



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109313197 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780037724.5

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

(22)申请日 2017.04.14

代理人 郭广迅 李渤

(30)优先权数据

62/323583 2016.04.15 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/50(2006.01)

2018.12.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/027734 2017.04.14

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/181087 EN 2017.10.19

(71)申请人 费利克斯疗法公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M·维连奇克 M·弗里德

A·库兹涅佐娃 Y·甘金

M·杜伊

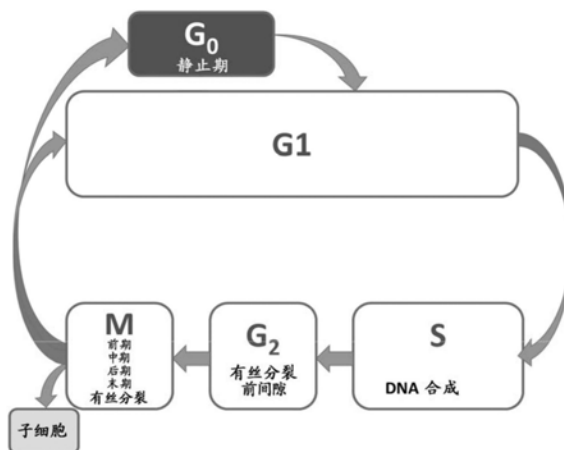
权利要求书5页 说明书19页 附图38页

(54)发明名称

使用静止细胞靶向和有丝分裂抑制剂的用于治疗肿瘤的组合

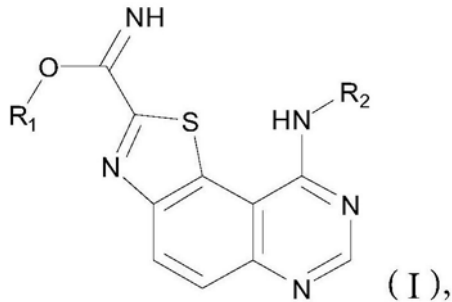
(57)摘要

本发明提供了用于治疗肿瘤的组合和方法,特别是通过使用治疗剂靶向静止癌细胞与针对特定肿瘤病症有效的其他治疗,特别是使用作为有丝分裂抑制剂(有丝分裂的抑制剂)的治疗剂的抗癌治疗的组合用于治疗肿瘤的组合和方法。



1. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予DYRK1抑制剂和向受试者给予有丝分裂抑制剂,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;

R₂为苯基,任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代,其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

2. 权利要求1所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

3. 权利要求1所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和前列腺癌。

4. 权利要求1所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:结肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、小细胞肺癌和胰腺癌。

5. 权利要求1所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂为紫杉烷、长春花生物碱或PLK1抑制剂。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BMS-188796、BMS-188797、卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛(XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇(DHA-紫杉醇)和特西他赛(DJ-927)。

7. 权利要求1所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂是vintafolide。

9. 权利要求1所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BI-2536、GSK461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂选自I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6和I-7。

11. 权利要求10所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂为紫杉烷、长春花生物碱或PLK1抑制剂。

12. 权利要求10所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

13. 权利要求10所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BMS-188796、BMS-188797、

卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛 (XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇 (DHA-紫杉醇) 和特西他赛 (DJ-927)。

14. 权利要求10所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。

15. 权利要求10所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂为vintafolide。

16. 权利要求10所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BI-2536、GSK461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。

17. 权利要求10所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和前列腺癌。

18. 权利要求10所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:结肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、小细胞肺癌和胰腺癌。

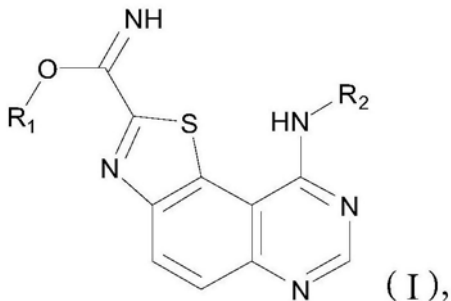
19. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予:

(a) DYRK1抑制剂,其抑制DYRK1A或DYRK1B激酶活性,在生化分析中IC₅₀为100nM或更低,并且使在不存在这样的抑制剂的情况下将另外发现的静止癌细胞(体外或体内)的分数降低至少10%;和

(b) 向受试者给予有丝分裂抑制剂。

20. 权利要求19所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;

R₂为苯基,任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代,其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

21. 权利要求19所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

22. 权利要求19所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和前列腺癌。

23. 权利要求19所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性结肠癌、非小细胞肺

癌、卵巢癌、前列腺癌、小细胞肺癌或胰腺癌。

24. 权利要求19所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂为紫杉烷、长春花生物碱或PLK1抑制剂。

25. 权利要求19所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BMS-188796、BMS-188797、卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛(XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇(DHA-紫杉醇)和特西他赛(DJ-927)。

26. 权利要求19所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。

27. 权利要求19所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂是vintafolide。

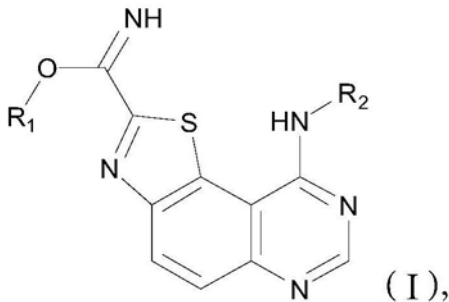
28. 权利要求19所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BI-2536、GSK461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。

29. 权利要求19所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂选自I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6和I-7。

30. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予DYRK1抑制剂和向受试者给予有丝分裂抑制剂,其中如在基于细胞的分析中确定的,当与仅使用有丝分裂抑制剂的相同治疗相比时,组合治疗中有丝分裂抑制剂的EC₅₀值低至少20%。

31. 权利要求30所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;

R₂为苯基,任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代,其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

32. 权利要求30所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

33. 权利要求30所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和前列腺癌。

34. 权利要求30所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性结肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、小细胞肺癌或胰腺癌。

35. 权利要求30所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂是紫杉烷、长春花生物碱或PLK1

抑制剂。

36. 权利要求30所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BMS-188796、BMS-188797、卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛(XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇(DHA-紫杉醇)和特西他赛(DJ-927)。

37. 权利要求30所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。

38. 权利要求30所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂是vintafolide。

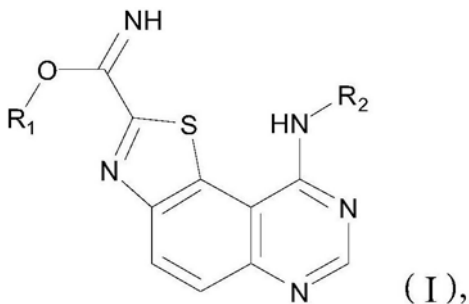
39. 权利要求30所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BI-2536、GSK461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。

40. 权利要求30所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂选自I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6和I-7。

41. 一种用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:

顺序或同时向受试者给予DYRK1抑制剂和向受试者给予有丝分裂抑制剂,其中如通过FACS分析由亚G₀细胞的分数的分数所确定的,所述组合治疗使处理的细胞群中凋亡细胞的分数与任一单独药剂相比增加至少2倍。

42. 权利要求41所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂具有式I



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中

R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;

R₂为苯基,任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代,其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

43. 权利要求41所述的方法,还包括向受试者给予有效量的放射治疗。

44. 权利要求41所述的方法,其中被治疗的肿瘤是选自以下的原发性或转移性癌症:胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、卵巢癌和前列腺癌。

45. 权利要求41所述的方法,其中被治疗的肿瘤是原发性或转移性结肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、小细胞肺癌、胰腺癌。

46. 权利要求41所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂为紫杉烷、长春花生物碱或PLK1抑制剂。

47. 权利要求41所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BMS-188796、BMS-188797、

卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛 (XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇 (DHA-紫杉醇) 和特西他赛 (DJ-927)。

48. 权利要求41所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。

49. 权利要求41所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂为vintafolide。

50. 权利要求41所述的方法,其中所述有丝分裂抑制剂选自BI-2536、GSK461364、GW843682X, HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。

51. 权利要求41所述的方法,其中所述DYRK1抑制剂选自I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6和I-7。

使用静止细胞靶向和有丝分裂抑制剂的用于治疗肿瘤的组合

[0001] 发明背景

[0002] 癌细胞静止,实际上是细胞处于睡眠状态,最近已经认识到它是癌细胞对抗治疗并用于提供疾病复发的途径的主要机制。这种静止,或者称为细胞休眠是由于在细胞周期的G₀期的阻滞。通常,细胞从间期1(G₁)进入细胞周期,如图1所示。在合成期(S)和短暂的有丝分裂前间隙(G₂)之后,细胞通过有丝分裂(M)分裂,然后返回G₁。然而,除了G₁,细胞还可以进入细胞休眠或静止,称为G₀期。癌细胞可以在经历终末分化之前进入不可逆状态,称为衰老,或进入可逆的、真正的静止G₀状态,它们可以由此恢复循环,像静止成纤维细胞(Coller HA, Sang L, 和Roberts JM(2006) A new description of cellular quiescence, PLoS Biology 4, e83)。

[0003] 细胞群可以天然地在任何给定时间处于静止状态,并且保持静止达一段不确定的时期,直到接收到进入细胞分裂周期的信号。在一个实例中,肿瘤中的细胞群内处于静止状态的癌细胞的比例可能因环境因素,如缺乏营养物、缺氧、高浓度的活性氧物质等而增加。细胞也可以通过药物的作用被诱导进入静止状态,如在药理学静止中。

[0004] 相对于分裂细胞,静止细胞的能量和营养需求降低。由于目前的癌症治疗靶向分裂细胞,如图2所示,因此,癌细胞必须处于细胞分裂周期以使这样的治疗对其发生影响。因此,静止癌细胞对抗通过破坏暴露的DNA、干扰DNA复制或修复、干扰有丝分裂或其他机制影响一种或多种细胞增殖过程的治疗。

[0005] 抗癌疗法和放射治疗均产生不良反应。因此,治疗的剂量和持续时间受到毒性的限制,并且非常期望更低的有效剂量和/或更短的治疗持续时间。然而,在减少剂量或中断治疗后,存活的静止癌细胞可以在重新进入细胞周期后引起癌症复发,其时机无法预测。此外,血流中的转移性癌细胞可以经历一段时间的静止,同时它们适应其新的微环境(Chaffer CL和Weinberg RA(2011) A perspective on cancer cell metastasis, Science 331, 1559-1564)。静止癌细胞降解其多核糖体,从而阻断翻译并降低总RNA和蛋白质含量。这些收缩的癌细胞可能能够进入毛细血管的孔(直径约8μm),而循环癌细胞通常大得多(20-30μm)。

[0006] 因此,肿瘤内静止癌细胞群的存在被认为是成功和持久治疗的障碍(Jackson RC(1989) The problem of the quiescent cancer cell, Advances in Enzyme Regulation 29, 27-46)。已经报道了源自各种癌症类型的静止癌细胞和其对各种抗癌治疗的抗性的证据。

[0007] 然而,尽管越来越认识到癌细胞静止的重要性,但这个问题在临床上仍未得到解决。因此,本发明提供了用于治疗肿瘤的方法和组合,其特征在于通过小分子,特别是针对静止癌细胞有效的分子靶向静止癌细胞与已知的针对特定肿瘤细胞有效的治疗的组合。

[0008] 发明概述

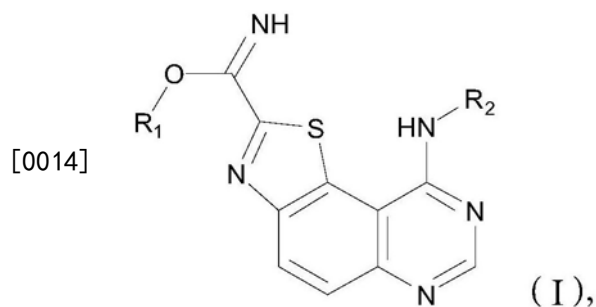
[0009] 本发明提供了用于治疗肿瘤的组合和方法,特别是通过使用治疗剂靶向静止癌细胞与其他针对特定肿瘤病症有效的治疗,特别是使用作为有丝分裂抑制剂(有丝分裂的抑制剂)的治疗剂的抗癌治疗的组合用于治疗肿瘤的组合和方法。

[0010] 通常,本发明的特征在于一种治疗肿瘤的方法,其包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂;和(b)第二药剂,其为有丝分裂抑制剂,其中这两种药剂可以顺序或同时给予。在一些实施方案中,肿瘤是癌症或体外或体内的癌细胞群。在一些实施方案中,接受治疗的受试者被诊断患有癌症(例如,转移性的或转移前的)。在一些实施方案中,受试者先前已经用针对癌症的一线疗法治疗。在一些实施方案中,顺序或同时使用两种或更多种有丝分裂抑制剂治疗受试者,或已经顺序或同时使用两种或更多种有丝分裂抑制剂治疗受试者。

[0011] 在一些实施方案中,组合治疗可以导致改善的结果,如存活延长、严重性降低、复发延迟或消除或主要治疗(即有丝分裂抑制剂)的副作用减少。在一些实施方案中,与单独使用药剂的治疗相比,当作为组合的部分给予时,第二药剂以更低的剂量和/或更短的持续时间给予。例如,在一些实施方案中,如例如在基于细胞的分析中确定的,当与单独使用有丝分裂抑制剂的相同治疗相比时,组合治疗中有丝分裂抑制剂的EC₅₀值低至少20%。在一些实施方案中,如例如通过FACS分析由亚G₀细胞的分数所确定的,与单独的任一药剂相比,组合治疗使处理的细胞群中凋亡细胞的分数增加至少2倍。

[0012] 在一个实施方案中,针对静止癌细胞有效的治疗剂是DYRK1抑制剂。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂是抑制DYRK1激酶,DYRK1A或DYRK1B的活性(体外或体内)的化合物,例如,在生化分析中IC₅₀为100nM或更低。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂使在不存在这样的抑制剂的情况下将另外发现的静止癌细胞(体外或体内)的分数降低例如至少10%。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂抑制DYRK1A和DYRK1B二者。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂对DYRK1A或DYRK1B具有选择性。

[0013] 在一个实施方案中,针对静止癌细胞有效的治疗剂是DYRK1抑制剂。在一个实施方案中,DYRK1抑制剂是式I的化合物:

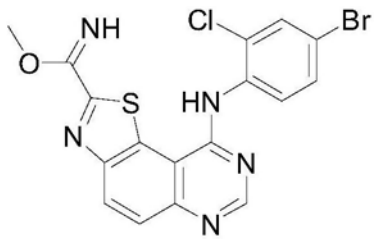


[0015] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中,

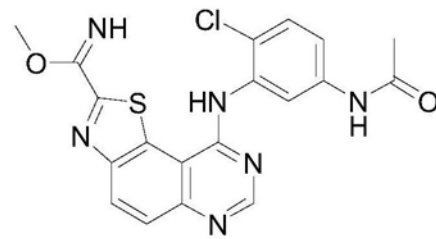
[0016] R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;

[0017] R₂为苯基,任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代,其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

[0018] 在一个实施方案中,式I的化合物选自:

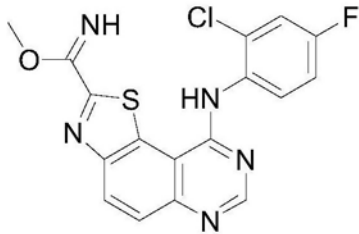


(I-1)、

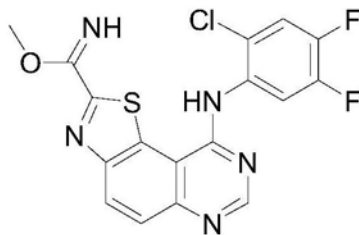


(I-2)、

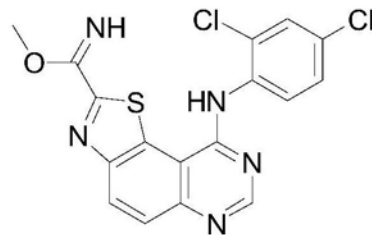
[0019]



(I-3)、

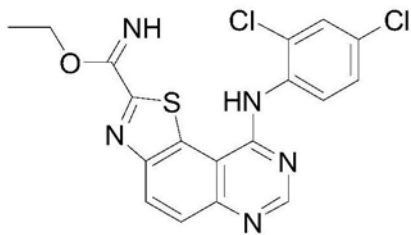


(I-4)、

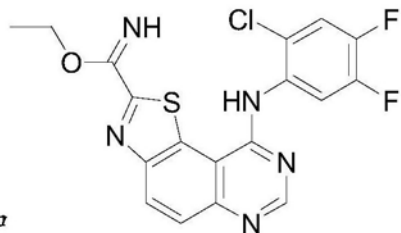


(I-5)、

[0020]



(I-6)



和

(I-7)。

[0021] 在另一个实施方案中,本发明的方法还提供了(c)向受试者给予另一种癌症治疗,例如,放射治疗或其他癌症治疗。

[0022] 在一个实施方案中,本发明的方法包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)式I的治疗剂;(b)有丝分裂抑制剂;和(c)放射治疗;每种治疗顺序或同时给予。例如,在一些实施方案中,首先用放射疗法治疗受试者,然后单独或与有丝分裂抑制剂组合向受试者给予式I的治疗剂。在一些实施方案中,向受试者共同给予(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂,(b)有丝分裂抑制剂,和任选的(c)放射治疗。在一些实施方案中,有丝分裂抑制剂是有效治疗或防止肿瘤的有丝分裂抑制剂,包括但不限于批准用于治疗癌症的所有这样的化合物和另外在治疗哺乳动物受试者(例如,小鼠、大鼠、狗、猴、人)的癌症中显示功效的化合物,和在体外针对肿瘤细胞显示功效的化合物。许多这样的化合物是已知的。

[0023] 在一个实施方案中,有丝分裂抑制剂是紫杉烷。在另一个实施方案中,有丝分裂的

紫杉烷抑制剂为例如, BMS-188796、BMS-188797、卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛 (XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇 (taxoprexin) (DHA-紫杉醇) 和特西他赛 (tesetaxel) (DJ-927)。

[0024] 在另一个实施方案中, 有丝分裂抑制剂是长春花生物碱。在另一个实施方案中, 有丝分裂的长春花生物碱抑制剂为例如, 长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。在另一个实施方案中, 有丝分裂的长春花生物碱抑制剂为vintafolide。

[0025] 在另一个实施方案中, 有丝分裂抑制剂是PLK1抑制剂。在另一个实施方案中, 有丝分裂的PLK1抑制剂为例如, BI-2536、GSK 461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替 (rigosertib)、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替 (volasertib)。在另一个实施方案中, 有丝分裂抑制剂为BI-2536或GSK461364。

