周期3中的所有计划时间点
探索性(续)	PK/PD	评估在PK/PD生物标记物与和维奈妥拉及5-氮杂胞苷组合的CC-90011的临床结局之间的关系	周期1和指定时间点的后续周期
	药效学	外周血中MMD和MYL9的基因表达	选择与PK并行的时间点(第1-22天)
	药效学	CC-90011：使用来自对MRD群体的骨髓抽吸的基因表达和/或流式细胞术，分析髓样谱系标记物(例如CD86和CD11b)、免疫细胞亚群、以及LSC和祖细胞群体。 AZA：血液中的DNA甲基化变化； VEN：细胞凋亡调节物(BCL-2、MCL-1)，使用基因表达；BH3概况	从入组到研究中止
	预测性生物标记物	对于骨髓抽吸物，使用NGS单细胞RNAseq对分选的MRD细胞进行的基因突变分析	从入组到研究中止
	基线后输注非依赖率	在基线时依赖输注并在基线后转化为不依赖输注的受试者的比率	从C1D1直到最后一次给药后28天。

缩写：AE＝不良事件；AZA＝5-氮杂胞苷；BCL-2＝B细胞淋巴瘤2；BH3＝BCL-2同源结构域3；C1D1＝周期1第1天；CD＝分化簇；CD11b＝CD11抗原样家族成员B；CR＝完全缓解；CRh＝血液学部分恢复的CR；CRi＝血液学恢复不完全的CR；CR_{MRD-}＝无微小残留病的CR；DLT＝剂量限制性毒性；DNA＝脱氧核糖核酸；DOR＝反应持续时间；ECG＝心电图；ECOG＝东部肿

瘤协作组;EFS＝无事件存活;ICF＝知情同意书;LVEF＝左心室射血分数;MLFS＝形态学无白血病状态;LSC＝白血病干细胞;MCL-1＝髓样细胞白血病1;MLFS＝形态学无白血病状态;MMD＝单核细胞巨噬细胞分化关联蛋白;MRD＝微小残留病;MYL9＝肌球蛋白轻链9;NCI＝国家癌症研究所;NGS＝下一代测序;ORR＝总反应率;OS＝总存活期;PD＝药效学;PK＝药代动力学;PR＝部分缓解;RNAseq＝核糖核酸测序;RP2D＝推荐2期剂量;VEN＝维奈妥拉。

[0233] 有资格入组的受试者将患有新诊断的AML,并且必须由于年龄≥75岁或年龄≥60岁至74岁且伴有排除使用强化诱导化疗的共病而无资格进行强化诱导化疗。

[0234] 本研究将由以下2部分组成:剂量递增和剂量扩展部分,分别将招募多达大约18名受试者和40名受试者。

[0235] 图21示出总体研究设计。

[0236] 所有受试者将在周期1期间入院以进行维奈妥拉剂量斜升(第1-3天),并且至少最低限度直到周期1第8天。受试者可以继续研究治疗,直到证明有记录的从CR或部分缓解(PR)的复发、疾病进展、一个或多个不可接受的不良事件、阻止进一步施用治疗的间发疾患、研究者决定撤回受试者、受试者撤回同意、不依从试验治疗或程序要求、死亡或管理原因。

[0237] 剂量递增 剂量递增部分将确定在28天周期中CC-90011与维奈妥拉和5-氮杂胞苷一起的MTD(如果达到)和组合推荐2期剂量(RP2D)。剂量递增将评价CC-90011的3个剂量水平:20mg PO QW、40mg PO QW和60mg PO QW,与维奈妥拉和5-氮杂胞苷的标准给药组合,并且每个剂量队列中可招募3至6名受试者。剂量递增部分将招募大约9至18名受试者。

[0238] 剂量递增将通过mTPI-2设计来指导(Guo,W.等人,Contemp Clin Trials.2017年7月;58:23-33),并且可以基于SRC对临床安全性和实验室数据的审查探索替代剂量和/或时间表。

[0239] 剂量扩展 一旦确定了三重组合疗法的MTD和/或RP2D,就在剂量扩展部分中将招募大约40名受试者,以进一步评价CC-90011与维奈妥拉和5-氮杂胞苷的施用组合RP2D的安全性和初步功效。按剂量修改指南,基于观察到的安全性,可能会发生剂量减少。

[0240] 筛选期 在研究治疗开始前28天内的筛选时间段期间将进行受试者筛选程序。在开始任何其他研究程序之前,必须由受试者和管理人员在知情同意书(ICF)上签名和标注日期。所有筛选测试和程序必须在研究治疗开始前28天内完成。

[0241] 治疗期 在确认有资格后,受试者入组,并开始在连续4周(28天)周期中每周一次用口服CC-90011治疗。应在每个治疗周期的第1天开始研究治疗,允许窗口为±3天。研究访视将每日进行,从周期1第1天开始直到周期1第8天;然后至少每周进行,持续前3个周期;然后从周期4开始在每个后续周期中,每两周(第1天和第15天)进行。

[0242] 所有受试者将在周期1期间住院以进行维奈妥拉剂量斜升(第1-3天),并且至少直至周期1第8天,并将接受肿瘤裂解综合征(TLS)的预防和监测。这种住院治疗需要符合方案进行,且不构成严重不良事件。在不存在残留形态学白血病的情况下并且在周期1完成时存在持续血细胞减少症的情况下,可以将CC-90011、维奈妥拉和/或5-氮杂胞苷中断长达14天以允许血液学恢复。对于嗜中性粒细胞减少症的管理,如果患者在完成循环1后实现CRi或具有无形态学白血病状态(MLFS),则可以延迟后续周期以允许从第29天恢复ANC直至ANC达到≥500/μL或长达14天。嗜中性粒细胞减少症的复发事件可以通过减少治疗强度(即对于

随后的周期,维奈妥拉至21天;和/或5-氮杂胞苷剂量根据标签降低)来解决。

[0243] 在周期1期间不允许CC-90011的受试者内剂量递增,但如果SRC批准,可以在后面的周期中允许递增至后续认为在较高给药队列中耐受的剂量。

[0244] 为了允许有从治疗中受益的最佳机会,并且鉴于CC-90011的作用机制以及维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的中值反应时间,研究者应旨在治疗患者至少3个周期,但受试者可以在以下情况下提前中止治疗:他们证明记录的从CR或PR复发、疾病进展、一个或多个不可接受的不良事件、阻止进一步施用治疗的间发疾患、调查者决定撤回受试者、受试者撤回同意、不依从试验治疗或程序要求、死亡或管理原因。

[0245] 因复发或耐药性疾病以外的原因中止CC-90011的受试者可以继续使用维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合,直到证明有复发或耐药性疾病或者直到受试者由于不良事件而不再能够耐受治疗,即使根据研究者的判断受试者正在接受益处也如此。中止维奈妥拉和5-氮杂胞苷的组合治疗的受试者也将中止用CC-90011治疗。

[0246] 治疗结束(EOT) 治疗将继续直到记录到从CR或PR的复发、疾病进展、一个或多个不可接受的不良事件、阻止进一步施用治疗的间发疾患、研究者决定撤回受试者、受试者撤回同意、不依从试验治疗或程序要求、死亡或管理原因。

[0247] 治疗结束(EOT)访视应在最后一剂CC-90011后的最早日期且在自最后一次给药之日起14天内进行。如果EOT在按时间表的访视期间发生,则还必须完成所有EOT评估。

[0248] 随访期 在随访期中,在安全性随访中,将在最后一次CC-90011给药或最后一次研究访视后对受试者追踪28天(±3天),以较晚者为准。在安全性随访后,后续的每4周(±2周)对所有受试者进行追踪以进行存活随访,持续直至1年或直至死亡、失访、撤回进一步数据收集的同意、或试验结束,以先发生者为准。可以通过对受试者、家属或受试者的主治医生的记录审查(包括公共记录)和/或电话联系来进行存活随访。

[0249] 受试者的研究持续时间 整个研究的预期持续时间为大约5年,其中包括大约25个月的入组期、最长28天的筛选期、15个月的治疗期和最后一次给药后1年的存活随访期。研究的实际持续时间将取决于受试者的中值治疗持续时间和随访。

[0250] 每名单独受试者的预期研究持续时间为大约2年,包括最长28天的筛选期、大约15个月的治疗期、和最后一次给药后1年的存活随访期。

[0251] 试验结束 试验结束被定义为最后一个受试者完成治疗后随访的最后一次访视的日期,或从最后一个受试者收到为主要、次要和/或探索性分析(如方案中预先规定的)所需的最后一个数据点的日期,以较晚的日期为准。

[0252] 研究人群/估计患者人数 本研究将招募多达58名没有资格进行强化诱导化疗的AML初治受试者:在剂量递增中大约9至18名受试者,以及在剂量扩展中大约40名受试者。

[0253] 关键纳入标准 受试者将满足以下标准才能入组研究:(1)在进行任何与研究相关的评估/程序之前,受试者必须理解并自愿签署知情同意书(ICF)。(2)受试者愿意并且能够遵守研究访视时间表和其他方案要求。(3)经组织学证实为世界卫生组织(WHO)分类定义的初治AML,并且在签署知情同意书时年龄≥75岁或在签署ICF时年龄≥60岁至74岁伴有由以下定义的排除使用强化诱导化疗的共病:(a)≥60岁至74岁,至少有以下共病之一:(i)东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态为2;(ii)需要治疗的充血性心力衰竭(CHF)的心脏史,或射血分数≤50%,或通过多门控采集(MUGA)或超声心动图(ECHO)确定的慢性稳定型心绞痛;

(iii)肌酐清除率≥30mL/min至<45mL/min;(iv)中度肝功能损害,其中总胆红素>1.5至≤3.0倍正常值上限(ULN);(v)医生判断为与强化化疗不相容的任何其他共病必须在筛选期间和研究入组之前由发起者进行审查。(4)受试者的推断期望寿命必须为至少12周。(5)除羟基脲治疗高白细胞血症外,受试者未接受过对于AML的先前疗法。(6)受试者的ECOG体能状态为0至2。(7)受试者必须具有以下筛选实验室值:(a)白细胞(WBC)计数≤25 x 10^9/L。允许羟基脲或白细胞单采术满足此标准。(b)钾和镁在正常限值内或可通过补充剂纠正。(c)尿酸≤7.5mg/dL(446μmol/L)。允许使用降尿酸剂(例如别嘌呤醇、拉布立酶)进行先前和/或并行治疗。拉布立酶在基线葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏的受试者中是禁忌的。(d)国际归一化比率(INR)<1.5 x ULN,并且活化部分凝血活酶时间(aPTT)<1.5 x ULN。(8)足够的器官功能,定义为:(a)肾功能:肌酐清除率≥30mL/min,通过Cockcroft Gault公式计算或通过24小时尿液收集测量;(b)肝功能:AST、ALT≤3x ULN、胆红素≤1.5x ULN,除非由于吉尔伯特综合征或白血病器官受累。<75岁的受试者可具有≤3.0x ULN的胆红素;(c)通过MUGA或ECHO得出的左心室射血分数(LVEF)>50%。(9)受试者必须能够并愿意在第一次给药维奈妥拉之前和在周期1期间接受住院治疗、补水和用降尿酸剂治疗。(10)具有生育潜力的女性(FCBP)是指如下女性:1)在某个时间点月经初潮,2)未进行子宫切除术或双侧卵巢切除术,或3)未自然绝经后(癌症疗法后闭经或其他医疗病症不排除在具有生育潜力之外)持续至少连续24个月(即在前面的连续24个月期间的任何时间有月经)。具有生育潜力的女性必须:(a)承诺在与本研究相关的以下时间段期间,真正禁欲*而不与异性性接触(必须每月审查并记录来源)或同意使用并能够遵守一种高效避孕方法加一种阻隔方法:1)从签署ICF开始;2)在接受研究治疗时;3)在剂量中断期间;以及4)在受试者最后一次CC-90011给药后持续至少45天,在最后一次维奈妥拉给药后持续30天,或在最后一次5-氮杂胞苷给药后持续90天,以较晚者为准。高效避孕方法是组合的(含有雌激素和孕激素)或仅含孕激素的与抑制排卵相关的激素避孕(口服、注射、阴道内、贴片或植入);双侧输卵管结扎术;宫内节育器(IUD);宫内激素释放系统;或输精管切除的伴侣绝育(注意,如果伴侣是FCBP试验参与者的唯一性伴侣并且输精管切除伴侣已收到手术成功的医学评估,则输精管切除的伴侣是一种高效节育方法)。阻隔方法是男用或女用乳胶或非乳胶合成避孕套、隔膜、宫颈帽或含杀精剂的海绵。(b)在开始研究治疗之前经研究者验证的两次妊娠测试阴性:(i)在筛选时血清妊娠测试阴性(灵敏度至少为25mIU/mL);(ii)研究治疗的周期1第1天之前72小时内血清或尿液妊娠测试阴性。尿液妊娠测试的灵敏度必须为至少25mIU/mL。(c)同意在研究历程期间持续进行妊娠测试。即使受试者践行真正禁欲*而不与异性性接触,这也适用。(d)在治疗中以及在最后一次CC-90011给药后45天内、在最后一次维奈妥拉给药后30天内或在最后一次5-氮杂胞苷给药后90天内(以较晚者为准),避免受孕或捐赠卵子。(11)男性受试者必须:(a)在参与研究时、在剂量中断期间、以及在受试者最后一次CC-90011给药后至少105天内、在最后一次维奈妥拉给药后95天内、或在最后一次5-氮杂胞苷给药后90天内(以较晚者为准),践行真正禁欲*而不与异性性交(必须每月审查)或同意在与怀孕女性或FCBP性接触期间使用避孕套(推荐乳胶或非乳胶合成避孕套),即使他已经成功进行了输精管切除术也如此。同意在治疗时以及在最后一次CC-90011给药后至少105天内、在最后一次维奈妥拉给药后95天内、或在最后一次5-氮杂胞苷给药后90天内(以较晚者为准)不捐献精液或精子。(*如果符合首选和通常的生活方式,真正的禁欲是可接受的,[定

期禁欲(例如,日历、排卵、症状体温;使用体温来确定排卵时间)和戒断是不可接受的避孕方法]。)

[0254] 研究产品(CC-90011) CC-90011将以胶囊提供,用于口服施用。这些胶囊将装在带有儿童防护盖的高密度聚乙烯瓶中,并根据相关国家卫生当局的规定适当标记以供研究使用。CC-90011配制的胶囊有以下剂量可获得:20mg、40mg和60mg。

[0255] CC-90011应储存在室温下(低于25℃[77°F]),并且必须在标签上单独指定的有效期内使用。受试者不应大量接触CC-90011胶囊,并应保持在包装中的储存直至摄入。

[0256] 研究产品(维奈妥拉) 维奈妥拉(VENCLEXTA®)有10mg、50mg和100mg片剂可供口服施用。受试者将能够通过他们当地的医院药房或许可经销商获得市售产品。

[0257] 研究产品(5-氮杂胞苷) 注射用5-氮杂胞苷以在100mg单剂量小瓶中的冻干粉末形式提供,用于重构和施用。受试者将能够通过他们当地的医院药房或许可经销商获得市售产品。

[0258] 治疗施用和时间表 为了允许有从治疗中受益的最佳机会,并且鉴于CC-90011的作用机制以及维奈妥拉和5-氮杂胞苷组合的中值反应时间,受试者应被治疗至少3个周期,但受试者可以在以下情况下较早中止治疗:他们证明记录的从CR或PR复发、疾病进展、一个或多个不可接受的不良事件、阻止进一步施用治疗的间发疾患、调查者决定撤回受试者、受试者撤回同意、不依从试验治疗或程序要求、死亡或管理原因。在存在这些原因的情况下,受试者可以继续接受研究治疗。

[0259] 因复发或耐药性疾病以外的原因中止CC-90011的受试者可以继续使用组合药物,直到证明有复发或耐药性疾病或者直到受试者由于不良事件而不再能够耐受治疗,即使根据研究者的判断受试者正在接受益处也如此。中止维奈妥拉和5-氮杂胞苷的组合治疗的受试者也将中止用CC-90011治疗。

[0260] 将在连续4周(28天)周期(第1、8、15和22天)中每周一次PO给予CC-90011。CC-90011将与至少240mL(8盎司)的水一起施用。受试者应在CC-90011施用前至少禁食4小时,并在给药后长达1小时内避免任何食物摄入。受试者应在每次给药后至少1小时内禁断食物或其他药物摄入。

[0261] 剂量递增部分将从28天周期中的20mg PO QW剂量的CC-90011开始。如果耐受,可以开放40mg PO QW的第二剂量水平队列,随后是计划的60mg PO QW的第三剂量水平队列。如果在研究进行期间的任何时间都可以获得有关CC-90011安全性和耐受性的另外信息,则可以根据SRC的建议探索替代剂量和/或时间表。

[0262] 当CC-90011、维奈妥拉和5-氮杂胞苷在同一天施用时,首先施用CC-90011,随后在CC-90011给药后至少6小时施用5-氮杂胞苷,然后施用维奈妥拉。

[0263] 将根据批准的标签(Venclexta®,2019)在每个28天周期的第1至28天口服QD施用维奈妥拉。对于周期1进行短暂的剂量斜升,其中在第1天给药100mg,第2天给药200mg,以及第3天给药400mg。随后几天以400mg施用维奈妥拉。受试者将在周期1的维奈妥拉剂量斜升期间住院,至少直至周期1第8天。这种住院治疗需要符合方案进行,且不构成严重不良事件。应指导受试者在每天大约相同的时间±6小时服用他们的每日剂量。每个剂量应与一餐和水一起服用,并在尽可能短的时间内服用。应指导受试者整片吞服,而不要咀嚼片剂。在第一次维奈妥拉给药前3天内并且直至最后一次维奈妥拉给药,禁止食用葡萄柚、葡萄柚产

品、塞维利亚橙(包括含有塞维利亚橙的果酱)或杨桃。

[0264] 将根据批准的标签(VIDAZA®,2018)在每个28天周期的第1至7天以75mg/m^2作为IV输注液或SC注射液施用5-氮杂胞苷。

[0265] 如果静脉内施用5-氮杂胞苷,则应在用于CC-90011PK收集的手臂的对侧给予。这仅适用于对CC-90011进行密集PK样品收集的周期1的第1天。

[0266] 如果在7天给药时间段期间错过2次或更少的剂量,则应继续给药以使受试者接受完整的7天疗法。如果在7天给药时间段期间错过了3天或更长时间,研究者应联系发起者,并根据具体情况做出给药决定。

[0267] DLT可评价的受试者的定义 接受至少一个剂量的CC-90011和/或一种或多种组合药物的所有受试者都是安全性可评价的。

[0268] 在剂量递增期间在任何受试者队列中施用第一个剂量后,每个队列中的受试者将被观察至少28天(周期1,DLT窗口),之后可以开始下一个更高的方案指定剂量队列。

[0269] 对于被认为DLT可评价的受试者,受试者必须在接受至少一个剂量的CC-90011后已具有周期1DLT,或者已在没有DLT的情况下完成周期1。如果受试者在完成CC-90011计划剂量的75%(即28天内4个剂量的CC-90011中的3个剂量)以及第一个治疗周期的维奈妥拉和5-氮杂胞苷总计划剂量的80%(即>22个维奈妥拉剂量;≥6个剂量的5-氮杂胞苷)之前因毒性以外的原因(例如个人原因或疾病进展)退出研究,则该受试者将不被视为已完成治疗周期并将被替换。

[0270] 下一受试者队列中剂量递增的标准 SRC将做出剂量递增决定。对于SRC为剂量扩展选择的剂量水平,应在剂量递增部分对至少6名受试者进行DLT评价,以申明可耐受的剂量水平。

[0271] 剂量水平的数量取决于DLT的发生率。一名受试者可能会经历多于一种DLT。剂量递增决定是基于经历DLT事件的受试者的数量。

[0272] 功效评估 连续血液和骨髓取样将用于确定从周期2第1天开始对研究药物疗法的反应。

[0273] 在基线时,需要骨髓抽吸(BMA)样品。如果抽吸物不可用,则必须收集活检物,并且可以根据机构惯例在收集抽吸物之外还收集活检物。筛选时还需要来自BMA的细胞遗传学和分子谱分析(除非它们可以从受试者过去90天的医疗记录中输入)。全血细胞计数、外周血涂片(PBS)和BMA将用于确定每个时间点对疗法的反应。可在周期结束前最多4天例如第25至28天获得样品。

[0274] 每位研究者将根据报告的血液学实验室参数、外周血涂片、骨髓抽吸物和/或活检物评估对治疗的反应。

[0275] 将评价血液学反应,因为具有先前血液学障碍的受试者可能被招募到了研究中。输注依赖性定义为在研究治疗前8周内已接受了≥2个单位的RBC和/或血小板。输注非依赖性定义为8周的时间段内没有输注。

[0276] 当研究治疗中止时,受试者将接受治疗结束评价。治疗中止的原因将记录在eCRF页面和源文件中。

[0277] 还将在每次骨髓收集时通过MFC和/或NGS集中评价MRD状态。

[0278] 微小残留病评估将与功效评估同时进行,并将集中评估前者。中心将确保收集并

储存外周血和骨髓抽吸(BMA)/骨髓活检(BMB)样品,以用于在每次骨髓收集时进行探索性测试。

[0279] 疾病进展将被定义为:(1)骨髓原始细胞计数百分比从基线(筛选)骨髓原始细胞计数增加>50%(如果基线原始细胞<30%,则需要至少增加15%点;或在至少3个月内持续性骨髓原始细胞计数>70%;绝对嗜中性粒细胞计数(ANC)没有至少100%提高至绝对水平(>0.5 x 10^9/L)和/或非输注血小板计数>50 x 10^9/L),或外周原始细胞(WBC×%原始细胞)增加>50%,至>25 x 10^9/L(>25,000/μL)(在不存在分化综合征的情况下),或新的髓外疾病。

[0280] 疾病进展日期定义为骨髓原始细胞计数从基线增加>50%,在基线骨髓原始细胞计数>70%的受试者中骨髓原始细胞持续>70%,外周血原始细胞计数增加一倍,或新的髓外疾病。

[0281] 治疗失败将被定义为疾病进展或未至少实现PR。在没有疾病进展(如上定义)或不可接受的毒性的情况下,如果受试者获得益处,则根据研究者的判断,受试者可以继续接受治疗。

[0282] 骨髓抽吸和针芯取样(活检)应根据护理标准进行,并在当地中心的实验室根据国际血液学标准化委员会(ICSH)指南进行分析。

[0283] 急性髓性白血病反应标准将按最佳总体反应类别进行总结:CR/CRh率和总反应率(ORR)。ORR包括完全缓解(即CR、CR_{MRD-}、CRi)、形态学无白血病状态(MLFS)和部分缓解(PR)的所有反应。微小残留病(MRD)反应率和MRD转化率也将作为功效变量被评估。

[0284] 将总结包括总存活期(OS)、无事件存活期(EFS)和反应持续时间(CR/CRh和ORR)在内的其他临床活性测量。

[0285] 治疗中止后,每4周安排收集存活数据,持续最后一次给药后的1年或直至死亡、失访或撤回进一步数据收集的同意。

[0286] 对于血浆中CC-90011的PK评价,将在多个时间点从所有受试者收集血液样品。时间匹配的一式三份ECG也将在周期1第1天和周期1第2天的多个时间点收集。

[0287] 已经结合某些实施方案和实施例描述了本公开文本;然而,除非另有说明,否则所要求保护的本发明不应不适当地限制于这些具体实施方案和实施例。

[0288] 虽然已经说明和描述了某些实施方案,但是应理解,在不脱离如所附权利要求中限定的本技术的更广泛方面的情况下,可以根据本领域的普通技术在其中进行改变和修改。

[0289] 本文说明性描述的实施方案可以在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下进行合适的实践。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被扩展地且无限制地解读。另外,本文采用的术语和表述已经用作描述性术语而非限制性术语,并且没有意图使用这类术语和表述来排除所示或所述的特征的任何等同物或其部分,但是应认识到在所要求保护的技术的范围内的各种修改是可能的。另外,短语“基本上由……组成”将被理解为包括那些具体叙述的要素和那些实质上不影响所要求保护的技术的基本和新颖特征的另外要素。短语“由……组成”排除未指定的任何要素。

[0290] 另外,在根据马库什组(Markush group)描述本公开文本的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开文本也由此根据马库什组的任何单独成员或成员亚组来

描述。

[0291] 如本领域技术人员将理解的，出于任何和所有目的，特别是在提供书面描述方面，本文公开的所有范围还涵盖其任何和所有可能的子范围(包含端点)及子范围的组合。任何列出的范围都可以被容易地识别为充分描述相同的范围并使相同的范围能够分解成至少相等的两等份、三等份、四等份、五等份、十等份等。作为非限制性例子，本文讨论的每个范围都可以容易地分解成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还将理解的，诸如“至多”、“至少”、“大于”、“小于”等所有语言包括所列举的数字，并且是指可以随后分解成如上讨论的子范围的范围。最后，如本领域技术人员将理解的，范围包括每个单独成员。

[0292] 将本说明书中提及的所有出版物、专利申请、授权专利和其他文件均通过引用并入本文，如同具体且单独地指示将每个单独的出版物、专利申请、授权专利或其他文件通过引用以其整体并入一样。在通过引用并入的文本中包含的定义与本公开文本中的定义相抵触的程度上，将其排除。

