



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111491927 A

(43)申请公布日 2020.08.04

(21)申请号 201880074427.2

(22)申请日 2018.11.16

(30)优先权数据

62/587,707 2017.11.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.05.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/061579 2018.11.16

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/099873 EN 2019.05.23

(71)申请人 伊利诺伊大学董事会

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 保罗·J·赫根罗德 杰西·白

马修·布德罗

(74)专利代理机构 北京攀腾专利代理事务所

(普通合伙) 11374

代理人 彭蓉

(51)Int.Cl.

G07D 295/15(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

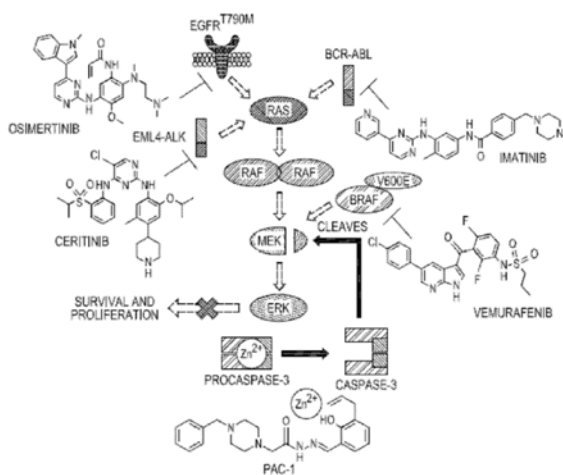
权利要求书3页 说明书25页 附图21页

(54)发明名称

通过降解双MEK信号传导的癌症疗法

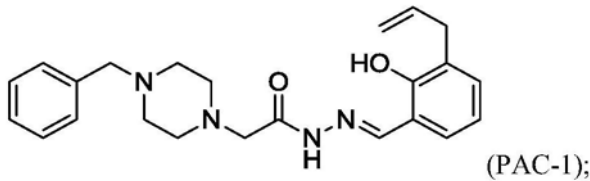
(57)摘要

有关驱动致癌作用的突变或融合激酶的发现,以及随后对这些酶的特异性抑制剂的获得,已在某些癌症的治疗中发挥了作用。但是,抗性的形成仍然是临床上面临的重大问题,其限制了大多数此类药物的长期疗效。本文展示了通过药物诱导的MEK裂解(通过直接前体半胱天冬酶-3激活)结合靶向激酶抑制作用来克服这种抗性的策略。这种联合效应在多种肿瘤组织学(黑色素瘤,肺癌和白血病)和驱动基因突变(突变BRAF或EGFR,融合激酶EML4-ALK和BCR-ABL)中普遍存在。半胱天冬酶-3介导的MEK激酶降解可导致持续的通路抑制,并以优于与MEK抑制剂组合的方式显著延迟或消除癌细胞中的抗性。这些数据表明,作为防止对靶向抗癌疗法抗性的治疗策略,药物介导的MEK激酶裂解的普遍性意义。



1. 一种组合物, 包括:

(a) 化合物PAC-1:



(b) 至少一种第二活性剂, 其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂; 以及

(c) 任选的, 药学上可接受的稀释剂, 赋形剂, 载体或其组合。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述组合物是MEK激酶降解的增强剂。

3. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述组合物是MEK-1和MEK-2激酶的半胱天冬酶-3降解的介体。

4. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述组合物是MEK-1和MEK-2激酶磷酸化的抑制剂, ERK-1和ERK-2激酶磷酸化的抑制剂或其组合。

5. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述第二活性剂是突变EGFR激酶的抑制剂。

6. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述第二活性剂为奥西替尼, 吉非替尼, 厄洛替尼, 阿法替尼或其组合。

7. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述第二活性剂是融合激酶的抑制剂, 其中所述融合激酶是EML4-ALK或Bcr-Abl。

8. 根据权利要求7所述的组合物, 其中所述融合激酶是EML4-ALK, 并且所述第二活性剂是赛立替尼, 克唑替尼, 艾乐替尼, 布里加替尼或其组合。

9. 根据权利要求7所述的组合物, 其中所述融合激酶是Bcr-Abl, 并且所述第二活性剂是伊马替尼, 达沙替尼, 尼洛替尼, 波舒替尼, 帕纳替尼或其组合。

10. 根据权利要求1所述的组合物, 其中a) 所述载体包括水, 缓冲剂, 糖, 纤维素, 环糊精, 二甲亚砜, 聚乙二醇, 生育酚, 脂质体, 胶束或其组合, 或b) 所述赋形剂包括粘合剂, 润滑剂, 吸附剂, 媒介物, 崩解剂, 防腐剂或其组合。

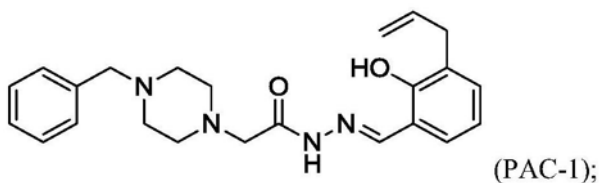
11. 根据权利要求1所述的组合物, 其中PAC-1的浓度为约0.1 μ M至约50 μ M。

12. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述第二活性剂的浓度为约1nM至约100 μ M。

13. 抑制癌细胞生长或增殖的方法, 其包括使所述癌细胞与有效量的权利要求1-12任一项所述的组合物接触, 从而抑制所述癌细胞的生长或增殖。

14. 在癌细胞中诱导细胞凋亡的方法, 包括使所述癌细胞与有效量的权利要求1-12任一项所述的组合物接触, 从而在所述癌细胞中诱导细胞凋亡。

15. 一种治疗癌症的方法, 其包括向有需要的患者同时或依次施用治疗有效量的化合物PAC-1:



以及有效量的第二活性剂,其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;其中所述癌症由此被治疗。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述第二活性剂是突变EGFR激酶的抑制剂,突变c-kit的抑制剂,EML4-ALK融合激酶的抑制剂或Bcr-Abl融合激酶的抑制剂,其中所述突变EGFR激酶任选具有T790M突变。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中促凋亡Bcl-2蛋白(BIM)被上调。

18. 根据权利要求15所述的方法,其中通过降解或消除MEK-1和MEK-2激酶来治疗癌症,从而通过抑制MEK-1和MEK-2,ERK-1和ERK-2或其组合的磷酸化来有效地抑制MAPK信号传导途径并诱导癌细胞中的细胞凋亡。

19. 根据权利要求15所述的方法,其中所述癌症是黑素瘤,白血病,胃癌,肾癌,肺癌,脑癌或其转移形式。

20. 根据权利要求15-19任一项所述的方法,其中所述第二活性剂是奥西替尼,塞立替尼或伊马替尼,其中降低、延迟或消除对有需要的患者的癌症治疗的抗性。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中PAC-1与奥西替尼,塞立替尼或伊马替尼在体外或体内协同作用,其中:

a) PAC-1的浓度为约2 μ M至约5 μ M,所述第二活性剂为奥西替尼,其浓度为约1nM至约30nM;

b) PAC-1的浓度为约2 μ M至约5 μ M,所述第二活性剂为塞立替尼,其浓度为约5nM至约30nM;或

c) PAC-1的浓度为约5 μ M至约7.5 μ M,所述第二活性剂为伊马替尼,其浓度为约60nM至约100nM。

22. 根据权利要求15所述的方法,其中化合物PAC-1和所述第二活性剂被同时施用于癌症患者。

23. 根据权利要求15所述的方法,其中化合物PAC-1和所述第二活性剂被依次施用于癌症患者。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中化合物PAC-1在所述第二活性剂之前施用于癌症患者。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中化合物PAC-1在所述第二活性剂之后施用于癌症患者。

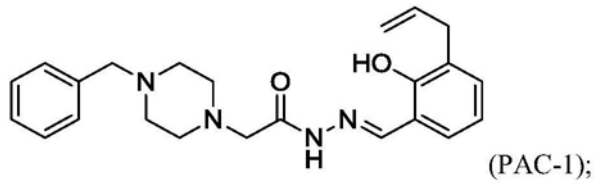
26. 根据权利要求15所述的方法,还包括向患者同时或依次施用治疗有效量的MEK抑制剂,V600E突变的BRAF激酶抑制剂或其组合。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述MEK抑制剂是曲美替尼,考比替尼,比尼替尼或其组合。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述突变的BRAF激酶抑制剂是威罗非尼,达拉非尼,恩可拉菲尼或其组合。

29. 一种组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述组合物包含:

(a) 化合物PAC-1;



(b) 至少一种第二活性剂,其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;以及

(c) 任选的,药学上可接受的稀释剂,赋形剂,载体或其组合;

其中所述组合物是MEK激酶降解的增强剂。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述癌症是黑素瘤,白血病,胃癌,肾癌,肺癌,脑癌或其转移形式。

通过降解双MEK信号传导的癌症疗法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据U.S.C. §119 (e) 要求2017年11月17日提交的美国临时专利申请62/587,707的优先权,而上述在先申请在此通过引用纳入本文。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明是在美国政府支助下由National Institutes of Health提供的拨款R01-CA120439的资助进行的。美国政府对本发明享有某些权利。

背景技术

[0005] 激酶的表达、突变或融合,其影响细胞增殖和存活途径,驱动了许多癌症中的肿瘤发生。对这些致癌激酶采用抑制剂的特异性靶向已导致很大一部分晚期疾病患者的强烈反应。然而,由于对这些药物的抗药性的快速发作,对激酶抑制剂的反应通常是短暂的。存在多种抗性机制以重新激活细胞增殖和存活途径。特别是,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路的重新激活是导致对大量临床获准的抑制剂(包括靶向突变型BRAF,突变型EGFR, EML4-ALK或BCR-ABL激酶的抑制剂)产生抗性的原因。

[0006] 认识到MAPK途径的重新激活会减弱激酶抑制剂的临床疗效,且MEK1/2激酶是MAPK途径的最后关守激酶,对与MEK1/2抑制剂(例如曲美替尼或考比替尼)的联合疗法进行了探索,采用几种激酶抑制剂以延缓抗性。临床上MEK1/2和突变型BRAF抑制剂的组合可延长转移性BRAF^{V600E}黑色素瘤(BRAF^{V600E} melanomas)的无进展生存期和总体生存期。然而对这种双重疗法的抗性总是在治疗开始后一年出现,部分原因是MEK1和MEK2激酶的继发突变消除了抗癌功效。

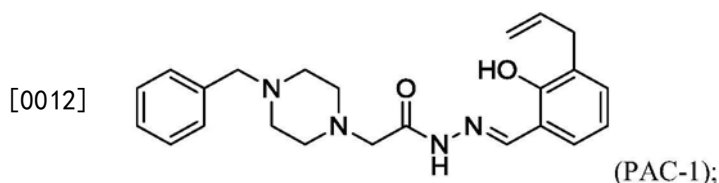
[0007] 因此,对MEK1和MEK2的继发突变引起的抗癌功效的丧失,可以通过小分子方法来解决,使MEK1和MEK2激酶降解以使它们不能发出下游信号,从而使癌症治疗获得进展。

[0008] 发明概述

[0009] 靶向抗癌疗法的临床作用受到抗药性快速发作的限制。在抗药克隆中,经常观察到通过MEK1/2激酶激活下游信号,因此对MEK1/2的抑制就成了延缓抗药性的诱人策略。然而,药物介导的MEK1/2抑制作用只能短暂关闭下游信号传导并且只能提供不太大的存活益处。本文显示,作为一种有前途的抗癌策略,药物诱导的MEK1和MEK2降解可广泛增强由多种已批准的激酶抑制剂介导的细胞死亡,包括针对黑色素瘤,肺癌和白血病。MEK1和MEK2的这种损耗导致对下游信号的持续抑制,从而显著延迟或消除癌细胞中抗药性的发作。

[0010] 因此,本文提供了一种组合物,其包含:

[0011] (a) 化合物PAC-1:



[0013] (b) 至少一种第二活性剂,其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶

的抑制剂;以及

[0014] (c) 任选的,药学上可接受的稀释剂,赋形剂,载体或其组合。

[0015] 本文还提供了一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者同时或依次施用治疗有效量的化合物PAC-1和有效量的第二活性剂,其中所述第二活性剂为突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;其中所述癌症由此被治疗。

[0016] 另外,本文提供了一种组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述组合物包含:

[0017] (a) 化合物PAC-1;

[0018] (b) 至少一种第二活性剂,其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;以及

[0019] (c) 任选的,药学上可接受的稀释剂,赋形剂,载体或其组合;

[0020] 其中所述组合物是MEK激酶降解的增强剂。

[0021] 本发明提供了本文所述组合物在医药疗法中的用途。所述医药疗法可以治疗癌症,例如黑色素瘤(melanoma),白血病(leukemia),乳腺癌(breast cancer),肺癌(lung cancer),胰腺癌(pancreatic cancer),前列腺癌(prostate cancer)或结肠癌(colon cancer)。本发明还提供了本文所述的组合物在制备用于治疗哺乳动物疾病,例如人、猫或狗的癌症的药物中的用途。所述药物可以包括药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

附图说明

[0022] 下述附图属于说明书的一部分并且是用来对本发明的一些实施方式或不同方面作进一步的描述。在一些实例中,本发明的实施方式可以通过参照附图并结合本文提供的详细描述得到更好地理解。这些描述和附图可以突出某些具体的实施例或者本发明的某些方面。然而,本领域技术人员应当理解这些部分的实施例或方面也可用于结合本发明的其他实施例或方面。

[0023] 图1:用PAC-1和多种靶向激酶抑制剂共同治疗癌细胞后,caspase-3(半胱天冬酶-3)的活性(activity)增强。在用DMSO、单药PAC-1(5 μ M)或osimertinib(奥希替尼)处理的(A)H1975和(B)PC-9GR NSCLC细胞中观察到caspase-3活性或PARP-1裂解可忽略不计的增加。在用PAC-1+osimertinib处理的细胞中,早在处理后36h就观察到caspase-3活性急剧增加。48h后观察到PARP-1的显著裂解和procaspase-3(前体半胱天冬酶-3)水平的降低,与caspase-3活性测定的结果一致。(C)H3122 NSCLC细胞用PAC-1(5 μ M)+ceritinib(色瑞替尼)处理不同的时间,观察到caspase-3活性显著增加。处理48h后,还观察到PARP-1裂解增加和procaspase-3水平降低。(D)在用PAC-1(7.5 μ M)+imatinib(伊马替尼)处理的K-562细胞中也观察到了caspase-3活性的显著增强,单药活性可忽略不计。PAC-1+imatinib(伊马替尼)治疗48h后,还观察到PARP-1裂解和procaspase-3激活增加。显示的值是至少3个实验的平均值,误差线是s.e.m.,用于双向ANOVA分析(确定组合是否与单个药物的加和效应不同)显示的p值在统计上不同(* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$)。另可参阅图6。

[0024] 图2:PAC-1组合疗法导致caspase-3活化和MEK1和MEK2激酶降解。(A)Procaspase-3激活导致用PAC-1(5 μ M)+vemurafenib(威罗菲尼)(10 μ M)处理48h的A375和SK-MEL-5细胞中MEK1和MEK2水平急剧下降。在用trametinib(曲美替尼)(30nM)+vemurafenib处理的细胞

中未观察到这种减少。(B)用PAC-1 (5 μ M)+osimertinib (4nM) 处理48h的H1975和PC-9GR细胞导致procaspase-3活化以及相应MEK1和MEK2激酶降解。在用PAC-1+gefitinib (吉非替尼) (4nM) 或trametinib (30nM)+osimertinib处理的细胞中未观察到此现象。(C) 在用PAC-1 (5 μ M)+ceritinib (30nM) 处理48h的H3122细胞中相似地观察到MEK1和MEK2降解,但在用trametinib (30nM)+ceritinib处理的细胞中未观察到MEK1和MEK2降解。另可参见图7和图8。

[0025] 图3:用PAC-1和vemurafenib (威罗菲尼) 或osimertinib处理的细胞对MAPK信号传导具有持续抑制作用。(A) 将A375和SK-MEL-5黑色素瘤细胞分别用PAC-1 (5 μ M), vemurafenib (10 μ M), trametinib (30nM) 或所示组合治疗48h。仅在用PAC-1+vemurafenib处理的细胞中观察到ERK1/2和MEK1/2磷酸化的抑制作用。(B) 用DMSO, vemurafenib, vemurafenib+PAC-1或vemurafenib+trametinib处理6、24或48h的A375细胞中磷酸-MEK1/2和磷酸-ERK1/2抑制作用的时间进程。(C) 用PAC-1 (5 μ M)+osimertinib (4nM) 处理48h后,在H1975和PC-9GR细胞中观察到MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。用PAC-1+gefitinib (吉非替尼) (4nM) 处理相似的时间段并没有产生相似的结果。在用trametinib (30nM)+osimertinib处理的细胞中也未观察到MEK1/2磷酸化的持续抑制。(D) 在用DMSO, osimertinib, osimertinib+PAC-1或osimertinib+trametinib处理6、24或48h的PC-9GR细胞中,磷酸-MEK1/2和磷酸-ERK1/2抑制作用的时间进程。另可参阅图9。

[0026] 图4:PAC-1组合疗法大大延迟或消除了获得抗性。(A) 将A375细胞用指定浓度的PAC-1, vemurafenib, trametinib或各自的组合处理长达30天。细胞被固定并在成像前用SRB染料染色。(B) 前述(A)的定量化,报告的数据是三个独立实验的平均值和标准误差。(C) 用指定浓度的PAC-1, osimertinib, trametinib或各自的组合处理PC-9GR细胞长达35天。细胞如(B)中成像。另可参见图10。(D) 前述(C)的定量化,报告的数据是两个独立实验的平均值和标准误差。(E) 用指定浓度的PAC-1, ceritinib, trametinib或各自的组合处理H3122细胞长达32天。所示图像代表两个独立实验。(F) 用PAC-1+ceritinib或trametinib+ceritinib处理H3122细胞32天的放大图像。与PAC-1+ceritinib相比,在用trametinib+ceritinib处理的细胞中可见到更高的抗性菌落。

[0027] 图5:此处检查的临床获准的激酶抑制剂与PAC-1联合疗法提出的作用机制。显示激酶抑制剂靶向关键的致癌驱动激酶,导致通过MEK短暂抑制信号传导。非常重要是PAC-1处理诱导MEK激酶裂解的能力。这种MEK裂解,结合上游途径抑制作用,可有效消除ERK磷酸化并阻碍促活和增殖信号传导。

[0028] 图6:用PAC-1和临床获准的靶向激酶抑制剂处理的细胞中增强的凋亡细胞死亡。与图1相关。(A) EGFR^{T790M}细胞和(B) H3122细胞分别用指定浓度的PAC-1+osimertinib或PAC-1+ceritinib处理48h。(C) K-562细胞用指定浓度的PAC-1+imatinib处理72h。然后细胞用膜联蛋白V-FITC和PI染料染色并通过流式细胞仪进行分析。所示数据是至少三个独立实验的平均值,误差线为s.e.m。条形图上的水平虚线表示由化合物的累加作用预期的凋亡细胞死亡水平。

[0029] 图7:在较低浓度下观察到的MEK1/2降解。与图2相关。(A) 在PC-9GR和培养5天后H1975细胞中PAC-1, osimertinib和gefitinib的IC₅₀ (\pm s.e.m)。所示数据是至少三个独立实验的平均值。(B-C) 用较低浓度的PAC-1+osimertinib或PAC-1+ceritinib处理48h的细胞

中MEK1/2激酶的降解。(D)用imatinib结合PAC-1或trametinib处理K-562 (BCR-ABL) 细胞48h导致procaspase-3活化和MEK1/2降解。(E) 48h后,较低浓度的imatinib (80nM) 与PAC-1组合也导致procaspase-3活化和所得MEK1/2激酶的降解。

[0030] 图8:使用caspase抑制剂Q-VD-OPh (25 μ M) 处理48h,防止PAC-1+靶向激酶抑制剂处理的细胞中的细胞死亡。与图2相关。(A) A375细胞,其用PAC-1 (5 μ M), vemurafenib (10 μ M), trametinib (30nM), Q-VD-OPh及其组合处理。(B) PC-9GR细胞,其用PAC-1 (5 μ M), osimertinib (4nM), Q-VD-OPh及其组合处理。(C) H3122细胞,其用PAC-1 (5 μ M), ceritinib (30nM), Q-VD-OPh及其组合处理。(D) K-562细胞,其用PAC-1 (7.5 μ M), imatinib (100nM), Q-VD-OPh及其组合处理。细胞用膜联蛋白V-FITC和PI染料染色,并通过流式细胞仪分析。所示数据是至少三个独立实验的平均值,误差线为s.e.m.双向t检验显示的p值;**p \leq 0.01,***p \leq 0.001。(E-G) 在用PAC-1+靶向激酶抑制剂+caspase抑制剂Q-VD-OPh处理的细胞中,MEK1/2的裂解减弱。(E) A375细胞,其用PAC-1 (5 μ M), vemurafenib (10 μ M), Q-VD-OPh (25 μ M)及其组合处理48h。(F) PC-9GR细胞,其用PAC-1 (5 μ M), osimertinib (4nM), Q-VD-OPh (25 μ M)及其组合处理48h。(G) H3122细胞,其用PAC-1 (5 μ M), ceritinib (30nM), Q-VD-OPh (25 μ M)及其组合处理48h。