[0026] 在另一个实施方案中, 被治疗的肿瘤为癌症, 例如, 胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌 (例如黑色素瘤)、睾丸癌、甲状腺癌或子宫癌。在另一个实施方案中, 被治疗的肿瘤是膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢癌和前列腺癌。在另外的实施方案中, 癌症是原发性或转移性的。在又一个实施方案中, 癌症是由实施例中所示的细胞系类型代表的类型。

[0027] 实施方案并不意味着对另外的组合组分, 尤其是作为现有治疗组合的部分的治疗剂和抑制剂, 例如TPF或PCV的限制, 其中T代表泰素帝[®], 即多西他赛, 其中V代表硫酸长春新碱。类似地, 实施方案并不意味着对给予途径和顺序或者对患者类型 (先前未治疗或先前治疗的、存在或不合并病症、性别等) 或患者的疾病阶段、有丝分裂抑制剂的类型等的限制。

[0028] 附图简述

[0029] 图1显示真核细胞的有丝分裂周期的示意图。

[0030] 图2显示真核癌细胞的有丝分裂周期的示意图, 对其注释以表示所认为的一些可用抗癌治疗剂作用的细胞周期的阶段。

[0031] 图3显示紫杉醇和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对SW620细胞的生长的影响。

[0032] 图4显示紫杉醇和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对DMS273细胞的生长的影响。

[0033] 图5显示紫杉醇和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对LNCap细胞的生长的影响。

[0034] 图6显示紫杉醇和化合物I-7 (0、3和6 μ M) 的组合对HCC827细胞的生长的影响。

[0035] 图7显示紫杉醇和化合物I-7 (0、3和6 μ M) 的组合对A549细胞的生长的影响。

[0036] 图8显示紫杉醇和化合物I-7 (0、2、4、8和10 μ M) 的组合对SK-OV-3细胞的生长的影响。

[0037] 图9显示紫杉醇和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对OVCAR3细胞的生长的影响。

[0038] 图10显示多西他赛和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对SW620细胞的生长的影响。

[0039] 图11显示多西他赛和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对DMS273细胞的生长的影响。

[0040] 图12显示多西他赛和化合物I-7 (0、3和6 μ M) 的组合对HCC827细胞的生长的影响。

[0041] 图13显示多西他赛和化合物I-7 (0、3和6 μ M) 的组合对A549细胞的生长的影响。

[0042] 图14显示多西他赛和化合物I-7 (0、4和8 μ M) 的组合对SK-OV-3细胞的生长的影响。

[0043] 图15显示多西他赛和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对OVCAR3细胞的生长的影响。

- [0044] 图16显示长春新碱和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对DMS273细胞的生长的影响。
- [0045] 图17显示长春新碱和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对H1975细胞的生长的影响。
- [0046] 图18显示长春新碱和化合物I-7 (0、4和8 μ M) 的组合对SK-OV-3细胞的生长的影响。
- [0047] 图19显示长春新碱和化合物I-7 (0、1和3 μ M) 的组合对OVCAR3细胞的生长的影响。
- [0048] 图20显示长春瑞滨和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对DMS273细胞的生长的影响。
- [0049] 图21显示长春瑞滨和化合物I-5 (0、2和4 μ M) 的组合对H1975细胞的生长的影响。
- [0050] 图22显示长春瑞滨和化合物I-7 (0、1和3 μ M) 的组合对OVCAR3细胞的生长的影响。
- [0051] 图23显示长春新碱和化合物I-7 (0、4和8 μ M) 的组合对SK-OV-3细胞的生长的影响。
- [0052] 图24显示长春新碱和化合物I-7 (0、3和6 μ M) 的组合对A549细胞的生长的影响。
- [0053] 图25显示BI2536和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对H1975细胞的生长的影响。
- [0054] 图26显示BI2536和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对PANC1细胞的生长的影响。
- [0055] 图27显示BI2536和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对DMS273细胞的生长的影响。
- [0056] 图28显示BI2536和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对A549细胞的生长的影响。
- [0057] 图29显示GSK461364和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对H1975细胞的生长的影响。
- [0058] 图30显示GSK461364和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对PANC1细胞的生长的影响。
- [0059] 图31显示GSK461364和化合物I-7 (0、2和4 μ M) 的组合对DMS273细胞的生长的影响。
- [0060] 图32显示GSK461364和化合物I-7 (0、3和6 μ M) 的组合对A549细胞的生长的影响。
- [0061] 图33显示在以下中孵育24小时的DMS273细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A: FBS+培养基;图B: FBS-培养基;图C: 含有4 μ M化合物I-7的FBS+培养基;图D: 含有2.7nM紫杉醇的FBS+培养基;图E: 含有5 μ M化合物I-7和2nM紫杉醇的FBS+培养基。
- [0062] 图34显示在以下中孵育24小时的SW620细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A: FBS+培养基;图B: FBS-培养基;图C: 含有4 μ M化合物I-7的FBS+培养基;图D: 含有2nM紫杉醇的FBS+培养基;图E: 含有4 μ M化合物I-7和2nM紫杉醇的FBS+培养基。
- [0063] 图35显示在以下中孵育24小时的DMS273细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A: FBS+培养基;图B: FBS-培养基;图C: 含有4 μ M化合物I-7的FBS+培养基;图D: 含有1.1nM长春新碱的FBS+培养基;图E: 含有4 μ M化合物I-7和1.1nM长春新碱的FBS+培养基。
- [0064] 图36显示在以下中孵育24小时的DMS273细胞的细胞周期分布的FACS分析:图A: FBS+培养基;图B: FBS-培养基;图C: 含有4 μ M化合物I-7的FBS+培养基;图D: 含有8.1nM长春瑞滨的FBS+培养基;图E: 含有4 μ M化合物I-7和8.1nM长春瑞滨的FBS+培养基。
- [0065] 图37显示通过SW620细胞的细胞周期分布的DNA含量进行的FACS分析。细胞在以下中孵育:图A: 在FBS-培养基中24小时;图B: 在具有2.5 μ M AZ191的FBS-培养基中24小时;图C: 在具有5 μ M AZ191的FBS-培养基中24小时;图D: 在具有10 μ M AZ191的FBS-培养基中24小时。
- [0066] 图38显示通过SW620细胞的细胞周期分布的DNA含量进行的FACS分析。细胞在以下中孵育:图A: 在具有DMSO对照的FBS-培养基中24小时;图B: 在具有1.25 μ M化合物I-7的FBS-培养基中24小时;图C: 在具有2.5 μ M化合物I-7的FBS-培养基中24小时;图D: 在具有5 μ M化合物I-7的FBS-培养基中24小时。

[0067] 发明详述

[0068] 术语表

[0069] 在本发明中,除非另有说明,“烷基”是包含1至8个碳原子(C₁₋₈烷基),特别是1至6个,或1至4个碳原子的饱和的直链或支链烃基。所包括的具有1至6个碳原子的烷基的实例为甲基、乙基、丙基(例如,正丙基、异丙基)、丁基(例如,叔丁基、仲丁基、正丁基)、戊基(例如,新戊基)、己基(例如,正己基)、2-甲基丁基、2-甲基戊基以及其他异构形式。烷基可以是未取代的或被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。

[0070] 在本发明中,“烯基”是包含至少一个碳-碳双键,包含2-8个碳原子的直链或支链烃基(除非另有说明)。包含2至6个碳原子的烯基的实例为乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基及其异构形式。烯基可以是未取代的或被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。

[0071] 在本发明中,“炔基”是包含至少一个碳-碳三键,包含2至8个碳原子的直链或支链烃基。炔基可以被至少一个选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。

[0072] 在本发明中,“芳基”是包含5至14个碳原子的芳烃环。最优选的芳基是单环或双环的,并且包含6至14个碳原子,如苯基、 α -萘基、3-萘基、蒽基,优选苯基。“芳基”还包括双环或三环,其包含稠合到至少另一个芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基的芳环,如苯并二氧杂环戊烷、苯并二氧六环、二氢苯并呋喃或苯并咪唑。芳基可以是未取代的或被至少一个(例如,1、2或3个)选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,芳基可以被相邻的取代基取代,所述取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0073] 在本发明中,“卤素原子”或“卤素”是Cl、Br、F或I原子。

[0074] 在本发明中,“烷氧基”是具有式O-烷基的通过氧原子与分子的其余部分连接的烷基。

[0075] 在本发明中,“氨基”是NH₂、NH-烷基或N(烷基)₂。

[0076] 在本发明中,“杂芳基”是其环被至少一个杂原子,例如N、O或S原子中断的芳基,如噻吩或吡啶。杂芳基可以是未取代的或被至少一个(例如,1、2或3个)选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,杂芳基可以被相邻的取代基取代,所述相邻的取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0077] 在本发明中,“环烷基”表示形成一个具有优选3至14个碳原子,更优选3至8个碳原子的环的饱和烷基,如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。环烷基可以是未取代的或被至少一个(例如,1、2或3个)选自以下的基团取代:卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外,环烷基可以被相邻的取代基取代,所述相邻的取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环,其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0078] 在本发明中,“杂环烷基”是包含至少一个杂原子的环烷基,如吡咯烷、四氢噻吩、四氢呋喃、哌啶、吡喃、二恶英、吗啉或哌嗪。杂环烷基可以特别地包含4至14个碳原子,如吗

啉基、哌啶基、吡咯烷基、四氢吡喃基、二硫杂环戊基。杂环烷基可以是未取代的或被至少一个选自以下的基团取代：卤素原子、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、烯基、炔基、CN、硝基和氨基。此外，杂环烷基可以被相邻的取代基取代，所述相邻的取代基可以与它们所连接的碳原子一起形成5-至6-元环，其可以含有一个或多个选自N、O和S的杂原子。

[0079] 如本文所使用的，“肿瘤”是指由瘤形成导致的异常组织块。“瘤形成”是指细胞异常增殖的过程。在本发明的一些实施方案中，肿瘤是实体癌，或者为造血系统癌。瘤形成可以是良性的、癌变前的或恶性的。术语肿瘤包括哺乳动物癌症，在一些实施方案中，人癌症，和癌 (carcinoma)，肉瘤，任何组织的母细胞瘤 (例如腺癌、鳞状细胞癌、骨肉瘤等)，生殖细胞肿瘤，神经胶质细胞瘤，淋巴瘤，白血病，包括实体癌和淋巴瘤，肾癌，乳腺癌，肺癌，膀胱癌，结肠癌，卵巢癌，前列腺癌，直肠癌，胰腺癌，胃癌，脑癌，头颈癌，皮肤癌，子宫癌，宫颈癌，睾丸癌，食道癌，甲状腺癌，胆管癌，肝癌，和骨和软骨组织的癌症，包括非霍奇金淋巴瘤 (例如，伯基特淋巴瘤、小细胞淋巴瘤和大细胞淋巴瘤) 和霍奇金淋巴瘤，白血病，多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征。

[0080] 如本文所使用的，术语“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”意指抵抗医学病症 (例如，癌症) 至医学病症根据临床可接受的标准得到改善的程度。癌症的改善可以包括：1) 肿瘤增长速度降低 (肿瘤生长抑制)，2) 肿瘤缩小 (消退)，3) 部分或全部缓解，4) 转移减少，5) 无进展生存延长，和6) 复发延迟或消除。在本发明的某些实施方案中，治疗包括部分或基本上实现以下结果中的一种或多种：部分或完全减少癌症质量、体积或恶性细胞计数；减轻或改善与实体癌或造血系统癌相关的临床症状或指标；延迟、抑制或防止实体癌或造血系统癌的进展；或部分或完全延迟、抑制或防止实体癌或造血系统癌的发生或发展。“治疗”还可以意味着与未经治疗的预期生存相比或与护理治疗的标准相比，生存延长。

[0081] 治疗包括预防性 (prophylactic) 或预防 (preventative) 治疗。“预防性治疗”是指在出现或重新出现目标疾病的临床症状之前，以防止、抑制或减少其发生、严重性或进展的治疗。

[0082] 如本文所使用的，“有效量”是指治疗剂或治疗剂组合的量，其在治疗上或预防上足以实现对目标疾病的期望改善。有效量的实例通常为每单次给予剂量约0.0001mg/kg体重至约500mg/kg体重，这些剂量一次或在一段时间内给予。示例性范围为每剂量约0.0001mg/kg体重至约5mg/kg。在其他实例中，范围可以为每单次给予剂量约0.0001mg/kg至约5mg/kg。在再其他实例中，有效量的范围为每单次给予剂量约0.01mg/kg体重至50mg/kg体重，或每单次给予剂量0.01mg/kg体重至0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg或40mg/kg体重。对于具有已知临床用途的药剂，有效剂量的实例是管理机构批准用于治疗适应症的量。

[0083] 如本文所使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如人，但也可以指需要兽医学治疗的动物，例如陪伴动物 (例如，狗、猫等)，农场动物 (例如，牛、绵羊、猪、马等) 和实验室动物 (例如，大鼠、小鼠、豚鼠等)。

[0084] 如本文所用的，术语“治疗剂”是指用于或考虑用于或研究用于癌症治疗的任何化学分子，包括细胞毒性剂、细胞抑制剂或靶向剂，无论是小分子、肽、抗体还是寡核苷酸，也不论作用机制如何。如本文所使用的，术语“治疗的”或“治疗剂”是指活性药物成分 (API) 或

其药学上可接受的盐或水合物(溶剂化物),或包含治疗剂的药物产品,无论如何配制,以及无论API是无定形的还是结晶的,也不论是何种多晶型。制剂是指活性药物成分(API,药物物质)或成分(API)与赋形剂和/或递送载体组合以制备可给予的剂型(药物产品)的组合。例如,如本文所使用的,对紫杉醇的提及包括**泰素[®]**

(**Taxol[®]**)、**Abraxane[®]**、**力扑素[®]**(**Lipusu[®]**)和包含紫杉醇作为活性成分的任何其他药物产品。

[0085] 就标准药学实践而言(如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing中所述的),本发明的治疗剂可以单独给予,但通常与药学上可接受的载体一起给予。因此,本发明的另一个目的涉及本文定义的药物组合物和药学上可接受的载体。

[0086] 如本文所使用的,术语“抑制剂”是指降低酶活性的任何组合物。抑制剂的实例是化学分子。抑制剂效力的量度是其“50%抑制浓度”(IC₅₀)。IC₅₀浓度或IC₅₀值是抑制剂抑制50%的酶活性时的抑制剂浓度。用于确定例如激酶抑制剂的IC₅₀值的方法是本领域普通技术人员已知的,并且包括直接和间接功能分析,如HotSpot[™]激酶分析技术(Reaction Biology Corporation, Malvern, PA, www.reactionbiology.com)或竞争结合分析,如**KINOMEScan[®]**(DiscoverX Corporation, Fremont, CA, www.discoverx.com)。

[0087] 治疗剂针对细胞系的效力的量度是其“50%有效浓度”(EC₅₀)。EC₅₀浓度或EC₅₀值是产生半数最大反应,例如50%的生长抑制或50%细胞活力降低的药物浓度。用于确定例如激酶抑制剂的EC₅₀值的方法是本领域普通技术人员已知的。

[0088] 如本文所使用的,术语“静止”或“静止状态”是指细胞周期的G₀状态,如本领域从业人员所理解的。

[0089] 如本文所使用的,术语“针对静止癌细胞有效的治疗剂”是指降低细胞群中静止癌细胞的分数或在否则会导致细胞群中静止癌细胞的分数增加的情况下完全或基本上防止这样的增加的分子。

[0090] “静止的肿瘤细胞”,或称为“静止癌细胞”,是指处于细胞周期的静止状态或G₀状态的癌细胞。如本文所使用的,“静止的肿瘤细胞的分数”或“静止的癌细胞的分数”是指处于细胞周期的G₀状态的癌细胞群的部分。确定静止的肿瘤细胞的分数包括通过在细胞周期的阶段内细胞群的组成细胞的分布来表征细胞群。将处于G₀状态的细胞部分(即静止的肿瘤细胞)相对于总细胞群定量。该分数可以表示为总细胞群的百分比(即(静止细胞数除以细胞群中总细胞数)乘以100)。通过在细胞周期阶段内细胞群的组成细胞的分布来表征细胞群可以通过本领域普通技术人员已知的技术实现,并且可以包括使用流式细胞术方法,例如荧光激活细胞分选术(FACS),通过DNA和/或RNA含量进行的分析。

[0091] 详述

[0092] 本发明提供了用于治疗肿瘤的组合物和方法,特别是通过使用治疗剂靶向静止癌细胞与其他针对特定肿瘤病症有效的治疗,特别是使用作为有丝分裂抑制剂的治疗剂的抗癌治疗的组合用于治疗肿瘤的组合物和方法。

[0093] 通常,本发明的特征在于治疗肿瘤的方法,其包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂;(b)第二药剂,其为有丝分裂抑制剂,其中所述两种药剂可以顺序或同时给予。在一些实施方案中,肿瘤是癌症或体外或体内的癌细胞群。

在一些实施方案中,接受治疗的受试者被诊断患有癌症(例如,转移性或转移前的)。在一些实施方案中,受试者先前已经用针对癌症的一线疗法治疗。在一些实施方案中,受试者先前已经用二线和/或其他疗法治疗。在一些实施方案中,受试者使用放射疗法治疗或已经使用放射疗法治疗。在一些实施方案中,受试者使用手术治疗,例如,切除或摧毁肿瘤。在其他实施方案中,受试者的肿瘤已经复发。在一些实施方案中,顺序或同时使用两种或更多种有丝分裂抑制剂治疗受试者,或已经顺序或同时使用两种或更多种有丝分裂抑制剂治疗受试者。

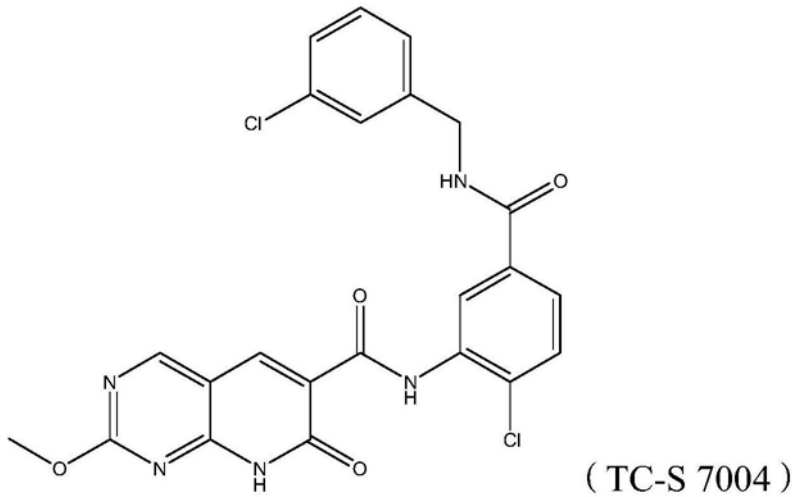
[0094] 在一些实施方案中,组合治疗可以导致改善的结果,如存活延长、严重性降低、复发延迟或消除或主要治疗(即有丝分裂抑制剂)的副作用减少。在一些实施方案中,与单独使用药剂的治疗相比,当作为组合的部分给予时,第二药剂以更低的剂量和/或更短的持续时间给予。例如,在一些实施方案中,如例如在基于细胞的分析中确定的,当与使用第一药剂的相同治疗相比时,在组合治疗中有丝分裂抑制剂的 EC_{50} 值低至少20%、25%、30%、40%、50%、100%、3倍、5倍、10倍。在一些实施方案中,如例如在FACS分析中通过亚 G_0 期细胞的分数确定的,与单独的任一种药剂相比,组合治疗使处理的细胞群中凋亡细胞的分数增加至少2倍、3倍、4倍、5倍。