[0293] 在以下权利要求中阐述了其他实施方案。

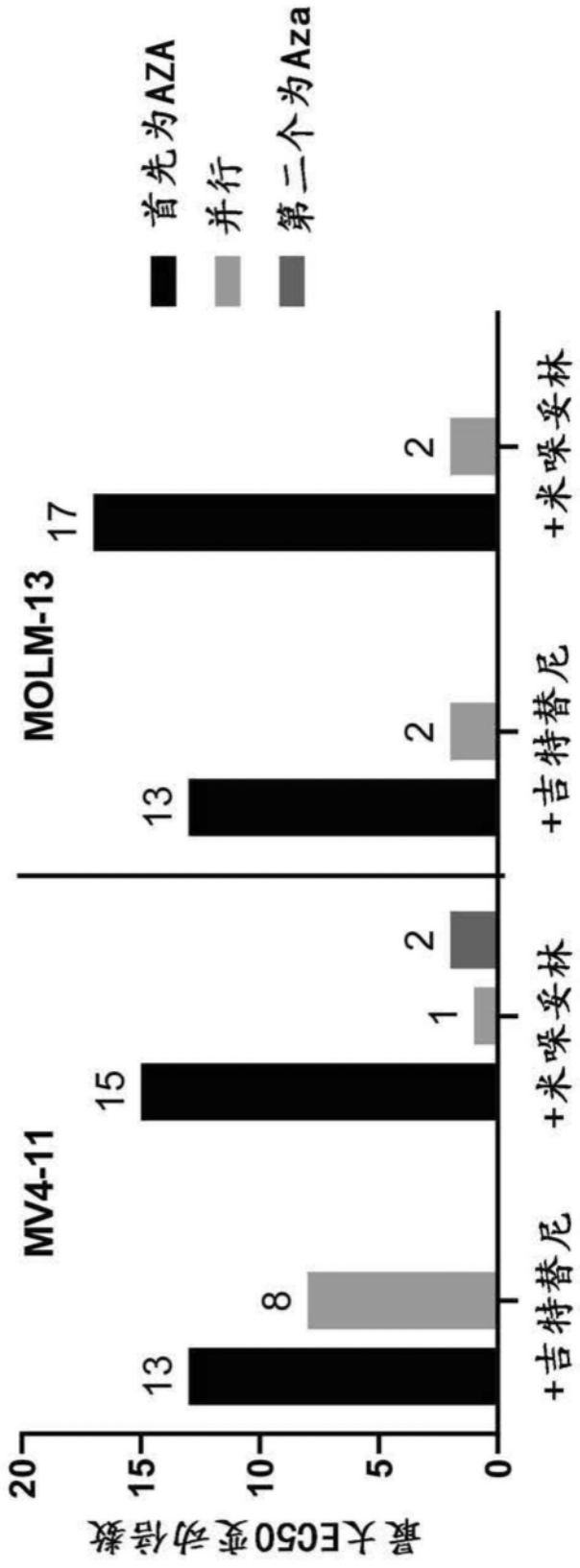

首先为AZA
并行
第二个为Aza
MV4-11
MOLM-13
13
8
15
1
2
13
2
17
2
+吉特替尼
+米哚妥林
+吉特替尼
+米哚妥林
0
5
10
15
20
最大ECSO变动倍数

FIG.1

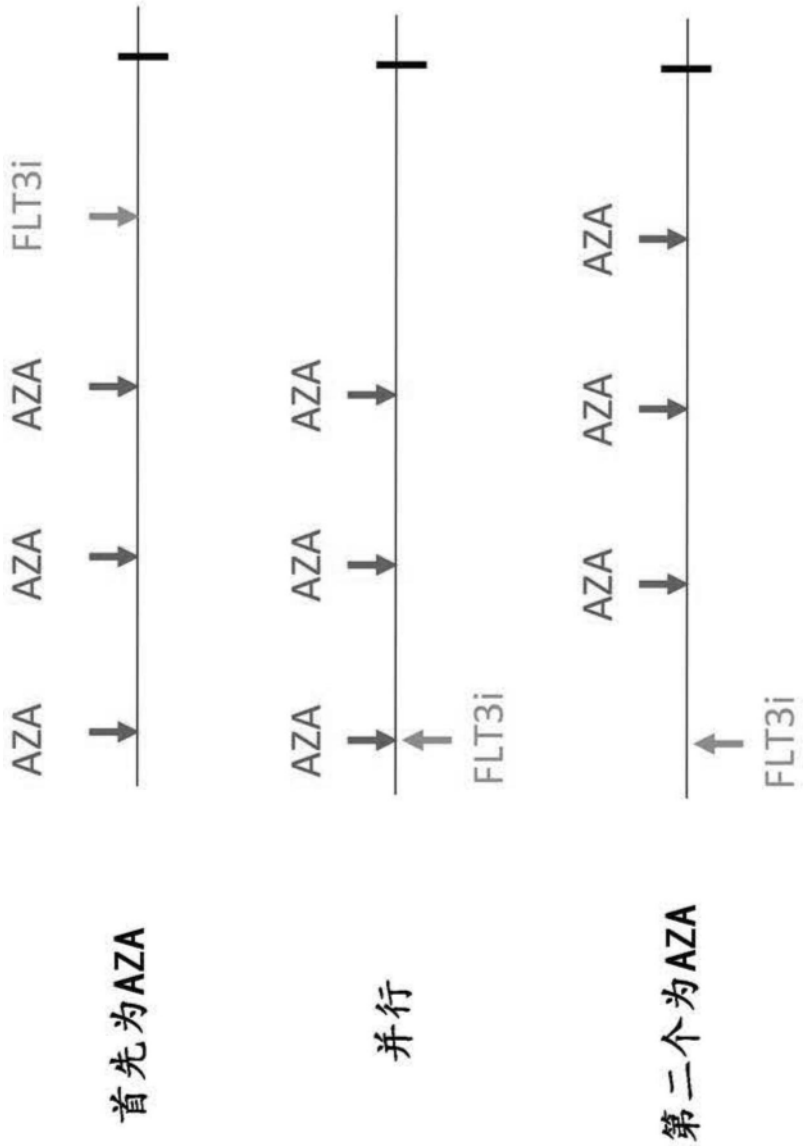

AZA
AZA
AZA
FLT3i
首先为AZA
AZA
AZA
FLT3i
并行
AZA
AZA
AZA
FLT3i
第二个为AZA

FIG.2

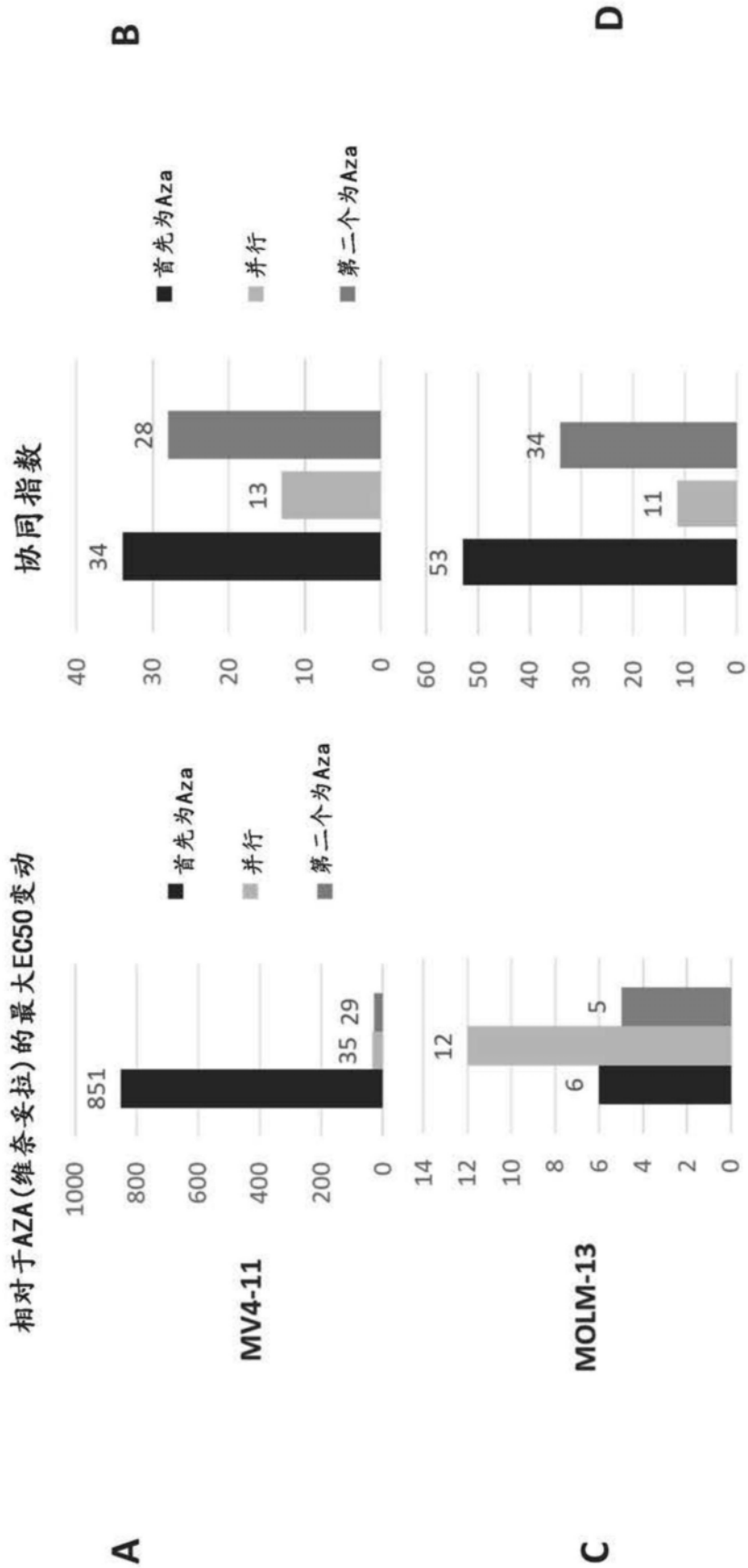

A
相对于AZA(维奈克拉)的最大EC50变动
首先为Aza
并行
第二个为Aza
MV4-11
851
35
29
1000
800
600
400
200
0
B
协同指数
34
13
28
40
30
20
10
0
C
MOLM-13
6
12
5
14
12
10
8
6
4
2
0
D
53
11
34
60
50
40
30
20
10
0

FIG.3

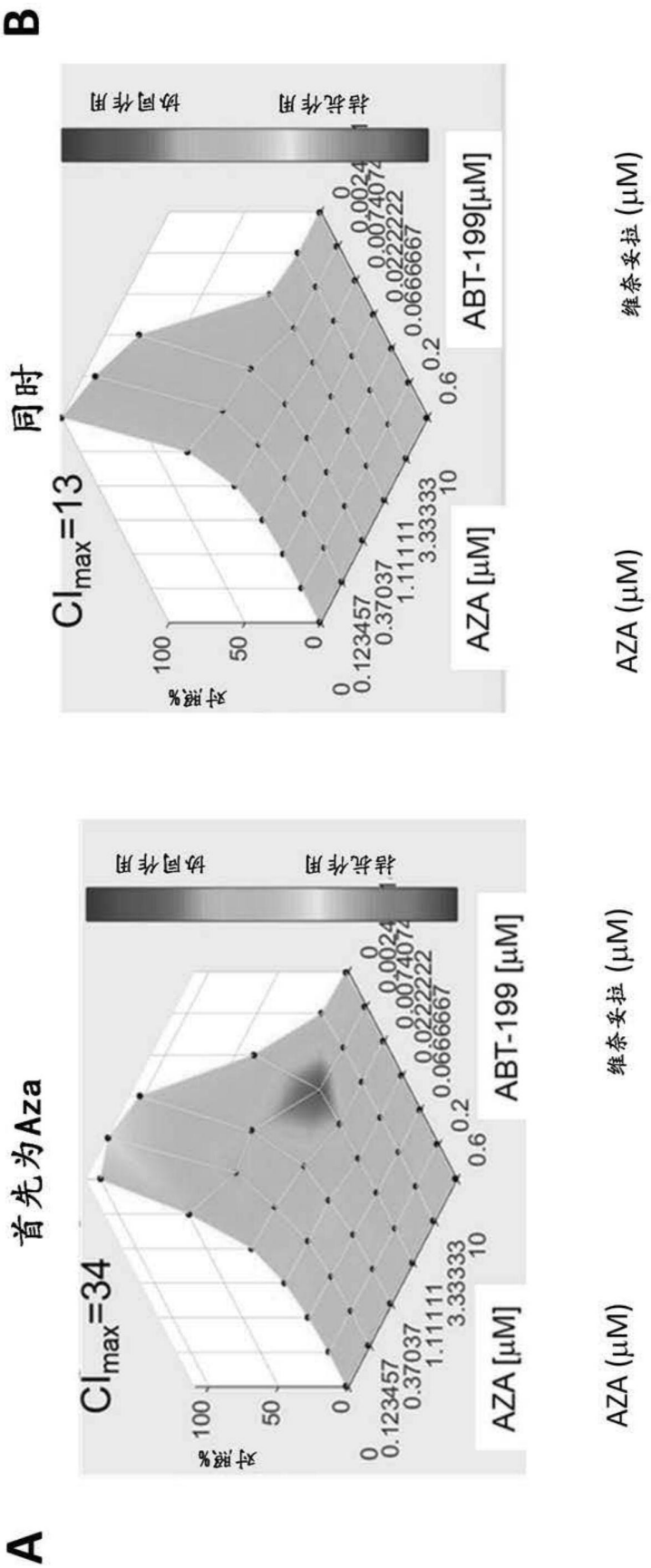

A
首先为Aza
CI_{max}=34
对照%
100
50
0
0
0.123457
0.37037
1.11111
3.33333
10
AZA [μM]
0
0.0024074
0.0074074
0.0222222
0.0666667
0.2
0.6
ABT-199 [μM]
维奈克拉 (μM)
AZA (μM)
拮抗作用
协同作用
B
同时
CI_{max}=13
对照%
100
50
0
0
0.123457
0.37037
1.11111
3.33333
10
AZA [μM]
0
0.0024074
0.0074074
0.0222222
0.0666667
0.2
0.6
ABT-199[μM]
维奈克拉 (μM)
AZA (μM)
拮抗作用
协同作用

FIG.4

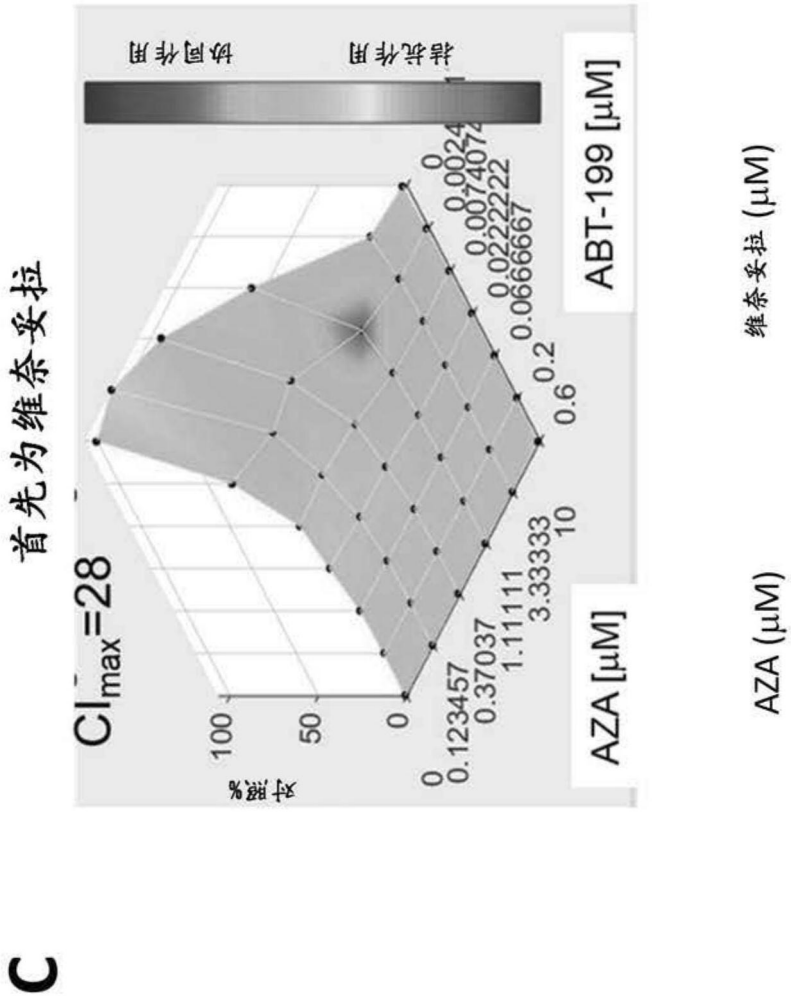

C
首先为维奈妥拉
CI_{max}=28
对照%
100
50
0
0
0.123457
0.37037
1.11111
3.33333
10
AZA [μM]
0
0.0024
0.00740741
0.0222222
0.0666667
0.2
0.6
ABT-199 [μM]
协同作用
拮抗作用
AZA (μM)
维奈妥拉 (μM)

FIG.4(续)

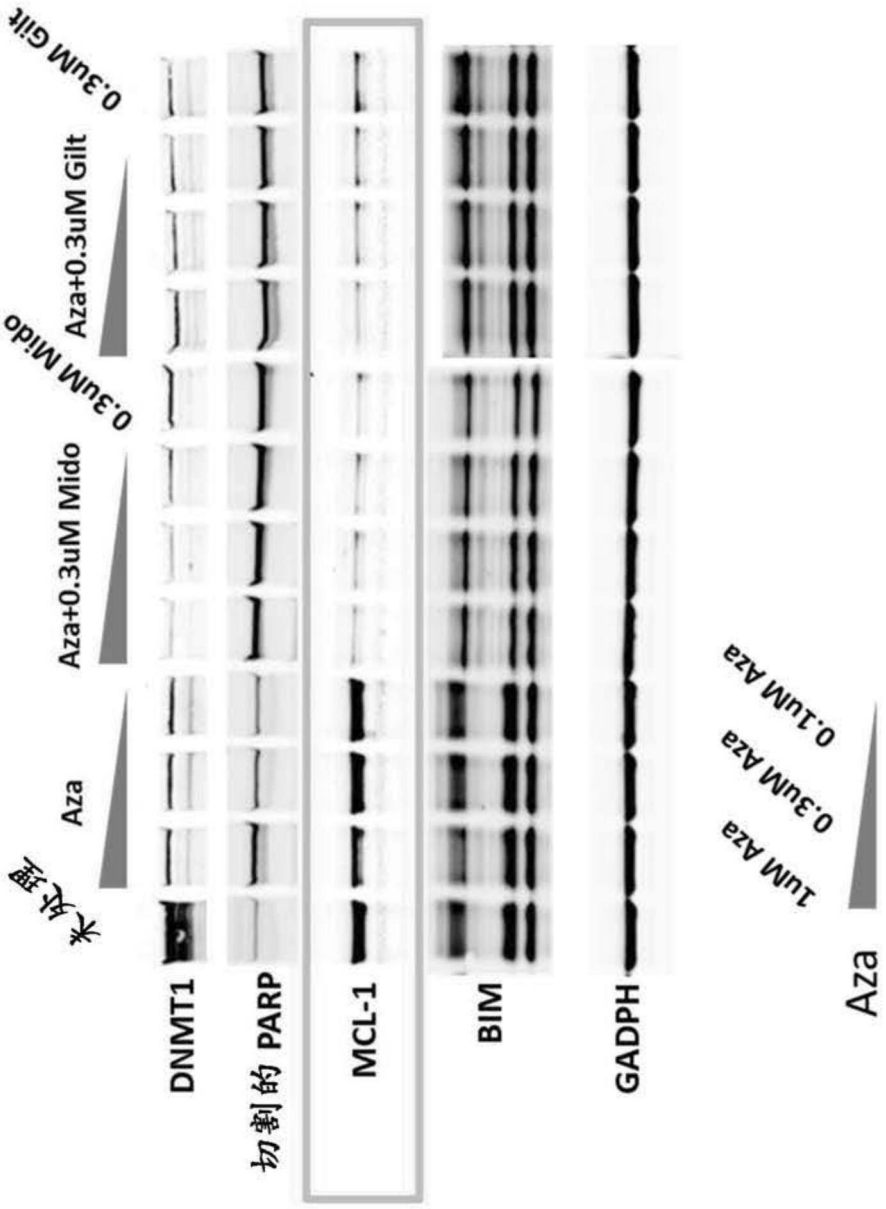

未处理
Aza
Aza+0.3uM Mido
Aza+0.3uM Gilt
0.3uM Mido
0.3uM Gilt
DNMT1
切割的 PARP
MCL-1
BIM
GADPH
1uM Aza
0.3uM Aza
0.1uM Aza
Aza

FIG.5

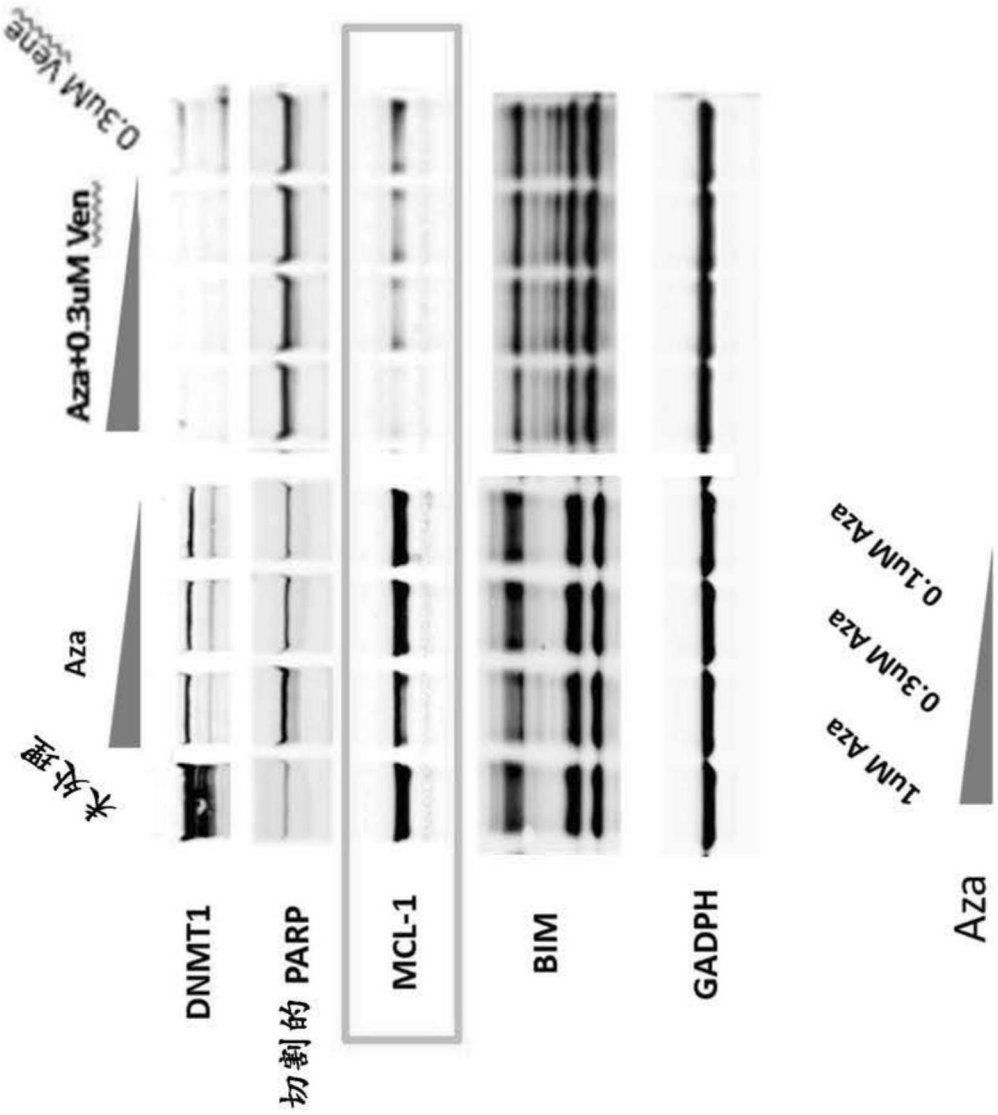

未处理
Aza
Aza+0.3uM Ven
0.3uM Vene
DNMT1
切割的 PARP
MCL-1
BIM
GADPH
Aza
1uM Aza
0.3uM Aza
0.1uM Aza

FIG.6

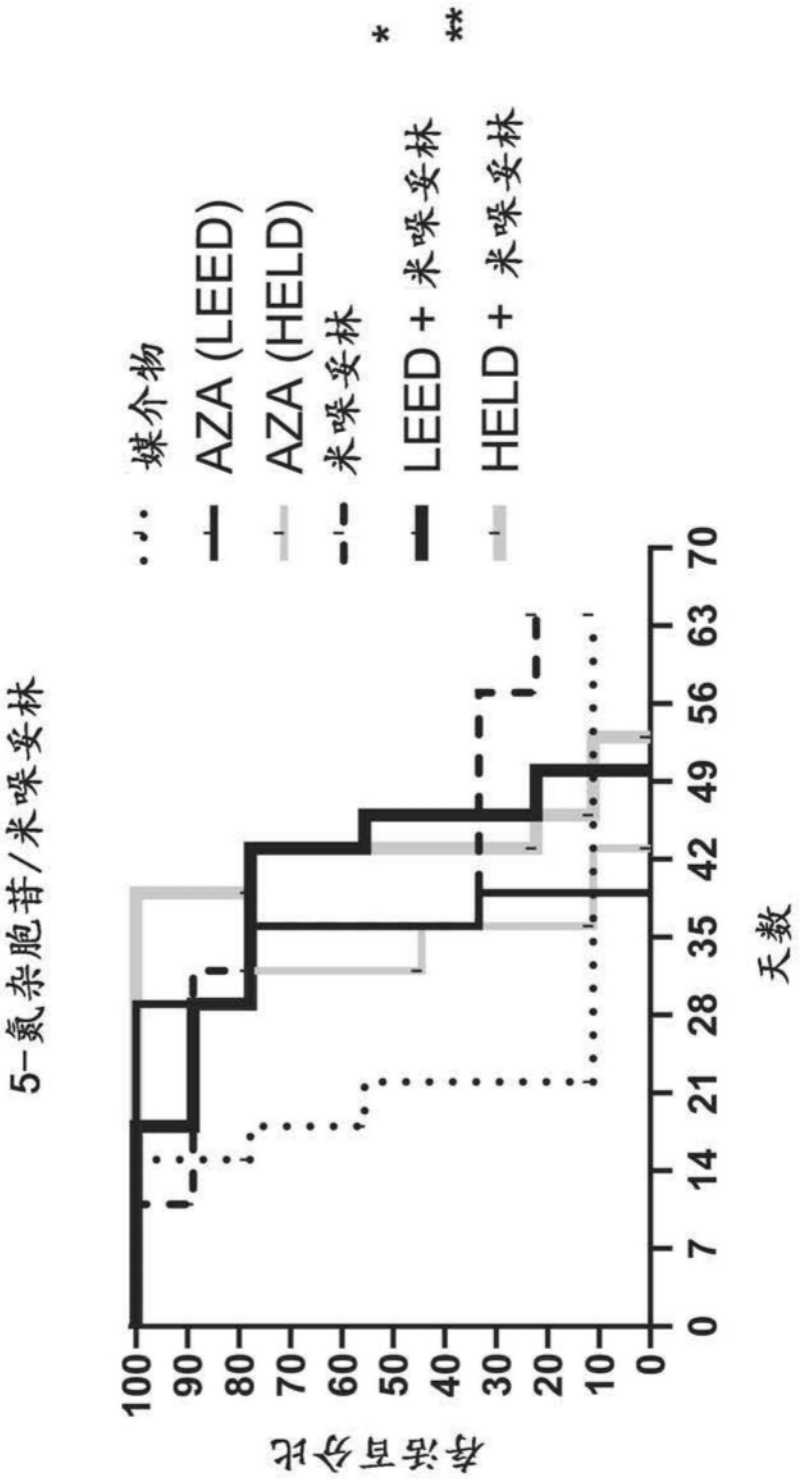

5-氮杂胞苷/米哚安林
存活百分比
天数
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
米哚安林
LEED + 米哚安林
HELD + 米哚安林
*
**