[0031] 图9:MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制作用。与图3相关。(A) 用PAC-1和较低浓度的osimertinib (2.5nM) 处理48h后,EGFR^{T790M}细胞中的MEK1/2和ERK1/2磷酸化。(B-D) PAC-1+ceritinib导致H3122细胞中持续的MEK1/2磷酸化。(B) H3122细胞,用PAC-1 (5 μ M)+ceritinib (30nM) 处理48h,导致MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。但是,trametinib (30nM)+ceritinib的处理不能抑制MEK1/2磷酸化。(C) 在较低浓度的ceritinib (15nM),所述组合导致MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。(D) 磷酸-MEK1/2和磷酸-ERK1/2抑制的时间过程。H3122细胞DMSO,ceritinib,ceritinib+PAC-1或ceritinib+trametinib处理6、24或48h。用trametinib联合疗法观察到很少或没有MEK1/2磷酸化的抑制。(E-F) 在K-562 (BCR-ABL) 细胞中MEK1/2和ERK1/2磷酸化的抑制。(E) K-562细胞,用PAC-1+ceritinib处理48h,导致MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。与BRAF^{V600E},EGFR^{T790M}和EML4-ALK细胞不同,在用imatinib+trametinib处理的细胞中观察到procaspase-3的激活,从而导致MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。(F) 在较低浓度的imatinib (80nM),所述组合导致MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。

[0032] 图10:PAC-1+osimertinib可延迟获得抗性。与图4相关。处理28天后的(A) PC-9GR细胞,和(B) H1975细胞。细胞被固定并在成像前用SRB染料染色。

[0033] 图11:对靶向激酶抑制剂的快速获得抗性限制了它们在治疗晚期癌症中的应用。本文表明,多种激酶抑制剂与procaspase-3激活化合物(PAC-1)的组合导致MEK1/2降解,大大延迟了获得抗性;其中PAC-1增强了caspase-3活性以及由多种激酶抑制剂诱导的细胞凋亡;Caspase-3介导的MEK降解持续抑制MEK磷酸化;PAC-1组合疗法显著延迟或消除获得抗性。

[0034] 发明详述

[0035] 考虑到临床上使用的抑制剂对MEK1/2活性的短暂和差异抑制作用,提出了一种假设,与能够诱导MEK1/2激酶降解的小分子的联合疗法比直接抑制具有优势,使得在与多种临床认可的激酶抑制剂一起使用时,抗性低或者无抗性。详细的蛋白质组学实验表明,

MEK1/2激酶在凋亡过程中被caspase-3(半胱天冬酶-3)裂解,并且广泛报道procaspase-3(前体半胱天冬酶-3)在相对于健康组织的多种癌症中过表达。尽管通过各种机制逃避凋亡被认为是癌症的标志,但先前的研究表明,procaspase-3的过表达可以驱动肿瘤发生。这些观察结果暗示,procaspase-3活化为caspase-3并随后由caspase-3介导的MEK降解可以选择性地发生在与健康细胞相对的癌性细胞中。直接procaspase-3激活的另一个好处是能够绕过通常在癌性细胞中procaspase-3上游发现的凋亡路径中的缺陷(图11)。

[0036] PAC-1是一种选择性的procaspase-3激活化合物,可与BRAF^{V600E}抑制剂vemurafenib(威罗菲尼)协同作用,在含有BRAF中V600E突变的许多黑色素瘤细胞系中延迟获得抗性,这表明所述策略的可行性。本文评估了PAC-1组合四种不同的临床获准的抑制剂,其靶向由MAPK途径发出信号的四种不同的激酶。这些组合可显著增强caspase-3活性并诱导MEK1/2激酶降解。本文报道了在靶向BRAF^{V600E}(vemurafenib),EGFR^{T790M}(osimertinib),EML4-ALK(ceritinib)或BCR-ABL(imatinib)的激酶抑制剂中添加PAC-1会增强MEK1和MEK2降解,从而导致对MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制,增加凋亡细胞的死亡,并明显延迟或消除获得抗性。由于目前正在人类癌症患者的临床试验中对PAC-1进行评估(NCT02355535,NCT03332355),因此本文提供的结果可快速转化为与各种靶向激酶抑制剂的组合临床试验,而这些研究可以为癌症患者带来重大益处。

[0037] 定义

[0038] 下面的定义是用来对说明书和权利要求书提供清晰和一致的理解。本文所采用的术语具有下述的含义。本说明书中所采用的其他术语和短语具有本领域技术人员所能理解的普通含义。这种普通含义可通过参考技术辞典获得,例如Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14th Edition,by R.J.Lewis,John Wiley&Sons,New York,N.Y.,2001。

[0039] 本说明书中提及的“一种实施方式(one embodiment)”、“实施方式(an embodiment)”等表明所描述的实施方式可包含特定的方面、特征、结构、部分或特性,但并不是每个实施方式都必须包含这些特定的方面、特征、结构、部分或特点。此外,这些短语可能,但并不一定,适用于在本说明书其它部分提及的相同的实施方式。此外,当特定的方面、特征、结构、部分或特点是结合某种实施方式进行描述的,本领域技术人员应当能够知道将这些特定的方面、特征、结构、部分或特点应用到或关联到其它的实施方式,无论是否明确地表述出来。

[0040] 单数形式的冠词“a,”“an”和“the”包括复数含义,除非上下文存在明确的不同阐述。因此,例如,“化合物”可以是指包括多个这样的化合物,从而化合物X包括多个的化合物X。进一步值得注意的是,权利要求书可能被撰写为排除任何可选元素。因此,本声明旨在作为排除性术语使用的前置基础,例如“单独(solely)”、“仅仅(only)”等术语,与本文所描述的任何元素相关联和/或作为对权利要求所述要素的限定或者用作“负面”限制。

[0041] 术语“和/或(and/or)”是指相关项目的任何一项、任何组合,或它们的全部。短语“一个或多个(one or more)”和“至少一个(at least one)”是本领域技术人员都能容易理解的,尤其是根据上下文理解。例如,这些短语可以是指一、二、三、四、五、六、十、一百,或大约比已经列举的下限高出10、100或1000倍的任何上限值。

[0042] 本领域技术人员应当能够理解,包括表示成分含量、诸如分子量的性质、反应条件等等的任何数目都可以是近似的,并且在各种情下都能够采用术语“大约”进行修饰。取决

与本领域技术人员通过本文所述方法所期望获得的性质,这些值是可以有变化的。还应当理解,这些值,由于测试中出现的标准偏差必然会导致其内在的可变化性。当使用先行词“约”将值表示为近似值时,应当理解,没有修饰语“约”的特定值也形成了另一方面。

[0043] 术语“约 (about)”和“大约 (approximately)”交互使用。两者均表示特定值可以具有 $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 或 $\pm 25\%$ 的变化。例如,百分之“约50”在一些实施方式中可变化为45到55百分比。对于整数范围,术语“约”可包含在所指范围各端相较于所列举的整数小或大一个或两个整数。除非文中另有说明,术语“约”是用来包括对于成分、组合或实施例的功能来说等同的接近所列范围的数值。术语“约”和“大约”也能够用来对本段前述范围的端点进行调整。

[0044] 本领域技术人员应当能够理解,出于任何各种目的,尤其是就提供文字描述来说,本文提供的任何范围还包括所有可能的子范围和这些子范围的组合,以及构成所述范围的单独值,尤其是整数值。因此,应当理解,两个特定单位之间的每个单位均被披露。例如,如果公开了10到15,则也分别公开了11、12、13和14及其作为范围的一部分。所引述范围(例如重量百分比或碳基团)包括各个特定的数值、整数、小数或所述范围内的特性。应当易于理解,所列举的任何范围能够充分描述并能够使的相同的范围被分解为相等的二等份、三等份、四等份、五等份或十等份。作为非限制性例子,本文所述的每个范围都可容易地分解为下三分之一,中三分之一和上三分之一等等。本领域技术人员也应当能够理解,诸如“高至”、“至少”、“高于”、“低于”、“多于”、“或以上”或类似的术语包含所列举的数字,并且这种术语还指所述范围可随后分成上文提及的子范围。同样地,本文所列的任何比率也包含落在较宽比率之内的子比率。因此,自由基、取代基和范围的具体数值只是用来进行说明;其不排除自由基和取代基的其它指定数值或其它指定范围的数值。还须理解,每个范围的端点相关于另一个端点并且也可能是独立于另一个端点。

[0045] 本领域技术人员还应当能够容易理解,当单元被按照通常的方式例如在马库什群组中被组合起来时,本发明不仅包括所列单元组合构成的整体,还包括所述群组单独的每个单元以及所述基本群组的任何可能的亚群组。另外,对于所有的目的,本发明不仅包括基本群组,还包括基本群组去掉一个或多个单元的群组。可见,本发明可以包括明确排除所引述群组的任何一个或多个单元。因此,有关约束条件可以附加于任何公开的范畴或实施方式,其中任何一个或多个单元、种类或实施方式,可从所述范畴或实施方式中排除出来,例如,用于明示负面限定的场合。

[0046] 本文使用的术语“基本上 (substantially)”是一个宽泛的用语,并且以其通常的含义使用,包括但不限于,大体上但不一定完全是指定的。例如,该术语可以指可能并非所指完全数值100%的值。所述完全数值可以小于约1%,约2%,约3%,约4%,约5%,约6%,约7%,约8%,约9%,约10%,约15%,或约20%。

[0047] 术语“同时 (concurrently)”是指(1)在时间上同步进行,或者(2)在共同处理程序中的不同时间进行。

[0048] 术语“依次 (sequentially)”是指在所述过程中施用一种活性剂,然后施用另一种活性剂。在一种活性剂的施用之后,下一种活性剂的施用可以是立即跟在第一种活性剂之后,或者也可以是在第一种活性剂的施用之后再过有效时间段;所述有效时间段是为了实现由第一种活性剂的施用的最大效益而所设定的时间量。

[0049] 术语“接触 (contacting)”是指触及、接触,或者邻接或紧密地靠近,例如,包括在细胞或分子水平,比如在溶液或反应混合物中,在体外或体内,发生生理反应、化学反应或物理变化。

[0050] 术语“有效量 (effective amount)”是指有效地治疗疾病、失调和/或病况,或者导致诸如激活或抑制所描述效果的量。例如,有效量可以是有效地减缓所治疗的病况或症状的进展或程度的剂量。对治疗上有效量是在本领域技术人员能力范围内能够确定的。术语“有效量”是指包括本文所描述的化合物的量,或本文所描述的肽类的组合的量,比如,是用于针对受试者有效地治疗或预防疾病或失调,或者治疗疾病或失调的症状。因此,“有效量”通常是指能提供预期效果的量。

[0051] 在一种实施方式中,有效量是指本文所述活性剂的量,单独或与药物载体组合,能够通过单剂量或多剂量施与细胞或受试者(例如患者)从而有效地抑制生长或增殖,诱导死亡或阻止过度增殖细胞的生长。这样的生长抑制或灭杀作用可以体现为受试者存活的延长,例如患者超过没有治疗情形所预期的存活期,或者相对于不存在这种治疗的患者预后的任何改善。

[0052] 术语“治疗 (treating, treat 和 treatment)”包括 (i) 防止疾病、病理或医学状况的发生(例如预防); (ii) 抑制疾病、病理或医学状况或阻止其发展; (iii) 减轻疾病、病理或医学状况; 和/或 (iv) 减缓与疾病、病理或医学状况有关的症状。因此,术语“治疗”,“治疗”和“治疗”可以扩展到预防并且可以包括预防、防止、降低、停止或逆转所治疗的病症或症状的进展或严重程度。这样,适当时,术语“治疗”可以包括医学、治疗和/或预防性给药。

[0053] 本文中的术语“受试者 (subject)”或“患者 (patient)”是指具有疾病或其他恶性肿瘤的症状或其风险的个体。患者可以是人类或非人类,并且可以包括例如为了研究用作“模型系统”的动物品系或物种,例如本文所述的小鼠模型。同样,患者可能包括成人或少年(例如儿童)。此外,患者可以指可以受益于本文考虑的组合物施用的任何活生物体,优选哺乳动物(例如人或非人)。哺乳动物的例子包括但不限于哺乳动物类别的任何成员:人类; 非人类灵长动物,例如黑猩猩; 以及其他猿类和猴类; 牲畜,例如牛、马、绵羊、山羊和猪; 家畜,例如兔子,狗和猫; 实验动物,包括啮齿动物,例如大鼠、小鼠和豚鼠等。非哺乳动物的例子包括但不限于鸟类,鱼类等。在本文所述方法的一种实施方式中,所述哺乳动物是人类。

[0054] 本文中的术语“提供 (providing)”、“施用 (administering)”、“引入 (introducing)”在此可交互使用,并且是指通过在所需位置至少部分放置本发明的组合物或途径将本发明的组合物置于受试者体内。所述组合物可以通过递送到受试者中所需位置的任何合适的给药途径来施用。

[0055] 本文所述的组合物可以与其他组合物一起施用以延长组合物的稳定性和活性,或与其他治疗药物组合。

[0056] 术语“抑制 (inhibit, inhibiting 和 inhibition)”是指减缓、阻止或逆转疾病、感染、病况或细胞群的生长或进展。抑制作用可以大于约20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95% 或 99%, 例如,相比于发生在没有治疗或处理的情况下的生长或进展程度。另外,术语“诱导 (induce)”、“抑制 (inhibit)”、“增强 (potentiate)”、“升高 (elevate)”、“增加 (decrease)”、“减少 (decrease)”等表示两种状态之间的数量差异,并且可以指至少两者之间的统计学显著差异。例如,“有效抑制过度增殖性细胞生长的量”是指细胞的生长速率在

一些实施方式中可以于未处理的细胞至少在统计学上显著不同。这样的术语在此可以用于例如增殖速率。

[0057] “抑制”过度增殖的细胞(例如肿瘤细胞)的“生长或增殖”的表述是指减缓、中断、阻碍或停止其生长和转移,并不一定表示肿瘤生长的完全消除。

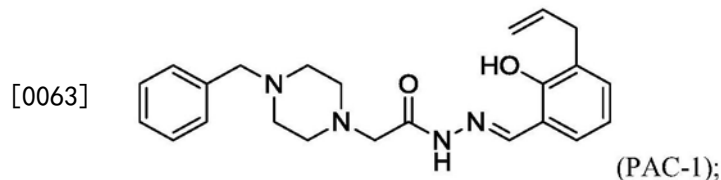
[0058] 术语“癌症(cancer)”通常是指由异常细胞的不受控制的生长所引起的100多种疾病中的任何一种。癌症可以体现为实体瘤和淋巴瘤以及诸如白血病的非实体癌症的形式。不同于正常细胞,其繁殖直到成熟并且只是在需要的时候才会替代受损的细胞,癌细胞可以无限生长和分裂,挤压附近的细胞,并且最终扩散到身体的其他部位。可以治疗的某些癌性疾病的例子包括但不限于肛门癌,移行细胞膀胱癌,骨癌,乳腺癌,宫颈癌,结肠直肠癌,胃癌,头颈癌,卡波济肉瘤,白血病,肺癌(例如支气管肺癌,小细胞肺癌和非小细胞肺癌),霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,恶性淋巴瘤,神经母细胞瘤,成骨细胞癌(例如骨癌),眼科癌症(例如视网膜母细胞瘤和其它眼部的癌症),卵巢癌,前列腺癌,肾癌,皮肤癌如黑色素瘤,软组织肉瘤,甲状腺癌和威尔姆瘤。在本发明范围内的非恶性过度增殖病况(例如癌症前期病况)的其他例子包括但不限于腺瘤,软骨瘤,纤维瘤,肌瘤,粘液瘤,神经瘤,成骨细胞瘤,骨软骨瘤,骨瘤,乳头状肿瘤,以及包括本文所述的其他癌症等。

[0059] 术语“白血病(leukemia)”或“白血病癌症(leukemic cancer)”是指造血系统和免疫系统(血液和淋巴系统)的所有癌症或瘤形成。这些术语是指造血器官的进展性的恶性疾病,以血液和骨髓中的白细胞及其前体的变形增殖和发展为特征。骨髓瘤是指其他类型的血液和骨髓细胞的肿瘤。淋巴瘤是指淋巴组织的肿瘤。白血病的实例包括急性骨髓性白血病(AML),急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和慢性骨髓性白血病(CML)。

[0060] 发明实施方式

[0061] 本文提供了以下各种实施方式的组合物,其包括:

[0062] (a) 化合物PAC-1:



[0064] (b) 至少一种第二活性剂,其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;以及

[0065] (c) 任选的,药学上可接受的稀释剂,赋形剂,载体或其组合。在本文另外的实施方式中,所述第二活性剂是突变c-kit的抑制剂。

[0066] 在本文的各种实施方式中,所述组合物是MEK激酶降解的增强剂。在其它的实施方式中,所述组合物是MEK-1和MEK-2激酶的caspase-3(半胱天冬酶-3)降解的介体。在另外的实施方式中,所述组合物是MEK-1和MEK-2激酶磷酸化的抑制剂,ERK-1和ERK-2激酶磷酸化的抑制剂或其组合。在其他的实施方式中,所述第二活性剂是mutant EGFR kinase(突变EGFR激酶)或tyrosine-protein kinase(酪氨酸蛋白激酶)的抑制剂。

[0067] 在另外其它的实施方式中,所述第二活性剂是osimertinib(奥西替尼), gefitinib(吉非替尼),erlotinib(厄洛替尼),afatinib(阿法替尼)或其组合。在各种其他实施方式中,所述第二活性剂是融合激酶的抑制剂,其中融合激酶是EML4-ALK或Bcr-Abl。

在其他各种实施方式中,融合激酶是EML4-ALK,第二活性剂是ceritinib(赛立替尼), crizotinib(克唑替尼), alectinib(艾乐替尼), brigatinib(布里加替尼)或其组合。在各种另外的实施方式中,所述融合激酶是Bcr-Abl,并且所述第二活性剂是imatinib(伊马替尼), dasatinib(达沙替尼), nilotinib(尼洛替尼), bosutinib(波舒替尼), ponatinib(帕纳替尼)或其组合。

[0068] 本文还提供了各种实施方式,其中a)载体包含水,缓冲液,糖,纤维素,环糊精,二甲亚砜,聚乙二醇,生育酚,脂质体,胶束或其组合,或b)赋形剂包含粘合剂,润滑剂,吸附剂,媒介物,崩解剂,防腐剂或其组合。

[0069] 在各种其他实施方式中,PAC-1的浓度为约0.1 μ M至约50 μ M。在另外的实施方式中,PAC-1的浓度为约0.1 μ M至约5 μ M,约1 μ M至约10 μ M,约2 μ M至约15 μ M,约3 μ M至约20 μ M,约4 μ M至约25 μ M,约5 μ M至约30 μ M,约10 μ M至约40 μ M,约15 μ M至约50 μ M,约20 μ M至约75 μ M,约25 μ M至约100 μ M,约50 μ M至约100 μ M,或约0.1nM至约5 μ M。

[0070] 在其他实施方式中,所述第二活性剂的浓度为约1nM至约100 μ M。在一些另外的实施方式中,所述第二活性剂的浓度为约0.1nM至约100 μ M,约0.5nM至约0.5 μ M,约0.5nM至约1 μ M,约1nM至约10 μ M,1nM至约20 μ M,约10nM至约50 μ M,约0.1 μ M至约10 μ M,约0.1 μ M至约20 μ M,约1 μ M至约30 μ M,约10 μ M至约50 μ M,约10 μ M至约75 μ M,或约15 μ M至约100 μ M。

[0071] 本文提供了抑制癌细胞生长或增殖的方法的各种实施方式,所述方法包括使癌细胞与有效量的任何一种所公开组合物接触,从而抑制癌细胞的生长或增殖。还有多种诱导癌细胞凋亡的方法的实施方式,所述方法包括使癌细胞与有效量的任何一种所公开的组合物接触,从而诱导癌细胞中的细胞凋亡。

[0072] 本文公开了治疗癌症的方法的各种实施方式,所述方法包括同时或依次向需要治疗的患者施用治疗有效量的化合物PAC-1和有效量的第二活性剂,其中所述第二活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;其中癌症由此被治疗。

[0073] 在各种实施方式中,第二活性剂是突变EGFR激酶的抑制剂,突变c-kit的抑制剂,EML4-ALK融合激酶的抑制剂或Bcr-Abl融合激酶的抑制剂,其中所述突变EGFR激酶任选具有T790M突变。在其他实施方式中,促凋亡Bcl-2蛋白(BIM)被上调。

[0074] 在另外的实施方式中,通过降解或消除MEK-1和MEK-2激酶来治疗癌症,从而通过抑制MEK-1和MEK-2,ERK-1和ERK-2,或其组合的磷酸化来有效抑制MAPK信号传导途径并诱导癌细胞中的凋亡。在本文的其他另外的实施方式中,所述癌症是黑色素瘤,白血病,胃癌,肾癌,肺癌,脑癌或其转移形式。在本文的其他实施方式中,所述第二活性剂是osimertinib(奥西替尼), gefitinib(吉非替尼), erlotinib(厄洛替尼), afatinib(阿法替尼), ceritinib(赛立替尼), crizotinib(克唑替尼), alectinib(艾乐替尼), brigatinib(布里加替尼), dasatinib(达沙替尼), nilotinib(尼洛替尼), bosutinib(波舒替尼), ponatinib(帕纳替尼), trametinib(曲美替尼), cobimetinib(考比替尼), binimetinib(比尼替尼)或imatinib(伊马替尼),其中减少、延迟或消除对需要治疗的患者的癌症治疗的抗性。

[0075] 在各种另外的实施方式中,PAC-1与osimertinib,ceritinib或imatinib在体外或体内协同作用,其中:

[0076] a) PAC-1的浓度为约2 μ M至约5 μ M,所述第二活性剂为osimertinib,其浓度为约1nM至约30nM;