[0095] 在一个实施方案中,针对静止癌细胞有效的治疗剂是DYRK1抑制剂。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂是抑制DYRK1激酶,DYRK1A或DYRK1B的活性(体外或体内)的化合物,例如,在生化分析中 IC_{50} 值为<100nM、<90nM、<80nM、<70nM、<60nM、<50nM、<40nM、<30nM、<20nM、<10nM、<5nM或更低。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂使在不存在这样的抑制剂的情况下另外会发现的细胞群或肿瘤中的静止癌细胞(体外或体内)的分数降低例如至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%或更多。

[0096] 在一些实施方案中,DYRK1抑制剂抑制DYRK1A和DYRK1B二者。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂对DYRK1A具有选择性,其中DYRK1B IC_{50} 与DYRK1A IC_{50} 的比值为1000、100、50、25、10或5比1。在一些实施方案中,DYRK1抑制剂对DYRK1B具有选择性,其中DYRK1A IC_{50} 与DYRK1B IC_{50} 的比值为1000、100、50、25、10比1。在一些实施方案中,如通过 IC_{50} 值的比值所确定的,DYRK1抑制剂对DYRK1的选择性与DYRK2和/或DYRK3和/或DYRK4相比为至少4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍。在一些实施方案中,如通过 IC_{50} 值的比值所确定的,DYRK1抑制剂对DYRK1的选择性与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)例如CDK2相比为至少4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍。

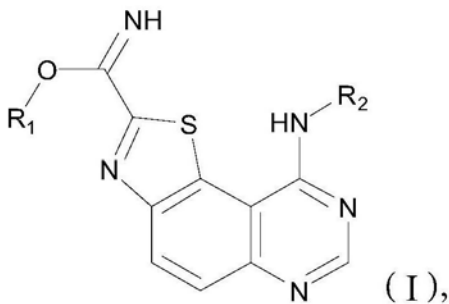
[0097] 已知的DYRK1抑制剂的实例包括AZ191、DYRKi、去氢骆驼蓬碱(harmine)、ID-8、leucettine L41、NCGC00185981、INDY、ProINDY、TC-S 7004和TG003。据报道,至少一种已知的DYRK1抑制剂TC-S 7004(US20120184562)在体外针对静止癌细胞有效(Ewton DZ,Hu J,Vilenchik M,Deng X,Luk KC,Polonskaia A,Hoffman AF,Zipf K,Boylan JF和Friedman EA.(2011) Inactivation of MIRK/DYRK1B kinase targets quiescent pancreatic cancer cells.Molecular Cancer Therapeutics 10:2104-2114)。

[0098]



[0099] 在一个实施方案中, DYRK1抑制剂是式I的化合物:

[0100]

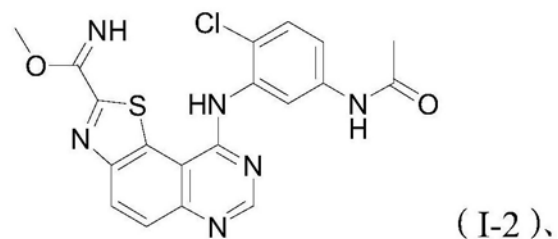
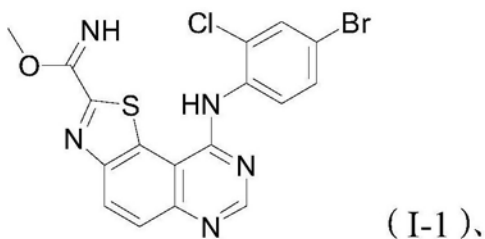


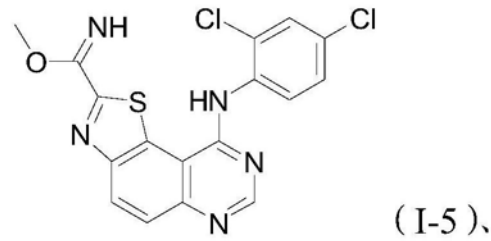
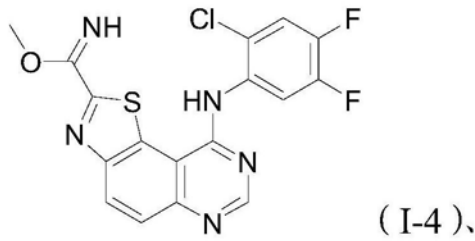
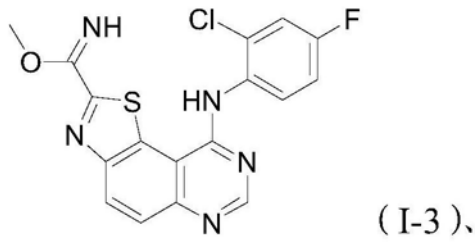
[0101] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中,

[0102] R₁为取代或未取代的C₁₋₈烷基、取代或未取代的苯基、或取代或未取代的苄基;[0103] R₂为苯基, 任选地被至多四个独立地选自卤素、CN、NO₂、NHC(O)C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷基、OH、OC₁₋₄烷基的基团取代, 其中两个相邻基团及介于其间的碳原子可以形成包含一个或多个选自N、O或S的杂原子的5-至6-元环。

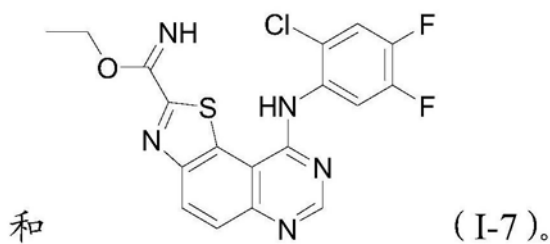
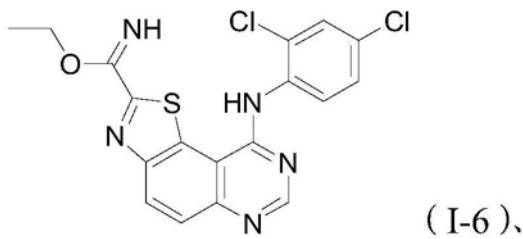
[0104] 在一个实施方案中, 式I的化合物选自:

[0105]





[0106]



[0107] 在另一个实施方案中,本发明的方法还提供了(c)向受试者给予另一种癌症治疗,例如,放射治疗或其他癌症治疗。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的方法包括:向有其需要的受试者给予治疗有效量的(a)式I的治疗剂;(b)有丝分裂抑制剂;和(c)放射治疗;每种治疗顺序或同时给予。例如,在一些实施方案中,首先用放射疗法治疗受试者,然后单独或与有丝分裂抑制剂组合向受试者给予式I的治疗剂。在一些实施方案中,向受试者共同给予(a)针对静止癌细胞有效的治疗剂,(b)有丝分裂抑制剂,和任选的(c)放射治疗。

[0109] 在一些实施方案中,有丝分裂抑制剂是有效治疗或防止肿瘤的有丝分裂抑制剂,包括但不限于批准用于治疗癌症的所有这样的化合物,在临床试验中用于治疗癌症的化合物,在治疗哺乳动物受试者(例如,小鼠、大鼠、猴、人类)的癌症中另外显示功效的化合物,和在体外针对肿瘤细胞显示功效的化合物。许多这样的化合物是已知的。

[0110] 在一个实施方案中,有丝分裂抑制剂为紫杉烷。用于本发明的方法的紫杉烷包括BMS-188796、BMS-188797、卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛(XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇(DHA-紫杉醇)和特西他赛(DJ-927)。

[0111] 在另一个实施方案中,有丝分裂抑制剂为长春花生物碱。用于本发明的方法的长春花生物碱包括长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨。在另一个实施方案

中,有丝分裂的长春花生物碱抑制剂是vintafolide。

[0112] 在另一个实施方案中,有丝分裂抑制剂是PLK1抑制剂。用于本发明的方法的PLK1抑制剂包括BI-2536、GSK461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。在另一个实施方案中,有丝分裂抑制剂为BI-2536或GSK461364。

[0113] 在另一个实施方案中,肿瘤为胆管癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、头颈癌、肾癌、白血病、肝癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌(例如黑色素瘤)、睾丸癌、甲状腺癌、或子宫癌。在另一个实施方案中,肿瘤选自膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢癌和前列腺癌。在另外的实施方案中,癌症是原发性或转移性的。在又一个实施方案中,癌症是由实施例中所示的细胞系类型代表的类型。

[0114] 实施方案并不意味着对另外的组合组分,尤其是作为现有治疗组合的部分的化合物,例如TPF或PCV的限制,其中T代表泰素帝[®],即多西他赛,其中V代表硫酸长春新碱。本文描述的实施方案是说明性的,并不意味着对给予途径和顺序、患者类型(先前未治疗或先前治疗的、存在或不合并病症、年龄、性别等)、或患者的疾病阶段、有丝分裂抑制剂的类型等的限制。

[0115] 有丝分裂抑制剂是本领域已知的(Dominguez-Brauer C等人(2015) Targeting mitosis in cancer:emerging strategies, Molecular Cell 60,524-536)。如本文所使用的,术语“有丝分裂抑制剂”和“有丝分裂的抑制剂”是等同的并且可以互换使用。有丝分裂抑制剂在M期期间或在进入(G₂/M检查点)或离开(有丝分裂后检查点)M期的检查点处中断细胞周期。在M期,染色体和细胞质分到两个子细胞中(胞质分裂)。有丝分裂分五个阶段进行:前期、前中期、中期、后期和末期,并且有丝分裂抑制剂可以中断这些阶段中的任一个。有丝分裂抑制剂的实例包括紫杉烷、长春花生物碱和PLK1抑制剂。

[0116] 例如,紫杉烷包括BMS-188796、BMS-188797、卡巴他赛、DEP卡巴他赛、多西他赛、拉洛他赛(XRP9881、RPR109881)、紫杉醇、二十二碳六烯酸紫杉醇(DHA-紫杉醇)和特西他赛(DJ-927);长春花生物碱包括长春新碱、长春花碱、长春地辛、长春氟宁和长春瑞滨;PLK1抑制剂包括BI-2536、GSK461364、GW843682X、HMN-214和HMN-176、MLN-0905、NMS-P937、瑞格塞替、Ro3280、SBE 13和伏拉塞替。

[0117] G₀状态由特定的基因表达程序维持。DYRK1激酶,如DYRK1A和DYRK1B可能对将癌细胞维持在G₀状态(静止状态)很重要。

[0118] DYRK1B/Mirk是Minibrain/DYRK激酶家族的成员,其在某些正常组织中介导存活和分化。(Kentrup H,Becker W,Heukelbach J,Wilmes A,Schurmann A,Huppertz C,Kainulainen H和Joost HG(1996) Dyrk,a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII, Journal of Biological Chemistry 271,3488-3495;Becker W,Weber Y,Wetzel K,Eirmbter K,Tejedor FJ和Joost HG(1998) Sequence characteristics,subcellular localization,and substrate specificity of DYRK-related kinases,a novel family of dual specificity protein kinases, Journal of Biological Chemistry 273,25893-25902)。DYRK1B在骨骼肌细胞和睾丸中以可检测的水

平表达。即使在发育中的肌肉中,DYRK1B的敲除也未在小鼠中导致明显的异常的表型,表明DYRK1B不是正常发育的必需基因。支持这种解释的是,正常的纤维母细胞在DYRK1B激酶水平消耗20倍后没有表现出存活的变化。因此,DYRK1B似乎不是正常细胞存活的必需基因,但有证据表明它在某些恶性癌细胞中上调,其中DYRK1B被认为通过保持癌细胞处于静止状态来介导存活。这些不寻常的特征表明,DYRK1B可能是治疗性干预,特别是直接针对静止癌细胞的抗癌治疗的有吸引力的靶标。

[0119] 公开的组合和方法可以提供关于每种单一组分或现有的单一和组合治疗的使用的如在术语表中定义的一种或多种改善。此外,所公开的组合和方法可允许减少治疗剂和放射的给予剂量和/或频率,以相对于使用单一组分或现有的单一和组合治疗的可能性,实现由治疗引起的相同改善。

[0120] 所公开的组合不需要是协同的以相对于使用有丝分裂抑制剂的单一治疗产生治疗有效性的显著改善。如上所述,静止癌细胞本身对包括有丝分裂抑制剂在内的抗癌治疗剂不太敏感,甚至在治疗后存活的一小部分静止细胞可以导致复发。因此,根除肿瘤中的抗性静止细胞群可能或可能不产生EC₅₀值的协同降低,但可以使癌症复发和转移性肿瘤的出现显著改善。

[0121] 所公开的组合的给予方案和给予途径可以根据所治疗的肿瘤、肿瘤的进展程度、选择的具体组合、受试者的年龄、性别和身体状况和其他因素而充分变化。给予方案可以包括每个时间段多个剂量,同时或顺序给予治疗等。此外,所述组合可以向未治疗(未经治疗)的受试者,或先前经历治疗、或经过手术切除或摧毁实体瘤的受试者,或癌症复发的受试者给予。例如,针对静止癌细胞有效的治疗剂可以在有丝分裂抑制剂之前给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂可以在有丝分裂抑制剂之前6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、一周给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂可以与有丝分裂抑制剂在相同的时间(同时)给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂可以在有丝分裂抑制剂之后6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时给予。针对静止癌细胞有效的治疗剂和/或有丝分裂抑制剂可以在放射或其他治疗之前、之后或与其同时给予。

[0122] 针对静止癌细胞有效的治疗剂可以每天、每两天、每三天、每四天、每周一次、每两周一次、每月一次通过口服、静脉内(IV)、腹膜内(IP)、皮下(SC)、肿瘤内(IT)、鞘内或其他给予途径给予。

[0123] 所述组合可以给予未治疗(未经治疗)的受试者,或经历采用一线、二线、三线或其他治疗、放射治疗的先前治疗或经过手术切除或摧毁实体瘤的受试者,或其癌症复发的受试者,或其癌症是非转移性或转移性的受试者。

实施例

[0124] 以下实施例并不要作为限制性的。根据本发明的内容,本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对特定材料进行许多改变并且这些改变被公开并且仍然获得相同或相似的结果。

[0125] 实施例1. 细胞群内静止癌细胞的分数的确定

[0126] 从ATCC获得以下细胞系并根据ATCC的建议培养:DMS273-小细胞肺癌细胞系;H1975-在EGFR TK中携带L858R和T790M突变的非小细胞肺癌细胞系;A549-具有野生型EGFR

的非小细胞肺癌细胞系;LNCap-前列腺癌细胞系;SW620-结肠癌细胞系;MiaPaCa2-胰腺癌细胞系;PANC1-胰腺癌细胞系;OVCAR3-卵巢癌细胞系;SK-OV-3-卵巢癌细胞系。

[0127] 将细胞培养物以 3×10^5 - 6×10^5 个细胞/孔接种到6孔板中;细胞的铺板数取决于细胞大小和增殖速率,目标是约50%融合。接种后,使细胞贴壁24小时,同时在37°C下在湿润的5%CO₂气氛中孵育,然后用化合物处理期望的时长(通常24小时),在相同条件下孵育。然后通过胰蛋白酶消化收获细胞,与漂浮细胞合并,在PBS中洗涤,并在70%的冰冷乙醇中固定过夜。为了吖啶橙(AO)染色,将固定的细胞用冰冷的PBS洗涤一次,重悬于100μL PBS中,然后加入200μL透化溶液和600μL AO染色溶液。使用Guava easyCyte HT流式细胞仪(EMD Millipore)进行测量,使用蓝色激光在488nm处激发,监测526nm处的AO-DNA复合物和650nm处的AO-RNA复合物的发射。缓冲液的完整方案和组成描述于文献中(Darzynkiewicz Z, Juan G和Srouf EF(2004) Differential Staining of DNA and RNA(2004). Current Protocols in Cytometry, Chapter 7:Unit 7.3)。

[0128] 实施例2. 细胞活力分析的一般程序

[0129] 为了进行活力分析,将细胞以 2×10^3 - 6×10^3 个细胞/孔接种到96孔板中;铺板的细胞数取决于细胞大小和增殖速率,目标是约50%融合。接种后,使细胞贴壁24小时,在37°C下在潮湿的5%CO₂气氛中孵育。

[0130] 使用至少6种不同浓度的化合物在DMSO中以1:3连续稀释进行处理,以使细胞培养基中的DMSO浓度<1%。将细胞培养物在5%CO₂培养箱中在37°C下再孵育96小时。处理一式三份进行。使用Spectra MAX Gemini分光光度计(Molecular Devices),根据制造商的说明,通过CellTiter-Glo™发光细胞活力分析(Promega,目录号G7571)分析结果。

[0131] 实施例3. 针对静止癌细胞有效的分子与紫杉醇的组合

[0132] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SW620细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为100nM,化合物I-5的浓度相应地为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的紫杉醇的EC₅₀值为8.1nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为2.3nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时为0.2nM。参见图3。

[0133] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的紫杉醇的EC₅₀值为2.7nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为1.9nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为0.9nM。参见图4。

[0134] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析LNCap细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为10nM,化合物I-5的浓度为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的紫杉醇的EC₅₀值为3.2nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为2.1nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时为0.9nM。参见图5。

[0135] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析HCC827细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为3μM和6μM。当化合物I-7不存在时,观察到的紫杉醇的EC₅₀值为4.2nM,当化合物I-7以3μM的浓度存在时为2.5nM,当化合物I-7以6μM的浓度存在时为0.6nM。参见图6。

[0136] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析A549细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为3μM和6μM。当化合物I-7不存在时,观察到的紫杉醇

的EC₅₀值为4.8nM,当化合物I-7以3μM的浓度存在时为2.5nM,当化合物I-7以6μM的浓度存在时为0.7nM。参见图7。

[0137] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SK-OV-3细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为2μM、4μM、8μM和10μM。当化合物I-7不存在时,观察到的紫杉醇的EC₅₀值为9.7nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为9.4nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为4.8nM,当化合物I-7以8μM的浓度存在时为4.7nM,当化合物I-7以10μM的浓度存在时为5.2nM。参见图8。

[0138] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析OVCAR3细胞。在该分析中使用的紫杉醇的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的紫杉醇的EC₅₀值为3.3nM,当化合物I-7以3μM的浓度存在时为2.8nM,当化合物I-7以6μM的浓度存在时为1.7nM。参见图9。