FIG.7A

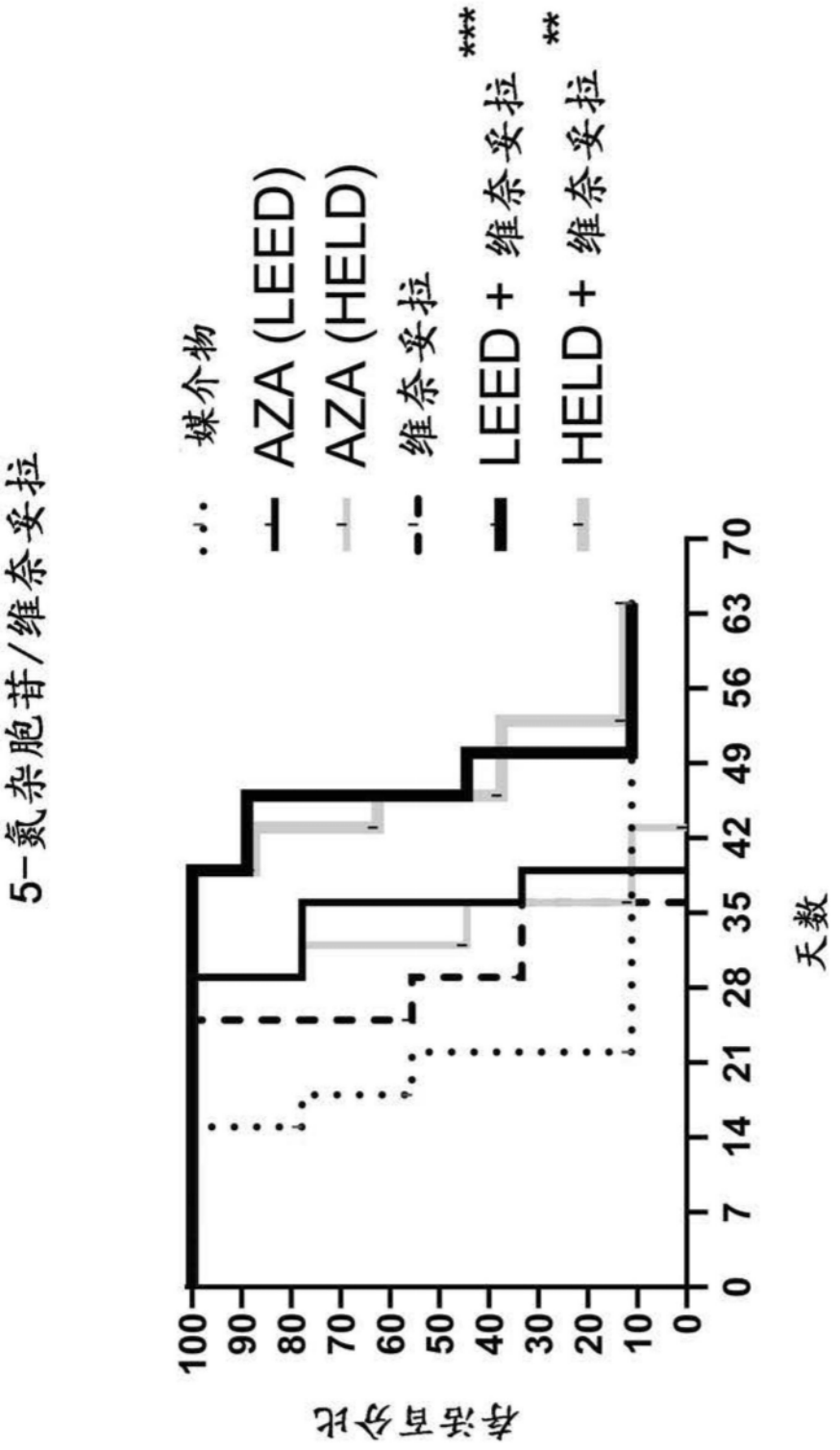

5-氮杂胞苷/维奈妥拉
存活百分比
天数
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
维奈妥拉
LEED + 维奈妥拉
HELD + 维奈妥拉
***
**

FIG.7B

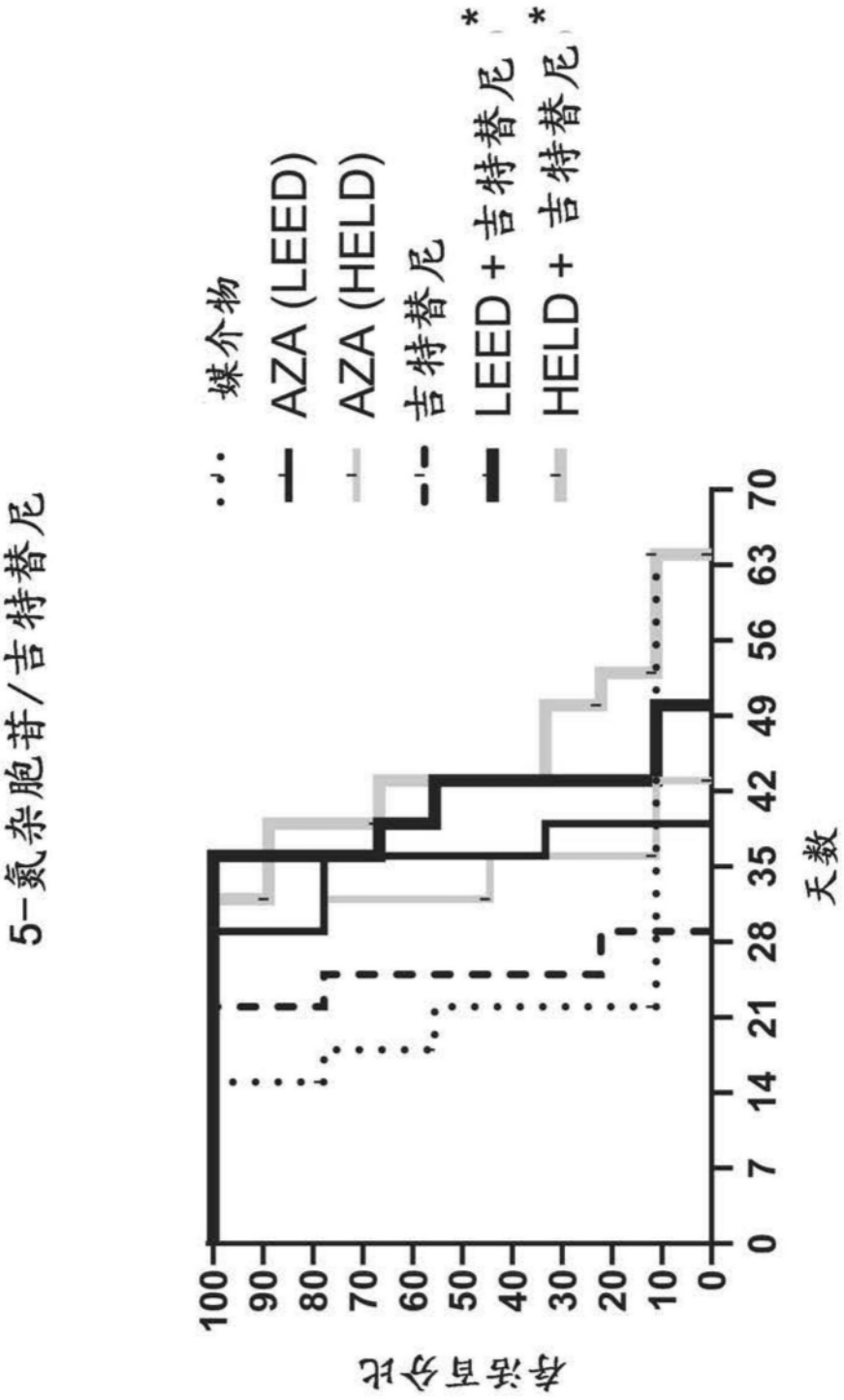

5-氮杂胞苷/吉特替尼
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
吉特替尼
LEED + 吉特替尼 *
HELD + 吉特替尼 *
存活百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
天数

FIG.7C

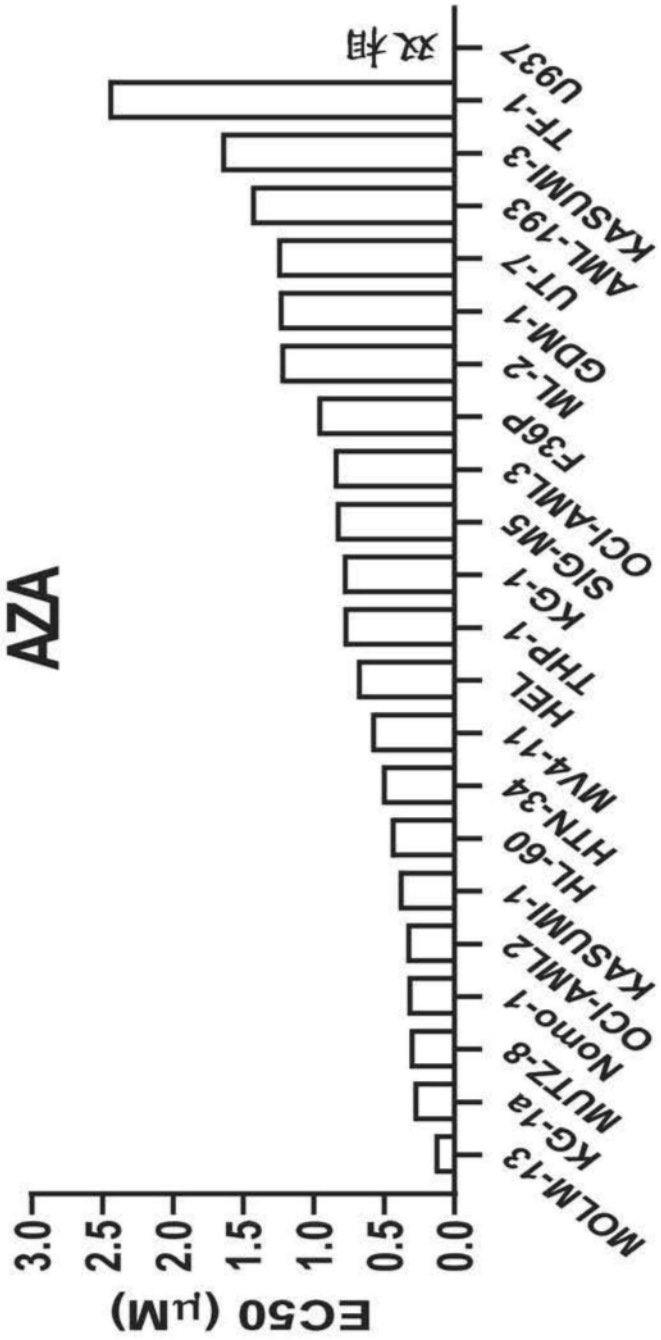

AZA
EC50 (μM)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MOLM-13
KG-1a
MUTZ-8
Nomo-1
OCI-AML2
KASUMI-1
HL-60
HTN-34
MV4-11
HEL
THP-1
KG-1
SIG-M5
OCI-AML3
F36P
ML-2
GDM-1
UT-7
AML-193
KASUMI-3
TF-1
U937
双相

FIG.8A

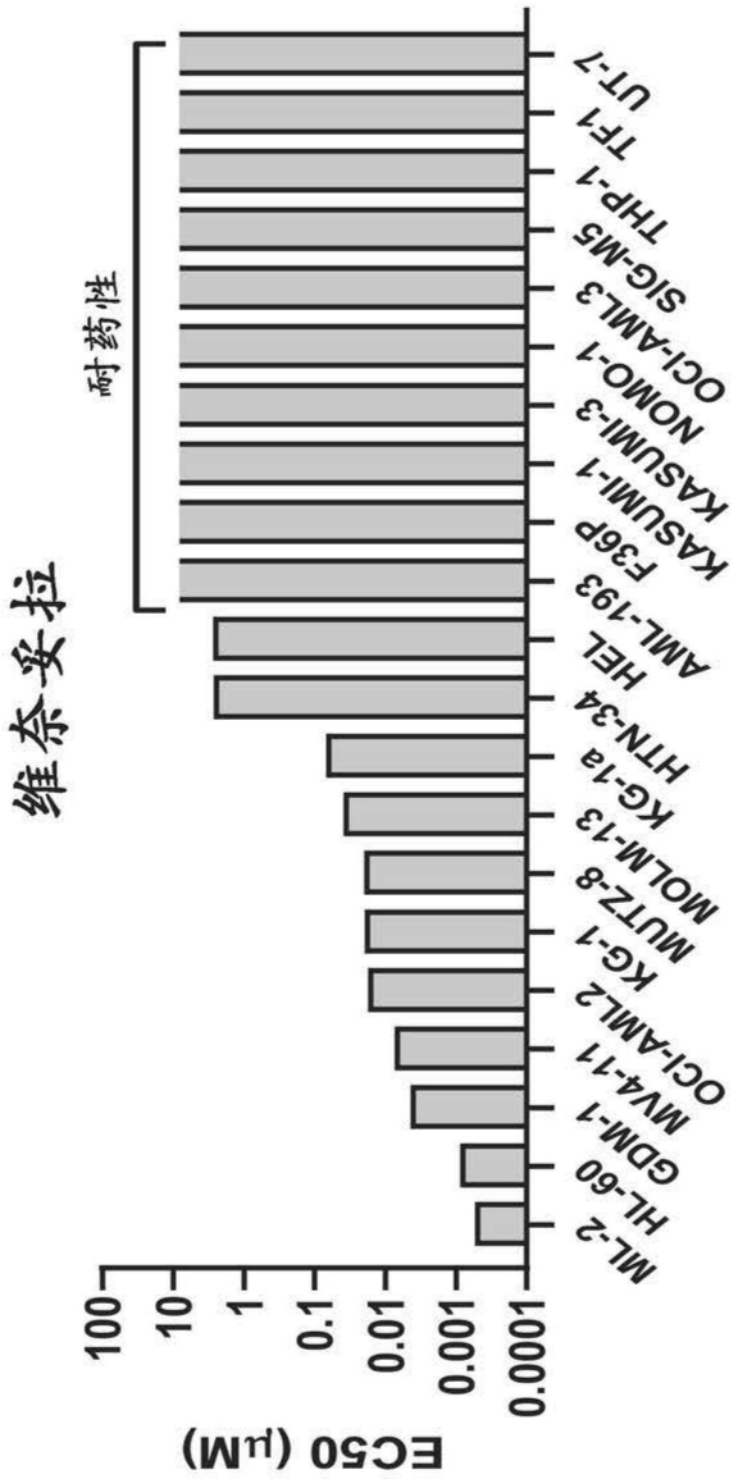

维奈妥拉
耐药性
UT-7
TF-1
THP-1
SIG-M5
OCI-AML3
NOMO-1
KASUMI-3
KASUMI-1
F36P
AML-193
HEL
HTN-34
KG-1a
MOLM-13
MUTZ-8
KG-1
OCI-AML2
MV4-11
GDM-1
HL-60
ML-2
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
EC50 (μM)

FIG.8B

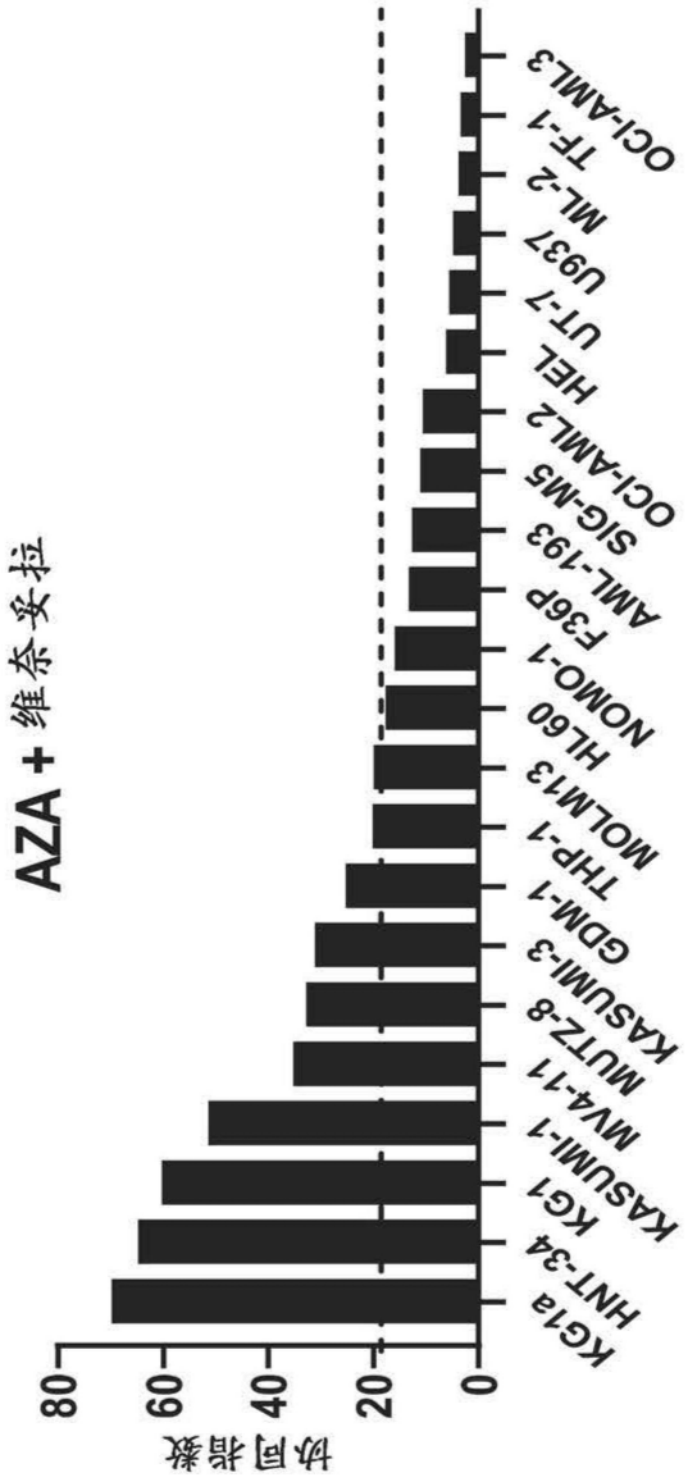

AZA + 维奈克拉
协同指数
0
20
40
60
80
KG1a
HNT-34
KG1
KASUMI-1
MV4-11
MUTZ-8
KASUMI-3
GDM-1
THP-1
MOLM13
HL60
NOMO-1
F36P
AML-193
SIG-M5
OCI-AML2
HEL
UT-7
U937
ML-2
TF-1
OCI-AML3

FIG.8C

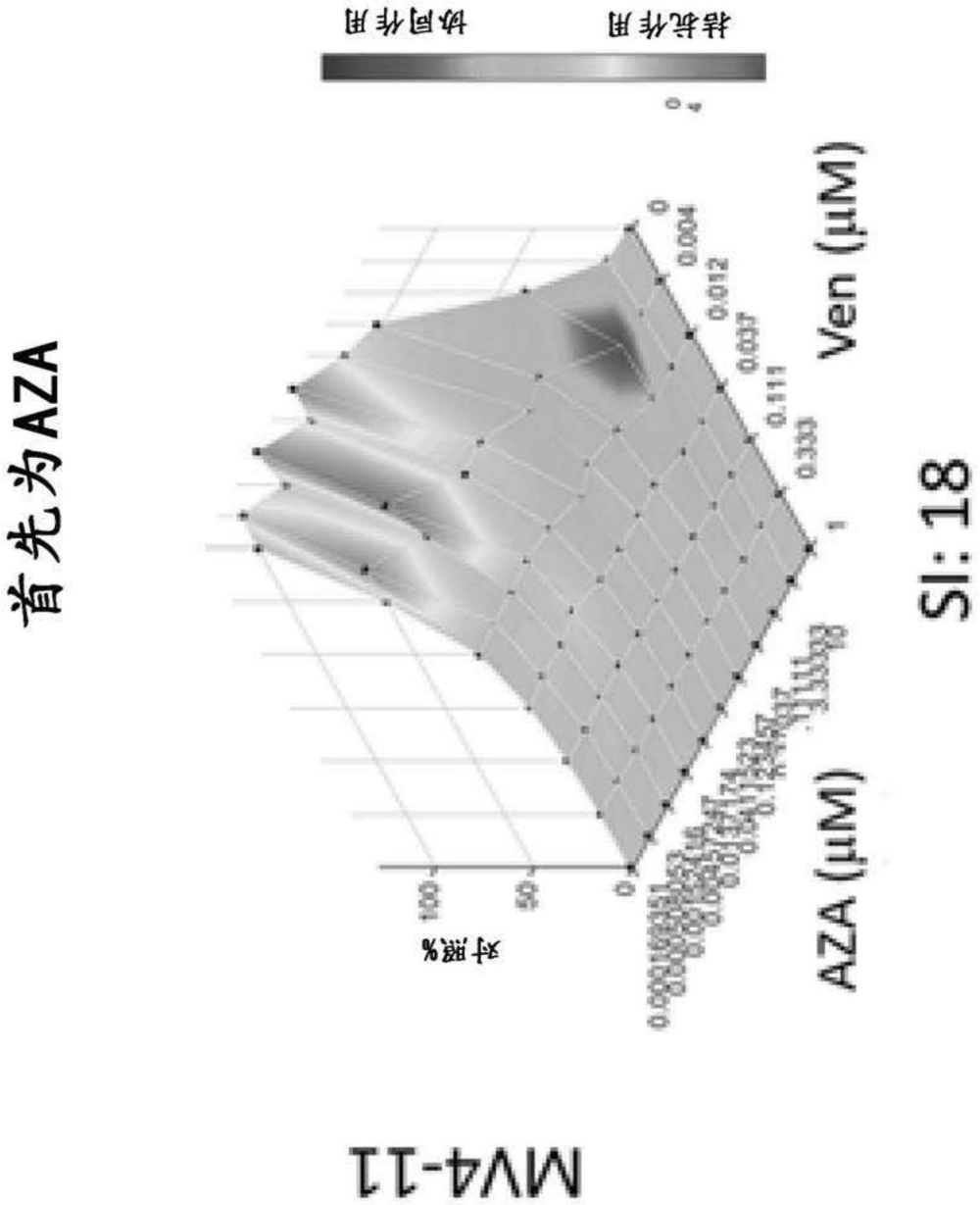

首先为AZA
MV4-11
拮抗作用
协同作用
对照%
100
50
0
AZA (μM)
Ven (μM)
0
0.004
0.012
0.037
0.111
0.333
1
SI:18