[0077] b) PAC-1的浓度为约2 μ M至约5 μ M,所述第二种活性剂为ceritinib,其浓度为约5nM至约30nM;或

[0078] c) PAC-1的浓度为约5 μ M至约7.5 μ M,所述第二种活性剂为imatinib,其浓度为约60nM至约100nM。

[0079] 在各种实施方式中,如本领域技术人员将容易认识到的,本文所述的PAC-1和第二种活性剂的浓度也可以被叙述并解释为PAC-1与第二活性剂的比例,例如通过将本文所述的浓度转化为其相应的PAC-1与第二活性剂的摩尔比。

[0080] 在各种其他实施方式中,化合物PAC-1和所述第二种活性剂被同时施用于癌症患者。在其他实施方式中,化合物PAC-1和所述第二种活性剂被依次施用于癌症患者。在一些其他实施方式中,化合物PAC-1在所述第二种活性剂之前施用于癌症患者。在还有一些实施方式中,化合物PAC-1在所述第二种活性剂之后施用于癌症患者。

[0081] 在各种实施方式中,所述方法进一步包括向患者同时或依次施用治疗有效量的MEK抑制剂,V600E突变的BRAF激酶抑制剂或其组合。在另外的实施方式中,MEK抑制剂是trametinib(曲美替尼),cobimetinib(考比替尼),binimetinib(比尼替尼)或其组合。在另外的实施方式中,突变的BRAF激酶抑制剂是vemurafenib(威罗非尼),dabrafenib(达拉非尼),encorafenib(恩可拉菲尼)或其组合。

[0082] 本文提供了使用组合物制备用于治疗癌症的药物的各种实施方式,所述组合物包括:

[0083] (a) 化合物PAC-1;

[0084] (b) 至少一种第二活性剂,其中所述第二种活性剂是突变激酶的抑制剂或融合激酶的抑制剂;及

[0085] (c) 任选的,药学上可接受的稀释剂,赋形剂,载体或其组合;

[0086] 其中所述组合物是MEK激酶降解的增强剂。

[0087] 在贯穿本文的各种实施方式中,所述癌症是黑色素瘤,白血病,胃癌,肾癌,肺癌,脑癌或其转移形式。

[0088] 本文内容提供了范围、极限和变量偏差,例如体积,质量,百分比,比率等。本领域技术人员应当理解,诸如“数字1”至“数字2”的范围意味着连续的包括整数和小数的数字的范围。例如,1到10表示1,2,3,4,5, ..., 9,10。它还表示1.0,1.1,1.2,1.3, ..., 9.8,9.9,10.0,也表示1.01,1.02,1.03,依此类推。如果所公开的变量是小于“数字10”的数字,则这意味着包括整数和小于数字10的分数的连续范围,如上所述。类似地,如果公开的变量是大于“数字10”的数字,则表示包含整数和大于数字10的分数的连续范围。这些范围可以由术语“约”修饰,其含义已在上面描述。

[0089] 结果

[0090] 用PAC-1和多种激酶抑制剂处理的细胞中Caspase-3活性显著增强

[0091] 如图1A和1B所示,PAC-1在由osimertinib处理的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞株H1975(EGFR^{L858R+T790M})和PC-9GR(EGFR^{ex19del+T790M})中的caspase-3activity(半胱天冬酶-3活性)显著提高。当用所述组合物处理时,在两种细胞系中也观察到增加的PARP-1裂解和procaspase-3(前体半胱天冬酶-3)带消失(图1A和1B)。在用PAC-1和ceritinib共同处理的H3122 NSCLC细胞(带有EML4-ALK融合)中(图1C),以及用PAC-1和imatinib处理的K-562慢

性骨髓性白血病 (CML) 细胞 (带有BCR-ABL融合) 中也观察到了类似的效果 (图1D)。使用双向ANOVA测试确定在较长时间点观察到caspase-3活性增强 (图1) 具有协同作用。由于caspase-3活性增加, 用PAC-1和osimertinib/ceritinib/imatinib联合治疗的细胞明显大量死亡 (图6A-C)。这些结果共同表明, 除了一般的细胞毒素和针对BRFV^{600E}的抑制剂外, PAC-1还能够广泛增强靶向EGFR^{T790M}, EML4-ALK和BCR-ABL的激酶抑制剂的caspase-3活性。

[0092] Caspase-3活性导致MEK激酶的降解

[0093] 诸如caspase-3的执行型半胱天冬酶 (executioner caspases) 的激活导致细胞中数百种蛋白质的裂解。有趣的是, caspase-3的蛋白质底物倾向于在控制细胞命运和存活的蛋白质复合物或信号通路中发现。Wells (Mahrus, et al., Cell 2008, 134, 866) 和Cravatt (Dix, et al., Cell 2008, 134, 679) 的实验室对caspase-3底物的全蛋白质组鉴定独立地表明, 在caspase-3介导的凋亡过程中MEK1和MEK2激酶都被裂解。此外, 以前也已经证明, MEK1和MEK2是使ERK1/2磷酸化的仅有激酶, 是ERK1/2活性的关键控制者。鉴于观察到将PAC-1加入多种激酶抑制剂会导致增强的细胞凋亡, 从而形成一种假设, 即caspase-3活性的急剧增加导致MEK1和MEK2降解, 从而抑制了下游促活信号。

[0094] 为了研究这种假设, 在用PAC-1+vemurafenib或trametinib+vemurafenib处理后, 探查了BRFV^{600E}细胞系中MEK1和MEK2激酶的水平。在用PAC-1+vemurafenib处理48h的A375细胞和SK-MEL-5细胞中, 都观察到procaspase-3, MEK1和MEK2水平的显著降低, 表明procaspase-3激活导致MEK1和MEK2降解 (图2A)。相反, 当用trametinib和vemurafenib处理这两种细胞系时, 未检测到procaspase-3, MEK1和MEK2水平的可观察到的变化 (图2A)。值得注意, MEK1/2裂解产物是短暂稳定的 (Dix et al., 2008), 从而对其在经过48h的处理后进行检测是具有挑战性的。

[0095] 为了研究这些结果的普遍性, 在用PAC-1和针对这些改变的激酶抑制剂进行联合治疗后, 评估了EGFR^{T790M}, EML4-ALK和BCR-ABL细胞中procaspase-3, MEK1和MEK2水平的变化。在H1975和PC-9GR细胞中, 用PAC-1和osimertinib (4nM) 处理均导致procaspase-3, MEK1和MEK2水平显著降低, 但是当使用非活性抑制剂gefitinib时 (图7A) 却没有 (图2B)。使用较低浓度的osimertinib (2.5nM) 也导致MEK1和MEK2激酶降解 (图7B)。重要的是, 与trametinib和osimertinib共同处理不会导致两种细胞系中的MEK1和MEK2水平降低 (图2B), 与在BRFV^{600E}细胞系中观察到的相似。当它们与PAC-1+ceritinib共同处理时, 即使在降低的ceritinib浓度下 (图7C), MEK1和MEK2也被观察到在H3122细胞中的降解。与trametinib和ceritinib共同治疗并未导致H3122细胞中MEK1和MEK2水平降低 (图2C), 这与在BRFV^{600E}和EGFR^{T790M}细胞中获得的数据一致。在用PAC-1+imatinib或trametinib+imatinib处理的K-562细胞中观察到大量的procaspase-3活化, 并且在两者的样品中也观察到MEK1和MEK2激酶的降解 (图7D)。改变imatinib的浓度也会引起MEK1和MEK2水平降低 (图7E)。

[0096] 为了进一步了解caspase-3活性在介导PAC-1/药物组合处理中观察到的协同细胞死亡中的重要性, 使用了Q-VD-OPh, 一种普通的caspase抑制剂。在这些实验中, 当将Q-VD-OPh同时添加到用PAC-1/药物组合处理的细胞中时, 均观察到了对凋亡细胞死亡的保护 (图8A-D) 和减弱的MEK1/2裂解 (图8E-G)。这些结果表明, 抑制caspase-3活性, 特别是抑制其裂解MEK1和MEK2激酶的活性, 足以消除在用PAC-1/药物组合处理的细胞中观察到的显著协同

作用。结合来看,公开的结果表明caspase-3诱导的MEK1/2裂解在介导协同凋亡细胞死亡中的重要性,以及该观察在各种癌症类型中的普遍性。

[0097] MEK1和MEK2激酶的降解导致对MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制

[0098] ERK1/2磷酸化的显著抑制(>80%)对于诸如vemurafenib的靶向激酶抑制剂的临床疗效来说是必需的。由于在抗药性肿瘤中通常观察到ERK1/2磷酸化的重新激活,因此在治疗方案中添加了MEK1/2抑制剂以实现持续的ERK1/2抑制。尽管临床获准的MEK1/2抑制剂可有效预防ERK1/2磷酸化,但对ERK1/2活性的抑制会干扰RAF的负反馈,从而导致RAF过度活化和MEK1/2的过度磷酸化。MEK1/2磷酸化的反弹随后导致通路重新激活。开发“反馈克星”MEK1/2抑制剂,例如trametinib,旨在减轻反弹,但这种作用是短暂的。因此,尽管有许多MEK1/2抑制剂,但持续抑制MEK1/2和ERK1/2仍然具有挑战性。

[0099] 鉴于增强的caspase-3活性导致MEK1/2激酶降解,提出了一个假设,即PAC-1组合疗法将导致MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。向vemurafenib中添加PAC-1可导致A375细胞(图3A和3B)和SK-MEL-5细胞(图3A)中ERK1/2磷酸化的抑制,这与以前的工作一致。尽管当用vemurafenib+PAC-1处理细胞时观察到,由于MEK1和MEK2激酶的降解,MEK1/2磷酸化的持续抑制作用,但在trametinib+vemurafenib处理的细胞中迅速观察到MEK1/2磷酸化的显著反弹(图3B)。这些观察与先前的报告一致,其详述了trametinib在抑制突变型BRAF黑色素瘤细胞中MEK1/2磷酸化的短暂(6h)作用。这些结果表明,药物诱导的MEK1和MEK2激酶降解作为抑制MEK1/2和ERK1/2活性有效策略的独特优势。

[0100] 为了探讨这种效应的普遍性,H1975和PC-9GR细胞分别用PAC-1和osimertinib处理,并探测ERK1/2和MEK1/2磷酸化的变化。如图3C和3D所示,由于MEK1和MEK2降解,用PAC-1和osimertinib处理的EGFR^{T790M}细胞导致ERK1/2和MEK1/2磷酸化的持续丧失。使用PAC-1和gefitinib,未观察到ERK1/2或MEK1/2磷酸化的相应降低(图3C),这表明osimertinib的作用对EGFR^{T790M}靶点具有特异性。在较低浓度的osimertinib下,还观察到MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制(图9A),对应于MEK1和MEK2激酶的降解(图7B)。类似地,在用osimertinib和trametinib处理的24h内,MEK1/2磷酸化迅速反弹,但在用osimertinib和PAC-1处理的细胞中却没有(图3D),这与在BRAF^{V600E}细胞中观察到的效果相似。

[0101] 以类似的方式,H3122细胞(EML4-ALK)用PAC-1+ceritinib或trametinib+ceritinib处理,并探测ERK1/2和MEK1/2磷酸化的变化。在这种情况下,H3122细胞用PAC-1+ceritinib共同处理48h也导致ERK1/2和MEK1/2磷酸化水平持续降低(图9B和图9D),这可归因于caspase-3介导的MEK1和MEK2激酶降解。当与PAC-1组合使用时,即使更低浓度的ceritinib,由于MEK1和MEK2激酶的降解(图7C),也会持续抑制MEK1/2和ERK1/2磷酸化(图9C)。同样,在用trametinib和ceritinib处理的H3122细胞中也观察到MEK1/2磷酸化的短暂抑制(图9D),与在BRAF^{V600E}和EGFR^{T790M}细胞中观察到的结果一致。

[0102] 最后,在表达BCR-ABL的K-562细胞中,由于MEK1和MEK2激酶的大量降解(图7D),与PAC-1和imatinib的共同处理还导致ERK1/2和MEK1/2磷酸化的持续抑制(图9E)。应当指出,在用trametinib+imatinib处理48h的细胞中未观察到MEK1/2磷酸化的反弹(图9E),因为在所述细胞系中也观察到了MEK1和MEK2激酶的降解(图7D)。类似地,由于MEK1和MEK2的降解(图7E),使用不同浓度的imatinib也会导致磷酸-MEK1/2和磷酸-ERK1/2水平降低(图9F)。总体而言,所公开的结果证明了PAC-1与多种激酶抑制剂联合使用能够持续抑制ERK1/2和

MEK1/2磷酸化的能力,这种结果在这些靶向激酶抑制剂与MEK1/2抑制剂trametinib组合的情形通常未被观察到。PAC-1+vemurafenib在消除获得抗性方面比trametinib+vemurafenib更有效

[0103] 认识道在对BRAFi+MEKi耐药的黑色素瘤中通常会发现MEK激酶的继发性激活突变,因此提出了一个假设,即PAC-1+vemurafenib在延缓A375细胞的获得抗性方面比trametinib+vemurafenib更有效。所述假设的基本原理是PAC-1+vemurafenib会明显增加凋亡细胞的死亡,从而导致MEK激酶降解,从而进一步抑制ERK1/2磷酸化。为了验证这一假设,将A375细胞用PAC-1, vemurafenib, trametinib及其各自的组合处理了30天。与先前的工作一致,早在治疗后20天,在用单药vemurafenib处理的A375细胞中就明显存在抗性菌落(图4A和4B)。在用trametinib+vemurafenib处理的细胞中,连续治疗25天后首次发现抗性菌落。治疗30天后,在用trametinib和vemurafenib处理的A375细胞中可见更多的抗性菌落,表明存在BRAFi+MEKi抗性(图4A和4B)。但是,治疗30天后,在存在或不存在trametinib的情况下,用PAC-1和vemurafenib处理的A375细胞中未观察到抗性菌落的出现(图4A和4B),表明PAC-1的双重或三重组合,与临床使用的BRAFi+MEKi组合相比,在消除vemurafenib获得抗性方面更为有效。

[0104] PAC-1和osimertinib/ceritinib的组合可有效消除EGFR^{T790M}和EML4-ALK细胞的获得抗性

[0105] 对PAC-1和osimertinib的组合延迟EGFR^{T790M}细胞获得抗性的能力进行了研究。在这种情况下,将H1975和PC-9GR细胞用指定浓度的PAC-1和/或osimertinib处理长达28天。在两种细胞系中,与DMSO处理的样品相比,单药PAC-1(2 μ M)处理8天的细胞毒性作用最小。另一方面,单药osimertinib(30nM)以及PAC-1和osimertinib的组合都非常有效地抑制细胞增殖(图10)。药物治疗28天后,与用PAC-1和osimertinib处理的细胞相比,在仅用osimertinib处理的PC-9GR和H1975细胞中清晰可见抗性菌落(图10)。这些结果表明,PAC-1和osimertinib的组合可有效地显著延迟或消除EGFR^{T790M}细胞系中osimertinib抗性的发作。然后进行实验以比较PAC-1+osimertinib组合与trametinib+osimertinib在PC-9GR细胞中延缓抗性的作用。在这种情况下,治疗8天后,与DMSO处理的细胞相比,作为单剂的PAC-1或trametinib(5nM)具有最小的细胞毒性作用。如预期的那样,用osimertinib, PAC-1+osimertinib或trametinib+osimertinib处理8天可有效抑制细胞增殖。与图10A一致,用单剂osimertinib处理28天后,在PC-9GR细胞中可见抗性菌落,而在用PAC-1和osimertinib处理的细胞中则看不到(图4C和4D)。在28天后,在用trametinib和osimertinib处理的细胞中也未观察到抗性菌落。然而在处理35天后,单药osimertinib处理的细胞中存在的抗性菌落数量急剧增加,而用PAC-1+osimertinib或trametinib+osimertinib处理的细胞中未观察到抗性菌落(图4C和4D)。这些观察结果表明,PAC-1+osimertinib的组合是同等效的,但在延缓抗性方面不比trametinib+osimertinib更有效。

[0106] 最后,研究了PAC-1+ceritinib延缓EML4-ALK细胞中获得抗性的能力。在这此, H3122细胞用指定浓度的PAC-1, trametinib, ceritinib或相应的组合处理了长达32天。处理8天后,与DMSO处理的样品相比,单药PAC-1(2 μ M)或trametinib(5nM)处理具有最小的细胞毒性作用。用ceritinib, PAC-1+ceritinib或trametinib+ceritinib处理8天可有效抑制细胞增殖(图4E)。用单药ceritinib处理20天后,在H3122细胞中可见抗性菌落,而在用PAC-

1和osimertinib或trametinib和ceritinib处理的细胞中看不到抗性菌落(图4E)。处理32天后,单药ceritinib处理的细胞中存在的抗性菌落数量急剧增加,但用PAC-1+ceritinib处理的细胞中几乎观察不到抗性菌落(图4E)。在用trametinib+ceritinib处理的细胞中,许多抗性菌落清晰可见,表明存在ALKi+MEKi抗性H3122细胞(图4E和4F)。

[0107] 总之,靶向BRAF^{V600E}, EGFR^{T790M}, EML4-ALK和BCR-ABL的激酶抑制剂与PAC-1的组合可增强procaspase-3的活化以及MEK1和MEK2激酶的降解(图5)。MEK激酶的降解,然后,导致对MEK1/2和ERK1/2信号的持续抑制。在PAC-1联合疗法中观察到,增加的凋亡细胞死亡和持续的MAPK途径的抑制的组合效果协同作用,可显著延迟或消除抗性。

[0108] 讨论

[0109] 在了解针对靶向激酶抑制剂的抗性机制方面已取得重大进展。这种了解已转化为针对BRAF^{V600E}黑色素瘤的联合疗法,以及对于突变EGFR和融合EML4-ALK和BCR-ABL激酶的新一代抑制剂。可惜的是,癌细胞通过替代的抗性机制迅速回避了这些新一代抑制剂的抑制作用,因此有必要开发新型药物来对抗性肿瘤。而且,尚无法解释药物引起的抗性的很大一部分,这意味着更新的药物仅会使少数具有分子确定的抗性机制的患者受益。

[0110] 公开的结果表明,在临床相关浓度下procaspase-3激活剂PAC-1与多种靶向激酶抑制剂的共同处理(见表2,每种激酶抑制剂对MEK1/2磷酸化和caspase活性的预报效果)在多种肿瘤组织学和驱动突变中能够广泛有效增强caspase-3活性和凋亡细胞死亡。所产生的caspase-3活性导致MEK1和MEK2激酶的酶性降解以及对MEK1/2和ERK1/2磷酸化的持续抑制。尽管使用MEK1/2抑制剂可以实现对ERK1/2的持续抑制,但这会干扰RAF激酶的负反馈,从而导致MEK1/2的反常磷酸化。曲美替尼(trametinib)被开发为“反馈克星”以尽量减少MEK1/2过度磷酸化,但抑制作用如前所示是相对短暂的,并且与公开的结果一致(图3)。相反,本文表明,caspase-3介导的MEK1和MEK2激酶的降解是灭活ERK1/2的极好的策略,而没有相应的MEK1/2磷酸化反弹。通过MEK1和MEK2的基因组敲除观察到的ERK1/2磷酸化的消除支持了所公开的结果。由于MEK1/2激酶在调节MAPK途径中起关键作用,因此它的持续抑制在显著延迟获得抗性的发作方面是有利的。

[0111] 与使用PAC-1直接激活procaspase-3相比,使用诸如doxorubicin(多柔比星)的一般细胞毒素的非特异性诱导凋亡可能由于这些试剂诱导的细胞应激而导致ERK1/2过度激活。这种观察结果强调了使用直接procaspase-3激活剂,而不是一般的细胞毒素,与靶向激酶抑制剂相结合的重要性,以避免ERK1/2磷酸化的反常激活。

[0112] 公开的结果还表明,添加1-2 μ M的PAC-1(在人类患者中很容易达到的浓度)可有效延迟在BRAF^{V600E}黑色素瘤,EGFR^{T790M}和EML4-ALK NSCLC中对vemurafenib,osimertinib和ceritinib的获得抗性。此外,与MEK1/2抑制(用trametinib)与靶向激酶抑制剂的组合相比,PAC-1与靶向激酶抑制剂的组合在显著延迟或消除获得抗性方面具有明显优势。有两种机制可能解释这一现象。其一,在PAC-1联合疗法处理的细胞中观察到的凋亡增强可能会阻止抗性菌落的出现,因为绝大多数癌细胞被杀死了。其次,持续的MEK1/2和ERK1/2抑制作用严重降低了细胞增殖和形成抗性菌落的能力。

[0113] 靶向激酶抑制剂对癌症的治疗产生了巨大影响,但抗性严重限制了这种作用的持久性。在本文公开的工作中,不是针对每种抗性机理开发新药,而是确定了一种潜在的普遍性策略,以消除或显著延迟对靶向抗癌疗法的抗性,并已成功证明了其在BRAF^{V600E},

EGFR^{T790M}和EML4-ALK激酶驱动的癌症中的功效。鉴于PAC-1目前正在临床试验中进行评估(NCT02355535, NCT03332355), 并且本研究中使用的激酶抑制剂已经获得FDA的批准, 本文提供的临床前数据结果可以为可延迟或消除抗性的PAC-1组合疗法研究中的后续试验设计提供信息。

[0114] 药物制剂

[0115] 本文所述的化合物可用于制备治疗性药物组合, 例如, 通过将所述化合物与药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体组合。所述化合物可以以盐或溶剂合物的形式加入到载体中。例如, 在化合物具有足够碱性或酸性以形成稳定的无毒酸或碱盐的情况下, 以盐形式施用所述化合物可能是合适的。药学上可接受的盐的实例为与形成生理学上可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐, 例如甲苯磺酸盐, 甲磺酸盐, 乙酸盐, 柠檬酸盐, 丙二酸盐, 酒石酸盐, 琥珀酸盐, 苯甲酸盐, 抗坏血酸盐, α -酮戊二酸盐和 β -甘油磷酸盐。也可以形成合适的无机盐, 包括盐酸盐, 卤化物, 硫酸盐, 硝酸盐, 碳酸氢盐和碳酸盐。