[0139] 实施例4. 针对静止癌细胞有效的分子与多西他赛的组合

[0140] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SW620细胞。在该分析中使用的多西他赛的最高浓度为100nM,化合物I-5的浓度为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的多西他赛的EC₅₀值为2.85nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为0.69nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时<0.015nM。参见图10。

[0141] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。在该分析中使用的多西他赛的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的多西他赛的EC₅₀值为0.64nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为0.38nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为0.14nM。参见图11。

[0142] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析HCC827细胞。在该分析中使用的多西他赛的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为3μM和6μM。当化合物I-7不存在时,观察到的多西他赛的EC₅₀值为1.8nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为0.6nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为0.03nM。参见图12。

[0143] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析A549细胞。在该分析中使用的多西他赛的最高浓度为5nM,化合物I-7的浓度为3μM和6μM。当化合物I-7不存在时,观察到的多西他赛的EC₅₀值为1.4nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为0.6nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为0.1nM。参见图13。

[0144] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SK-OV-3细胞。在该分析中使用的多西他赛的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为4μM和8μM。当化合物I-7不存在时,观察到的多西他赛的EC₅₀值为2.5nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为1.5nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为0.3nM。参见图14。

[0145] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析OVCAR3细胞。在该分析中使用的多西他赛的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的多西他赛的EC₅₀值为0.85nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为0.52nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时<0.04nM。参见图15。

[0146] 实施例5. 针对静止癌细胞有效的分子与长春新碱的组合

[0147] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。在该分析中使用的长春新碱的最高浓度为10nM,化合物I-5的浓度为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的长

春新碱的EC₅₀值为1.1nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为0.4nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时为<0.04nM。参见图16。

[0148] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析H1975细胞。在该分析中使用的长春新碱的最高浓度为10nM,化合物I-5的浓度为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的长春新碱的EC₅₀值为1.5nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为0.85nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时为0.35nM。参见图17。

[0149] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SK-OV-3细胞。在该分析中使用的长春新碱的最高浓度为20nM,化合物I-7的浓度为4μM和8μM。当化合物I-7不存在时,观察到的长春新碱的EC₅₀值为8.7nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为2.1nM,当化合物I-7以8μM的浓度存在时为1.0nM。参见图18。

[0150] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析OVCAR3细胞。在该分析中使用的长春新碱的最高浓度为1nM,化合物I-7的浓度为1μM和3μM。当化合物I-7不存在时,观察到的长春新碱的EC₅₀值为1.2nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为0.8nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为0.1nM。参见图19。

[0151] 实施例6. 针对静止癌细胞有效的分子与长春瑞滨的组合

[0152] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。在该分析中使用的长春瑞滨的最高浓度为10nM,化合物I-5的浓度为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的长春瑞滨的EC₅₀值为1.1nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为0.4nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时为<0.04nM。参见图20。

[0153] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析H1975细胞。在该分析中使用的长春瑞滨的最高浓度为10nM,化合物I-5的浓度为2μM和4μM。当化合物I-5不存在时,观察到的长春瑞滨的EC₅₀值为9.5nM,当化合物I-5以2μM的浓度存在时为5.2nM,当化合物I-5以4μM的浓度存在时为2.1nM。参见图21。

[0154] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析OVCAR3细胞。在该分析中使用的长春瑞滨的最高浓度为10nM,化合物I-7的浓度为1μM和3μM。当化合物I-7不存在时,观察到的长春瑞滨的EC₅₀值为2.4nM,当化合物I-7以1μM的浓度存在时为2.4nM,当化合物I-7以3μM的浓度存在时为0.1nM。参见图22。

[0155] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SK-OV-3细胞。在该分析中使用的长春瑞滨的最高浓度为40nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的长春瑞滨的EC₅₀值为15.1nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为10.1nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为4.7nM。参见图23。

[0156] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析A549细胞。在该分析中使用的长春瑞滨的最高浓度为50nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的长春瑞滨的EC₅₀值为27nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为16nM,当化合物I-7以4μM的浓度存在时为6nM。参见图24。

[0157] 实施例7. 针对静止癌细胞有效的分子与BI2536的组合

[0158] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析H1975细胞。在该分析中使用的BI2536的最高浓度为50nM,化合物I-7的浓度为2μM和4μM。当化合物I-7不存在时,观察到的BI2536的EC₅₀值为46.3nM,当化合物I-7以2μM的浓度存在时为17.3nM,当化合物I-7以4μM的浓度存

在时为 $<0.04\text{nM}$ 。参见图25。

[0159] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析PANC1细胞。在该分析中使用的BI2536的最高浓度为 50nM ，化合物I-7的浓度为 $2\mu\text{M}$ 和 $4\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的BI2536的 EC_{50} 值为 7.3nM ，当化合物I-7以 $2\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 4.4nM ，当化合物I-7以 $4\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 2.5nM 。参见图26。

[0160] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。在该分析中使用的BI2536的最高浓度为 50nM ，化合物I-7的浓度为 $2\mu\text{M}$ 和 $4\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的BI2536的 EC_{50} 值为 6.2nM ，当化合物I-7以 $2\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 4.1nM ，当化合物I-7以 $4\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 1.7nM 。参见图27。

[0161] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析A549细胞。在该分析中使用的BI2536的最高浓度为 50nM ，化合物I-7的浓度为 $3\mu\text{M}$ 和 $6\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的BI2536的 EC_{50} 值为 6.2nM ，当化合物I-7以 $3\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 4.1nM ，当化合物I-7以 $6\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 1.7nM 。参见图28。

[0162] 实施例8. 针对静止癌细胞有效的分子与GSK461364的组合

[0163] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析H1975细胞。在该分析中使用的GSK461364的最高浓度为 $10\mu\text{M}$ ，化合物I-7的浓度为 $2\mu\text{M}$ 和 $4\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的GSK461364的 EC_{50} 值为 $1.9\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $2\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.97\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $4\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.58\mu\text{M}$ 。参见图29。

[0164] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析PANC1细胞。在该分析中使用的GSK461364的最高浓度为 $10\mu\text{M}$ ，化合物I-7的浓度为 $2\mu\text{M}$ 和 $4\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的GSK461364的 EC_{50} 值为 $0.5\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $2\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.3\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $4\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.2\mu\text{M}$ 。参见图30。

[0165] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。在该分析中使用的GSK461364的最高浓度为 $10\mu\text{M}$ ，化合物I-7的浓度为 $2\mu\text{M}$ 和 $4\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的GSK461364的 EC_{50} 值为 $0.43\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $2\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.24\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $4\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.12\mu\text{M}$ 。参见图31。

[0166] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析A549细胞。在该分析中使用的GSK461364的最高浓度为 $1\mu\text{M}$ ，化合物I-7的浓度为 $3\mu\text{M}$ 和 $6\mu\text{M}$ 。当化合物I-7不存在时，观察到的GSK461364的 EC_{50} 值为 $1.2\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $3\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.5\mu\text{M}$ ，当化合物I-7以 $6\mu\text{M}$ 的浓度存在时为 $0.2\mu\text{M}$ 。参见图32。

[0167] 实施例9. 紫杉醇和针对静止癌细胞有效的分子与紫杉醇的组的细胞周期影响和细胞毒性

[0168] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。当存在不同浓度的紫杉醇、化合物I-7或紫杉醇和化合物I-7二者时的结果示于图33中。

[0169] 在该实验中，证明了DMS273细胞暴露于紫杉醇没有导致药理学静止，因为处于细胞周期的 G_0 期的细胞分数在存在或不存在紫杉醇的情况下是相似的。还证明了化合物I-7与紫杉醇的组合强烈影响了DMS273细胞的细胞周期分布，并导致处于 G_0 的细胞分数的显著降低。此外，如通过作为亚 G_0 细胞群观察到的凋亡细胞的分数的显著增加所证明的，组合的细胞毒性显著高于单独的紫杉醇的细胞毒性。

[0170] 显示在常规生长培养基 (FBS+) 中孵育的正常增殖的DMS273细胞和在无血清培养基 (FBS-) 中预孵育的DMS273细胞的细胞周期分布用于比较。

[0171] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析SW620细胞。当存在不同浓度的紫杉醇、化合物I-7或紫杉醇和化合物I-7二者时的结果示于图34中。

[0172] 在该实验中,证明了SW620细胞暴露于紫杉醇没有导致药理学静止,因为在生长培养基 (FBS+) 中孵育的细胞中,处于细胞周期的G₀期的细胞分数在存在或不存在紫杉醇的情况下是相似的。还证明了化合物I-7与紫杉醇的组合强烈影响了SW620细胞的细胞周期分布,并导致处于G₀的细胞分数的显著降低。此外,如通过作为亚G₀细胞群观察到的凋亡细胞的分数的显著增加所证明的,组合的细胞毒性显著高于单独的紫杉醇的细胞毒性。

[0173] 显示在常规生长培养基 (FBS+) 中孵育的正常增殖的SW620细胞和在无血清培养基 (FBS-) 中预孵育的SW620细胞的细胞周期分布用于比较。

[0174] 实施例10. 长春新碱和针对静止癌细胞有效的分子与长春新碱的组的细胞周期影响和细胞毒性

[0175] 如实施例1和2中所描述的培养、处理和分析DMS273细胞。当存在不同浓度的长春新碱、化合物I-7或长春新碱和化合物I-7二者时的结果示于图35中。

[0176] 在该实验中,证明了DMS273细胞暴露于长春新碱没有导致药理学静止,因为在生长培养基 (FBS+) 中孵育的细胞中,处于细胞周期的G₀期的细胞分数在存在或不存在长春新碱的情况下是相似的。还证明了化合物I-7与长春新碱的组合强烈影响了DMS273细胞的细胞周期分布,并导致处于G₀的细胞分数的显著降低。此外,如通过作为亚G₀细胞群观察到的凋亡细胞的分数的显著增加所证明的,组合的细胞毒性显著高于单独的长春新碱的细胞毒性。

[0177] 显示在常规生长培养基 (FBS+) 中孵育的正常增殖的DMS273细胞和在无血清培养基 (FBS-) 中预孵育的DMS273细胞的细胞周期分布用于比较。

[0178] 实施例11. 长春瑞滨和针对静止癌细胞有效的分子与长春瑞滨的组的细胞周期影响和细胞毒性

[0179] 如实施例1和2中所述培养、处理和分析DMS273细胞。当存在不同浓度的长春瑞滨、化合物I-7或长春瑞滨和化合物I-7二者时的结果示于图36中。

[0180] 在该实验中,证明了DMS273细胞暴露于长春瑞滨没有导致药理学静止。还证明了化合物I-7与长春瑞滨的组合影响了DMS273细胞的细胞周期分布,并导致处于G₀的细胞分数的显著降低。此外,如通过作为亚G₀细胞群观察到的凋亡细胞的分数的显著增加所证明的,组合的细胞毒性显著高于单独的长春瑞滨的细胞毒性。

[0181] 显示在常规生长培养基 (FBS+) 中孵育的正常增殖的DMS273细胞和在无血清培养基 (FBS-) 中预孵育的DMS273细胞的细胞周期分布用于比较。

[0182] 实施例12. AZ191的细胞周期影响和与化合物I-7的比较

[0183] 如实施例1中所描述的培养和处理SW620细胞。对于碘化丙锭 (PI) 染色,遵循与用于流式细胞术的Guava细胞周期试剂 (EMD Millipore) 一起提供的制造商的方案。使用Guava PCA-96流式细胞仪 (EMD Millipore) 进行测量,使用绿色激光在535nm处激发并监测617nm处的发射。

[0184] 不同浓度的AZ191存在时的结果显示在图37中。数据是两次重复的平均值。

[0185] 如实施例1中所描述的培养、处理和分析SW620细胞。对于碘化丙锭(PI)染色,遵循与用于流式细胞术的Guava细胞周期试剂(EMD Millipore)一起提供的制造商的方案。使用Guava PCA-96流式细胞仪(EMD Millipore)进行测量,使用绿色激光在535nm处激发并监测617nm处的发射。

[0186] 不同浓度的化合物I-7存在时的结果显示在图38中。数据是两次重复的平均值。

[0187] 在这些实验中,SW620细胞在FBS培养基中培养24小时,所述培养基含有不同浓度的AZ191或化合物I-7。在这些条件下,基于没有观察到的细胞G₀+G₁期分数的变化,暴露于AZ191没有导致处于静止状态(G₀)的细胞分数降低。在相同条件下,基于细胞G₀+G₁期分数的显著降低,暴露于相同或更低浓度的化合物I-7导致处于静止状态(G₀)的细胞分数显著降低。

[0188] AZ191在17nM下抑制DYRK1B(Ashford AL,Oxley D,Kettle J,Hudson K,Guichard S,Cook SJ,Lochhead PA(2014)A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3beta to phosphorylate cyclin D1at Thr(286), not Thr(288).Biochemical Journal 457,43-56)。

[0189] 在该实验中,证明并非所有DYRK1抑制剂都针对静止癌细胞有效。

[0190] 虽然已经参考本发明的示例性实施方案具体显示和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,在不脱离由所附权利要求包含的本发明范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