FIG.9A

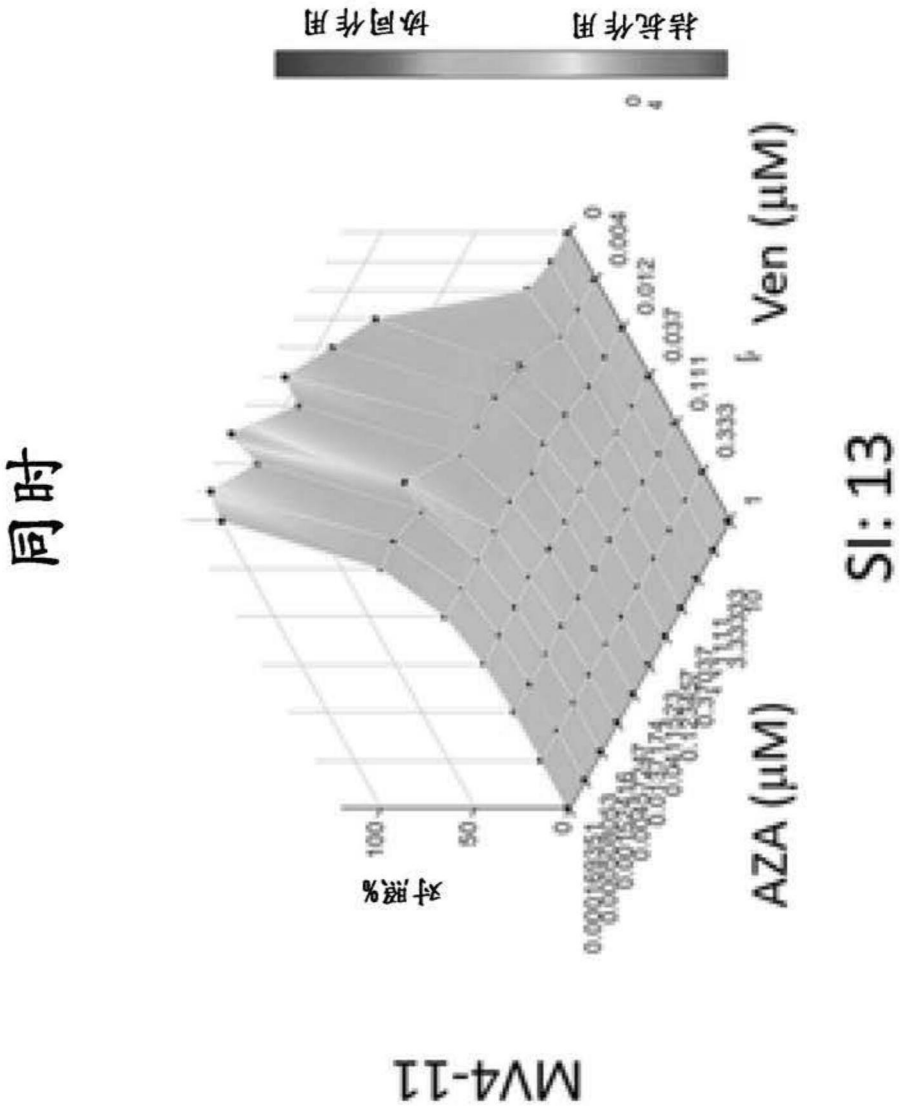


FIG.9B

FIG.9C

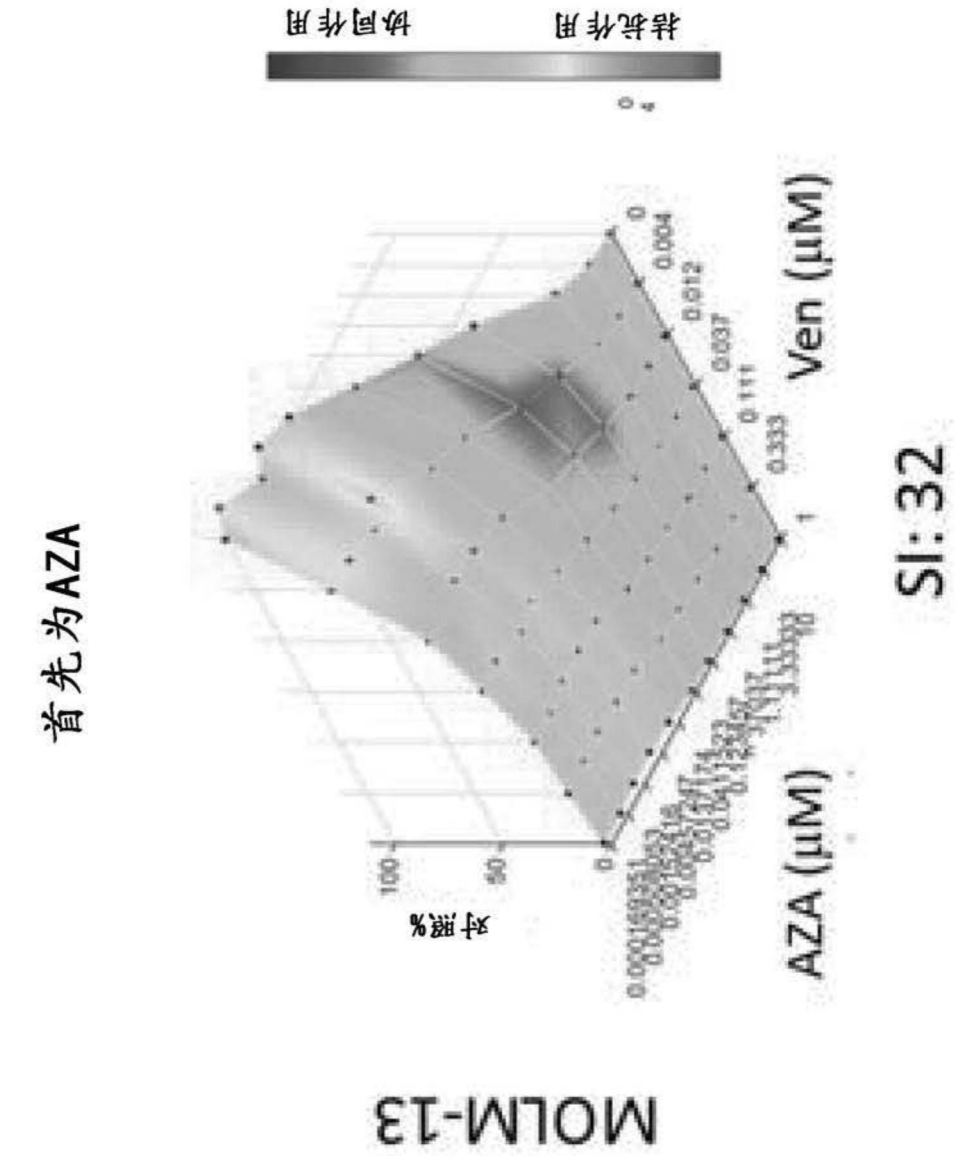

拮抗作用
协同作用
0
Ven (μM)
0
0.004
0.012
0.037
0.111
0.333
1
AZA (μM)
对照%
100
50
0
SI: 32
首先为AZA
MOLM-13

FIG.9D

拮抗作用
协同作用
0
Ven (μM)
0
0.004
0.012
0.037
0.111
0.333
1
AZA (μM)
SI: 10
同时
对照%
100
50
0
MOLM-13

FIG.9E

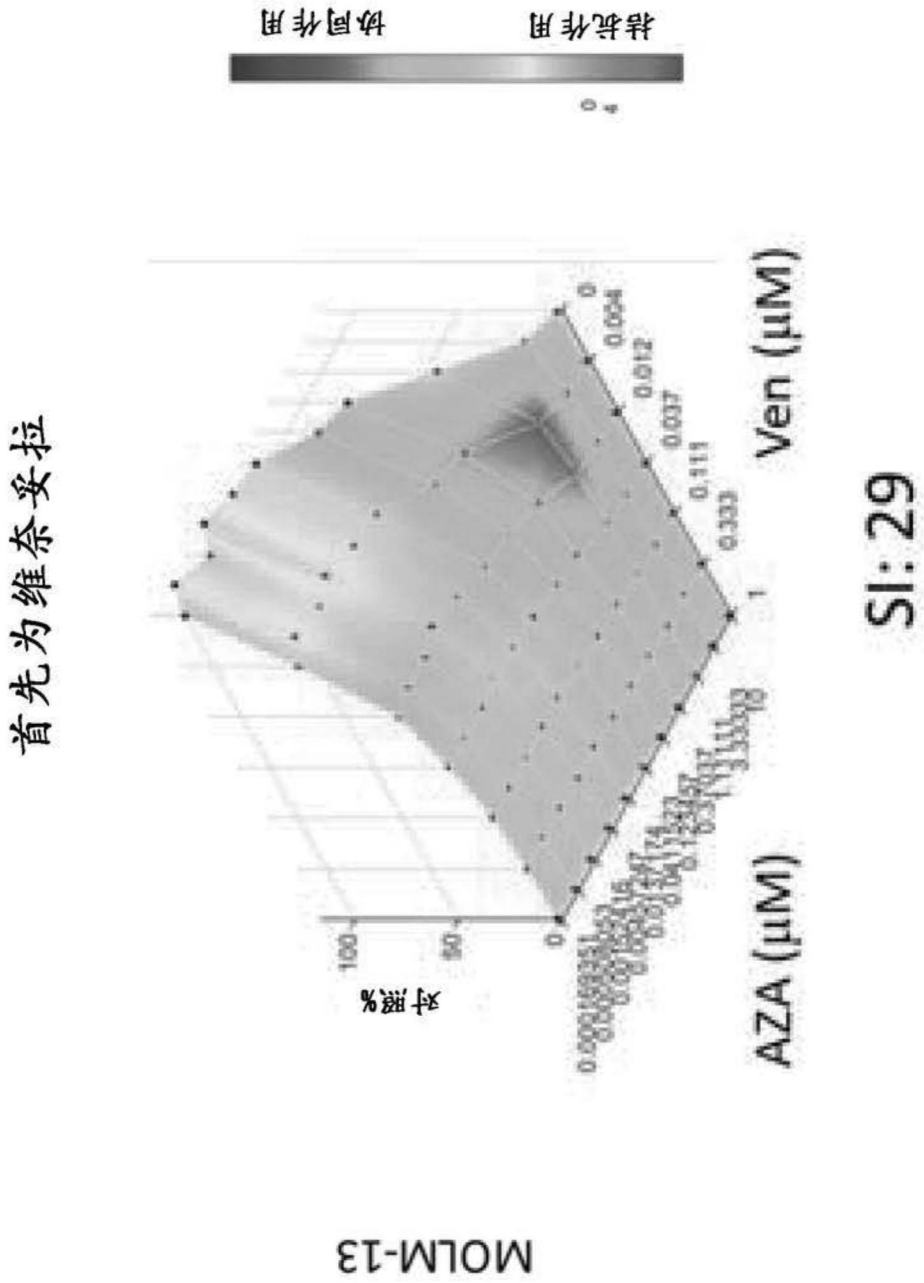

拮抗作用
协同作用
0
首先为维奈妥拉
MOLM-13
对照%
100
50
0
AZA (μM)
Ven (μM)
0
0.004
0.012
0.037
0.111
0.333
1
SI: 29

FIG.9F

表达不同FLT3的BaF3细胞 (EC50, nM)

	BaF-FLT3(WT)	BaF-FLT3-ITD	BaF-FLT3(D835Y)
AZA	189	598	456
吉特替尼	4	1.8	1.8
米哚妥林	23	5.5	5.4
奎扎替尼	3	0.008	9.5
维奈妥拉	>10000	>10000	4332

FIG.10A

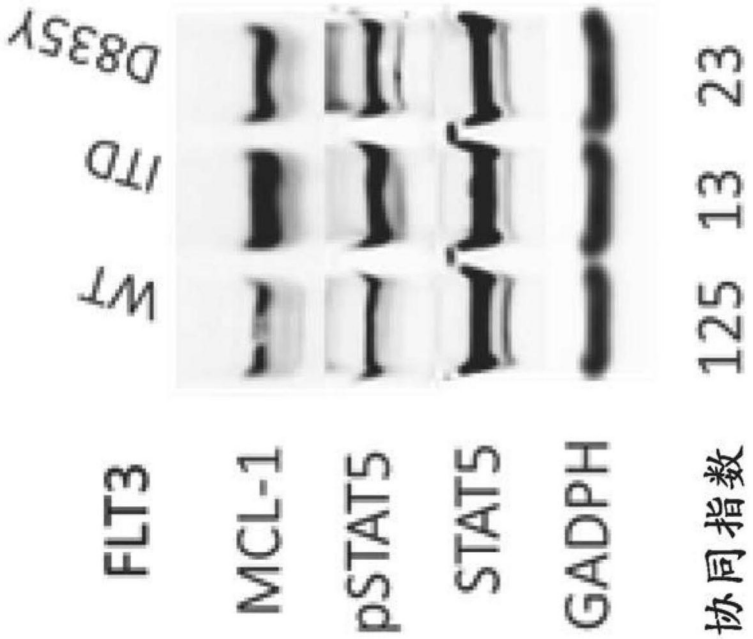


FIG.10B

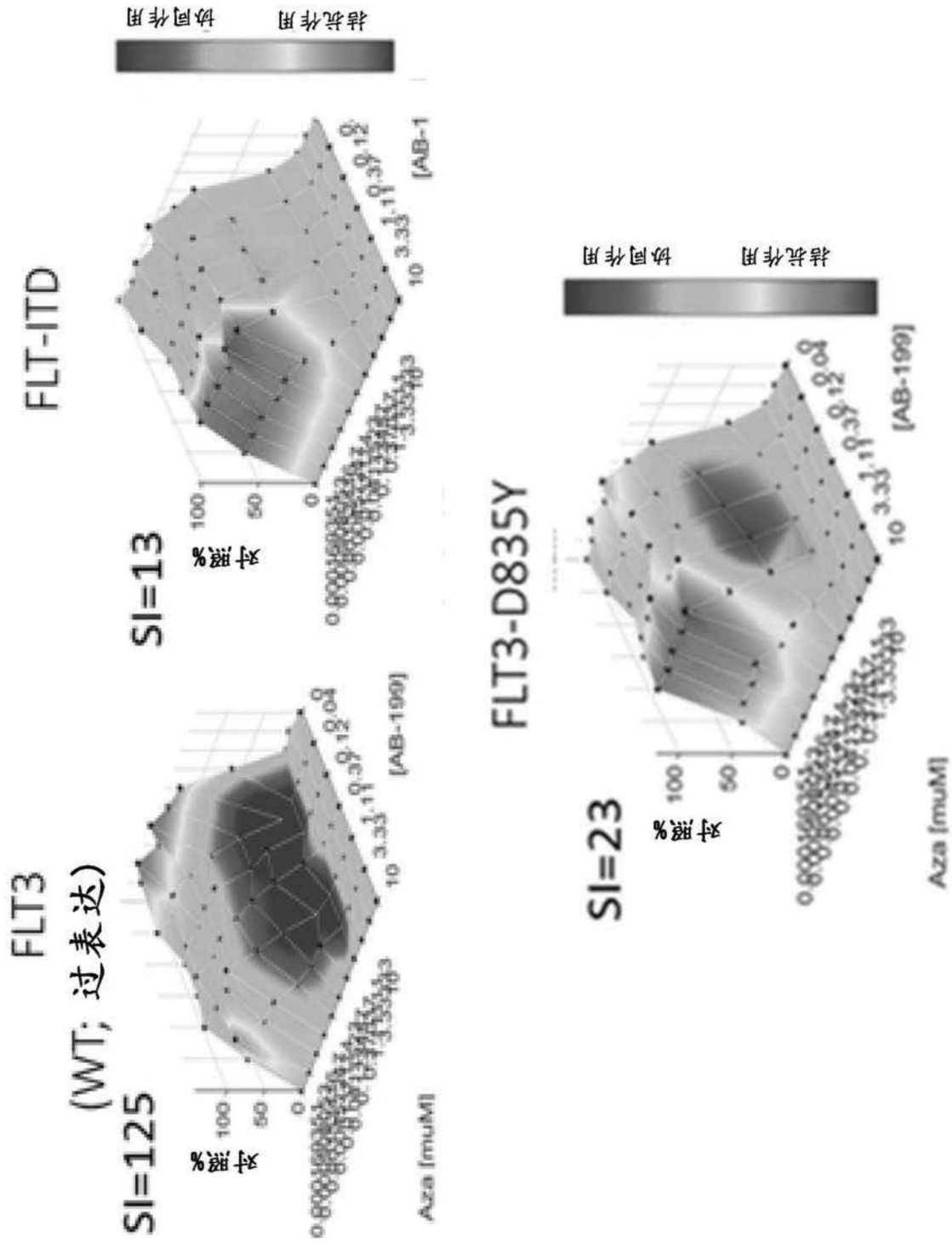

FLT3
(WT; 过表达)
SI=125
FLT-ITD
SI=13
FLT3-D835Y
SI=23
对照%
Aza [muM]
[AB-199]
[AB-1
拮抗作用
协同作用

FIG.10C

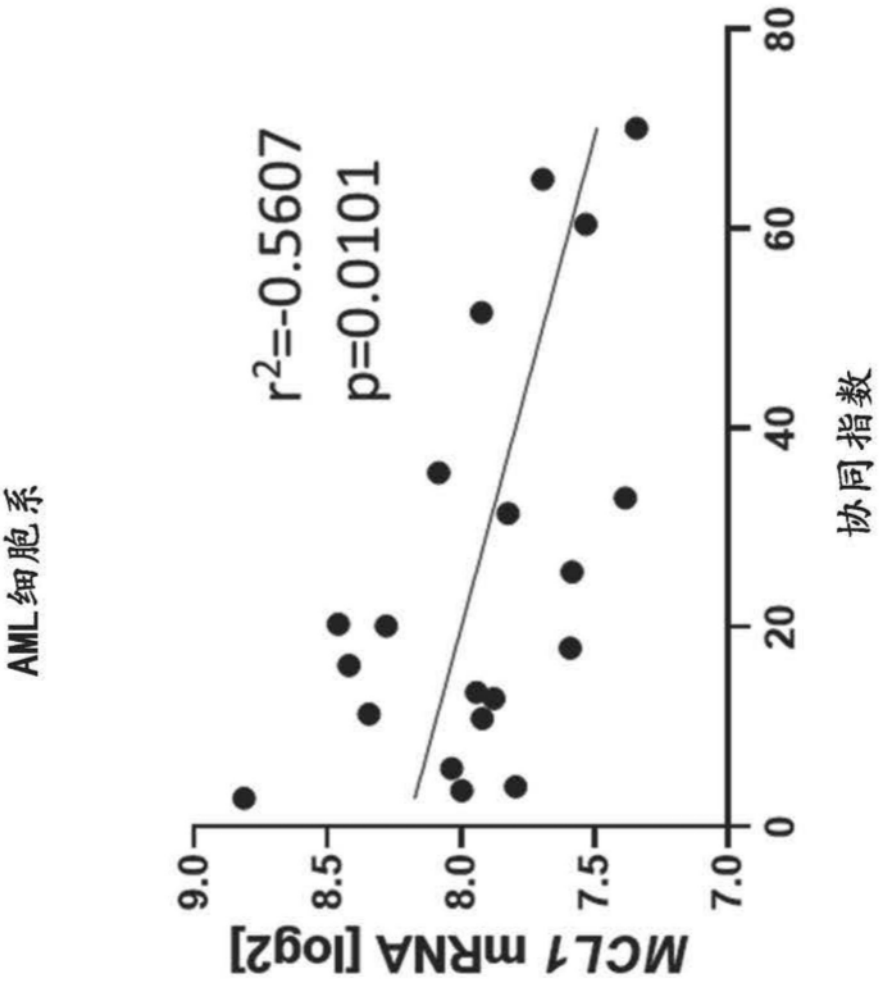

AML细胞系
r²=-0.5607
p=0.0101
MCL1 mRNA [log2]
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
0
20
40
60
80
协同指数

FIG.11

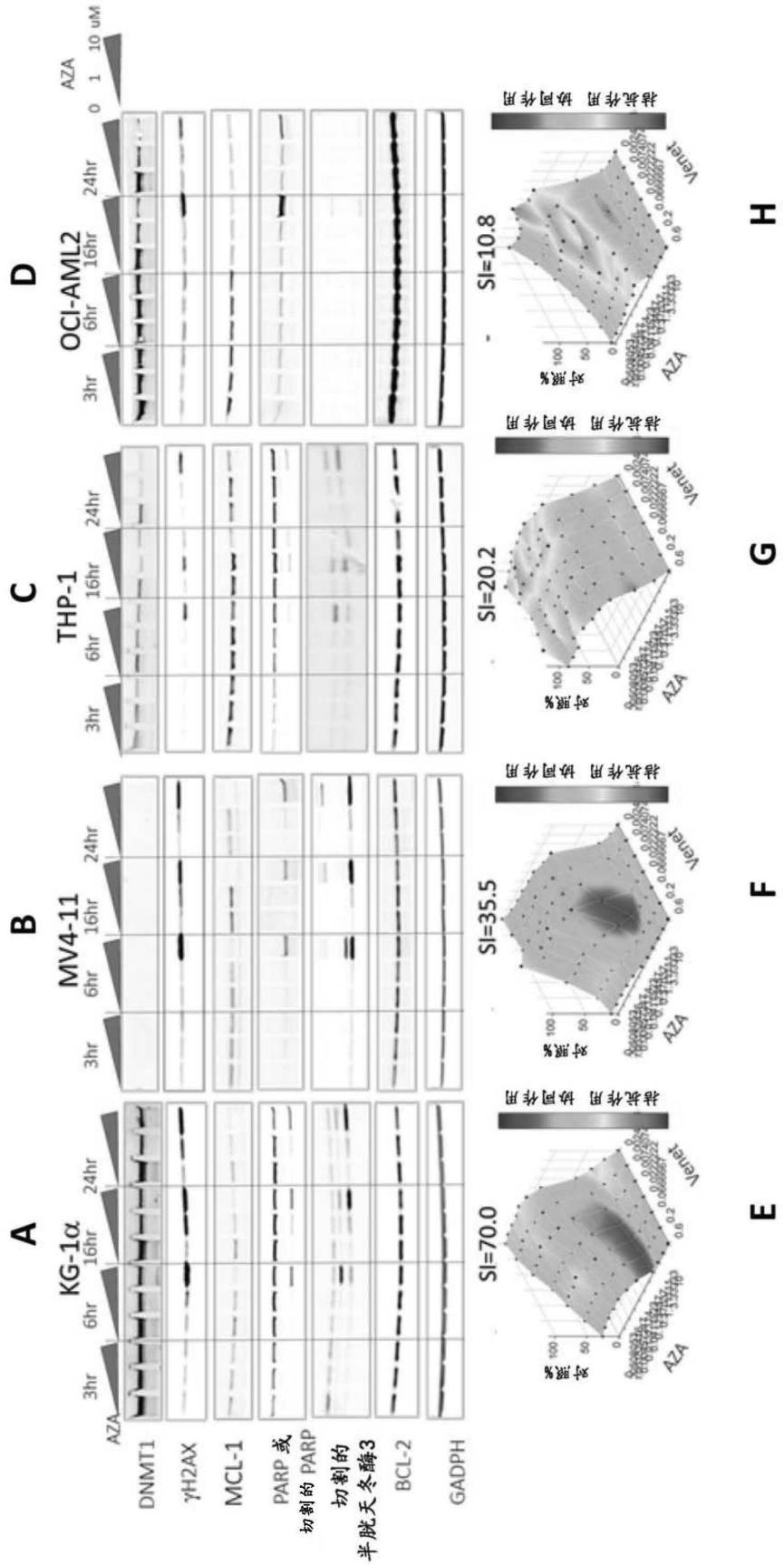

A
B
C
D
E
F
G
H
KG-1α
MV4-11
THP-1
OCI-AML2
AZA
0
1
10 uM
3hr
6hr
16hr
24hr
DNMT1
γH2AX
MCL-1
PARP 或
切割的 PARP
切割的
半胱天冬酶3
BCL-2
GADPH
SI=70.0
SI=35.5
SI=20.2
SI=10.8
对照%
Vehicle
拮抗作用
协同作用

FIG.12

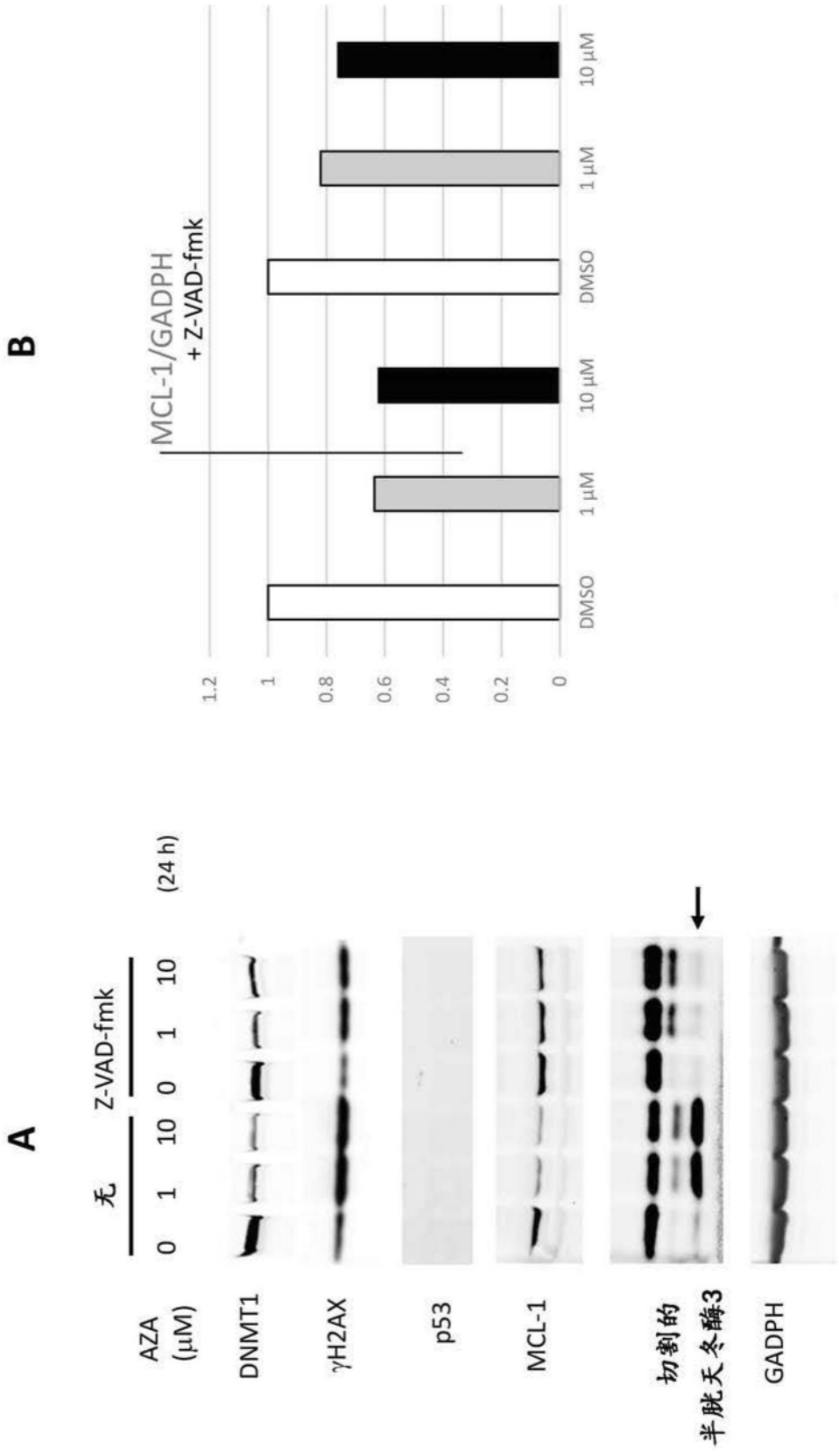

A
无
Z-VAD-fmk
AZA (μM)
0 1 10 0 1 10
(24 h)
DNMT1
γH2AX
p53
MCL-1
切割的半胱天冬酶3
GADPH
B
MCL-1/GADPH
+ Z-VAD-fmk
DMSO
1 μM
10 μM
DMSO
1 μM
10 μM
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0