[0116] 药学上可接受的盐可以使用本领域公知的标准方法获得, 例如通过使足够碱性的化合物例如胺与合适的酸反应以提供生理上可接受的离子化合物。羧酸的碱金属(例如钠, 钾或锂)或碱土金属(例如钙)的盐也可以用类似的方法制备。

[0117] 本文所述式的化合物可以配制成药物组合并以多种形式施用于哺乳动物宿主, 例如人类患者。所述形式可以特别适合于选择的给药途径, 例如口服或者通过静脉内、肌肉内、局部或皮下途径的肠胃外给药。

[0118] 本文所述的化合物可以与药学上可接受的载体(例如惰性稀释剂或可吸收的可食用载体)一起全身给药。对于口服给药, 可将化合物封装在硬的或软壳胶囊中, 压成片剂, 或直接掺入患者饮食的食物中。所述化合物还可以与一种或多种赋形剂组合, 并以可消化片剂, 口腔片剂, 锭剂, 胶囊剂, 酏剂, 混悬剂, 糖浆剂, 糯米纸囊剂等的形式使用。这样的组合物和制剂通常含有至少0.1%的活性化合物。组合物和制剂的百分比可以变化, 并且可以方便地为设定单位剂型重量的约0.5%至约60%, 约1%至约25%或约2%至约10%。这种治疗上有用的组合物中的活性化合物的量可以是使得达到有效剂量水平。

[0119] 片剂, 锭剂, 丸剂, 胶囊剂等也可以含有一种或多种以下物质: 粘合剂, 如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶; 赋形剂, 如磷酸二钙; 崩解剂, 如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等; 以及润滑剂, 如硬脂酸镁。可以添加甜味剂, 如蔗糖、果糖、乳糖或阿斯巴甜; 或调味剂, 如薄荷、冬青油或樱桃调味料。当单位剂型是胶囊时, 除了上述类型的材料之外, 它还可以含有液体载体, 例如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可作为包衣或以其他方式改变固态单位剂型的物理形式。例如, 片剂、丸剂或胶囊剂可以包覆有明胶、蜡、虫胶或糖等。糖浆或酏剂可含有活性化合物, 作为甜味剂的蔗糖或果糖, 作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯, 染料和诸如樱桃或橙调味料的调味剂。用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药学上可接受的, 并且在所述用量上基本上无毒。另外, 可将活性化合物掺入缓释制剂和装置中。

[0120] 所述活性化合物可通过输液或注射经静脉内或腹膜内给药。所述活性化合物或其盐的溶液可以在水中制备, 可选择地与无毒表面活性剂混合。分散体可以在甘油、液体聚乙二醇、甘油三乙酸酯或其混合物中或在药学上可接受的油中制备。在普通的储存和使用条件下, 制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0121] 适用于注射或输注的药物剂型可以包括无菌水溶液、分散体或无菌粉末,其包含适合即时制备无菌可注射或输注溶液或分散体的活性成分,可选择地包封在脂质体中。最终的剂型应该是无菌的、流体的以及在制造和储存的条件下稳定的。液体载体或赋形剂可以是溶剂或液态分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒甘油酯和其合适的混合物。例如,适合的流动性能可以通过形成脂质体,通过在分散体的情况下维持所需的粒度,或通过使用表面活性剂来维持。对微生物作用的防止可以通过各种抗菌剂和/或抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,优选地可以包括等渗剂,例如糖、缓冲剂或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过使用延缓吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和/或明胶。

[0122] 无菌可注射溶液的制备可以是通过将所需量的活性化合物与上文列举的各种其它成分(如果需要)合并适当的溶剂中,并且根据需要可选择地随后过滤除菌来进行。在采用制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法可以包括真空干燥和冷冻干燥技术,其形成活性成分加上在溶液中需要的任何额外成分的粉末。

[0123] 对于局部给药,化合物可以以纯的形式施用,例如当它们是液体时。然而,通常需要将活性剂以组合物或制剂的形式施用到皮肤,例如,结合皮肤病学上可接受的载体,其可以是固体,液体或凝胶等。

[0124] 可用的固体载体包括细碎的固体,如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等。可用的液体载体包括水、二甲基亚砜(DMSO)、醇、二醇或水-醇/二醇混合物,其中化合物能够以有效的浓度溶解或分散,可选择地借助于无毒的表面活性剂。辅助剂如香料和其他抗微生物剂也可添加用以针对给定用途进行性能优化。所得的液体组合物可以从吸收垫施用,用于浸渍绷带和其它敷料,或者使用泵式或气溶胶喷雾器喷射到患处。

[0125] 增稠剂,例如合成聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或改性矿物材料,也可与液体载体一起使用,形成可涂抹的糊剂,凝胶,软膏,肥皂等,直接涂在使用者的皮肤上。

[0126] 用于将活性剂递送至皮肤的皮肤病学组合物的实例是本领域已知的;例如,参见 U.S. Patent Nos. 4,992,478 (Geria), 4,820,508 (Wortzman), 4,608,392 (Jacquet et al.), and 4,559,157 (Smith et al.)。这种皮肤病学组合物可以与本文描述的化合物组合使用,其中这种组合物的成分可以任选地被本文所述的化合物代替,或者可以将本文所述的化合物添加到这种组合物中。

[0127] 本文所述活性剂的有用剂量可通过比较其体外活性和动物模型中的体内活性来确定。用于将小鼠和其它动物中的有效剂量外推至人类的方法是本领域已知的;例如参见美国专利4,938,949 (Borch et al.)。用于治疗所需的化合物或其活性盐或衍生物的量将不仅随着所选择的具体化合物或盐而变化,而且随着给药途径,被治疗的病症的性质以及患者的年龄和状况,最终由门诊医师或临床医师决定。

[0128] 然而,通常活性剂的合适剂量可为约0.5至约100mg/kg,例如约10至约75mg/kg体重每天,例如约3至约50mg每天每公斤接受者体重,优选6至90mg/kg/天,最优选15至60mg/kg/天。

[0129] 所述化合物可以方便地配制成单位剂量形式;例如每单位剂量含有活性成分5mg至1000mg,方便地10mg至750mg,最方便地50mg至500mg。在一个实施例中,本发明提供了包

含以这种单位剂型配制的本发明化合物的组合物。

[0130] 所述化合物能够方便地用作单位剂型,例如每单位剂型含有活性成分5to 1000mg/m²,方便地10to 750mg/m²,更方便地50to 500mg/m²。所需剂量可以方便地提供为单剂量或以适当间隔施用的分剂量,例如每天两、三、四或更多个亚剂量。所述亚剂量本身还可以进一步分为例如多个单独松散间隔的给药。

[0131] 本发明提供了治疗哺乳动物中癌症的治疗方法,其涉及向具有癌症的哺乳动物施用有效量的本文所述的化合物或组合物。所述哺乳动物包括灵长类动物,人类,啮齿动物,犬科动物,猫科动物,牛科动物,绵羊科动物,马科动物,猪科动物,山羊,牛等。所述癌症是指任何不同类型的恶性肿瘤,例如结肠癌,乳腺癌,黑色素瘤,或白血病,并且通常具有的特征为非期望的细胞增殖,例如失控生长,缺乏差异化,局部组织侵袭和转移。

[0132] 组合物治疗癌症的能力可以通过使用本领域公知的测试方法来确定。例如,已知的治疗方案的设计,毒性评估,数据分析,肿瘤细胞杀伤的定量以及使用可移植的肿瘤筛选的生物学意义。

[0133] 以下实施例是用来对上述发明内容进行说明,而不应被解释为缩小发明的范围。本领域技术人员应很容易的认识到所述实施例能够提示本发明可以通过很多其他方法来实施。应当理解,在本发明的范围内可以进行很多的变化和修改。

实施例

[0134] 实施例1.方法和材料(表1)。

[0135] 实验模型和受试者情况

[0136] A375,K-562和SK-MEL-5从ATCC获得。PC-9GR,H1975和H3122由Eric Haura教授(Moffitt Cancer Center)提供。PC-9GR,H1975和H3122在补充有10%FBS(Gemini)的RPMI 1640中培养。A375和SK-MEL-5在IMDM+10%FBS中培养。K-562在IMDM+10%FBS中培养。所有细胞均在37°C,5%CO₂下培养。人细胞系的性别:A375(女,54岁),K-562(女,53岁),SK-MEL-5(女,24岁),H3122(女,年龄未知),H1975(女,年龄未知),PC-9GR(女性,年龄未知)。

[0137] 表1.关键资源

[0138]

试剂 或资源	来源	标号
抗体		
Beta-Actin HRP (β -肌动蛋白 HRP)	Cell Signaling Technology	Product # 5125
Caspase-3 (全长) (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 9662
PARP-1 (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 9532
MEK1 (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 9146
MEK2 (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 9147
p-MEK1/2 (Ser217/Ser221) (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 9121
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 4370
Total ERK1/2 (兔子)	Cell Signaling Technology	Product # 4695
Annexin V-FITC	Southern Biotechnology	Cat # 10040-02
IgG (兔子) HRP	Cell Signaling Technology	Product # 7074
化学品, 肽类以及重组蛋白		
PAC-1	Putt, et al., 2006	N/A
Raptinal	Palchaudhuri, et al., 2015	N/A
Vemurafenib	LC Laboratories	Cat # V-2800
Gefitinib	Cayman Chemicals	Cat # 13166
Osimertinib	MedChem Express	Cat # HY-15772
Ceritinib	MedChem Express	Cat # HY-15656
Imatinib	MedChem Express	Cat # HY-15463
Trametinib	MedChem Express	Cat # HY-10999
BSA	Research Products International Corp.	Cat # A30075-100.0
SulforhodamineB (磺基罗丹明 B, SRB)	Sigma Aldrich	Cat # 230162
醋酸	Fisher Scientific	Cat # A38-212
碘化丙啶	Sigma Aldrich	Cat # 81845

Ac-DEVD-AFC	Cayman Chemicals	Cat # 14459
HEPES	Fisher Scientific	Cat # BP310-1
氯化钠	Fisher Scientific	Cat # S271-500
DTT	Sigma Aldrich	DTT-RO ROCHE
EDTA	Fisher Scientific	Cat # S311-100
Triton-X-100	Fisher Scientific	Cat # BP151-100
Q-VD-OPh	Cayman Chemical	Cat # 15260
RIPA Buffer	Cold Spring Harbor Protocols	doi:10.1101/pbd.recl0617
蛋白酶抑制剂混合物, 无 III EDTA	Calbiochem	Cat # 539134
磷酸酶抑制剂混合物 IV	BioVision	Cat # K282-1
SDS (Tris /甘氨酸) 缓冲剂 (10x)	BioRad	Cat # 161-0732
蔗糖	EMD Millipore	Cat # SX1075
Tris 碱	Fisher Scientific	Cat # BP152-500
氯化钠	Fisher Scientific	Cat # AC349610
关键商业分析		
皮尔斯 BCA 试剂 A/B	Thermo Fisher Scientific	Cat # 23225
实验模型: 细胞系		
A375	ATCC	Cat # CRL-1619
K-562	ATCC	Cat # CCL-243
PC-9 GR	Prof. Eric Haura, Moffitt Cancer Center	N/A
H3122	Prof. Eric Haura, Moffitt Cancer Center	N/A
H1975	Prof. Eric Haura, Moffitt Cancer Center	N/A
SK-MEL-5	ATCC	Cat # HTB-70
软件和算法		
ANOVA 2 Way T Test	OriginPro V10	https://www.originlab.com/
FCS Express V5	De Novo software	https://www.denovosoftware.com/
Two Way T-Test	Microsoft Excel 16.12	https://products.office.com/en-us/home
其他		
Mini-PROTEAN TGX Gels (4-20%)	BioRad	Cat # 456-1096
PDVF 膜	Millipore	Cat # IPVH00010
剥离缓冲液	Thermo Fisher	Cat # 21059
SuperSignal West Pico	Thermo Fisher	Cat # 34577
BD LSR II 流式细胞仪	BD Biosciences	n/a
GelDoc XR	BioRad	Cat # 1708195
ChemiDoc Touch	BioRad	Cat # 17001401
SpectraMax M3	Molecular Devices	Cat # M3

[0139]

[0140] 细胞系鉴定

[0141] 本研究所使用的全部人细胞系 (PC-9GR, H1975, SK-MEL-5, A375, K-562 和 H3122) 是采用 PowerPlex16HS Assay (Promega) 进行鉴定, 如先前所述 (Peh, et al., Mol. Cancer Ther., 2016, 15, 1859): 15 Autosomal Loci, X/Y at the University of Arizona Genetics Core (UAGC)。>100 万个细胞是使用细胞裂解缓冲液 (50mM Tris, 50mM EDTA, 25mM 蔗糖, 100mM NaCl, 1% SDS, pH 8) 进行收集并裂解。在 UAGC 对每个细胞系进行 DNA 提取和短串联重复序列 (STRs) 分析。将所得的常染色体 STR 谱图与参考数据库 (如 ATCC, DSMZ 和 JCRB)

进行比较。

[0142] 细胞活性测定

[0143] 在96孔板中的每个孔中接种1000个细胞,并使其粘附,然后再将osimertinib, gefitinib或PAC-1的DMSO溶液加到每个孔中。每个孔中的DMSO终浓度为0.5%。在5天结束时,通过磺基罗丹明B (sulforhodamine B, SRB) 测定法评估存活力。简而言之,在每个孔中加入100 μ L的10%三氯乙酸(TCA),并将板在4 $^{\circ}$ C下孵育至少1h。4 $^{\circ}$ C温育后,将板用水洗涤,并在室温下干燥至少1h。将100 μ L SRB染料(1%w/v)添加到每个孔中,并在室温下孵育30分钟。温育30分钟结束时,将板用1%乙酸溶液洗涤,并在室温下干燥。最后,向每个孔中添加200 μ L Tris溶液(pH>10)以溶解SRB染料。用SpectraMax M3酶标仪(Molecular Devices)在510nm处读取每个孔的吸光度。

[0144] Caspase-3/-7 (半胱天冬酶-3/-7) 活性测定

[0145] 对于EGFR^{T790M}细胞系,将4,000个细胞接种在96孔板的每个孔中,并使其粘附过夜。次日,添加指示浓度的PAC-1或osimertinib,并处理0、2、4、24、30、35、44和48h。将K-562细胞以每孔3,000个细胞的密度接种,并用指定浓度的PAC-1或imatinib处理0、2、4、24、48、68和72h。将H3122细胞以每孔4,000个细胞接种,并使其粘附过夜。然后将细胞用指定浓度的PAC-1或ceritinib处理0、2、4、24、44和48h。在整个实验过程中,将10 μ M raptinal用作阳性对照。在指定的孵育时间后,将细胞裂解,并通过添加双功能裂解和活性缓冲液(200mM HEPES, 400mM NaCl, 40mM DTT, 0.4mM EDTA, 1% Triton-X, pH 7.4)和50 μ M荧光Ac-DEVD-AFC底物(λ_{ex} =405nm, λ_{em} =505nm)评估半胱天冬酶-3/-7活性(caspase-3/-7 activity)。将板在SpectraMax M3 (Molecular Devices) 读板器中于37 $^{\circ}$ C预孵育30分钟,然后以3分钟的间隔阅读30分钟。对被个孔计算斜率,并在六次技术重复中求得平均值。将活性标准化为在测定中观察到的最大和最小活性。

[0146] 免疫印迹

[0147] 使用含有磷酸酶(BioVision)和蛋白酶抑制剂混合物(Calbiochem)的RIPA缓冲液裂解细胞。使用BCA测定法(Pierce)测定蛋白质浓度。将含有8-20 μ g蛋白质的细胞裂解液上样至4-20%梯度凝胶(BioRad)的每个泳道中,并进行SDS-PAGE操作。将蛋白质转移到PDVF膜(Millipore)上进行蛋白质印迹分析。用BSA封闭印迹一小时,然后与一抗孵育过夜(制造商建议的稀释度)。将二抗孵育一小时。在按照制造商的规定与SuperSignal West Pico Solution孵育后,用ChemiDoc Touch对印迹成像。

[0148] 流式细胞术评估细胞凋亡

[0149] 对于EGFR^{T790M}细胞系,将40,000个细胞接种在12孔板中,并使其粘附过夜。次日,添加指定浓度的PAC-1或osimertinib,并在37 $^{\circ}$ C下孵育48h。K-562细胞以30,000接种,并与PAC-1或imatinib孵育72h。在12孔板中,接种40,000个H3122细胞,并使其粘附过夜。次日,将它们与PAC-1或ceritinib孵育48h。在指定的温育期后,收获细胞并将其重悬于预先与Annexin V-FITC和PI染料混合的450 μ L冷缓冲液(10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, pH 7.4)。在BD Biosciences LSRII流式细胞仪上分析样品,并使用FSC Express Version5进行数据分析。

[0150] 通过流式细胞仪进行Q-VD-OPh保护

[0151] 将A375 (BRAF^{V600E}) 细胞以70,000个细胞/孔接种在12孔板中,并使其粘附过夜。次

日,添加指定浓度的,vemurafenib,trametinib和/或Q-VD-0Ph,并将细胞在37°C孵育48h。对于EGFR^{T790M}细胞系PC-9GR,将40,000个细胞接种在12孔板中,并使其粘附过夜。次日,添加指定浓度的PAC-1,osimertinib和Q-VD-0Ph,并在37°C孵育48h。在12孔板中,接种40,000个H3122细胞,并使其粘附过夜。次日,将它们与PAC-1,ceritinib和/或Q-VD-0Ph孵育48h。将K-562细胞以35,000个细胞/孔接种在12孔板中。次日,添加指定浓度的PAC-1,imatinib和/或Q-VD-0Ph,并将细胞在37°C孵育48h。在指定的温育期后,收获细胞并将其重悬于预先与Annexin V-FITC和PI染料混合的450 μ L冷缓冲液(10mM HEPES,140mM NaCl,2.5mM CaCl₂,pH 7.4)。在BD Biosciences LSRII流式细胞仪上分析样品,并使用FSC Express Version5进行数据分析。

[0152] BRAF^{V600E}细胞系的长期实验

[0153] 该测定如前所述进行。简要地,接种100-250个细胞并使其粘附过夜。次日,用指定浓度的PAC-1,vemurafenib或trametinib处理细胞10、20、25或30天。每3-4天添加新化合物来刷新培养基。在孵育期结束时,将细胞固定在10%的三氯乙酸中,用SRB染色,使用GelDoc XR (BioRad) 成像,并使用SpectraMax M3 (Molecular Devices) 酶标仪在510nm处读取吸光度。

[0154] EGFR^{T790M}细胞系的长期实验

[0155] 在12孔板中,将PC-9GR或H1975细胞以每孔2,000个细胞的速度接种,并使其粘附过夜。次日,将细胞用指定浓度的PAC-1或osimertinib处理8或28天。每3-4天用新化合物刷新培养基。为了比较PAC-1组合与trametinib组合的效果,将PC-9GR细胞以10,000个细胞/孔的密度接种在6孔板中,并粘附过夜。次日,将细胞用指定浓度的PAC-1,osimertinib或5nM trametinib处理8天、28天或35天。每3-4天用新化合物刷新培养基。孵育结束时,将细胞固定在10%的三氯乙酸中,用SRB染色,使用GelDoc XR成像,并使用SpectraMax M3 (Molecular Devices) 读板器在510nm处读取吸光度。

[0156] EML4-ALK细胞系的长期实验

[0157] 将H3122细胞以10,000个细胞/孔的密度接种在6个孔板中,并使其粘附过夜。次日,将细胞用指定浓度的PAC-1,osimertinib或5nM trametinib处理8天、20天或32天。每3-4天用新化合物刷新培养基。孵育结束时,将细胞固定在10%的三氯乙酸中,用SRB染色,使用GelDoc XR成像,并使用SpectraMax M3 (Molecular Devices) 读板器在510nm处读取吸光度。

[0158] 表2. 使半胱天冬酶磷酸化的激酶的分析,以及所示激酶抑制剂对这些半胱天冬酶和MEK1/2磷酸化作用的预期效果。与图1和图2相关。

磷酸化的 半胱天冬酶	激酶	磷酸化的 结果	% 抑制, 在指定浓度或 IC ₅₀ 值			
			威罗菲尼 (<i>Nature</i> 2010 , 467, 596- 599)	奥希替尼 (<i>Cancer Discov.</i> 2014 , 4, 1046-1061)	色瑞替尼 (<i>J. Med. Chem.</i> 2013 , 56, 5675- 5690)	伊马替尼 (<i>Genes Cells</i> 2013 , 18, 110- 122)
[0159]	MEK1 (MAP2K1)		< 10% 在 1 μ M	未报告	未报告	18% 在 1 μ M

[0160]