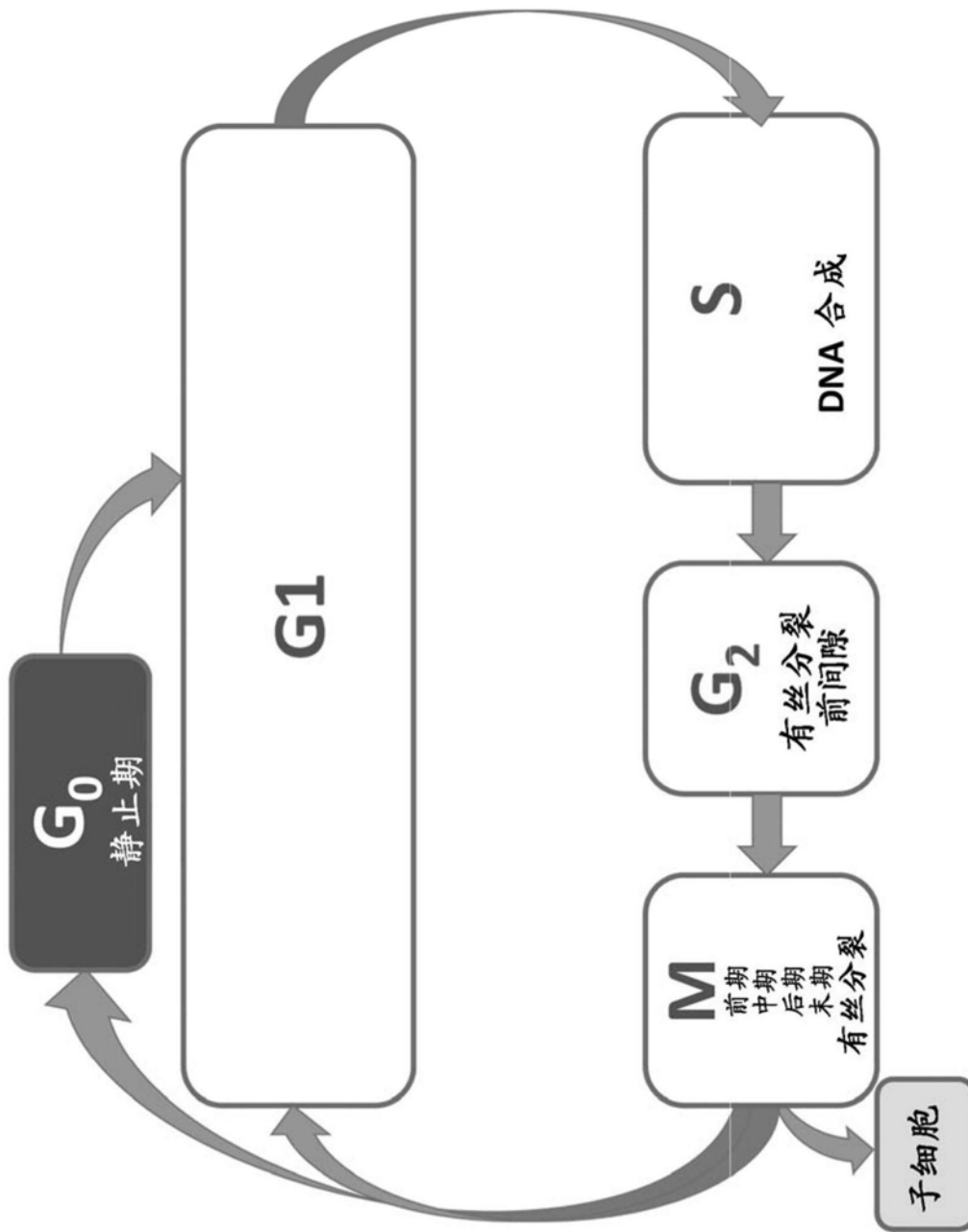


图1

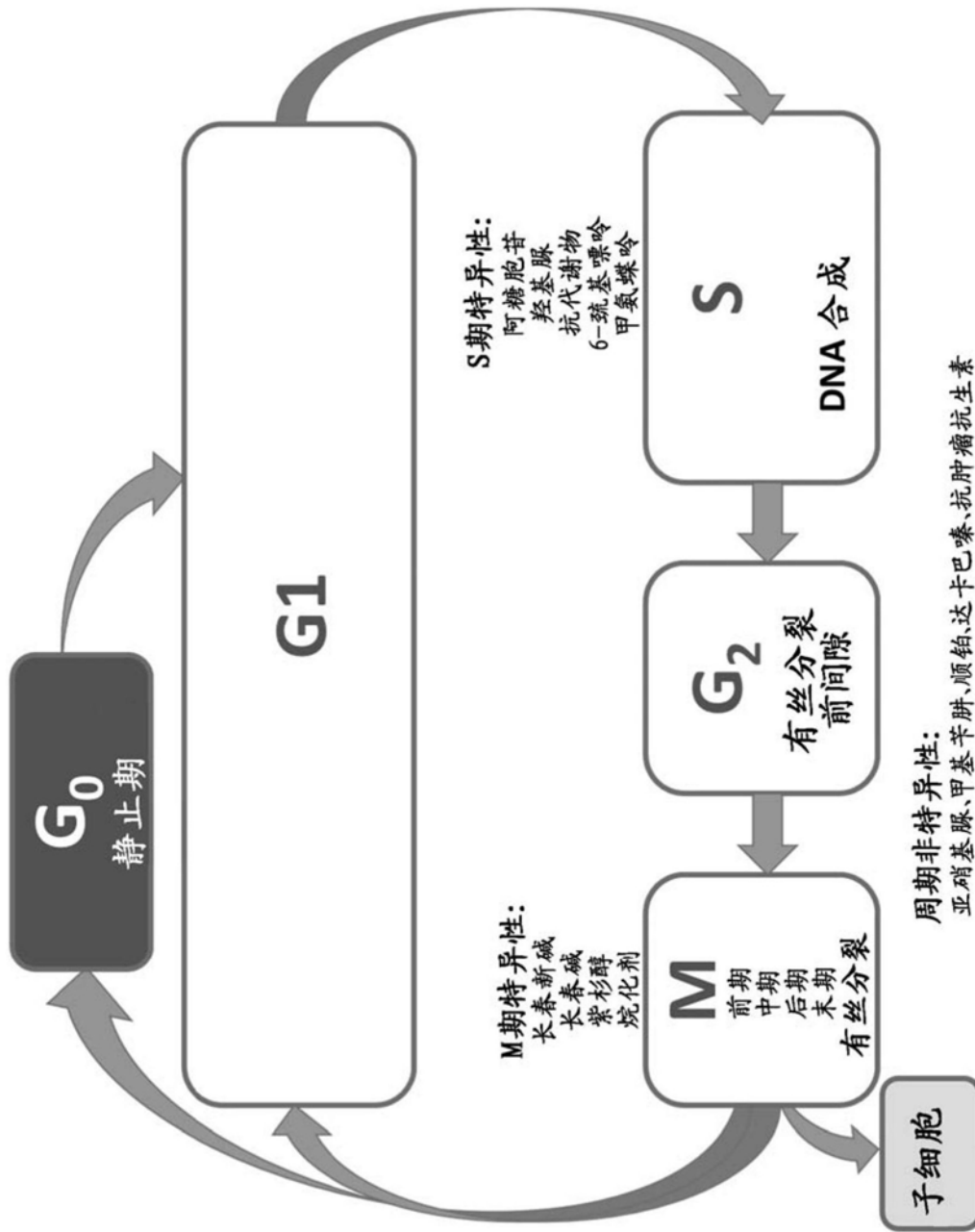
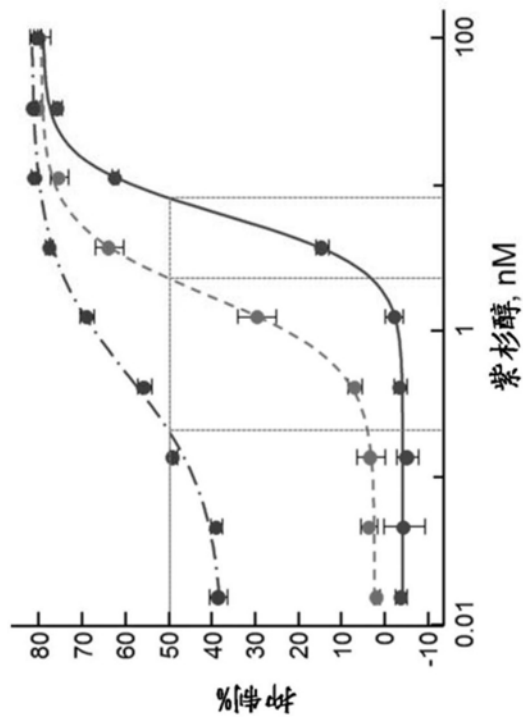
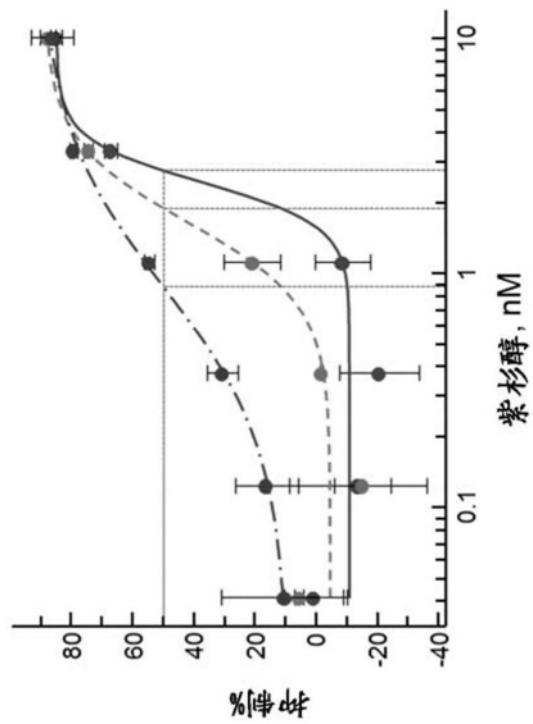


图2



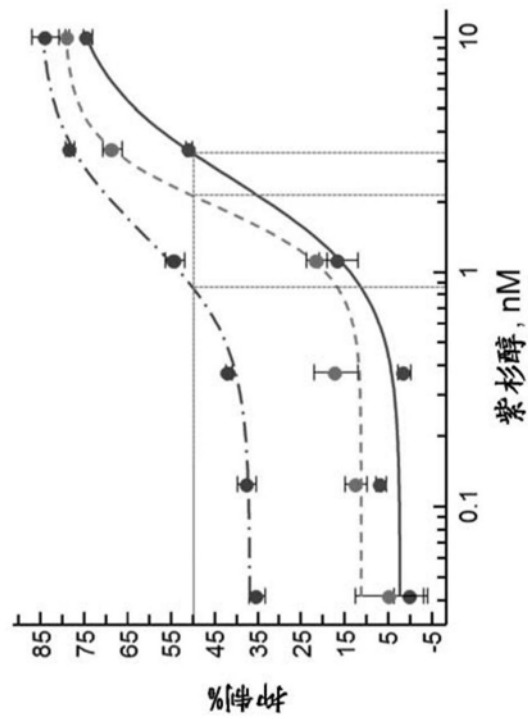
[1-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	8.1 nM
2 μM	- - - -	2.3 nM
4 μM	- · - · -	0.2 nM

图3



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	2.7 nM
2 μM	- - -	1.9 nM
4 μM	- · - · -	0.9 nM

图4



[1-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	3.2 nM
2 μM	- - -	2.1 nM
4 μM	- · - · -	0.86 nM

图5

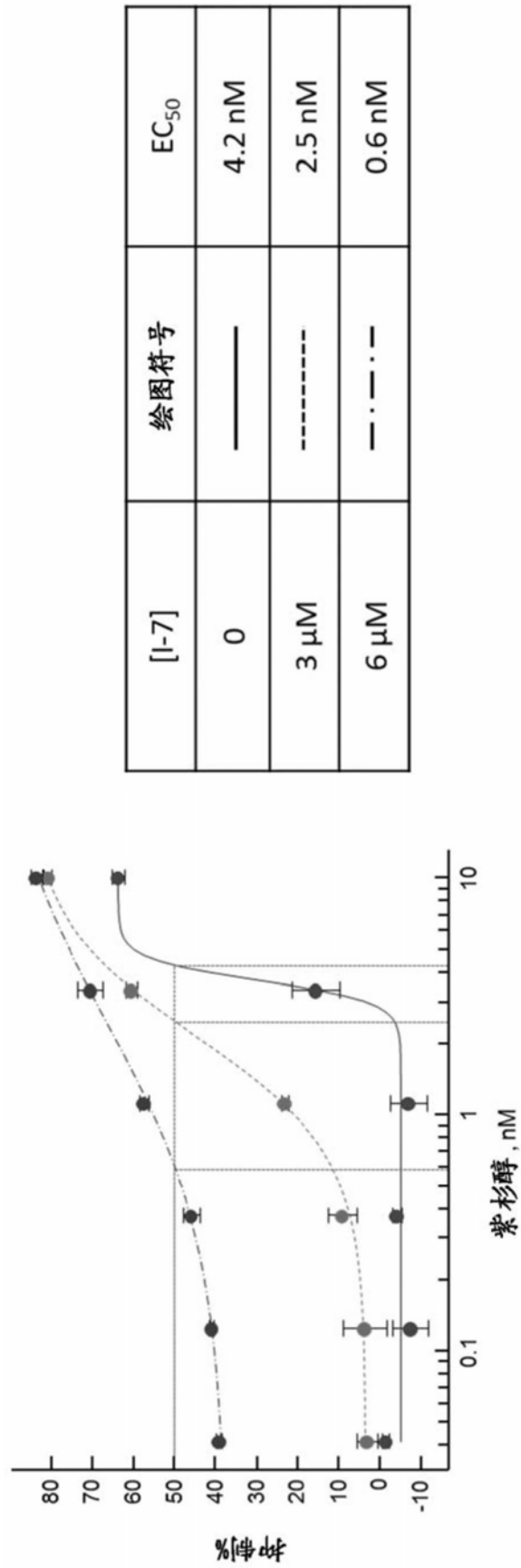


图6

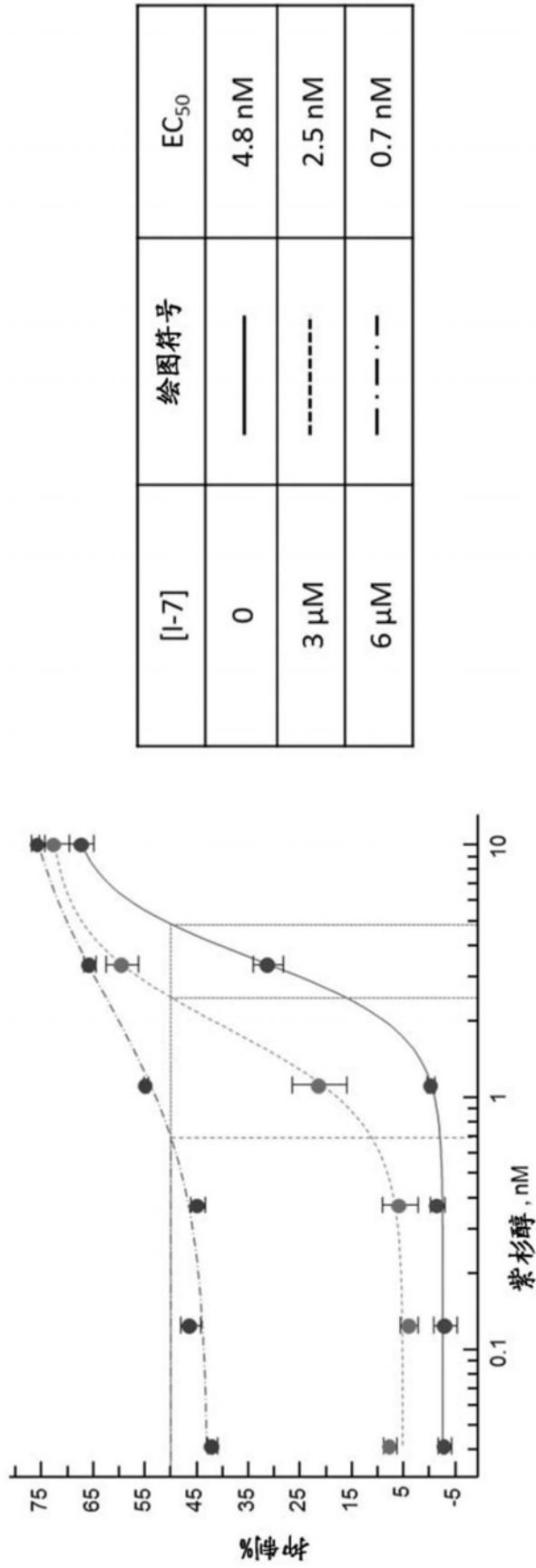
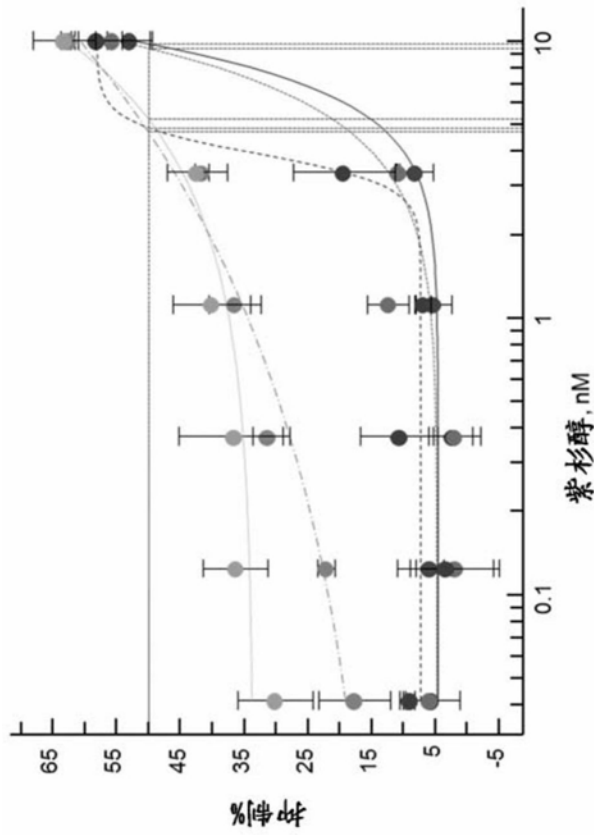
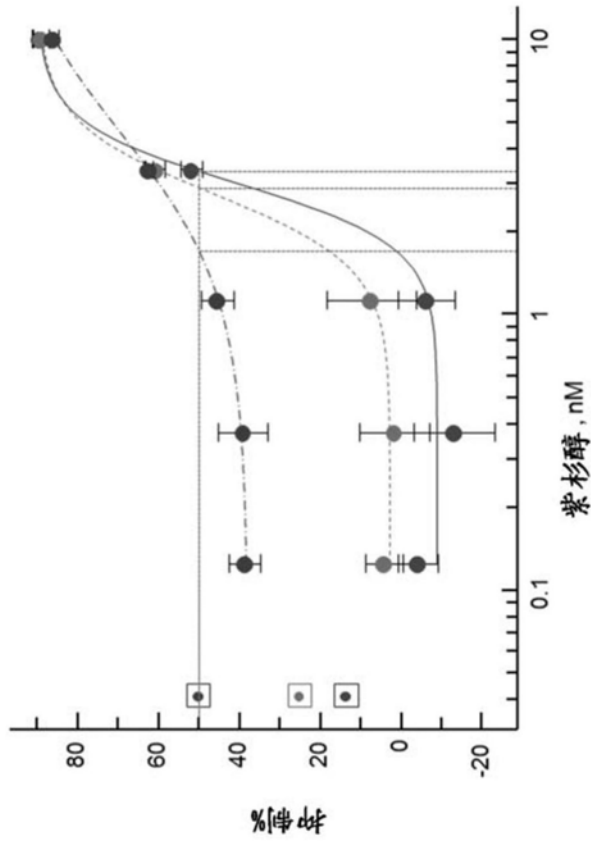


图7



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	9.7 nM
2 μM	- - - - -	9.4 nM
4 μM	- - - - -	4.8 nM
8 μM	- · - · - ·	4.7 nM
10 μM	·····	5.2 nM

图8



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	3.3 nM
2 μM	- - -	2.8 nM
4 μM	- · - · -	1.7 nM

图9

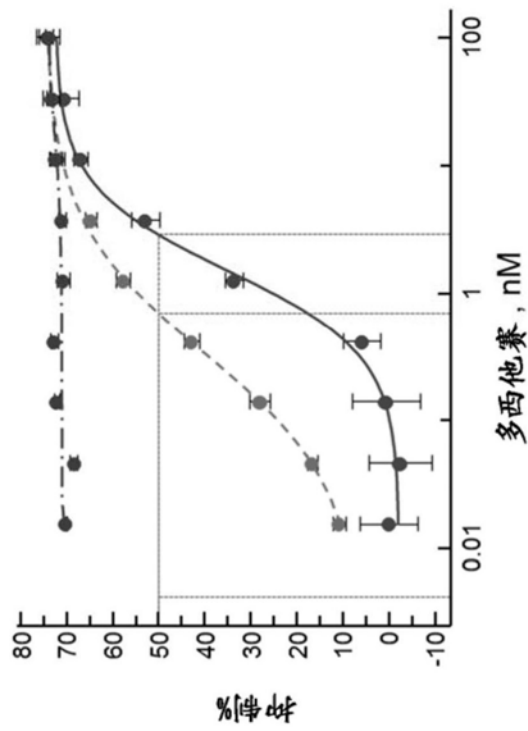
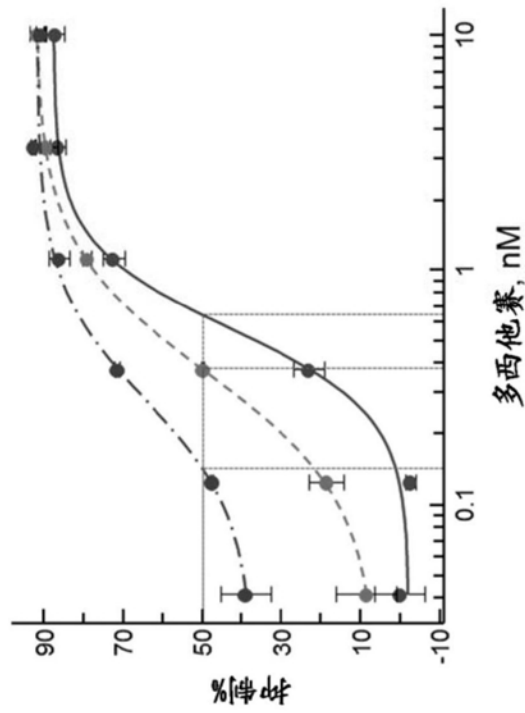


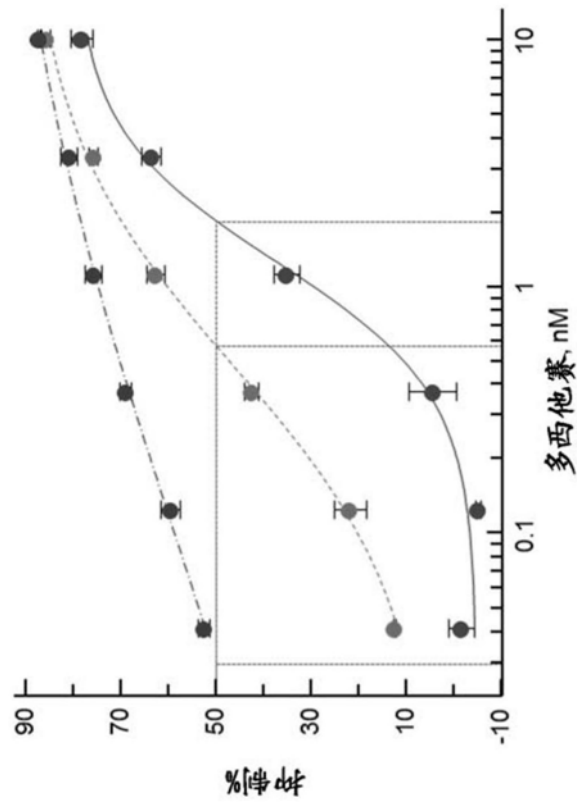
图10

[I-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	2.85 nM
2 μM	---	0.69 nM
4 μM	- · - · -	<0.015 nM