FIG.13

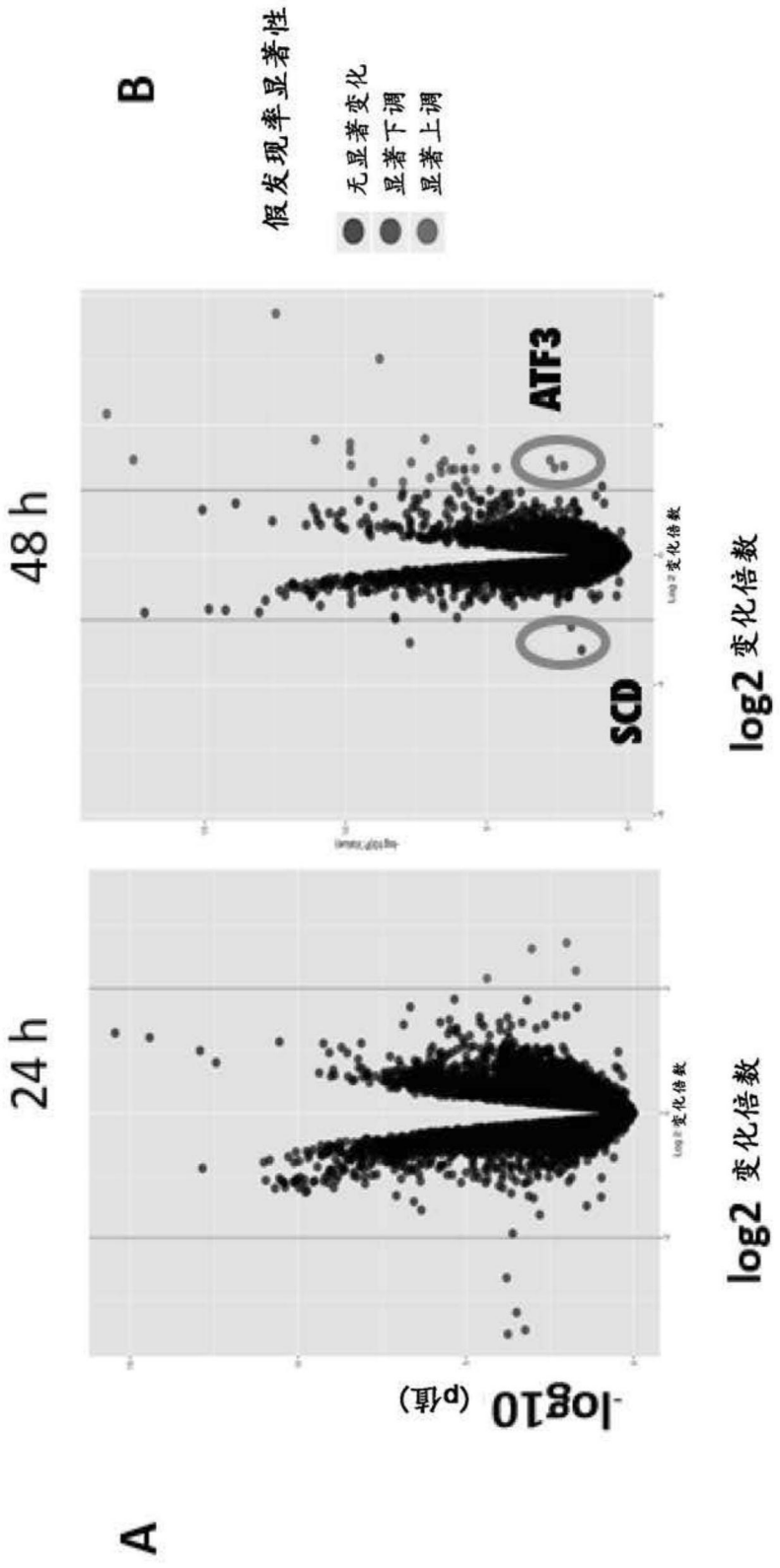

A
B
24 h
48 h
-log10 (p值)
log2 变化倍数
log2 变化倍数
ATF3
SCD
假发现率显著性
无显著变化
显著下调
显著上调

FIG.14

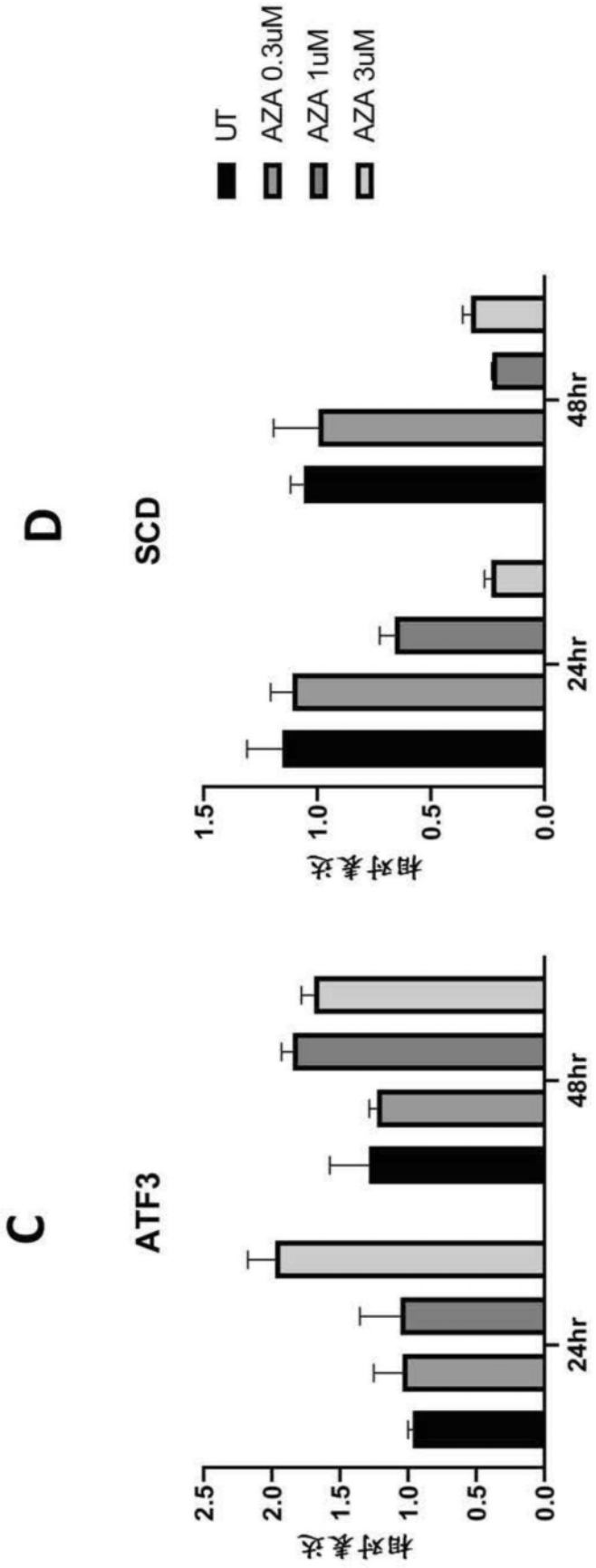

C
ATF3
相对表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
24hr
48hr
D
SCD
相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0
24hr
48hr
UT
AZA 0.3uM
AZA 1uM
AZA 3uM

FIG.14

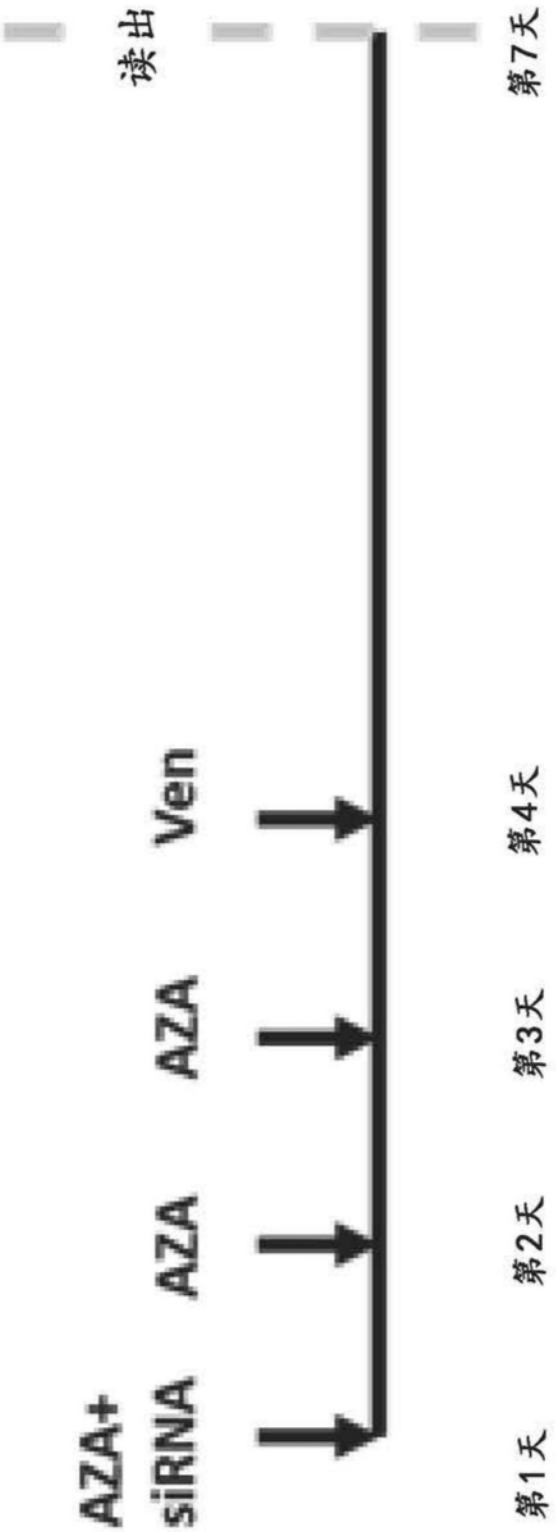


FIG.15A

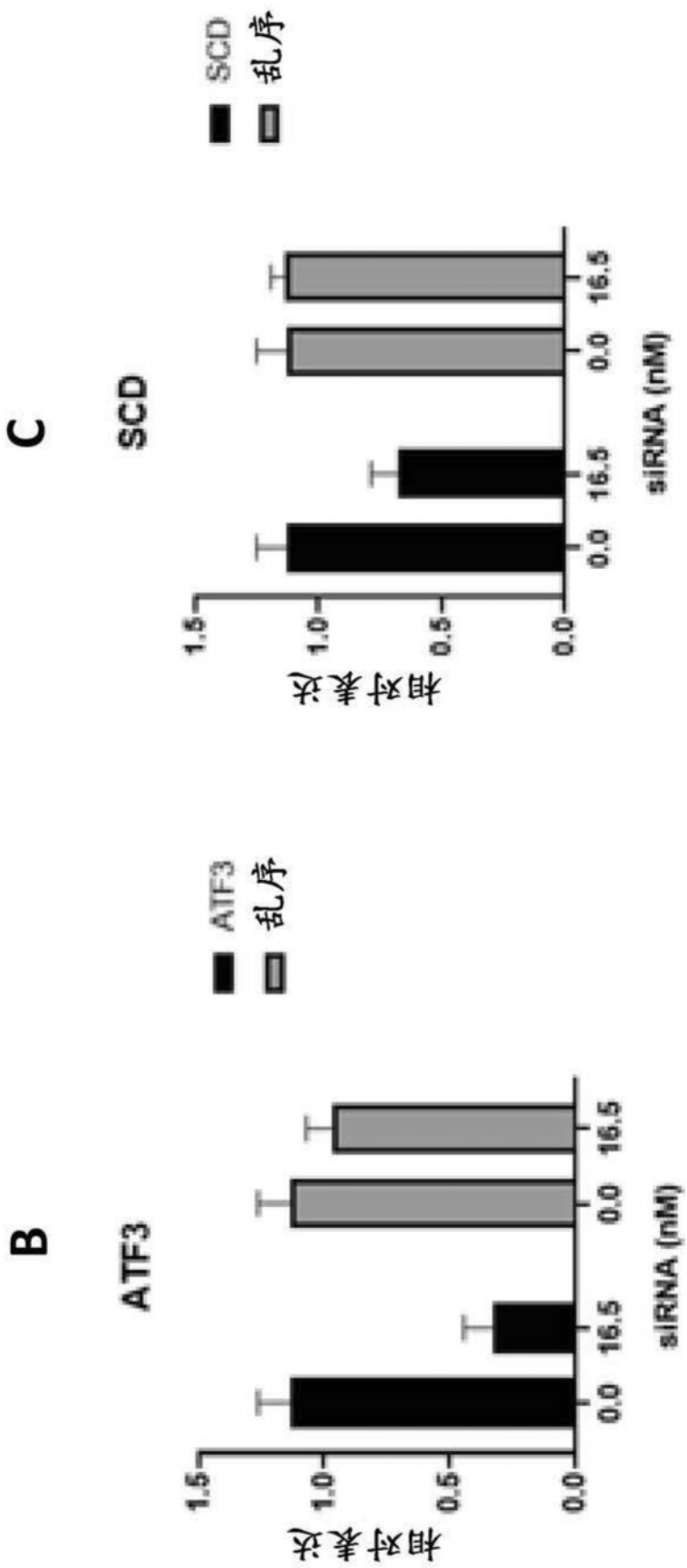

B
ATF3
ATF3
乱序
相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
16.5
0.0
16.5
siRNA (nM)
C
SCD
SCD
乱序
相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
16.5
0.0
16.5
siRNA (nM)

FIG.15

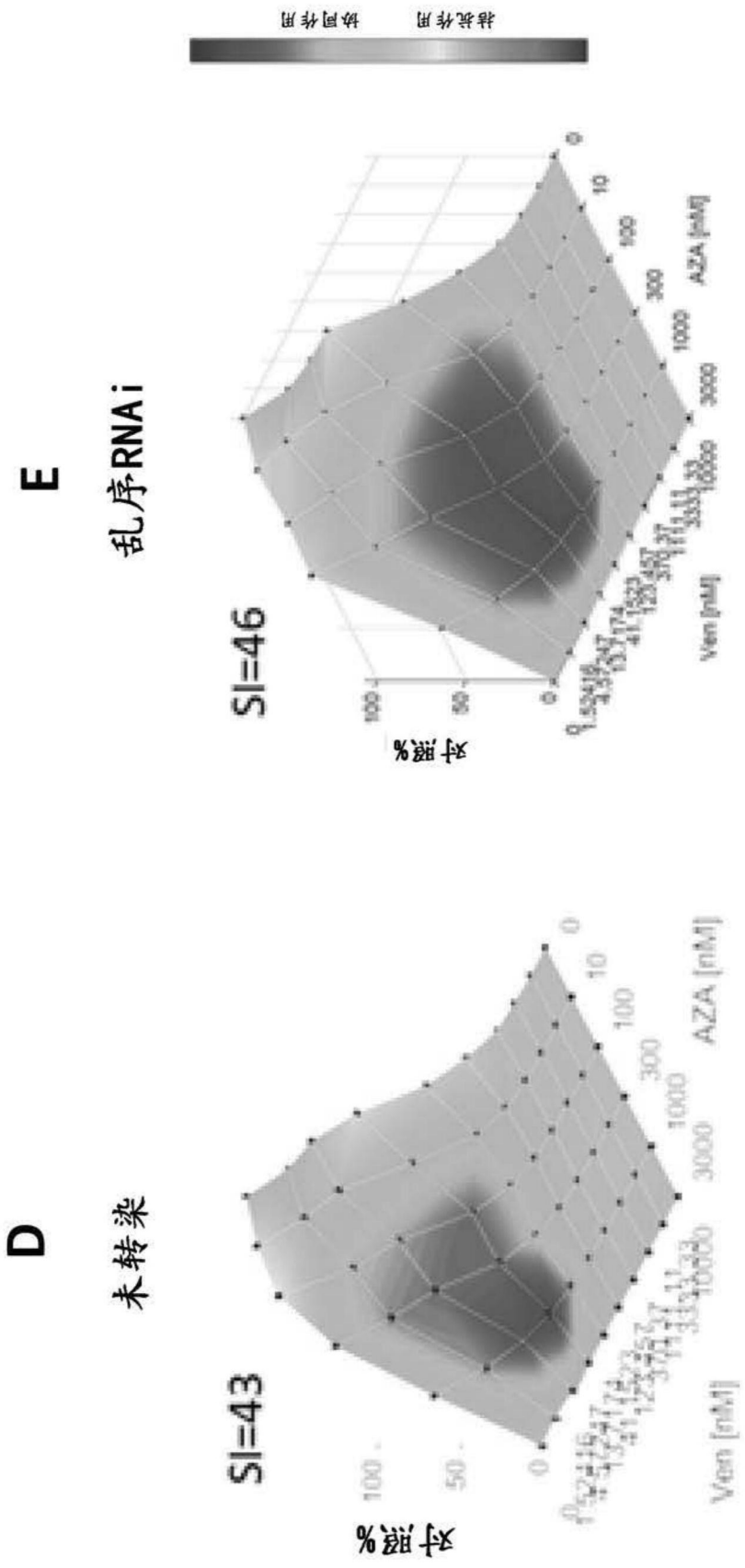

D
未转染
SI=43
对照%
100
50
0
Ven [nM]
AZA [nM]
E
乱序RNAi
SI=46
对照%
100
50
0
Ven [nM]
AZA [nM]
拮抗作用
协同作用

FIG.15

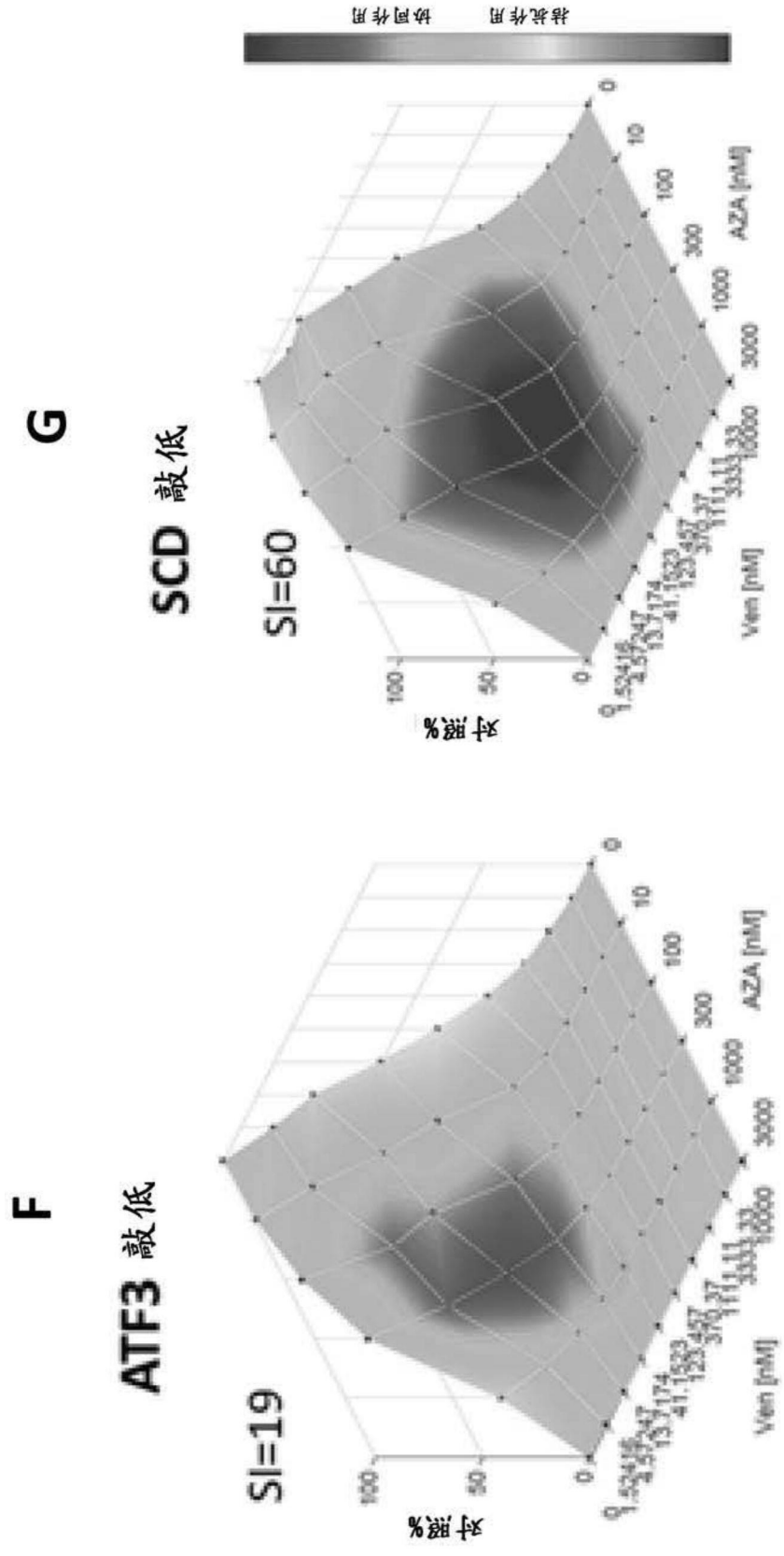

F
ATF3 敲低
SI=19
对照%
Ven [nM]
AZA [nM]
G
SCD 敲低
SI=60
对照%
Ven [nM]
AZA [nM]
协同作用
拮抗作用

FIG.15

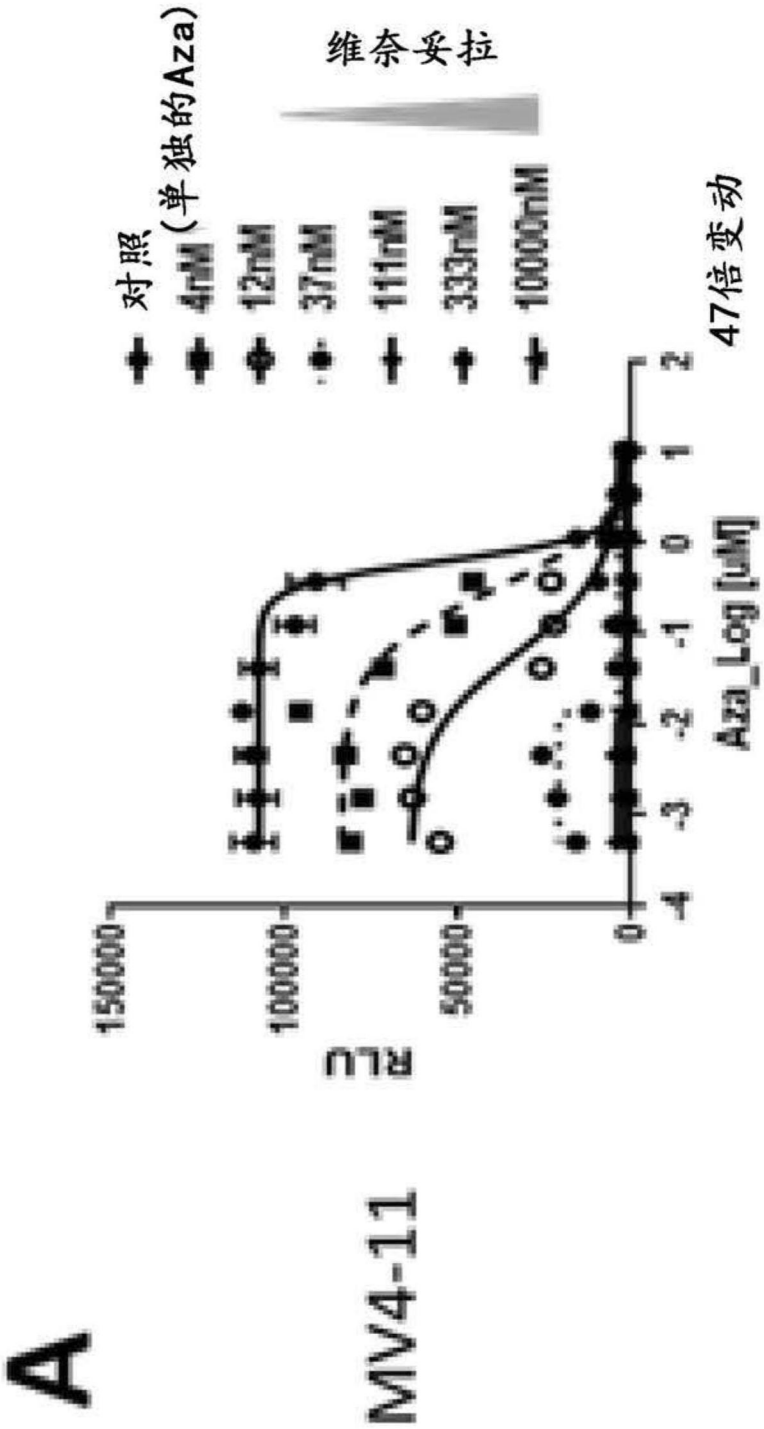
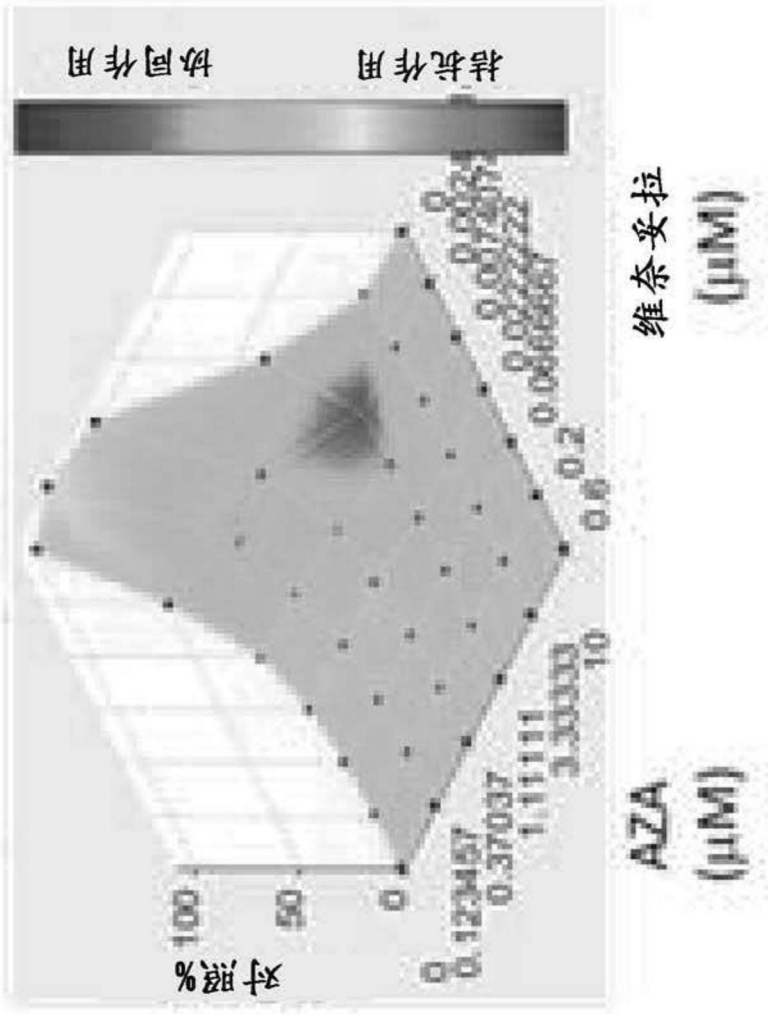