	MEK2 (MAP2K2)		< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	5.9% 在 1 μM
半胱天冬酶-2	DNA-PK	激活	未报告	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-2	CaMKII	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-2	PP1	压抑	未观测到	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-2	CK2	压抑	未观测到	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-3	PKCδ	增强	< 20% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-3	p38 MAPK (MAPK11)	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-3	PP2A	压抑	未观测到	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-8	ND	SHP1 结合	未观测到	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-8	Src	压抑	2.4 μM IC ₅₀	未报告	1694 nM IC ₅₀	5.3% 在 1 μM
半胱天冬酶-8	Fyn	压抑	< 20% 在 1 μM	未报告	未报告	29.6% 在 1 μM
半胱天冬酶-8	SHP1	压抑	未观测到	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-8	Lyn	压抑	未观测到	未报告	840 nM IC ₅₀ (<i>in vitro</i>), 2306 nM IC ₅₀ (Ba/F3 cells)	190 nM IC ₅₀
半胱天冬酶-8	SHP1	压抑	未观测到	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-8	p38 MAPK (MAPK11)	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-9	ERK1/2 (MAPK1)	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-9	CDK1	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	1.8% 在 1 μM
半胱天冬酶-9	DYRK1A	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	2.2% 在 1 μM
半胱天冬酶-9	p38 MAPK (MAPK11)	压抑	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-9	PP1α	压抑	未观测到	未报告	未报告	未报告
半胱天冬酶-9	PKCζ	压抑	< 20% 在 1 μM	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-9	c-Abl	增强	< 10% 在 1 μM	未报告	未报告	190 nM IC ₅₀
半胱天冬酶-9	PKA	无效果	未观测到	未报告	未报告	未观测到
半胱天冬酶-9	AKT	压抑	未观测到	未报告	>10 μM	3.2% 在 1 μM
半胱天冬酶-9	CK2	防止半胱天 冬酶-8 分裂	未观测到	未报告	未报告	未观测到

[0161] 量化和统计分析

[0162] 所述数据以平均值±平均的标准误差(s.e.m.)的方式呈现。使用Microsoft Excel,通过对对照组与实验组的双向t检验确定显著性水平。为了确定半胱天冬酶-3活性的增加是否具有协同作用,使用OriginPro (Version 10,Origin Lab)对DMSO、单试剂和组合

处理的样品进行了双向ANOVA分析。没有进行分析以确定数据是否符合此统计方法的假设。统计值,包括独立重复的数量和统计显著性,在图例中示出。

[0163] 实施例2. 药物剂型

[0164] 下述制剂描述了能够用于本文所述化合物组合(例如,PAC-1和第二活性剂)或其药学上可接受的盐或溶合物的治疗或预防性给药的代表性药物剂型(下文中称为“化合物X”,其可以是一种活性剂或两种活性剂的组合):

	<u>(i) 片剂 1</u>	<u>mg/片</u>
	'组合物 X'	100.0
	乳糖	77.5
[0165]	聚维酮	15.0
	交联羧甲基纤维素钠	12.0
	微晶纤维素	92.5
	硬脂酸镁	<u>3.0</u>
		300.0
	<u>(ii) 片剂 2</u>	<u>mg/片</u>
	'组合物 X'	20.0
[0166]	微晶纤维素	410.0
	淀粉	50.0
	羧基乙酸淀粉钠	15.0
	硬脂酸镁	<u>5.0</u>
		500.0
	<u>(iii) 囊剂</u>	<u>mg/囊</u>
	'组合物 X'	10.0
[0167]	胶态二氧化硅	1.5
	乳糖	465.5
	预胶化淀粉	120.0
	硬脂酸镁	<u>3.0</u>
		600.0
	<u>(iv) 注射剂 1 (1 mg/mL)</u>	<u>mg/mL</u>
	'组合物 X'	1.0
[0168]	磷酸二钠	12.0
	磷酸一钠	0.7
	氯化钠	4.5
	1.0 N 氢氧化钠溶液 (pH 调节至 7.0-7.5)	适量
	注射用水	适量加至 1 mL
	<u>(v) 注射剂 2 (10 mg/mL)</u>	<u>mg/mL</u>
	'组合物 X'	10.0
[0169]	磷酸一钠	0.3
	磷酸二钠	1.1
	聚乙二醇 400	200.0
	0.1 N 氢氧化钠溶液 (pH 调节至 7.0-7.5)	适量
	注射用水	适量加至 1 mL

	<u>(vi) 气雾剂</u>	<u>mg/罐</u>
[0170]	'组合物 X'	20
	油酸	10
	三氯一氟甲烷	5,000
	二氯二氟甲烷	10,000
	二氯四氟乙烷	5,000
	<u>(vii)局部用凝胶 1</u>	<u>wt.%</u>
[0171]	'组合物 X'	5%
	卡波姆 934	1.25%
	三乙醇胺	适量
	(pH 调整至 5-7)	
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	纯净水	适量加至 100 克
	<u>(viii)局部用凝胶 2</u>	<u>wt.%</u>
[0172]	'组合物 X'	5%
	甲基纤维素	2%
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	尼泊金丙酯	0.02%
	纯净水	适量加至 100 克
	<u>(ix)外用药膏</u>	<u>wt.%</u>
[0173]	'组合物 X'	5%
	丙二醇	1%
	无水软膏基质	40%
	聚山梨酯 80	2%
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	纯净水	适量加至 100 克
	<u>(x)外用霜 1</u>	<u>wt.%</u>
[0174]	'组合物 X'	5%
	白蜂蜡	10%
	液体石蜡	30%
	苯甲醇	5%
	纯净水	适量加至 100 克
	<u>(xi)局部用乳霜 2</u>	<u>wt.%</u>
[0175]	'组合物 X'	5%
	硬脂酸	10%
	单硬脂酸甘油酯	3%
	聚氧乙烯硬脂醚	3%
[0176]	山梨糖醇	5%
	棕榈酸异丙酯	2%
	对羟基苯甲酸甲酯	0.2%
	纯净水	适量加至 100 克

[0177] 实施例3. 片剂形式

[0178] 下述制剂描述了能够用于本文所述化合物组合(例如,PAC-1和第三活性剂)或其药学上可接受的盐或溶合物的治疗或预防性给药的代表性药物剂型:

	<u>(i) 片剂 A</u>	<u>mg/片</u>
	PAC-1	250.0
	微晶纤维素	127.5
	甘露醇	50.0
[0179]	羧基乙酸淀粉钠	50.0
	煅制硅胶	2.5
	羟丙基纤维素	15.0
	硬脂酰富马酸钠	<u>5.0</u>
		500.0
	<u>(ii) Tablet B</u>	<u>mg/tablet</u>
	第二活性剂	250.0
	微晶纤维素	127.5
	甘露醇	50.0
[0180]	羧基乙酸淀粉钠	50.0
	煅制硅胶	2.5
	羟丙基纤维素	15.0
	硬脂酰富马酸钠	<u>5.0</u>
		500.0

[0181] 这些制剂可以通过制药领域公知的常规方法制备。应当理解，上述药物组合可以根据公知的制药技术进行改变以适应不同量和类型的活性成分“化合物X”。气溶胶配方(vi)可与标准、计量的气溶胶喷雾器一起使用。另外，具体的成分和比例只是用来进行说明。根据需要的剂型的期望的性质，具体成分可以用合适的等价物替代，并且比例也可以改变。

[0182] 文中描述了上述的一些实施方式和实施例，但这些描述都只是示意和说明性的，对本发明的范围不产生限制作用。根据本领域的普通技术可能进行一些改变和修饰，然而并不脱离本发明由下列权利要求所定义的较为宽泛的范围。

[0183] 所有的出版物、授权专利和专利申请文献均通过参考纳入文本，就如各自单独通过参考纳入本文那样。由这些公开物，应当不会引入与本文公开内容不一致的限制。本发明的描述引述了各种特定和优选的实施方式和技术方案。应当理解，还有许多变化和修饰可被采纳，仍然都应属于本发明的精神和范围。

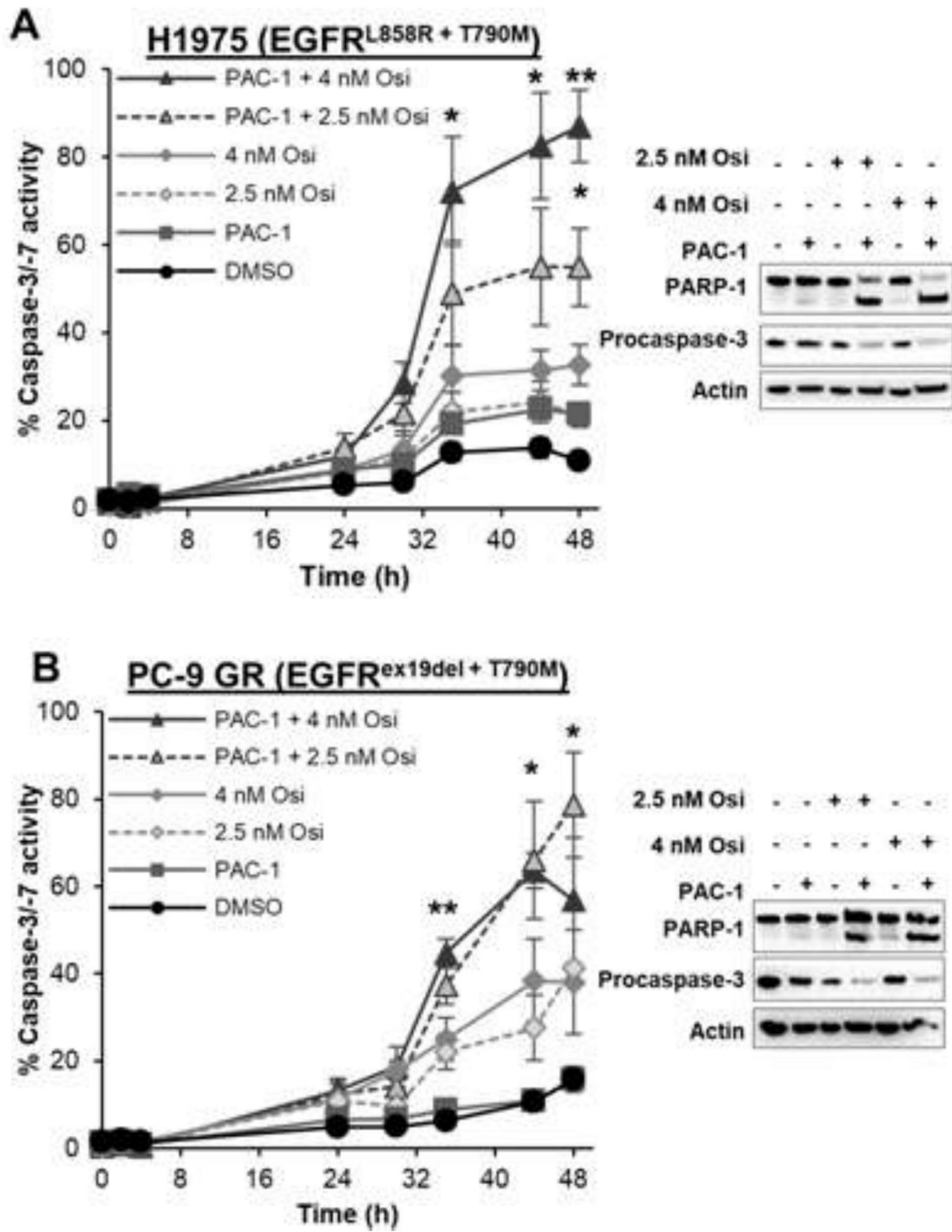


图1

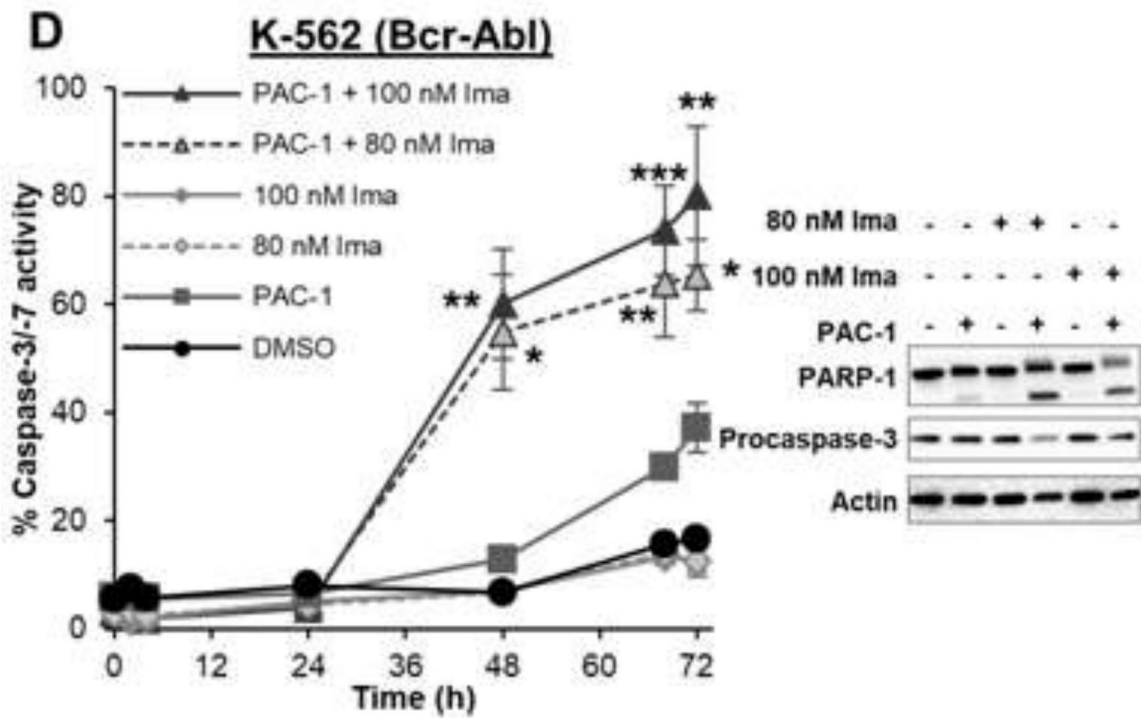
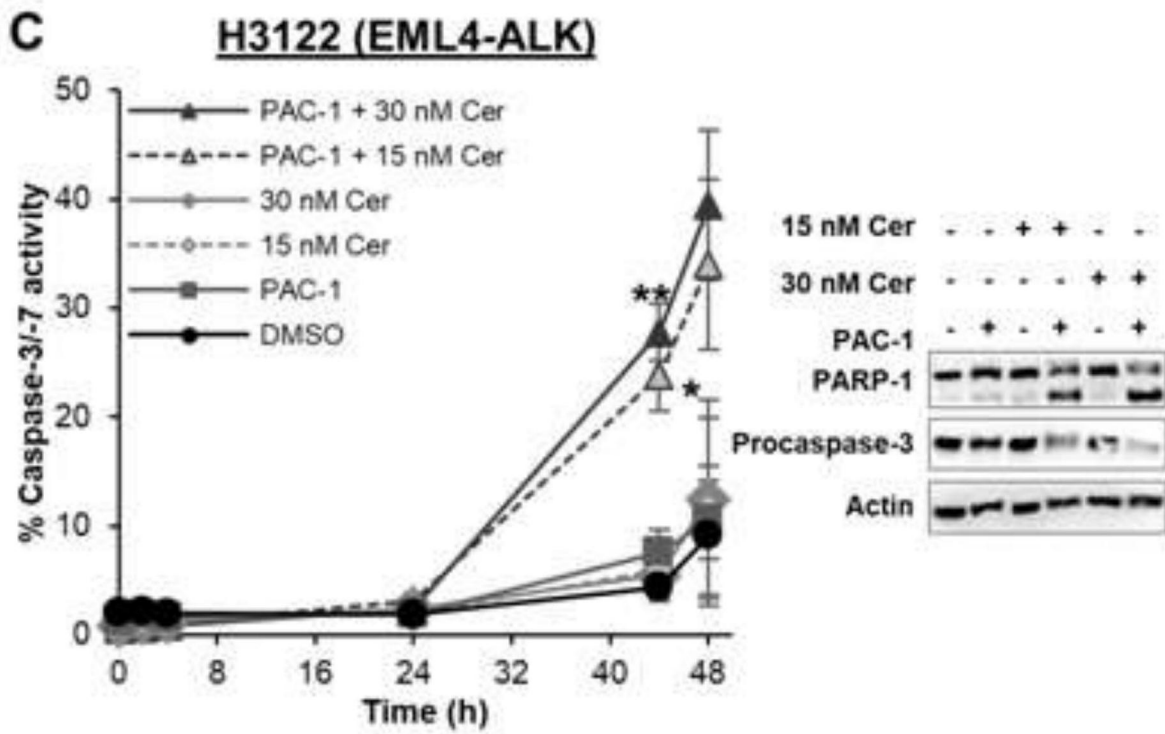


图1 (续)