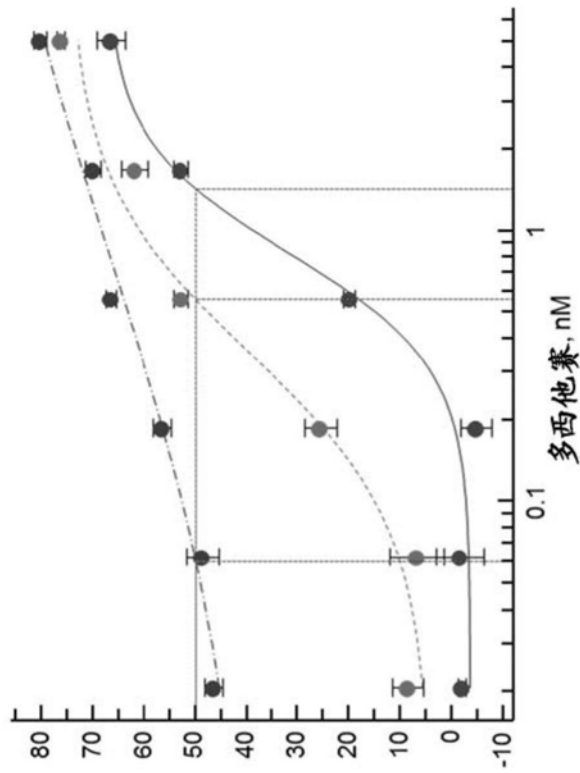
[I-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	0.64 nM
2 μM	- - -	0.38 nM
4 μM	- · - · -	0.14 nM

图11



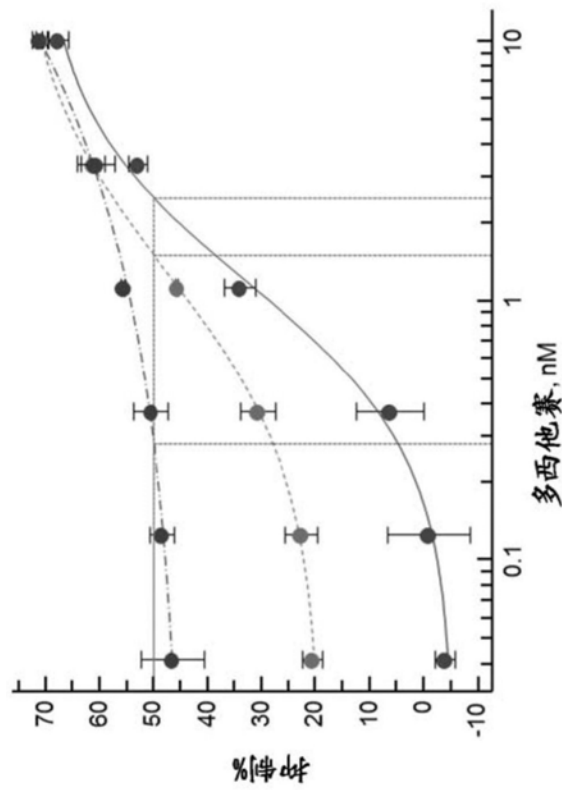
[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	1.8 nM
3 μM	- - -	0.6 nM
6 μM	- · - · -	0.03 nM

图12



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	1.4 nM
3 μM	- - -	0.6 nM
6 μM	- · - · -	0.1 nM

图13



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	2.5 nM
4 μM	- - -	1.5 nM
8 μM	- · - · -	0.3 nM

图14

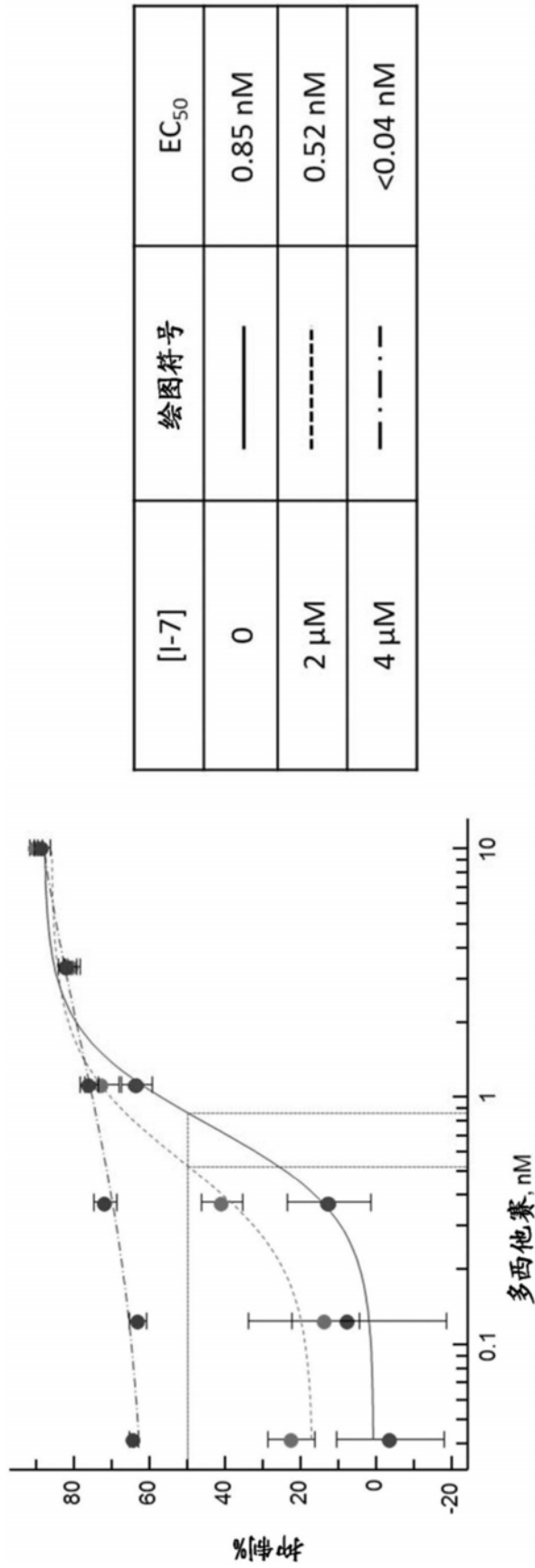
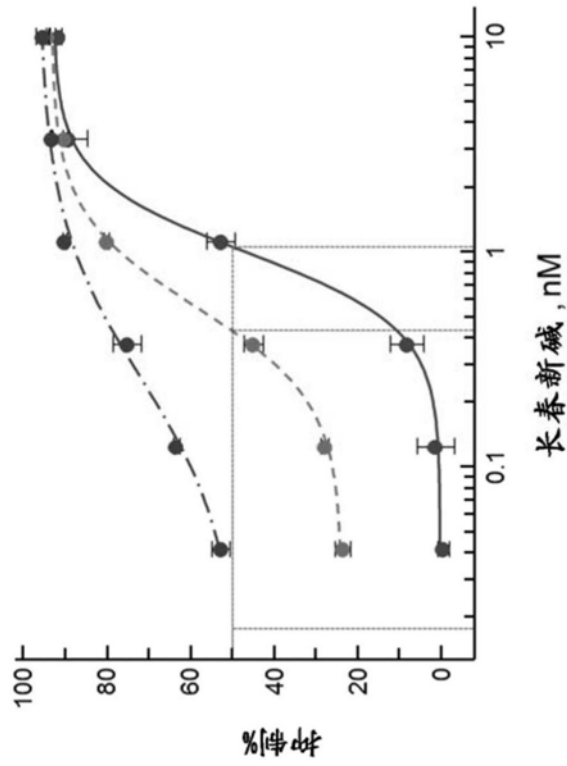
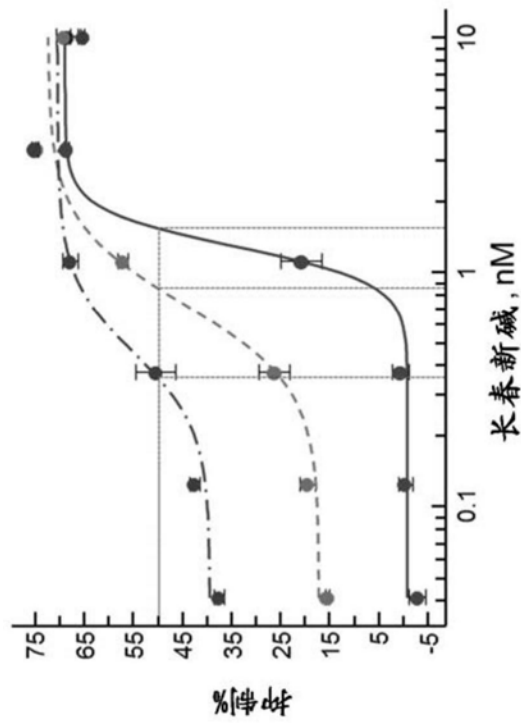


图15



[I-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	1.1 nM
2 μM	- - -	0.4 nM
4 μM	- · - · -	<0.04 nM

图16



[I-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	1.5 nM
2 μM	- - -	0.85 nM
4 μM	- · - · -	0.35 nM

图17

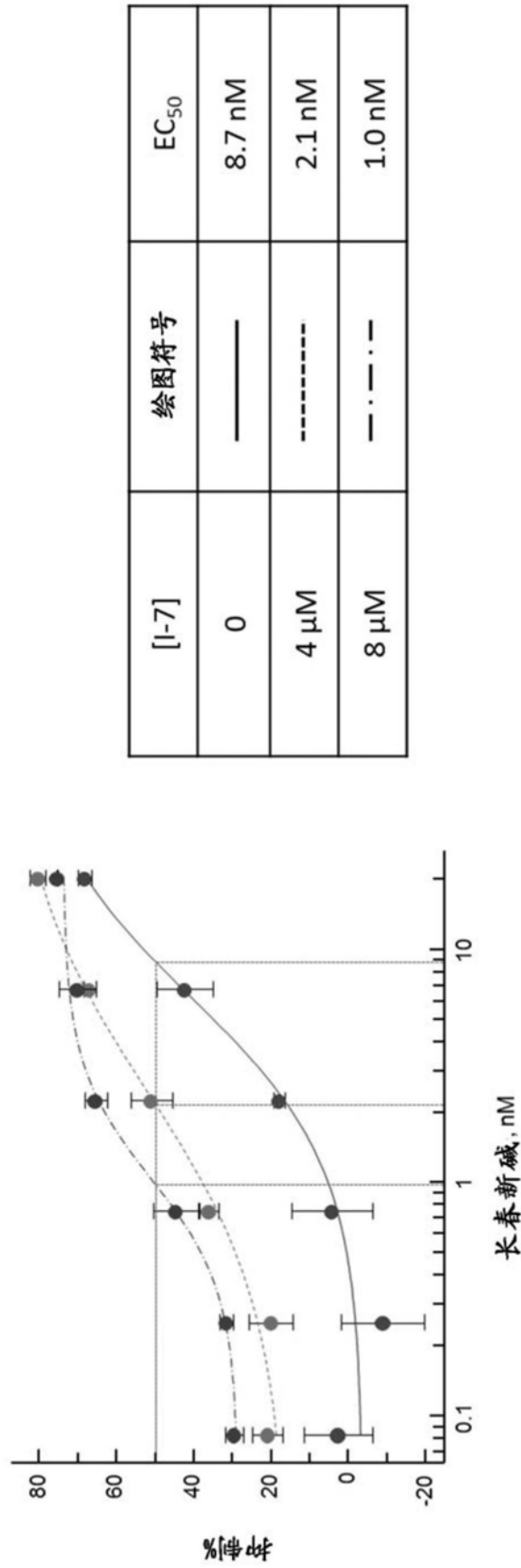
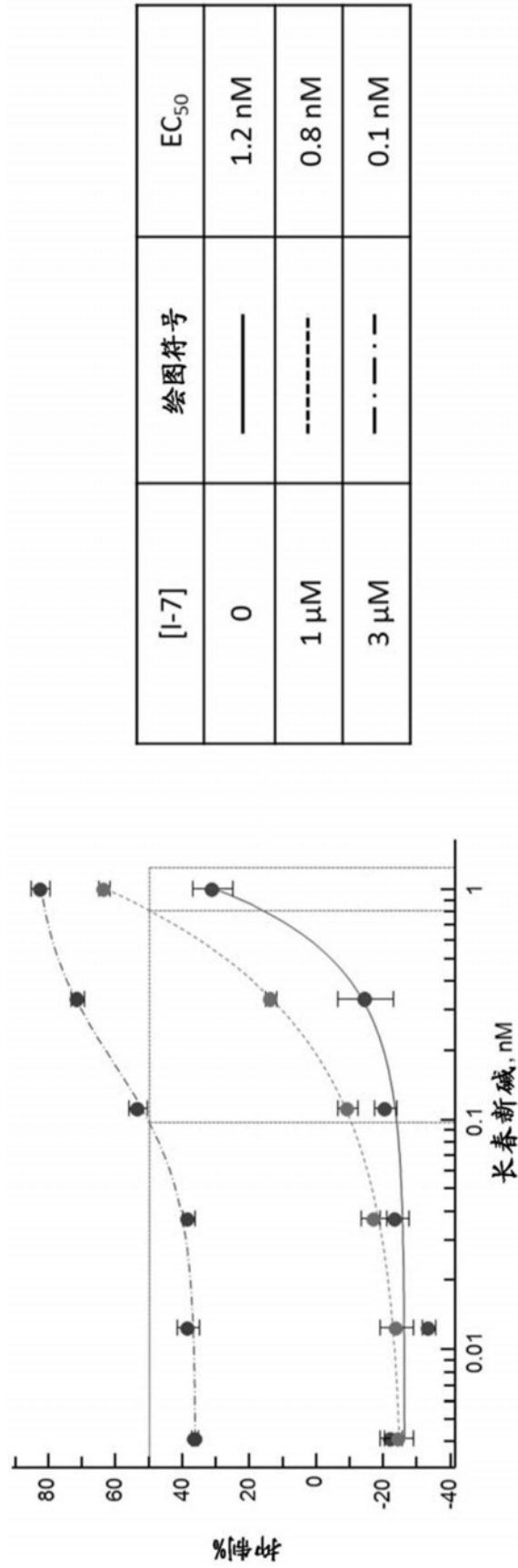
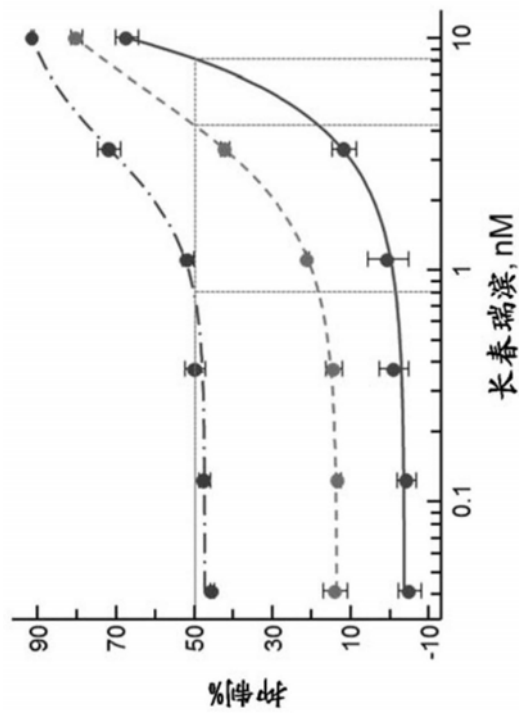


图18



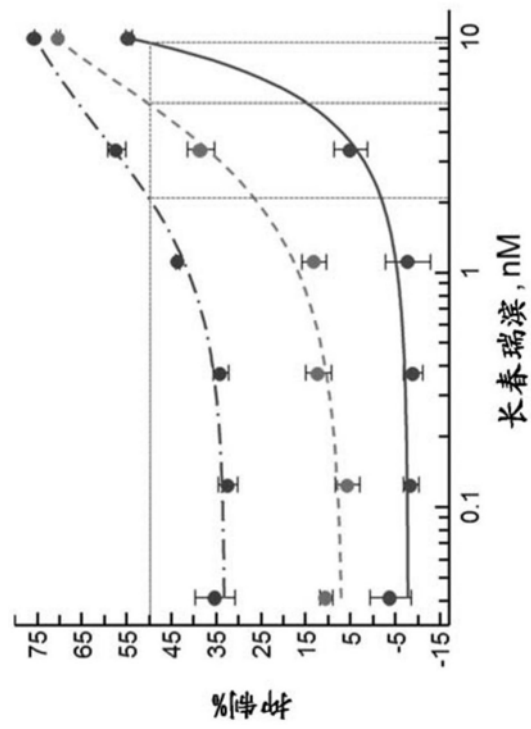
[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	1.2 nM
1 μM	- - - -	0.8 nM
3 μM	- · - · -	0.1 nM

图19



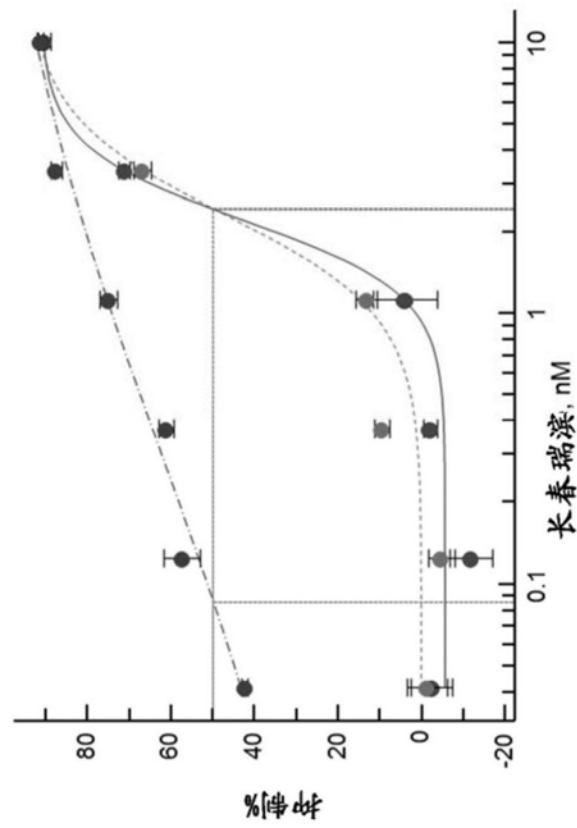
[I-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	8.1 nM
2 μM	- - -	4.2 nM
4 μM	- · - · -	0.8 nM

图20



[I-5]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	9.5 nM
2 μM	----	5.2 nM
4 μM	-·-·-	2.1 nM

图21



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	2.4 nM
1 μM	- - -	2.4 nM
3 μM	- · - · -	0.1 nM