A
MV4-11
RLU
150000
100000
50000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Aza_Log [uM]
47倍变动
维奈妥拉
对照
4nM (单独的Aza)
12nM
37nM
111nM
333nM
10000nM

FIG.16A


拮抗作用
协同作用
维奈妥拉 (μM)
0
0.0222222
0.0666667
0.2
0.6
2
6
10
AZA (μM)
0
0.0123457
0.037037
0.111111
0.333333
1
3
10
对照%
0
50
100

B

Fig.16B

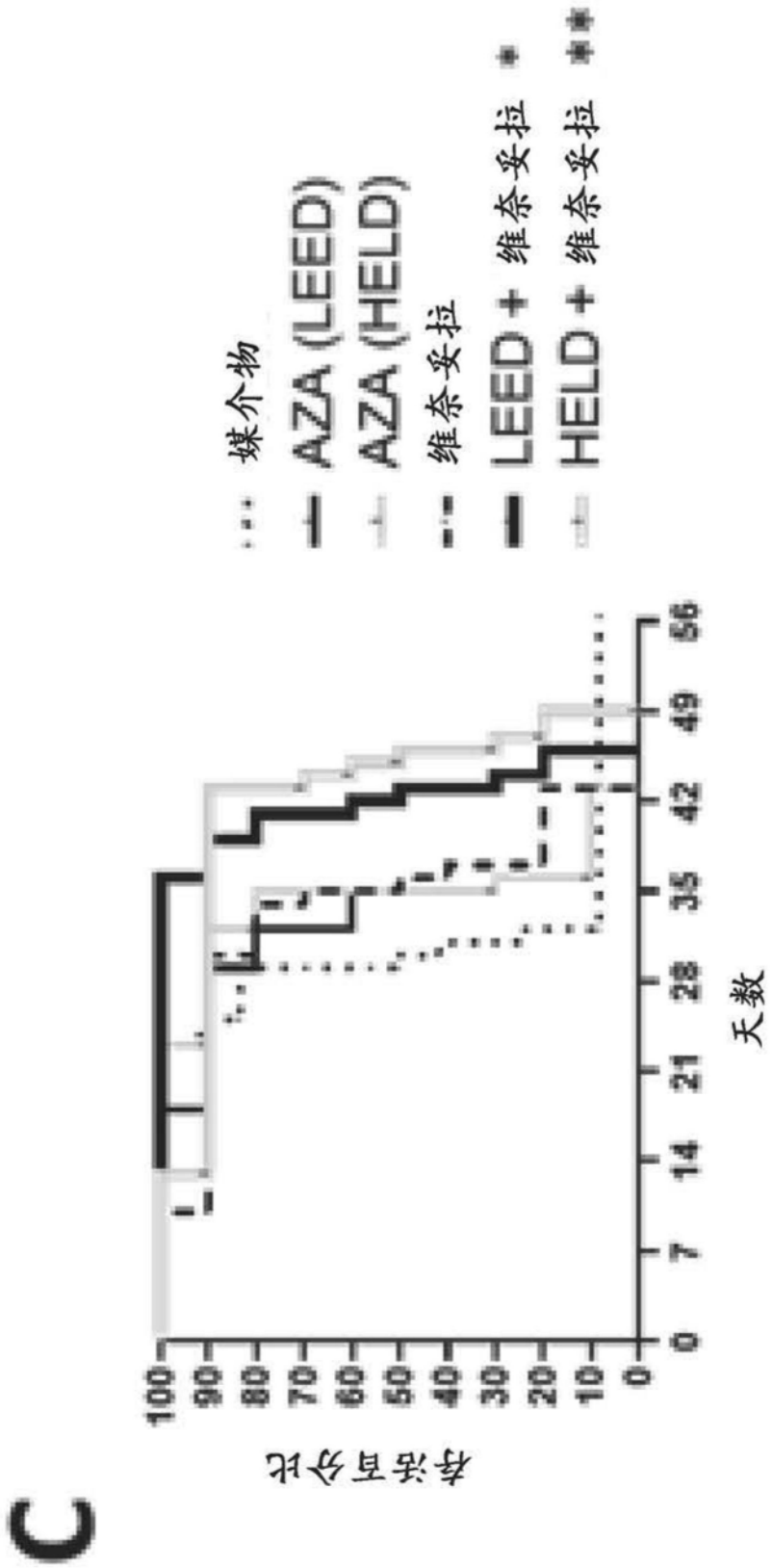

C
存活百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
天数
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
维奈妥拉
LEED + 维奈妥拉 *
HELD + 维奈妥拉 **

FIG.16C

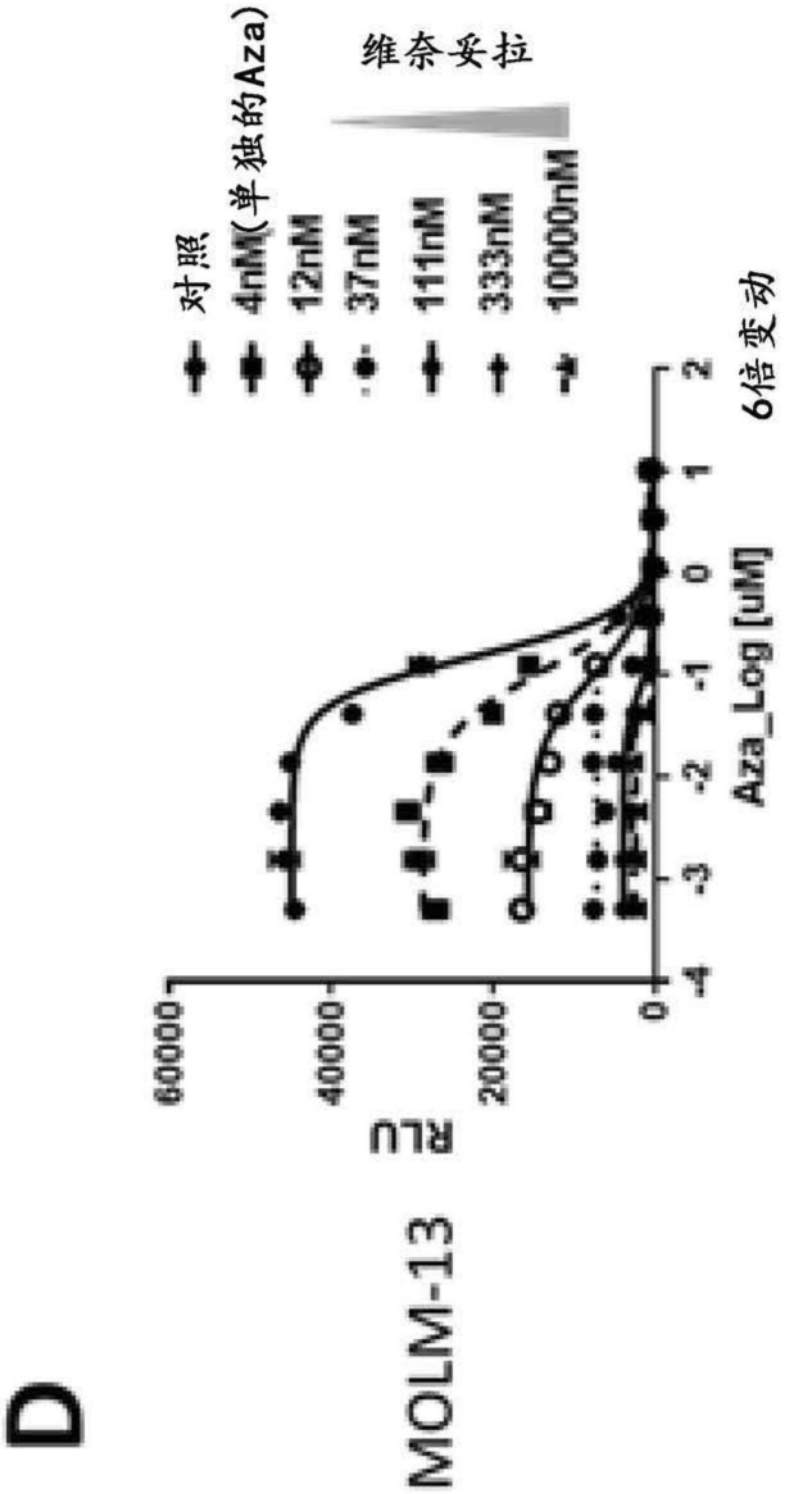

D
MOLM-13
RLU
60000
40000
20000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Aza_Log [uM]
6倍变动
维奈妥拉
对照
4nM(单独的Aza)
12nM
37nM
111nM
333nM
10000nM

FIG.16D

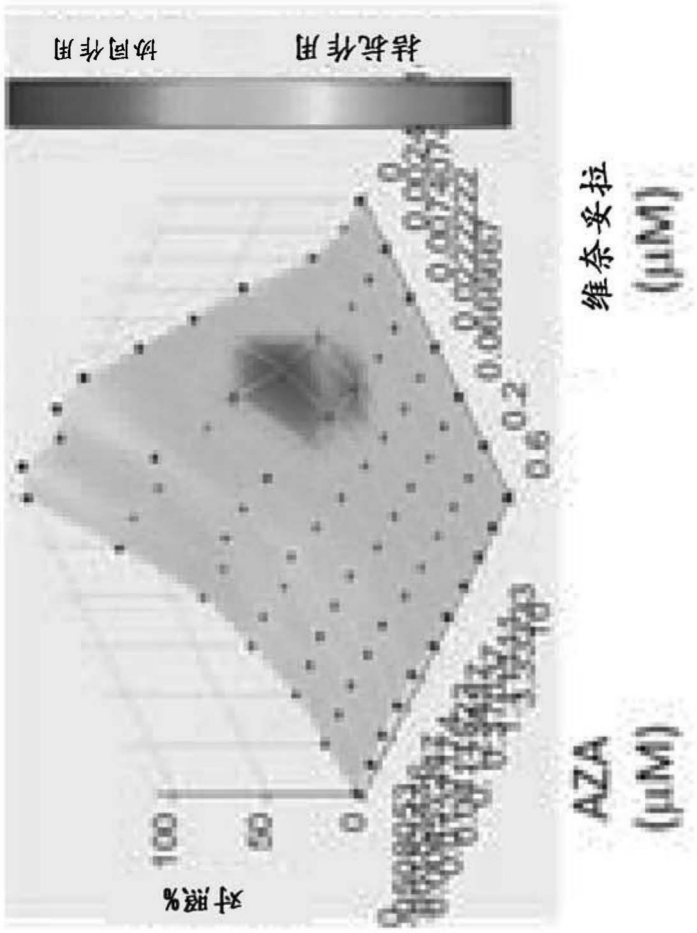


FIG.16E

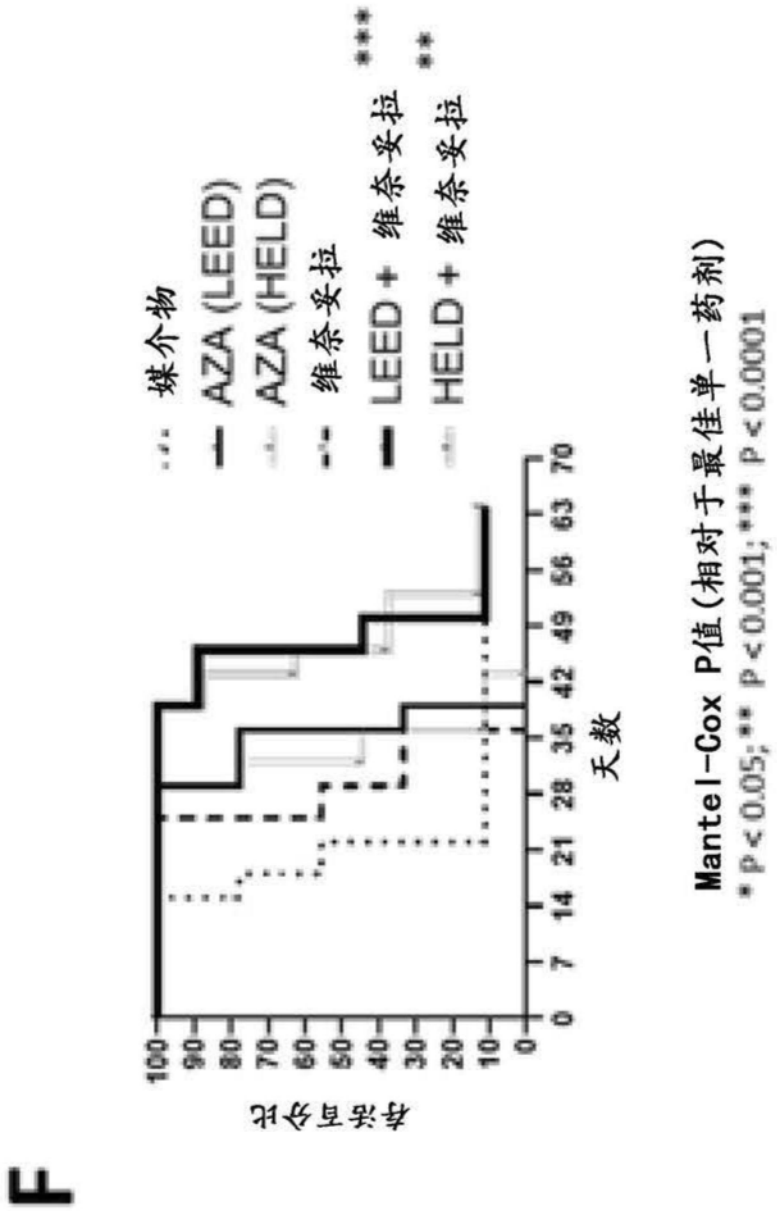

F
存活百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
天数
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
维奈妥拉
LEED + 维奈妥拉
HELD + 维奈妥拉
***
**
Mantel-Cox P值(相对于最佳单一药剂)
* P < 0.05; ** P < 0.001; *** P < 0.0001

FIG.16F

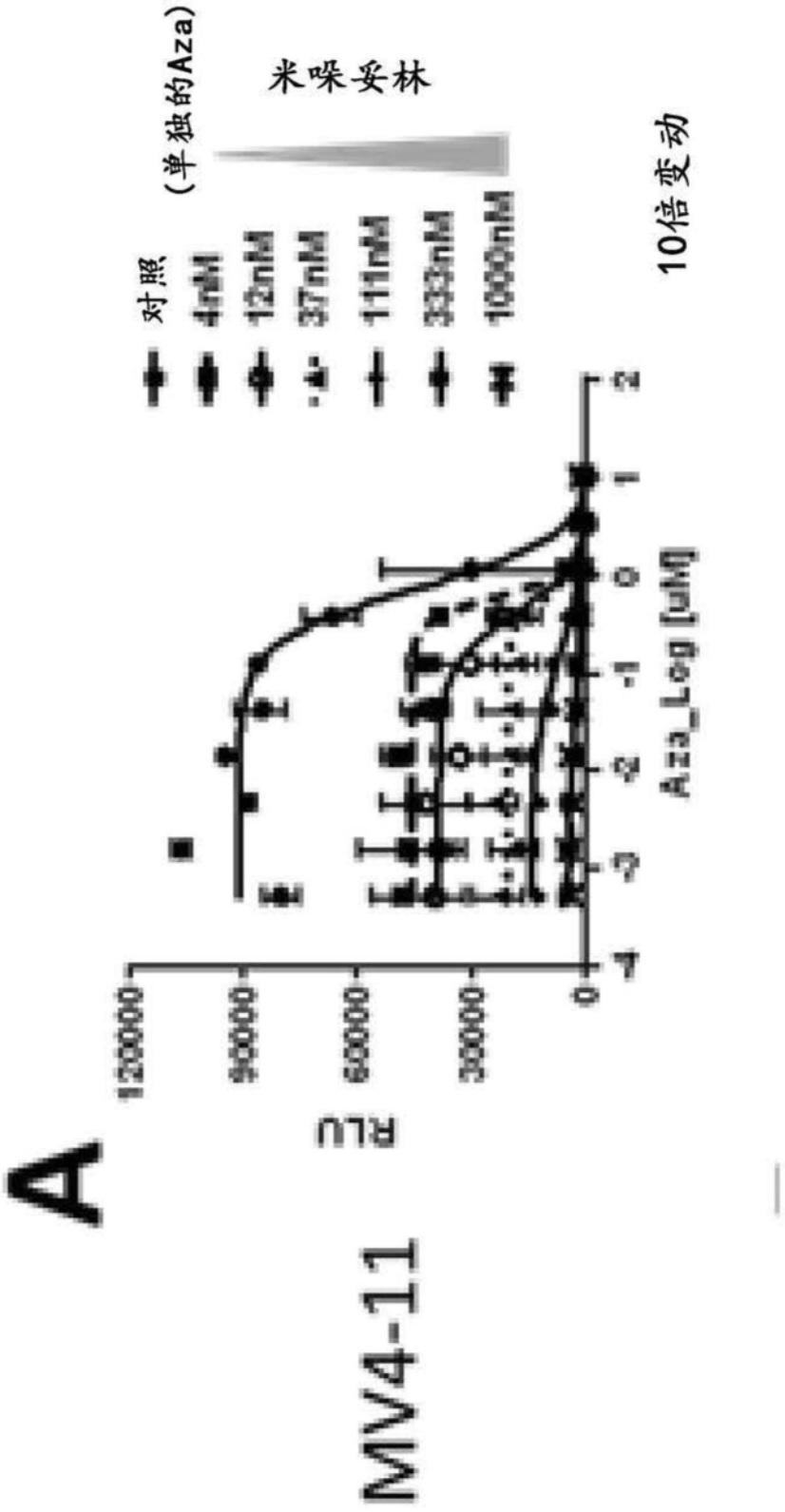

A
MV4-11
RLU
1200000
900000
600000
300000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Aza_Log [uM]
10倍变动
米哚妥林
(单独的Aza)
对照
4nM
12nM
37nM
111nM
333nM
1000nM

FIG.17A

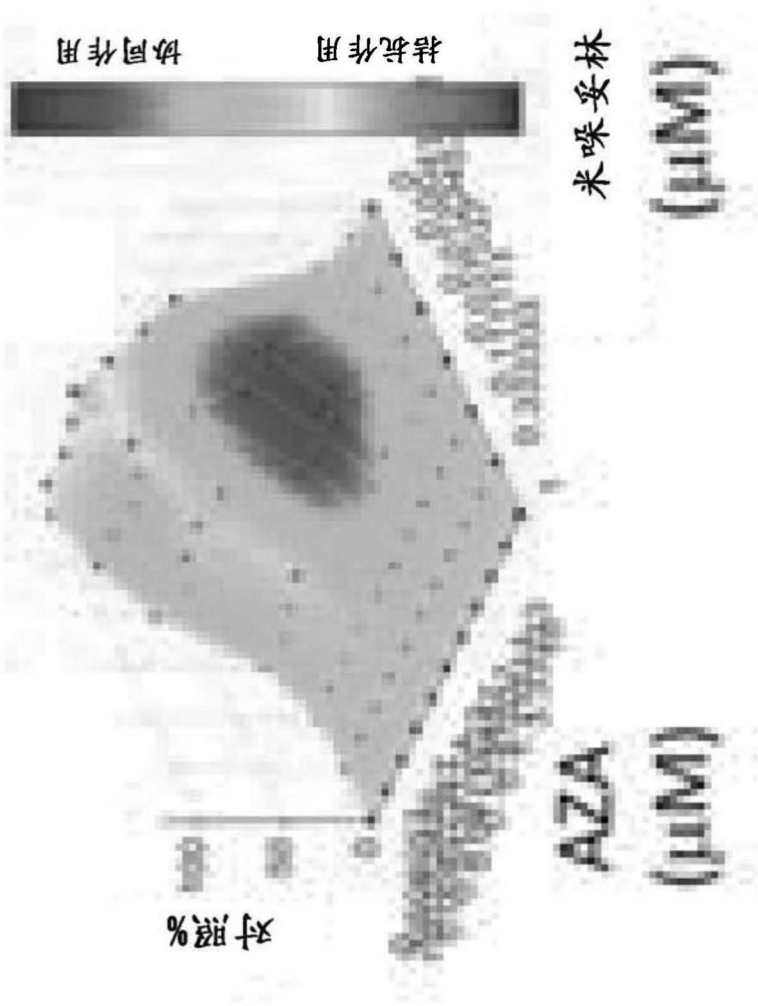


FIG.17B

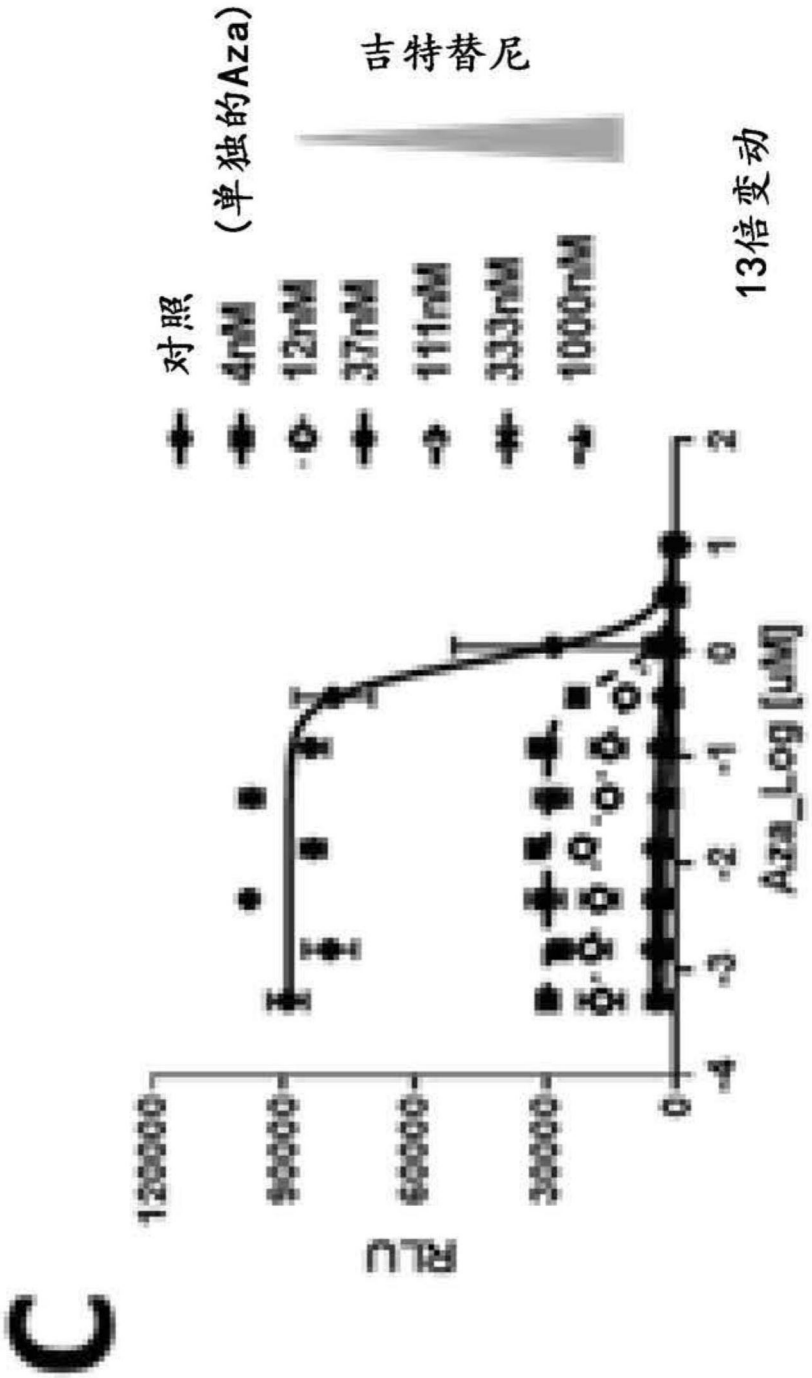

C
RLU
120000
90000
60000
30000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Aza_Log [uM]
13倍变动
对照
4nM
12nM
37nM
111nM
333nM
1000nM
(单独的Aza)
吉特替尼