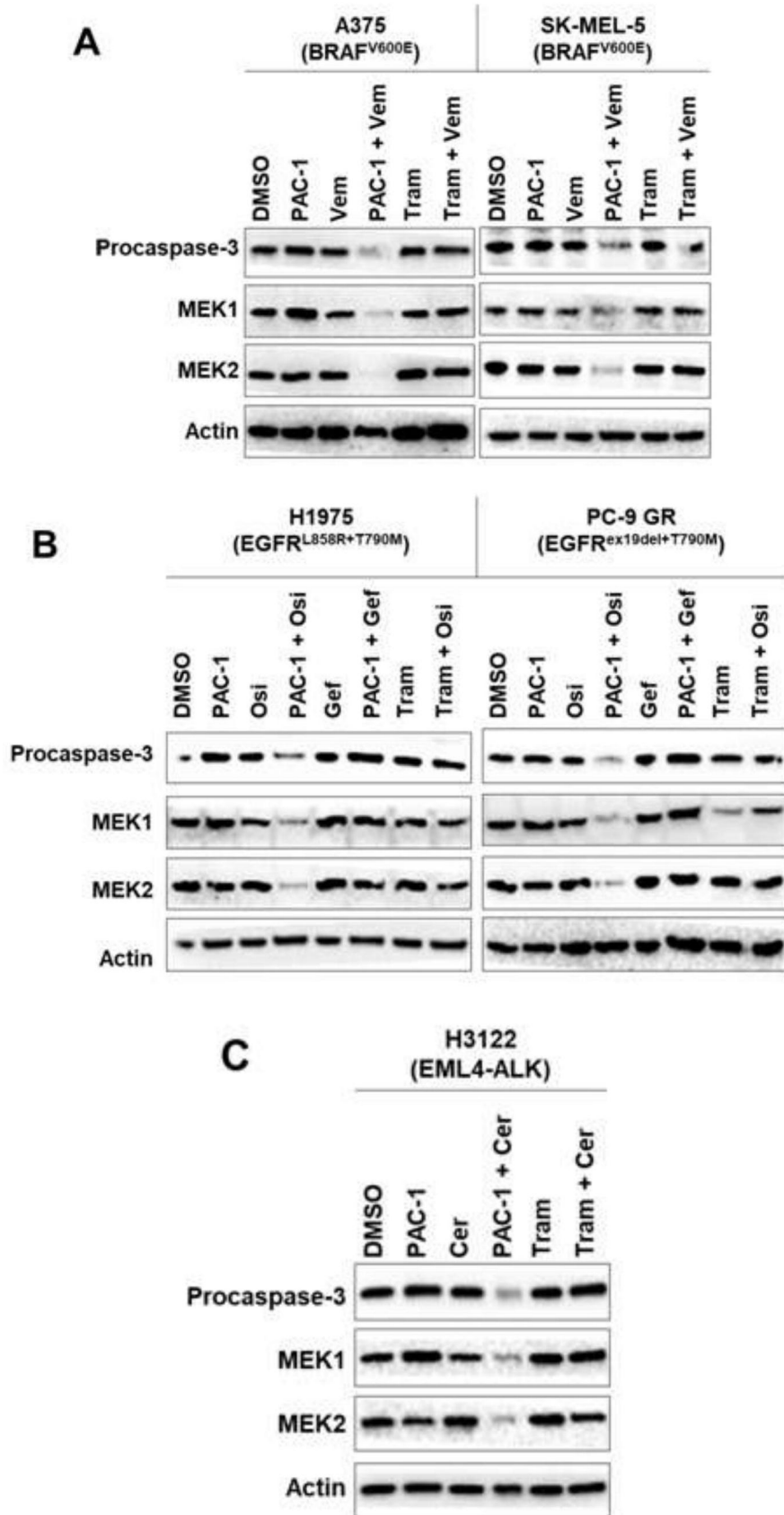


图2

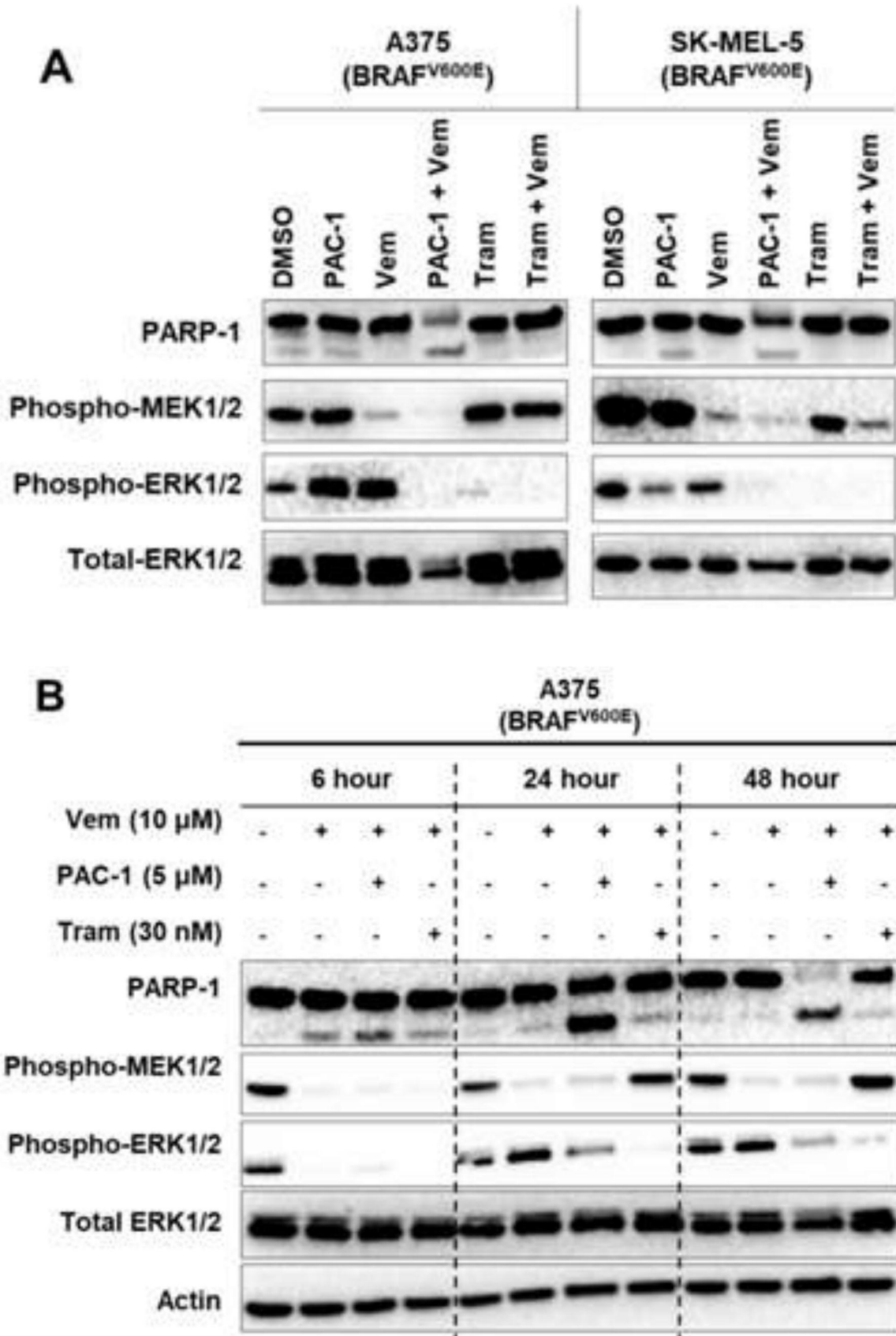


图3

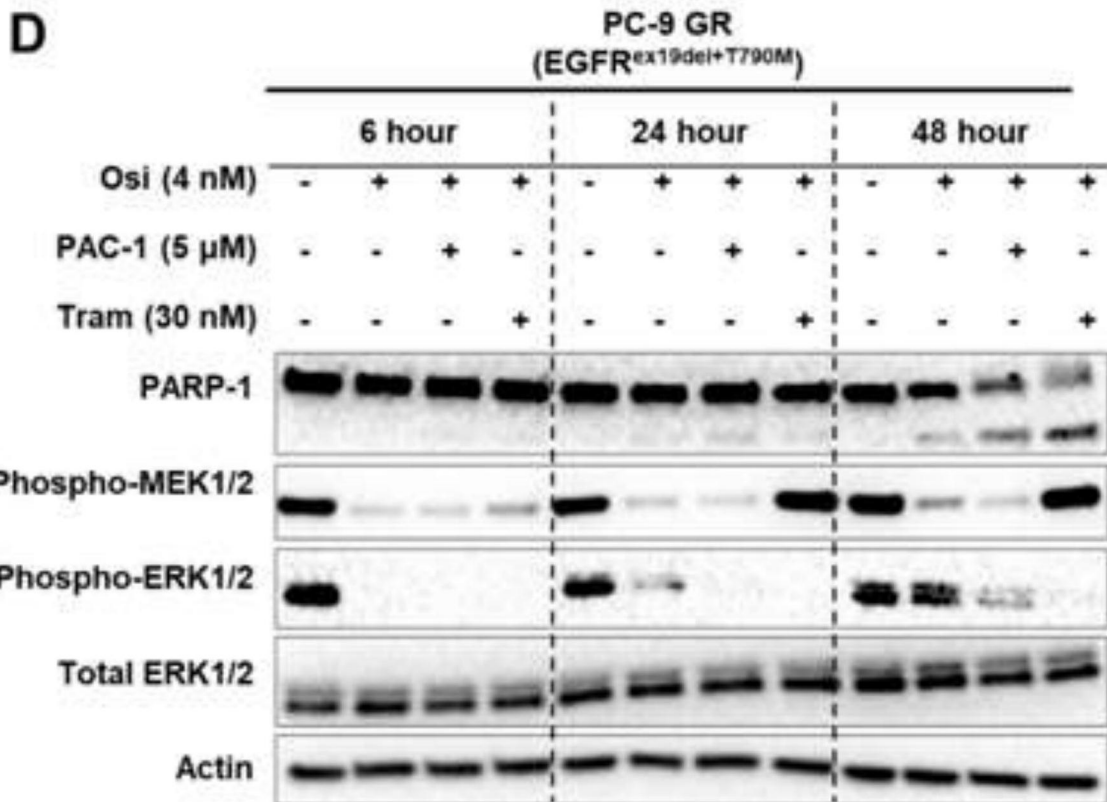
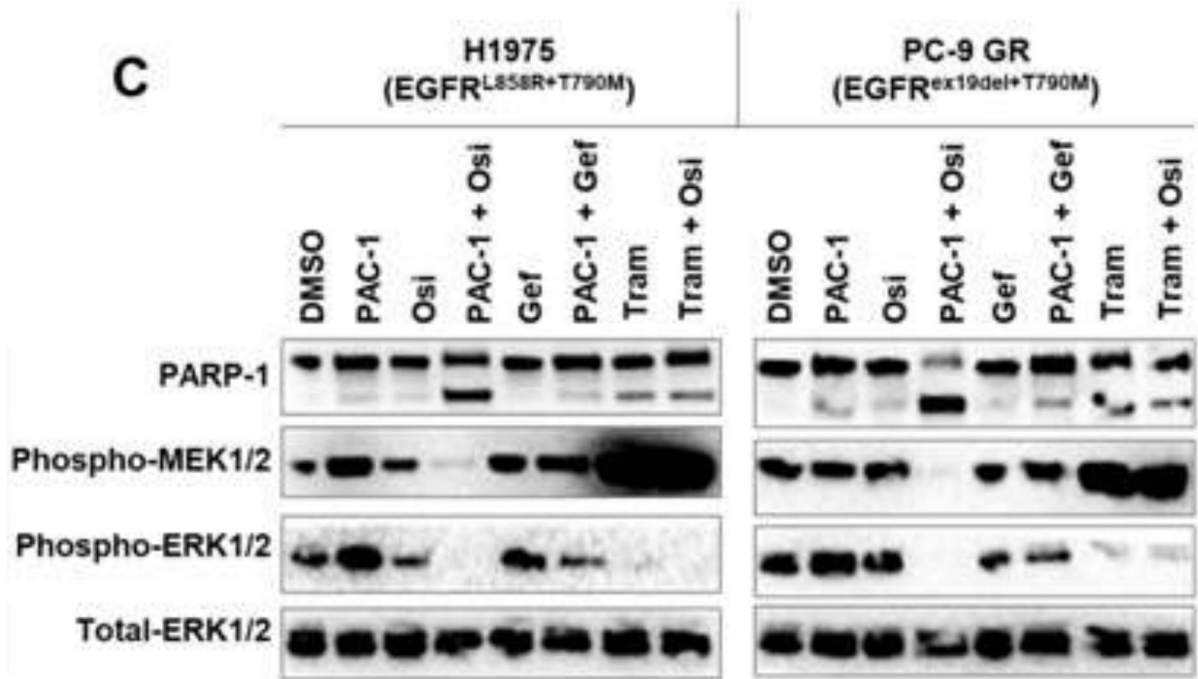


图3(续)

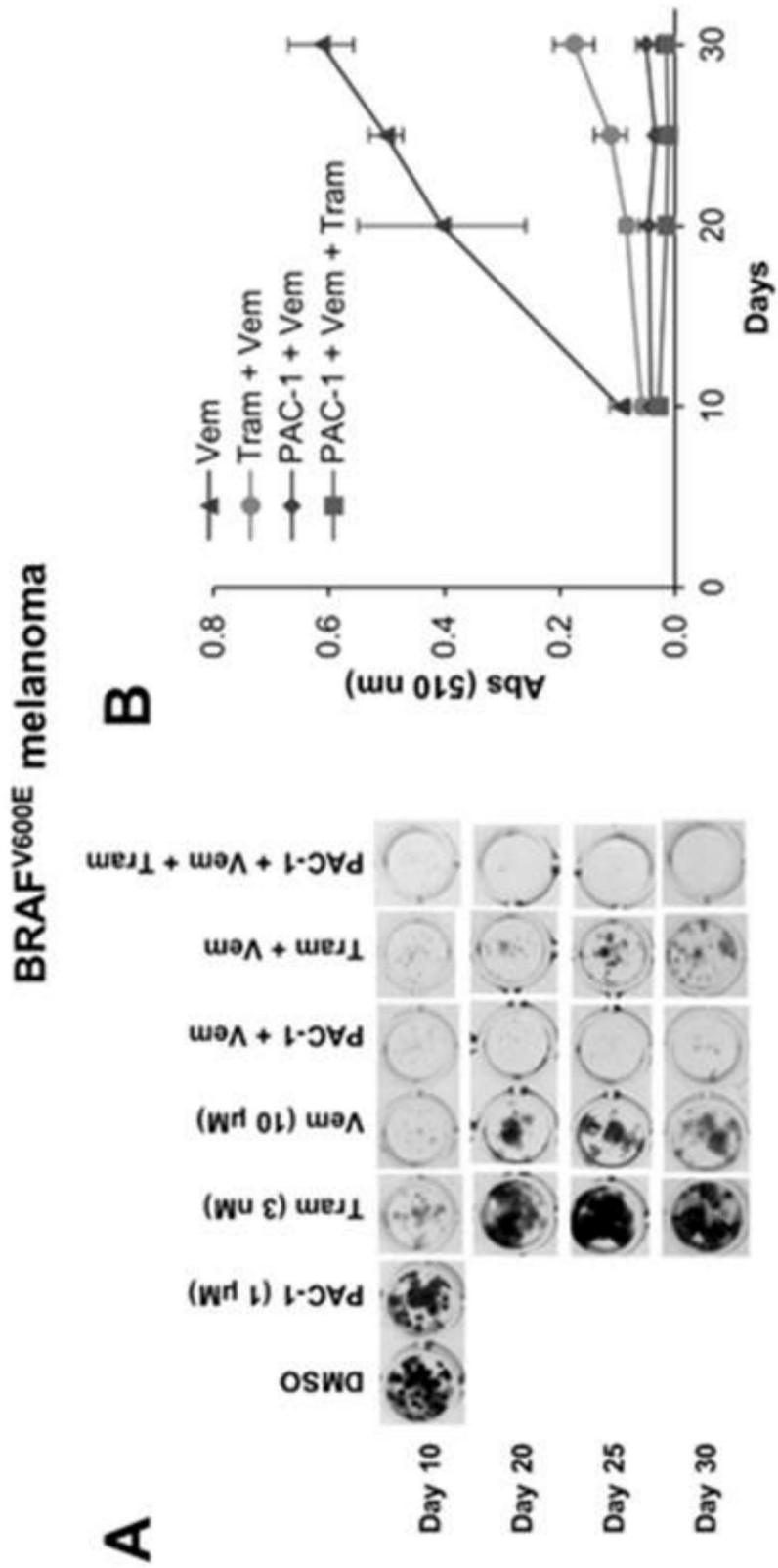


图4

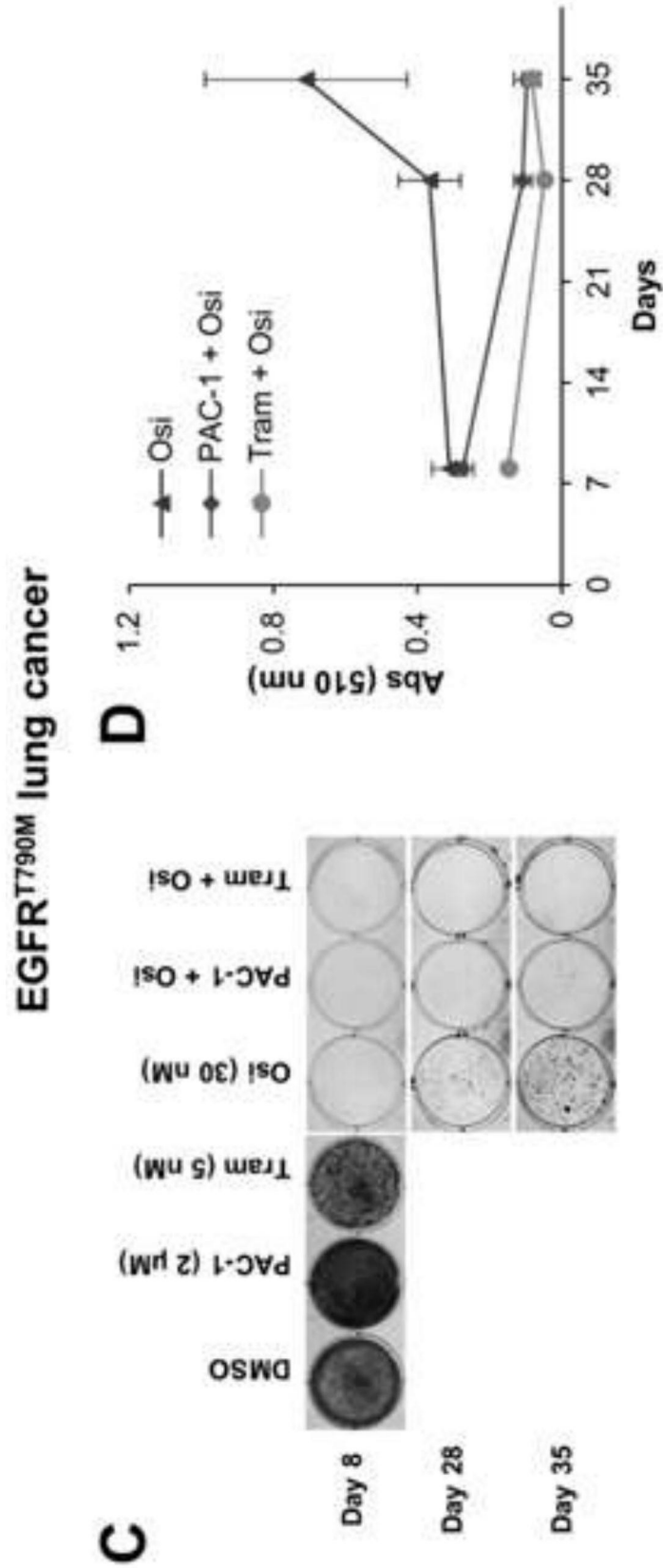


图4(续)

EML4-ALK lung cancer

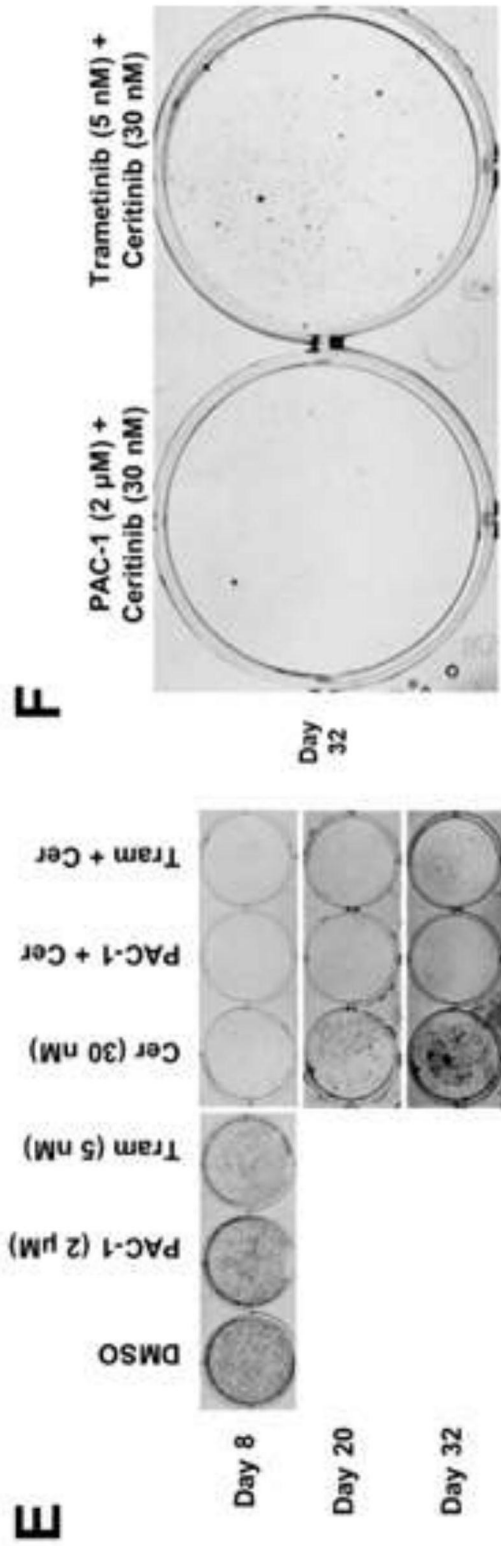


图4(续)