图22

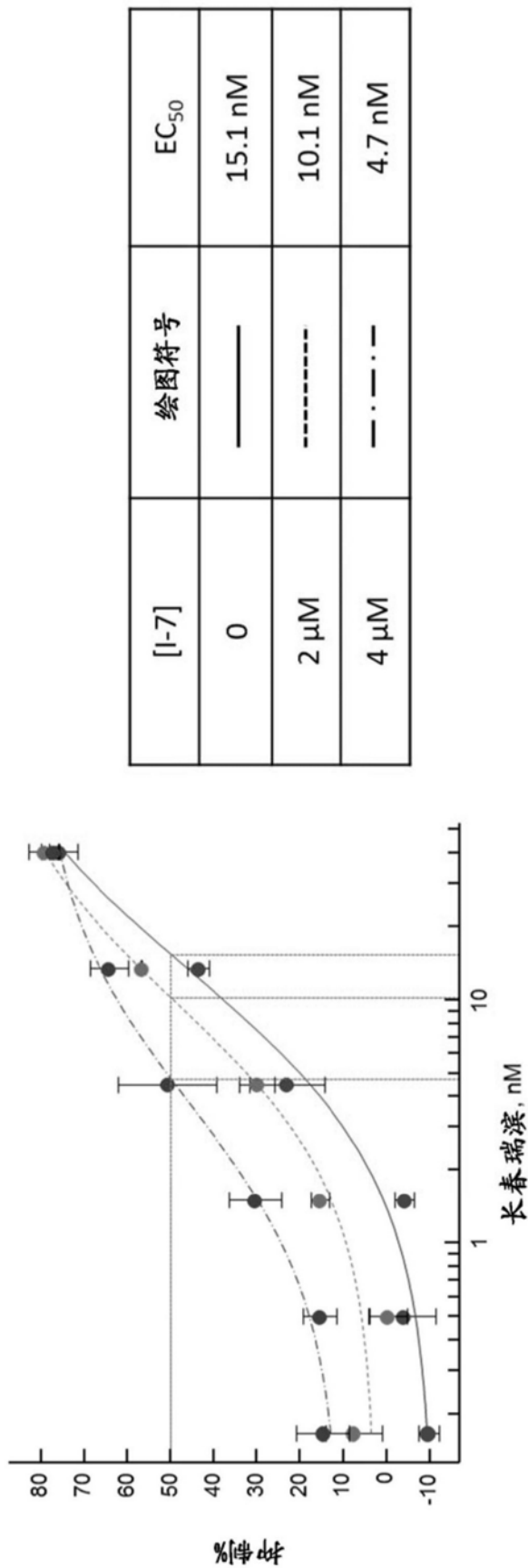


图23

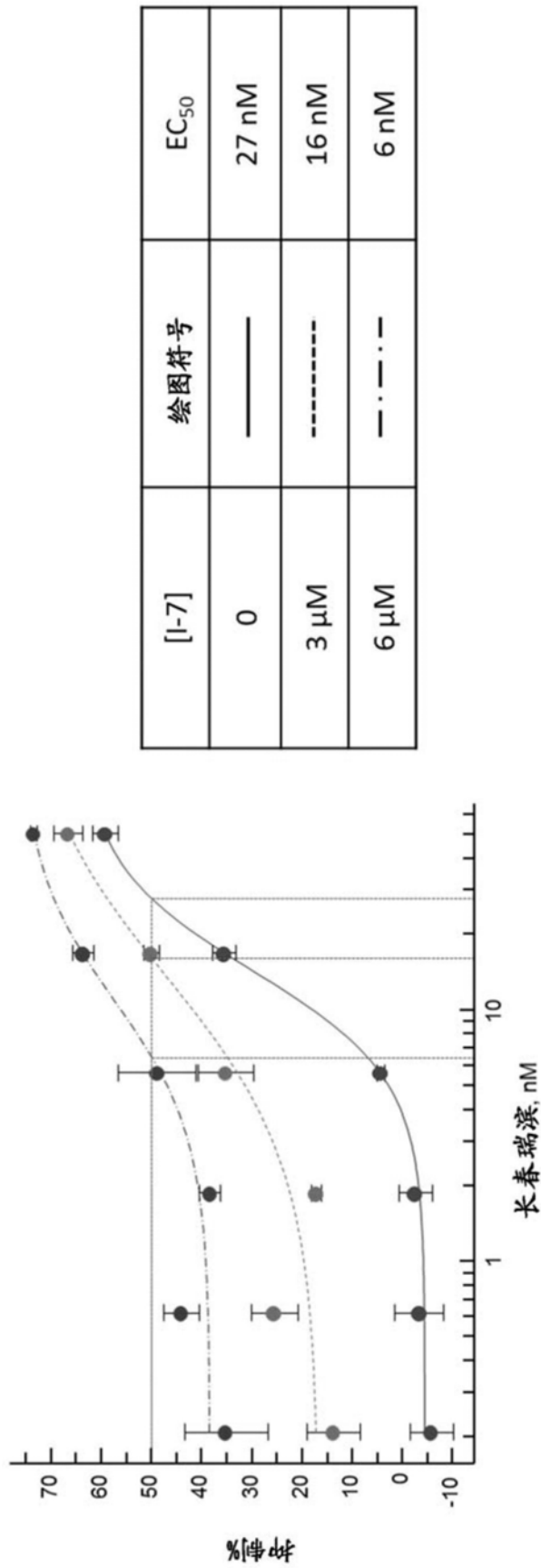
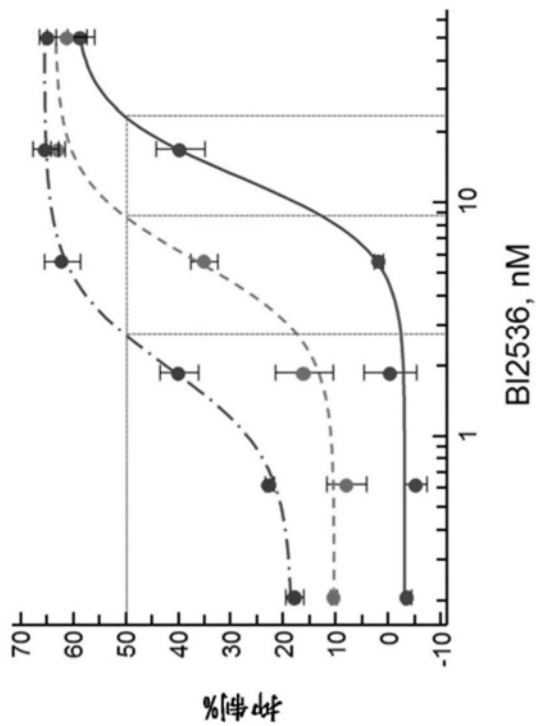
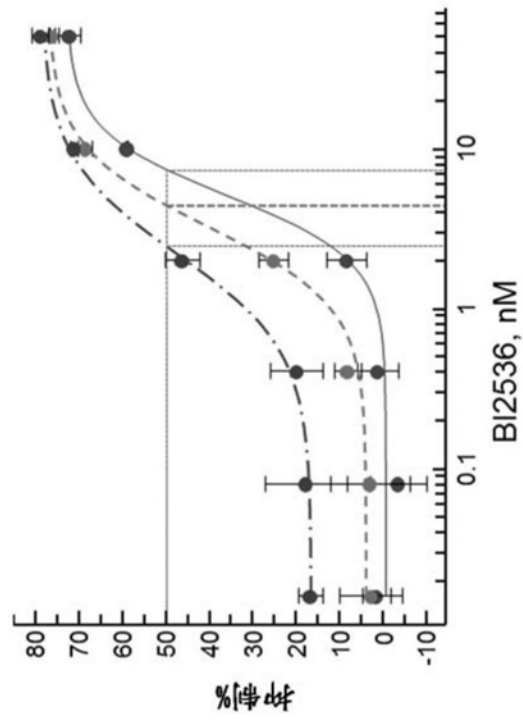


图24



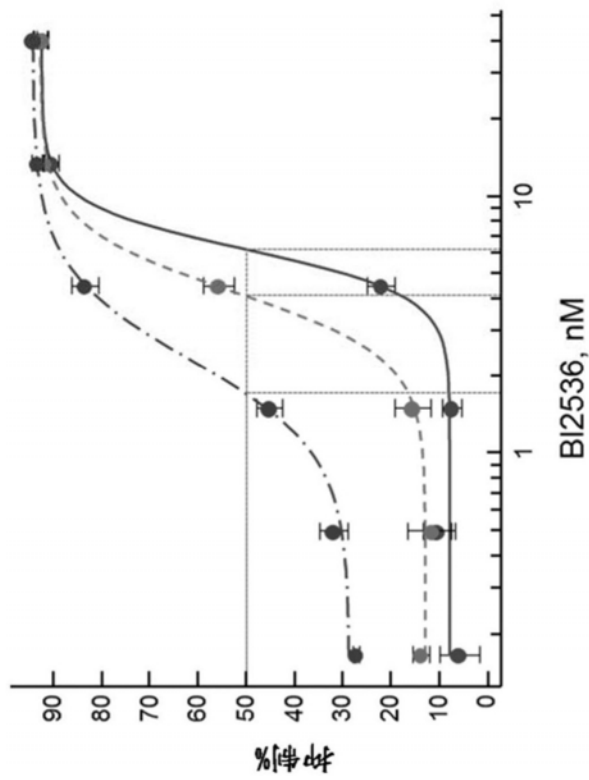
[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	46.3 nM
2 μM	----	17.3 nM
4 μM	-·-·-	5.4 nM

图25



[I-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	7.3 nM
2 μM	- - -	4.4 nM
4 μM	- · - · -	2.5 nM

图26



[I-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	6.2 nM
2 μM	- - -	4.1 nM
4 μM	- · - · -	1.7 nM

图27

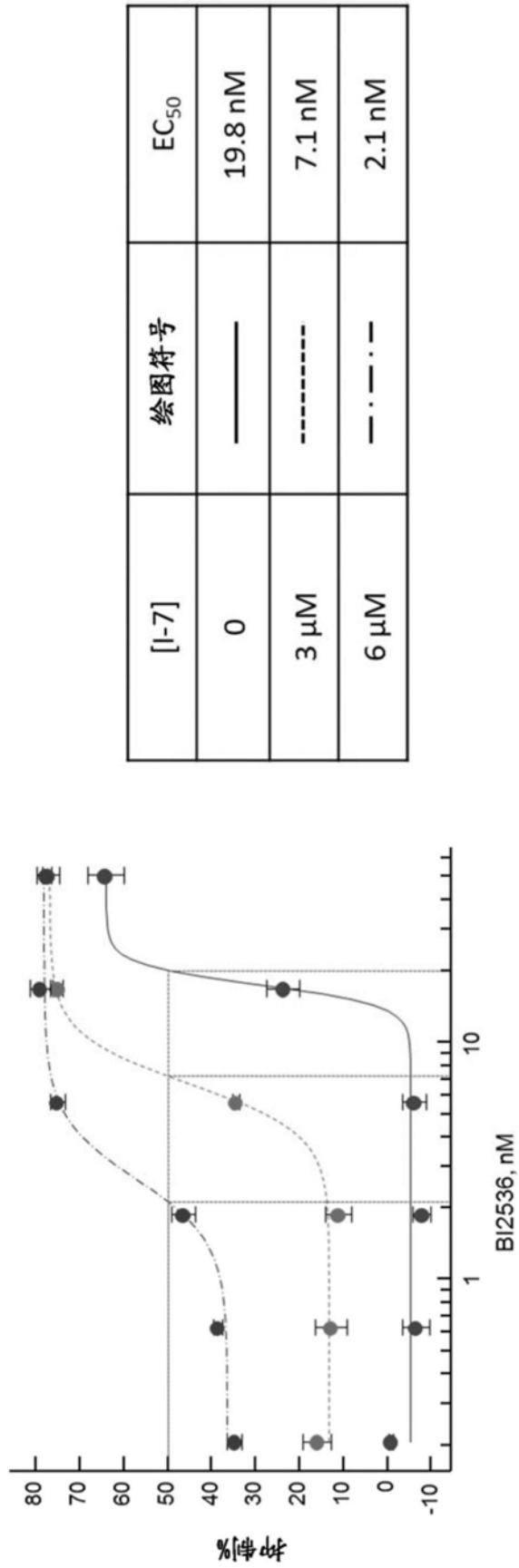
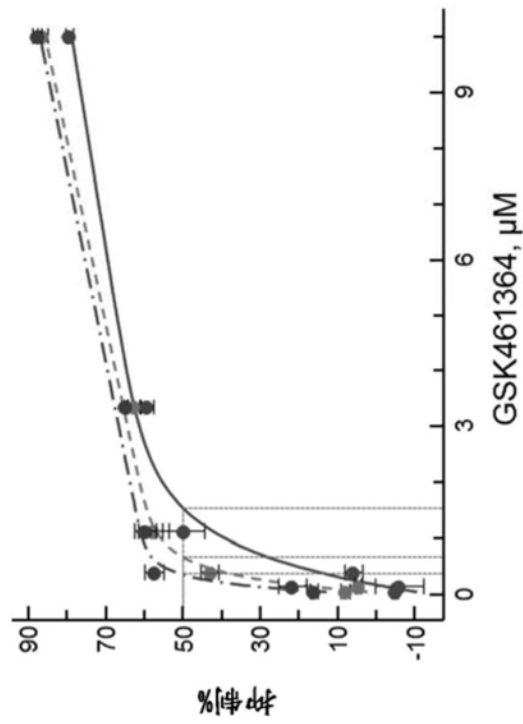
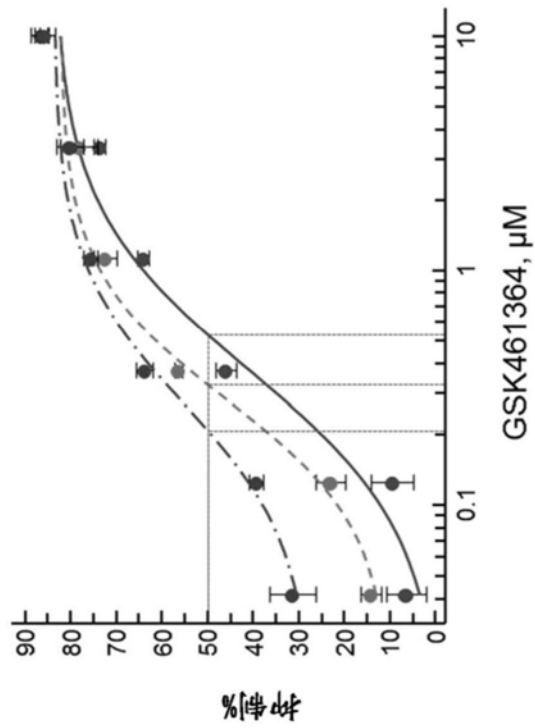


图28



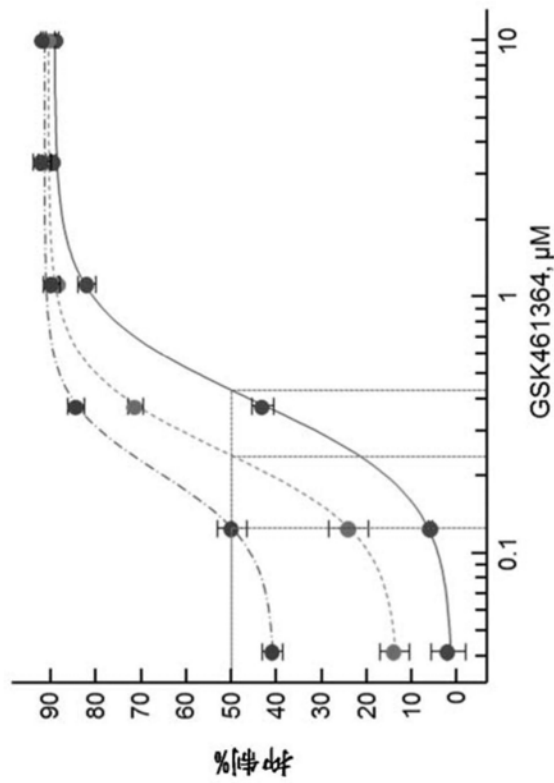
[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	1.9 μM
2 μM	----	0.97 μM
4 μM	-·-·-	0.58 μM

图29



[1-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	0.5 μM
2 μM	---	0.3 μM
4 μM	- · - · -	0.2 μM