FIG.17

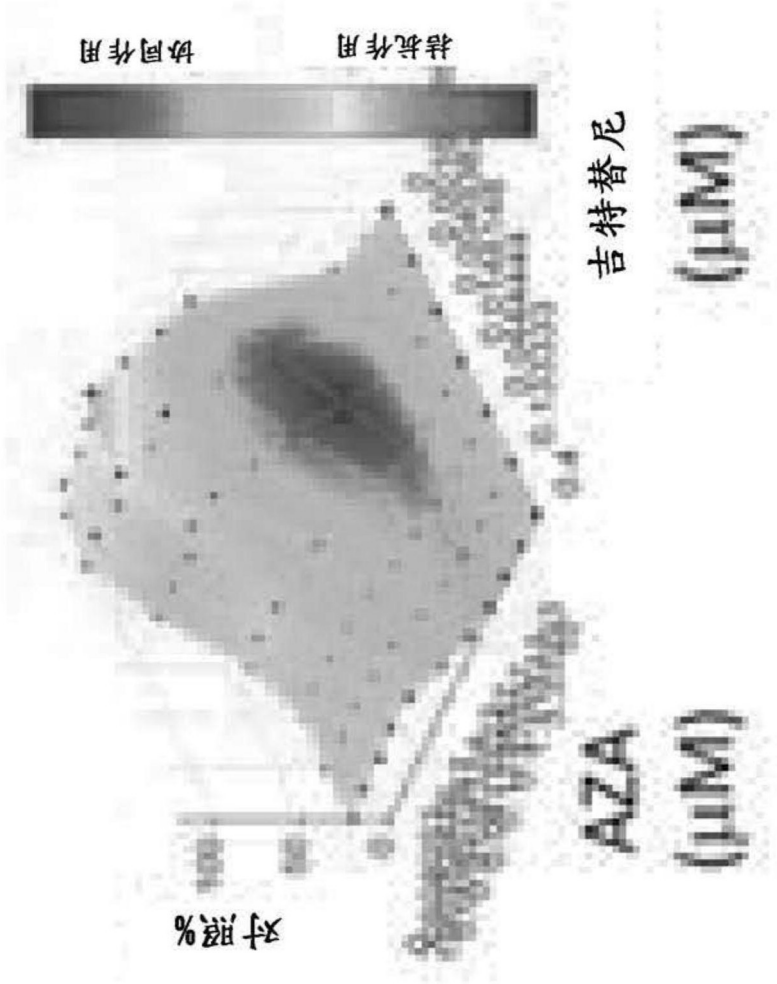


Fig.17D

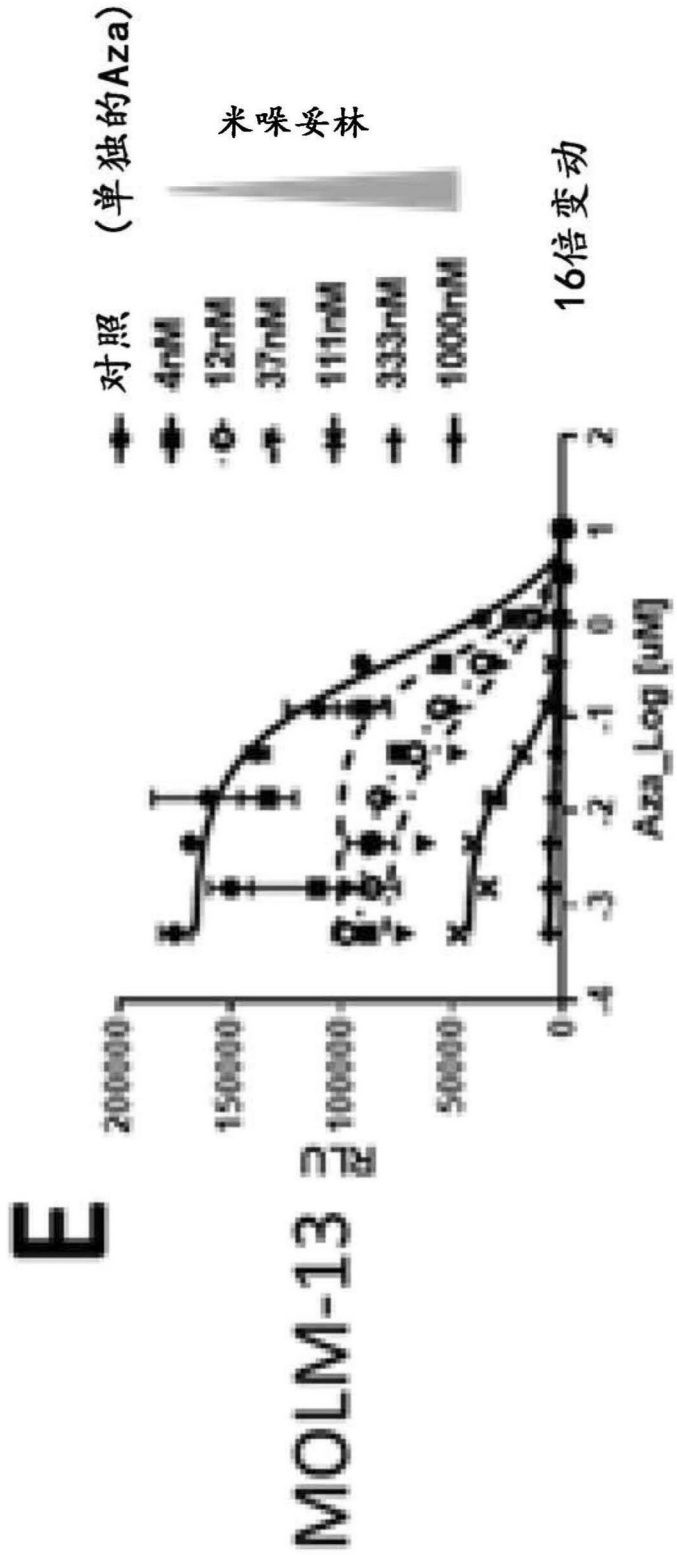

E
MOLM-13
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Aza_Log [uM]
对照
4nM
12nM
37nM
111nM
333nM
1000nM
(单独的Aza)
米哚妥林
16倍变动

FIG.17E

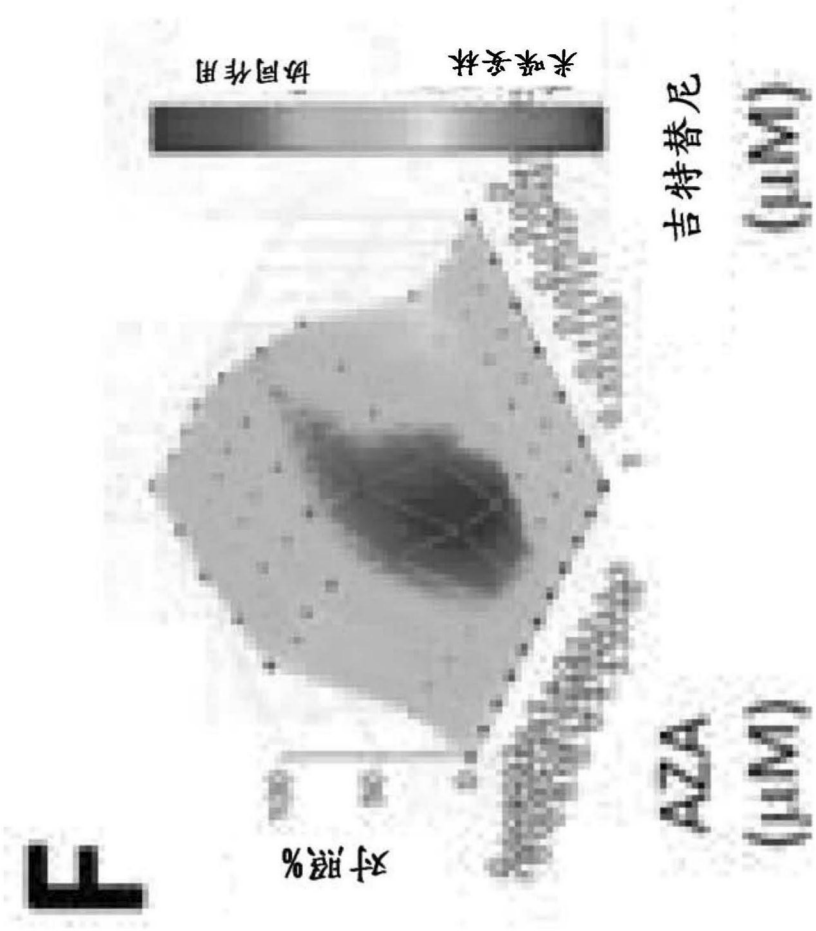


FIG.17F

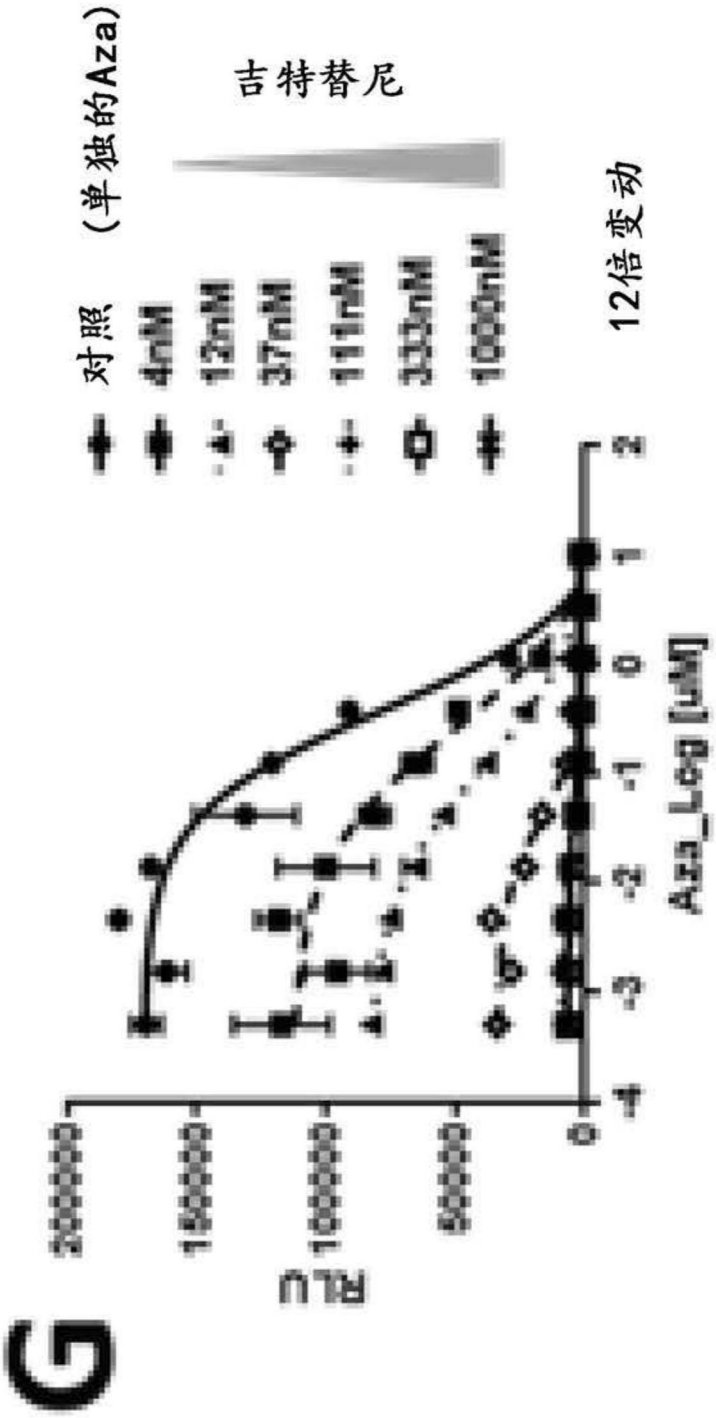

G
吉特替尼
(单独的Aza)
对照
4nM
12nM
37nM
111nM
333nM
1000nM
12倍变动
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
2
1
0
-1
-2
-3
-4
Aza_Log [uM]

FIG.17G

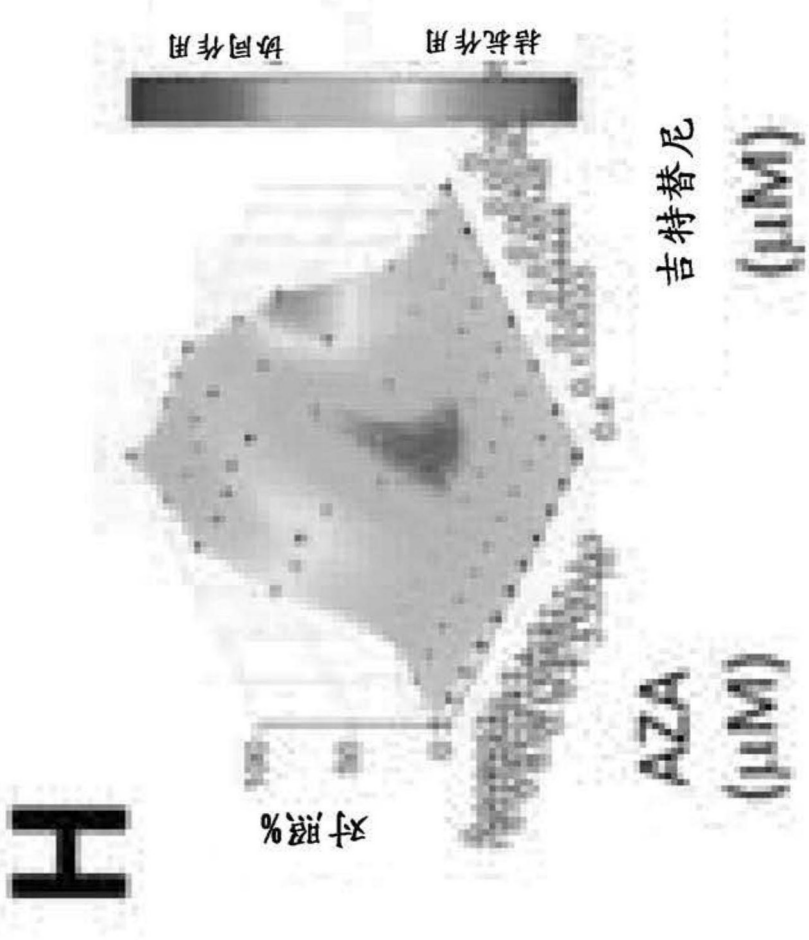


FIG.17H

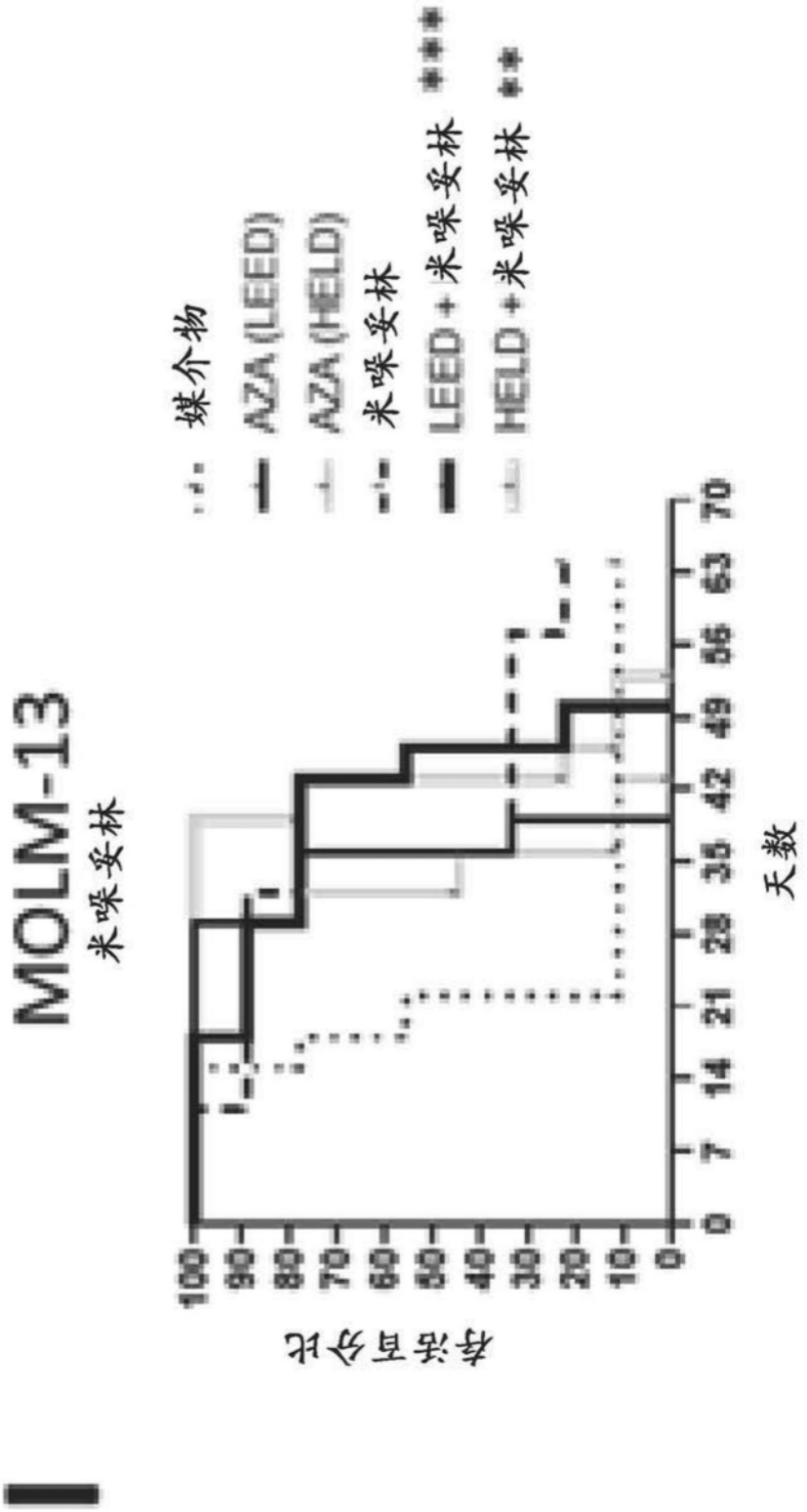

MOLM-13
米哚妥林
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
米哚妥林
LEED + 米哚妥林 ***
HELD + 米哚妥林 **
存活百分比
天数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70

FIG.17I

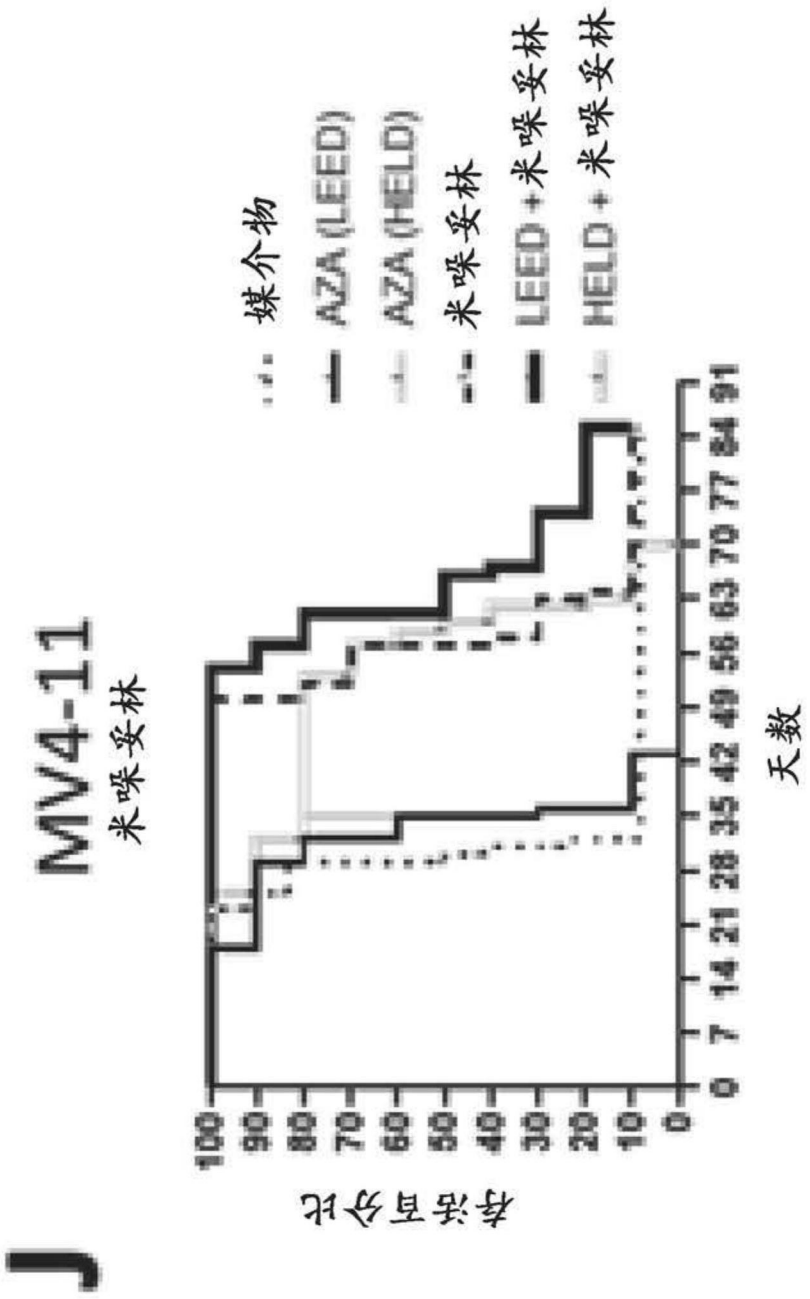

J
MV4-11
米哚妥林
存活百分比
天数
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
米哚妥林
LEED + 米哚妥林
HELD + 米哚妥林

FIG.17J

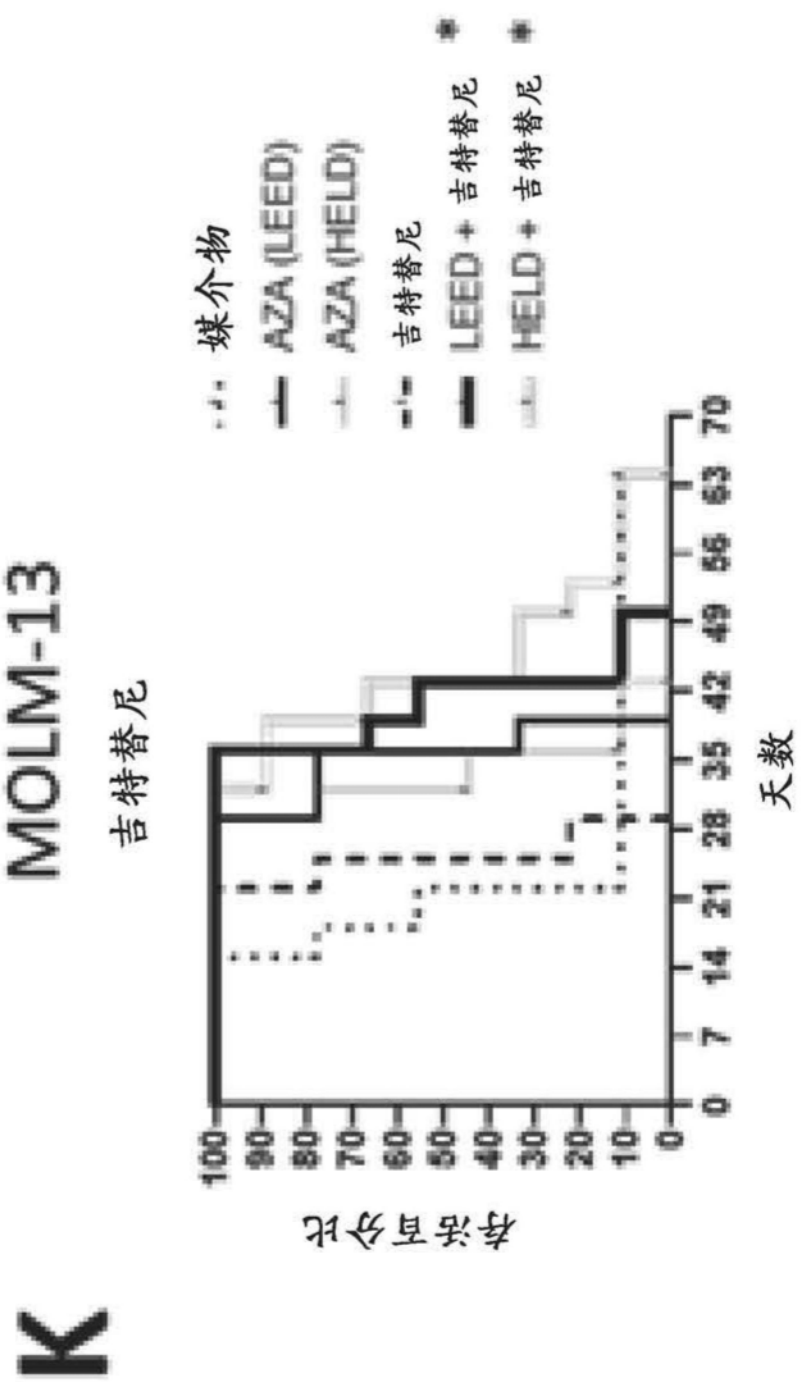

K
MOLM-13
吉特替尼
存活百分比
天数
媒介物
AZA (LEED)
AZA (HELD)
吉特替尼
LEED + 吉特替尼
HELD + 吉特替尼
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70

FIG.17K

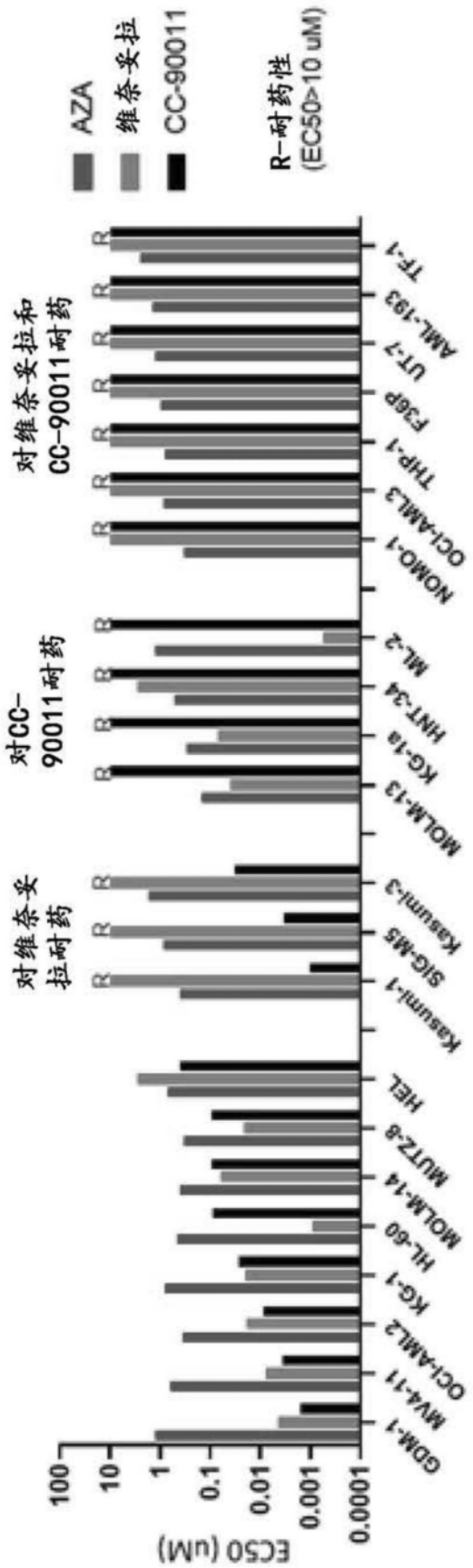

AZA
维奈妥拉
CC-90011
R-耐药性
(EC50>10 uM)
对维奈妥拉和
CC-90011耐药
对CC-
90011耐药
对维奈妥
拉耐药
ECS0 (uM)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
GDM-1
MV4-11
OCI-AML2
KG-1
HL-60
MOLM-14
MUTZ-8
HEL
Kasumi-1
SIG-M5
Kasumi-3
MOLM-13
KG-1a
HNT-34
ML-2
NOMO-1
OCI-AML3
THP-1
F36P
UT-7
AML-193
TF-1
R