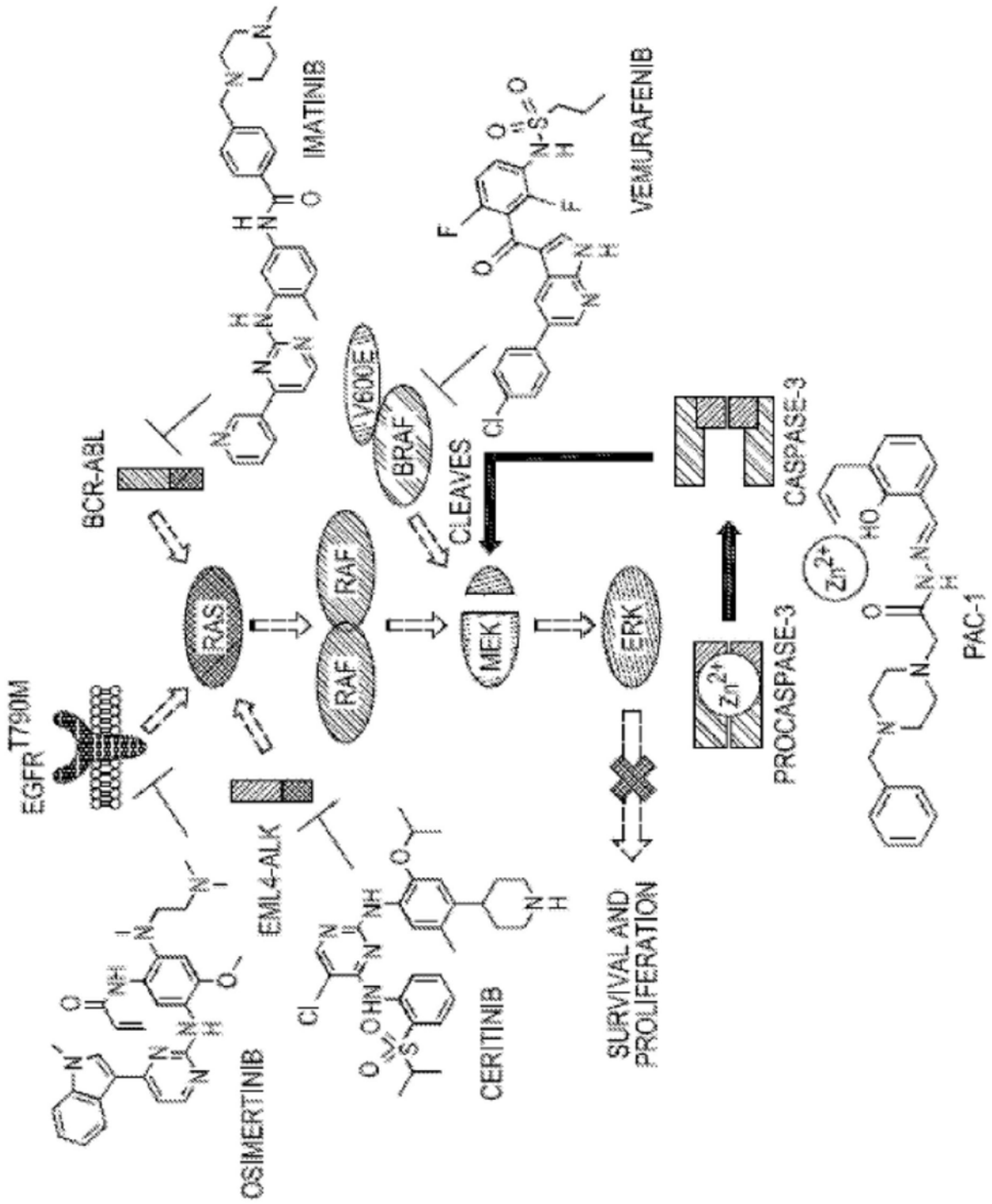


图5

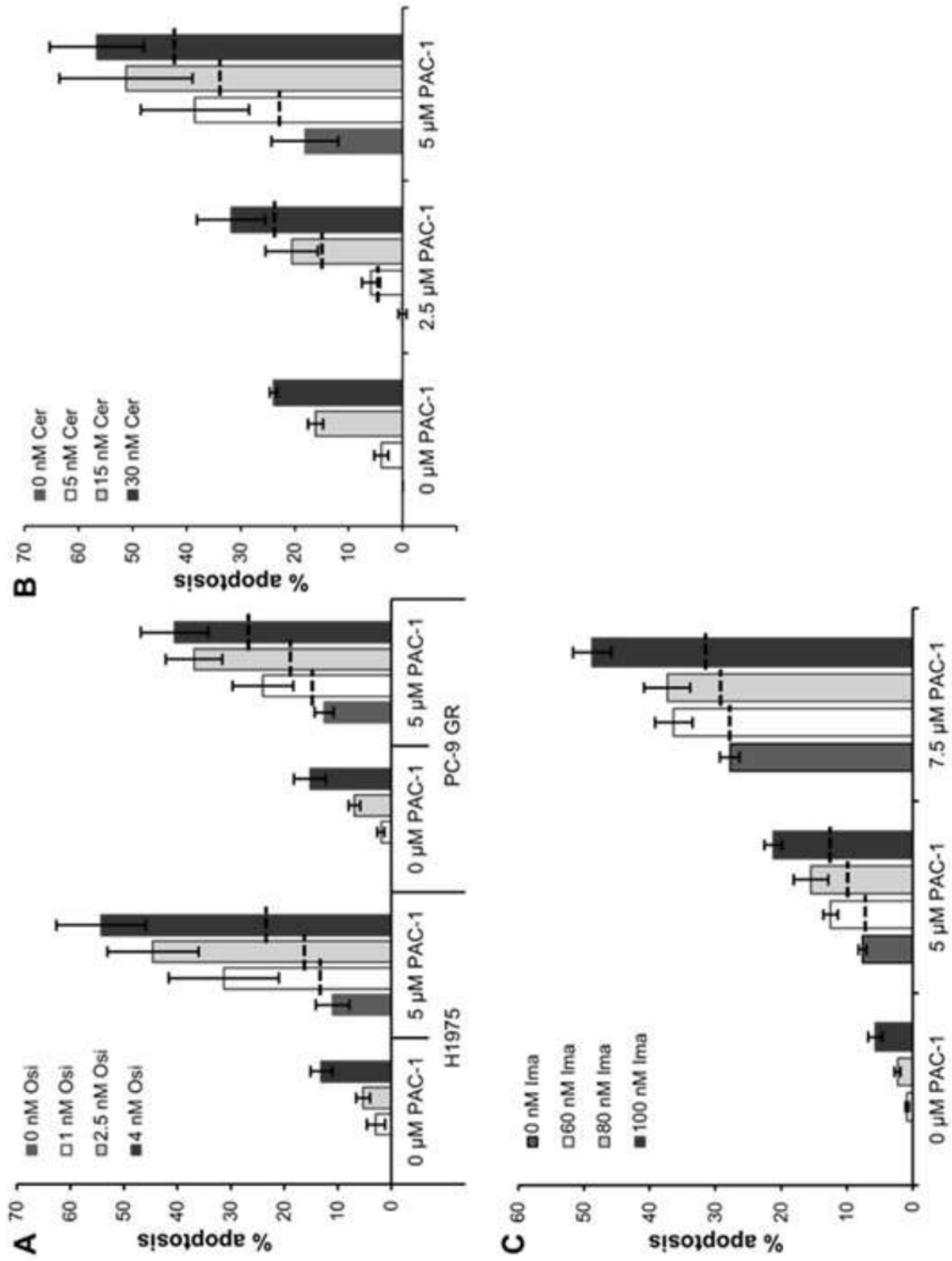


图6

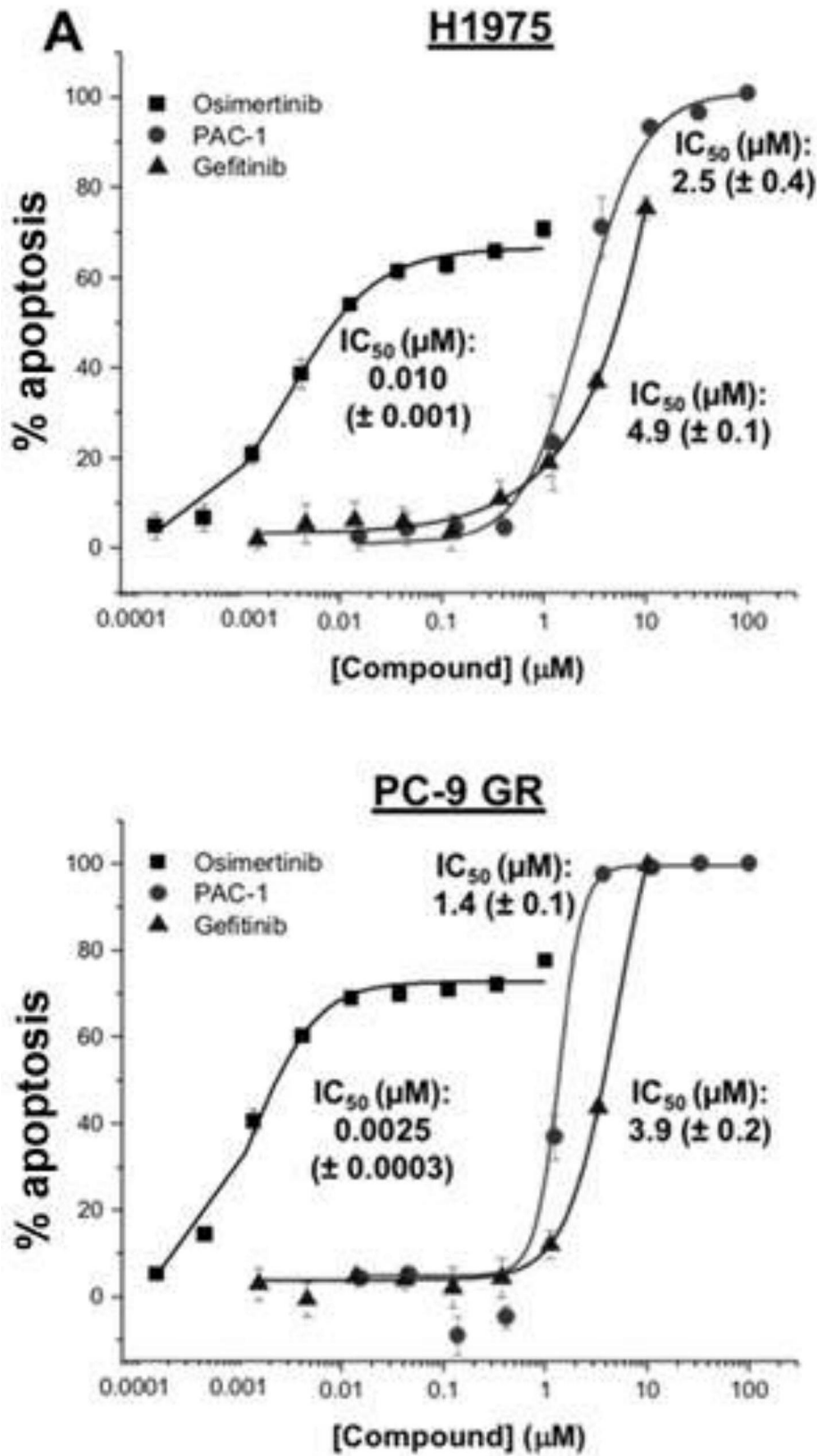


图7

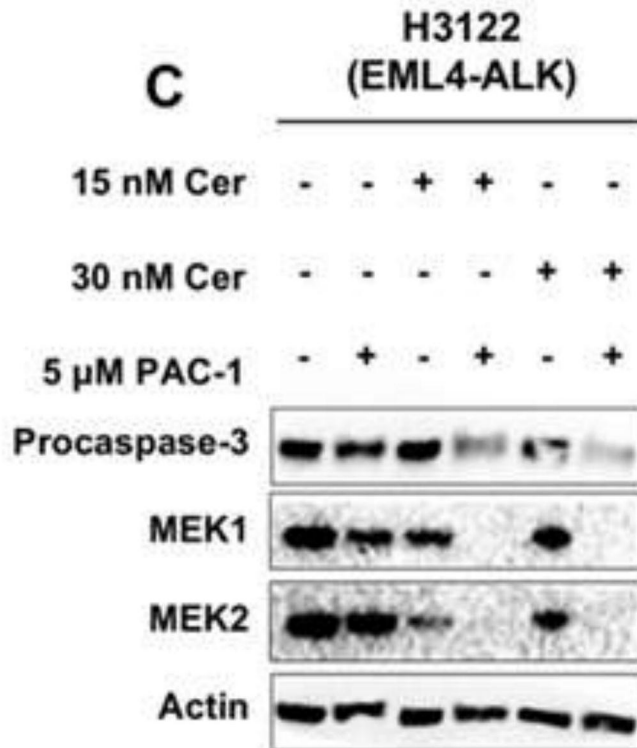
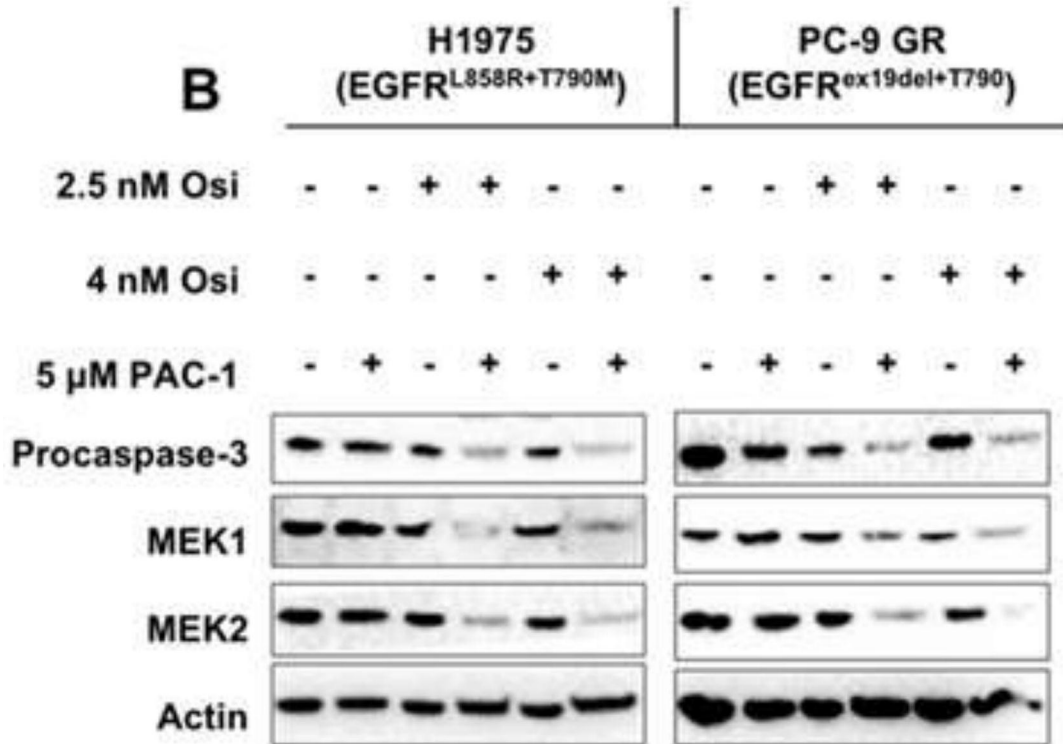


图7(续)

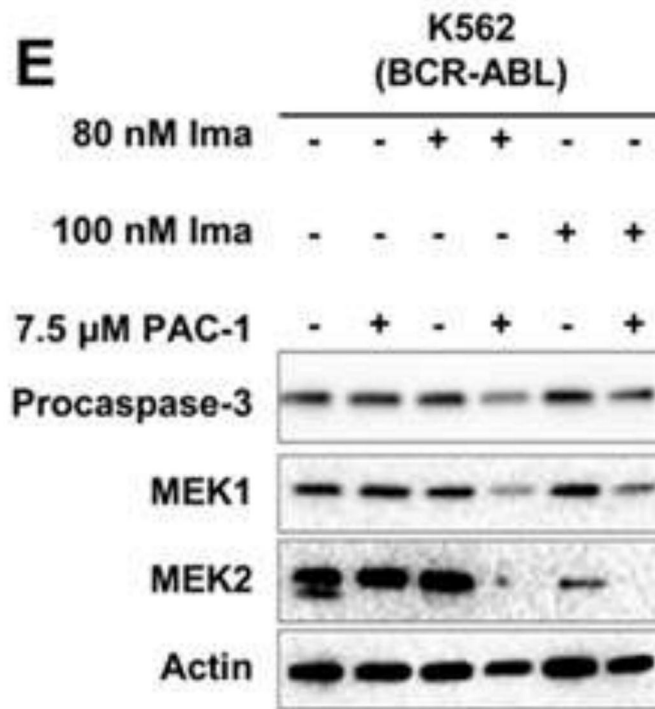
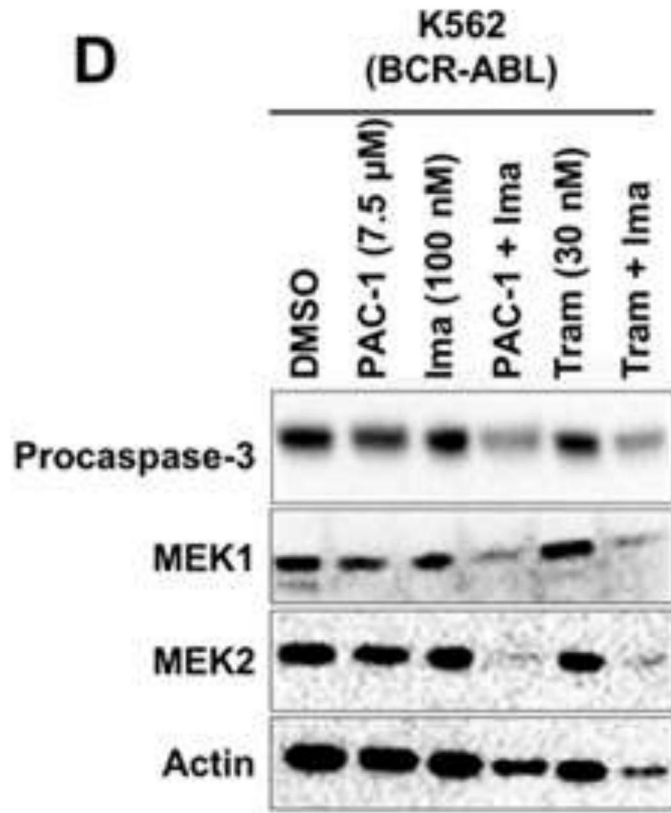


图7(续)

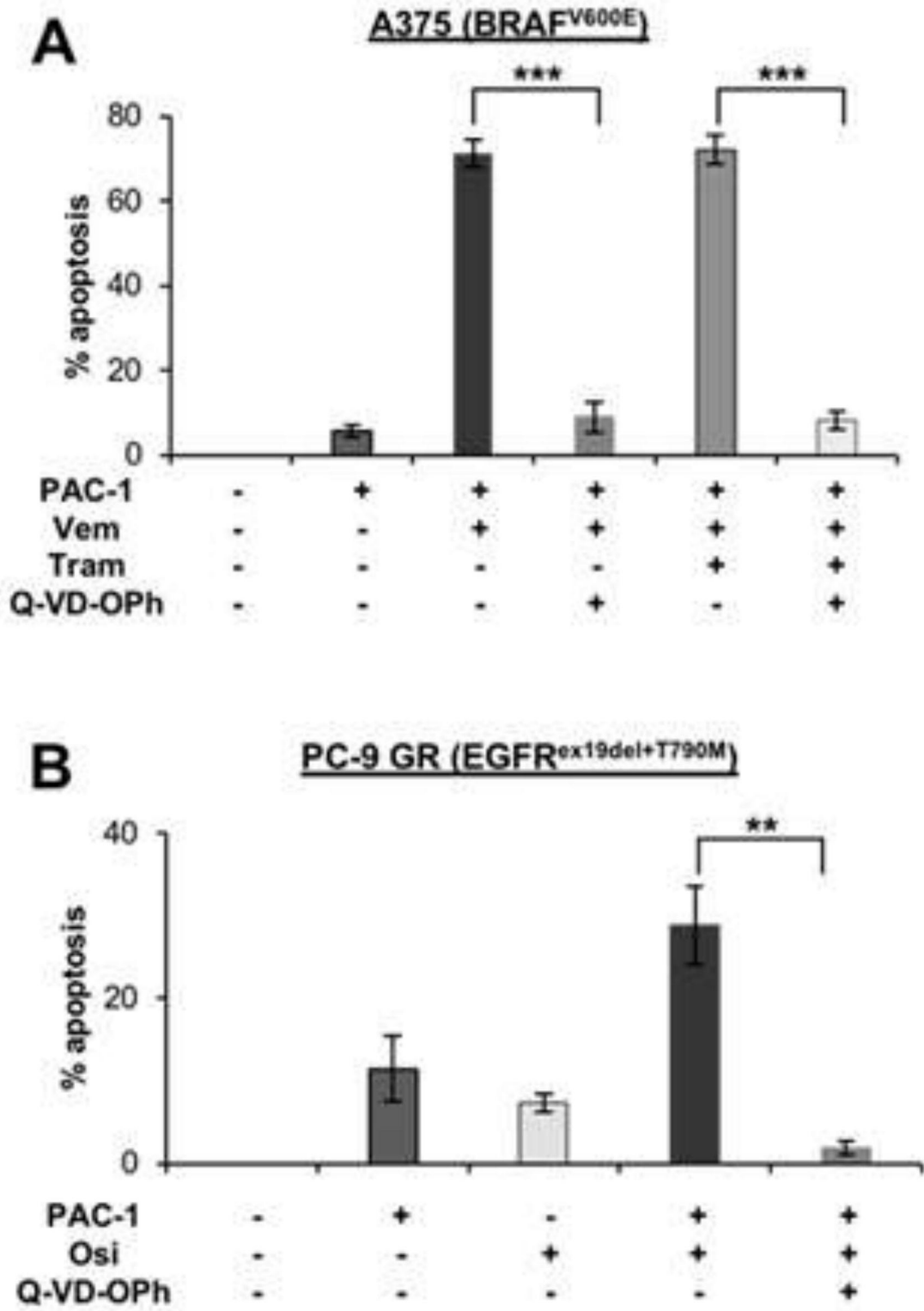


图8

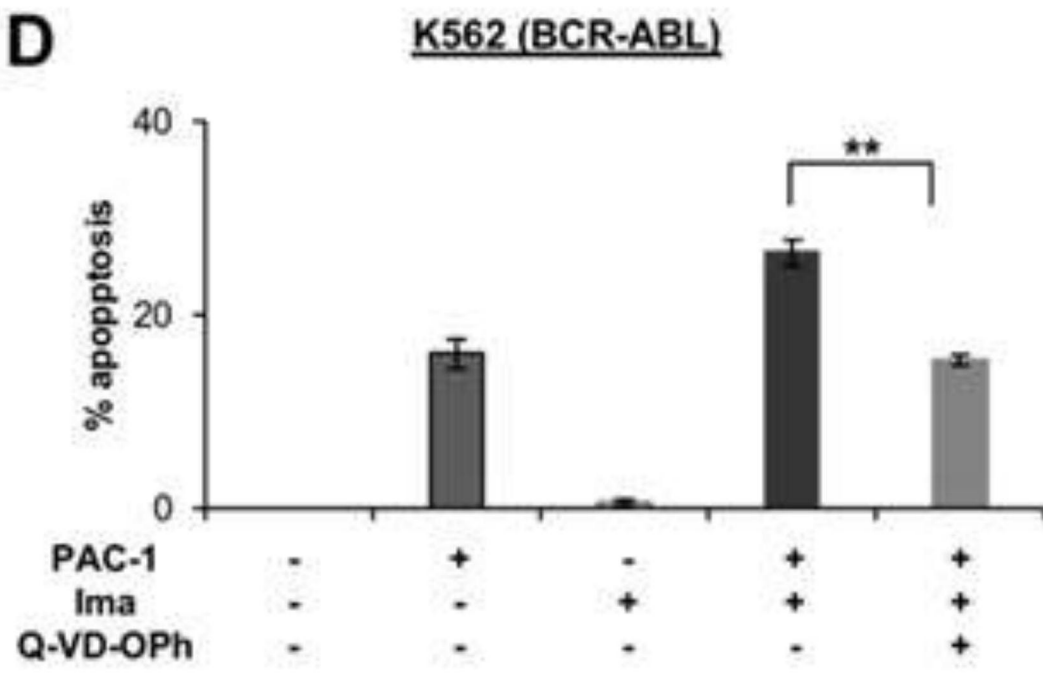
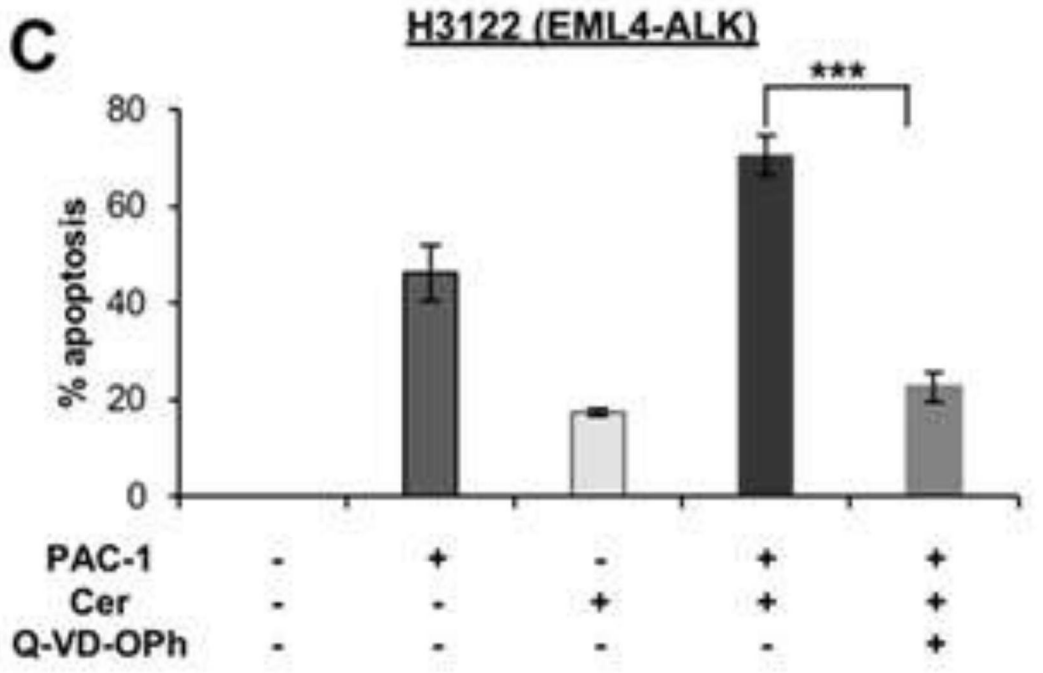