图30



[I-7]	绘图符号	EC ₅₀
0	—	0.43 μM
2 μM	- - -	0.24 μM
4 μM	- · - · -	0.12 μM

图31

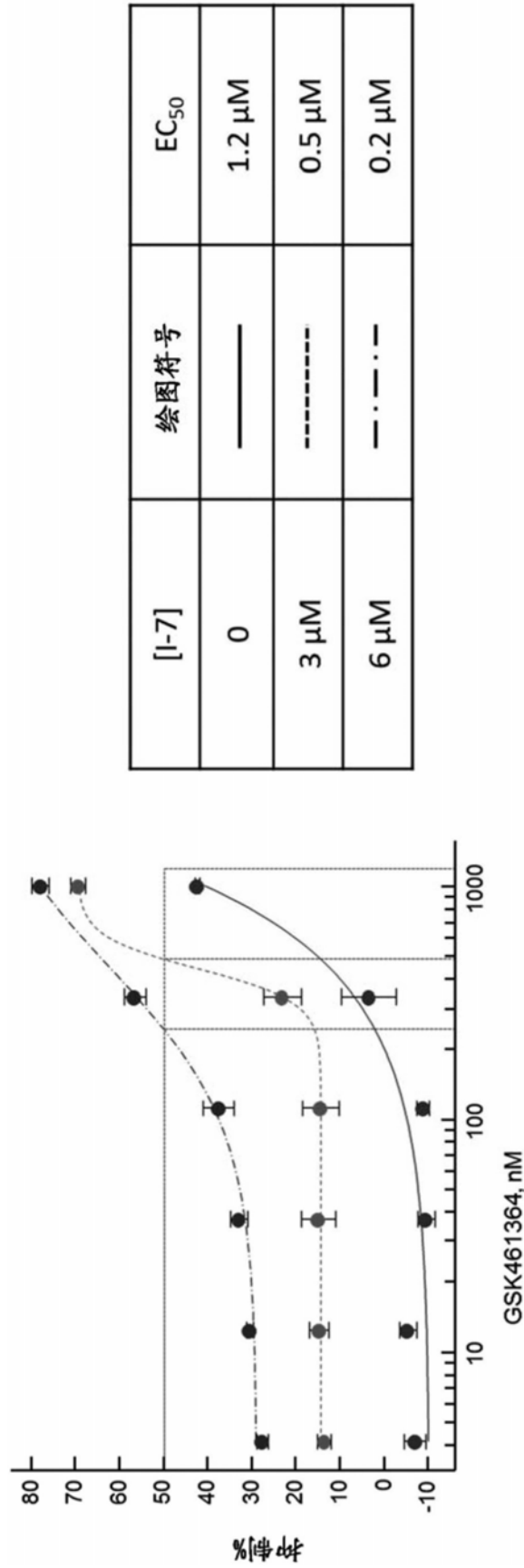


图32

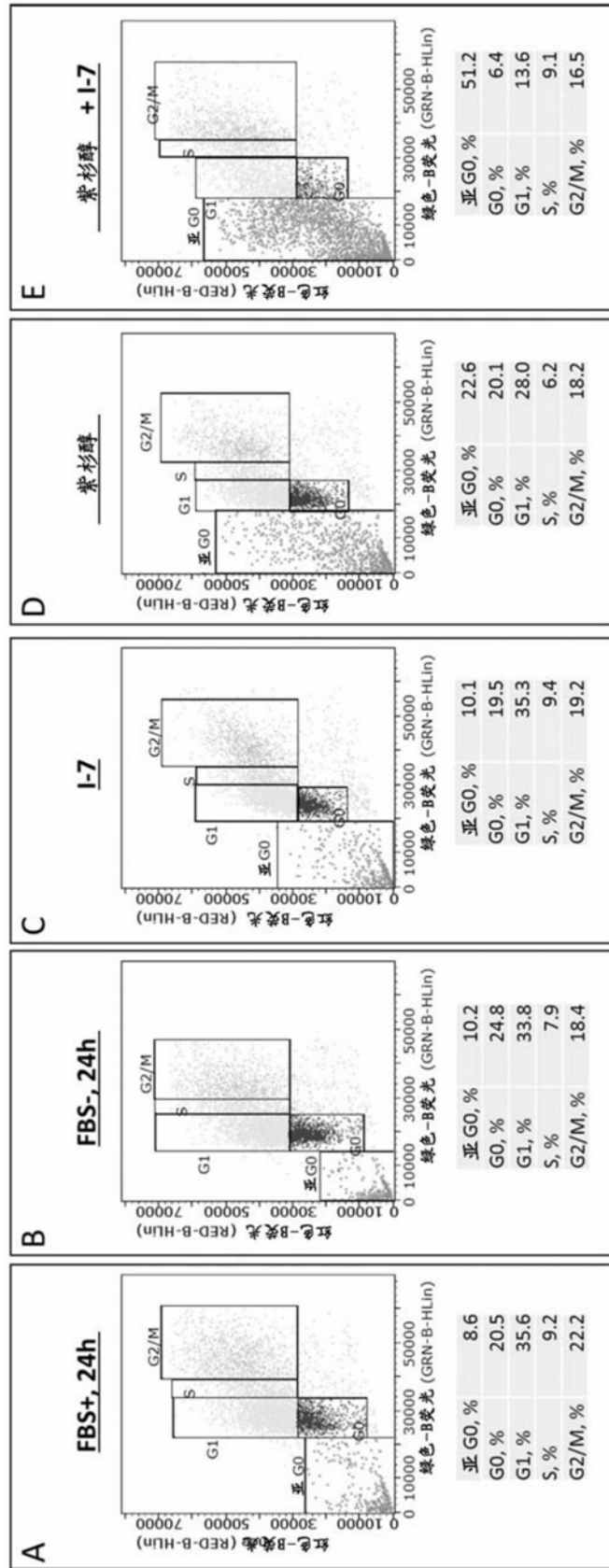


图33

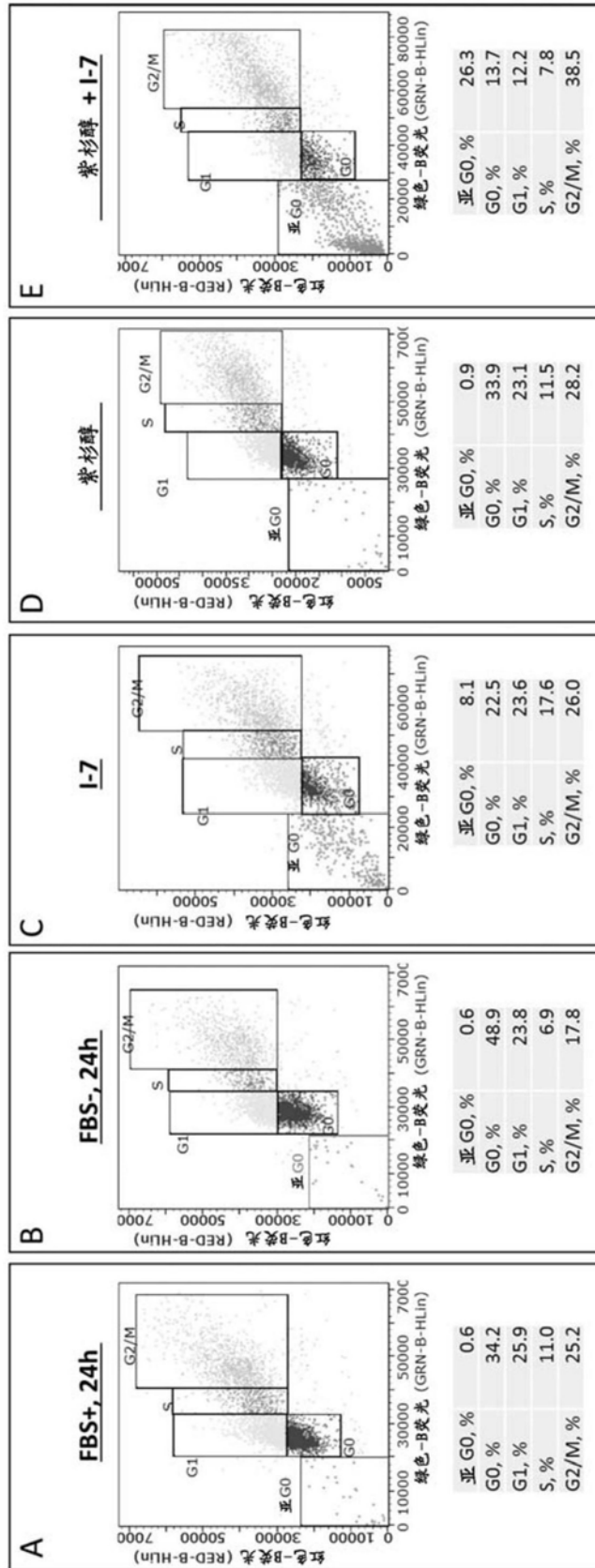


图34

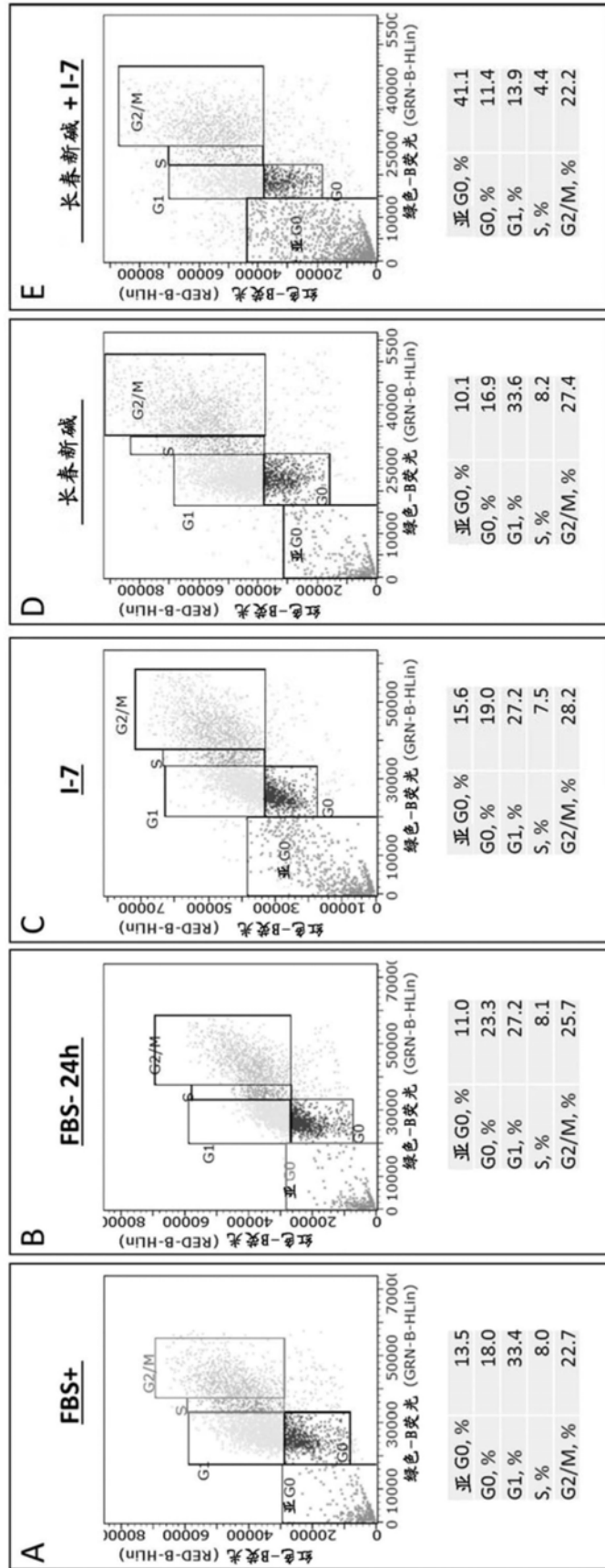


图35

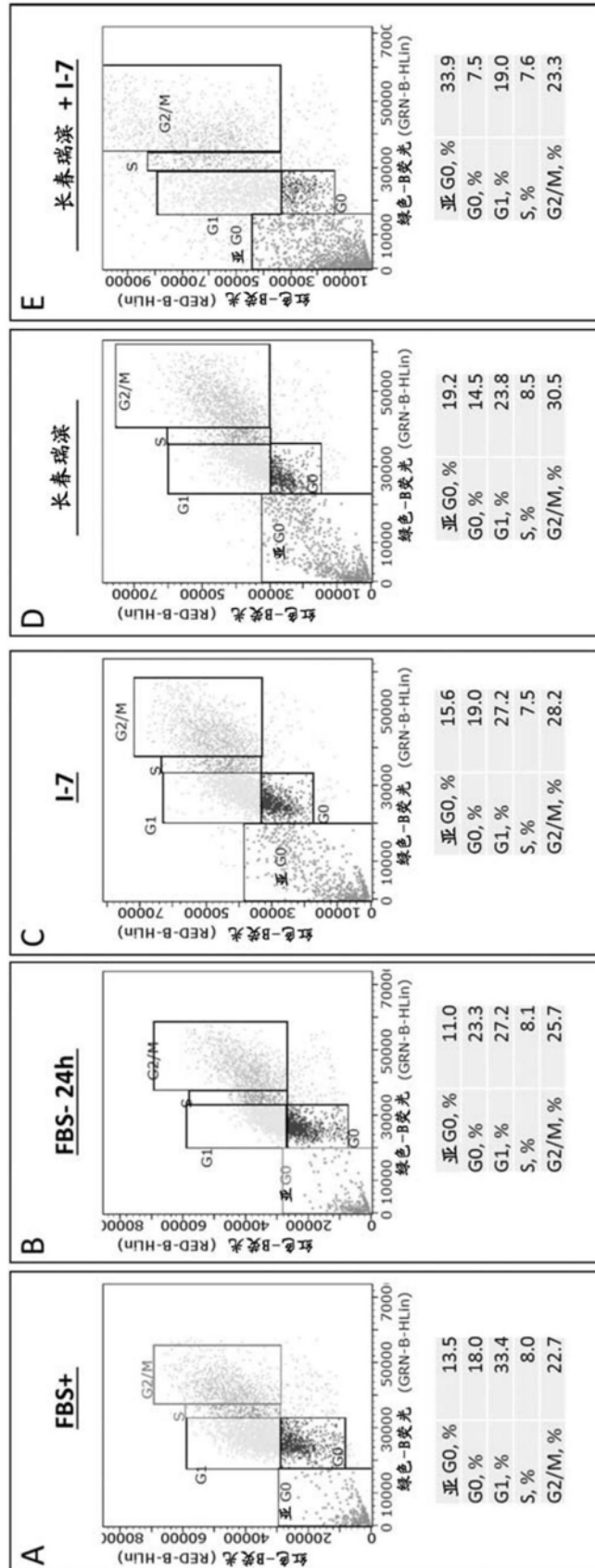


图36

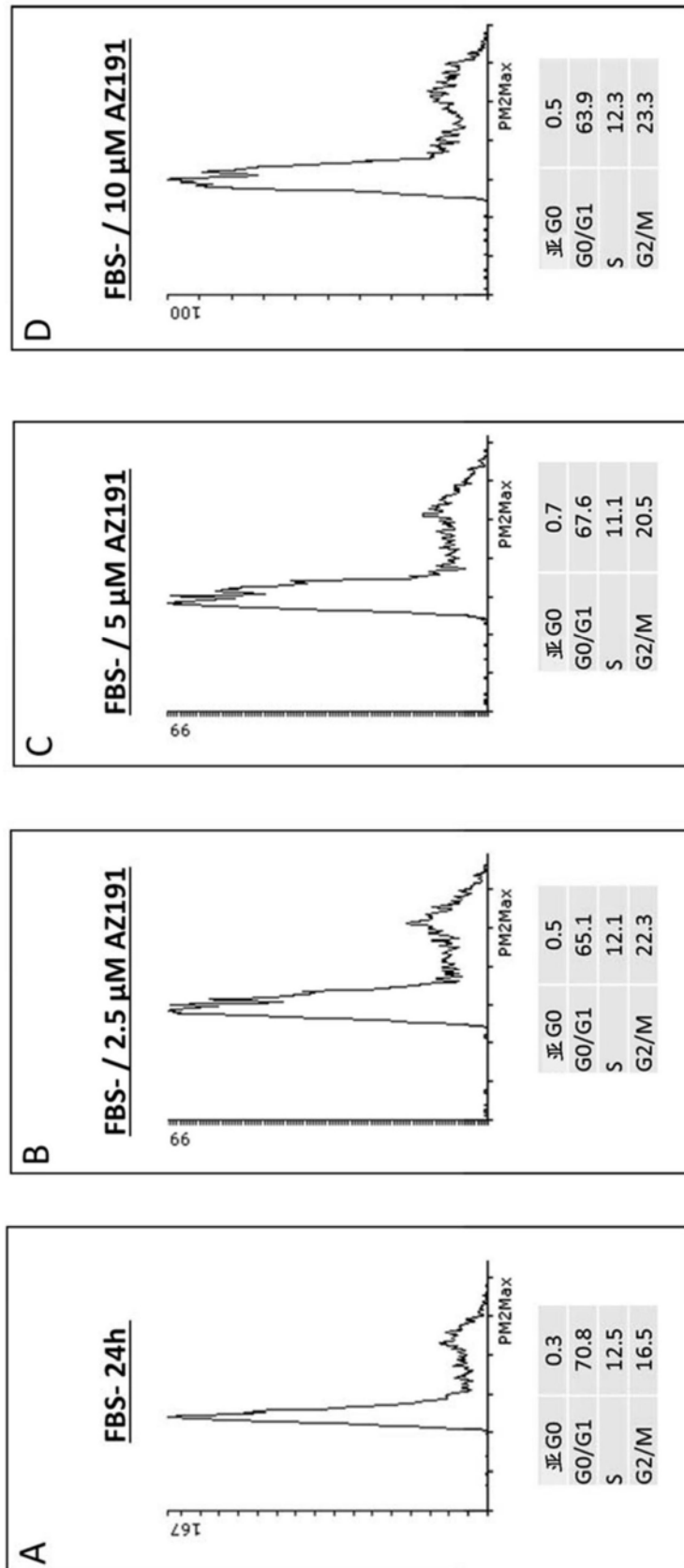


图37

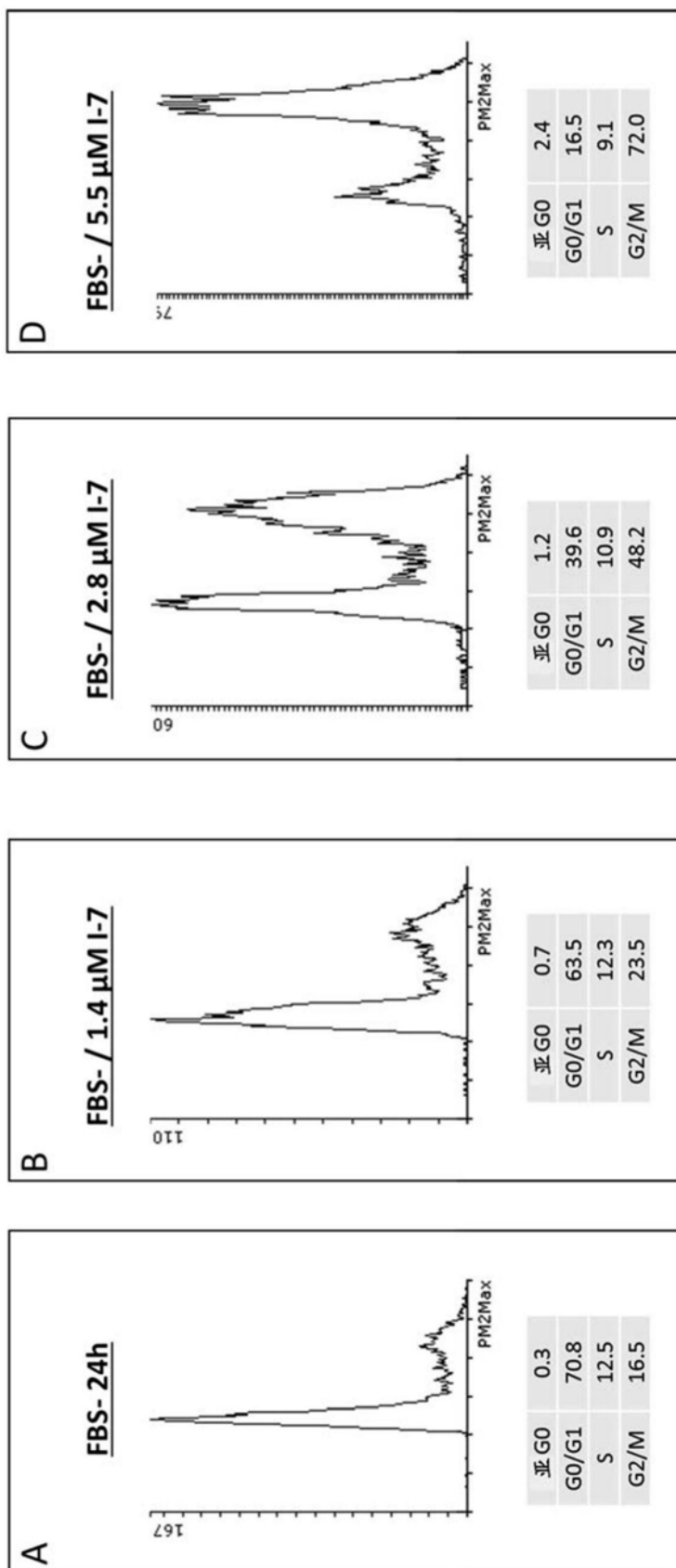


图38