FIG.18A

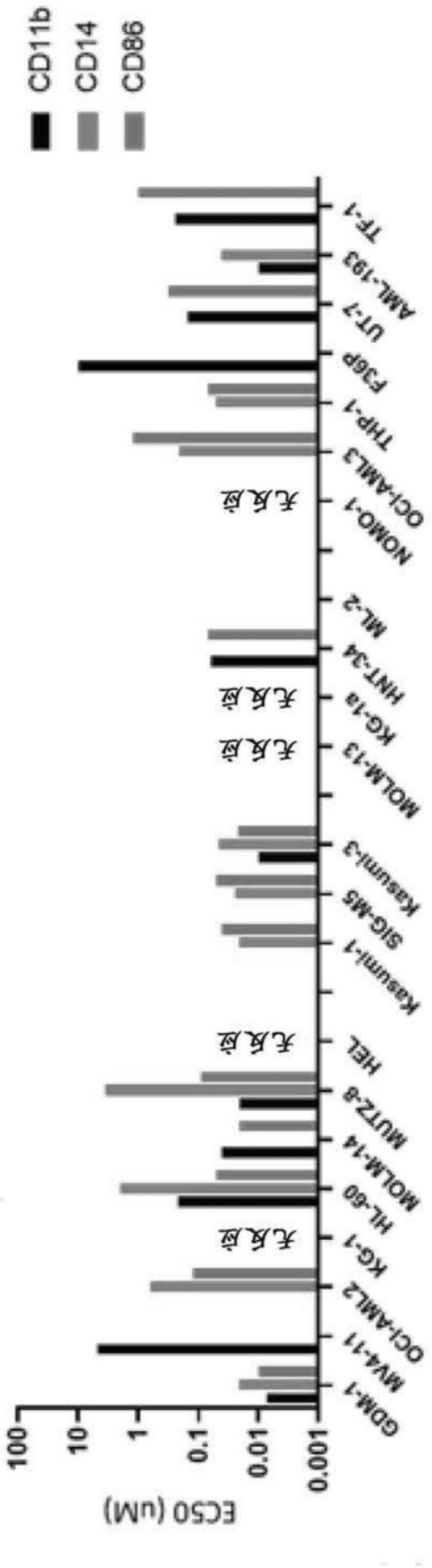

CD11b
CD14
CD86
TF-1
AML-193
UT-7
F36p
THP-1
OCI-AML3
NOMO-1
ML-2
HNT-34
KG-1a
MOLM-13
Kasumi-3
SIG-M5
Kasumi-1
HEL
MUTZ-8
MOLM-14
HL-60
KG-1
OCI-AML2
MV4-11
GDM-1
100
10
1
0.1
0.01
0.001
EC50 (uM)

FIG.18B

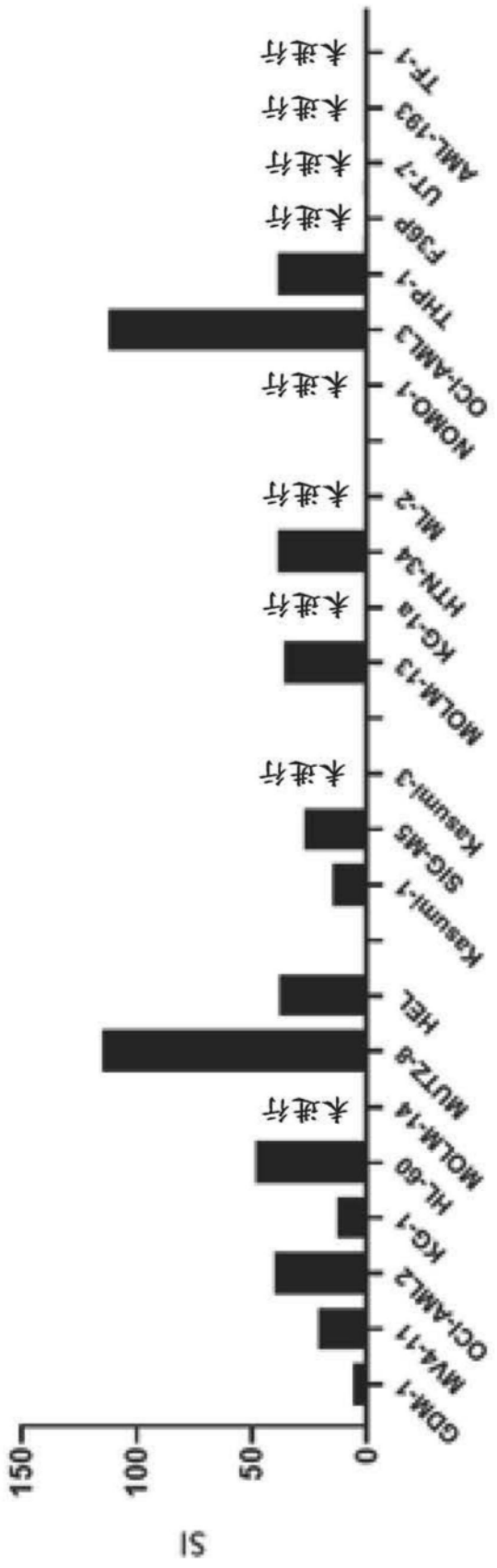

未进行
未进行
未进行
未进行
未进行
未进行
未进行
未进行
未进行
未进行
TF-1
AML-193
UT-7
F36p
THP-1
OCI-AML3
NOMO-1
ML-2
HTN-34
KG-1a
MOLM-13
Kasumi-3
SIG-M5
Kasumi-1
HEL
MUTZ-8
MOLM-14
HL-60
KG-1
OCI-AML2
MV4-11
GDM-1
150
100
50
0
SI

FIG.18C

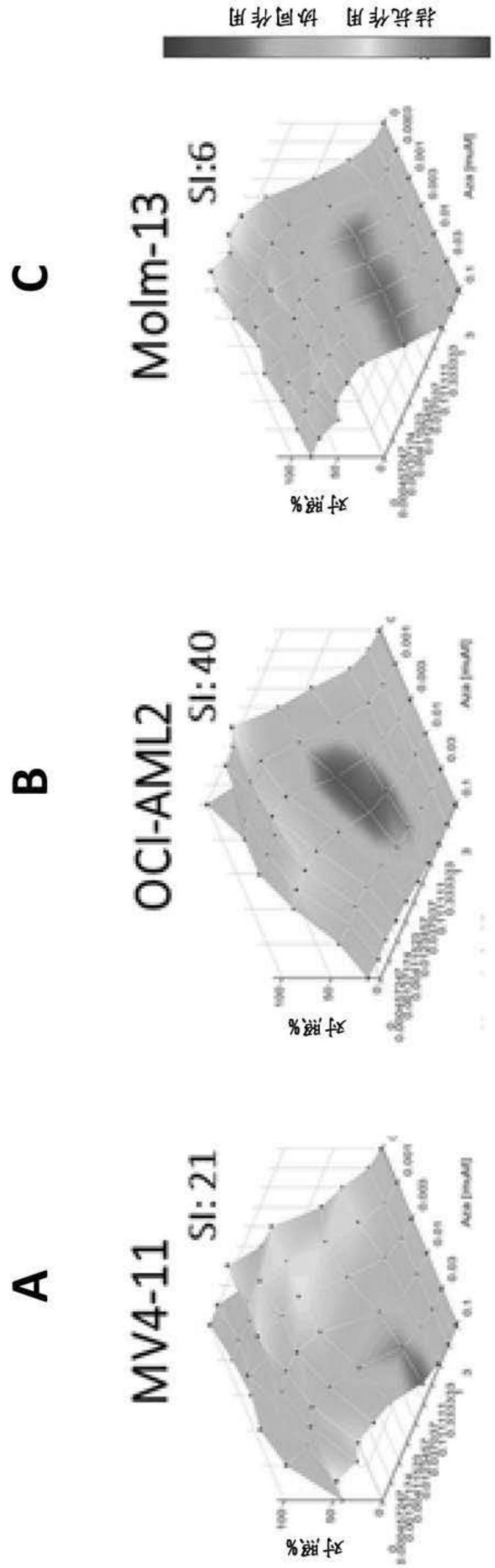


FIG.19

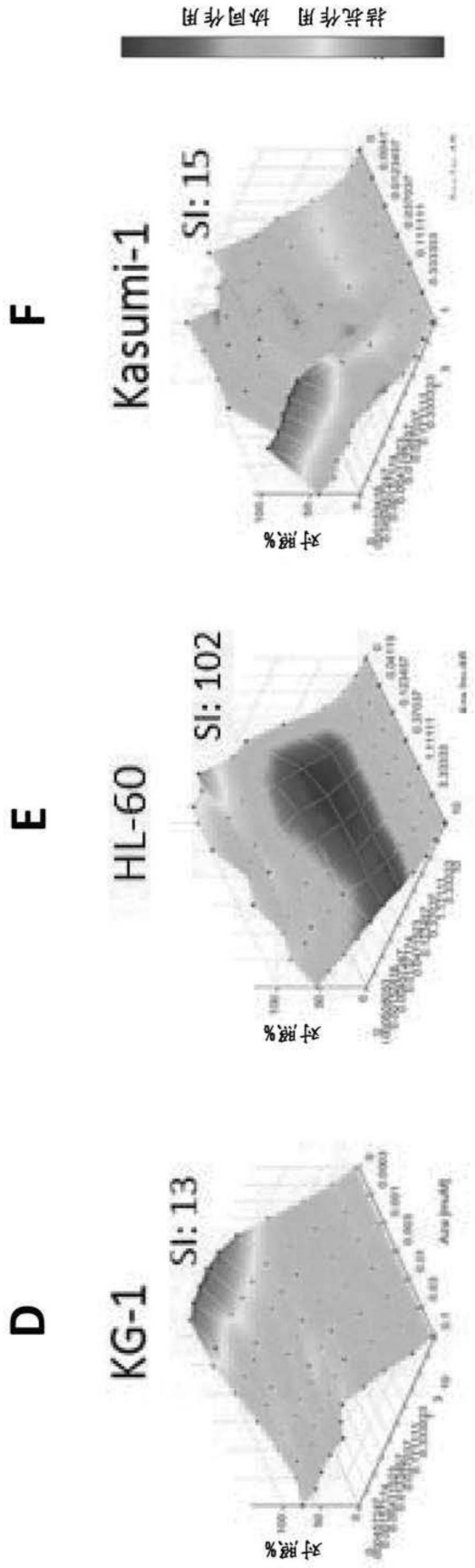


FIG.19

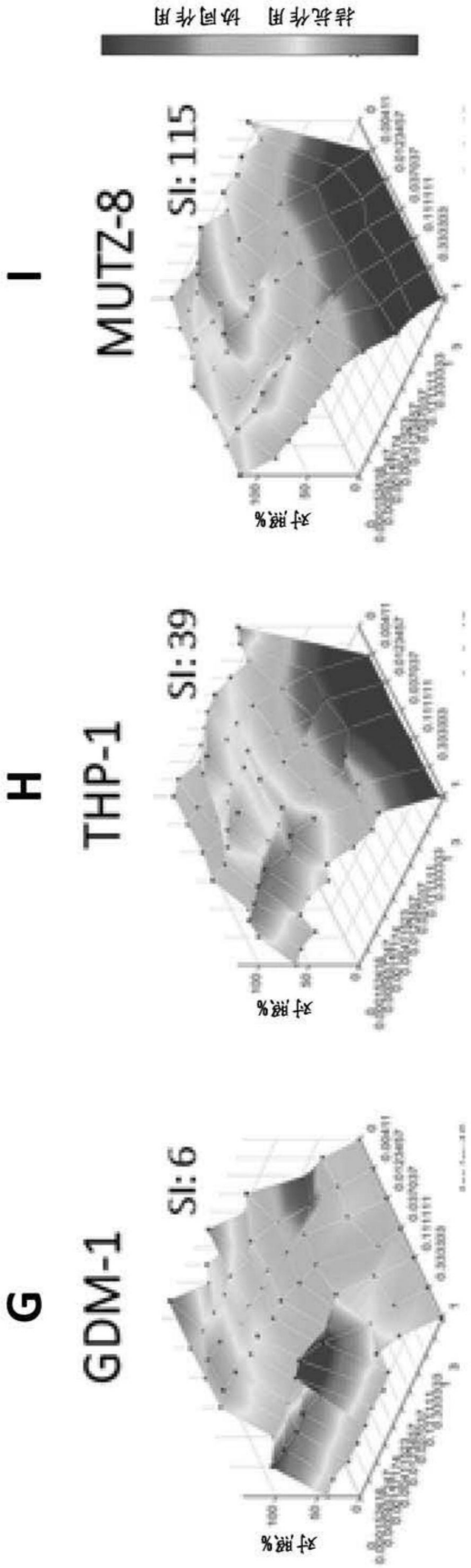


FIG.19

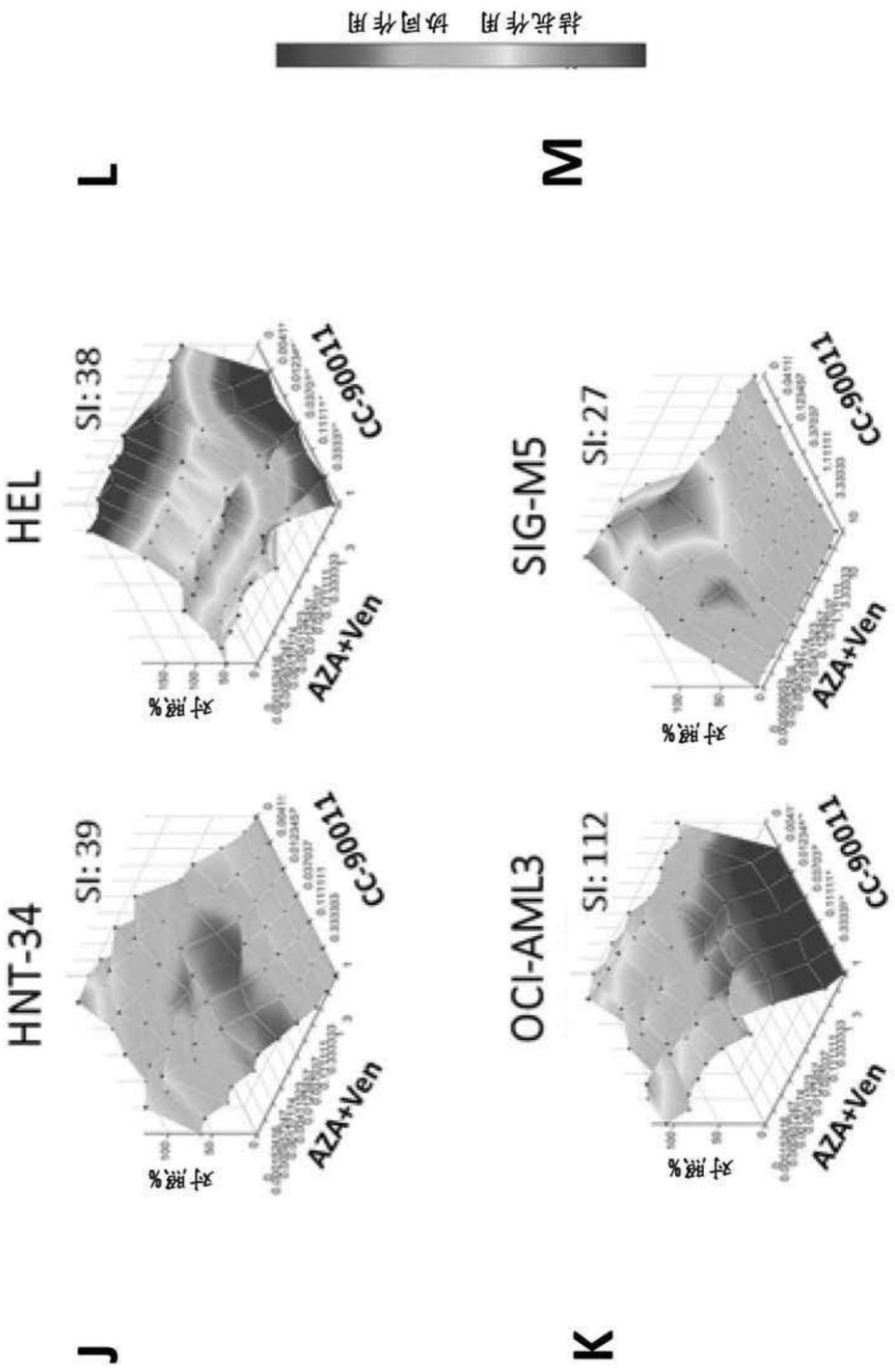

拮抗作用 协同作用
L
M
HEL
SI:38
SIG-M5
SI:27
CC-90011
AZA+Ven
对照%
J
K
HNT-34
SI:39
OCI-AML3
SI:112

FIG.19

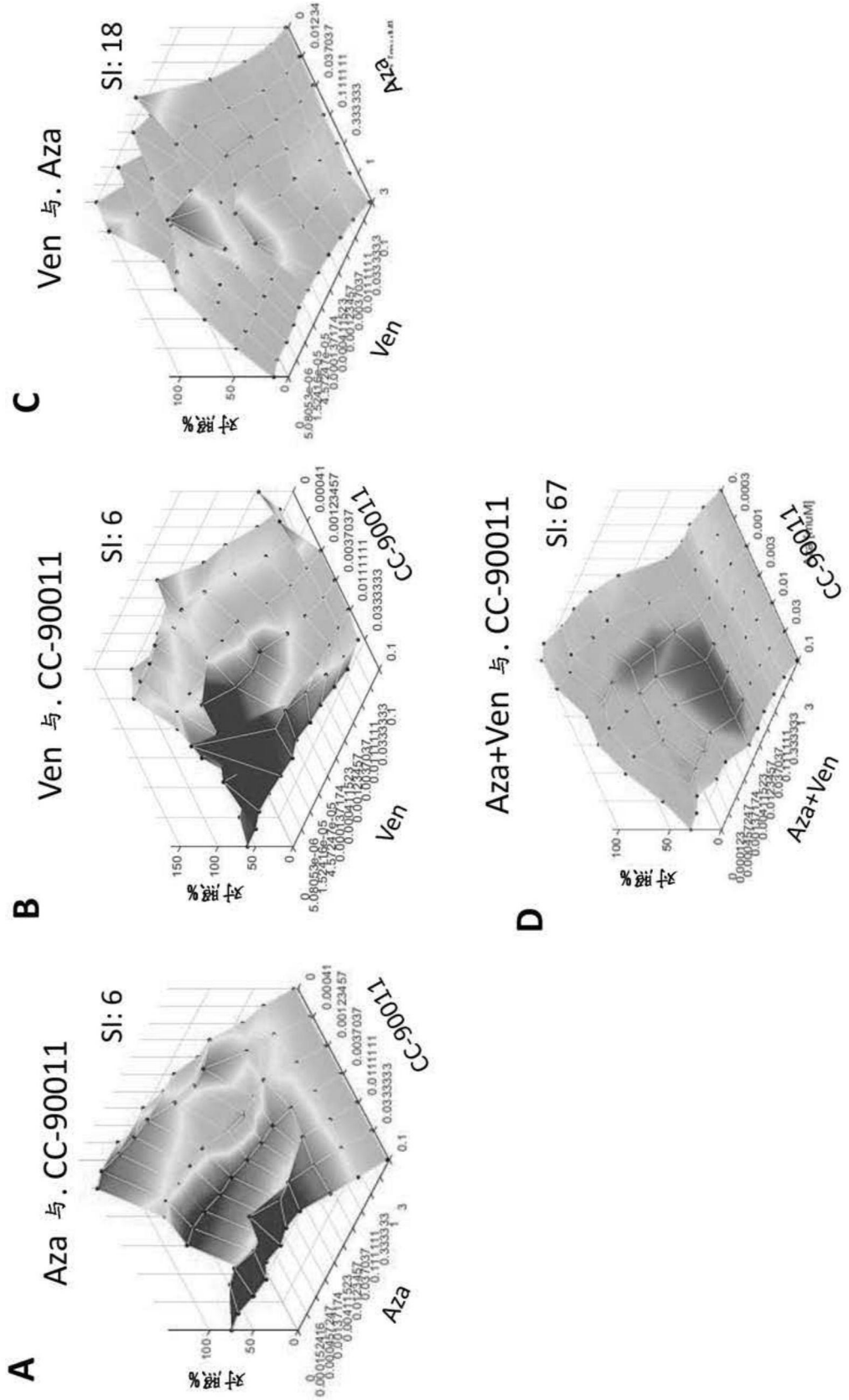

A
Aza 与. CC-90011
SI: 6
对照%
Aza
CC-90011
B
Ven 与. CC-90011
SI: 6
对照%
Ven
CC-90011
C
Ven 与. Aza
SI: 18
对照%
Ven
Aza
D
Aza+Ven 与. CC-90011
SI: 67
对照%
Aza+Ven
CC-90011

FIG.20

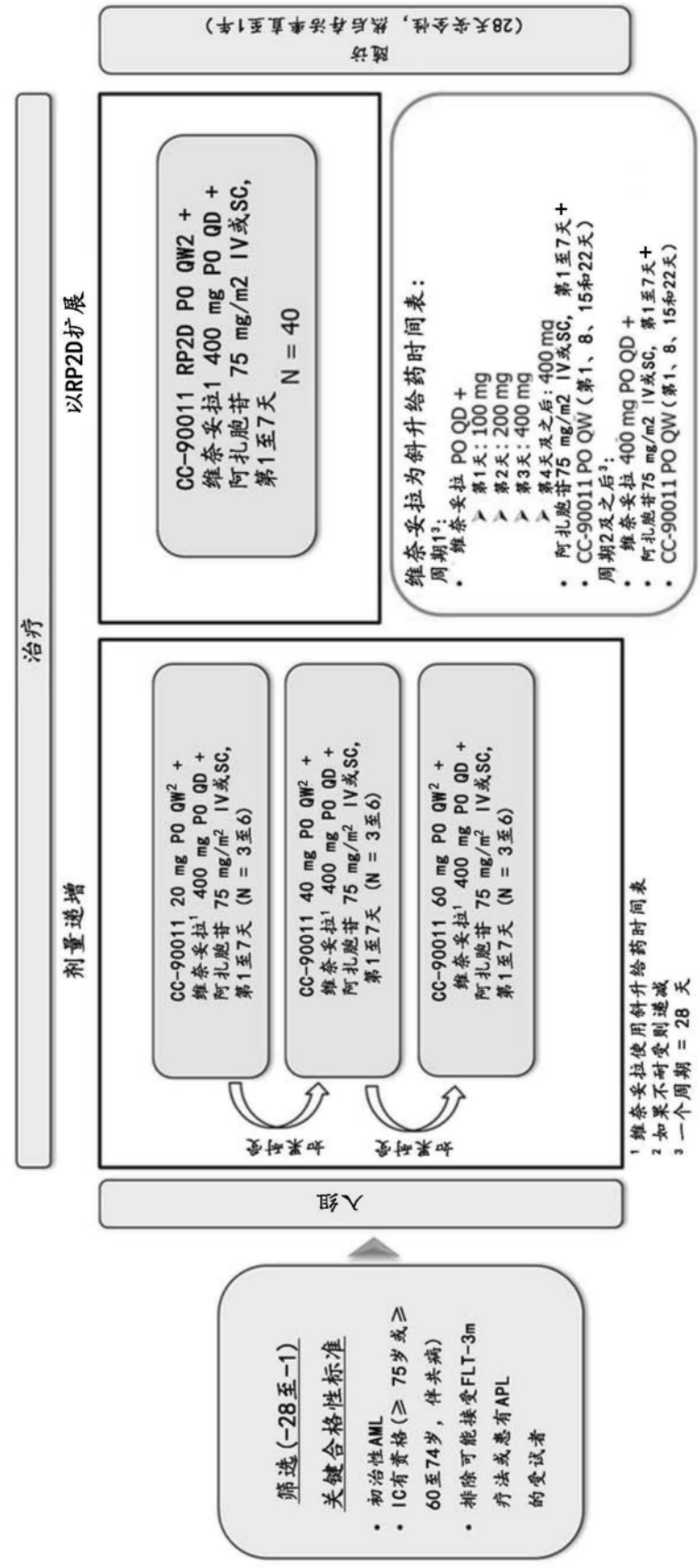

筛选(-28至-1)
关键合格性标准
• 初治性AML
• IC有资格(≥ 75岁或≥ 60至74岁，伴共病)
• 排除可能接受FLT-3m 疗法或患有APL 的受试者
入组
治疗
剂量递增
以RP2D扩展
CC-90011 20 mg PO QW2 + 维奈克拉1 400 mg PO QD + 阿扎胞苷 75 mg/m2 IV或SC, 第1至7天 (N = 3至6)
CC-90011 40 mg PO QW2 + 维奈克拉1 400 mg PO QD + 阿扎胞苷 75 mg/m2 IV或SC, 第1至7天 (N = 3至6)
CC-90011 60 mg PO QW2 + 维奈克拉1 400 mg PO QD + 阿扎胞苷 75 mg/m2 IV或SC, 第1至7天 (N = 3至6)
CC-90011 RP2D PO QW2 + 维奈克拉1 400 mg PO QD + 阿扎胞苷 75 mg/m2 IV或SC, 第1至7天
N = 40
维奈克拉为斜升给药时间表:
周期1[3]:
• 维奈克拉 PO QD +
➢ 第1天: 100 mg
➢ 第2天: 200 mg
➢ 第3天: 400 mg
➢ 第4天及之后: 400 mg
• 阿扎胞苷75 mg/m2 IV或SC, 第1至7天 +
• CC-90011 PO QW (第1、8、15和22天)
周期2及之后[3]:
• 维奈克拉 400 mg PO QD +
• 阿扎胞苷75 mg/m2 IV或SC, 第1至7天 +
• CC-90011 PO QW (第1、8、15和22天)
随访
(28天安全性，疾病特异性1年)
[1] 维奈克拉使用斜升给药时间表
[2] 如果不耐受则递减
[3] 一个周期 = 28 天

FIG.21