图8(续)

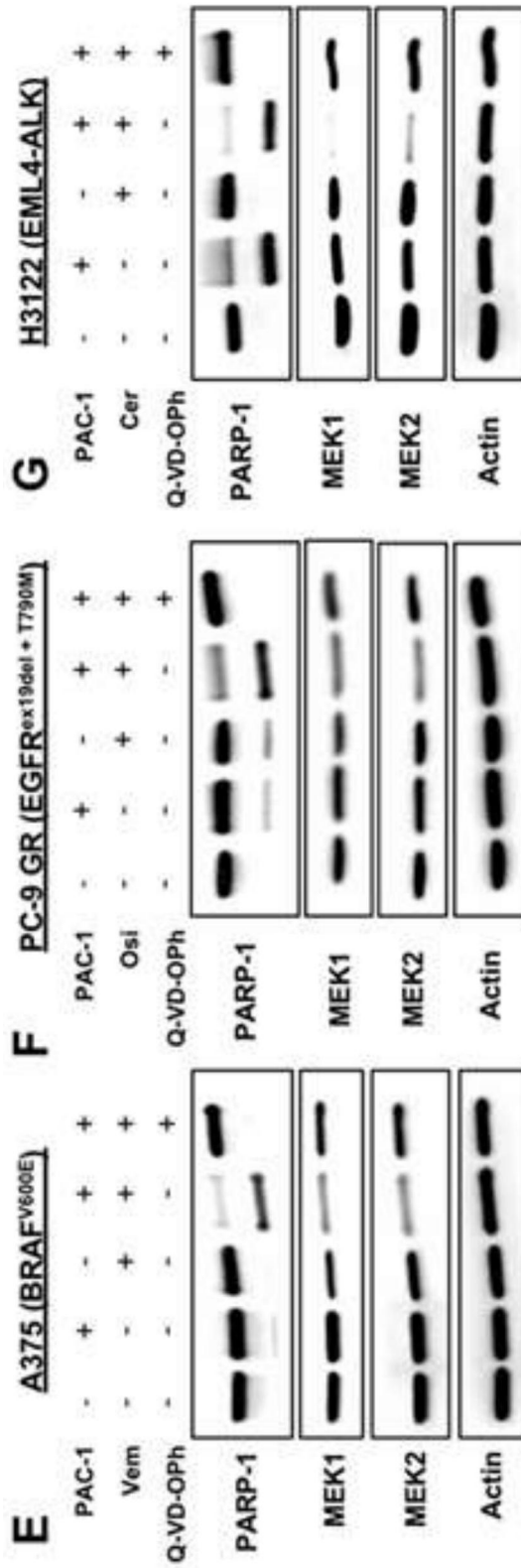


图8(续)

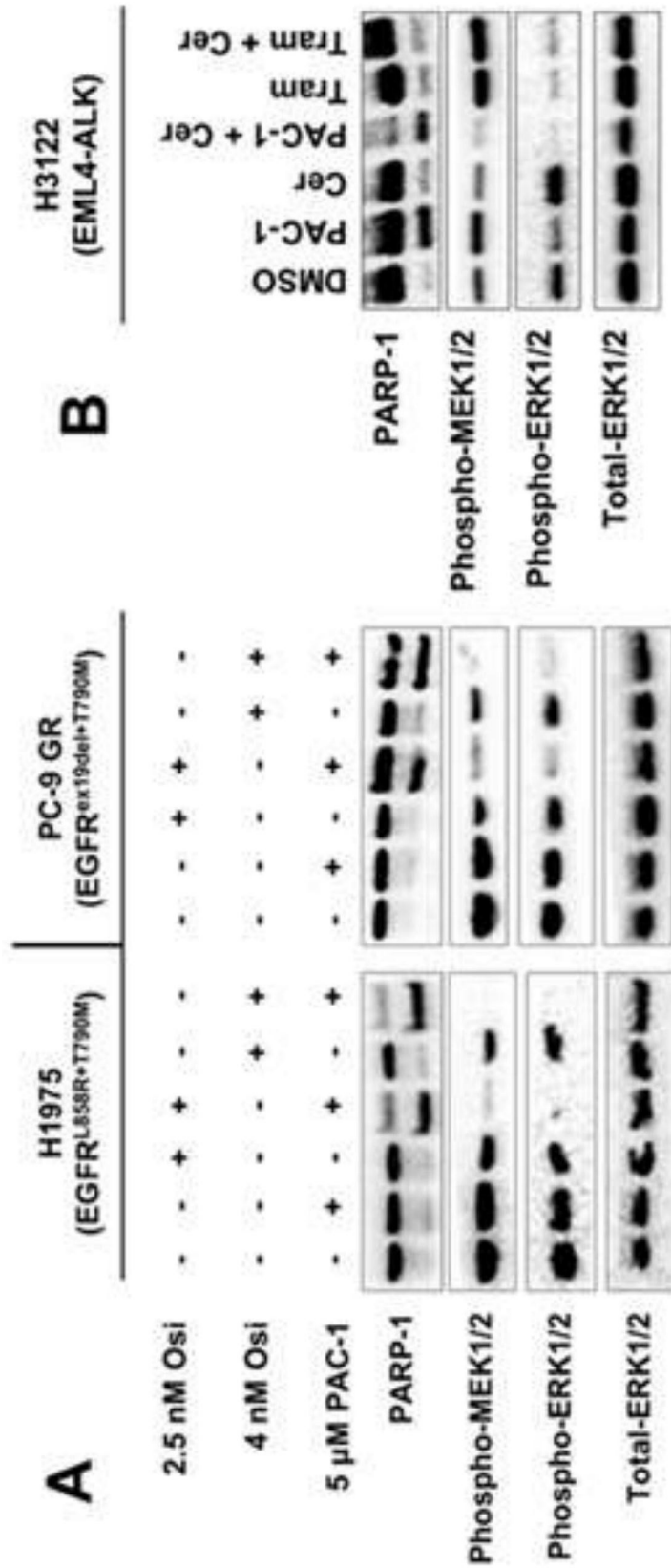


图9

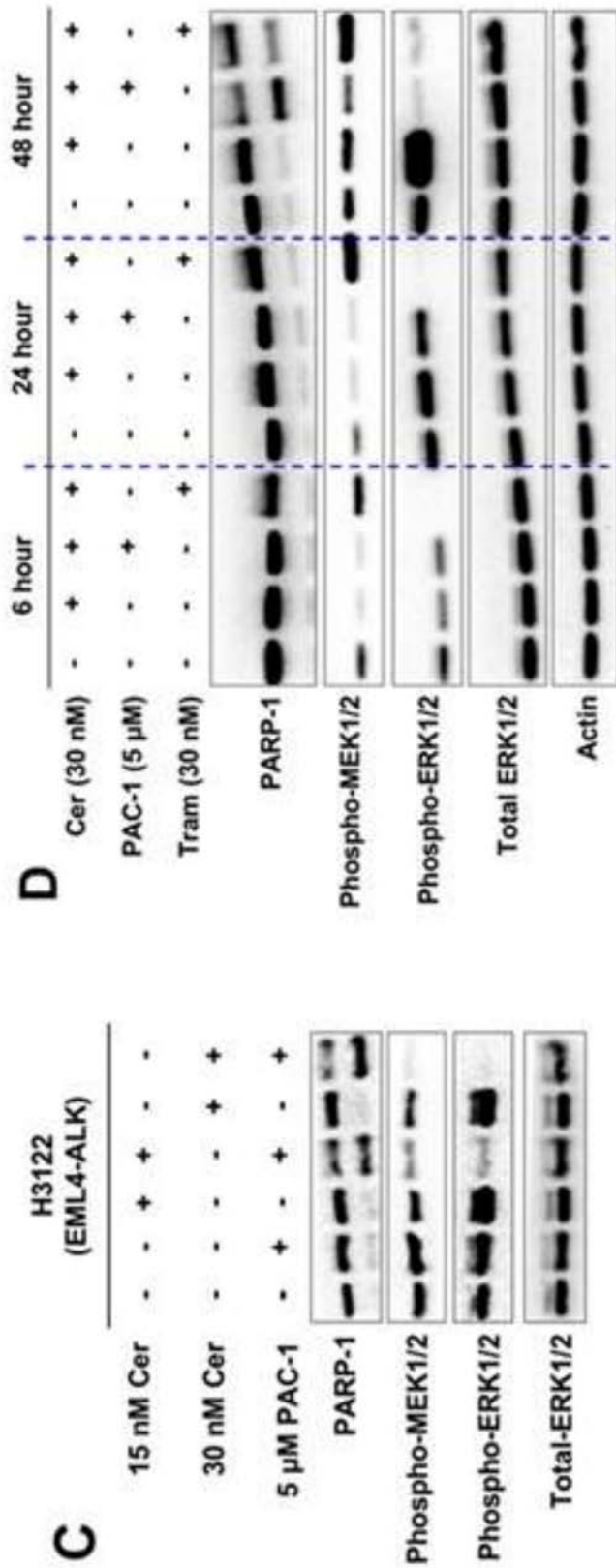


图9(续)

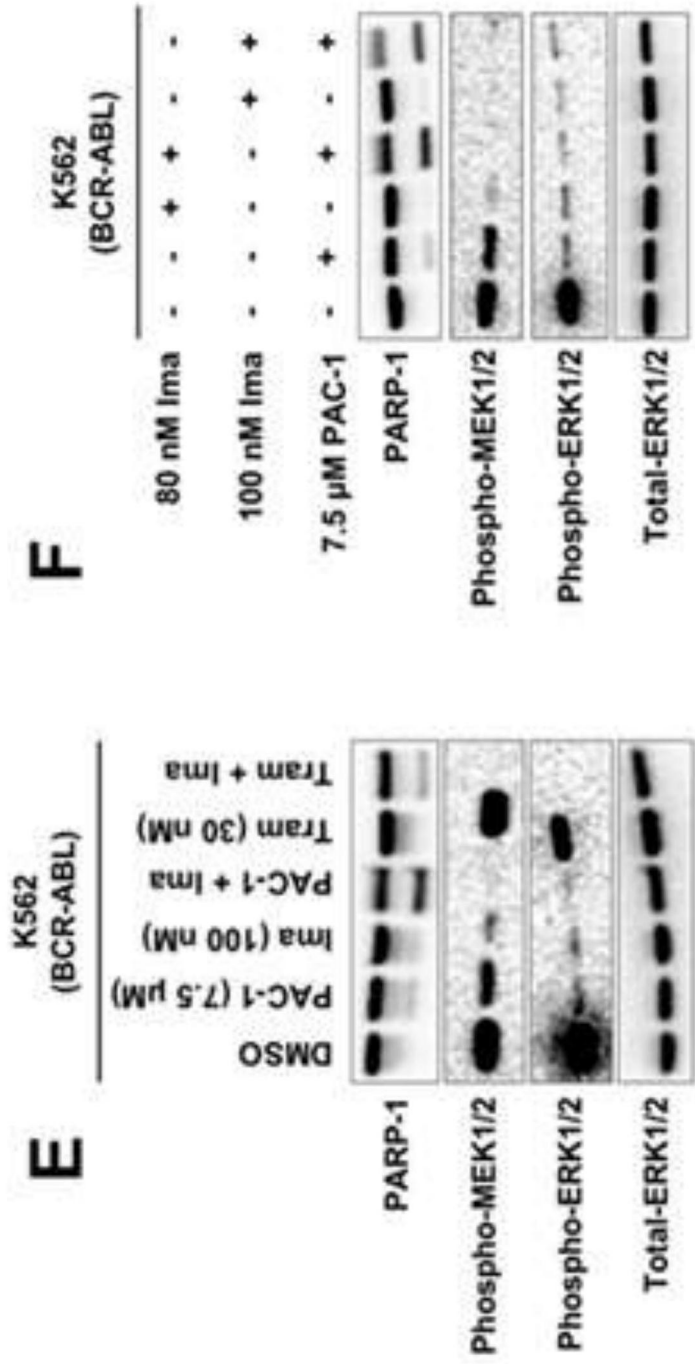
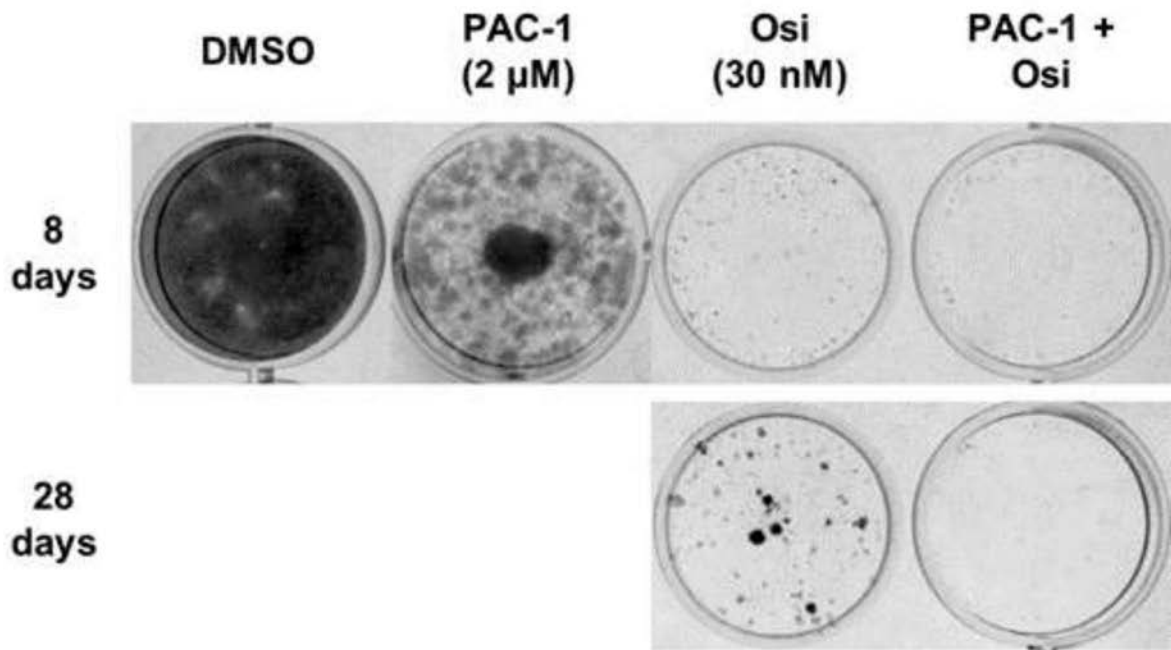


图9(续)

A PC-9 GR (EGFR^{ex19del} + T790M)



B H1975 (EGFR^{L858R} + T790M)

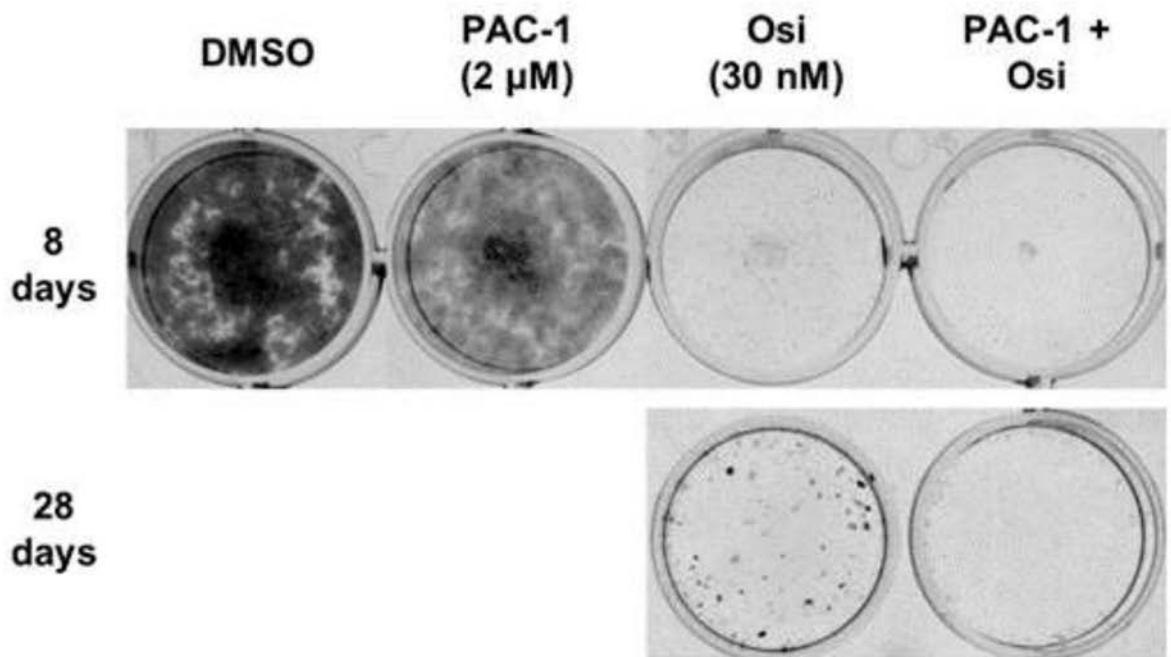


图10

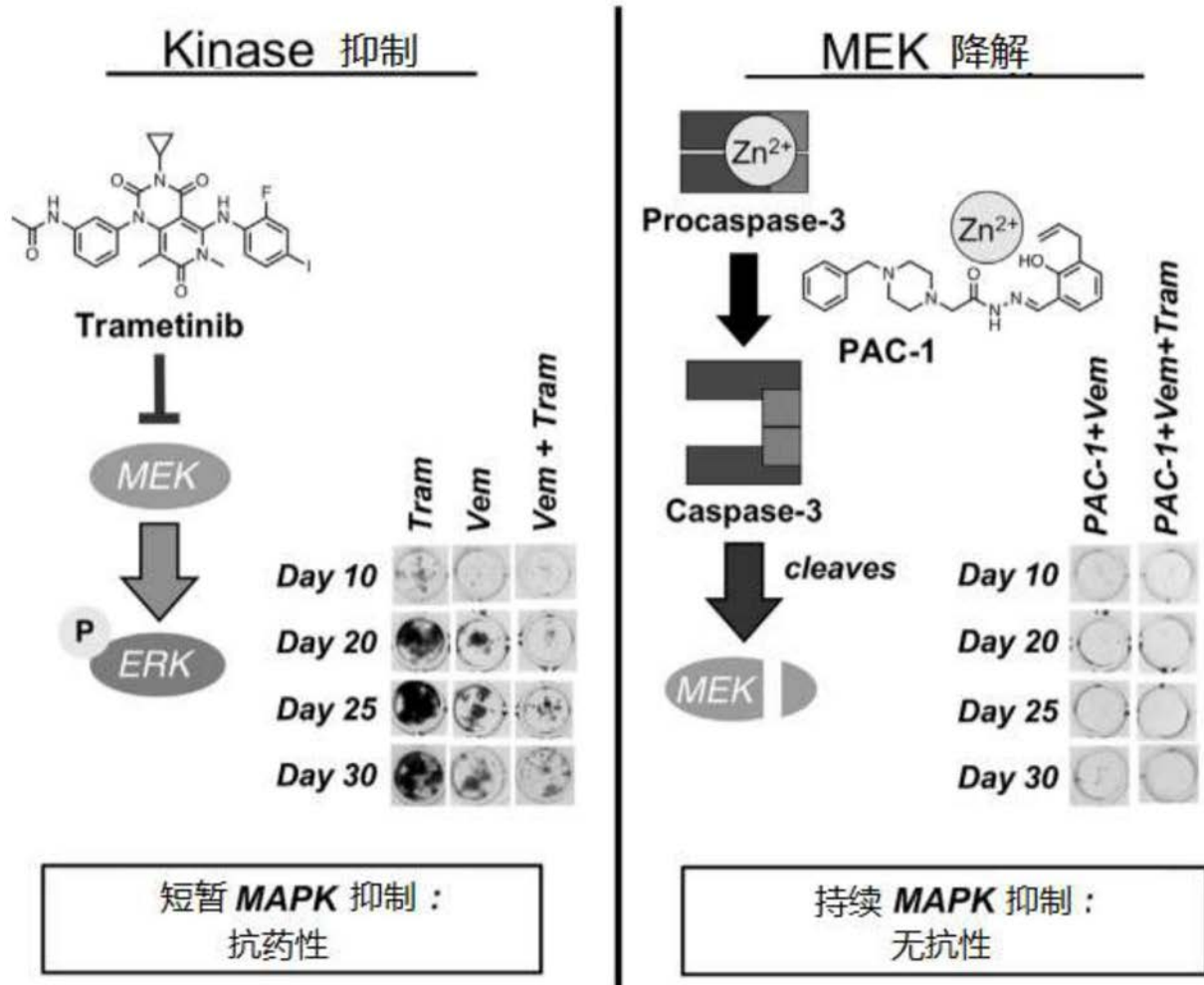


图11